

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání elektrochemických vlastností borem dopovaných  
diamantových elektrod s různým obsahem boru a jejich využití pro  
stanovení leukovorinu

Bc. Barbora Kránková

Diplomová práce

2017

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Comparison of the electrochemical properties of boron doped  
diamond electrodes with different boron content and their application  
for leucovorin determination

Bc. Barbora Kránková

Diploma Thesis

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Kráňková**  
Osobní číslo: **C15481**  
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Porovnání elektrochemických vlastností borem dopovaných  
diamantových elektrod s různým obsahem boru a jejich  
využití pro stanovení leukovorinu**  
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod a pracovních elektrod používaných v elektroanalytické chemii. Zpracujte literární rešerši na téma borem dopované diamantové elektrody (BDDE), jejich vlastnosti a možnosti využití v oblasti analýzy organických látek.
2. Zpracujte informace z literatury týkající se leukovorinu a problematiky voltametrického chování této látky, resp. možnosti jejího stanovení s využitím jednotlivých voltametrických metod v kombinaci s různými pracovními elektrodami.
3. V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování leukovorinu na komerčně dostupné BDDE a navrhnete metodu jeho stanovení.
4. Otestujte základní elektrochemické vlastnosti BDDE s různým obsahem boru prostřednictvím analýzy reverzibilních redoxních systémů. Ověřte možnosti využití těchto elektrod při stanovení leukovorinu aplikací metody navržené pro komerční BDDE a porovnejte dosažené statistické parametry.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**25. ledna 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. ledna 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Barbora Kránková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, trpělivost, pomoc a cenné rady během vypracování této mojí práce. Dále bych také ráda poděkovala mé konzultantce Ing. Michaelě Štěpánkové a Ing. Pavlíně Martinkové za pomoc a rady při vzniku experimentální části mé diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce bylo porovnání elektrochemických vlastností a aplikačních možností borem dopovaných diamantových elektrod s různým obsahem boru. Elektrochemické vlastnosti byly studovány zejména pomocí cyklické voltametrie reverzibilních redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Jako analyt pro porovnání aplikačních možností byl zvolen leukovorin, který se využívá při léčbě nádorových onemocnění. V rámci diplomové práce byla vyvinuta metoda jeho stanovení s využitím komerčně dostupné borem dopované diamantové elektrody, která byla následně aplikována na testované elektrody. Získané výsledky byly na závěr porovnány a diskutovány.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda, elektrochemické vlastnosti, leukovorin

## **ANNOTATION**

The aim of this diploma thesis was to compare electrochemical properties and application possibilities of boron-doped diamond electrodes with different boron content. Electrochemical properties were studied mainly by cyclic voltammetry of reversible redox markers  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Leucovorin, a drug used for a treatment of various types of cancer, was chosen as an analyte for the comparison of practical applicability of the investigated electrodes. Within the thesis, analytical method of its determination was developed using commercially available boron-doped diamond electrode at first and was subsequently applied to the tested electrodes. The obtained results were finally compared and discussed.

## **KEY WORDS**

Voltammetry, boron-doped diamond electrode, electrochemical properties, leucovorin

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>15</b>
2.1	VOLTAMETRIE .....	15
2.1.1	Úvod do polarografie, voltametrie .....	15
2.1.1.1	Uspořádání elektrochemického článku .....	17
2.1.1.2	Polarizační křivka .....	19
2.1.2	Polarografické / voltametrické metody .....	20
2.1.2.1	Stacionární voltametrie .....	20
2.1.2.2	Cyklická voltametrie .....	21
2.1.2.3	Diferenčně pulsní voltametrie .....	21
2.1.2.4	Rozpouštěcí voltametrie .....	22
2.1.3	Běžně používané pracovní elektrody ve voltametrické .....	23
2.1.3.1	Rtuťové pracovní elektrody .....	24
2.1.3.2	Pevné pracovní elektrody .....	25
2.1.4	Perspektivní elektrodové materiály .....	27
2.1.4.1	Bismutové elektrody .....	27
2.1.4.2	Amalgámové pracovní elektrody .....	28
2.1.4.3	Uhlíkové pastové elektrody .....	29
2.1.4.4	Kompozitní elektrody .....	30
2.1.5	Borem dopovaná diamantová elektroda .....	30
2.2	LEUKOVORIN .....	33
2.2.1	Fyzikálně chemické vlastnosti leukovorinu .....	33
2.2.2	Mechanismus působení leukovorinu při medicínských aplikacích .....	34
2.2.3	Voltametrické chování leukovorinu .....	36
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	38
3.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	38
3.3	PRACOVNÍ POSTUPY .....	40
3.3.1	Příprava BDDE k měření .....	40
3.3.2	Voltametrická měření .....	41
3.3.3	Analýza farmaceutického přípravku .....	41

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>43</b>
4.1	STUDIUM VOLTAMETRICKÉHO CHOVÁNÍ LEUKOVORINU NA BDDE A VÝVOJ METODY STANOVENÍ .....	43
4.1.1	<i>Studium voltametrického chování leukovorinu na BDDE</i> .....	43
4.1.1.1	Závislost na pH .....	44
4.1.1.2	Závislost na rychlosti polarizace .....	46
4.1.2	<i>Vývoj metody stanovení leukovorinu s využitím BDDE</i> .....	48
4.1.2.1	Optimalizace podmínek stanovení leukovorinu .....	49
4.1.2.2	Analýza modelových roztoků leukovorinu .....	53
4.1.2.3	Analýza farmaceutického přípravku .....	57
4.2	CHARAKTERIZACE BOREM DOPOVANÝCH DIAMANTOVÝCH ELEKTROD .....	59
4.2.1	<i>Elektrochemická charakterizace komerčně dostupné BDDE</i> .....	62
4.2.2	<i>Charakterizace testovaných BDDE s různým obsahem boru</i> .....	68
4.2.2.1	Povrchová charakterizace .....	68
4.2.2.2	Elektrochemická charakterizace pomocí $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ .....	69
4.2.2.3	Elektrochemická charakterizace pomocí $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ .....	77
4.3	APLIKAČNÍ MOŽNOSTI BDDE S RŮZNÝM OBSAHEM BORU PŘI ANALÝZE LEUKOVORINU .....	84
4.3.1	<i>Koncentrační závislosti leukovorinu a příslušné statistické parametry</i> .....	84
4.3.2	<i>Analýza modelových roztoků leukovorinu</i> .....	88
4.3.3	<i>Analýza farmaceutického přípravku</i> .....	90
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>93</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>95</b>

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

5,10-methylen-THF	5,10-methylentetrahydrofolát
5-FdUMP	5-fluorodeoxyuridinmonofosfát
5-FU	5-fluorouracil
5-methyl-THF	5-methyl-tetrahydrofolát
A	elektroaktivní plocha elektrody [ $\text{mm}^2$ ]
AdSV	adsorptivní rozpouštěcí voltametrie
AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie
AV ČR	Akademie věd České republiky
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BiBE	elektroda tvořená bismutovým diskem
Bi-CPE	bismutem modifikovaná uhlíková pastová elektroda
BRB	Britton-Robinsonův pufr
$c$	koncentrace [ $\text{mol/l}$ ]
$c^*$	koncentrace u povrchu elektrody [ $\text{mol/l}$ ]
$c^0$	koncentrace v roztoku [ $\text{mol/l}$ ]
C1	jednouhlíkatý zbytek
CAgAE	krystalová stříbrná amalgámová elektroda
CPE	uhlíková pastová elektroda
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie
CV	cyklická voltametrie
CVD	chemická depozice par
$D$	difuzní koeficient [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
$D_{\text{ox}}$	difuzní koeficient oxidované formy [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
$D_{\text{red}}$	difuzní koeficient redukované formy [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
DCV	stacionární voltametrie
DHF	dihydrofolát
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DME	kapající rtuťová elektroda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
dTMP	deoxythymidinmonofosfát

dUMP	deoxyuridinmonofosfát
$E$	potenciál [V]
$E^0$	standardní elektrodový potenciál [V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [V]
$E_{ak}$	potenciál akumulace [V]
$E_{kon}$	konečný potenciál [V]
$E_{obratu}$	potenciál obratu [V]
$E_p$	potenciálu píku [V]
$E_{pa}$	potenciál anodického píku [V]
$E_{pc}$	potenciál katodického píku [V]
$E_{poč}$	počáteční potenciál [V]
$E_{reg}$	regenerační potenciál [V]
$E_v$	vložené napětí [V]
$F$	Faradayova konstanta [C]
FA	kyselina listová
FH2	dihydrofolát
FH4	tetrahydrofolát
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
CH2FH4	5,10-methyilentetrahydrofolát
$I$	proud [A]
$I_d$	difuzní proud [A]
$\bar{I}_d$	střední difuzní proud [A]
$I_{d(lim)}$	limitní difuzní proud [A]
$I_c$	nabíjecí proud [A]
$I_k$	kinetický proud [A]
$I_p$	proud píku [A]
$I_{pa}$	proud anodického píku [A]
$I_{pc}$	proud katodického píku [A]
IARC	International Agency for Research on Cancer (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny)
$k$	konstanta
$k_{app}^0$	zdánlivá konstanta přenosu náboje [cm/s]

LD <sub>50</sub>	letální dávka, která vede k úmrtí poloviny testovaných zvířat
LDR	lineární dynamický rozsah
LOD	detekční limit
LOQ	mez stanovitelnosti
LV	leukovorin
<i>m</i>	hmotnost rtuťové kapky [g]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
MeA-PE	pastová amalgámová elektroda bez pastovací kapaliny
MeSA-CE	kompozitní amalgámová elektroda
MeSAE	pevná amalgámová elektroda
MeSA-PE	pastová amalgámová elektroda s pastovací kapalinou
MF-AgSAE	rtuťovým filmem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
MFE	rtuťová filmová elektroda
MF-MeSAE	rtuťovým filmem modifikovaná pevná amalgámová elektroda
m-MeSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná pevná amalgámová elektroda
MTX	metotrexát
MTX(Glu) <sub>n</sub>	polyglutamát metotrexátu
<i>n</i>	počet vyměněných elektronů
p-AgSAE	leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda
p-MeSAE	leštěná pevná amalgámová elektroda
<i>R</i>	korelační koeficient
RNA	ribonukleová kyselina
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka [%]
RVC	síťovaný skelný uhlík
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda
SV	rozpouštěcí voltametrie
<i>T</i>	teplota [°C]
<i>t</i> <sub>ak</sub>	doba akumulace [s]
THF	tetrahydrofolát
TMB	trimetylboran
TMP	thymidinmonofosfát

$t_{\text{reg}}$	doba regenerace [s]
TTP	thymidindifosfát
$v$	rychlost skenu [mV/s]
$\alpha$	koefficient přenosu náboje
$\gamma$	poměr difuzních koefficientů
$\psi$	míra reversibility, resp. ireversibility elektrodové reakce
$\Delta E_{1/2}$	rozdíl půlvlnových potenciálů [V]

# 1 Úvod

V analýze biologicky aktivních i environmentálně významných látek mají elektrochemické metody široké uplatnění, protože jsou velmi citlivé, přesné a instrumentálně i časově nenáročné. Polarografie, resp. voltametrie byla objevena v roce 1922 prof. Heyrovským, který za její objev získal Nobelovu cenu. Jako pracovní elektroda byla použita kapající rtuťová elektroda, která byla později nahrazena visící rtuťovou kapkovou elektrodou. Rtuť jako elektrodový materiál je naprosto ojedinělá svými vlastnostmi materiálovými, povrchovými i elektrochemickými. V posledních letech je ale velkou nevýhodou rtuťových elektrod toxicita rtuti, resp. jejich sloučenin. Proto je jedním z hlavních trendů vývoje v oblasti elektroanalytických metod hledání nových elektrodových materiálů, které by mohly problematickou rtuť nahradit.

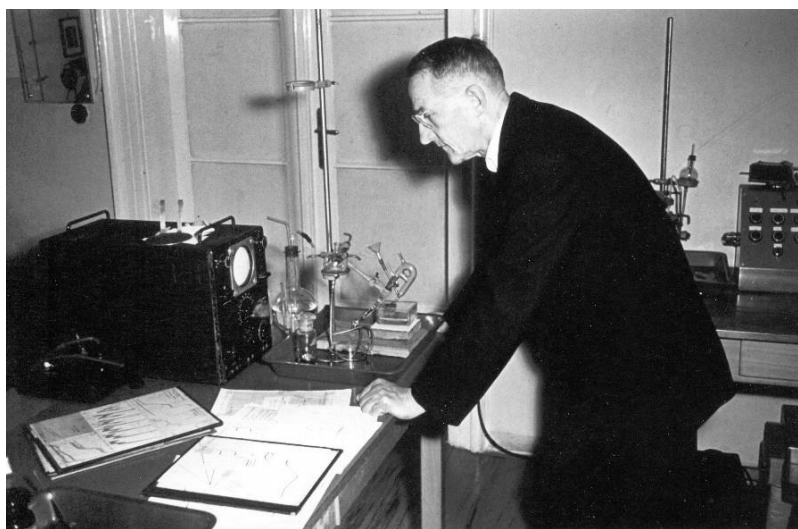
Mezi perspektivní elektrodové materiály patří mimo jiné i borem dopovaný diamant (BDD), který se připravuje chemickou depozicí par. Mezi hlavní výhody borem dopované diamantové elektrody (BDDE) patří zejména široké potenciálové okno umožňující studium anodických i katodických dějů. Elektrochemické vlastnosti BDDE mohou být významně ovlivněny obsahem dopantu, tedy boru, v diamantovém filmu. Cílem této diplomové práce proto bylo porovnání elektrochemických vlastností BDDE s různým obsahem boru. V souladu s literaturou byla pro účely této studie zvolena metoda cyklické voltametrie a analyzovány byly opět často využívané reverzibilní redoxní systémy  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ .

V další části práce byly ověřovány rovněž aplikační možnosti testovaných BDDE v souvislosti s různým obsahem boru. Jako elektrochemicky aktivní látka pro tyto experimenty byl zvolen leukovorin (LV), který patří do skupiny folátů. Jedná se o redukovanou formu kyseliny listové. Používá se při léčbě nádorových onemocnění např. jako antidotum k ochraně zdravých buněk před toxickými účinky tzv. antifolátů aplikovaných ve vysokých dávkách. V literatuře bylo voltametrické chování LV popsáno pouze na visící rtuťové kapkové elektrodě a stříbrné pevné amalgámové elektrodě. Proto byla nejprve vyvinuta metoda stanovení LV pomocí komerčně dostupné BDDE, která byla následně aplikována při ověřování použitelnosti testovaných BDDE v oblasti analýzy bioaktivních organických látek.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Voltametrie

Jaroslav Heyrovský, uveden na obrázku 1, v roce 1922 objevil analytickou metodu, kterou nazval polarografie. Ta patří dodnes mezi metody základního výzkumu v elektrochemii [1]. V době svého vzniku byla jednou z nejcitlivějších analytických metod s automatickým záznamem [2]. Heyrovský zkoumal závislost napětí vkládaného na elektrody a proudu, který protékal elektrochemickým článkem. Zjistil, že kapající rtuť je ideální elektrodou pro měření proudu a že pokud v roztoku jsou látky schopné vyměňovat s elektrodou elektrony, projeví se na polarizačních křivkách proudovými signály ve tvaru vln. S japonským vědcem M. Shikatou sestrojili roku 1924 automatický přístroj, tzv. polarograf. V roce 1959, tedy o 37 let později, získal Jaroslav Heyrovský Nobelovu cenu za chemii, a to právě za vynález polarografie [3]. Tato metoda ve své klasické formě se díky své jednoduchosti a ekonomické nenáročnosti stále využívá jako jedna ze základních metod analytické chemie. Své uplatnění ale nachází zejména v základním výzkumu. Vzhledem k vysokým nárokům na citlivost analytických metod se v současnosti využívají převážně voltametrické metody, které se z polarografie během let vyvinuly [4].



*Obrázek 1* Profesor Heyrovský [2]

#### 2.1.1 Úvod do polarografie, voltametrie

Polarografická resp. voltametrická měření jsou založena na současném sledování napětí na elektrodách a proudu procházejícího článkem. V článku probíhají elektrochemické

a chemické reakce. Rozdíl mezi polarografií a voltametrií je v použité pracovní elektrodě. Při polarografických měřeních se využívá kapající rtuťová elektroda, což je nestacionární elektroda. Naopak při voltametrii se využívají stacionární pracovní elektrody, mezi které patří např. visící rtuťová kapková elektroda nebo tuhé elektrody [5]. Ve voltametrii se používají elektrochemické články sestavené z polarizovatelné pracovní elektrody ponořené do analyzovaného roztoku a nepolarizovatelné referentní elektrody, která je obvykle spojená s analyzovaným roztokem solným můstkem [6]. Zatímco potenciál polarizovatelné pracovní elektrody je silně ovlivňován procházejícím proudem, potenciál nepolarizovatelné referentní elektrody je na velikosti procházející proudu nezávislý.

Polarizace elektrody brání účinkům vnějšího vloženého napětí  $E_v$ , tedy průchodu proudu  $I$ . Polarizace může být chemická, nebo koncentrační. Chemická polarizace je způsobena vznikem produktů elektrolýzy u povrchu elektrody a koncentrační polarizace snížením koncentrace elektroaktivní látky u povrchu elektrody. Při elektrodovém procesu probíhají děje spojené s transportem analytu k elektrodě, vlastní elektrodovou reakcí a vylučováním produktu na elektrodě, popřípadě jeho transportem od elektrody [7]. Jakmile se mezi polarizovatelnou a nepolarizovatelnou elektrodou tvořící elektrochemický článek vloží napětí  $E_v$ , dojde v důsledku probíhajícího elektrodového procesu ke změně potenciálu polarizovatelné elektrody, což vede k vytvoření polarizačního napětí  $E_p$  kompenzujícího vložené napětí  $E_v$ .  $E_p$  je dáno rozdílem potenciálů polarizovatelné a nepolarizovatelné elektrody. Jelikož je potenciál nepolarizovatelné elektrody konstantní, tak reakcí na změnu vloženého napětí je změna potenciálu polarizovatelné elektrody. Až po překročení tzv. rozkladného napětí, tedy rozkladného potenciálu pracovní elektrody, se na polarizovatelné elektrodě začne vylučovat analyt a začne procházet elektrický proud  $I$ . Elektroda je katodou, jestliže se vnutí pracovní elektrodě vůči srovnávací dostatečně negativní potenciál. Pak elektrony proudí do roztoku, způsobují redukci redukovatelných elektroaktivních látek a procházející proud je redukční. Naopak elektroda je anodou, jestliže se jí vnutí pozitivní potenciál, elektrony jsou odčerpávány z roztoku a oxidovatelné elektroaktivní látky jsou oxidovány. Pracovní elektrodou přitom prochází oxidační proud [8]. K pohybu elektroaktivní látky v elektrochemickém článku dochází různými způsoby:

- *migraci* – vzniká v důsledku působení elektrického pole mezi elektrodami;
- *konvekci* – může nastat přirozeně v důsledku gradientu teploty nebo mícháním;
- *difuzi* – je způsoben koncentračním spádem [9].

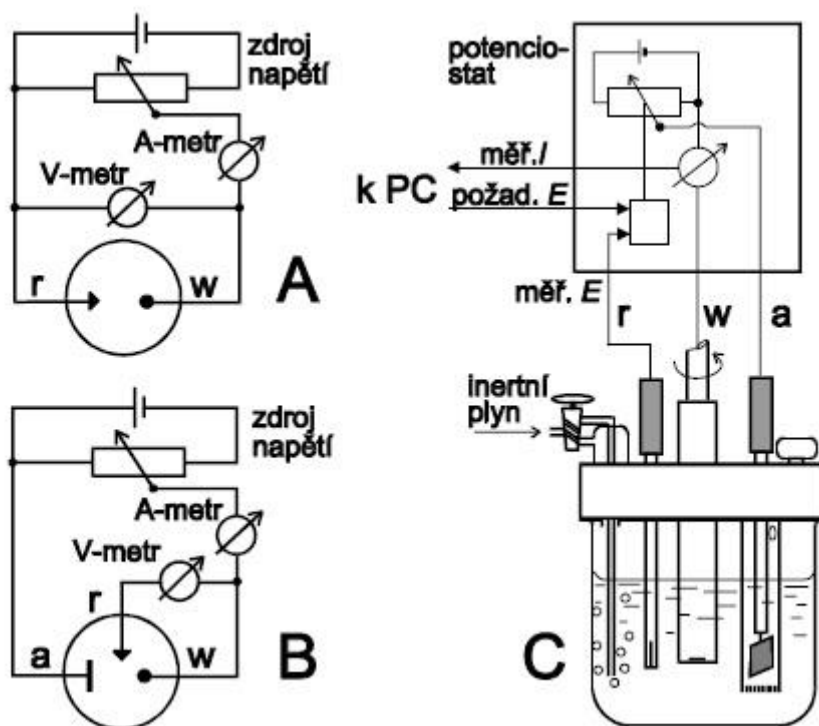
K celkovému proudu zaznamenanému při polarografické, resp. voltametrické analýze přispívají různé proudy, které se rozlišují a označují podle příčiny jejich vzniku:

- *difuzní (faradaický) proud* – vzniká v případě, že je přenos depolarizátoru k elektrodě řízen pouze difúzí. Ta je dána vyrovnáním koncentračních změn, ke kterým dochází u povrchu elektrody. Polarografická vlna představuje závislost difuzního proudu ( $I_d$ ) na  $E$ . Hodnoty limitního difuzního proudu ( $I_{d(\text{lim})}$ ) se dosáhne, když difúze částic má maximální rychlost a proud již dále neroste. Tato rychlost je úměrná koncentraci reagující látky v roztoku, a tedy  $I_{d(\text{lim})}$  je úměrný koncentraci analytu [9, 10];
- *nabíjecí (kapacitní) proud* – je potřebný k nabití elektrody na požadovaný potenciál. Z analytického hlediska je kapacitní proud nežádoucí, neboť omezuje citlivost metody. Jestliže jsou koncentrace depolarizátoru nízké ( $< 10^{-5}$  mol/l), vzniklé vlny jsou tak malé, že mohou být překrývány kapacitním proudem ( $I_c$ ). Nabíjecí proud je vhodné pro analytické účely eliminovat [2, 11];
- *kinetický proud* – vzniká chemickou reakcí v blízkosti elektrody a rychlost chemické reakce určuje výsledný kinetický proud ( $I_k$ ). Ten závisí na teplotě, pH a je úměrný koncentraci [10];
- *katalytický proud* – vzniká, pokud se k roztoku depolarizátoru přidá katalyzátor. Obě látky spolu reagují a výsledný katalytický efekt se projevuje např. posunem vylučovacího potenciálu vodíkových iontů k pozitivnějším hodnotám, což vede k vytvoření katalytické vlny vodíku. Katalytický proud závisí na koncentraci katalyzátoru, na pH a často roste s rostoucí koncentrací pufrů [10, 11];
- *adsorpční proud* – vzniká, pokud je elektrodový proces limitován adsorpcí depolarizátoru nebo produktu elektrodové reakce na povrchu elektrody. Projevuje se oddělenou vlnou u pozitivnějších nebo negativnějších potenciálů než je vlna redukce nebo oxidace neadsorbované látky [10, 11].

#### 2.1.1.1 *Uspořádání elektrochemického článku*

U voltametrických měření se používá dvuelektrodové nebo tříelektrodové zapojení článku. Dvuelektrodové uspořádání tvoří pracovní a referentní (srovnávací) elektroda. Schéma obvodu je uvedeno na obrázku 2A. Vkládané napětí ze zdroje je měřeno voltmetrem a proud procházející článkem ampérmetrem. Potenciál nepolarizovatelné referentní elektrody je konstantní a se změnou vloženého napětí se mění pouze potenciál polarizovatelné pracovní elektrody. Tříelektrodové uspořádání se používá častěji a jeho schéma je uvedeno na

obrázku 2B. Elektrochemický článek obsahuje kromě pracovní a referenční elektrody ještě elektrodu pomocnou. Pouze mezi pracovní a pomocnou elektrodou prochází proud a skutečný potenciál pracovní elektrody se měří mezi pracovní a referenční elektrodou za bezproudého stavu. Na obrázku 2C je příklad experimentálního uspořádání pro měření se třemi elektrodami [12].

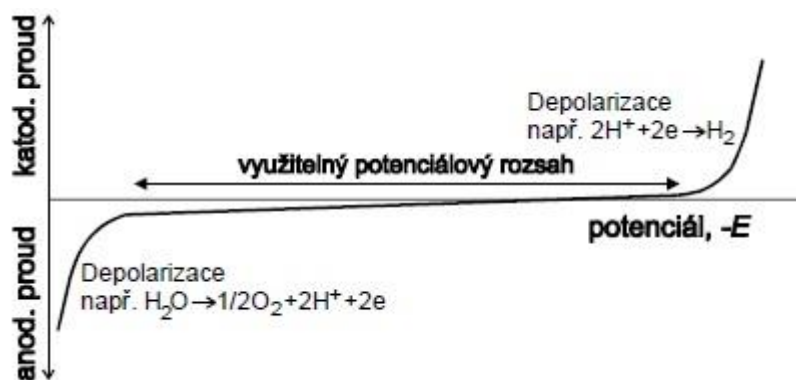


**Obrázek 2** Schéma zapojení dvouelektrodového (A) a třielektrodového (B) elektrochemického článku; C – uspořádání pro měření se třemi elektrodami [6]; a – pomocná elektroda, b – referenční elektroda, w – pracovní elektroda

Pracovní elektrody ve voltametii jsou nejčastěji z tuhých materiálů (např. platinové, zlaté, či z různých forem uhlíku) nebo rtuťové. Jako referenční elektrody slouží tzv. elektrody II. druhu. Tyto elektrody jsou tvořené kovem pokrytým vrstvou své málo rozpustné soli a ponořeným v roztoku, který obsahuje anion této soli. Používají se především argentschloridová, kalomelová nebo merkurosulfátová elektroda. Pomocné elektrody jsou prakticky nepolarizovatelné a jsou obvykle tvořeny platinovým plíškem. Elektroda může být od analyzovaného roztoku oddělena skleněnou fritou zabraňující kontaminaci roztoku produkty reakcí, které na ní probíhají [6].

### 2.1.1.2 Polarizační křivka

Při každém polarografickém resp. voltametrickém měření jsou zaznamenávány polarizační křivky, které znázorňují závislost proudu procházejícího elektrochemickým článkem na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu. Schéma polarizační křivky je uvedeno na obrázku 3 [7]. Tato křivka je registrována v roztoku základního elektrolytu, který obsahuje látky oxidující se a redukující se až při vysokých hodnotách potenciálů pracovní elektrody. Proto je v relativně široké oblasti potenciálů elektroda zpolarizovaná a teče jí pouze malý nabíjecí neboli kapacitní proud. Tento rozsah potenciálů, kdy je elektroda zpolarizovaná, je využitelný pro voltametrickou analýzu a bývá označován jako využitelný potenciálový rozsah nebo pracovní okno elektrody. Závisí hlavně na materiálu pracovní elektrody a použitém základním elektrolytu, případně rozpouštědle. Ve vodném roztoku bývá využitelný potenciálový rozsah omezen oxidací vody nebo rozpuštěním materiálu elektrody na anodické straně a na katodické straně redukcí vodíkového iontu. Pokud se do roztoku základního elektrolytu přidá analyt, který se oxiduje nebo redukuje, dochází při dosažení příslušného potenciálu k depolarizaci elektrody a elektrodou začne protékat anodický, resp. katodický proud [6].



Obrázek 3 Polarizační křivka registrovaná v základním elektrolytu [6]

Tvar polarizační křivky závisí na složení roztoku a může být rozdělena na tři oblasti:

- *oblast polarizace* – napětí nedosahuje hodnoty potřebné pro průběh elektrodové reakce a elektrochemickým článkem protéká pouze nabíjecí proud;
- *oblast depolarizace* – článkem protéká difuzní proud v důsledku redukce látky na katodě nebo oxidace látky na anodě. Látka podléhající elektrochemické reakci se nazývá depolarizátor;
- *oblast limitního difuzního proudu* – úbytek přeměňované látky v okolí elektrody se vyrovnává difuzí. Velikost limitního difuzního proudu  $I_{d(\text{lim})}$  odpovídá výšce vlny [8].

Za přítomnosti dostatečného nadbytku indiferentního elektrolytu je elektroaktivní látka transportována pouze difuzí a proto bylo nutné pro protékající proud řešit rovnici Fickova zákona. Tím se zabýval D. Ilkovič a odvodil pro okamžitý proud na kapající rtuťové elektrodě rovnici:

$$I = 0,732 \cdot n \cdot F \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot (c^0 - c^*), \quad (1)$$

kde  $I$  značí difuzní proud,  $n$  je počet vyměněných elektronů,  $F$  je Faradayova konstanta,  $D$  je difuzní koeficient,  $m$  je hmotnost rtuťové kapky,  $t$  je doba kapky,  $c^0$  je koncentrace v roztoku,  $c^*$  je koncentrace u povrchu elektrody. Ilkovič dále odvodil rovnici pro střední proud ve tvaru:

$$\bar{I}_d = 0,627 \cdot n \cdot F \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot (c^0 - c^*), \quad (2)$$

kde  $\bar{I}_d$  je střední difuzní proud. Ve zkrácené podobě může být Ilkovičova rovnice zapsána ve tvaru:

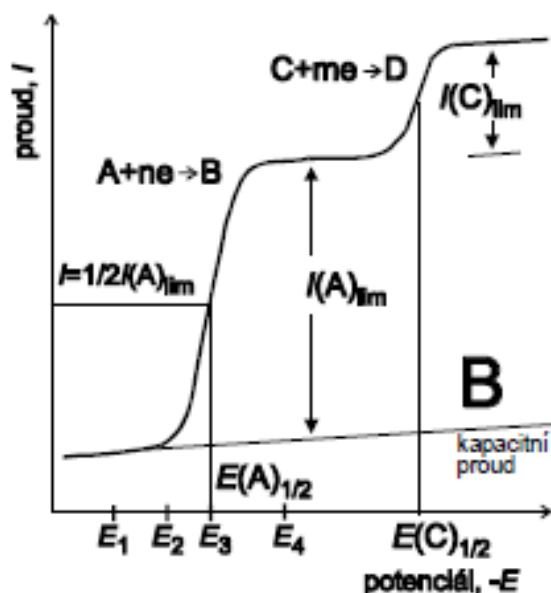
$$I_d = k \cdot c, \quad (3)$$

kde  $I_d$  je difuzní proud,  $k$  je konstanta a  $c$  představuje koncentraci depolarizátoru v roztoku. Ze zkrácené Ilkovičovy rovnice vyplývá, že velikost difuzního proudu je úměrná koncentraci analytu v roztoku [13].

## 2.1.2 Polarografické / voltametrické metody

### 2.1.2.1 Stacionární voltametrie

Princip stacionární voltametrie (DCV, direct current voltammetry) spočívá v tom, že se potenciál vkládaný na pracovní elektrodu mění lineárně s časem, roste či klesá. Metodu lze považovat za stacionární při konstantním potenciálu, je-li rychlost změny potenciálu dostatečně malá ve srovnání s rychlostí ustavení rovnováhy u povrchu elektrody. Výsledným záznamem je voltametrická vlna na  $I$ - $E$  křivce (obrázek 4). Polohu voltametrické vlny charakterizuje půlvlnový potenciál ( $E_{1/2}$ ), což je napětí, při kterém velikost protékajícího proudu dosahuje poloviny  $I_{d(\text{lim})}$ . Jedná se o kvalitativní údaj umožňující látku v roztoku identifikovat. Limitní difuzní proud je úměrný koncentraci analytu v roztoku a je tedy údajem kvantitativním [12]. Limity detekce pro DCV se pohybují kolem  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mol/l. Dají se stanovit látky anorganické i organické, které se dostatečně liší hodnotami půlvlnových potenciálů ( $\Delta E_{1/2} > 200$  mV) [6].



Obrázek 4 DC voltametrická křivka zaznamenávající redukci látek A a C [6]

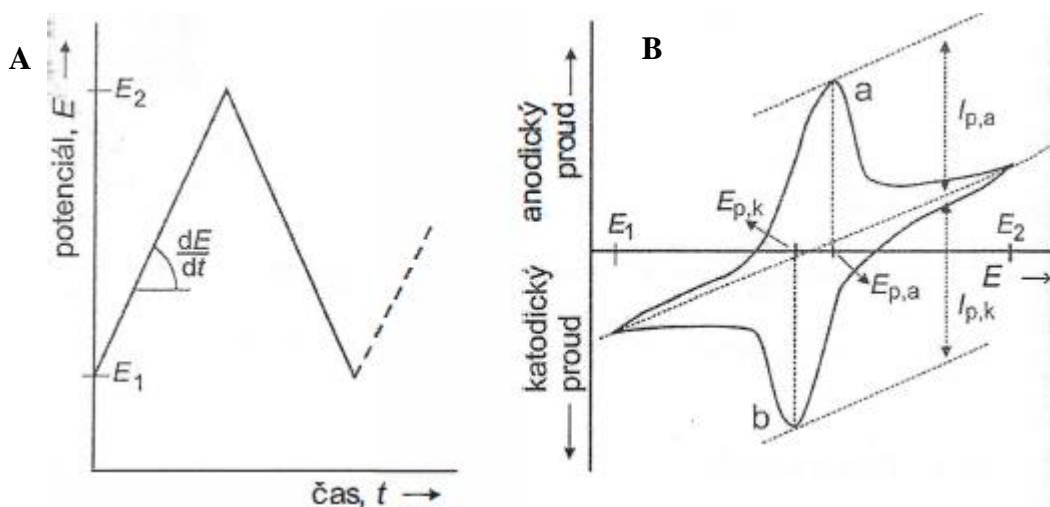
### 2.1.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je metodou, při které se na stacionární elektrodu vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí polarizace  $dE/dt$ . Pulz tvaru rovnoramenného trojúhelníku (obrázek 5A) způsobuje nejdříve redukci analytu a následně oxidaci vzniklých redukčních produktů nebo naopak. Tím dochází ke vzniku katodicko-anodické křivky (obrázek 5B) [14]. CV má význam především při studiu elektrodových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek lze usuzovat na mechanismus elektrodové reakce nebo posuzovat jejich reverzibilitu. Pro reverzibilní elektrodovou reakci platí, že rozdíl potenciálů anodického a katodického píku  $E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n$  ( $n$  je počet vyměněných elektronů) a podíl proudů anodického a katodického píku  $I_{pa}/I_{pc} = 1$ . Současně platí, že potenciál píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu ( $dE/dt$ ) a je o  $28,5/n$  mV negativnější u katodického píku resp. pozitivnější u anodického, než je hodnota půllnového potenciálu [12].

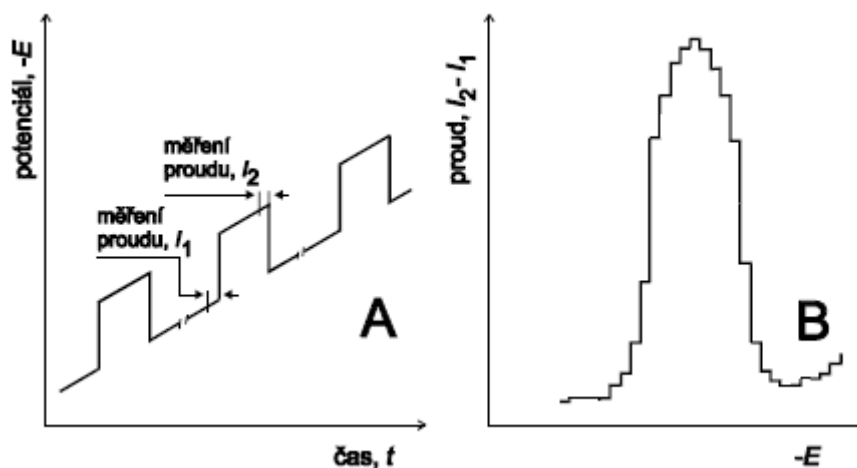
### 2.1.2.3 Diferenčně pulsní voltametrie

Diferenčně pulsní voltametrie (DPV) je metodou mnohem citlivější než klasická polarografie, resp. voltametrie. Na elektrodu se vkládá lineárně rostoucí napětí, které je překládáno konstantními napěťovými pulzy. Proud se měří vždy před začátkem pulzu a před jeho koncem (obrázek 6A). Proudový rozdíl se pak vynáší v závislosti na vkládaném napětí (obrázek 6B) [8]. Takto měřený proud výrazně omezuje vliv kapacitního proudu. Největší rozdíl proudů před začátkem a koncem pulzu je pozorován v oblasti půllnového potenciálu. Výška píku je

úměrná koncentraci analytu. Vrchol píku odpovídá přibližně půlvlnovému potenciálu. DPV je použitelná pro analýzu elektroaktivních látek při koncentracích až kolem  $10^{-8}$  mol/l a je možné ji využít pro stanovení látek, které se liší v hodnotách  $\Delta E_{1/2}$  minimálně o 50 mV. V porovnání s DCV je tedy možné rozlišit látky s mnohem bližšími hodnotami  $\Delta E_{1/2}$  [7, 14].



**Obrázek 5** Průběh potenciálu vkládaného na elektrodu (A) a odpovídající proudová odezva při CV [12]



**Obrázek 6** Průběh potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu s vyznačením intervalů, kdy je měřen proud (A); voltametrický pík registrovaný při použití metody DPV (B) [6]

#### 2.1.2.4 Rozpouštěcí voltametrie

Rozpouštěcí voltametrie (SV, stripping voltammetry) je metodou, při které se stanovení elektroaktivních složek směsi provádí nikoliv při jejich vylučování na pracovní elektrodě, ale naopak při jejich elektrolytickém rozpouštění. SV probíhá v několika krocích. V prvním

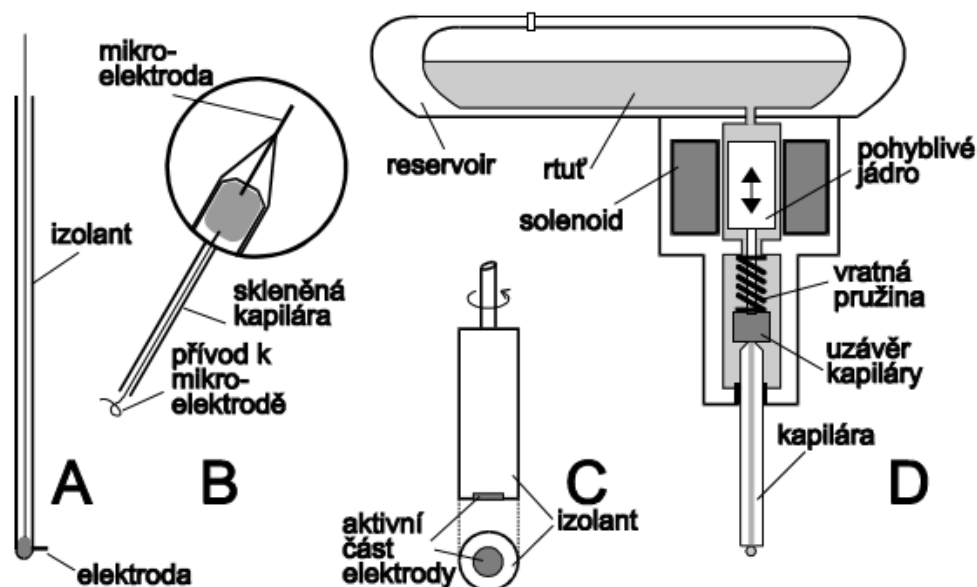
kroku dochází k vylučování stanovované látky za intenzivního míchání při konstantním potenciálu a nahromadění na elektrodě. V dalším kroku se vypne míchání, dochází k ustálení, případně je vyměněn elektrolyt [8]. V posledním kroku se nahromaděná látka z elektrody elektrolyticky rozpouští, což se zaznamenává. Pomocí SV lze stanovit látky o koncentraci až  $10^{-12}$  mol/l [15].

Mezi metody rozpouštěcí voltametrie patří:

- *anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV, anodic stripping voltammetry)* – tato metoda je v praxi nejčastěji používanou variantou. Kationt kovu se redukcí vyloučí na povrchu pracovní elektrody ve formě kovu, který tvoří buď amalgam se rtuťí, nebo tenký film na pevném elektrodovém povrchu. Po určité době se vyloučený kov anodicky rozpouští z elektrody zpátky do roztoku [12];
- *katodická rozpouštěcí voltametrie (CSV, cathodic stripping voltammetry)* – analyt se nakoncentruje na povrchu elektrody při potenciálu, kdy se materiál elektrody rozpouští. Vznikající ionty reagují a analytem za vzniku nerozpustné sloučeniny tvořící na elektrodě film. Následuje katodické rozpouštění zpět do roztoku [12];
- *adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (AdSV, adsorptive stripping voltammetry)* – akumulace nastává adsorpcí analytu při vhodném potenciálu ( $E_{ak}$ ) po dobu akumulace ( $t_{ak}$ ). Například samotné kovové ionty je možné vázat do adsorbovatelných komplexů s vhodnými činidly. AdSV je vhodná pro látky špatně se rozpouštějící v základním elektrolytu, které mají elektroaktivní funkční skupiny [7].

### 2.1.3 Běžně používané pracovní elektrody ve voltametii

Polarizovatelné pracovní elektrody bývají buď rtuťové, nebo z tuhých materiálů jako např. platinové, zlaté, uhlíkové apod. Jak je vidět z obrázku 7, elektrody mohou mít různou velikost a tvar. Pracovní elektroda by měla zaručovat vysoký poměr signál-šum, stejně jako reprodukovatelnou odezvu. Výběr pracovní elektrody závisí především na redoxních vlastnostech analytu a využitelném potenciálovém rozsahu elektrody. Důležitou roli hrají i mechanické vlastnosti elektrody [9].



**Obrázek 7** Drátková elektroda (A), vláknová mikroelektroda (B), rotující disková elektroda (C), elektronicky řízená rtuťová kapková elektroda [6]

### 2.1.3.1 Rtuťové pracovní elektrody

Rtuť je velmi široce používaným elektrodovým materiálem v elektroanalytické chemii. Ve vodném roztoku má vysoké negativní přepětí pro vývoj vodíku, což rozšiřuje katodický potenciálový rozsah v porovnání s pevnými elektrodami. Rtuťové elektrody poskytují vysoce reprodukovatelné výsledky díky povrchu snadno obnovitelnému odklepáváním použité a vytvořením nové kapky rtuti. Vzniklý povrch je dokonale čistý, hladký a neovlivněný předchozími měřeními. Velkou výhodou rtuťových elektrod je tvorba amalgámu s jinými kovy a tedy možnost využití ASV při stopové analýze kovů. Díky vysokému přepětí vodíku je možná aplikace potenciálů kolem  $-1000$  mV (vs. SCE) v kyselých roztocích a až kolem  $-2000$  mV (vs. SCE) v zásaditých roztocích. Vzhledem k omezenému anodickému potenciálovému rozsahu nejsou vhodné pro analýzu látek podléhajících oxidačním procesům [9]. Hlavní nevýhodou rtuťových kapkových elektrod je nepříliš dobrá mechanická stabilita. To může působit problémy například při měření s přenosnými terénními analyzátoři. Elektrody nejsou vhodné při práci v průtokových systémech ani při měření technikou přenosu naadsorbovaného vzorku, kdy může dojít ke ztrátě kapky i se vzorkem. Další velkou nevýhodou těchto elektrod je manipulace s poměrně velkým množstvím kapalné rtuti. Zejména v posledních letech se objevují stále silnější tlaky na omezení jejího používání vzhledem k obavám z toxicity rtuti [16, 17]. V některých zemích bylo její používání již zcela zakázáno.

*Kapající rtuťová elektroda (DME)* se používá v polarografii. Skládá se z 12-20 cm dlouhé kapiláry propojené se zásobníkem se rtuťí. Vnitřní průměr kapiláry je obvykle 30-50  $\mu\text{m}$ . Obnovování kapky rtuťi v průběhu měření vede k tomu, že nezávisí na době elektrolýzy a polarizační křivka je stejná při vzrůstu a poklesu potenciálu [12]. Hlavní výhodou DME je pravidelné odkapávání kapky rtuťi a tvorba nové v průběhu měření, což minimalizuje problémy s pasivací. Měření je pak dokonale reprodukovatelné a i výsledky jsou velmi dobře opakovatelné [5, 9]. Nevýhodou DME je velká spotřeba rtuťi.

*Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)* je nejrozšířenější variantou rtuťových elektrod a umožňuje elektronické řízení tvorby kapky. Na rozdíl od DME proběhne vždy celá analýza na jedné kapce rtuťi, která je následně odklepnuta a nahrazena další čistou kapkou pro následující měření. S tím souvisí zvýšení rizika pasivace elektrodového povrchu, ale současně i výrazné snížení množství spotřebované kapalné rtuťi [9]. Obdobou HMDE je i *statická rtuťová kapková elektroda (SMDE)*, která může být používána jak v režimu visící tak kapající rtuťové elektrody. Na konci kapiláry je reprodukovatelně vytvořena visící rtuťová kapka, která může být v pravidelných intervalech obnovována.

*Rtuťová filmová elektroda (MFE)* se vyrábí elektrolytickým vyloučením tenké vrstvy rtuťi z roztoku jejích solí na povrch tuhé pracovní elektrody. Rtuťová vrstva na povrchu nosiče netvoří souvislý film, ale je tvořena z mnoha malých kapiček rtuťi. Tato elektroda se používá zejména při analýze velmi malých koncentrací látek často s využitím předběžné akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody [18]. Rtuťový film lze obvykle používat opakovaně a nevzniká odpad kapalné rtuťi. Na druhou stranu se film vylučuje z roztoků toxických rtuťnatých solí.

### 2.1.3.2 Pevné pracovní elektrody

Pevné pracovní elektrody jsou na rozdíl od rtuťových elektrod z tuhých materiálů a během elektrolýzy se na jejich povrchu často vytvářejí filmy látek adsorbovaných z roztoku nebo produktů elektrodových reakcí. V průběhu měření se povrch tuhé elektrody neobnovuje. Z toho vyplývá, že registrované polarizační křivky se od sebe mohou lišit. Vlastnosti pevných elektrod mohou být ovlivněny předcházejícími elektrodovými reakcemi, existuje tzv. elektrodová paměť a objevují se problémy s pasivací povrchu. Voltametrie s využitím pevných pracovních elektrod je tak často experimentálně náročnější než práce se rtuťovými elektrodami a k dosažení reprodukovatelných výsledků je třeba zařadit určité postupy vedoucí

k regeneraci, resp. čištění elektrodového povrchu mezi jednotlivými měřeními. Může se jednat jak o mechanické broušení či leštění, tak o různé elektrochemické regenerační procesy. Elektrody z tuhých materiálů lze využít při pozitivních potenciálech a je tedy možné analyzovat látky prostřednictvím jejich oxidačních reakcí. Naopak v oblasti negativních potenciálů bývají jejich možnosti v porovnání se rtuť omezeny. Výhodou těchto elektrod je velmi dobrá mechanická odolnost, která umožňuje jejich využití v průtoku i v terénních analyzátoch. Ke zvýšení selektivity elektrod se na jejich povrch mohou vázat různé látky, tzv. modifikátory. Nejčastěji používanými materiály jsou různé formy uhlíku a kovy jako platina nebo zlato [12].

*Uhlíkové elektrody* mají velký význam v současné elektrochemické analýze. Používají se různé formy uhlíku, které se liší svými vlastnostmi. Uhlík (grafit) je pórovitý materiál, jenž může adsorbovat roztok. Příkladem méně porézní elektrody je elektroda ze skelného uhlíku (GCE, glassy carbon electrode), jejíž povrch může být vyleštěn. Další variantou skelného uhlíku je tzv. Reticulated Vitreous Carbon (RVC) mající vysoce pórovitou strukturu. RVC vzniká pyrolýzou pěnových organických polymerů a je vhodný pro průtokové metody založené na úplné elektrolýze analytu. Dalším typem uhlíkového elektrodového materiálu připravujícího se pyrolyzními postupy je tzv. pyrolytický grafit [12].

Mezi nejběžnější materiály *kovových elektrod* patří platina a zlato. Na platinových elektrodách probíhají elektrochemické reakce většinou rychle. Polarizační křivka se vyznačuje několika oblastmi. V oblasti jedna je z povrchu desorbován vodík, v oblasti druhé je povrch platiny čistý, v oblasti třetí odpovídá proud oxidaci platiny na oxidy, v oblasti čtvrté dochází při dostatečně pozitivním potenciálu k rychle vzrůstajícímu proudu v důsledku oxidace rozpouštědla. V další oblasti dochází při změně směru polarizace k redukci povrchových oxidů, v šesté oblasti dochází k adsorpci vodíku, v sedmé oblasti je povrch vodíkem zcela obsazen a dochází k vývoji plynného vodíku [12]. Platinové elektrody našly uplatnění např. při stanovení chlorbenzenu [19]. Zlaté pevné elektrody mají polarizační křivku v základním elektrolytu velmi podobnou křivce platiny, avšak s tím rozdílem, že se méně projevují elektrochemické děje, které jsou spojené s adsorpcí a desorpcí vodíku. Ve voltametii se někdy dává přednost zlatým elektrodám před platinovými, protože zlato má menší elektrokatalytické účinky a je méně náchylné k otravě katalytickými jedy [12]. Zlaté elektrody jsou vhodné např. ke stanovení kovů (Cu, Hg) [20] nebo antioxidantů v ropných produktech [21, 22].

## 2.1.4 Perspektivní elektrodové materiály

Vývoj nových elektrodových materiálů je nedílnou součástí moderní elektroanalytické chemie. Z hlediska elektrochemických vlastností je u nových elektrod důležité široké potenciálové okno, malý šum, použitelnost v různých rozpouštědlech i odolnost vůči pasivaci nebo možnost elektrochemické regenerace povrchu. V současné době se klade důraz také na minimální toxicitu materiálu vzhledem k životnímu prostředí [23].

### 2.1.4.1 Bismutové elektrody

První zmínka o použití elektrod s povlakem bismutu jako alternativy ke rtuťovým elektrodám byla v roce 2000 [24]. Nejběžnější variantou, která se v současné době využívá, je bismutová filmová elektroda (BiFE). Vyrábí se elektrolyticky vyloučením tenkého povlaku bismutu na povrchu pevné elektrody (např. GCE, kovové elektrody), a to z roztoku bismutitých iontů. Vedle BiFE se používají také elektrody tvořené bismutovým diskem (BiBE, bismuth bulk electrode) nebo materiálem s přimíseným bismutovým práškem (např.: Bi-CPE, bismuth carbon paste electrode) [25, 26]. Bismut jako elektrodový materiál je velmi zajímavý z hlediska sledování katodických dějů a vzhledem k tvorbě intermetalických sloučenin se využívá nejčastěji při rozpouštěcí analýze. Bismut nekonkuruje kapkám rtuti ve smyslu obnovování povrchu elektrody, protože rtuť je za normálních podmínek kapalina, kdežto bismut je stříbrolesklý pevný kov. Bismutové elektrody v porovnání se rtuťí mají omezenější rozsah využitelného potenciálu, protože Bi je méně ušlechtilý kov než Hg. Povrch BiFE se obvykle regeneruje mechanickým otřením filmu nebo jeho anodickým rozpouštěním [27, 28]. Bi film se připravuje v režimu *in situ* nebo *ex situ*. Běžnější variantou je příprava *in situ*, přičemž se film kovu na elektrodě vylučuje elektrolyticky přímo v měřeném roztoku během akumulace analytu. Povlaky vylučované *in situ* postačí pouze pro jedno měření a na konci rozpouštěcího kroku analýzy jsou z povrchu elektrody odstraněny. Příprava *ex situ* představuje depozici bismutových povlaků ze speciálních pokovovacích roztoků. Vyredukované povlaky bývají kompaktnější a dají se používat po celou sérii měření [29]. Bismutové elektrody mají uplatnění zejména pro stanovení kovů s využitím rozpouštěcích technik, např. Cd, Pb, Zn, In, Cu, Ni a Co [30], ale v posledních letech se stále častěji využívají i v oblasti analýzy organických látek, např. léčiv, pesticidů apod. [31].

#### 2.1.4.2 Amalgámové pracovní elektrody

První zmínka o amalgámových elektrodách (MeSAE, solid amalgam electrode) pochází rovněž z roku 2000 z Fyzikálního ústavu Jaroslava Heyrovského AV ČR v Praze, kde autoři L. Novotný a B. Yosypchuk vydali publikaci pod názvem „Pevné stříbrné amalgámové elektrody“ [32]. Amalgámové elektrody dovolují v mnoha případech nahradit HMDE a současně vnášejí nové, na čistě rtuťových elektrodách neproveditelné možnosti. Amalgámové elektrody jsou z netoxického materiálu, což je příznivé vzhledem k životnímu resp. pracovnímu prostředí. Jsou vhodné zejména pro měření redukčních procesů díky vysokému přepětí vodíku. Poskytují tedy široké potenciálové okno v katodické oblasti stejně jako elektrody rtuťové. Stejně tak se příliš nepoužívají pro sledování oxidačních procesů především kvůli snadnému rozpouštění materiálu elektrody již při nízkých kladných potenciálech [33]. Největším problémem u pevných amalgamových elektrod je jejich regenerace a s tím spojená horší opakovatelnost měření v porovnání s HMDE [34].

Podle základních vlastností lze amalgámové pracovní elektrody rozdělit na dvě hlavní skupiny:

- amalgám je tvořen kovem, případně několika kovy u vícesložkových pevných amalgámů, který je elektrochemicky méně aktivní než rtuť. Nejčastěji se používá zlato, stříbro, iridium – elektrody se chovají spíše jako rtuťové;
- amalgám je tvořen kovem nebo v případě vícesložkových pevných amalgámů alespoň jedním kovem, který je elektrochemicky aktivnější než rtuť. Používá se měď, bismut, kadmium – při analýze se využívá specifické interakce (např. tvorby komplexů) analytu s daným kovem [34].

Doposud byly navrženy a popsány následující typy pracovních elektrod založených na amalgámovém elektrodovém materiálu:

- pevná amalgámová elektroda (MeSAE), která je tvořena pevným amalgámem vybraného kovu. Podle stavu povrchu MeSAE je možné rozlišit:
  - o leštěná (p-MeSAE) – neobsahuje kapalnou rtuť, její povrch je vyleštěn;
  - o filmová (MF-MeSAE) – p-MeSAE, jejíž povrch je pokryt rtuťovým filmem;
  - o menisková (m-MeSAE) – p-MeSAE, jejíž povrch je pokryt rtuťovým meniskem [32, 33];
- pastová amalgámová elektroda, kdy lze podle struktury rozlišit:

- pasta s pastovací kapalinou (MeSA-PE) – jemný prášek pevného amalgamu je smísen s kapalným olejem;
- pasta bez pastovací kapaliny (MeA-PE) – pastový amalgám s relativně velkým obsahem kovu [35];
- kompozitní amalgámová elektroda (MeSA-CE) – je tvořena směsí jemného prášku pevného amalgamu a tuhého polymeru [33, 34];
- krystalová stříbrná amalgámová elektroda (CAgAE) – je tvořena jedním krystalem amalgámu [36].

*Stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE)* se stala nejčastěji využívanou variantou ze všech výše uvedených typů amalgámových elektrod. Příprava této elektrody je velmi jednoduchá. Lze ji připravit naplněním vhodné skleněné trubičky práškovým stříbrem a ponořením do kapalné rtuti. Vzniká mechanicky stabilní a netoxický amalgám, který může být použit jako p-AgSAE nebo dále modifikován např. rtutí (m-, MF-AgSAE). Nejčastěji se v praxi používá m-AgSAE, jejíž vlastnosti se díky rtuťovému menisku nejvíce blíží HMDE [27]. Na začátku každého pracovního dne je nutné elektrodu aktivovat obvykle v 0,2mol/l KCl při potenciálu -2200 mV a mezi jednotlivými měřeními se provádí elektrochemická regenerace povrchu, a to přímo v analyzovaném roztoku [37]. AgSAE má široké možnosti uplatnění jak při stanovení anorganických látek (např.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^+$  [32, 38], jodičnanů [39]), tak v oblasti analýzy organických látek (např. léčiv, vitamínů, pesticidů, karcinogenních látek apod. [37, 40-42]). Řada prací je zaměřena také na využití této elektrody při analýze DNA, či peptidů [43-46].

#### 2.1.4.3 Uhlíkové pastové elektrody

Mezi perspektivní elektrodové materiály na bázi uhlíku patří rovněž uhlíkové pasty, které jsou směsí uhlíkového prášku a vhodného pojiva [47]. Uhlíkové pastové elektrody (CPE, carbon paste electrode) mají specifické rysy a unikátní vlastnosti. Při přípravě se používají komerčně dostupné spektrální grafitové prášky vyhovující převážně z hlediska velikosti zrn ( $\mu\text{m}$ ), distribuce velikosti částic, vysoké chemické čistoty a snížené absorpční schopnosti [47]. Jako pojivo se využívá organická kapalina (parafínové a minerální oleje), která poté rozhoduje o většině typických vlastností past. Kapalné pojivo musí splňovat následující podmínky:

- chemickou netečnost a elektroinaktivitu;
- vysokou viskozitu a malou těkavost;
- minimální rozpustnost ve vodě;

- sníženou mísitelnost s organickými rozpouštědly [47].

Povrch elektrody se dá snadno regenerovat setřením použité pasty a vytlačení nové [48]. Uhlíkové pastové elektrody lze modifikovat přimísením vhodného modifikátoru do směsi při přípravě pasty (např. enzymy) [49]. Uhlíkové pastové elektrody našly uplatnění v analýze anorganických i organických látek, biologicky významných látek i léčiv [49-54].

#### 2.1.4.4 *Kompozitní elektrody*

Kompozitní elektrody jsou vyrobeny z materiálu, který představuje směs minimálně jednoho vodiče a jednoho izolátoru [55]. Mezi kompozitní elektrody patří kompozitní uhlíkové elektrody obsahující směs uhlíku, pojiva a v některých případech se přidává i těkavé rozpouštědlo. Rozdíl mezi pastovými a kompozitními elektrodami je ten, že pojivem již není kapalina, ale pevná nevodivá látka v tomto případě nejčastěji polymer. Kompozitní tuhá elektroda se připravuje rozpuštěním polymeru, ten se následně smíchá s uhlíkem a těkavým rozpouštědlem, které se odpaří a vznikne tuhá elektroda [56]. Vedle uhlíkových byly popsány také kovové kompozitní elektrody, např. zlaté [57] a stříbrné [58].

Kompozitní elektrody jsou velmi stabilní a mechanicky odolné. Regenerace povrchu může probíhat elektrochemicky, nebo se elektrody leští na alumině. Jsou vhodné pro měření při velmi pozitivních potenciálech a jsou stabilní v organických rozpouštědlech. Nevýhodou těchto elektrod jsou problémy způsobené časovými změnami kvality povrchu. Každá následující analýza je zatížena předchozími měřeními. Často dochází k pasivaci elektrody [59]. Kompozitní elektrody je možné modifikovat např. enzymy [60, 61] nebo Nafionem [62]. Tyto elektrody našly uplatnění převážně v anodické rozpouštěcí voltametrické analýze kovů např. Pb, Cd, Cu atd. [63, 64], chloridů [65], As [66], dopaminu [62].

#### 2.1.5 **Borem dopovaná diamantová elektroda**

První studie o diamantových elektrodách byla popsána v roce 1983 [67], kdy japonští vědci navrhli implementaci diamantů na elektrody. Ty byly následně aplikovány v oblasti elektrochemie. Diamant je mimořádně mechanicky i chemicky stabilní, je to jeden z nejlepších přírodních izolátorů a pro elektrochemické využití je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji se používají atomy boru (B) [68]. Diamantové elektrody se používají ve formě tenkých polykrystalických filmů, které se připravují chemickou depozicí par (CVD). Na svém povrchu mají monovrstvu vodíku, čehož je dosaženo zaváděním vodíku do reakční

komory při konečné fázi depozice [27]. K depozici diamantového filmu se používá směs metanu a vodíku. Přítomný vodík zabraňuje depozici nenasycených  $sp^2$ -hybridizovaných uhlíkových struktur, tím se potlačuje vznik grafitového uhlíku v diamantovém filmu. Do směsi plynů se jako zdroj B přidává diboran [69]. Hlavními výhodami borem dopované diamantové elektrody (BDDE) jsou nízká kapacita elektrické dvojvrstvy, široké potenciálové okno umožňující studium katodických i anodických dějů a velmi nízká adsorpce látek na povrchu elektrody. Elektrody jsou biokompatibilní a umožňují snadnou implementaci do živé tkáně s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy [70, 71]. BDDE je málo náchylná k pasivaci, tudíž je v mnoha případech ideálním elektrodovým materiálem. Používá se ke stanovení velkého množství anorganických i organických látek [71, 72]. Její povrch lze také různě modifikovat, např. DNA [73], enzymy [74] či proteiny [75] pro aplikace v biotechnologiích.

U pevných pracovních elektrod se obvykle zařazují různé mechanické nebo elektrochemické postupy vedoucí k regeneraci, aktivaci nebo jiné úpravě povrchu před a mezi jednotlivými měřeními, které vedou ke zvýšení měřených voltametrických signálů, zabránění pasivaci povrchu elektrody, zajištění opakovatelných a reprodukovatelných výsledků [76]. U BDDE má velký vliv na elektrochemické vlastnosti tzv. terminace [77]. Katodickou či anodickou předúpravou lze dosáhnout O-terminovaného nebo H-terminovaného povrchu [78]. Povrch diamantu, který má volné vazby ukončené vodíkem je hydrofobní (H-terminace) a málo aktivní. Oxidovaný povrch diamantu obsahuje kyslíkaté funkční skupiny a je hydrofilní (O-terminace) [27, 72]. Přeměna vodíkem terminované elektrody na elektrodu terminovanou kyslíkem je dána vkládaným potenciálem a hodnotou pH roztoku, ale i vzdušný kyslík má vliv na stabilitu vodíkového povrchu. BDDE s H-terminovaným povrchem vykazují rychlejší přenos elektronů. Je také zpomalen vývoj vodíku a kyslíku na koncích potenciálového okna, protože se na elektrody neadsorbují polární sloučeniny [79]. Jak již bylo uvedeno výše, O-terminované elektrody jsou hydrofilní, a tudíž vykazují nižší vodivost [78]. Oxidace se nejčastěji provádí elektrochemicky v kyselém prostředí, kdy se na elektrodu vloží kladný potenciál z oblasti rozkladu základního elektrolytu [78, 79]. Na elektrodě tak vznikají OH radikály (rovnice 4), které oxidují povrch BDDE.



Katodické předčištění má význam pro rychlejší přenos elektronů, zvýšení signálu a lepší opakovatelnost. Katodická redukce se provádí také v kyselém prostředí vložením záporného

potenciálu. Katodická předúprava musí být aplikována těsně před elektrochemickým experimentem, aby došlo ke spolehlivým a reprodukovatelným výsledkům z důvodu nestability elektrody na vzduchu. Anodické předčištění se obvykle provádí jako prevence znečištění, resp. pasivace elektrody [73].

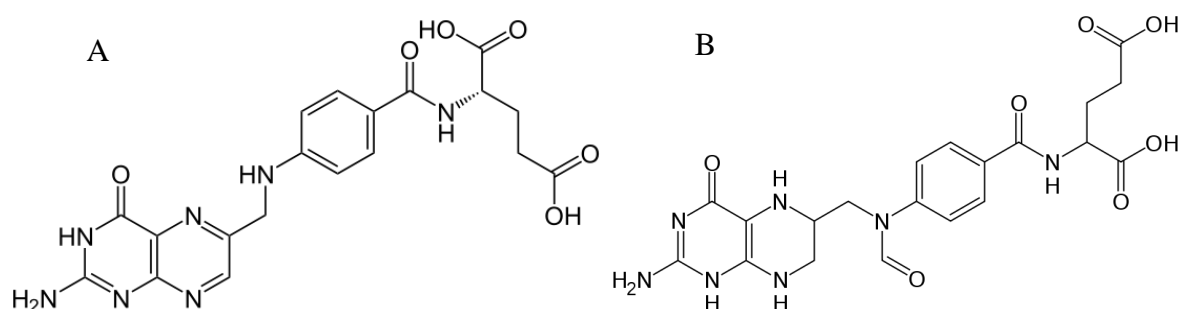
Kvalita povrchu BDDE se obvykle zkoumá pomocí Ramanovy spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie (SEM) [80]. Tyto elektrody mohou mít kovové, polovodičové nebo supravodivé vlastnosti [81]. Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími vodivost jsou obsah B v diamantovém filmu, krystalické uspořádání a obsah nečistot ve filmu. Elektrody se dopují na obsah od  $10^{17}$  do  $10^{21}$  atomů B na  $\text{cm}^{-3}$  diamantového filmu. Častěji se obsah B vyjadřuje jako poměr boru a uhlíku (B/C) ve směsi plynů při depozici. Uvedený rozsah odpovídá poměru B/C v plynné fázi od 500–15 000 ppm [71, 82].

Ke studiu elektrochemických vlastností diamantového filmu se obvykle využívá cyklická voltametrie reverzibilních redoxních systémů, např.  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Rozdíl potenciálu katodického a anodického píku nebo poměr proudu anodického a katodického signálu se využívá k charakterizaci diamantového filmu [83, 84]. S rostoucím poměrem B/C se obvykle reverzibilita signálů zlepšuje, což je spojeno s množstvím povrchově aktivních míst BDDE sloužící k přenosu elektronů. Potenciálové okno se se zvyšujícím obsahem boru zužuje, přičemž toto zúžení je mnohem výraznější na katodické straně [85]. Elektrochemicky aktivní místa na povrchu elektrody jsou závislá na účinnosti dopování boru a zdá se, že s klesajícím obsahem boru klesá dostupnost těchto elektrochemicky aktivních míst, což vede k rozšíření potenciálového okna [86, 87]. V neposlední řadě je obsahem boru ovlivněna také mez detekce, která s rostoucí koncentrací bóru v BDD filmu obvykle klesá. Se zvyšující se koncentrací bóru se zlepšuje opakovatelnost a citlivost stanovení [85, 88].

Borem dopovaný diamant je velmi specifický elektrodový materiál s výjimečnými elektrochemickými vlastnostmi, které jsou závislé na mnoha okolnostech. Proto je BDDE se svými vlastnostmi stále předmětem zkoumání a i tato diplomová práce je zaměřena na studium elektrochemických vlastností této elektrody v závislosti na obsahu boru v diamantovém filmu. Předmětem práce je rovněž testování BDDE s různým obsahem boru při praktické aplikaci stanovení leukovorinu.

## 2.2 Leukovorin

Leukovorin (LV, kyselina folinová, 5-formyltetrahydrofolát monoglutamát, 5-formyl- $H_4$ folate,  $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ ) patří do skupiny metabolitů kyseliny listové (FA). Jde o její redukovanou formu. Strukturální vzorce obou látek jsou uvedeny na obrázku 8. LV se pojí s léčbou nádorových onemocnění, kdy se používá jako antidotum k ochraně zdravých buněk před toxickými účinky tzv. antifolátů aplikovaných ve vysokých dávkách při chemoterapii [89, 90]. Dále se LV běžně podává ve spojení s 5-fluorouracilem (5-FU) ke zvýšení jeho cytotoxického účinku [91].



**Obrázek 8** Strukturální vzorce kyseliny listové (A) a leukovorinu (B)

### 2.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti leukovorinu

Leukovorin neboli kyselina folinová je béžový prášek bez zápachu s molekulovou hmotností 473,44 g/mol. Hodnota pH je udávána jako 6,8-8,0 při 25 g/l. Rozpustnost ve vodě je 4 g/l, teplota rozkladu se pohybuje v rozmezí 240-250 °C. LV je chemicky stabilní za skladovacích podmínek, uchovává se na chladném místě při teplotě 2-8 °C v dobře uzavřené nádobě na suchém a větraném místě. Je nereaktivní a neslučitelný se silnými oxidačními činidly. Z hlediska akutní toxicity je LV netoxický. U zvířat, resp. u laboratorních krys byly pozorovány příznaky akutní orální expozice LV.  $LD_{50}$ , což je dávka, která vede k úmrtí poloviny testovaných zvířat, je větší než 8 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Dle IARC žádná ze složek obsažených v této látce nebyla identifikována při hladinách větších nebo rovných 0,1 % jako pravděpodobný, možný nebo prokázaný karcinogen. Dle Nařízení (ES) č. 1272/2008 [92] je LV klasifikován jako dráždivý pro kůži, dále může dojít při kontaktu s očima k podráždění, je dechově senzibilní, způsobuje senzibilitu kůže a jednorázovou expozici pro cílový orgán, resp. dýchací systém. LV je také klasifikován jako zdraví škodlivý, jak ukazují piktogramy na obrázku 9 [92, 93].



**Obrázek 9** Piktogramy charakterizující nebezpečné vlastnosti LV  
A – dechově senzibilní, B – zdraví nebezpečný

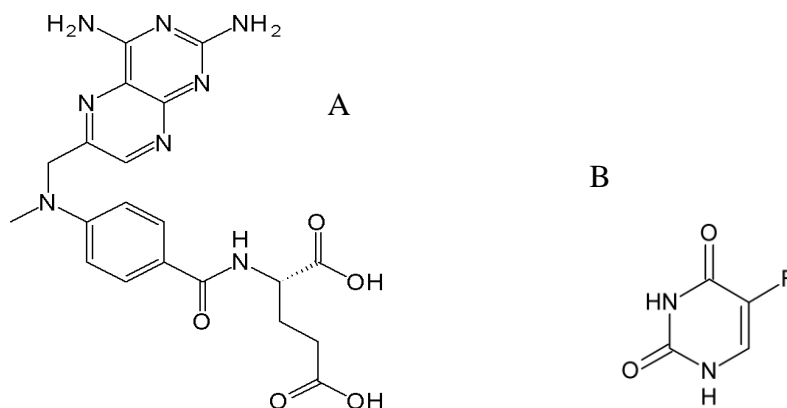
### 2.2.2 Mechanismus působení leukovorinu při medicínských aplikacích

Foláty se v organismu podílejí na přenosu jedné uhlíkové zbytků (C1), které hrají významnou roli při syntéze purinů. Obecně hrají FA a foláty klíčovou roli v metabolismu aminokyselin, při syntéze nukleových kyselin, při dělení a syntéze buněk a při tvorbě červených krvinek [89, 94].

Nositelem biologické aktivity LV je jeho L-forma, která je v organismu přeměňována mimo jiné na 5-methyl-tetrahydrofolát (5-methyl-THF), který dále přechází na další aktivní THF. THF s polyglutamovým řetězcem jsou schopny přenášet uhlík v různých oxidačních stupních a proto jsou na rozdíl od jiných přenašečů C1 zbytků (např. biotinu) považovány za univerzální. Pokud je potřeba THF přenašečů nižší než produkce, jsou tyto látky skladovány v jaterních buňkách [95]. C1 zbytky vznikají např. při přeměně aminokyseliny serinu na glycin, při štěpení glycinu glycinsynthasou nebo při degradaci histidinu. Poté jsou kovalentně vázány na N(5) nebo N(10) atomy v molekule THF. Vzhledem k roli THF v organismu našel LV široké uplatnění v současné medicíně. Využívá se při léčbě megaloblastické anémie s prokázaným deficitem FA, pokud není možná přímo terapie kyselinou listovou. Významná je také aplikace v kombinaci s protinádorovými léčivy, jejichž cytostatický účinek buď zvyšuje, nebo naopak působí jako jejich antidotum.

Látka, která blokuje syntézu purinu v buňkách, se nazývá metotrexát (MTX, obrázek 10A). MTX inhibuje enzym dihydrofolát reduktázu, což vede k inhibici dělení buněk. Tento mechanismus je využíván při léčbě psoriázy, revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby a zejména pak zhoubných nádorů buněk imunitního systému, zhoubných nádorů vznikajících v děloze v příčinné souvislosti s těhotenstvím nebo maligních kostních nádorů. Při aplikaci MTX ovšem dochází také k toxickému účinku na zdravé, rychle proliferující tkáň. Proto se využívá LV jako antidotum [94, 96]. Intracelulární interakce MTX a LV je znázorněna na

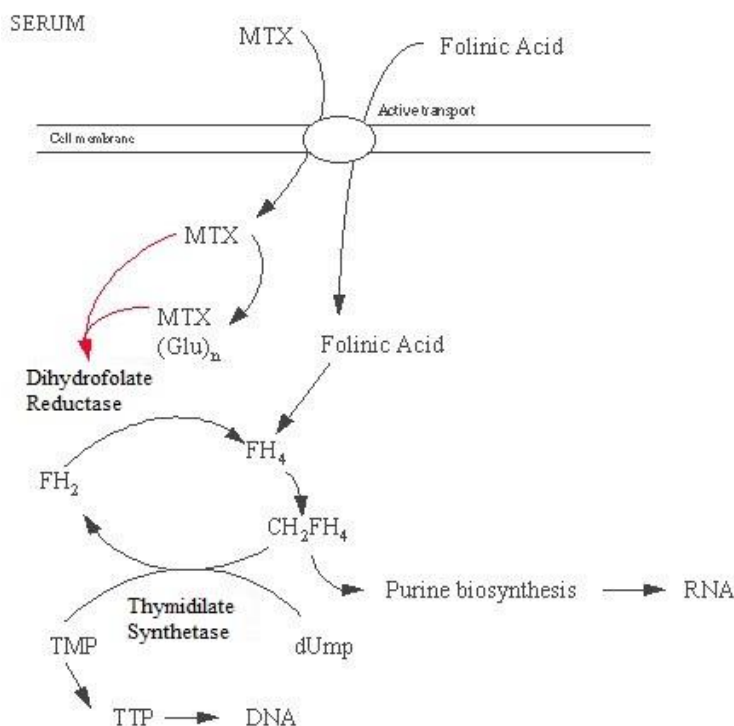
obrázku 11. MTX, vzhledem k podobné struktuře s foláty, vstupuje do buňky stejnými receptory jako foláty. Uvnitř buňky vznikají glutamáci za přítomnosti enzymu folylpolyglutamátsyntetasy polyglutamáty ( $\text{MTX}(\text{Glu})_n$ ), které se ukládají v buňce. Pokud je v buňce přítomen MTX nebo  $\text{MTX}(\text{Glu})_n$  dochází k jeho navázání na enzym DHFR a jeho následné inhibici, což způsobuje zastavení redukce folátů přes dihydrofoláty (DHF) až na THF. Po vyčerpání THF v organismu dojde k porušení všech reakcí, kterých se tyto přenašeče zúčastňují. Výsledkem je porucha syntézy nukleových kyselin a zastavení dělení buněk. Aplikace LV naopak vede k obnovení reakcí folátů, neboť LV není nutné před dalšími reakcemi redukovat pomocí DHFR. Dostatečná koncentrace LV způsobí vytěsnění MTX z DHFR a znovuobnovení funkce tohoto enzymu. LV vstupuje přednostně do zdravých buněk, u kterých způsobuje nedostatek redukováných folátů smrt po 42 až 48 hodinách. U maligních buněk výrazně citlivějších na přítomnost MTX dochází k zániku mnohem dříve. Pokud by ovšem k podání LV nedošlo včas, kromě poškození rapidně se dělících buněk rakovinných by byly poškozeny i buňky zdravé [97].



**Obrázek 10** Strukturní vzorec metotrexátu (A) a 5-fluorouracilu (B)

LV také zvyšuje cytostatický účinek 5-FU (obrázek 10B) při léčbě karcinomů tlustého střeva, žaludku, konečníku a také slinivky břišní. 5-FU inhibuje enzym thymidilátsyntasu, který je nezbytný při metylaci dUMP (deoxyuridinmonofosfát) na dTMP (deoxythymidinmonofosfát), což způsobuje nedostatek dTMP pro syntézu nukleových kyselin a vede primárně k buněčné smrti rapidně se dělících maligních buněk. Protinádorový účinek 5-FU je možno podpořit tzv. biochemickou modulací právě vlivem LV. Tento synergismus LV a 5-FU v cytostatickém účinku je založen na kovalentní vazbě enzymu thymidilátsyntasy a 5-FdUMP (5-fluorodeoxyuridinmonofosfát, metabolický derivát 5-FU) zesílené přítomností 5,10-methylen-THF, který vzniká právě transformací LV. Podání leukovorinu musí vždy předcházet podání

5-FU a vyžaduje přesné dávkovací schéma, protože může vést i ke zvýšení nežádoucích účinků 5-FU. Nežádoucí účinky samotného LV jsou vzácné. Může se vyskytnout alergická reakce, nevolnost a zvracení. Leukovorin je přednostně vylučován ve formě metabolitů močí a v malém množství i stolicí [89, 97, 98].



**Obrázek 11** Schéma vzájemného působení MTX a LV uvnitř buňky [94]

*MTX – metotrexát, MTX(Glu)<sub>n</sub> – polyglutamat metotrexátu, FH<sub>2</sub> – dihydrofolát, FH<sub>4</sub> – tetrahydrofolát, CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> – 5,10-methylentetrahydrofolát, RNA – ribonukleová kyselina, DNA – deoxyribonukleová kyselina, TMP – thymidinmonofosfát, TTP – thymidintrifosfát, dUmp – deoxyuridinmonofosfát.*

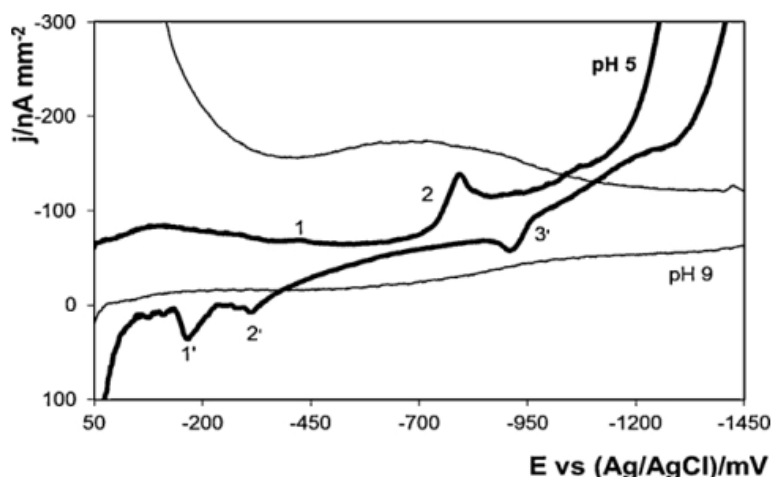
### 2.2.3 Voltametrické chování leukovorinu

V literatuře byly popsány různé analytické metody určené pro stanovení leukovorinu. Nejčastěji se využívá kapalinová chromatografie (HPLC) s gradientovou elucí a duální detekcí, konkrétně UV absorpce a fluorescence [99, 100], nebo fluorescenční detekcí [101]. Dalšími metodami vhodnými pro stanovení LV jsou spektrofotometrie [102], fluorimetrie [103] nebo kapilární elektroforéza [104].

Vzhledem k tomu, že LV je elektrochemicky aktivní látka, může být stanoven rovněž voltametricky. Elektrochemické metody jsou využívány zejména pro jejich rychlost, dobrou citlivost, časovou nenáročnost, nízké pořizovací a provozní náklady a často jednodušší

přípravu vzorku k analýze. Roli hraje také možnost miniaturizace. Voltametričkému chování LV není v literatuře věnováno mnoho pozornosti. V práci [105] z roku 1994 autoři Stejskal a Heyrovský studovali voltametričké chování LV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,7 pomocí cyklické voltametrie a navrhli metodu pro jeho stanovení s využitím adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (AdSV) [105]. Obdobné výsledky získali i autoři Šelešovská a kol. [94] na HMDE i p-AgSAE a m-AgSAE. Pro studium voltametričkého chování LV byla opět použita CV nebo DCV a pro jeho stanovení rozpouštěcí DPV.

Jak je vidět na obrázku 12, LV poskytoval na HMDE ve slabě kyselém prostředí 3 oxidační ( $E_{p1'} = -180$  mV,  $E_{p2'} = -330$  mV a  $E_{p3'} = -950$  mV; pH 5) a 2 redukční ( $E_{p1} = -440$  mV a  $E_{p2} = -850$  mV; pH 5) signály. Oxidačnímu píku 3' odpovídá příslušný redukční signál 2. Další dva registrované oxidační signály 1' a 2' odpovídaly dvoustupňové oxidaci na pteridinovém jádře. Produkt této reakce byl následně opět redukován (pík 1). Signál redukčního píku 1 bylo možné zesílit předřazením akumulčního kroku. Obdobné výsledky byly získány rovněž s využitím AgSAE [94, 105]. V obou uvedených publikacích bylo potvrzeno, že je možné LV adsorbovat na rtuťový povrch, čehož může být dále využíváno pro jeho voltametričké stanovení. V práci [94] autoři navrhli metodu stanovení LV založenou na redukcí oxidované formy LV a to s využitím AdSV v kombinaci s AgSAE. Navrženou metodu pak úspěšně aplikovali při analýze reálných vzorků injekčních roztoků.



**Obrázek 12** Záznam cyklického voltamogramu LV naměřený na HMDE v prostředí o pH 5 a 9 [94];  $c_{LV} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , 1,2 – redukční píky poskytované oxidovaným LV, 1',2',3' - oxidační píky poskytované LV

## 3 Experimentální část

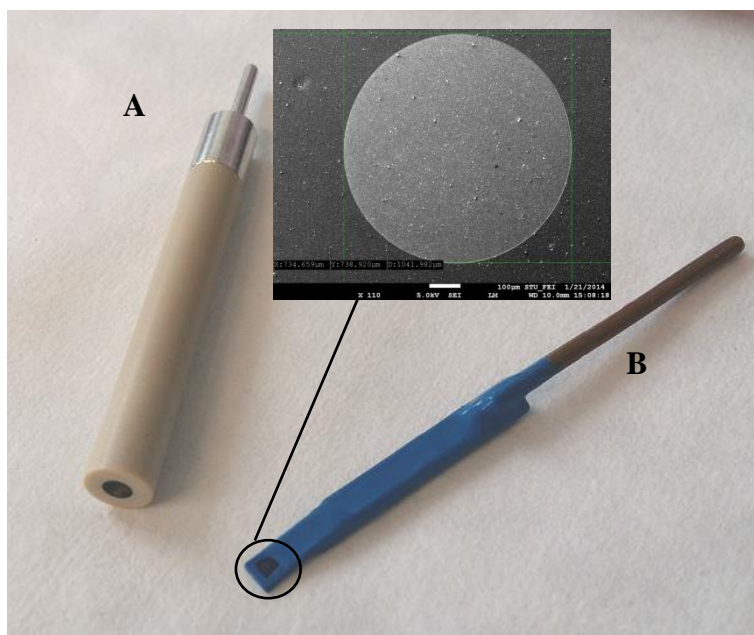
### 3.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie pro přípravu standardních roztoků a elektrolytů byly čistoty p.a. Zásobní roztok LV (Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky jeho vápenaté soli v destilované vodě a uchováván bez přístupu světla v lednici. Analyzované roztoky o nižších koncentracích byly připravovány denně čerstvé ředěním zásobního roztoku. Jako elektrolyt byl používán Brittonův-Robinsonův pufr (BRB) v rozmezí hodnot pH 2-12. BRB byl připraven smícháním kyselé a alkalické složky. Kyselá složka sestávající z roztoku  $H_3PO_4$ ,  $H_3BO_3$  a  $CH_3COOH$  o koncentraci 0,4 mol/l byla připravena naředěním ze zásobních kyselin 85%  $H_3PO_4$  a 99,8%  $CH_3COOH$  a rozpuštěním navážky pevné 99,8%  $H_3BO_3$  (všechny Sigma-Aldrich, Praha). Alkalickou složku tvořil roztok NaOH (Lachema, Brno) o koncentraci 0,2 mol/l. Roztoky  $H_2SO_4$  o koncentraci 0,5 a 0,05 mol/l byly připraveny naředěním 96%  $H_2SO_4$  (Penta-Švec, Praha). Dále byl používán jako elektrolyt roztok KCl (Penta-Švec, Praha) o koncentraci 0,1 mol/l, který byl připraven rozpuštěním vhodné navážky pevného KCl v destilované vodě. Zásobní roztoky  $K_3[Fe(CN)_6]$  a  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  (oba  $\leq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci  $2,5 \times 10^{-3}$  byly připraveny rozpuštěním vhodné navážky pevné látky v roztoku KCl. Analyzovaný farmaceutický přípravek ve formě prášku pro přípravu injekčního roztoku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ pocházel od firmy Pliva-Lachema, Brno.

### 3.2 Přístrojové vybavení

Všechna voltametrická měření byla provedena pomocí počítačem řízeného Eco-Tribo Polarografu (Polaro-Sensors, Česká republika) se softwarem POLAR.PRO verze 5.1 pro Windows XP, a to v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda sloužila komerčně dostupná BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie) s pracovním povrchem  $7,07 \text{ mm}^2$  a poměrem B/C v plynné fázi při depozičním kroku deklarovaným výrobcem 1000 ppm (obrázek 13A). Dále byly použity laboratorně vyrobené BDDE (obrázek 13B) s pracovním povrchem  $0,43 \text{ mm}^2$  a poměrem B/C 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm (všechny Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Slovenská republika). Jako referentní byla použita nasycená argentschloridová elektroda (Ag/AgCl(KCl, satur.)) a jako pomocná sloužil platinový (Pt) drátek (obě Monokrystaly Turnov, Česká republika). Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě ( $23 \pm 2$  °C) a za přítomnosti kyslíku, tedy bez bublání

roztoku. Pro ověření vlivu případného odstranění  $O_2$  z roztoku bylo zařazeno bubláni dusíkem (třída čistoty 4.0; Linde, Česká republika). Během měření byla udržována dusíková atmosféra nad roztokem.



**Obrázek 13** Porovnání komerčně dostupné (A) a laboratorně vyrobené (B) BDDE s vloženým SEM snímkem detailu pracovní plochy

Ramanova spektra byla měřena za použití konfokálního systému ISA Dilor-Jobin-Yvon-Spex LabRAM s laserem He-Ne o vlnové délce 632,8 nm. Skenovací elektronová mikroskopie byla prováděna s použitím skenovacího elektronového mikroskopu JOEL JSM-7500F. Hodnoty pH byly měřeny pomocí pH metru Accumet AB150 (Fisher Scientific, Česká republika). Pro přípravu roztoků byly použity analytické váhy (Kern, Česká republika). Automatické pipety (Biohit PLC, Finsko, Thermo Scientific, Finsko, Eppendorf Research Česká republika) sloužily pro dávkování roztoků.

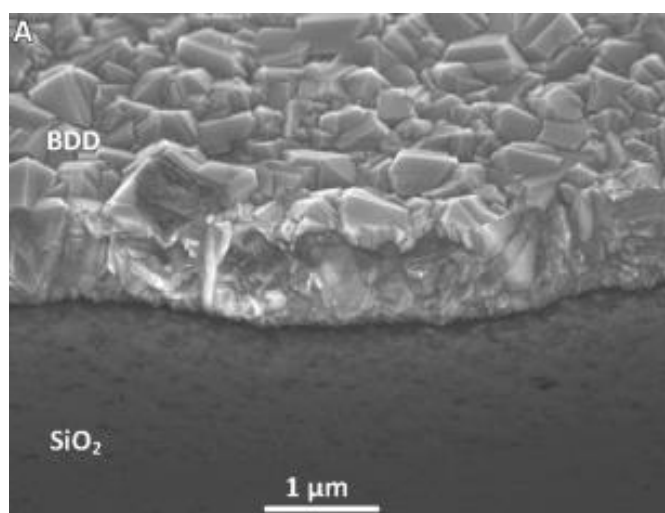
Všechny grafy prezentované v práci byly získány pomocí softwaru MS Excel 2010 (Microsoft, USA). Parametry kalibračních přímků a intervaly spolehlivosti byly vypočteny pomocí programu OriginPro 9 (OriginLab Corporation, USA) na hladině významnosti 0,05. Statistické parametry, jako je limit detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ), byly vypočítány z naměřených koncentračních závislostí jako  $3\times$ , resp.  $10\times$  směrodatná odchylka úseku podělená směrnici kalibrační přímků.

### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Příprava BDDE k měření

Jak již bylo uvedeno výše, komerční BDDE pocházela od firmy Windsor Scientific z Velké Británie. Laboratorně připravené BDD elektrody s různým obsahem boru byly dodány pracovníky Ústavu elektroniky a fotoniky Slovenské technické univerzity v Bratislavě. Pro depozici diamantového filmu byla použita metoda studených par (CVD) s reaktorem se žhavenými vlákny (HF). Substrátem byla křemíková destička s tenkou vrstvou  $\text{SiO}_2$  (CVD, Oxford PlasmaLab 80). Jako zdroj boru byl použit přídatek trimetylboranu (TMB) do plynné směsi  $\text{CH}_4$  a  $\text{H}_2$ . Obsah  $\text{CH}_4$  ve směsi byl nastaven na 1 %. Poměr B/C v plynné fázi se měnil v rozsahu od 1000 do 20 000 ppm. Podrobný postup výroby elektrod a konkrétní podmínky depozice diamantového filmu jsou uvedeny v práci [84]. Na obrázku 14 je uveden záznam ze SEM, kde je patrné rozhraní mezi substrátem s vrstvou  $\text{SiO}_2$  a deponovaným BDD filmem.

Všechny použité BDD elektrody byly aktivovány, resp. regenerovány stejným způsobem. Před zahájením měření byla každá elektroda vždy aktivována v 0,5 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , kdy byl nejprve na elektrodu vložen katodický potenciál ( $E_k$ )  $-2000$  mV na dobu 60 s a poté anodický potenciál ( $E_a$ )  $+2000$  mV opět na 60 s. Následovalo proměření 20 cyklických voltamogramů od počátečního potenciálu ( $E_{\text{poč}}$ )  $-1000$  mV do potenciálu obratu ( $E_{\text{obratu}}$ )  $+2000$  mV při rychlosti polarizace 100 mV/s. Mezi jednotlivými měřeními pak byl vložen na elektrodu pozitivní regenerační potenciál ( $E_{\text{reg}}$ )  $+2000$  mV na dobu ( $t_{\text{reg}}$ ) 5 s. Tento krok zajišťoval O-terminovaný povrch použité elektrody během měření a současně oxidaci případných nečistot na povrchu zachycených.



**Obrázek 14** SEM snímek BDD filmu deponovaného na povrchu Si substrátu s tenkou vrstvou  $\text{SiO}_2$  [84]

### 3.3.2 Voltametrická měření

Pro studium voltametrického chování LV na komerční BDDE byla použita metoda cyklické voltametrie (CV). Byly zaznamenány závislosti získaných signálů na pH a rychlosti polarizace ( $v$ ). Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $E_{\text{poč}} -1000$  mV a  $E_{\text{obratu}} +2000$  mV při  $v$  100 mV/s. Při studiu vlivu  $v$  na voltametrické chování LV byla rychlost měněna v rozsahu 25-500 mV/s. Pro vývoj metody stanovení LV na BDDE byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) v prostředí BRB o pH 3. Po optimalizaci parametrů byly pro všechna další měření na všech použitých pracovních elektrodách nastaveny následující hodnoty:  $E_{\text{poč}} -700$  mV, konečný potenciál ( $E_{\text{kon}}$ ) +1800 mV,  $E_{\text{reg}} +2000$  mV,  $t_{\text{reg}} 5$  s,  $v$  40 mV/s, šířka pulzu 20 ms a výška pulzu +50 mV. Získané výšky píků byly vyhodnoceny pomocí spojnice začátku a konce píku.

Při elektrochemické charakterizaci BDD filmů s poměrem B/C 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm metodou CV bylo využito reverzibilních redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Před zahájením měření byla příslušná elektroda vždy aktivována postupem uvedeným v kapitole 3.3.2. Pro oba systémy byly nastaveny parametry měření v rozsahu  $E_{\text{poč}} -1600$  mV až  $E_{\text{obratu}} +1800$  mV při  $v$  100 mV/s. Při měření závislosti na rychlosti polarizace se  $v$  měnila následujícím způsobem: 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 a 500 mV/s. Z uvedených měření byly vyhodnocovány rozdíly potenciálů anodického a katodického signálu ( $\Delta E_p$ ), poměry výšek anodického a katodického signálu ( $I_a/I_c$ ), byl počítán elektrochemicky aktivní povrch jednotlivých elektrod pomocí Randles-Ševčíkovy rovnice [106] a také zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje ( $k_{\text{app}}^0$ ) podle Nicholsona [107].

### 3.3.3 Analýza farmaceutického přípravku

Analyzovaným praktickým vzorkem byl farmaceutický přípravek „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ (Lachema, Brno), což je prášek pro přípravu injekčního roztoku. Roztok (obrázek 15) byl připraven podle návodu od výrobce rozpuštěním 10 mg prášku v 1 ml destilované vody. Koncentrace takto připraveného roztoku byla přibližně  $1,955 \times 10^{-2}$  mol/l (vypočteno na základě množství prášku v ampulce deklarovaného výrobcem). Pro následnou analýzu byl tento roztok  $10 \times$  zředěn ( $1,955 \times 10^{-3}$  mol/l). 10  $\mu$ l připraveného roztoku vzorku bylo přidáno do polarografické nádoby k 10 ml základního elektrolytu (BRB o pH 3). Analýza byla provedena metodou standardního přídávku a jako standardní přídavek bylo dávkováno 20  $\mu$ l standardního roztoku LV o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Byly přidány vždy 2-3

standardní přídávky a stanovení injekčního roztoku LV bylo zopakováno 5×. Z těchto měření pak byla vypočtena průměrná hodnota s příslušným intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení (RSD).



*Obrázek 15 Injekční roztok „Leucovorin Ca LACHEMA 10“*

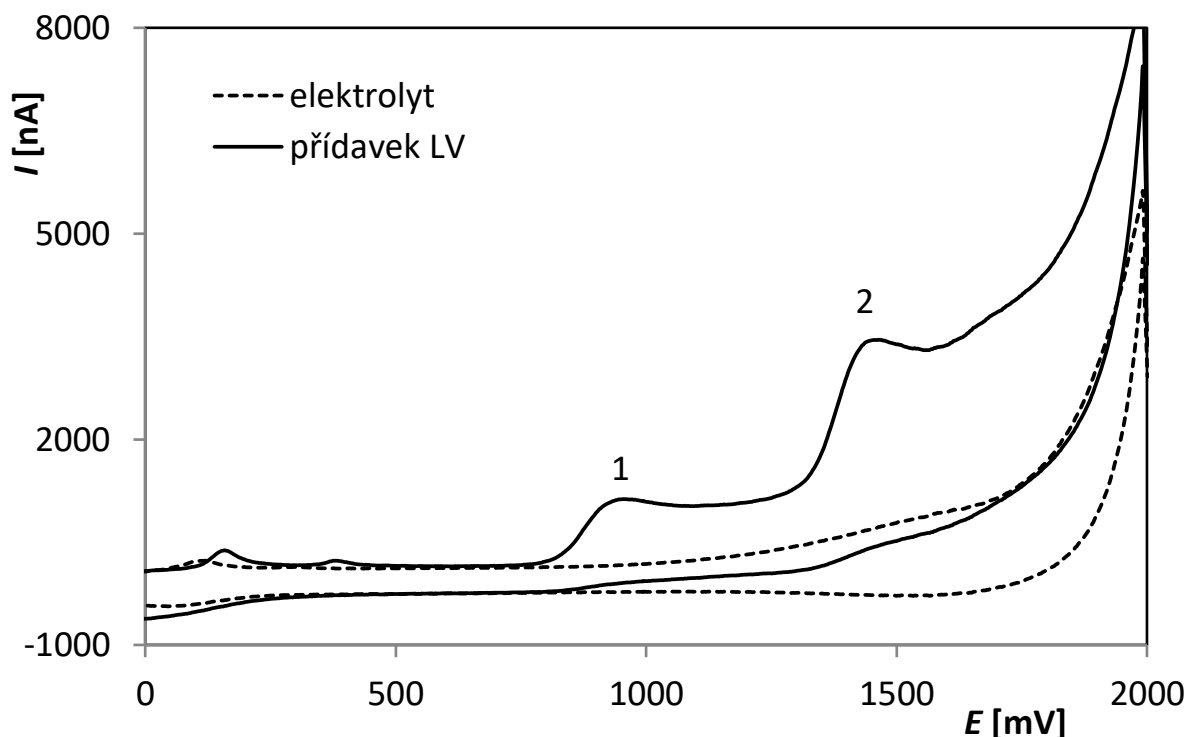
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Studium voltametrického chování leukovorinu na BDDE a vývoj metody stanovení

Voltametrickému stanovení LV není v literatuře věnováno příliš pozornosti. Jeho chování na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,7 bylo podrobně popsáno Stejskalem a Heyrovským [105]. Poté se analýzou LV zabývali autoři v práci [94], kteří studovali chování LV vedle HMDE i na p-AgSAE a m-AgSAE a vyvinuli metody jeho stanovení s využitím uvedených pracovních elektrod na bázi rtuti. V rámci této diplomové práce bylo poprvé studováno voltametrické chování LV na BDDE a rovněž byla vyvinuta metoda jeho stanovení. Pro tyto experimenty byla použita komerčně dostupná BDDE od firmy Windsor Scientific z Velké Británie s deklarovaným obsahem boru 1000 ppm a s pracovním povrchem o velikosti 7,07 mm<sup>2</sup>.

#### 4.1.1 Studium voltametrického chování leukovorinu na BDDE

V úvodu této diplomové práce byl změřen cyklický voltamogram LV o koncentraci  $5 \times 10^{-5}$  mol/l na BDDE v prostředí BRB o pH 5. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů od  $E_{\text{poč}} -1000$  mV do  $E_{\text{obratu}} +2000$  mV při  $v$  100 mV/s. Získaný voltamogram je uveden na obrázku 16. Z něho vyplývá, že LV poskytuje na BDDE ve slabě kyselém prostředí 2 významné oxidační signály. Signál anodického píku 1 byl pozorován při potenciálu +947 mV a signál píku 2 byl zaznamenán při potenciálu +1445 mV. Podle literatury [105] odpovídají tyto signály pravděpodobně dvoustupňové oxidaci pteridinového jádra. Na katodické křivce nebyla zaznamenána žádná odpovídající redukční proudová odezva, a tudíž je možné říci, že se jedná o chemicky ireverzibilní elektrodové reakce. Dále byl testován vliv kyslíku na uvedený CV záznam LV, kdy byl roztok před měřením probubláván dusíkem po dobu 5 minut. Bylo zjištěno, že odstranění kyslíku nemělo žádný vliv na tvar získaného voltamogramu, a proto všechna následující měření probíhala v přítomnosti kyslíku, tedy bez bublání roztoku dusíkem.



**Obrázek 16** Cyklický voltamogram LV zaznamenaný na BDDE  
 Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 5),  $E_{poč} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2000$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l

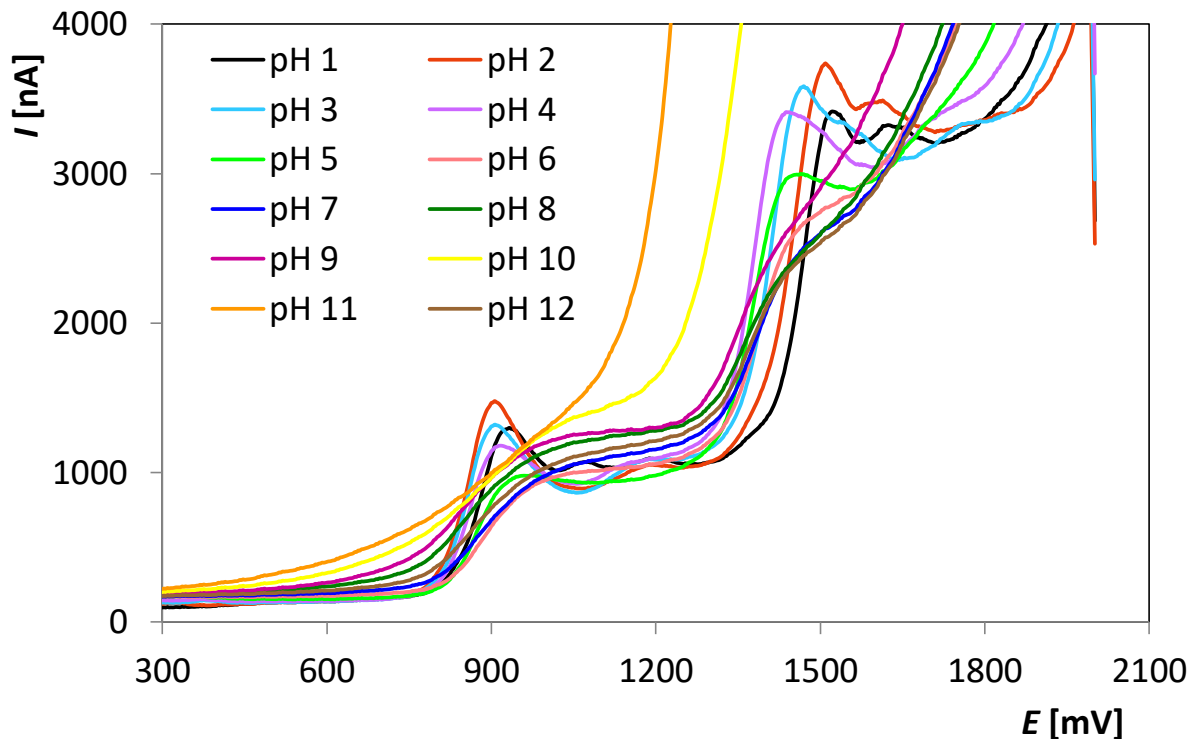
#### 4.1.1.1 Závislost na pH

Další experimenty byly zaměřeny na studium voltametričkého chování LV v závislosti na pH základního elektrolytu pomocí metody CV. Měření probíhalo v základním elektrolytu  $H_2SO_4$  o koncentraci 0,05 mol/l k zajištění prostředí o pH 1 a v roztoku BRB pro pH v rozsahu 2-12. Koncentrace LV byla opět  $5 \times 10^{-5}$  mol/l a vyhodnocovány byly oba zaznamenané oxidační signály. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $E_{poč} -1000$  mV a  $E_{obratu} +2000$  mV při  $v = 100$  mV/s. Vzhledem k tomu, že nebyly pozorovány žádné redukční signály, jsou na obrázku 17 uvedeny pro zjednodušení jen anodické části získaných cyklických voltamogramů. Z obrázků je zřejmé, že v kyselém prostředí bylo pro oba píky dosaženo nejvyšší proudové odezvy. Jak je vidět ze závislosti výšky píky ( $I_p$ ) na pH uvedených na obrázku 18A, nejvyšší píky 1 i 2 byly zaznamenaný v prostředí BRB o pH 2. S rostoucí hodnotou pH docházelo k postupnému snižování prvního signálu a také k jeho rozšiřování a deformaci. Druhý anodický signál byl v kyselém prostředí rozdělen na dva a ty se s rostoucí hodnotou pH přibližovaly, až se ve slabě kyselém prostředí spojily v jednu proudovou odezvu, která opět s rostoucí hodnotou pH klesala. Navíc tvar, a tedy i vyhodnotitelnost

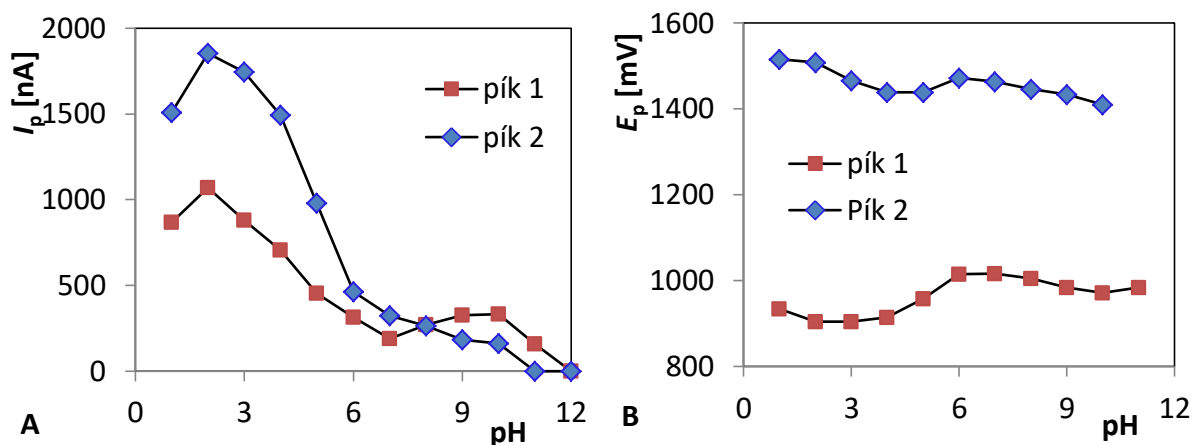
tohoto píku, byl významně ovlivněn koncem potenciálového okna. V silně alkalické oblasti o pH 10 a 11 nebyly již pozorovány žádné významné signály odpovídající oxidaci LV.

Na základě získaných výsledků se jeví jako optimální pro další měření LV na BDDE prostředí BRB o pH 2. Při opakovaném měření ale bylo zjištěno, že 1. pozorovaný signál je v tomto prostředí velice špatně opakovatelný a v závislosti na čase dochází k jeho významnému poklesu. Současně se začal tvořit nový pík při mírně pozitivnějších potenciálech, který naopak v závislosti na čase narůstal. Toto zjištění svědčí o komplikovaném průběhu sledovaného děje, který může být spojen s nějakou předřazenou nebo následnou chemickou reakcí (např. kyselá hydrolyza analytu). O komplikovaném průběhu elektrodových reakcí svědčí také závislosti potenciálu píků 1 a 2 na pH (obrázek 18B), které nevykazují žádný významný trend a  $E_p$  střídavě klesá a opět roste se změnou pH.

Vzhledem ke špatné opakovatelnosti prvního oxidačního signálu v BRB o pH 2 bylo pro další studie zvoleno mírně kyselé prostředí (pH 5), kde již podobné jevy pozorovány nebyly. Výběru vhodného prostředí (pH) pro vývoj metody stanovení LV bude pozornost věnována i v dalších kapitolách.



**Obrázek 17** Anodické části CV voltamogramů LV v závislosti na pH zaznamenaných na BDDE  
Metoda CV, elektrolyt 0,05 mol/l  $H_2SO_4$  (pH 1), BRB (pH 2-12),  $E_{poč} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2000$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l



**Obrázek 18** Závislosti výšky (A) a potenciálu (B) píků 1 a 2 na pH získané na BDDE  
 Metoda CV, elektrolyt 0,05 mol/l  $H_2SO_4$  (pH 1), BRB (pH 2-12),  $E_{poč} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2000$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l

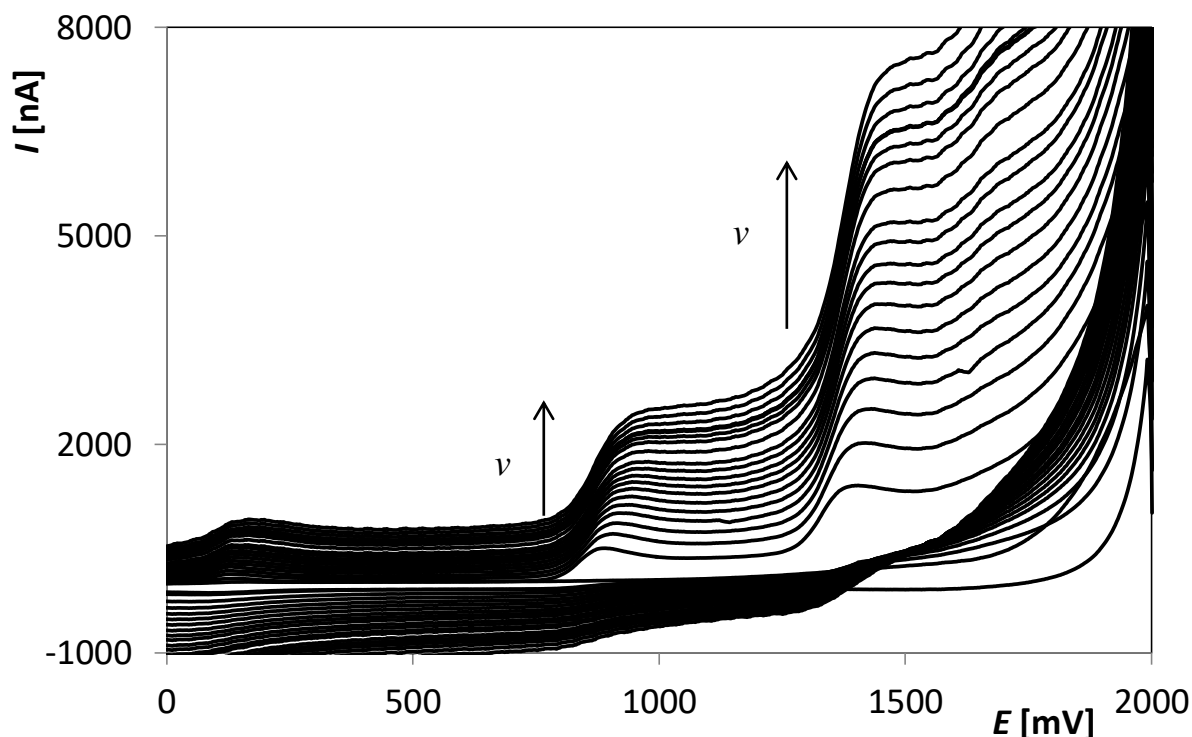
#### 4.1.1.2 Závislost na rychlosti polarizace

Dalším studovaným parametrem, který ovlivňoval výšku, tvar a polohu oxidačních signálů LV, byla rychlost polarizace. Měření probíhalo metodou CV v rozsahu potenciálů od  $E_{poč} -1000$  mV do  $E_{obratu} +2000$  mV, kdy  $v$  byla měněna od 25 do 500 mV/s po 25 mV/s. V polarografické nádobce byla vždy koncentrace LV  $5 \times 10^{-5}$  mol/l. V prostředí BRB o pH 5 byly získány voltametrické křivky, které jsou uvedené na obrázku 19. Z něj vyplývá, že výšky obou oxidačních píků s rostoucí rychlostí polarizace rostly. Současně docházelo k posunu obou signálů k pozitivnějším potenciálům, což odpovídá ireverzibilnímu průběhu elektrodových reakcí. Různé formy závislosti výšky píku na rychlosti polarizace pro obě zaznamenané proudové odezvy jsou uvedeny na obrázku 20. Z obrázku 20A je patrné, že  $I_p$  s rostoucí  $v$  neroste lineárně ani pro pík 1 ani pro pík 2, takže probíhající reakce nejsou řízeny adsorpcí. Následně byly vyneseny závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 20B), které lze považovat za lineární a mohou být popsány následujícími rovnicemi 5 a 6 pro 1. a 2. pík s příslušnými korelačními koeficienty:

$$I_p [\text{nA}] = (20,60 \pm 0,39)v^{1/2} [(\text{mV/s})^{1/2}] + (342,5 \pm 6,4), R = 0,9967, \quad (5)$$

$$I_p [\text{nA}] = (59,6 \pm 1,1)v^{1/2} [(\text{mV/s})^{1/2}] + (258 \pm 19), R = 0,9967, \quad (6)$$

Vzhledem k lineárnímu průběhu sledovaných závislostí je pravděpodobné, že jsou reakce řízeny difuzí nebo že má na jejich průběh difuze významný vliv.



**Obrázek 19** Cyklické voltamogramy LV v závislosti na rychlosti polarizace zaznamenané na BDDE  
Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 5),  $E_{poč} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2000$  mV,  $v = 25-500$  mV/s,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l

Pro upřesnění řídicích procesů u probíhajících elektrodových reakcí byly vyneseny také logaritmické závislosti ( $\log(I_p)_{\log(v)}$ ), které jsou uvedeny na obrázku 20C a mohou být popsány rovnicí (7) pro první signál a rovnicí (8) pro druhý signál opět s příslušnými korelačními koeficienty:

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,2117 \pm 0,0042) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,3230 \pm 0,0010),$$

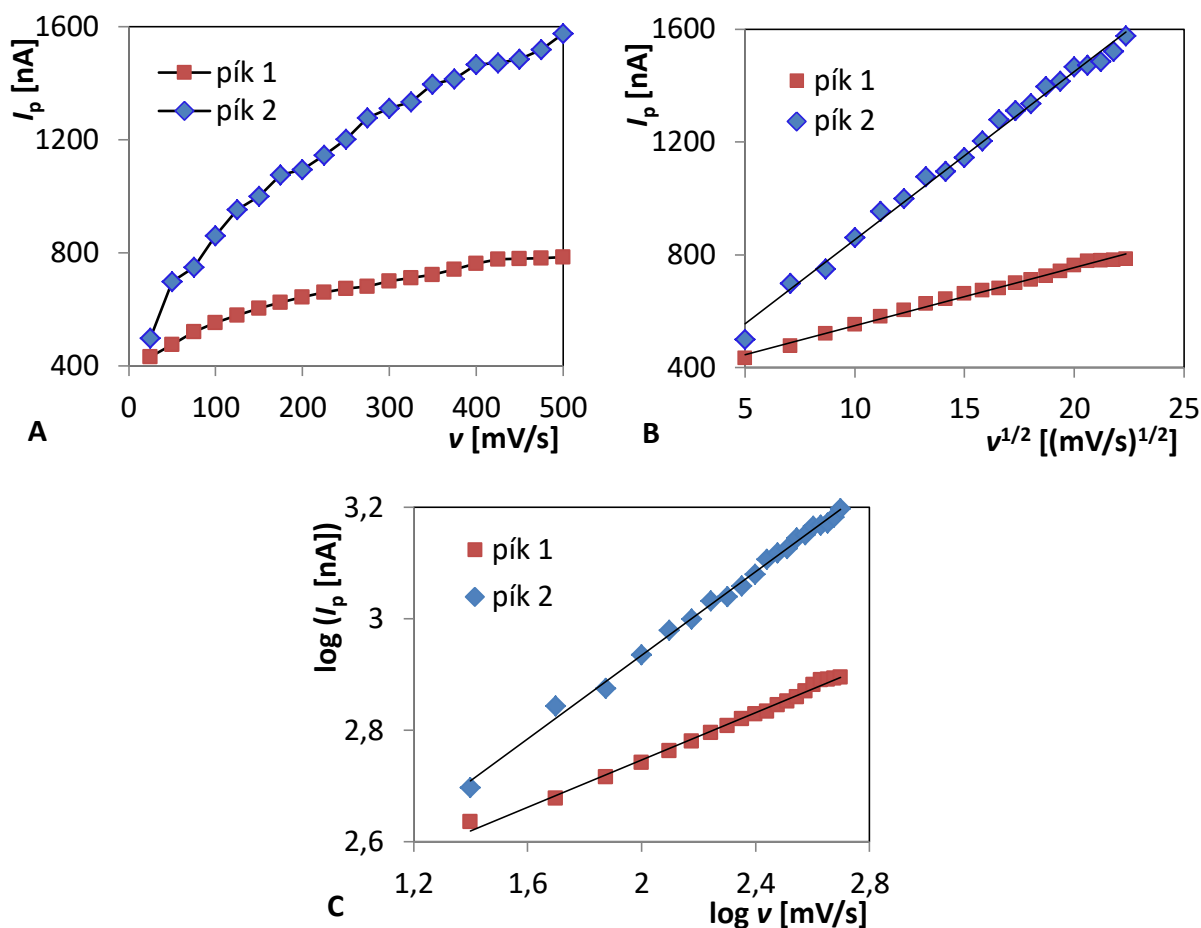
$$R = 0,9968 \quad (7)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,3747 \pm 0,0054) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,185 \pm 0,013),$$

$$R = 0,9981 \quad (8)$$

U těchto logaritmických závislostí je určující hodnota směrnice získané rovnice. Jestliže se tato hodnota blíží hodnotě 0,5, jedná se o difuzně řízenou elektrodovou reakci. Pokud se hodnota blíží jedné, jde o adsorpčně řízenou reakci, a když se směrnice blíží nule, jde o kineticky řízenou reakci. V případě obou oxidačních píků LV se hodnoty směrnic uvedených rovnic 7 a 8 pohybují mezi hodnotami 0 a 0,5 (konkrétně 0,2117 resp. 0,3747) a jedná se tedy o složitější elektrodové děje, které jsou významně ovlivněny jak difuzí, tak

kinetikou nějaké chemické reakce, která může být předřazena probíhající elektrodové reakci nebo může jít o reakci následnou.



**Obrázek 20** Závislosti  $I_p$  píku 1 a 2 na  $v$  (A) a  $v^{1/2}$  (B) a logaritmické závislosti  $I_p$  píku 1 a 2 na  $v$  (C) zaznamenané na BDDE

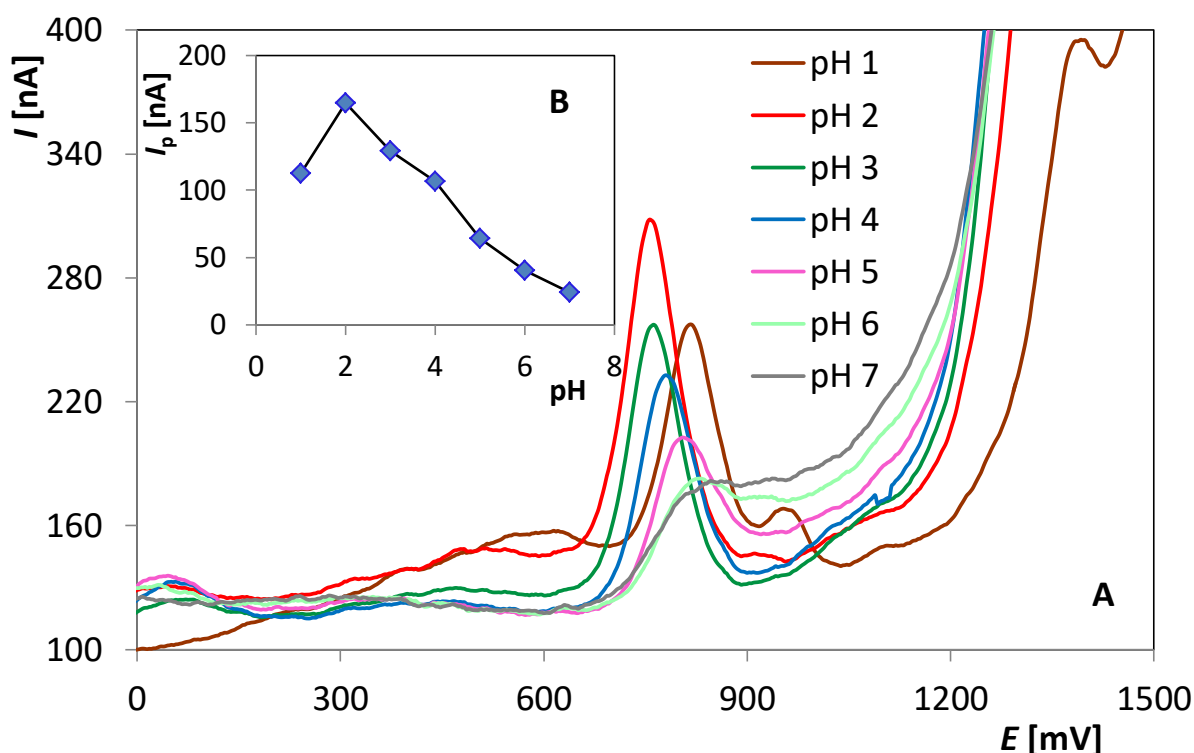
Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 5),  $E_{poč} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2000$  mV,  $v = 25-500$  mV/s,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l

#### 4.1.2 Vývoj metody stanovení leukovorinu s využitím BDDE

Vzhledem k vyšší citlivosti byla pro stanovení LV v modelových roztocích pomocí BDDE vybrána metoda diferenční pulzní voltametrie (DPV). Nejdříve bylo nutné optimalizovat podmínky pro měření metodou DPV, a to pH elektrolytu, rychlost polarizace a výšku, resp. šířku potenciálového pulzu. Poté byly analyzovány různé modelové roztoky LV s cílem stanovit základní statistické parametry navržené metody. Na závěr byla tato metoda aplikována při analýze praktického vzorku farmaceutického přípravku.

#### 4.1.2.1 Optimalizace podmínek stanovení leukovorinu

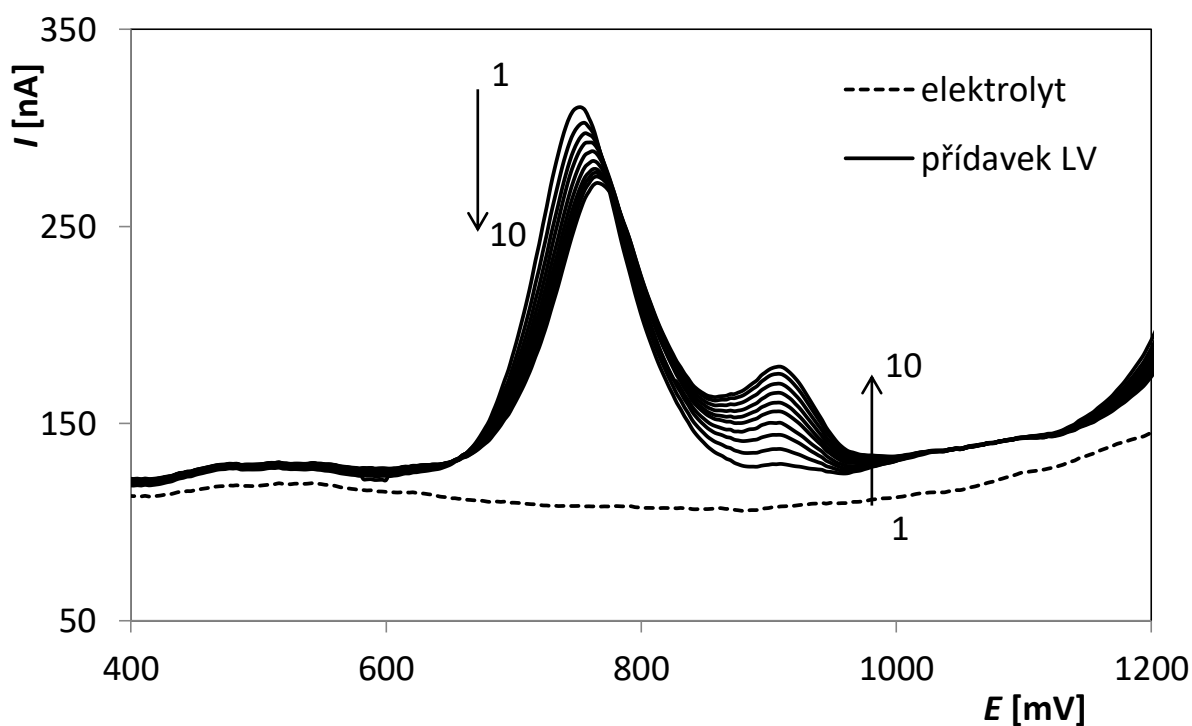
Pro stanovení LV byla vybrána jeho první oxidační proudová odezva (pík 1) s ohledem na lepší polohu a tedy i vyhodnotitelnost v porovnání s píkem 2. Na úvod bylo nutné znovu otestovat vliv pH elektrolytu (BRB) na sledovaný signál LV, a to i v souvislosti s výše zmíněnou horší opakovatelností měření v kyselém prostředí. Testování probíhalo pouze v rozsahu pH 1-7, protože, jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1.1.1, v kyselé oblasti poskytuje LV větší a štíhlejší píky, než v oblasti zásadité. Použité parametry metody byly následující:  $E_{poč} -700$  mV,  $E_{kon} +1800$  mV,  $v$  25 mV/s, výška pulzu 50 mV a šířka pulzu 50 ms. Jak ukazuje obrázek 21A, nejvyšší proudová odezva byla opět naměřena pro BRB o pH 2. Z vložené závislosti  $I_p$  na  $v$  je patrné, že při zvyšování pH docházelo k postupnému snižování sledovaného signálu LV. Proto byl nejdříve zvolen BRB o pH 2 jako elektrolyt pro další měření.



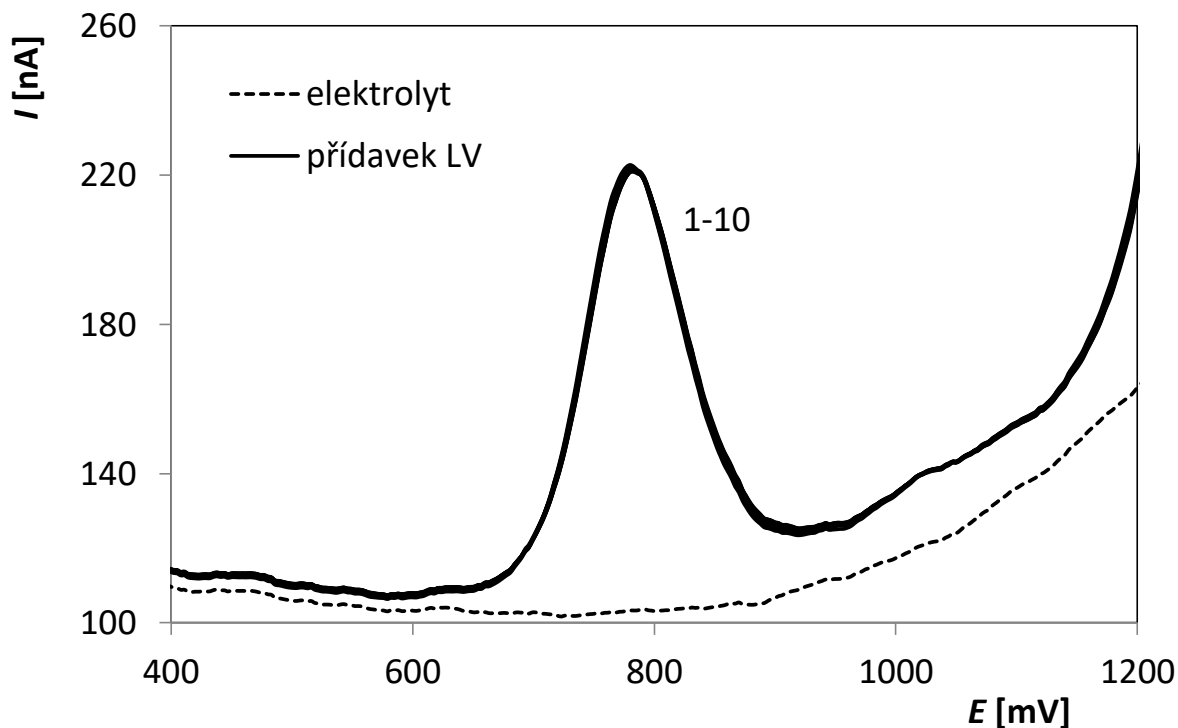
**Obrázek 21** DP voltamogramy LV v závislosti na pH (A) a závislost  $I_p$  na pH (B) zaznamenané na BDDE  
Metoda DPV, elektrolyt 0,05 mol/l  $H_2SO_4$  (pH 1), BRB (pH 2-7),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 25$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 50 ms,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-5}$  mol/l

Vzhledem k předchozím zkušenostem se špatnou opakovatelností měření v takto kyselém prostředí byla opakovatelnost testována i při měření metodou DPV. Všechny parametry měření byly stejné, jako u předchozího experimentu. Na obrázku 22 je uveden záznam 10

opakovaných měření roztoku LV o koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  mol/l v prostředí BRB o pH 2. Ze záznamu je patrné, že při opakování měření docházelo postupně ke snižování výšky sledovaného píku 1 a naopak se začal tvořit další signál u pozitivnějšího potenciálu, který v závislosti na čase naopak narůstal. Z těchto 10 měření byly vyhodnoceny výšky píku 1 a byla vypočtena hodnota relativní směrodatné odchylky ( $RSD_{10}$ ). Jak ukazuje tabulka 1, tato hodnota ( $RSD_{10} > 8 \%$ ) nebyla dostatečná pro analytické účely a BRB o pH 2 tedy není vhodným prostředím pro stanovení LV, protože analyt je nestabilní. Dále byla proto proměřena opakovatelnost ještě při hodnotách pH 3, 4 a 5, aby bylo zjištěno, v jakém prostředí je již měření LV dobře opakovatelné. Průměrné výšky píků a vypočtené hodnoty  $RSD_{10}$  jsou shrnuty v tabulce 1. Z té je zřejmé, že při zvyšování pH docházelo k významnému zlepšení opakovatelnosti. Příklad DP voltamogramů pro BRB o pH 4 je uveden na obrázku 23. Z obrázku je vidět, že opakovatelnost signálu je velmi dobrá a pík u pozitivnějšího potenciálu se již netvořil. Vzhledem k tomu, že již při pH 3 bylo dosaženo velmi dobrých výsledků ( $RSD_{10} = 1,9 \%$ ), což svědčí o zvýšení stability analytu v roztoku, a současně byl pík nejvyšší v porovnání s méně kyselým prostředím, byla tato hodnota pH zvolena jako optimální pro všechny následující experimenty.



**Obrázek 22** DP voltamogramy opakovaného měření LV zaznamenané na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2),  $E_{poc} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 25$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
 šířka pulzu = 50 ms,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-5}$  mol/l

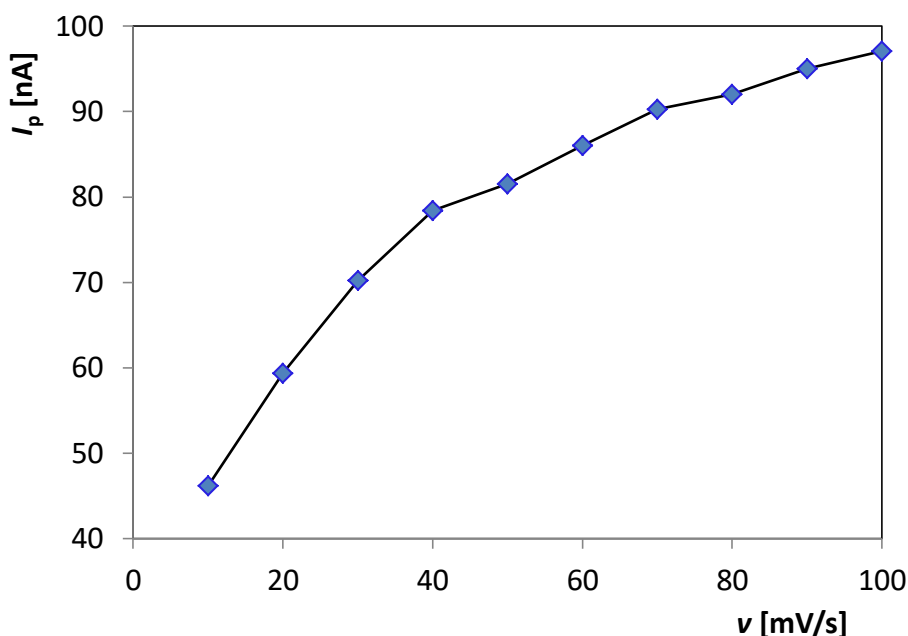


**Obrázek 23** DP voltamogramy opakovaného měření LV zaznamenané na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 4),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 25$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
 šířka pulzu = 50 ms,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-5}$  mol/l

**Tabulka 1** Opakovatelnost měření  $1 \times 10^{-5}$  mol/l LV v prostředí BRB v závislosti na pH

pH	$I_p$ [nA]	RSD <sub>10</sub> [%]
2	161,4±8,8	8,3
3	132,8±1,7	1,9
4	107,09±0,62	0,9
5	64,53±0,83	1,9

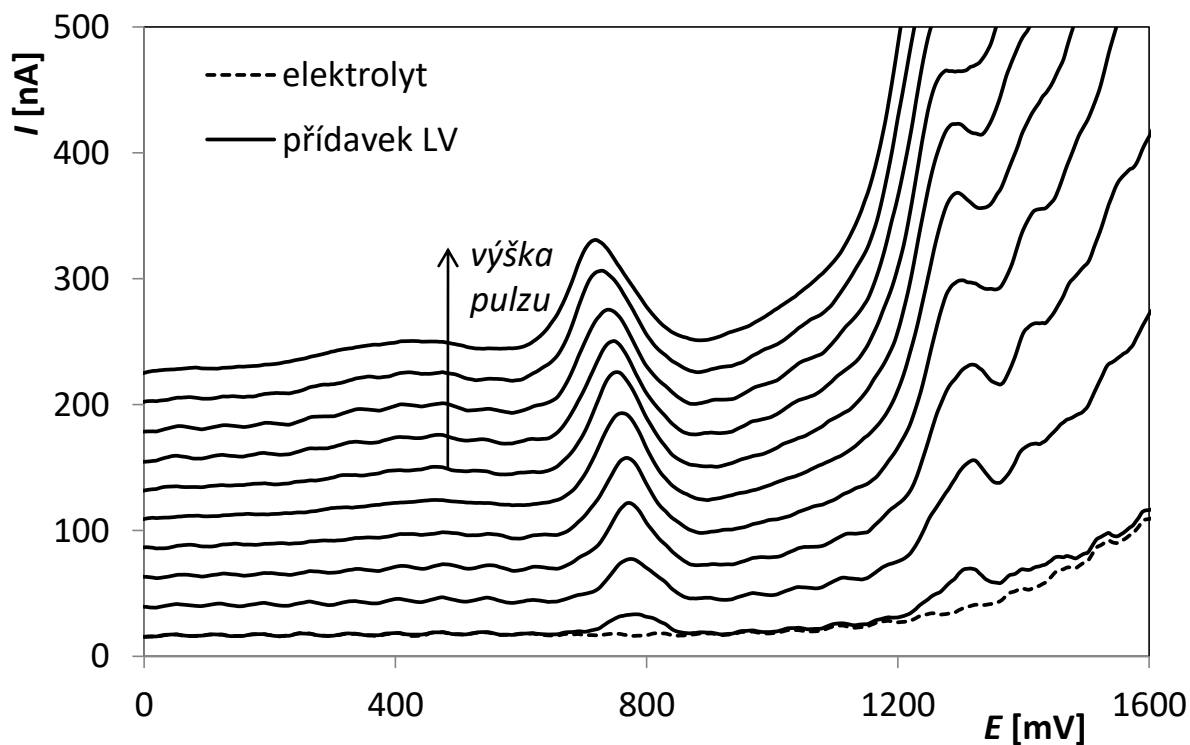
Prvním studovaným parametrem při optimalizaci metody DPV pro stanovení LV na BDDE byla rychlost polarizace. Jako základní elektrolyt byl použit BRB o pH 3. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $E_{poč} -700$  mV a  $E_{kon} +1800$  mV, výška pulzu byla 50 mV a šířka pulzu 50 ms. Koncentrace LV v polarografické nádobce při všech optimalizačních měřeních byla  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. Rychlost polarizace byla měněna v rozsahu od 10 do 100 mV/s po 10 mV/s. Na obrázku 24 je vynesena závislost  $I_p$  na  $v$ . Z té vyplývá, že proudová odezva s rostoucí rychlostí vzrůstala. Tento nárůst byl přibližně lineární do rychlosti 40 mV/s a poté se zpomalil. Navíc při vyšší  $v$  docházelo rovněž k rozšiřování píku. Pro další měření byla proto vybrána hodnota 40 mV/s.



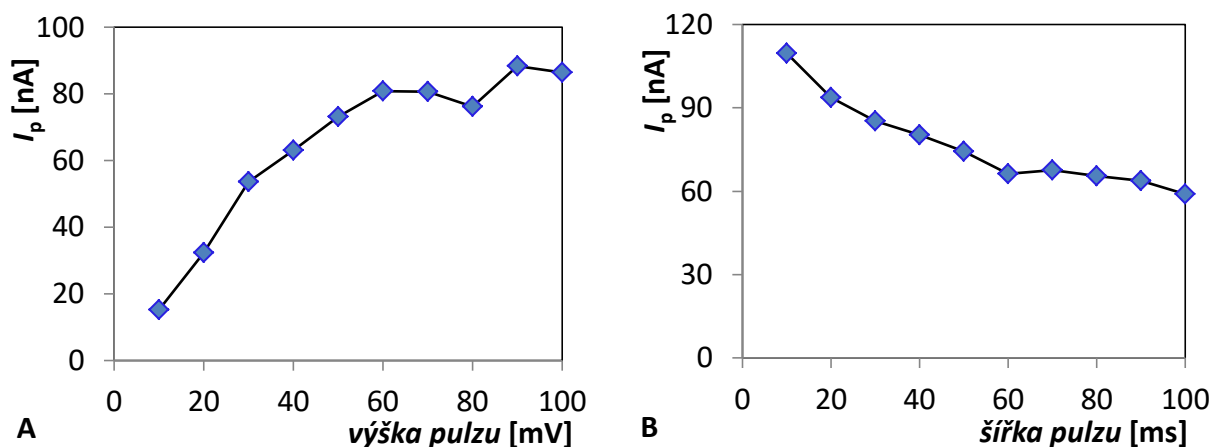
**Obrázek 24** Závislost  $I_p$  na  $v$  zaznamenaná na BDDE

Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 10-100$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 50 ms,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-6}$  mol/l

Dalším testovaným parametrem byla výška pulzu. Měření opět probíhalo v rozsahu potenciálů od  $-700$  do  $+1800$  mV rychlostí 40 mV/s. Velikost šířky pulzu byla nastavena opět na 50 ms. Výška pulzu byla měněna po 10 mV od 10 do 100 mV. Záznam získaných DP voltamogramů je uveden na obrázku 25. Z tohoto obrázku a současně ze závislosti  $I_p$  na výšce pulzu na obrázku 26A je zřejmé, že se zvyšující se výškou pulzu docházelo také ke zvyšování proudové odezvy. Mezi hodnotami 10-60 mV byla tato závislost opět přibližně lineární. Při vyšších hodnotách výšky pulzu již signál v podstatě nenarůstal, ale docházelo k jeho rozšiřování. Pro další měření byla vybrána výška pulzu 50 mV. Posledním testovaným parametrem byla šířka pulzu. Měření opět probíhalo ve stejném rozsahu potenciálů při nastavených optimálních hodnotách  $v$  40 mV/s a výšce pulzu 50 mV. Šířka pulzu byla měněna od 10 do 100 ms vždy po 10 ms. Ze závislosti uvedené na obrázku 26B je patrné, že s rostoucí šířkou pulzu docházelo ke snižování proudové odezvy až do hodnoty 60 ms. Poté se již  $I_p$  významně neměnila. Pro další měření byla vybrána šířka pulzu 20 ms. To znamená, že po 20 ms klidové doby probíhá měření v posledních 20 ms pulzu. Po optimalizaci parametrů DPV byly následně testovány podmínky regenerace elektrody. Nejprve byl vkládán  $E_{reg} +2000$  mV po dobu  $t_{reg}$  5 s, kdy byly získány krásně vyvinuté a dobře opakovatelné signály LV, které se ale s dalším prodlužováním  $t_{reg}$  již nijak významně nezlepšovaly. Naopak při vkládání  $E_{reg} -2000$  mV docházelo k výraznému zhoršování signálu.



**Obrázek 25** DP voltamogramy LV v závislosti na výšce pulzu zaznamenané na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 10-100 mV,  
 šířka pulzu = 50 ms,  $c_{LV} = 5 \times 10^{-6}$  mol/l

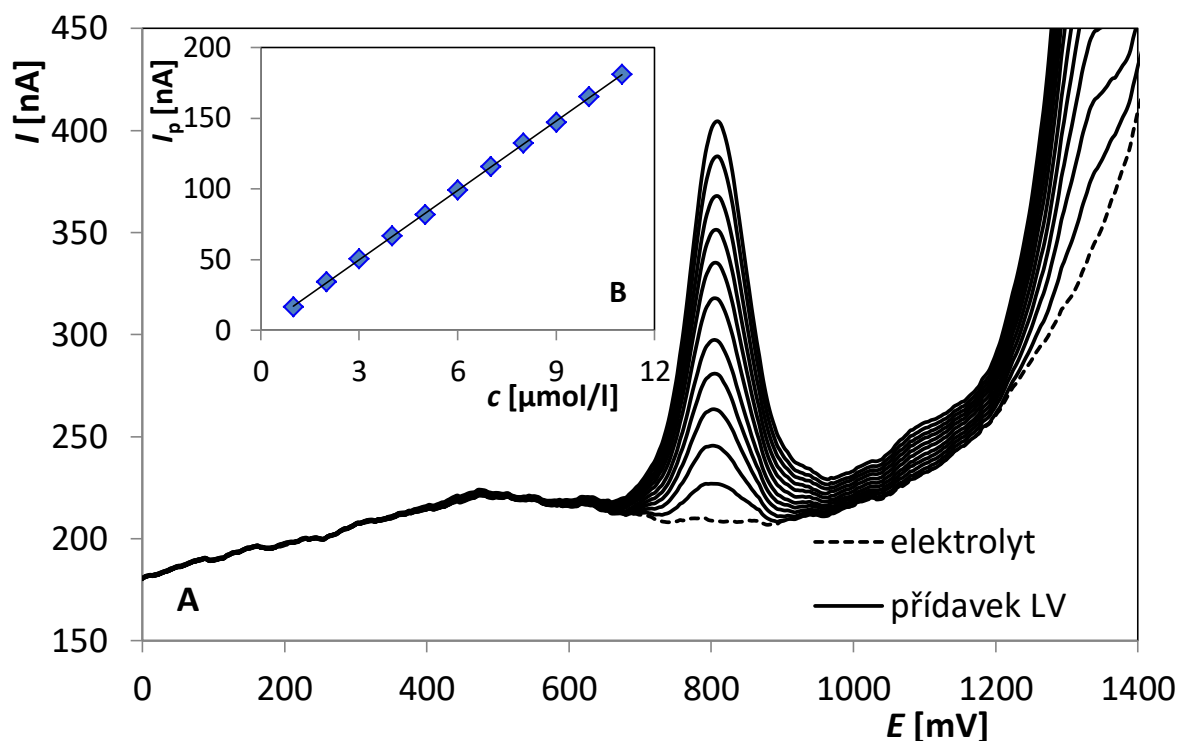


**Obrázek 26** Závislosti  $I_p$  na výšce pulzu (A) a šířce pulzu (B) zaznamenané na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 10-100 mV  
 (A) a 50 mV (B), šířka pulzu = 50 ms (A) a 10-100 ms (B),  $c_{LV} = 5 \times 10^{-6}$  mol/l

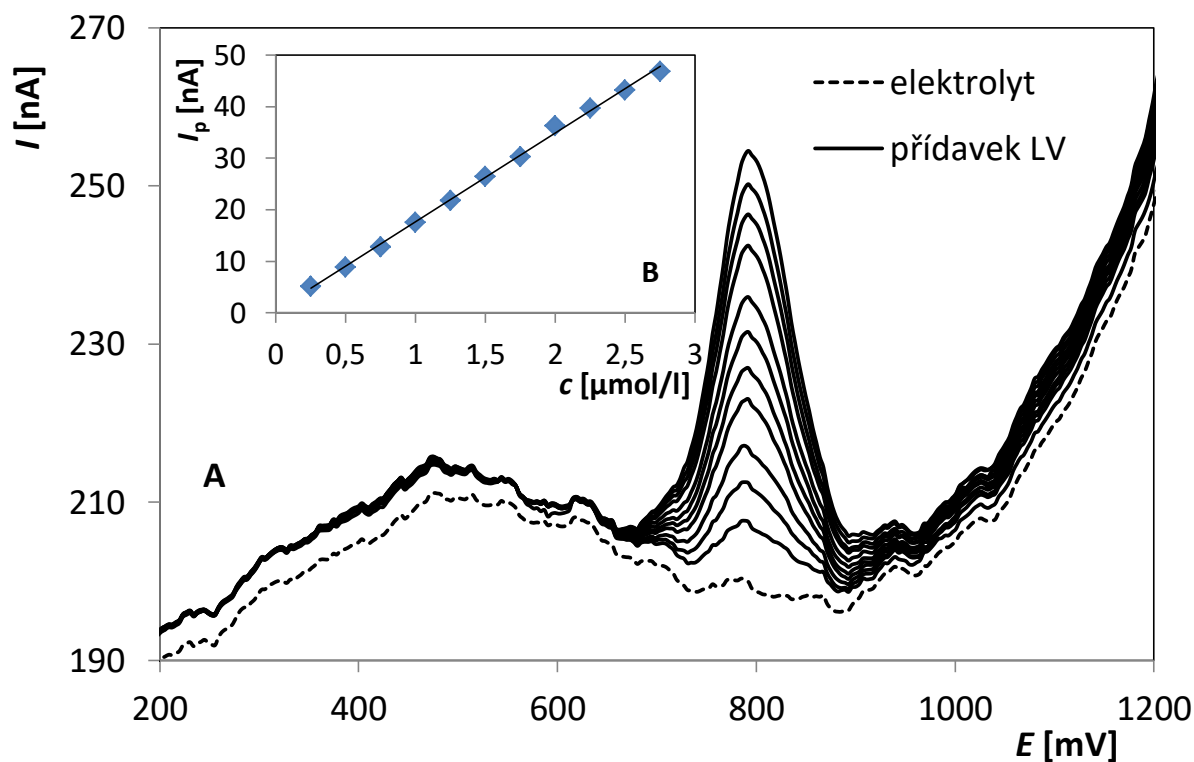
#### 4.1.2.2 Analýza modelových roztoků leukovorinu

Při optimalizovaných experimentálních podmínkách DPV byly proměřeny koncentrační závislosti LV v modelových roztocích na komerční BDDE. Měření probíhalo v rozsahu

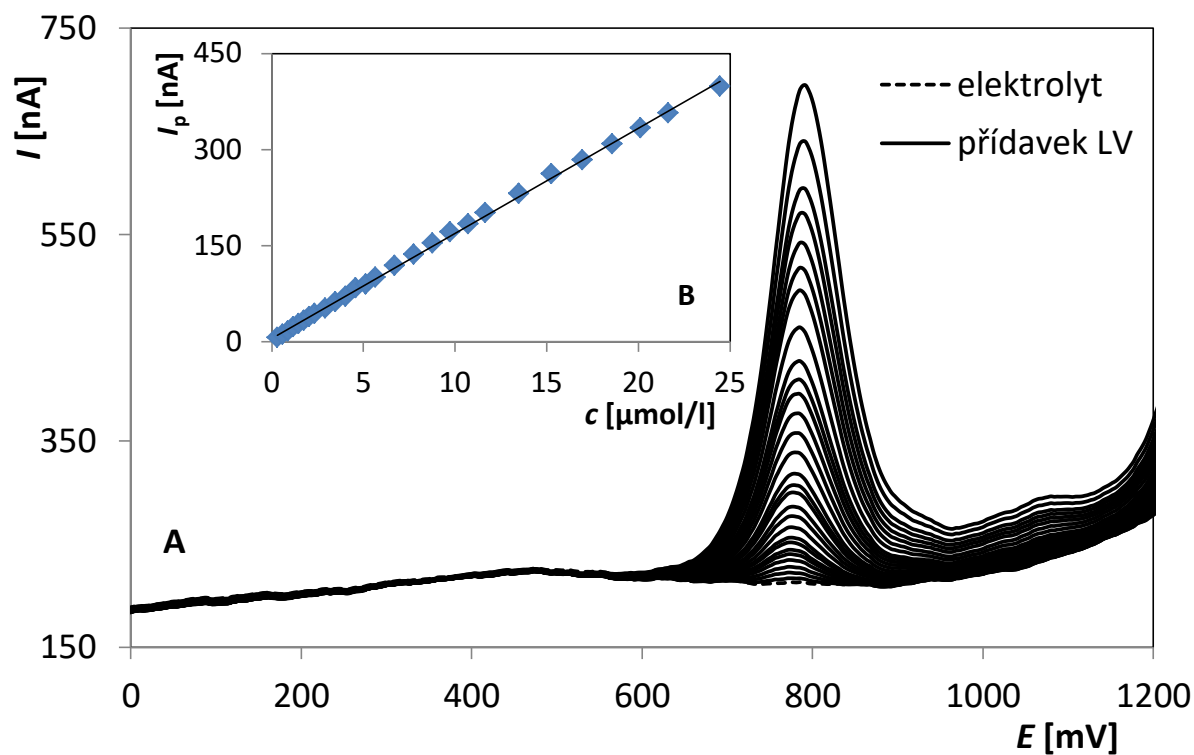
potenciálů  $E_{poč} -700$  mV a  $E_{kon} +1800$  mV s optimalizovanými parametry  $v$  40 mV/s, výška pulzu 50 mV a šířka pulzu 20 ms v prostředí BRB o pH 3. Na obrázku 27 a 28 jsou uvedeny příklady získaných voltamogramů různých koncentračních závislostí. Na obrázku 27A jde o koncentraci v rozsahu  $1 \times 10^{-6}$ - $1,1 \times 10^{-5}$  mol/l. Z vložené závislosti vyplývá, že se výška píku zvyšovala lineárně s rostoucí koncentrací LV (obrázek 27B). Na obrázku 28A je uveden příklad pro nižší koncentraci LV v roztoku, a to  $2,5 \times 10^{-7}$ - $2,8 \times 10^{-6}$  mol/l. Vynesená závislost výšky píku na koncentraci LV opět rostla lineárně (obrázek 28B). Parametry rovnic, kterými lze uvedené koncentrační závislosti popsat, včetně odpovídajících korelačních koeficientů jsou shrnuty v tabulce 2. Pro ilustraci velmi širokého lineárního dynamického rozsahu pro stanovení LV metodou DPV ve spojení s BDDE je na obrázku 29 prezentována také závislost naměřená v rozsahu  $2,99 \times 10^{-7}$ - $2,45 \times 10^{-5}$  mol/l. Z koncentrační závislosti naměřené pro nejnižší koncentraci LV v roztoku ( $1,5 \times 10^{-7}$ - $1,7 \times 10^{-6}$  mol/l), jejíž parametry jsou rovněž uvedeny v tabulce 2, byl vypočítán detekční limit (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) pro navrženou metodu. Byly získány hodnoty LOD  $1,5 \times 10^{-8}$  mol/l a LOQ  $5,0 \times 10^{-8}$  mol/l. Takto nízké hodnoty jsou dány velice dobrou linearitou ( $R = 0,999$ ) závislosti použité k výpočtu.



**Obrázek 27** DP voltamogramy LV v závislosti na koncentraci (A), závislost  $I_p$  na  $c_{LV}$  (B) zaznamenaná na BDDE  
Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-6}$  až  $1,1 \times 10^{-5}$  mol/l



**Obrázek 28** DP voltamogramy LV v závislosti na koncentraci (A), závislost  $I_p$  na  $c_{LV}$  (B) zaznamenaná na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
 šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s,  $c_{LV} = 2,5 \times 10^{-7}$  až  $2,8 \times 10^{-6}$  mol/l



**Obrázek 29** DP voltamogramy LV v závislosti na koncentraci (A), závislost  $I_p$  na  $c_{LV}$  (B) zaznamenané na BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
 šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s,  $c_{LV} = 2,99 \times 10^{-7}$  až  $2,45 \times 10^{-5}$  mol/l

*Tabulka 2* Statistické parametry koncentračních závislostí LV v modelových roztocích

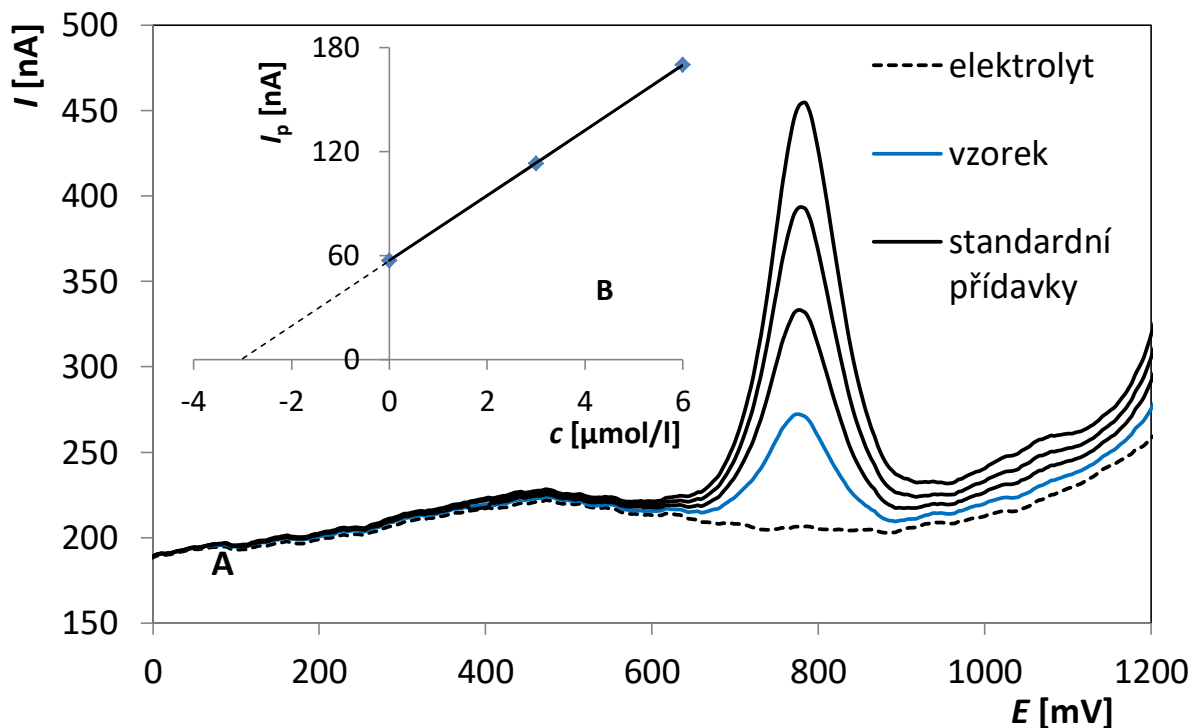
<b>c [μmol/l]</b>	<b>Směrnice [nA l μmol<sup>-1</sup>]</b>	<b>Úsek [nA]</b>	<b>R</b>
1,0-11	(16,389±0,062)	(0,61±0,42)	0,9999
0,25-2,8	(17,19±0,25)	(0,55±0,42)	0,9991
0,15-1,7	(17,201±0,084)	-(0,089±0,086)	0,9999
0,3-24,5	(16,392±0,037)	(5,4976±4,1)	0,9996

Z tabulky 2 rovněž vyplývá, že hodnoty směrnice všech prezentovaných závislostí jsou téměř shodné, což svědčí o konstantním nárůstu výšky píku s koncentrací LV v roztoku v širokém rozsahu koncentrací. Lineární dynamický rozsah (LDR) pro navrženou metodu byl  $1,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l.

V další části práce byla testována opakovatelnost měření, resp. stanovení LV na komerčně dostupné BDDE při nastavení optimalizovaných podmínek. Pro koncentraci LV v roztoku  $1 \times 10^{-5}$  mol/l bylo změřeno 11 opakovaných křivek a následně ze získaných výšek píku byla vypočítána hodnota  $RSD_{11}$  0,70 %. Tato hodnota svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření a také velmi dobré reprodukovatelnosti povrchu BDDE. V dalším kroku byly analyzovány 3 modelové roztoky LV o různé koncentraci ( $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $3,0 \times 10^{-7}$  mol/l). Pro stanovení obsahu LV byla použita metoda standardního přídatku, kdy byly vždy přidány minimálně 2-3 přídatky standardního roztoku LV o koncentraci 0,001 mol/l. Stanovení bylo vždy 5× zopakováno a byla vypočtena průměrná hodnota koncentrace LV s příslušným intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 0,05, relativní směrodatná odchylka ( $RSD_5$ ) a výtěžnost. Všechny výsledky jsou shrnuty v tabulce 3, z níž vyplývá, že získané výsledky jsou správné a stanovení je velmi dobře opakovatelné ( $RSD_5 < 3$  %). Na obrázku 30 je uveden příklad stanovení LV v modelovém roztoku o koncentraci  $3 \times 10^{-6}$  mol/l doplněný grafickým vyhodnocením metody standardního přídatku.

*Tabulka 3* Výsledky opakovaných stanovení LV v modelových roztocích

<b>Dáno [mol/l]</b>	<b>Stanoveno [mol/l]</b>	<b>Výtěžnost [%]</b>	<b>RSD<sub>5</sub> [%]</b>
$1,0 \times 10^{-5}$	$(1,010 \pm 0,017) \times 10^{-6}$	98,0-105,0	2,57
$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,030 \pm 0,035) \times 10^{-6}$	98,3-102,6	1,74
$3,0 \times 10^{-7}$	$(3,000 \pm 0,029) \times 10^{-7}$	99,0-102,6	1,46



**Obrázek 30** Stanovení LV v modelovém roztoku o koncentraci  $3 \times 10^{-6}$  mol/l zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B)

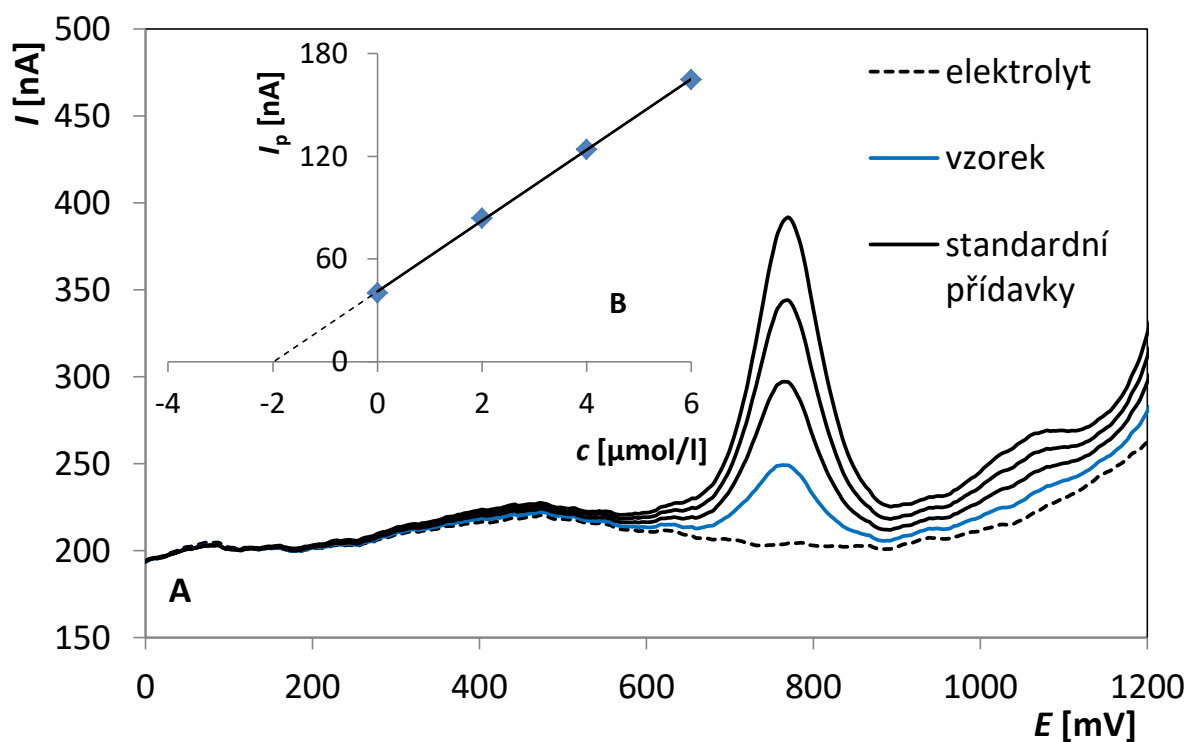
Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s, standardní přídavky:  $V = 30$   $\mu$ l,  $c_{LV} = 0,001$  mol/l

#### 4.1.2.3 Analýza farmaceutického přípravku

Na závěr této části diplomové práce, zaměřené na studium voltametrického chování LV na BDDE a na vývoj metody stanovení tohoto léčiva, byla navržená metoda aplikována při analýze reálného vzorku farmaceutického přípravku. Byl analyzován prášek pro přípravu injekčního roztoku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“, u nějž výrobce deklaroval obsah 10 mg LV na jednu ampulku. Příprava vzorku k analýze a konkrétní postup stanovení LV byl popsán v Experimentální části v kapitole 3.3.3. Analýza byla provedena opět metodou standardního přídavku a stanovení bylo opakováno 5 $\times$ . Vypočítaný obsah LV s dalšími statistickými parametry stanovení je uveden v tabulce 4. Z té vyplývá, že stanovení LV ve farmaceutickém přípravku vykazuje velmi dobré výsledky, je správné a dobře opakovatelné, s velmi dobrou výtěžností. Příklad získaných voltamogramů s vloženým grafickým vyhodnocením analýzy přípravku pro přípravu injekčního roztoku pomocí metody standardního přídavku je uveden na obrázku 31.

**Tabulka 4** Výsledky opakovaného stanovení LV ve farmaceutickém přípravku

Deklarováno [mg]	Stanoveno [mg]	Výtěžnost [%]	RSD <sub>5</sub> [%]
10	10,08±0,12	98,7-102,8	1,81



**Obrázek 31** Stanovení LV v roztoku farmaceutického přípravku zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B)

Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{\text{poč}} = -700$  mV,  $E_{\text{kon}} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{\text{reg}} = +2000$  mV,  $t_{\text{reg}} = 5$  s, standardní přídavky:  $V = 20$   $\mu\text{l}$ ,  $c_{LV} = 0,001$  mol/l

## 4.2 Charakterizace borem dopovaných diamantových elektrod

Tato část diplomové práce byla zaměřena zejména na elektrochemickou charakterizaci používaných borem dopovaných diamantových elektrod. Všechny experimenty byly realizovány nejprve s komerčně dostupnou BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie) s pracovním povrchem  $7,07 \text{ mm}^2$  a poměrem B/C v plynné fázi při depozičním kroku deklarovaným výrobcem 1000 ppm. Stejná měření byla poté provedena i pro laboratorně vyrobené BDDE s pracovním povrchem  $0,43 \text{ mm}^2$  a poměrem B/C 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm (všechny Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Slovenská republika). Ke studiu elektrochemických vlastností diamantového filmu byla použita CV reverzibilních redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ , které patří mezi nejčastěji využívané při studiu nových elektrodových materiálů a jejich vlastností. Přenos elektronu mezi elektrodou a roztokem je uskutečňován na základě tzv. outer-sphere nebo inner-sphere reakcí, tzn. reakcí řízených mechanismem vnější resp. vnitřní sféry. Mezi outer-sphere redoxní systémy patří např.  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ ,  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$  nebo  $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+/3+}$ . Elektroda je tu pouze jako zdroj elektronů a kinetika probíhajících elektrodových reakcí je málo citlivá na strukturu nebo povrch elektrody. Elektron je přenášen rychle přes vrstvu rozpouštědla a reaktanty, meziprodukty ani produkty reakce nevykazují silné interakce s povrchem elektrody. Přenos elektronu není ovlivněn materiálem elektrody. Mezi redoxní systémy označované jako inner-sphere patří  $\text{Fe}_{\text{aq}}^{3+/2+}$ ,  $\text{V}_{\text{aq}}^{2+/3+}$  a  $\text{Eu}_{\text{aq}}^{2+/3+}$ . Dále se do této skupiny v případě BDD elektrod řadí i  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a kyselina askorbová, které pro kovové elektrody a elektrody tvořené  $\text{sp}^2$  uhlíkem spadají mezi outer-sphere systémy. Reakce zde probíhá přes specifickou interakci s povrchem elektrody. Tento typ reakce je závislý na povrchu a struktuře elektrody a je velmi citlivý k jeho kvalitě. Reaktanty, meziprodukty nebo produkty reakce silně interagují s povrchem elektrody, na který jsou často přímo adsorbovány. Přenos elektronu je silně ovlivněn stavem povrchu, resp. materiálem elektrody [81, 108].

Ze změřených cyklických voltamogramů byla vyhodnocována řada parametrů, které byly následně porovnávány a diskutovány v souvislosti s obsahem boru v diamantovém filmu. Prvním posuzovaným parametrem byla šířka potenciálového okna. Dále byla studována reverzibilita elektrodové reakce pro výše uvedené redoxní systémy, kdy byly z voltametričeských křivek odečteny hodnoty  $I_{\text{pa}}$  a  $I_{\text{pc}}$  pro výpočty poměrů výšek anodických a katodických píků ( $I_{\text{a}}/I_{\text{c}}$ ), resp. hodnoty  $E_{\text{pa}}$  a  $E_{\text{pc}}$  pro výpočty potenciálového rozdílu  $\Delta E_{\text{p}}$ . Poté byly měřeny CV v závislosti na rychlosti polarizace pro používané BDDE a redoxní

systemy  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Následně byly opět vyhodnoceny výšky a potenciály píků anodických i katodických a sestrojeny závislosti  $I_{\text{pa,c}}$  na  $v^{1/2}$ , logaritmické závislosti  $I_{\text{pa,c}}$  na  $v$ , a také  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$ .

Ze získaných závislostí  $I_p$  na  $v^{1/2}$  byl počítán elektrochemicky aktivní povrch jednotlivých elektrod pomocí Randles-Ševčíkovy rovnice (9) [106]:

$$I_{\text{pa,c}} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot n^{1,5} \cdot D^{0,5} \cdot v^{0,5}, \quad (9)$$

kde  $I_{\text{pa,c}}$  je proud anodického a katodického píku,  $A$  je plocha elektrody,  $n$  je počet vyměňovaných elektronů,  $v$  je rychlost polarizace,  $D$  je difuzní koeficient. Hodnoty difuzního koeficientu použité pro výpočet byly převzaty z literatury a byly následující: pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  [81, 109] a pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$   $5,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  [110].

V neposlední řadě byla počítána také zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje ( $k_{\text{app}}^0$ ) podle Nicholsona [107]. Rychlostní konstanta přenosu náboje se stanovuje pomocí CV ze závislosti  $\Delta E_p$  na  $v$  a byla počítána podle rovnice (10):

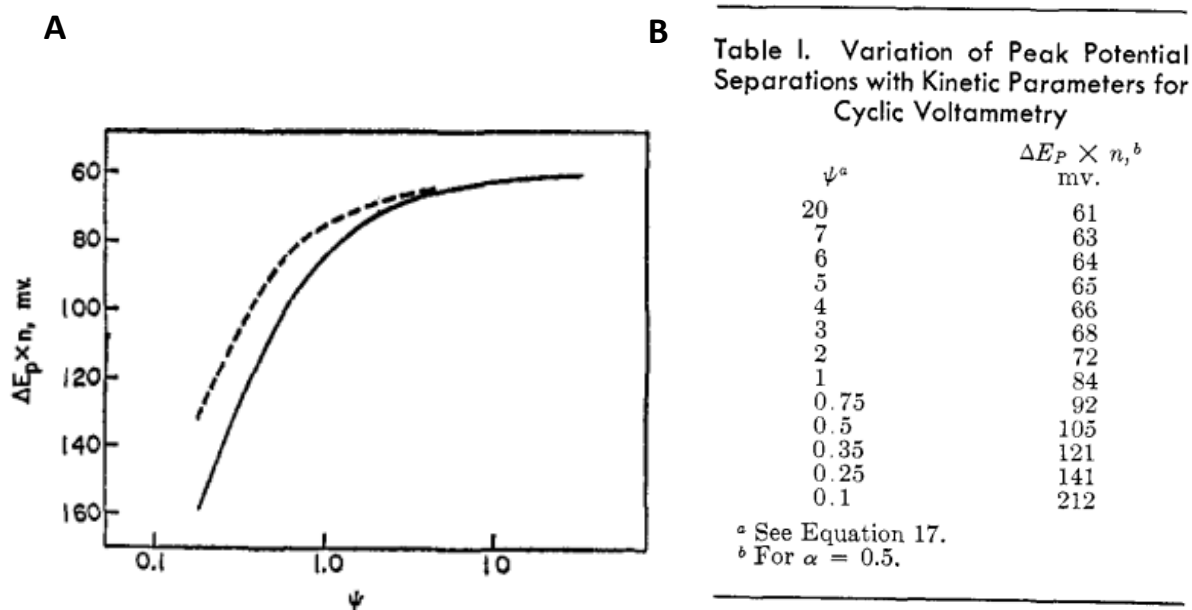
$$\psi = \gamma^\alpha k_{\text{app}}^0 / \sqrt{\pi a D_o}, \quad (10)$$

kde  $k_{\text{app}}^0$  je zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje,  $\gamma$  je poměr difuzních koeficientů oxidační a redukční formy (podle literatury [81, 109] se  $D_{\text{ox}}$  a  $D_{\text{red}}$  rovnají),  $\alpha$  je koeficient přenosu náboje,  $a = nFv/RT$  (kde  $n$  je počet vyměňovaných elektronů,  $v$  je rychlost polarizace,  $F$  je Faradayova konstanta,  $R$  je plynová konstanta,  $T$  je teplota),  $\psi$  je definováno rovnicí (10) a vyjadřuje míru reversibility, resp. ireversibility elektrodové reakce. Na obrázku 32A je  $(\Delta E_p \times n)$  vyneseno jako logaritmická funkce  $\psi$  a na obrázku 32B je uvedena tabulka hodnot  $\psi$  a příslušných  $(\Delta E_p \times n)$ , z nichž uvedená závislost vychází [107]. Pro vysoké hodnoty  $\psi$  platí, že se jedná o reverzibilní reakci, jejíž průběh odpovídá Nernstově rovnici (11) s předpokládaným potenciálovým rozdílem v případě jednoho vyměňovaného elektronu 0,059 V:

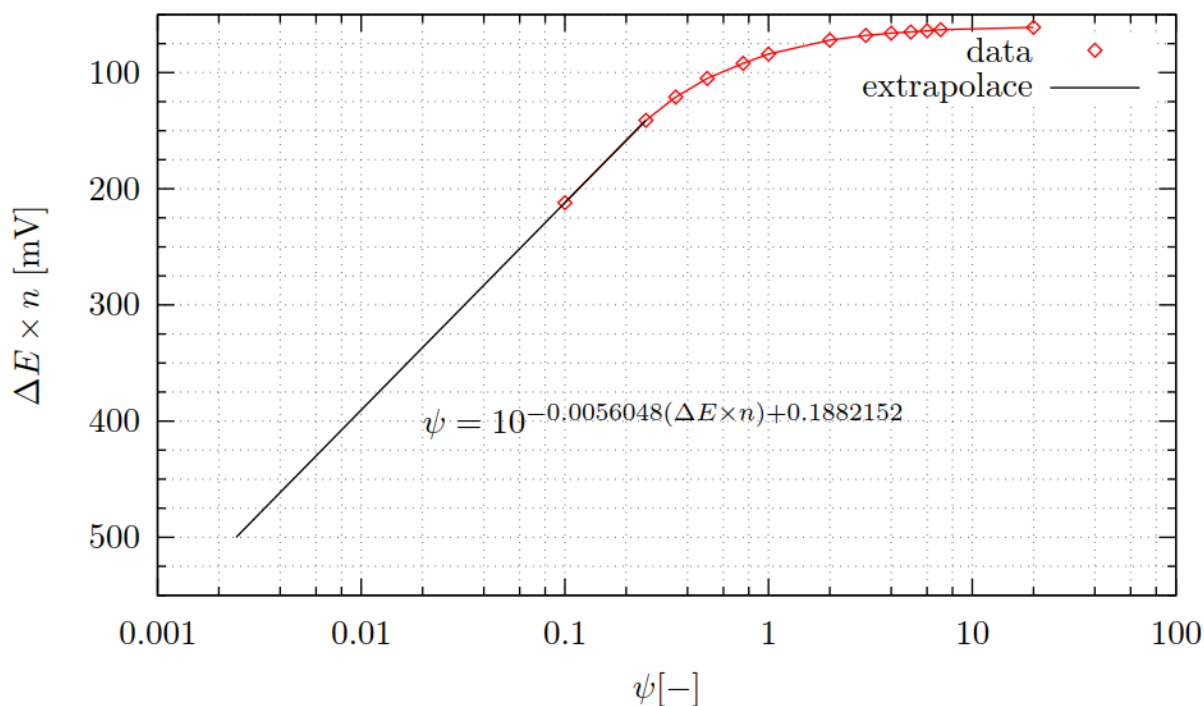
$$E = E^0 - (0,059/n) \cdot \log(a_{\text{red}}/a_{\text{ox}}), \quad (11)$$

kde  $E$  je potenciál elektrody,  $E^0$  je standardní elektronový potenciál,  $n$  je počet vyměňovaných elektronů,  $a$  je aktivita oxidované nebo redukované formy. Pokud se hodnoty  $\psi$  blíží 0, jedná se o ireverzibilní elektrodovou reakci. Podle Nicholsona platí, že pro nízké hodnoty  $\psi$  pokračuje uvedená závislost lineárně. Pro odečet hodnot  $\psi$  byl v rámci této diplomové práce

sestrojen graf, který je uveden na obrázku 33. Pro odečet nízkých  $\psi$  (pro velké hodnoty  $(\Delta E_p \times n)$ ) byla provedena extrapolace a získána rovnice odpovídající uvedenému lineárnímu průběhu závislosti, která je vložena v obrázku.



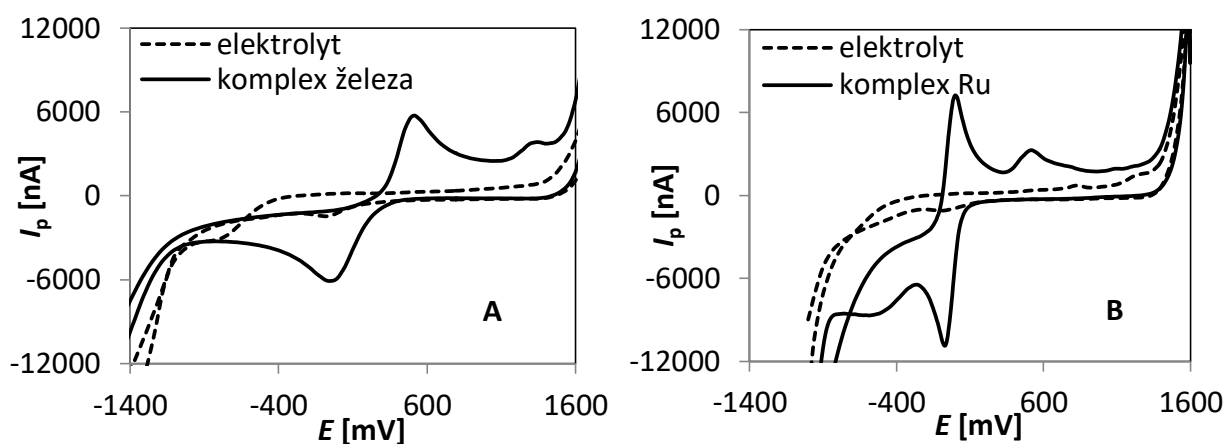
Obrázek 32 Graf závislosti  $(\Delta E_p \times n)$  na  $\psi$  (A) a příslušné hodnoty  $(\Delta E_p \times n)$  a  $\psi$  (B) [107]



Obrázek 33 Sestrojený graf závislosti  $(\Delta E_p \times n)$  na  $\psi$  včetně extrapolace pro nízké hodnoty  $\psi$

#### 4.2.1 Elektrochemická charakterizace komerčně dostupné BDDE

V této části diplomové práce byly změřeny cyklické voltamogramy základního elektrolytu KCl o koncentraci 0,1 mol/l a následně CV reverzibilních redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l, jejichž záznam je uveden na obrázku 34. Pro oba systémy byly nastaveny následující parametry měření:  $E_{\text{poč}} -1600$  mV,  $E_{\text{obratu}} +1800$  mV a  $v$  100 mV/s. Ze získaných CV byly vyhodnoceny výšky  $I_{\text{pa}}$  a  $I_{\text{pc}}$  s příslušnými potenciály  $E_{\text{pa,c}}$  jejichž přehled je uveden v tabulce 5. Z té vyplývá, že pro oba redoxní systémy se hodnota poměru  $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$  blíží jedné, což odpovídá reverzibilnímu průběhu elektrodové reakce. Z hodnot  $E_{\text{pa}}$  a  $E_{\text{pc}}$  byly vypočítány rozdíly potenciálů  $\Delta E_p$ . Pro systém  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  byla získána hodnota  $\Delta E_p$  552 mV, která se od teoretické hodnoty 59 mV pro jednoelektronovou reversibilní reakci velmi výrazně liší. Naopak  $\Delta E_p$  pro systém  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  byla 67 mV, a tedy velmi blízká teoretické hodnotě pro reverzibilní systém. Tento rozdíl mezi oběma systémy pravděpodobně souvisí s tím, že zatímco  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  patří mezi inner-sphere redoxní systémy a průběh reakce je tedy významně ovlivněn kvalitou elektrodového povrchu,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  náleží do skupiny outer-sphere redoxních markerů a přenos elektronu není ovlivněn strukturou ani kvalitou povrchu elektrody. Také byla vyhodnocena šířka potenciálového okna použité BDDE v prostředí 0,1 mol/l KCl. Jako mezní byl odečten na anodické i katodické straně vždy potenciál, při němž proud dosáhl hodnoty  $\pm 6000$  nA. Šířka potenciálového okna byla za uvedených podmínek 2817 mV. V neposlední řadě byl vypočítán elektroaktivní povrch komerčně dostupné BDDE podle výše uvedené Randles-Ševčíkovy rovnice (9), a to  $2,3 \text{ mm}^2$  ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ), resp.  $3,9 \text{ mm}^2$  ( $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ ).



**Obrázek 34** Cyklické voltamogramy  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (A) a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  (B) zaznamenané na komerční BDDE

Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{\text{poč}} = -1600$  mV,  $E_{\text{obratu}} = +1800$  mV,  $v = 100$  mV/s

**Tabulka 5** Vyhodnocení CV voltamogramů redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

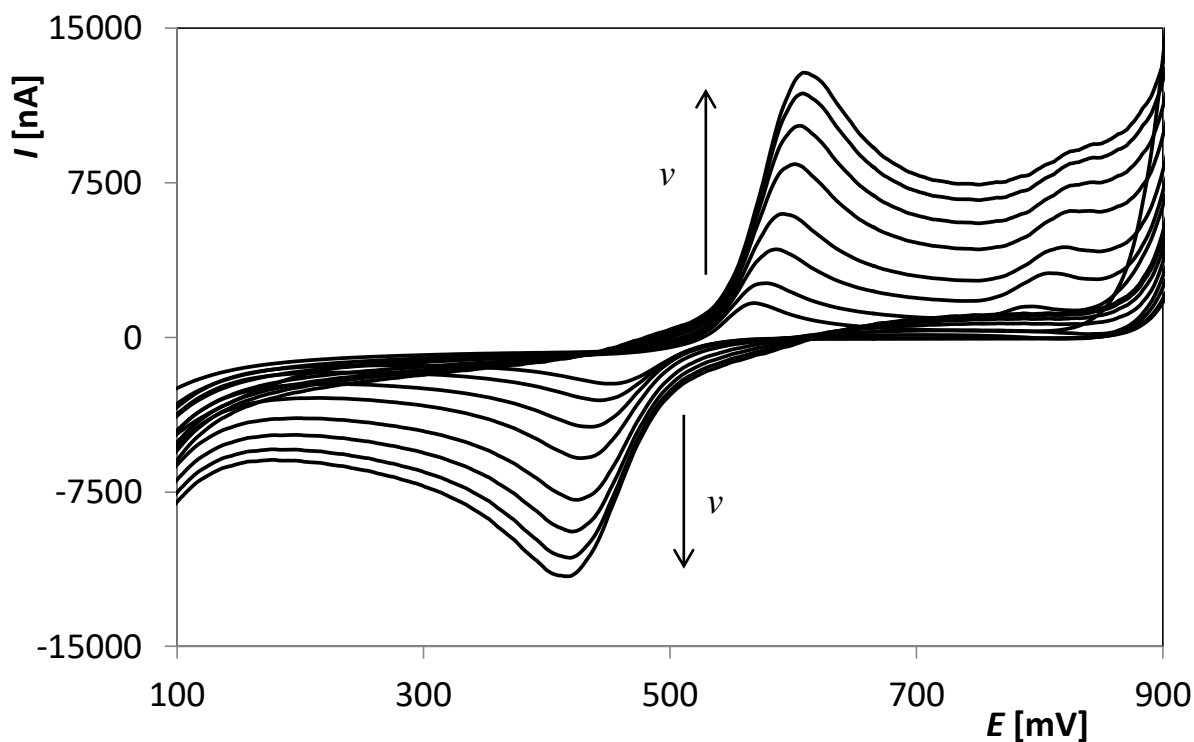
	$I_{pa}$ [nA]	$I_{pc}$ [nA]	$I_{pa}/I_{pc}$	$E_{pa}$ [mV]	$E_{pc}$ [mV]	$\Delta E_p$ [mV]
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	5174	-4749	1,09	514	-38	552
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$	8304	-7727	1,07	-1	-68	67

Dále byl studován vliv rychlosti polarizace na voltametrické chování  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $-1600$  až  $+1800$  mV při  $v$  10-500 mV/s. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 35. Je zřejmé, že s rostoucí rychlostí polarizace se zvyšovaly výšky anodických i katodických píků, ale tento nárůst nebyl lineární. Následně byly vyneseny závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 36A), které lze považovat za lineární a mohou být popsány následujícími rovnicemi 12 a 13 pro anodický a katodický pík s příslušnými korelačními koeficienty:

$$I_{pa}[\text{nA}] = (400,8 \pm 8,1)v^{1/2}[(\text{mV/s})^{1/2}] + (971 \pm 114), R = 0,9990, \quad (12)$$

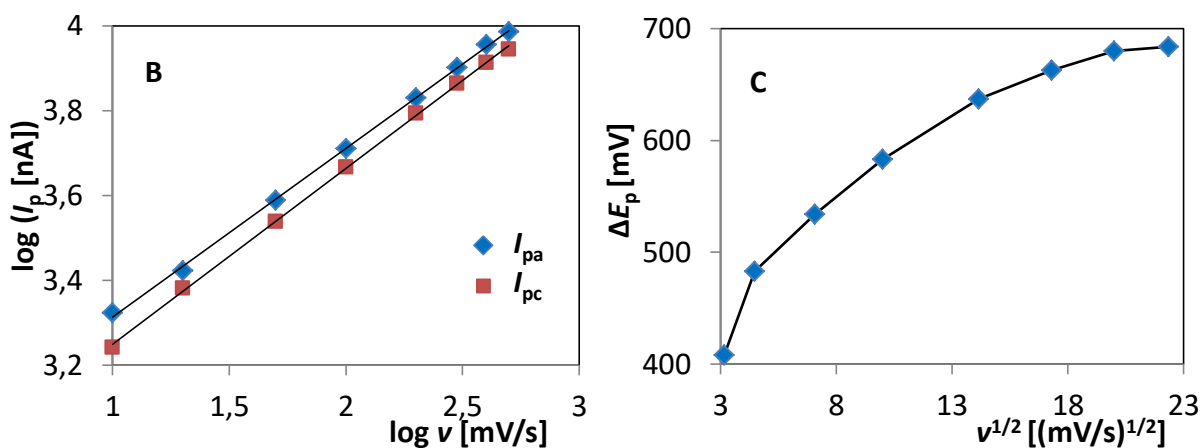
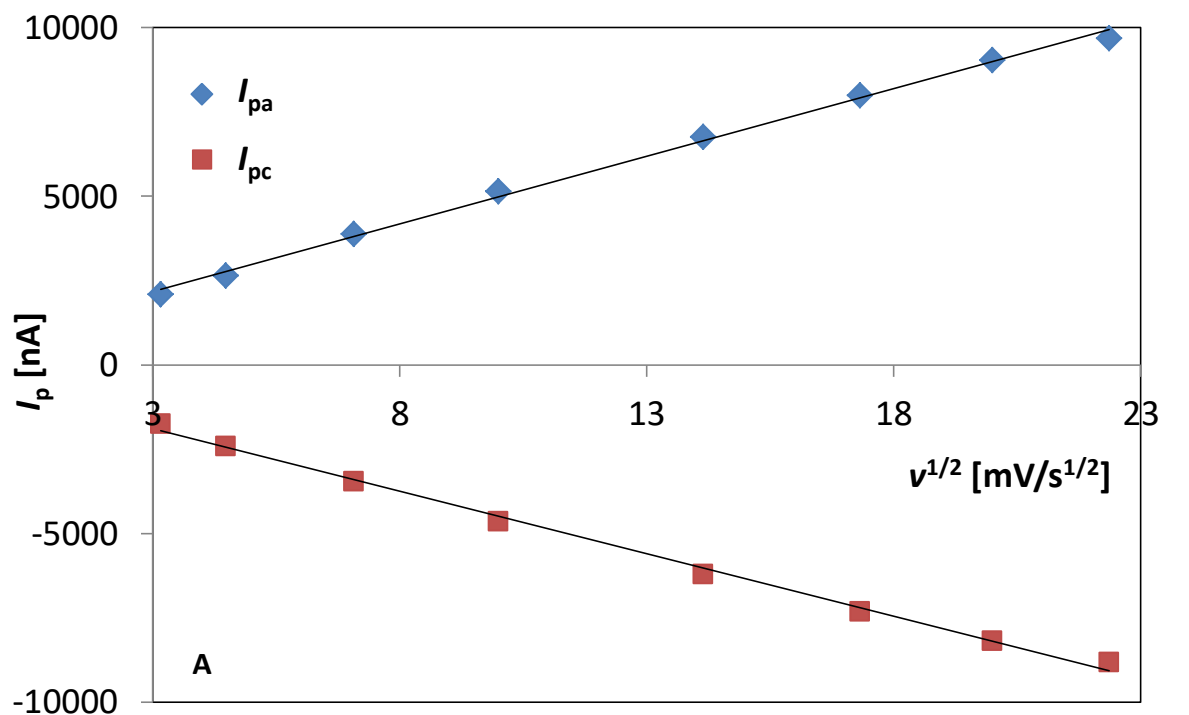
$$I_{pc}[\text{nA}] = -(370,2 \pm 9,2)v^{1/2}[(\text{mV/s})^{1/2}] - (788 \pm 129), R = 0,9981. \quad (13)$$

Podle předpokladu se tedy v případě  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  jedná o difuzně řízené elektrodové reakce.



**Obrázek 35** Cyklické voltamogramy  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v závislosti na rychlosti polarizace zaznamenané na komerční BDDE

Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poc} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 10-500$  mV/s



**Obrázek 36** Závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v^{1/2}$  (A), logaritmické závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v$  (B) a závislost  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  (C) pro  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na komerční BDDE  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 10-500$  mV/s

Pro upřesnění byly vyneseny také logaritmické závislosti ( $\log(I_p)$ \_ $\log(v)$ ), obrázek 36B), které mohou být popsány rovnicí (14) pro anodickou proudovou odezvu a rovnicí (15) pro odpovídající katodický signál, opět s příslušnými korelačními koeficienty:

$$\log(I_{pa}[\text{nA}]) = (0,3980 \pm 0,0039) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,9152 \pm 0,0081),$$

$$R = 0,9997, \quad (14)$$

$$\log(I_{pc}[\text{nA}]) = (0,4144 \pm 0,0037) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,8353 \pm 0,0078),$$

$$R = 0,9997 . \quad (15)$$

Jak již bylo řečeno, u těchto logaritmických závislostí je určující hodnota směrnice získané rovnice. Jelikož se tato hodnota v případě anodického i katodického píku pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  blíží hodnotě 0,5, jedná se skutečně o difuzně řízené elektrodové reakce. V obou případech ale platí, že hodnota 0,5 neleží v intervalu spolehlivosti vypočtených směrnic. Ty jsou nižší (+0,3980 resp. +0,4144), což by odpovídalo vlivu kinetiky nějaké předřazené resp. následné chemické reakce.

Současně se změnou výšky píků v závislosti na rychlosti polarizace dochází rovněž k posunu potenciálů anodického i katodického signálu tak, že hodnota  $\Delta E_p$  s rostoucí  $v$  narůstá. Byla proto vynesena také závislost  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 36C). Zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje byla počítána podle Nicholsona s využitím výše uvedené rovnice (10), a to pro rychlost polarizace 100 mV/s. Výsledná hodnota  $k_{app}^0$  pro komerčně dostupnou BDDE byla  $1,2 \times 10^{-5}$  cm/s. Tento výsledek je v souladu s literaturou [81], která říká, že pro redoxní systém  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  se  $k_{app}^0$  pohybuje v rozmezí  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  cm/s, protože probíhající reakce je závislá na struktuře a kvalitě povrchu s ohledem na příslušnost  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  k inner-sphere redoxním systémům.

Vliv rychlosti polarizace byl studován také pro redoxní systém  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l. Měření opět probíhalo v rozsahu potenciálů  $-1600$  až  $+1800$  mV při  $v$  10-500 mV/s. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 37. Z nich opět vyplývá, že s rostoucí rychlostí polarizace se zvyšovaly hodnoty  $I_{pa}$  i  $I_{pc}$ , ale ani v případě  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  nešlo o lineární závislost  $I_p$  na  $v$ . Naopak závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 38A) jsou lineární a mohou být popsány rovnicemi 16 a 17 s příslušnými korelačními koeficienty:

$$I_{pa}[\text{nA}] = (824 \pm 20)v^{1/2}[(\text{mV/s})^{1/2}] + (104 \pm 287), R = 0,9981 , \quad (16)$$

$$I_{pc}[\text{nA}] = -(864 \pm 953)v^{1/2}[(\text{mV/s})^{1/2}] + (1205 \pm 744), R = 0,9889 . \quad (17)$$

I v případě  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  se tedy jedná o reakce řízené difuzí. Z logaritmických závislostí ( $\log(I_p)$ - $\log(v)$ , obrázek 38B) charakterizovaných rovnicemi (18) a (19) s příslušnými korelačními koeficienty vyplývá, že hodnoty směrnic se opět blíží hodnotě 0,5, a to výrazněji než v případě  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , a byla tak potvrzena difuze, jako řídicí děj sledovaných

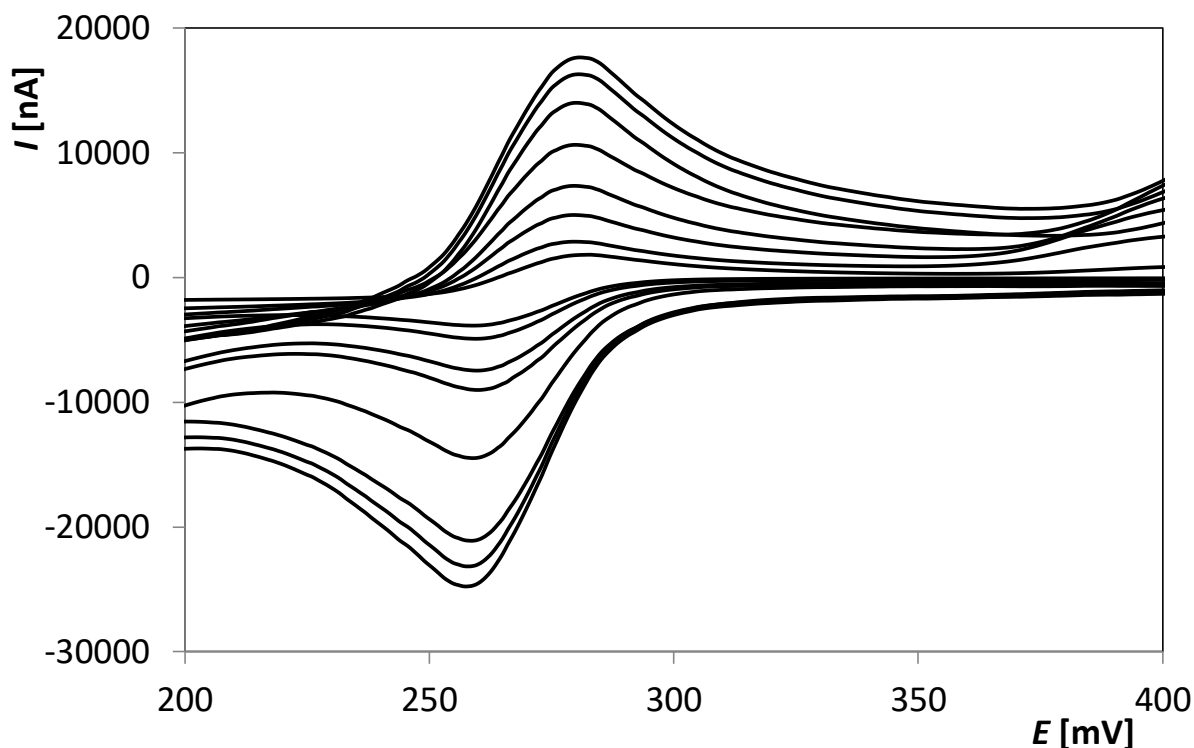
elektrodoových reakcí. Ani tentokrát však hodnota 0,5 neleží v intervalu spolehlivosti vypočtených směrnic.

$$\log(I_{pa}[\text{nA}]) = (0,4867 \pm 0,0088) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,950 \pm 0,018) ,$$

$$R = 0,9990 , \quad (18)$$

$$\log(I_{pc}[\text{nA}]) = (0,549 \pm 0,030) \log(v \text{ [(mV/s)]}) + (2,762 \pm 0,062) ,$$

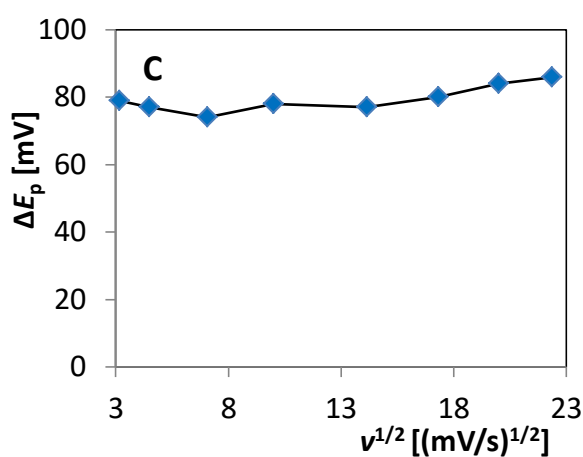
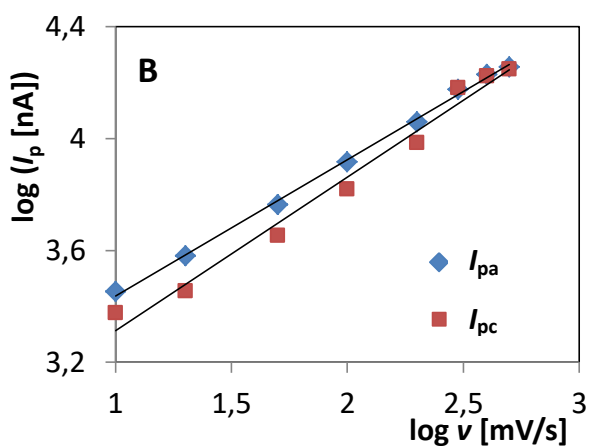
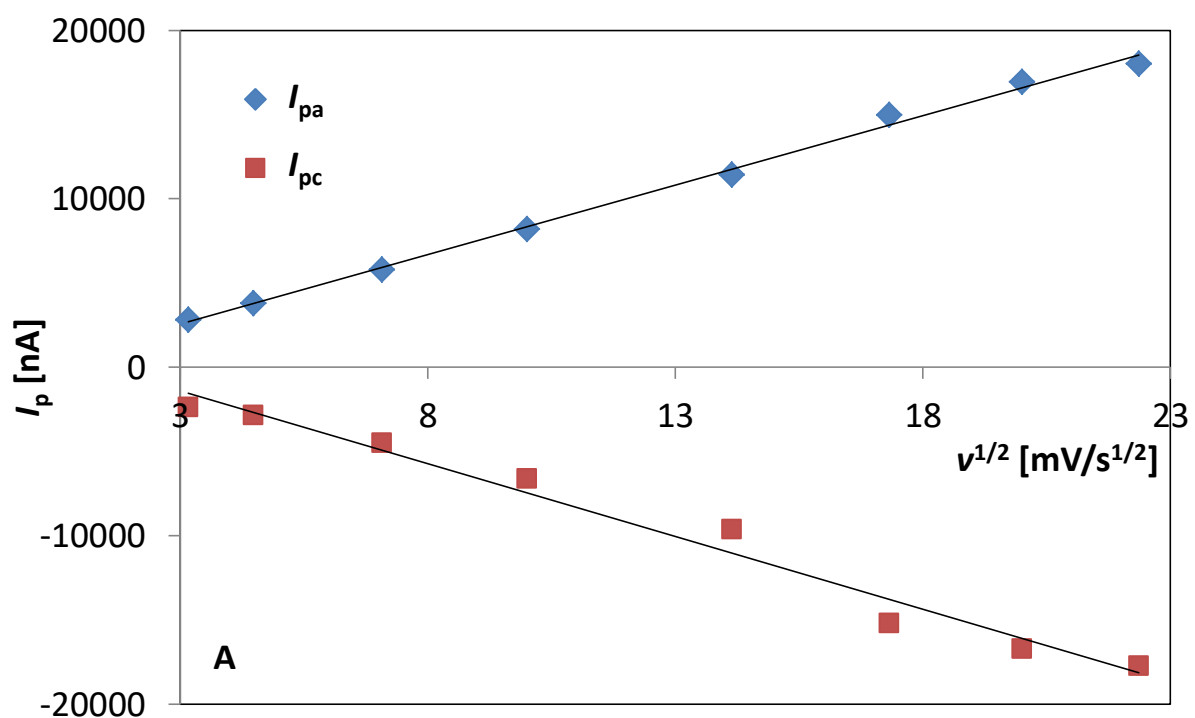
$$R = 0,9914 . \quad (19)$$



**Obrázek 37** Cyklické voltamogramy  $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol/l } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  v závislosti na rychlosti polarizace zaznamenané na komerční BDDE  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 10\text{-}500 \text{ mV/s}$

Stejně jako v předchozím případě byla sledována rovněž poloha anodického a katodického signálu  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  v závislosti na měnící se  $v$ . Na rozdíl od systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v tomto případě nedocházelo k významnému posunu píků, což dokumentuje rovněž závislost  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  prezentovaná na obrázku 38C. Zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje byla počítána také pro redoxní systém  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  na komerčně dostupné BDDE, a to opět pro rychlost polarizace 100 mV/s. Vypočtená hodnota  $k_{app}^0$  byla  $2,9 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ . Tento výsledek je opět v souladu s hodnotami dříve prezentovanými v literatuře [81]. Hodnota  $k_{app}^0$  získaná pro

$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  je o tři řády vyšší, než pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , což odpovídá tomu, že outer-sphere redoxní systémy nejsou tolik citlivé na strukturu nebo čistotu povrchu elektrody.



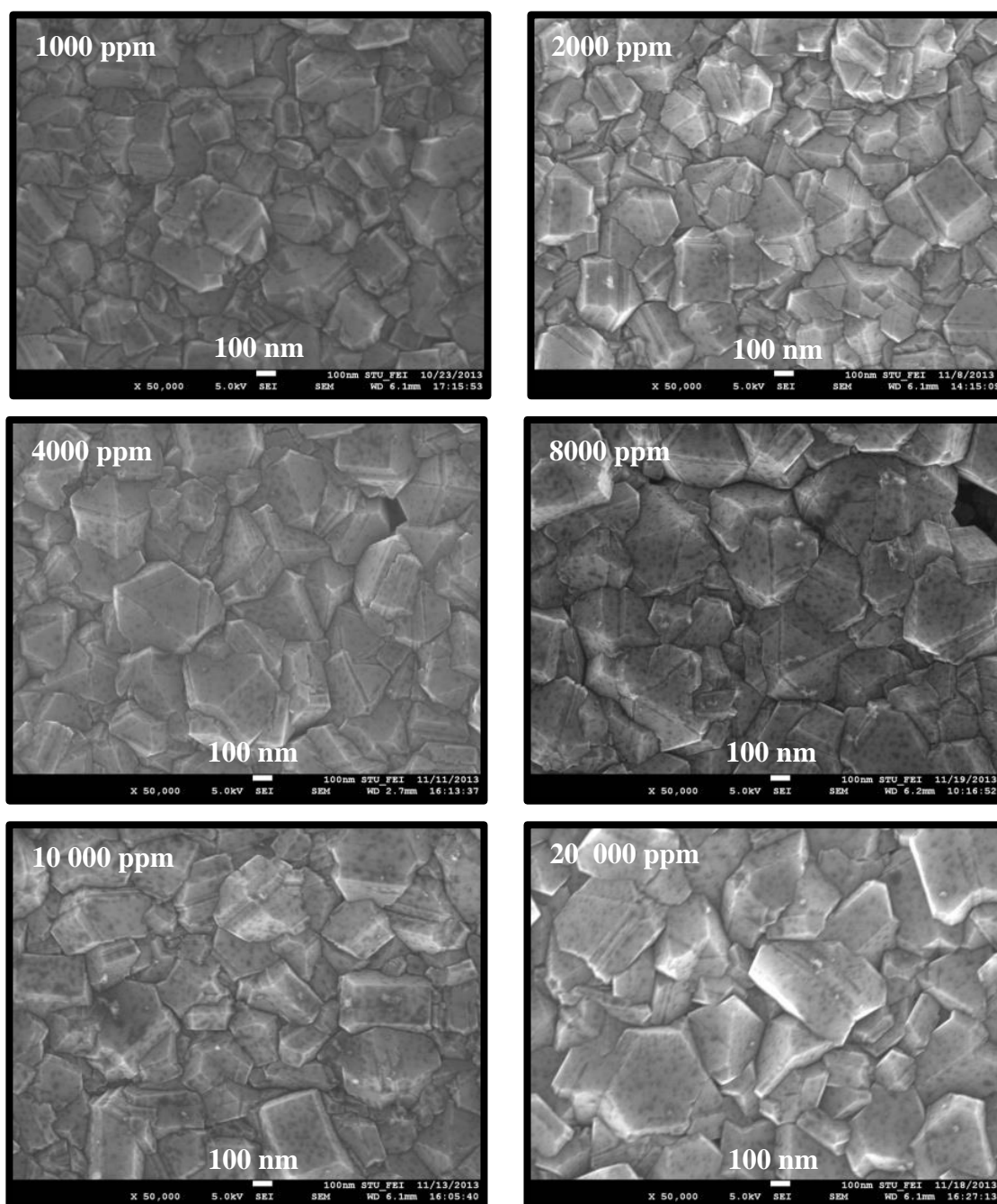
**Obrázek 38** Závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v^{1/2}$  (A), logaritmické závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v$  (B) a závislost  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  (C) pro  $6,25 \times 10^{-4}$  mol/l  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na BDDE

Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 10$ -500 mV/s

## 4.2.2 Charakterizace testovaných BDDE s různým obsahem boru

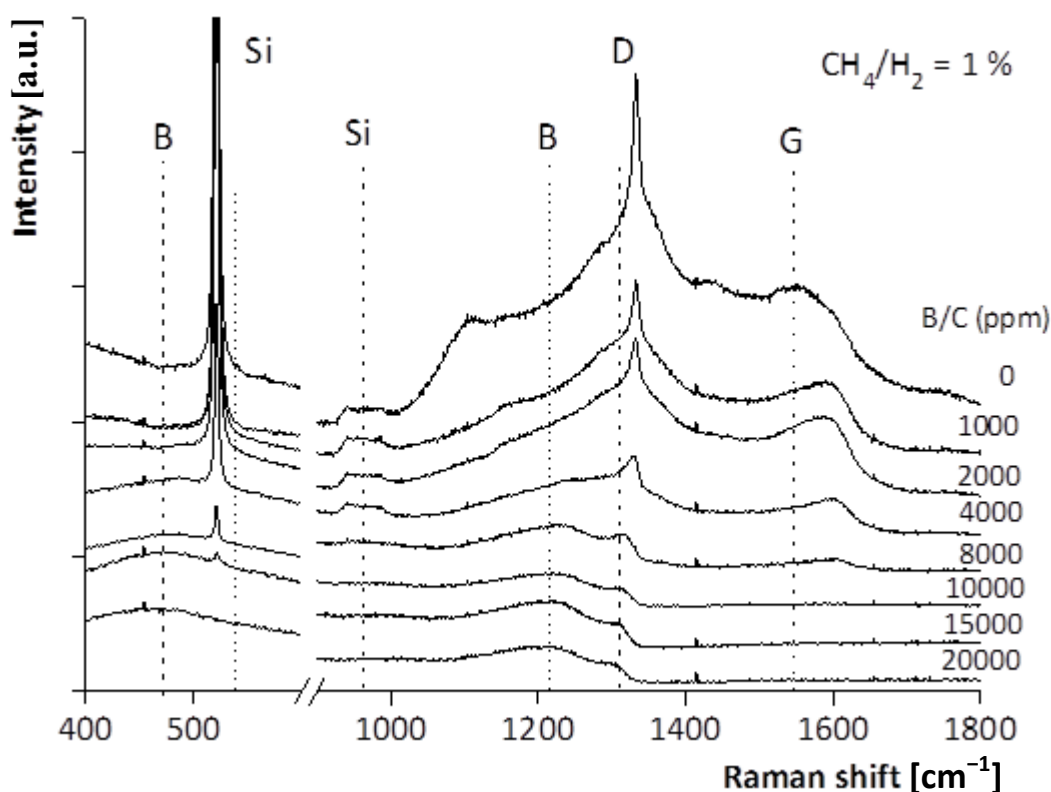
### 4.2.2.1 Povrchová charakterizace

Všechny laboratorně vyrobené BDDE s různým obsahem boru byly sledovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Na obrázku 39 jsou uvedeny získané snímky povrchu jednotlivých testovaných elektrod. Z obrázku je patrné, že se zvyšujícím se obsahem boru resp. poměrem B/C se zvětšuje velikost zrn ve struktuře deponovaného diamantového filmu.



Obrázek 39 Snímky povrchu testovaných BDDE ze skenovacího elektronového mikroskopu

Další metodou použitou pro charakterizaci materiálu jednotlivých filmů byla Ramanova spektroskopie. Získaná Ramanova spektra BDD filmů připravených v prostředí směsi 1 % CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> s obsahem B/C 0-20 000 ppm byla měřena při vlnové délce 623 nm. Na obrázku 40 je vidět, že elektrody s obsahem boru 0 ppm vykazují ostrý pík při 1335 cm<sup>-1</sup>, který odpovídá sp<sup>3</sup> uhlíkovým vazbám. To znamená, že na křemíkovém substrátu byl deponován vysoce kvalitní diamant. Dále je patrné, že tento ostrý signál se zmenšuje s rostoucím poměrem B/C. Dva široké pásy se středem 470 a 1220 cm<sup>-1</sup> spojuje to, že dochází k začlenění boru do mřížky diamantu. Oba tyto signály narůstají s rostoucím obsahem boru v deponovaném filmu. Spektrum s maximem kolem 1580 cm<sup>-1</sup> odpovídá sp<sup>2</sup> uhlíkovým vazbám, které jsou dány přítomností grafitického uhlíku jako nečistot na povrchu diamantového filmu. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou [80].



**Obrázek 40** Ramanova spektra BDD filmů připravených v 1 % CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> s obsahem B/C 0-20 000 ppm

#### 4.2.2.2 Elektrochemická charakterizace pomocí [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>

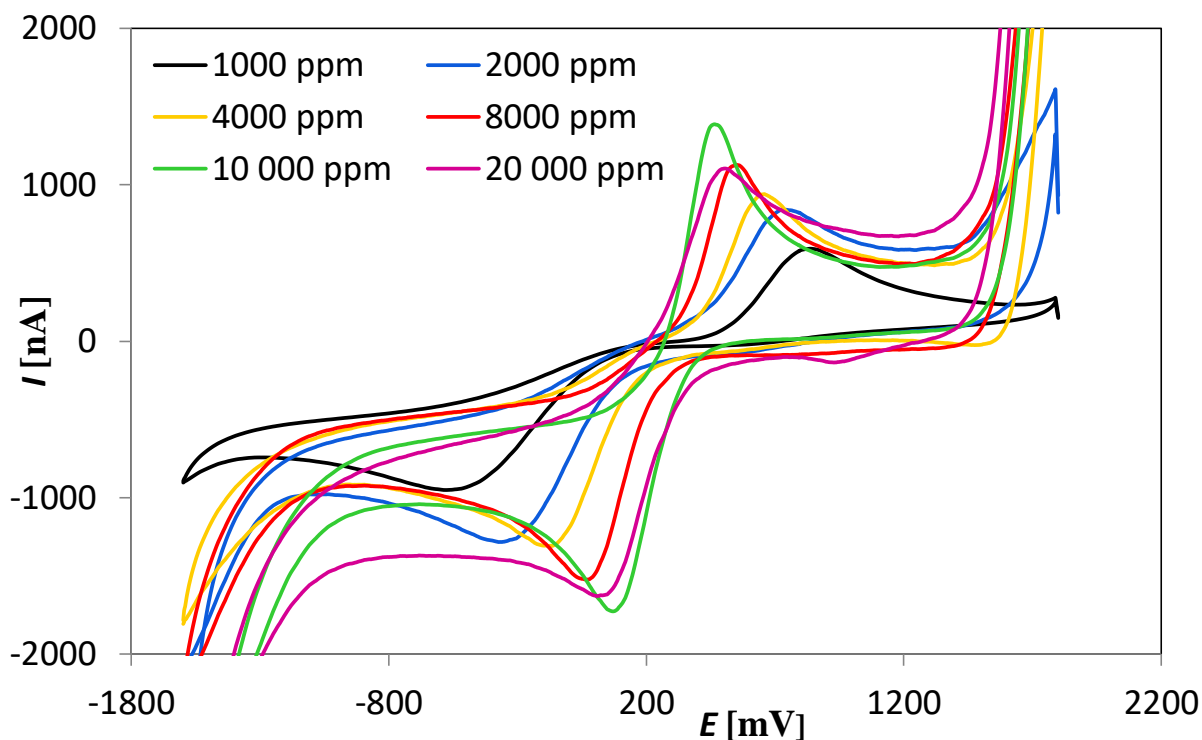
Stěžejní částí této kapitoly byla elektrochemická charakterizace laboratorně vyrobených BDDE. Na úvod práce byly na všech testovaných elektrodách změřeny cyklické voltamogramy v neutrálním prostředí, kdy byl jako základní elektrolyt použit roztok KCl

o koncentraci 0,1 mol/l, a byly vyhodnoceny šířky potenciálového okna. Jako mezní byl odečten na anodické i katodické straně vždy potenciál, při němž proud dosáhl hodnoty  $\pm 500$  nA. Z odečtených hodnot potenciálů bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací boru docházelo k zúžení potenciálového okna elektrody. Na katodické straně bylo zúžení mnohem výraznější než na anodické straně. Potenciálové okno se celkově zmenšilo o 500-600 mV mezi BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm. BDDE s poměrem B/C 1000 ppm vykazovala nejširší potenciálové okno 3300 mV. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou [85].

Další elektrochemické vlastnosti BDDE s různým obsahem boru byly studovány opět s využitím reverzibilních redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  stejně jako v případě komerčně dostupné BDDE. Nejprve byly ve stejném prostředí (0,1 mol/l KCl) změřeny cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Měření probíhalo od  $E_{\text{poč}} -1600$  mV do  $E_{\text{obratu}} +1800$  mV při  $v$  100 mV/s. Získané záznamy pro všechny testované BDDE jsou uvedeny na obrázku 41. Z něho je na první pohled patrné, že s rostoucím poměrem B/C docházelo ke zvýšení reverzibility sledované elektrodové reakce, tzn., že docházelo ke zvyšování proudových signálů a zmenšoval se rozdíl potenciálů anodického a katodického píku. Tyto trendy potvrzují rovněž závislosti vynesené v obrázku 42. Konkrétní hodnoty proudů a potenciálů odečtené z prezentovaných CV voltamogramů jsou shrnuty v tabulce 6. Z tabulky vyplývá, že poměr  $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$  se u všech elektrod pohyboval v rozsahu 0,88-0,98. Nejlepší hodnoty (0,98) byly vypočteny pro elektrody s nejvyšším obsahem boru (10 000 a 20 000 ppm) a rovněž elektroda s obsahem 1000 ppm vykazovala překvapivě poměr  $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$  velmi blízký 1 (0,95), což by odpovídalo reverzibilnímu průběhu elektrodové reakce. Co se týče potenciálového rozdílu mezi anodickým a katodickým píkem, docházelo k jeho zmenšování s rostoucím obsahem boru v diamantovém filmu od 1406 mV pro elektrodu s obsahem boru 1000 ppm do 473 mV pro elektrodu s obsahem 10 000 ppm. Tento trend svědčí o zvyšování reverzibility elektrodové reakce a tedy o zlepšování elektrochemických vlastností elektrod. U elektrody s obsahem boru 20 000 ppm se potenciálový rozdíl opět zvýšil, což může být způsobeno horší kvalitou BDD filmu, např. zvýšeným obsahem  $\text{sp}^2$  neboli grafitického uhlíku. Ani nejnižší hodnota potenciálového rozdílu se ale neblíží teoretické hodnotě 59 mV pro reverzibilní reakci. Naopak přibližně odpovídá výsledku prezentovanému výše pro komerční BDDE.

Dále byl vypočítán elektroaktivní povrch pro testované BDDE dle výše uvedené Randles-Ševčíkovy rovnice (9) pro rychlost polarizace 100 mV/s. Hodnoty elektroaktivních ploch jsou

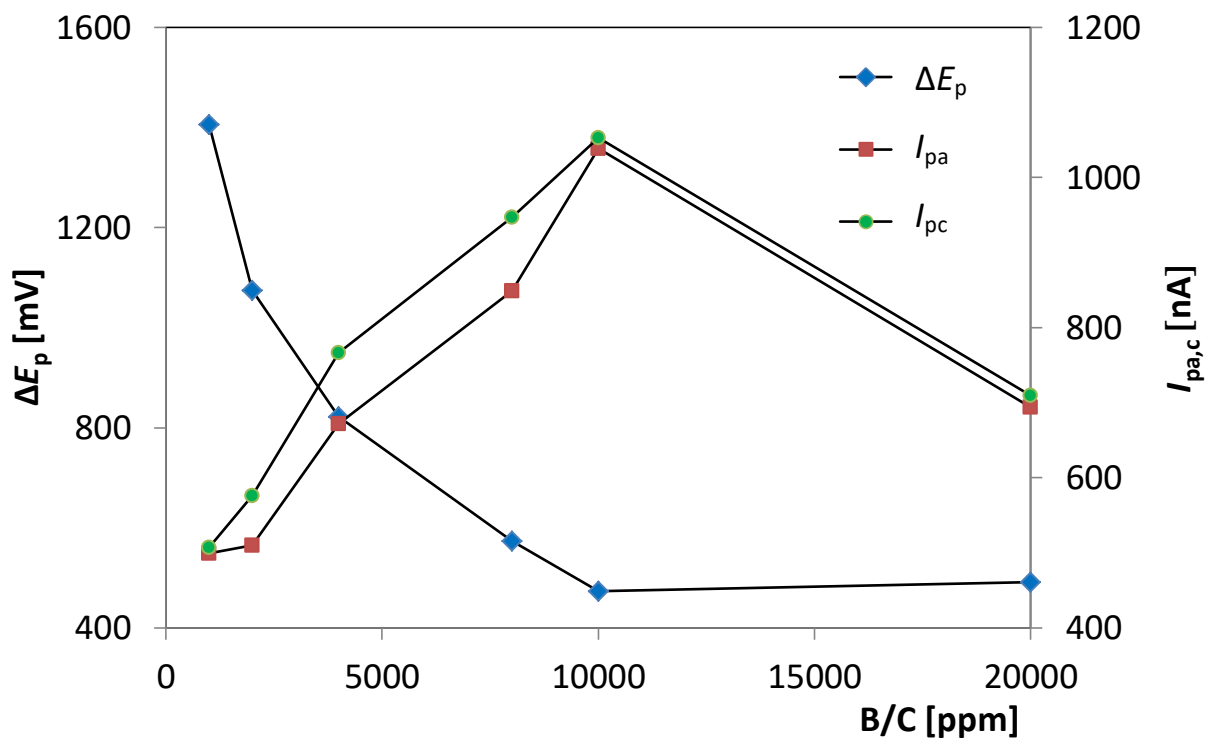
rovněž uvedeny v tabulce 6. Největší plocha elektrody ( $0,6 \text{ mm}^2$ ) byla vypočítána pro BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm, nejmenší pak pro 1000 ppm ( $0,25 \text{ mm}^2$ ). Získané velikosti ploch korespondují s ostatními výsledky.



**Obrázek 41** Cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na testovaných BDDE  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 100 \text{ mV/s}$

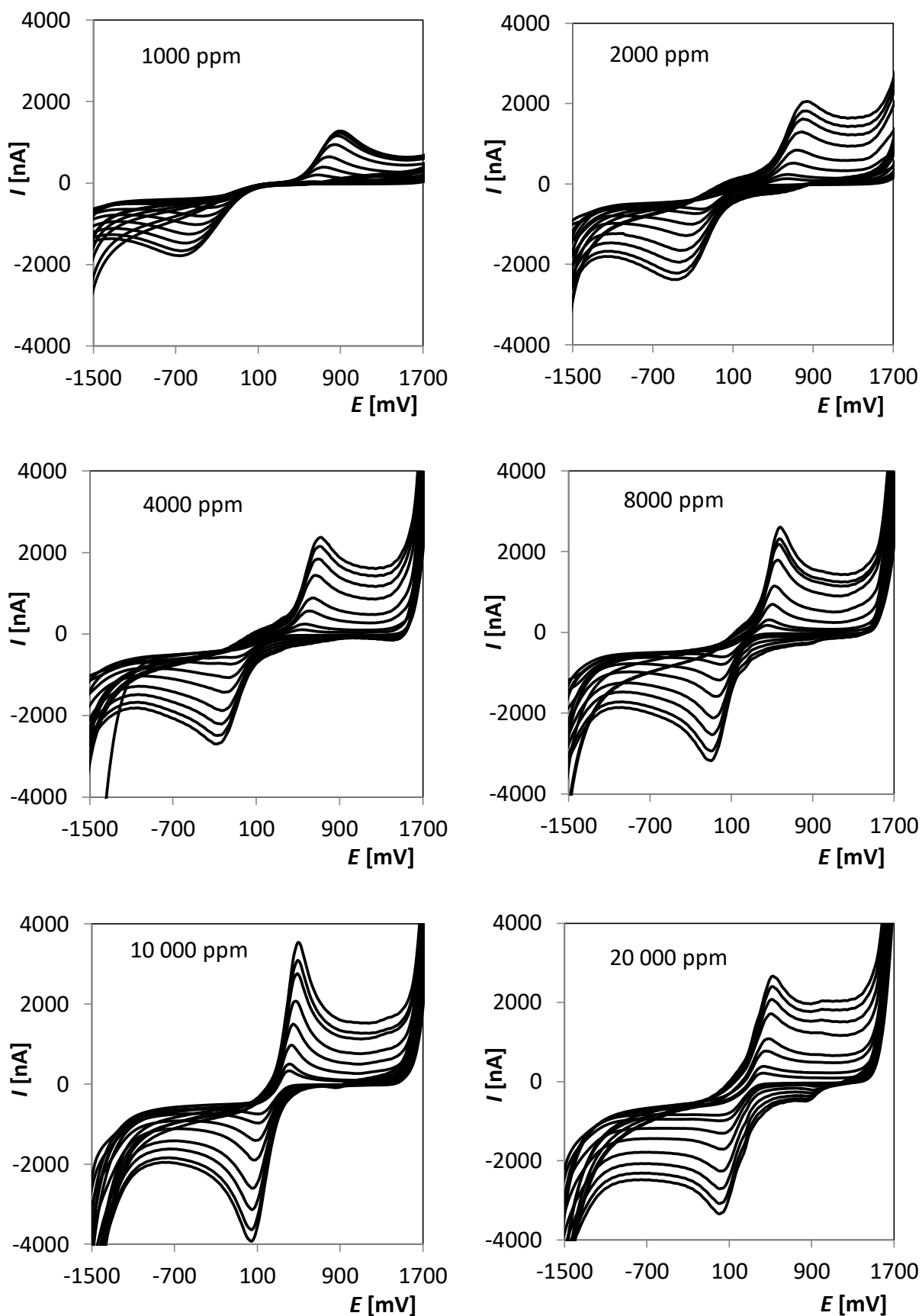
**Tabulka 6** Vyhodnocení výšky a polohy píků  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v závislosti na poměru B/C

B/C [ppm]	$I_{\text{pa}}$ [nA]	$I_{\text{pc}}$ [nA]	$I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$	$E_{\text{pa}}$ [mV]	$E_{\text{pc}}$ [mV]	$\Delta E_{\text{p}}$ [mV]	A [mm <sup>2</sup> ]
1000	500	-507	0,98	829	-577	1406	0,25
2000	510	-576	0,88	720	-355	1075	0,26
4000	672	-767	0,88	659	-163	822	0,30
8000	849	-947	0,89	550	-24	574	0,36
10 000	1039	-1053	0,98	545	72	473	0,60
20 000	694	-710	0,98	503	12	491	0,30

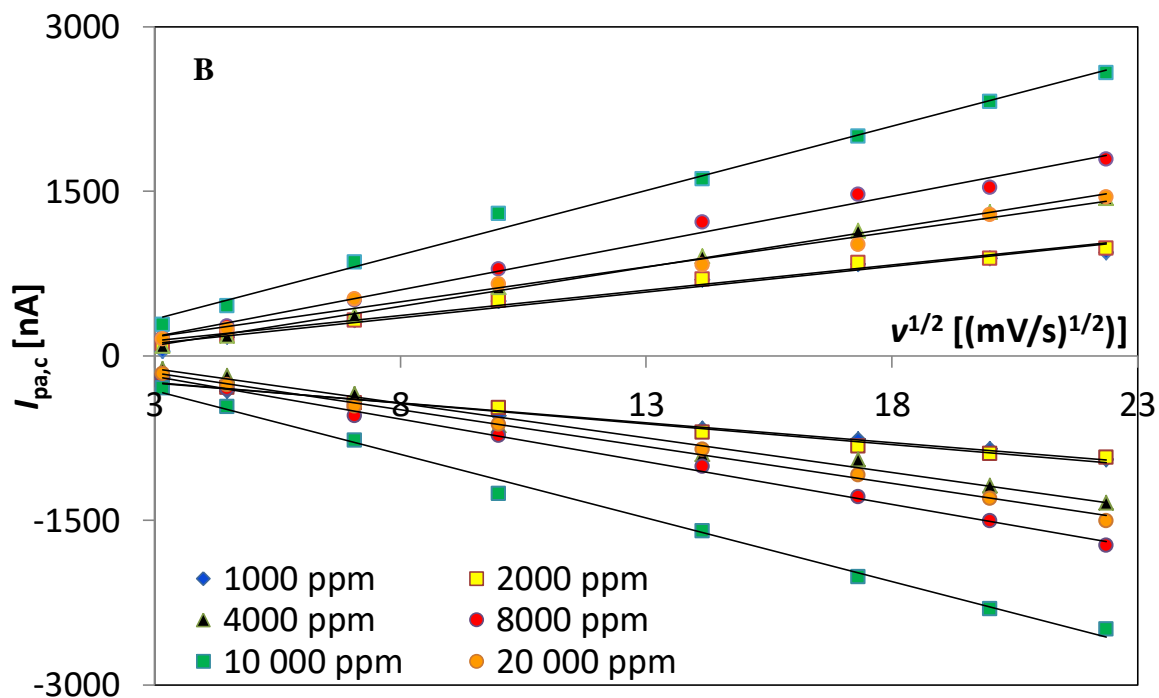
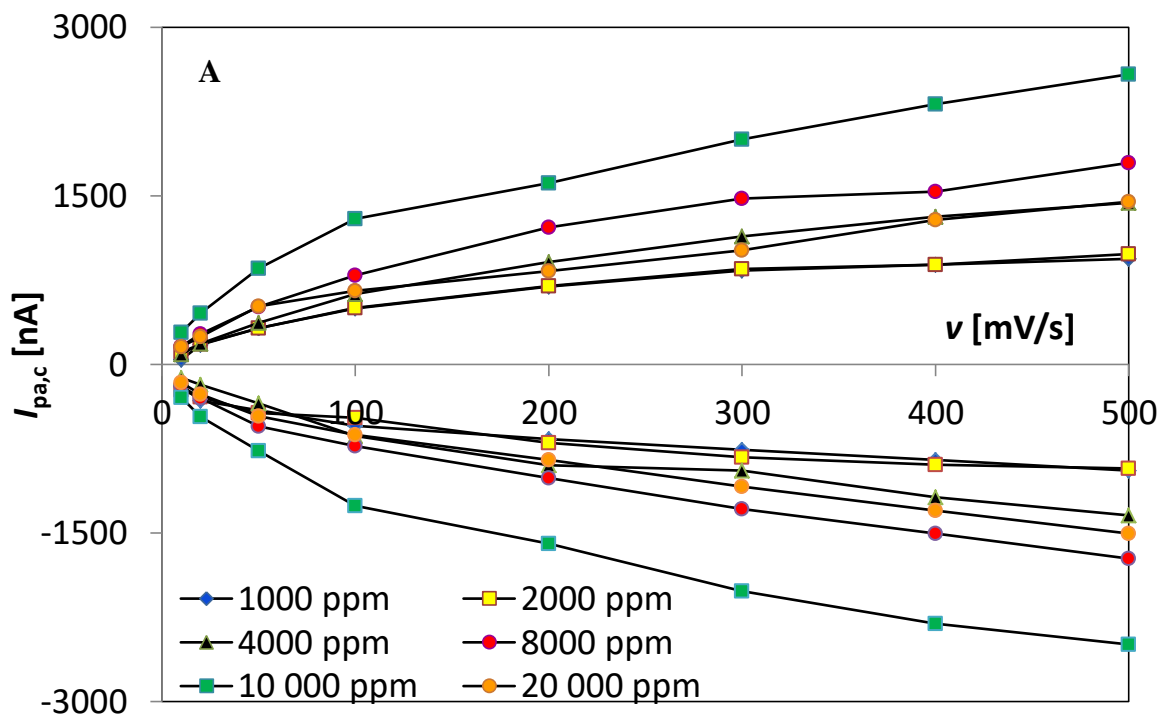


**Obrázek 42** Závislosti  $\Delta E_p$  a  $I_{pac}$  na B/C pro  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na testovaných BDDE Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$ ,  $\nu = 100 \text{ mV/s}$

Na obrázku 43 jsou prezentovány cyklické voltamogramy  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na jednotlivých testovaných elektrodách v závislosti na rychlosti polarizace. Koncentrace  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v polarografické nádobce byla  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  a měření probíhalo v prostředí 0,1 mol/l KCl v rozsahu potenciálů od  $-1600$  do  $+1800 \text{ mV}$ . Rychlost polarizace byla měněna od 10 do 500 mV/s. Z obrázku je patrné, že se zvyšujícím se poměrem B/C docházelo k přibližování potenciálu píků a také k nárůstu výšky redoxních signálů. Nejlepší elektrochemické vlastnosti vykazovala elektroda s poměrem B/C 10 000 ppm a při vyšším poměru se tvar voltamogramů opět zhoršil. Z uvedených měření byly vyhodnoceny výšky anodických a katodických signálů a vyneseny závislosti  $I_p$  na  $\nu$  (obrázek 44A) resp.  $I_p$  na  $\nu^{1/2}$  (obrázek 44B). Zatímco závislosti  $I_p$  na  $\nu$  nevykazovaly lineární průběh, závislosti na  $\nu^{1/2}$  jsou lineární a mohou být popsány rovnicemi, jejichž základní parametry (směrnice, úseky a korelační koeficienty) jsou uvedeny v tabulce 7. Z té je zřejmé, že hodnota směrnice se zvyšuje s rostoucím poměrem B/C a maxima dosáhla opět pro elektrodu s B/C 10 000 ppm. Lineární průběh všech těchto závislostí svědčí o difuzně řízené elektrodové reakci. Následně byly vyneseny logaritmické závislosti ( $\log(I_p)$ \_log( $\nu$ )) a hodnoty směrnic a úseků pro anodické a katodické proudové odezvy jsou uvedeny v tabulce 8, a to s příslušnými korelačními koeficienty. Hodnoty směrnic potvrzují difuzně řízenou elektrodovou reakci.



**Obrázek 43** Cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$   $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$ ,  $\nu = 10\text{-}500 \text{ mV/s}$



**Obrázek 44** Závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v$  (A) a  $I_{pa,c}$  na  $v^{1/2}$  (B) pro  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 10-500 \text{ mV/s}$

**Tabulka 7** Statistické parametry závislosti  $I_{pa,c}([Fe(CN)_6]^{3-/4-})$  na  $v^{1/2}$  získaných pro jednotlivé testované BDDE

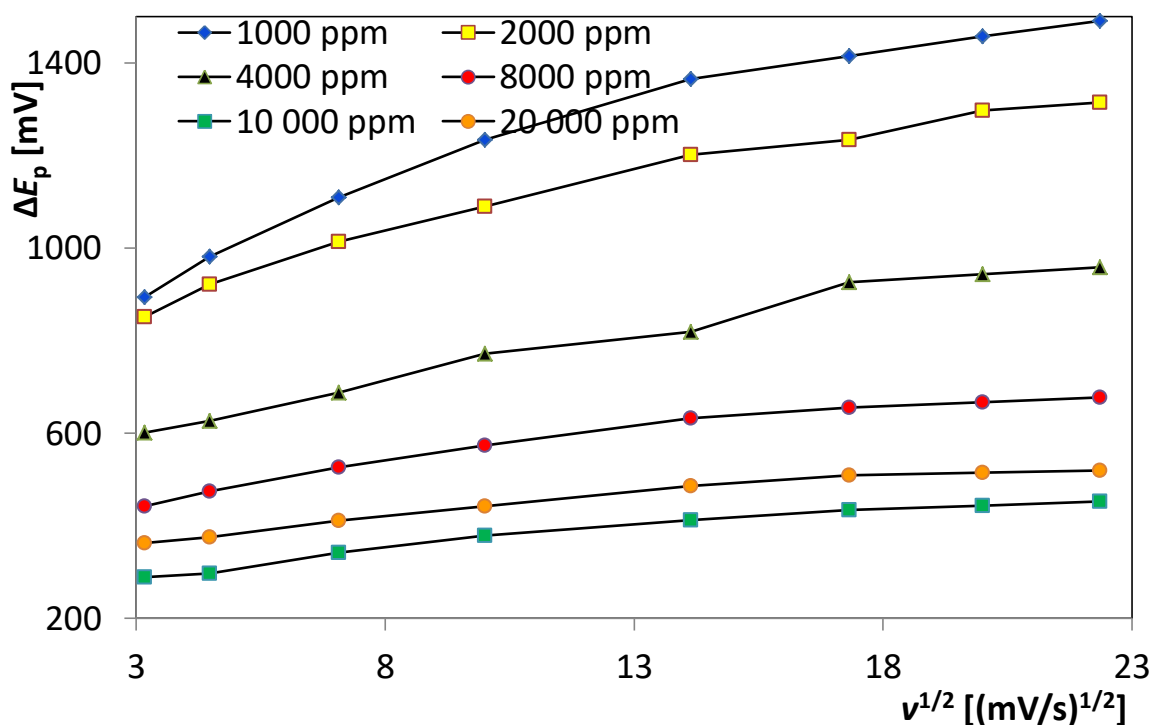
$I_p$	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	R
anodický	1000	(45,5±2,8)	-(4,9±38)	0,9892
	2000	(45,9±2,4)	(0,75±34)	0,9918
	4000	(71,6±1,4)	-(122±19)	0,9988
	8000	(88,3±3,4)	-(82±48)	0,9952
	10 000	(117,3±3,8)	-(19±53)	0,9969
	20 000	(63,9±3,0)	-(17±42)	0,9935
katodický	1000	-(43,2±1,7)	-(65±23)	0,9918
	2000	-(41,9±2,5)	-(74±35)	0,9900
	4000	-(63,1±2,9)	(71±41)	0,9936
	8000	-(77,7±1,6)	(46±22)	0,9987
	10 000	-(116,0±3,5)	(28±48)	0,9973
	20 000	-(67,2±1,8)	(46±25)	0,9978

**Tabulka 8** Statistické parametry závislosti  $\log(I_{pa,c}([Fe(CN)_6]^{3-/4-}))$  na  $\log(v)$  získaných pro jednotlivé BDDE

$I_p$	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	R
anodický	1000	(0,589±0,038)	(1,450±0,079)	0,9878
	2000	(0,558±0,026)	(1,531±0,054)	0,9938
	4000	(0,696±0,034)	(1,335±0,072)	0,9928
	8000	(0,611±0,023)	(1,639±0,048)	0,9957
	10 000	(0,551±0,024)	(1,950±0,049)	0,9945
	20 000	(0,543±0,029)	(1,697±0,062)	0,9911
katodický	1000	(0,447±0,001)	(1,809±0,021)	0,9986
	2000	(0,461±0,021)	(1,774±0,045)	0,9936
	4000	(0,622±0,028)	(1,476±0,059)	0,9940
	8000	(0,544±0,014)	(1,767±0,029)	0,9980
	10 000	(0,545±0,017)	(1,953±0,036)	0,9970
	20 000	(0,544±0,014)	(1,701±0,030)	0,9979

Nakonec byly vyneseny závislosti  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 45), které potvrzují, že největší potenciálový rozdíl mezi anodickým a katodickým píkem byl pozorován pro BDDE s poměrem B/C 1000 ppm. S rostoucím poměrem B/C se potenciálový rozdíl zmenšoval a nejmenší byl pro elektrody s poměrem B/C 10 000 a 20 000 ppm. S rostoucím obsahem boru byl také pozorován menší posun potenciálu píků v závislosti na rychlosti polarizace. Pro všechny testované elektrody byla vypočítána zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje podle Nicholsona (rovnice 10). K výpočtu byla ve všech případech použita data z měření při  $v$  100 mV/s. Jelikož pro redoxní systém  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  byly hodnoty  $\Delta E_p$  pro jednotlivé

elektrody velké (379-1234 mV), bylo nutné pro odečtení nízkých hodnot  $\psi$  (pro velké hodnoty ( $\Delta E_p \times n$ )) použít rovnici odpovídající lineární části závislosti uvedené na obrázku 33. Odečtené hodnoty  $\psi$  jsou uvedeny v tabulce 9. Z těchto hodnot byly následně vypočítány zdánlivé konstanty přenosu náboje pro všechny BDDE a výsledky jsou opět shrnuty v tabulce 9. Hodnoty  $k_{app}^0$  se pohybovaly v rozmezí  $1,1 \times 10^{-4}$  do  $1,8 \times 10^{-9}$  cm/s a s vyšší koncentrací boru v BDD filmu docházelo ke zvyšování hodnoty  $k_{app}^0$ . Jak již bylo uvedeno výše, rozsah hodnot  $k_{app}^0$  pro tento redoxní systém se pohybuje obvykle od  $10^{-4}$  do  $10^{-6}$  cm/s [81]. V tomto rozmezí leží rychlostní konstanty BDDE s poměrem B/C 8000 až 20 000 ppm. Naopak nižší hodnoty  $k_{app}^0$  pro elektrody s poměrem B/C 1000, 2000 a 4000 ppm jsou dány velmi pomalým přenosem nábojem a svědčí o horších elektrochemických vlastnostech těchto BDDE.



**Obrázek 45** Závislosti  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  pro  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm

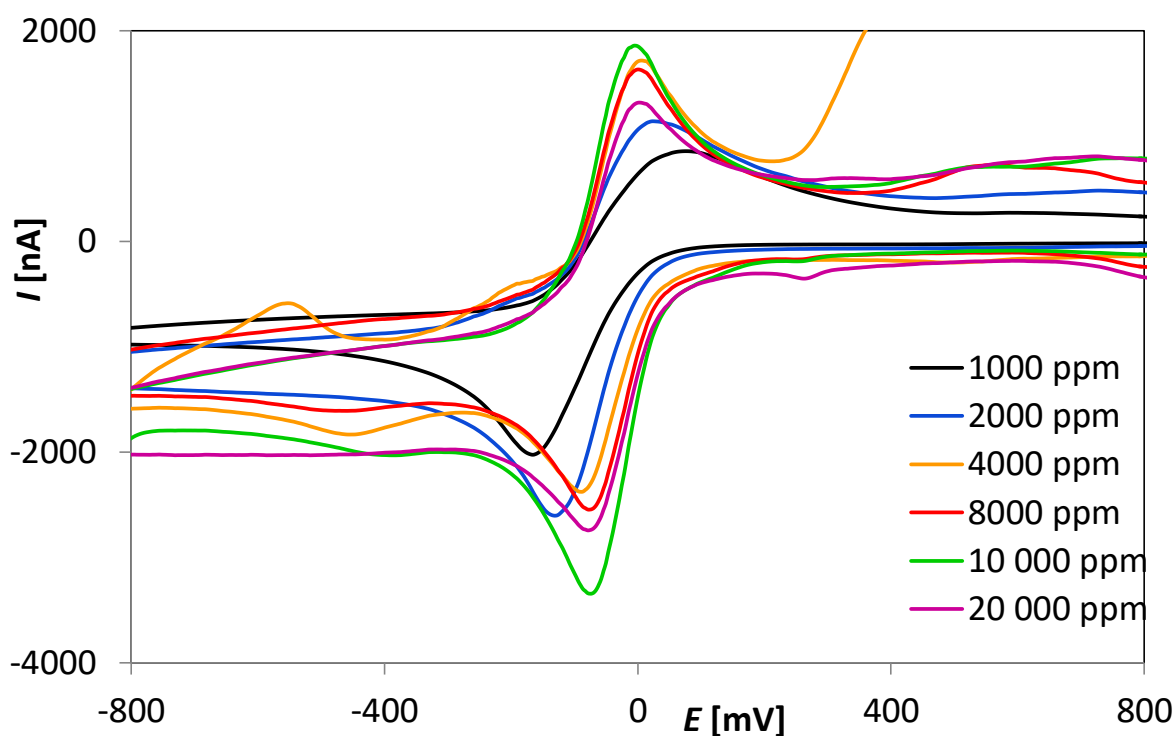
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 10-500$  mV/s

**Tabulka 9** Vypočtené hodnoty zdánlivé rychlostní konstanty přenosu náboje pro testované BDDE

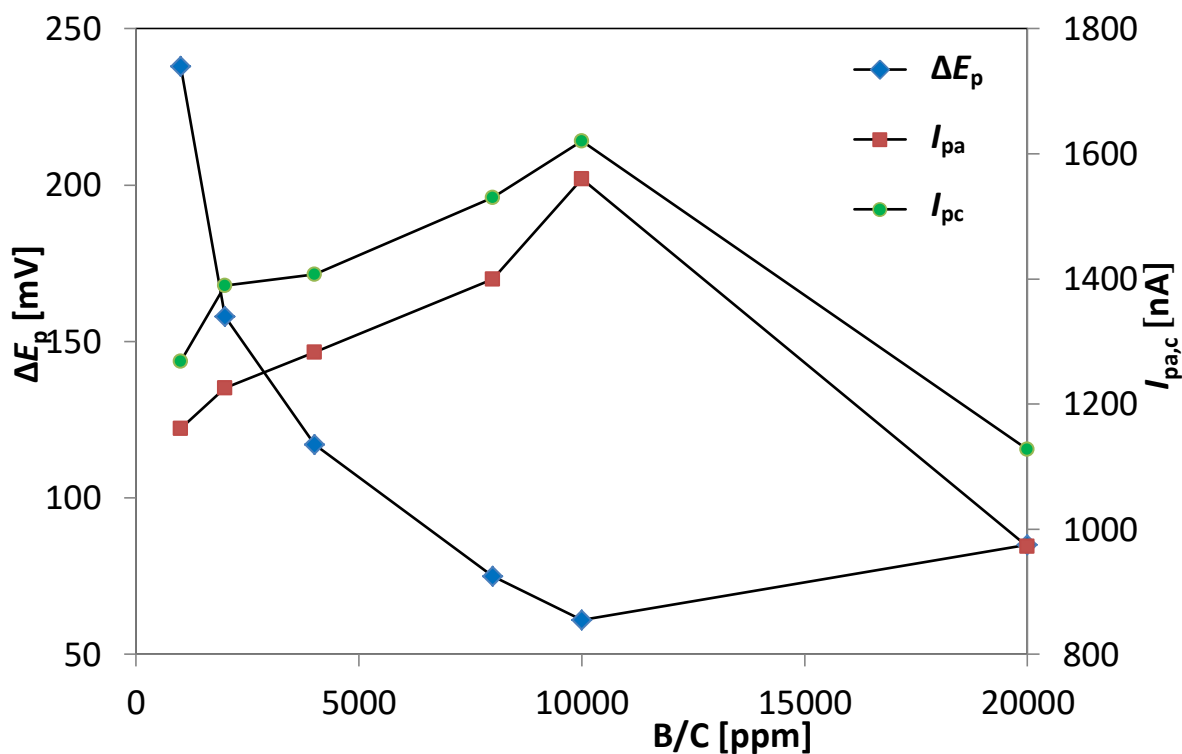
B/C [ppm]	$\Delta E_p$ [mV]	$\psi$	$k_{app}^0$ [cm/s]
1000	1234	$1,9 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-9}$
2000	1090	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-8}$
4000	772	$7,3 \times 10^{-5}$	$7,0 \times 10^{-7}$
8000	574	$9,4 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-6}$
10000	379	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$
20000	442	$5,1 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$

#### 4.2.2.3 Elektrochemická charakterizace pomocí $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$

Stejně jako v případě komerčně dostupné BDDE byl i u laboratorně vyrobených elektrod vedle systému  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  použit pro studium jejich elektrodových vlastností také outer-sphere redoxní systém  $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ . Opět byly změřeny cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$   $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$  v prostředí  $0,1 \text{ mol/l}$  KCl. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $E_{poč} -1600 \text{ mV}$  až  $E_{obratu} +1800 \text{ mV}$  při  $v = 100 \text{ mV/s}$ . Získané voltamogramy pro testované BDDE jsou uvedeny na obrázku 46. Z obrázku je opět zřejmé, že s rostoucím poměrem B/C docházelo ke zvýšení reverzibility elektrodové reakce. Z toho vyplývá, že docházelo ke zvětšování proudových signálů a také ke zmenšování rozdílu potenciálu anodického a katodického signálu. Tyto trendy jsou patrné také z vynesných závislostí prezentovaných na obrázku 47. V tabulce 10 jsou pak shrnuty konkrétní hodnoty proudů a potenciálů odečtené z voltamogramů. Ze získaných proudů byl vypočítán poměr  $I_{pa}/I_{pc}$  a u všech elektrod se pohyboval v rozsahu 0,86-0,97. Hodnota nejbližší 1 (0,97) byla vypočtena pro elektrodu s obsahem boru 10 000 ppm. Reverzibilní průběh elektrodové reakce vykazovala také elektroda s obsahem 1000 a 8000 ppm, kdy byl poměr  $I_{pa}/I_{pc}$  shodně 0,92.



**Obrázek 46** Cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$   $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na testovaných BDDE  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 100 \text{ mV/s}$ ,



**Obrázek 47** Závislosti  $\Delta E_p$  a  $I_{pa,c}$  na B/C pro  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 100$  mV/s

**Tabulka 10** Vyhodnocení výšky píku v závislosti na jednotlivých poměrech B/C

B/C [ppm]	$I_{pa}$ [nA]	$I_{pc}$ [nA]	$I_{pa}/I_{pc}$	$E_{pa}$ [mV]	$E_{pc}$ [mV]	$\Delta E_p$ [mV]
1000	1161	-1268	0,92	71	-167	238
2000	1226	-1389	0,88	26	-132	158
4000	1283	-1407	0,91	26	-91	117
8000	1400	-1530	0,92	4	-71	75
10 000	1560	-1612	0,97	-10	-71	61
20 000	972	-1128	0,86	8	-77	85

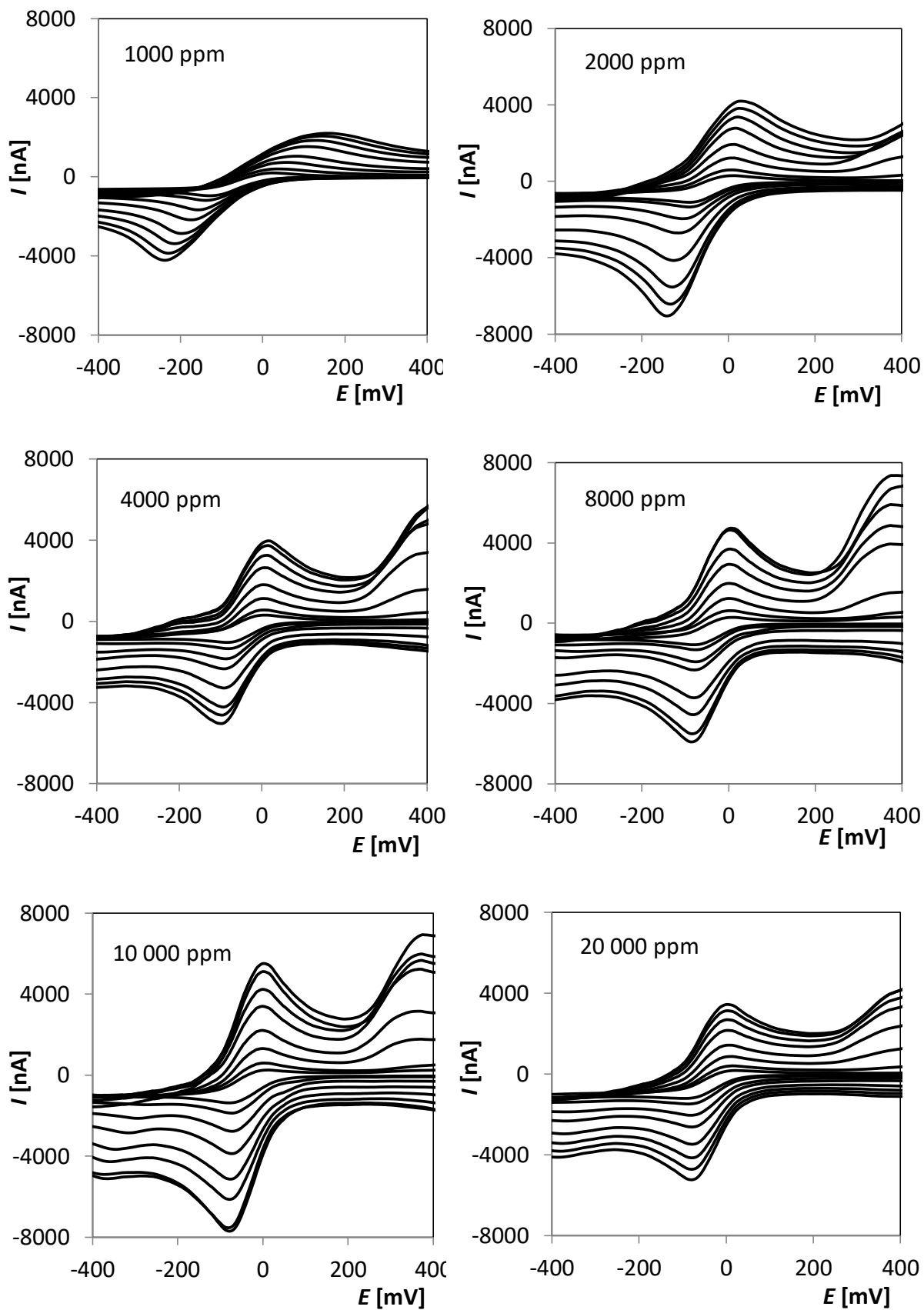
Z hodnot  $\Delta E_p$  uvedených pro jednotlivé elektrody v tabulce 10 vyplývá, že s rostoucím obsahem boru dochází k přibližování anodické a příslušné katodické proudové odezvy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ . Pro elektrody s vyšším obsahem boru (8000-20 000 ppm) se navíc tato hodnota blížila teoretické hodnotě 59 mV podle Nernstovy rovnice (11). Vzhledem k charakteru  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  jako outer-sphere redoxního systému byly všechny získané hodnoty  $\Delta E_p$  mnohem menší než pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Výsledky jsou opět v souladu s těmi získanými pro komerčně dostupnou BDDE.

Na obrázku 48 jsou uvedeny cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  o koncentraci  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  zaznamenané v závislosti na rychlosti polarizace na všech testovaných elektrodách. Měření probíhalo v prostředí 0,1 mol/l KCl v rozsahu potenciálů od  $-1600$  do  $+1800 \text{ mV}$ , rychlost polarizace byla měněna od 20 do 500 mV/s. Z obrázku je patrné, že se zvyšujícím se poměrem B/C docházelo k přibližování potenciálu píků a také se zvětšovaly výšky anodických a katodických signálů. Jako v případě předchozího redoxního systému, tak i u  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ , vykazovala nejlepší elektrochemické vlastnosti elektroda s poměrem B/C 10 000 ppm a při dalším zvýšení poměru na 20 000 ppm se voltamogram opět zhoršil.

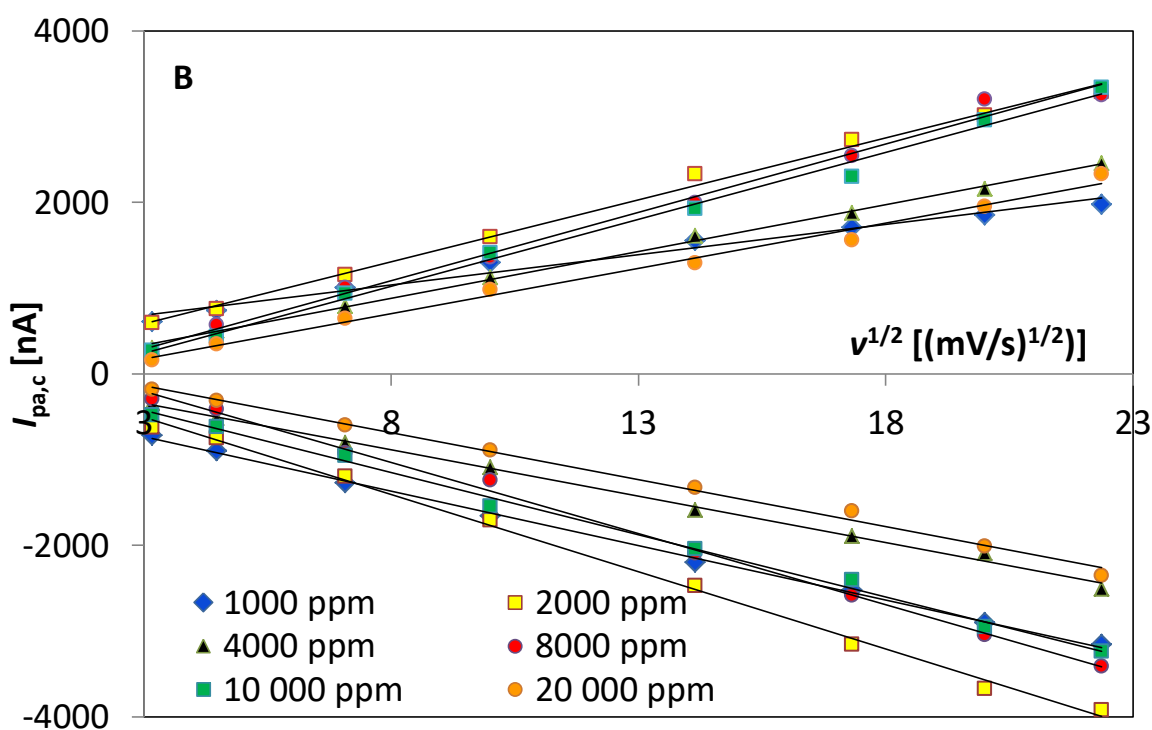
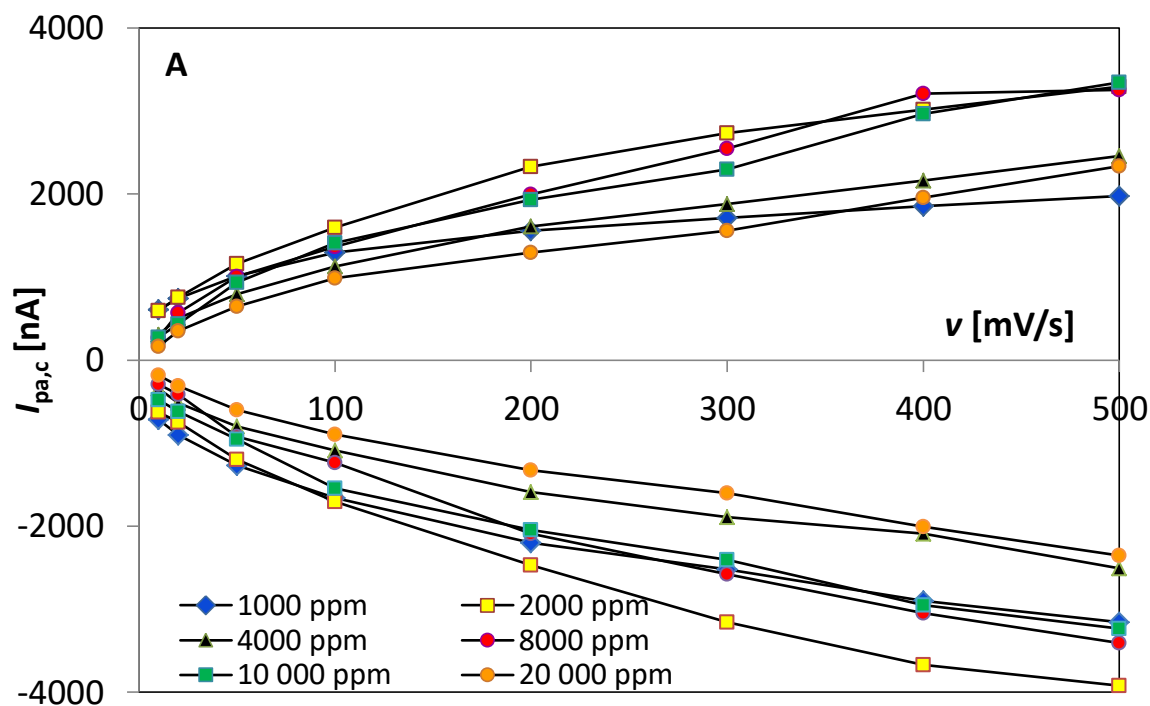
Následně byly z těchto měření vyhodnoceny výšky anodických a katodických píků a vyneseny závislosti  $I_p$  na  $v$  (obrázek 49A) a  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 49B). Zatímco závislosti  $I_p$  na  $v$  nevykazovaly lineární průběh, tak závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  jsou lineární a mohou být popsány rovnicemi, jejichž parametry jsou shrnuty v tabulce 11. Lineární průběh závislostí svědčí o difuzně řízené elektrodové reakci. Poté byly vyneseny logaritmické závislosti ( $\log(I_p)$ - $\log(v)$ ) a příslušné hodnoty směrnic a úseků pro anodické a katodické proudy jsou uvedeny v tabulce 12 s příslušnými korelačními koeficienty. Získané hodnoty směrnic potvrzují difuzně řízené elektrodové reakce.

**Tabulka 11** Statistické parametry závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v^{1/2}$  na testovaných BDDE pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

$I_p$	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	R
anodický	1000	(116,5±4,9)	(209±70)	0,9945
	2000	(144,5±4,0)	(154±56)	0,9978
	4000	(109,5±1,9)	(5,8±27)	0,9991
	8000	(159,2±5,8)	-(185±81)	0,9960
	10 000	(156,2±5,0)	-(224±70)	0,9969
	20 000	(105,6±4,3)	-(140±60)	0,9951
katodický	1000	-(136,2±3,3)	-(175±46)	0,9985
	2000	-(180,4±4,1)	(34±57)	0,9984
	4000	-(108,3±2,7)	-(20±38)	0,9981
	8000	-(165,7±3,3)	(292±46)	0,9988
	10 000	-(144,9±3,6)	(6,5±51)	0,9981
	20 000	-(109,7±3,2)	(191±45)	0,9974



**Obrázek 48** Cyklické voltamogramy  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l  $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na testovaných BDDE  
 Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600$  mV,  $E_{obratu} = +1800$  mV,  $v = 10-500$  mV/s

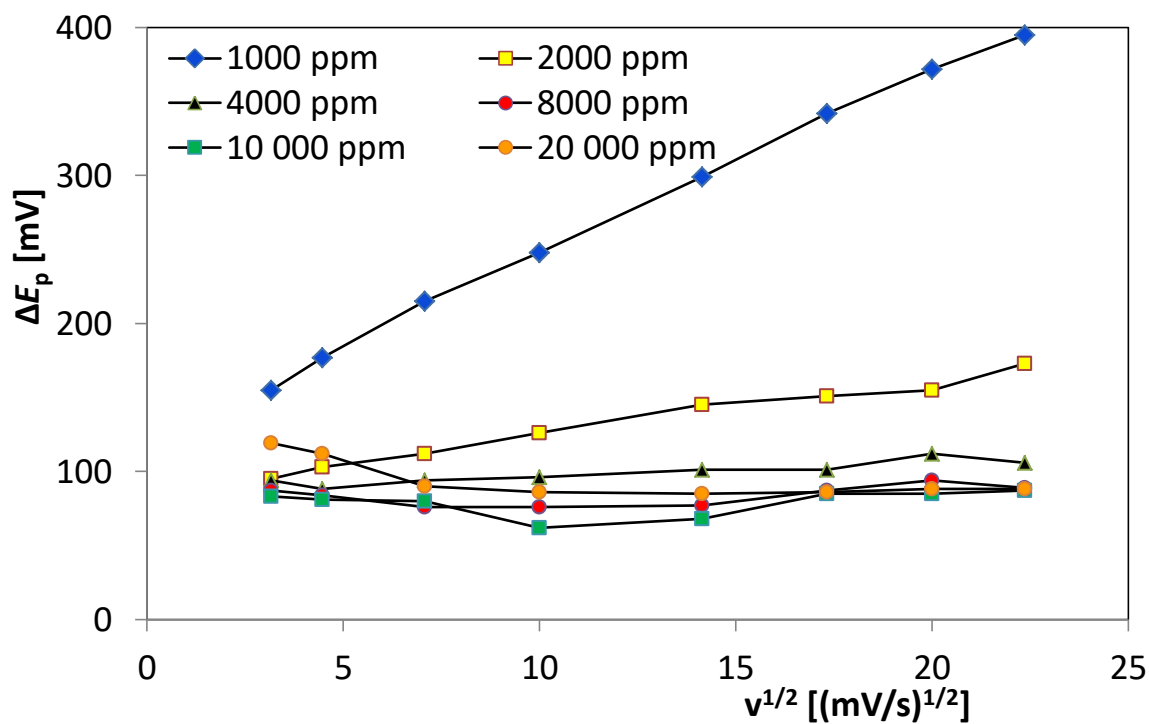


**Obrázek 49** Závislosti  $I_{pa,c}$  na  $v$  (A) a  $I_{pa,c}$  na  $v^{1/2}$  (B) pro  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$ ,  $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 10\text{-}500 \text{ mV/s}$

**Tabulka 12** Statistické parametry závislosti  $\log(I_{pa,c})$  na  $\log(v)$  na testovaných BDDE pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

$I_p$	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	R
anodický	1000	(0,426±0,013)	(2,296±0,028)	0,9971
	2000	(0,4521±0,0088)	(2,306±0,018)	0,9988
	4000	(0,516±0,014)	(2,005±0,029)	0,9979
	8000	(0,612±0,032)	(1,900±0,068)	0,9918
	10 000	(0,628±0,024)	(1,843±0,051)	0,9956
	20 000	(0,630±0,036)	(1,674±0,076)	0,9902
katodický	1000	(0,452±0,011)	(2,288±0,023)	0,9983
	2000	(0,496±0,015)	(2,257±0,032)	0,9971
	4000	(0,4930±0,0091)	(2,057±0,019)	0,9990
	8000	(0,640±0,018)	(1,824±0,038)	0,9976
	10 000	(0,499±0,014)	(2,160±0,028)	0,9978
	20 000	(0,636±0,016)	(1,658±0,035)	0,9980

Poté byly vyneseny ještě závislosti  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  (obrázek 50), které potvrzují, že největší potenciálový rozdíl mezi anodickým a katodickým píkem byl pozorován opět pro BDDE s poměrem B/C 1000 ppm. S rostoucím poměrem B/C se potenciálový rozdíl zmenšoval. Významný posun potenciálu píků v závislosti na rychlosti polarizace byl pozorován pouze pro elektrody s vysokým obsahem boru (10 000 a 20 000 ppm). U dalších elektrod se pak potenciál píků s rostoucí rychlostí v podstatě neměnil. Na závěr této části práce byly počítány  $k_{app}^0$  pro jednotlivé elektrody, a to opět z dat pro rychlost polarizace 100 mV/s. Hodnoty  $\psi$  odečtené ze závislosti na obrázku 33 a vypočtené hodnoty  $k_{app}^0$  pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  jsou shrnuty v tabulce 13.  $k_{app}^0$  se pohybovaly v rozmezí  $1,3 \times 10^{-2}$  do  $5,2 \times 10^{-4}$  cm/s. Z tabulky je patrné, že s vyšší koncentrací boru v elektrodě docházelo ke zvyšování hodnoty  $k_{app}^0$ . Nejvyšší  $k_{app}^0$  byly získány pro elektrody s B/C 8000 a 10 000 ppm ( $1,3 \times 10^{-2}$  a  $9,7 \times 10^{-2}$  cm/s). Tyto výsledky korespondují s dříve publikovanými hodnotami [81]. Pro redoxní systém  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  jsou rychlostní konstanty o několik řádů vyšší než pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , což odpovídá výrazným rozdílům v hodnotách  $\Delta E_p$  pro oba použité redoxní systémy. Závěrem lze říci, že čím je hodnota  $k_{app}^0$  vyšší, tím je přenos elektronu lepší a lepší jsou tedy elektrochemické vlastnosti použitého elektrodového materiálu.



**Obrázek 50** Závislosti  $\Delta E_p$  na  $v^{1/2}$  pro  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  zaznamenané na testovaných BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda CV, elektrolyt KCl (0,1 M),  $E_{\text{poč}} = -1600$  mV,  $E_{\text{obratu}} = +1800$  mV,  $v = 10$ -500 mV/s

**Tabulka 13** Vypočtené hodnoty zdánlivé rychlostní konstanty přenosu náboje pro testované BDDE

B/C [ppm]	$\Delta E_p$ [mV]	$\psi$	$k_{\text{app}}^0$ [cm/s]
1000	248	0,063	$5,2 \times 10^{-4}$
2000	126	0,32	$2,7 \times 10^{-3}$
4000	96	0,66	$5,5 \times 10^{-3}$
8000	76	1,5	$1,3 \times 10^{-2}$
10000	62	12	$9,7 \times 10^{-2}$
20000	86	0,93	$7,7 \times 10^{-3}$

### 4.3 Aplikační možnosti BDDE s různým obsahem boru při analýze leukovorinu

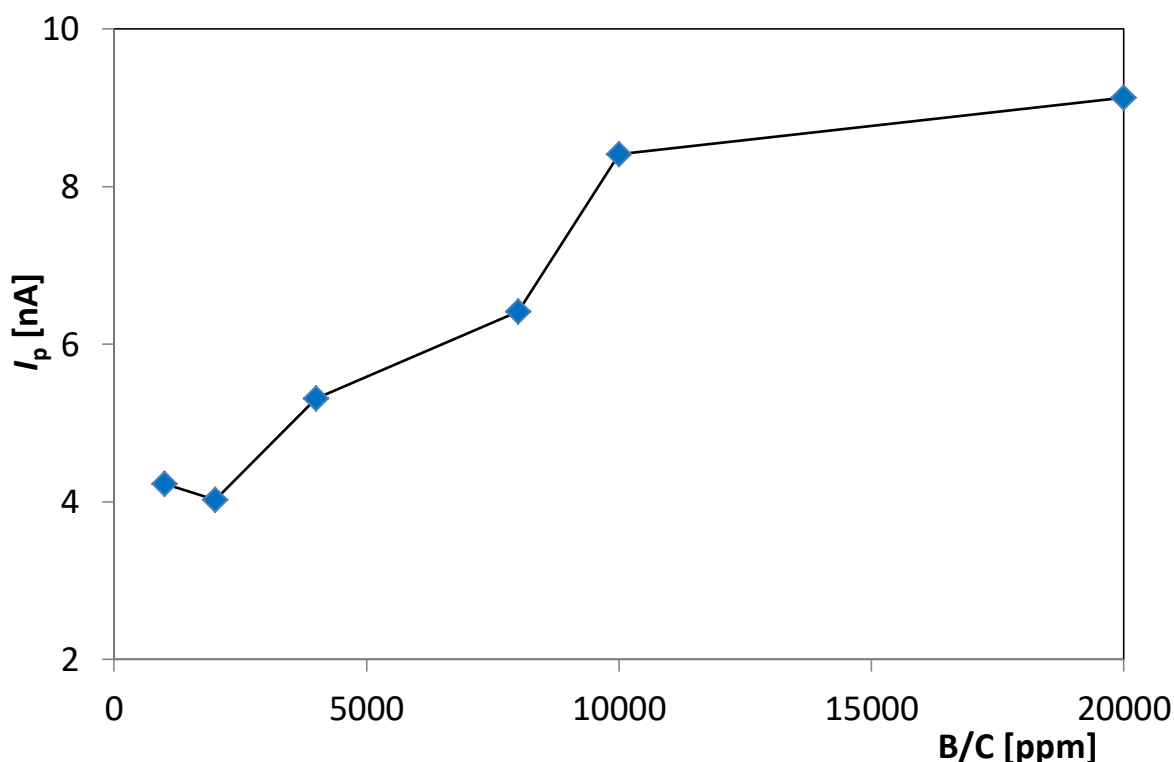
Jak již bylo uvedeno výše, aplikační možnosti testovaných BDDE byly ověřovány prostřednictvím analýzy leukovorinu. Pro uvedené experimenty byla použita metoda vyvinutá v úvodní části práce pro komerční BDDE. Před zahájením práce byla každá elektroda aktivována vložení katodického potenciálu  $-2000$  mV na dobu 60 s a poté anodického potenciálu  $+2000$  mV opět na 60 s. Pro zlepšení opakovatelnosti měření bylo vloženo ještě 20 potenciálových cyklů v rozsahu potenciálů od  $-1000$  mV do  $+2000$  mV. Všechna měření metodou DPV probíhala v prostředí BRB o pH 3 a byly nastaveny následující parametry:  $E_{\text{poč}} -700$  mV,  $E_{\text{kon}} +1800$  mV,  $v$  40 mV/s, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 20 ms,  $E_{\text{reg}} +2000$  mV a  $t_{\text{reg}}$  5 s.

#### 4.3.1 Koncentrační závislosti leukovorinu a příslušné statistické parametry

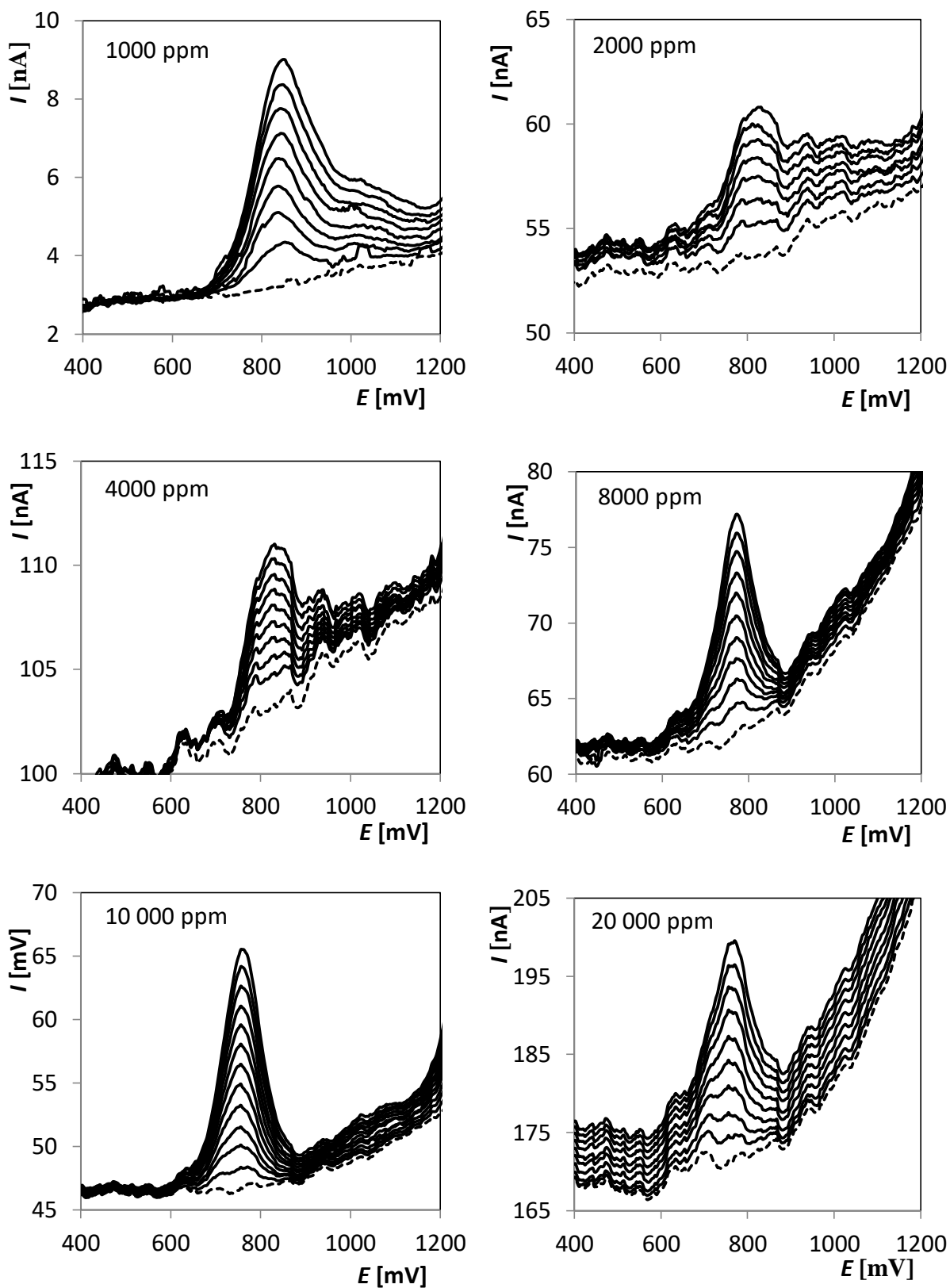
Na úvod byly na všech elektrodách změřeny DP voltamogramy LV o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  mol/l a byla vynesena závislost  $I_p$  na poměru B/C, která je uvedena na obrázku 51. Z obrázku je zřejmé, že výška píku s rostoucí koncentrací boru rostla a nejvyšší proudová odezva byla zaznamenána pro elektrody s obsahem boru 10 000 a 20 000 ppm. Mezi těmito dvěma elektrodami již nebyl nárůst signálu významný, což by odpovídalo předchozím výsledkům, z nichž vyplývá, že zvýšení obsahu boru nad 10 000 ppm již nevedlo ke zlepšení elektrochemických vlastností elektrody.

Pro všechny použité BDDE byla poté proměřena řada koncentračních závislostí LV v modelových roztocích s cílem určit lineární dynamický rozsah pro jednotlivé elektrody a vypočítat základní statistické parametry. Příklady získaných voltamogramů koncentračních závislostí naměřených na stejné koncentrační hladině, tedy od koncentrace  $1 \times 10^{-6}$  mol/l jsou uvedeny na obrázku 52. Konkrétně se jedná o následující koncentrační rozmezí:  $1 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-6}$  mol/l (1000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $7 \times 10^{-6}$  mol/l (2000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $9 \times 10^{-6}$  mol/l (4000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l (8000 ppm) a  $1 \times 10^{-6}$ - $1,2 \times 10^{-5}$  mol/l (10 000 ppm). Vzhledem k tomu, že pro elektrodu s poměrem B/C 20 000 ppm byla nejnižší měřitelnou koncentrací hodnota  $2 \times 10^{-6}$  mol/l, byla měřena koncentrační závislost v rozsahu  $2 \times 10^{-6}$ - $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l. Pro lepší představu o kvalitě získaných záznamů jsou na obrázku uvedeny naměřené voltamogramy bez následného softwarového vyhlazení. Na obrázku je vidět velký rozdíl mezi záznamy pro jednotlivé testované elektrody. Liší se nejen výškou a tvarem píků, ale výrazný rozdíl je také

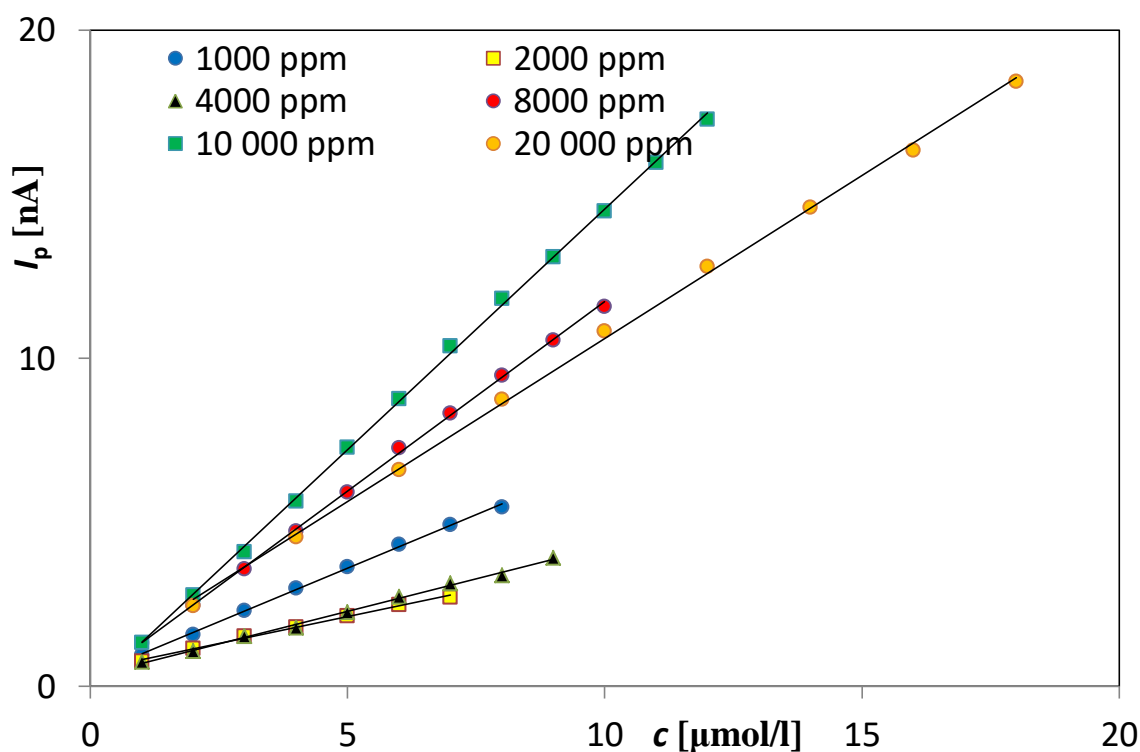
v pozadí, které je nejnižší pro elektrodu s B/C 1000 ppm a naopak velmi vysoké pro elektrodu s poměrem B/C 20 000 ppm. Nejlépe vyvinuté píky poskytovaly BDDE s poměrem B/C 8000 a 10 000 ppm. Na obrázku 53 jsou vyneseny závislosti  $I_p$  na  $c_{LV}$  pro uvedená měření z obrázku 52. Ze získaných závislostí lze vyčíst, že nejstrmější přímky poskytují, a tudíž nejcitlivější jsou BDDE s B/C 8000 a 10 000 ppm. Tyto závěry potvrzují rovněž hodnoty směrnic uvedených závislostí, které jsou shrnuty spolu s úseky a korelačními koeficienty v tabulce 14. Z ní vyplývá, že citlivost elektrod s obsahem boru 1000-4000 ppm je obdobná a poté prudce narůstá pro elektrody s vyšším poměrem B/C. Maximální hodnota směrnice byla dosažena pro elektrodu 10 000 ppm a poté byl v souladu s předchozími výsledky opět zaznamenán pokles citlivosti pro elektrodu s B/C 20 000 ppm.



**Obrázek 51** Závislost  $I_p$   $5 \times 10^{-6}$  mol/l LV na B/C zaznamenaná na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV,  
šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s



**Obrázek 52** DP voltamogramy LV v závislosti na koncentraci zaznamenané na testovaných BDDE  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-6}$  mol/l (1000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $7 \times 10^{-6}$  mol/l (2000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $9 \times 10^{-6}$  mol/l (4000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l (8000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $1,2 \times 10^{-5}$  mol/l (10 000 ppm) a  $2 \times 10^{-6}$ - $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l (20 000 ppm); přerušovaná čára – elektrolyt, plná čára – přídavky LV



**Obrázek 53** Závislosti  $I_p$  na  $c_{LV}$  zaznamenané na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm  
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s,  $c_{LV} = 1 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-6}$  mol/l (1000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $7 \times 10^{-6}$  mol/l (2000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $9 \times 10^{-6}$  mol/l (4000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l (8000 ppm),  $1 \times 10^{-6}$ - $1,2 \times 10^{-5}$  mol/l (10 000 ppm) a  $2 \times 10^{-6}$ - $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l (20 000 ppm)

**Tabulka 14** Statistické parametry koncentračních závislostí LV v modelových roztocích pro jednotlivé elektrody

B/C [ppm]	Směrnice [nA l $\mu\text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	R
1000	(0,653±0,010)	(0,339±0,051)	0,9992
2000	(0,3267±0,0088)	(0,499±0,039)	0,9982
4000	(0,3951±0,0065)	(0,312±0,036)	0,9984
8000	(1,1545±0,0098)	(0,176±0,061)	0,9997
10 000	(1,466±0,012)	(0,114±0,085)	0,9997
20 000	(0,983±0,011)	(0,74±0,14)	0,9995

Statistické parametry jako LDR, LOD a LOQ získané z měření koncentračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 15. Z ní vyplývá, že velmi nízké a v podstatě shodné hodnoty LOD byly podle očekávání vypočteny pro elektrody s B/C 8000 a 10 000 ppm BDDE ( $9,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-7}$  mol/l). Nejnižší hodnota LOD byla ale navzdory předchozím výsledkům dosažena pro elektrodu s poměrem 1000 ppm ( $6,7 \times 10^{-8}$  mol/l). Vysvětlením pro tento fakt může být velmi nízké pozadí při měření s touto elektrodou, velký poměr signál/šum a také velmi dobrá linearita koncentrační závislosti použité pro výpočet ( $R = 0,9999$ ). Naopak nejhorší LOD byl

dosazen pro elektrodu 20 000 ppm, což bylo patrně způsobeno vysokým pozadím a malým poměrem signál/šum (obrázek 52). Tato elektroda poskytovala rovněž nejužší LDR. Nejširší LDR byl naměřen na BDDE s B/C 10 000 ppm ( $5,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-5}$  mol/l).

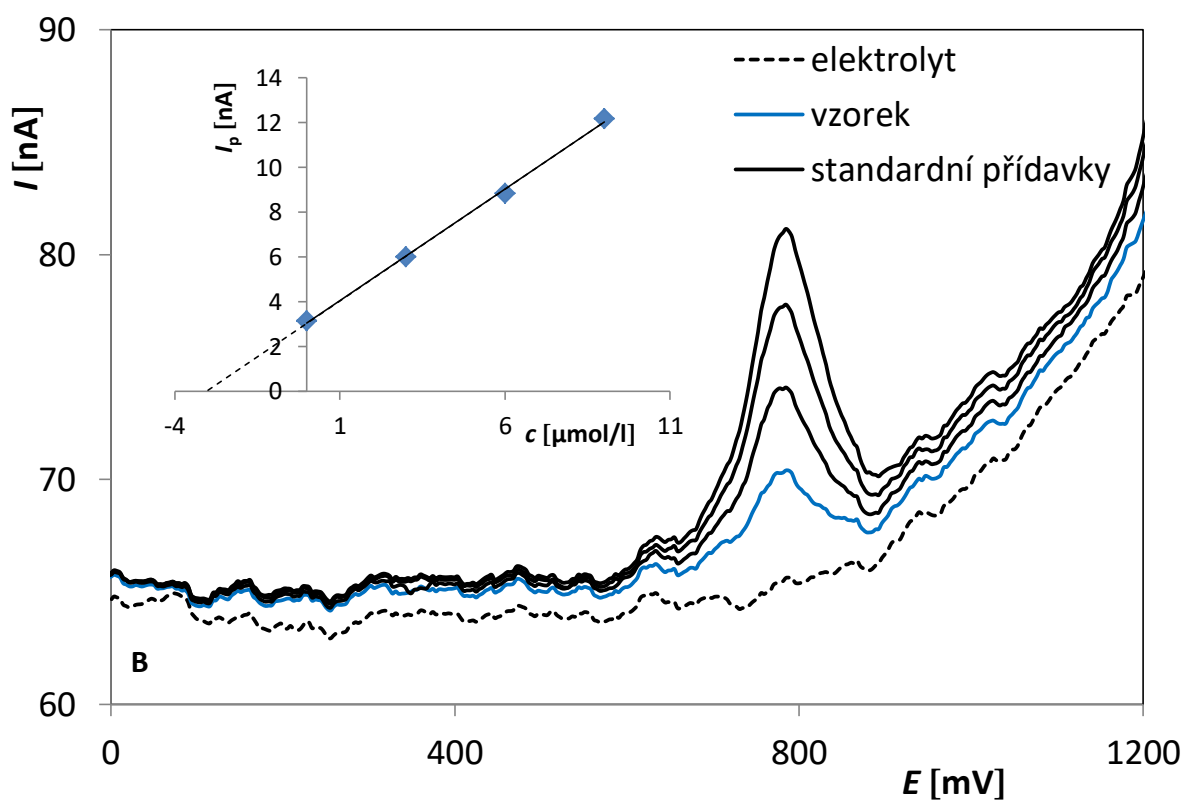
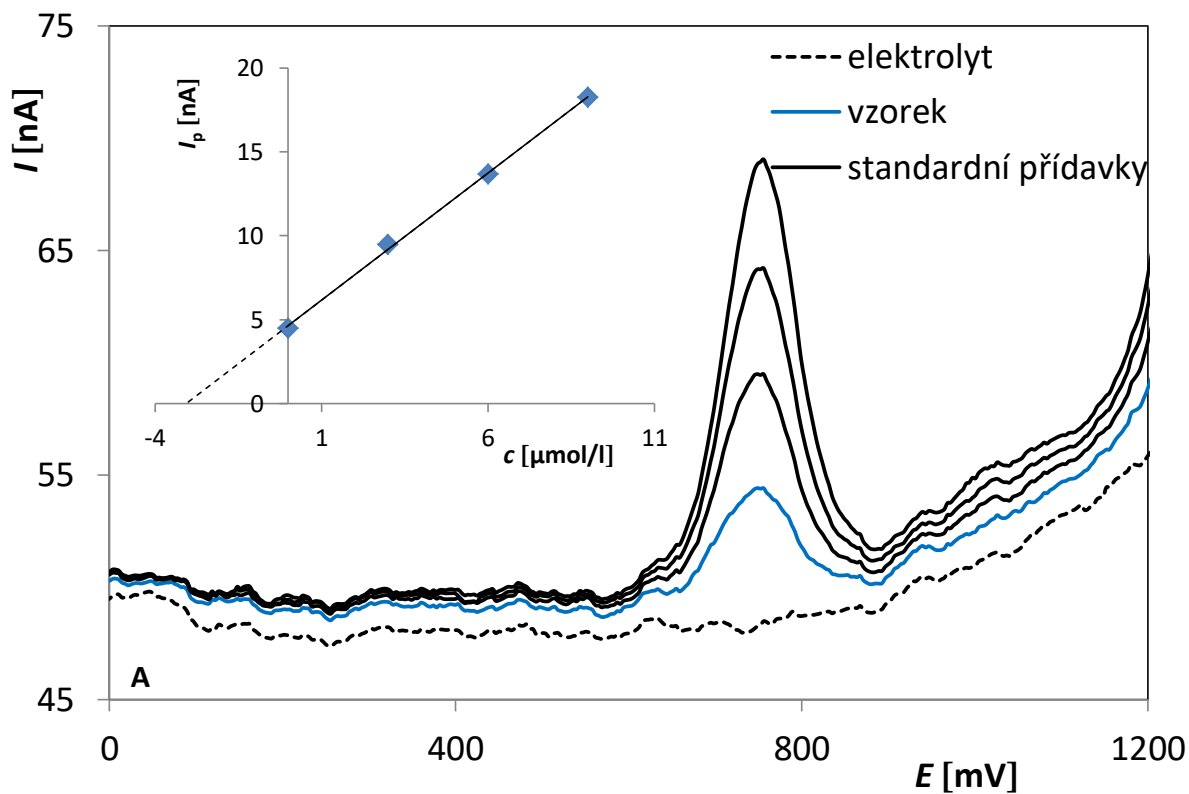
V dalším kroku byla testována opakovatelnost měření. Bylo změřeno 11 opakovaných křivek pro LV o koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  mol/l na všech testovaných BDDE a z odečtených hodnot  $I_p$  byla následně vypočítána hodnota  $RSD_{11}$ . Získané výsledky jsou opět uvedeny v tabulce 15. Vzhledem k tomu, že jsou všechny hodnoty  $RSD_{11} < 3,5$  %, je možné říci, že měření je velmi dobře opakovatelné s využitím všech testovaných elektrod.

*Tabulka 15* Statistické parametry pro stanovení LV s využitím jednotlivých testovaných BDDE

<b>B/C</b> <b>[ppm]</b>	<b>LDR</b> <b>[mol/l]</b>	<b>LOD</b> <b>[mol/l]</b>	<b>LOQ</b> <b>[mol/l]</b>	<b>RSD<sub>11</sub></b> <b>[%]</b>
1000	$2,5 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-7}$	2,0
2000	$1,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-6}$	1,7
4000	$5,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-7}$	1,9
8000	$5,0 \times 10^{-7} - 3,5 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-7}$	3,4
10 000	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$	1,1
20 000	$2,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-6}$	0,8

#### 4.3.2 Analýza modelových roztoků leukovorinu

V další části práce byla testována opakovatelnost stanovení LV s využitím jednotlivých BDDE. Byly analyzovány vždy 2 modelové roztoky LV o různé koncentraci ( $1,0 \times 10^{-6}$  resp.  $2,0 \times 10^{-6}$  a  $3,0 \times 10^{-6}$  mol/l). Hodnota nižší koncentrace LV pro BDDE s B/C 20 000 ppm byla oproti ostatním elektrodám vyšší ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol/l) vzhledem k tomu, že to byla nejnižší možná reálně měřitelná koncentrace na této elektrodě. Pro stanovení obsahu LV byla použita metoda standardního přídatku, kdy byly vždy přidány minimálně 2-3 přídatky standardního roztoku LV o koncentraci 0,001 mol/l. Stanovení bylo pro všechny testované elektrody vždy 5× zopakováno a byla vypočtena průměrná hodnota koncentrace LV s příslušným intervalem spolehlivosti ( $\alpha = 0,05$ ), relativní směrodatnou odchylkou ( $RSD_5$ ) a výtěžností. Všechny výsledky jsou shrnuty v tabulce 16. Z ní vyplývá, že všechny získané výsledky jsou správné a stanovení je velmi dobře opakovatelné ( $RSD_5 < 4$  %). Příklady záznamů stanovení LV v modelových roztocích o koncentraci  $3 \times 10^{-6}$  mol/l na BDDE s poměrem B/C 8000 a 10 000 ppm jsou uvedeny na obrázku 54 spolu s grafickým vyhodnocením metody standardního přídatku.



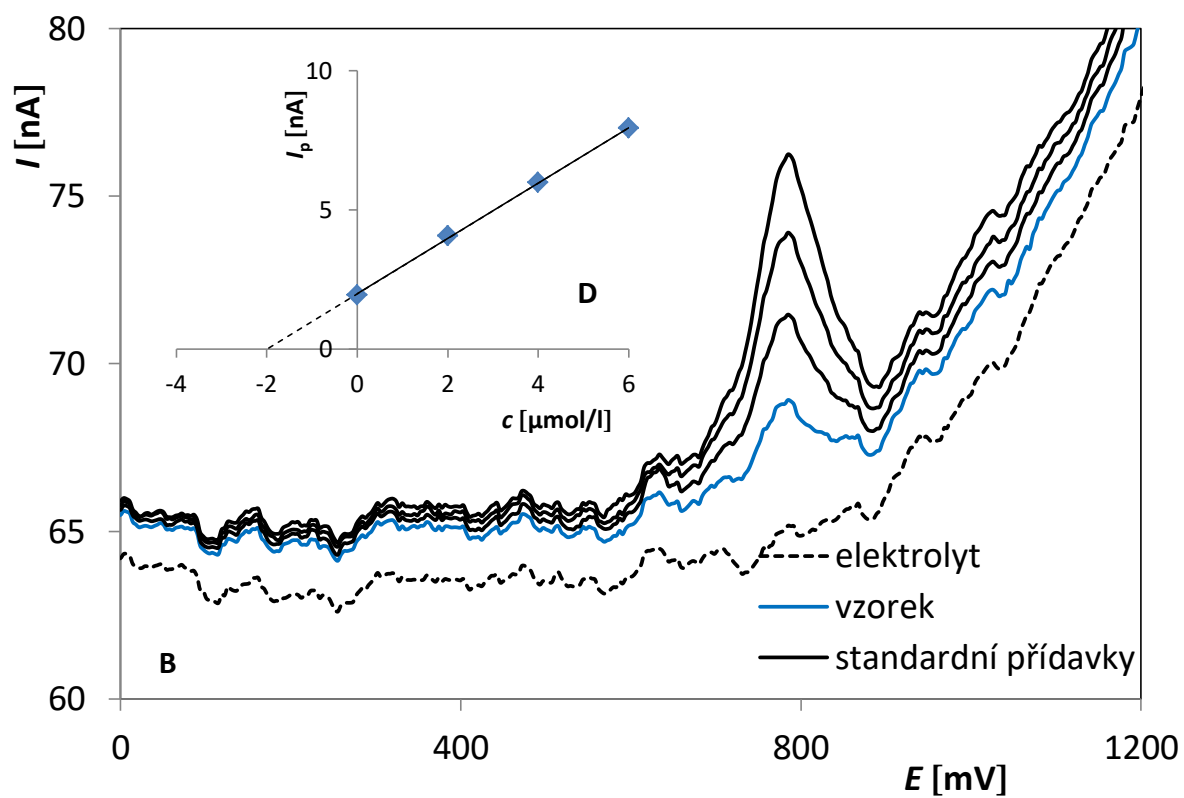
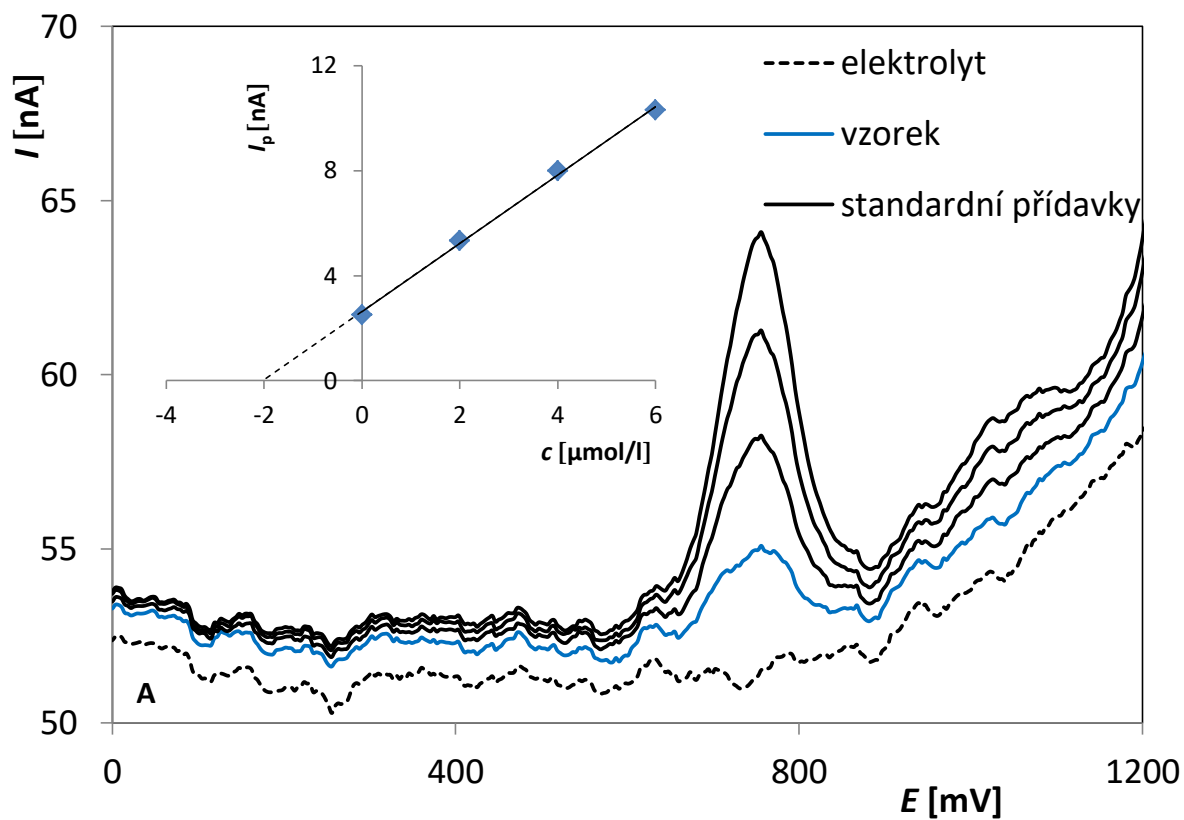
**Obrázek 54** Stanovení LV metodou standardního přídávku v modelovém roztoku o koncentraci  $3 \times 10^{-6}$  mol/l zaznamenané na BDDE s B/C 10 000 ppm (A) a 8000 (B); vložena jsou grafická vyhodnocení analýz Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s, standardní přídávky:  $V = 30$   $\mu$ l,  $c_{LV} = 0,001$  mol/l

*Tabulka 16 Výsledky opakovaných stanovení LV v modelových roztocích pro jednotlivé BDDE*

<b>B/C [ppm]</b>	<b>Dáno [mol/l]</b>	<b>Stanoveno [mol/l]</b>	<b>Výtěžnost [%]</b>	<b>RSD<sub>5</sub> [%]</b>
1000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,030) \times 10^{-6}$	99,0-101,3	1,5
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,012) \times 10^{-6}$	99,5-104,0	1,8
2000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,040 \pm 0,043) \times 10^{-6}$	98,3-103,6	2,1
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,020 \pm 0,024) \times 10^{-6}$	97,0-105,0	3,5
4000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,043) \times 10^{-6}$	98,3-104,0	2,2
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,020 \pm 0,025) \times 10^{-6}$	96,5-107,0	3,7
8000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,030 \pm 0,031) \times 10^{-6}$	99,3-103,3	1,5
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,025) \times 10^{-6}$	95,5-106,0	3,8
10 000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,022) \times 10^{-6}$	98,6-101,3	1,1
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,011) \times 10^{-6}$	98,0-102,0	1,7
20 000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,010 \pm 0,039) \times 10^{-6}$	97,3-102,3	1,9
	$2,0 \times 10^{-6}$	$(2,000 \pm 0,018) \times 10^{-6}$	98,5-101,0	1,4

### 4.3.3 Analýza farmaceutického přípravku

Na závěr této diplomové práce byla vyvinutá metoda pro stanovení LV v kombinaci s testovanými elektrodami aplikována při analýze přípravku pro přípravu injekčního roztoku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ s deklarovaným obsahem 10 mg LV na jednu ampulku. V experimentální části v kapitole 3.3.3 je popsána příprava vzorku k analýze a konkrétní postup stanovení LV. Analýza byla provedena opět metodou standardního přídatku. Stanovení bylo pro všechny testované elektrody vždy 5× zopakováno a byl vypočten průměrný obsah LV v ampulce s příslušným intervalem spolehlivosti, relativní směrodatnou odchylkou (RSD<sub>5</sub>) a výtěžností. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 17. Z té vyplývá, že při stanovení LV ve farmaceutickém přípravku byly dosaženy velmi dobré výsledky pro všechny testované BDDE, stanovení je správné a dobře opakovatelné (RSD<sub>5</sub> < 2,5 %). Konkrétní příklady stanovení LV v přípravku s využitím BDDE s poměrem B/C 8000 a 10 000 ppm jsou uvedeny na obrázku 55 spolu s grafickým vyhodnocením metody standardního přídatku.



**Obrázek 55** Stanovení LV metodou standardního přídavku přípravku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ zaznamenané na BDDE s B/C 10 000 ppm (A), 8000 (B); vložena jsou grafická vyhodnocení analýz Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3),  $E_{poč} = -700$  mV,  $E_{kon} = +1800$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $E_{reg} = +2000$  mV,  $t_{reg} = 5$  s, standardní přídavky:  $V = 20$   $\mu\text{l}$ ,  $c_{LV} = 0,001$  mol/l

**Tabulka 17** Výsledky opakovaných stanovení LV v přípravku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ pro jednotlivé BDDE

<b>B/C [ppm]</b>	<b>Deklarováno [mg]</b>	<b>Stanoveno [mg]</b>	<b>Výtěžnost [%]</b>	<b>RSD<sub>5</sub> [%]</b>
1000	10	(10,03±0,080)	98,2-100,8	1,2
2000	10	(10,09±0,121)	98,7-102,8	1,8
4000	10	(10,08±0,131)	98,2-102,8	2,0
8000	10	(10,03±0,104)	98,7-102,8	1,6
10 000	10	(10,03±0,143)	97,7-103,3	2,1
20 000	10	(10,04±0,099)	99,2-102,3	1,4

## 5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo porovnání elektrochemických vlastností borem dopovaných diamantových elektrod s různým obsahem boru a vývoj metody stanovení LV resp. její aplikace při analýze modelových roztoků a farmaceutického přípravku s využitím testovaných elektrod.

První část práce byla věnována studiu voltametrického chování LV a vývoji metody jeho stanovení s využitím komerčně dostupné BDDE. Bylo zjištěno, že LV poskytuje na BDDE ve slabě kyselém prostředí 2 oxidační signály. Pro studium voltametrického chování LV v závislosti na pH a rychlosti polarizace byla použita metoda CV. Vysoké, dobře vyvinuté i dobře vyhodnotitelné a současně dostatečně opakovatelné signály byly pozorovány v prostředí BRB o pH 3, který byl proto zvolen jako vhodný základní elektrolyt. Ze závislosti na rychlosti polarizace bylo zjištěno, že sledované elektrodové reakce jsou řízeny difúzí, avšak hodnoty směrnic logaritmických závislostí svědčí rovněž o vlivu kinetiky nějaké chemické reakce, která mohla být předřazena probíhající elektrodové reakci, nebo mohlo jít o reakci následnou. Pro stanovení LV byly optimalizovány parametry DPV a to rychlost polarizace, výška a šířka pulzu, a také parametry regenerace elektrodového povrchu. Optimalizované parametry byly použity při analýze modelových roztoků LV nejen pomocí komerční BDDE, ale rovněž při pozdější aplikaci testovaných elektrod s různým obsahem boru v diamantovém filmu. Po optimalizaci parametrů DPV byly proměřeny koncentrační závislosti LV v modelových roztocích a vypočteny základní statistické parametry, např. LDR  $1,5 \times 10^{-7}$ – $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l nebo LOD  $1,5 \times 10^{-8}$  mol/l a LOQ  $5,0 \times 10^{-8}$  mol/l. Navržená metoda byla úspěšně aplikována při analýze farmaceutického přípravku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“.

Stěžejní částí této diplomové práce byla charakterizace laboratorně vyrobených BDDE s různým obsahem boru v diamantovém filmu. Byly změřeny CV voltamogramy redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ , a to i v závislosti na rychlosti polarizace. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací boru docházelo k zúžení potenciálového okna jednotlivých elektrod a současně také ke zvýšení reverzibility sledovaných elektrodových reakcí. Nejlepší elektrochemické vlastnosti, např. poměr  $I_{pa}/I_{pc}$  blízký 1, nejmenší hodnoty  $\Delta E_p$  anodického a katodického signálu, největší elektroaktivní plochu elektrody či nejvyšší vypočtené hodnoty  $k_{app}^0$ , vykazovala elektroda s poměrem B/C 10 000 ppm. Při dalším zvýšení obsahu boru pak

bylo pozorováno opětovné zhoršení uvedených parametrů, pravděpodobně v důsledku zvýšeného obsahu nečistot ve formě  $sp^2$  uhlíku.

V poslední části práce byly ověřovány aplikační možnosti testovaných BDDE při analýze LV. Metoda vyvinutá pomocí komerčně dostupné elektrody byla použita při analýze modelových roztoků s využitím jednotlivých BDDE s různým obsahem boru. Byly proměřeny koncentrační závislosti s cílem určit LDR, LOD a LOQ. V souladu s předchozími výsledky poskytly nejnižší hodnoty LOD elektrody s poměrem B/C 8000 a 10 000 ppm a překvapivě také elektroda s poměrem 1000 ppm. Opakovatelnost měření byla velmi dobrá pro všechny testované elektrody ( $RSD_{11} < 3,5 \%$ ) a podobně tomu bylo i v případě opakovaných stanovení LV v modelových roztocích ( $RSD_5 < 4 \%$ ). Stejně jako v případě komerční elektrody i testované BDDE ve spojení s DPV byly aplikovány při stanovení LV ve farmaceutickém přípravku a se všemi elektrodami byly dosaženy správné a velmi dobře opakovatelné výsledky ( $RSD_5 < 2,5 \%$ ).

Na závěr lze konstatovat, že obsah boru v diamantovém filmu významně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti připraveného elektrodového materiálu. Obecně platí, že s rostoucím poměrem B/C se testované parametry elektrod zlepšují, ale jen po určité koncentraci.

## Použitá literatura

1. Kalvoda R., Kůta J.: *Moderní polarografické a voltametrické metody*. Chemické Listy, č. 74, s. 674-693 (1980)
2. Kalvoda R.: *Hrst vzpomínek na pana profesora Heyrovského a jeho polarografii*. Chemické Listy, č. 103, s. 880-888 (2009)
3. Jindra J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882 – 1989*. Nakladatelství Libri, Praha, s. 227, ISBN 978-80-7277-400-5, 2009
4. Kalvoda R.: *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. SNTL, s. 212, Praha 1985
5. Kotrlý S., Churáček J.: *Analytická chemie III: elektroanalytické metody*. Vysoká škola chemicko-technologická, s. 82, Pardubice 1984
6. Opekar F. a kol.: *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, s. 208, ISBN 80-246-0553-8, 2002
7. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava, s. 132, ISBN 80-86369-07-2, 2003
8. Kříženecká S., Synek V.: *Základy analytické chemie*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, s. 143, ISBN 978-80-7414-873-6, 2014
9. Ozkan, S. A. *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and their Validation*. HNB Publishing, New York, ISBN 978-0-9664286-7-4, 2012
10. Heyrovský J., Zuman P.: *Úvod do praktické polarografie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, s. 224, 1964
11. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, s. 428, 1962
12. Barek J. a kol.: *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, s. 188, ISBN 80-246-1146-5, 2005
13. Zýka J.: *Analytická příručka*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, s. 476, 1975
14. Čůta F.: *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL, s. 295, 1986
15. Holzbecher Z., Churáček J.: *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, s. 664, 1987
16. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006: *O registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky*. Úřední věstník Evropské unie, prosinec 2006

17. Nařízení komise (EU) č. 847/2012 kterým se mění příloha XVII nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 *o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH), pokud jde o rtuť*. Úřední věstník Evropského unie, září 2012
18. Barek J.: *Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii*. Chemické Listy, č. 91, s. 1038-1042 (1997)
19. Liu L. et al.: *Electrochemical degradation of chlorobenzene on boron-doped diamond and platinum electrodes*. Journal of Hazardous Materials, 168, s. 179-186, 2009
20. Chýlková J. a kol.: *Proposal for a mercury isolation procedure using cold vapor method in combination with voltammetric determination using a rotating gold electrode*. Central European Journal of Chemistry, č. 5(2), s. 479-495, 2007
21. Tomášková M. a kol.: *Voltametric Determination of Different Antioxidants in Petroleum Products by Working Gold Electrode*. International Journal of Electrochemical Science, č. 8, s. 1664-1677, 2013
22. Chýlková J. a kol.: *Voltammetric Determination of BHT Antioxidant at Gold Electrode in Biodiesel*. Electroanalysis, č. 24, s. 1374-1379, 2012
23. Barek J.: *Perspektivy elektroanalytických metod*. Ve skriptech Barek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 3-14, 2006
24. Wang J. et al.: *Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry*. Analytical Chemistry, č. 70, s. 3218-3222, 2000
25. Pauliukaitė R. et al.: *Characterization and Applications of a Bismuth Bulk Electrode*. Electroanalysis, č. 9, s. 719-723, 2004
26. Królicka A et al.: *Bismuth-film-plated carbon paste electrodes*. Electrochemistry Communications, č. 4, s. 193-196, 2002
27. Vyskočil V. a kol.: *Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů*. Chemické Listy, č. 104, s. 1181-1195, 2010
28. Švancara I., Vytřas K.: *Elektrolýza s bismutovými elektrodami*. Chemické Listy, č. 100, s. 90-113, 2006
29. Švancara I.: *Bismutové elektrody v elektroanalýze*. Ve skriptech Barek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 59-68, 2006
30. Economou A.: *Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis*. Trends in Analytical Chemistry, č. 24, s. 334-340, 2005
31. Guzsvány V. et al.: *Bismuth Film Electrode for the Cathodic Electrochemical Determination of Thiamethoxam*. Electroanalysis, č. 18, s. 1363-1371, 2006

32. Novotný L., Yosypchuk B.: *Pevné stříbrné amalgamové elektrody*. Chemické Listy, č. 94, s. 1118-1120, 2000
33. Yosypchuk B., Barek J.: *Vlastnosti pevných a pastových amalgamových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti*. Chemické Listy, č. 103, s. 284-290, 2009
34. Yosypchuk B.: *Pevné amalgamové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin*. Ve skriptech Barek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 15-31, 2006
35. Yosypchuk B., Šestáková I.: *Working Electrodes from Amalgam Paste for Electrochemical Measurements*. Electroanalysis, č. 20, s. 426-433, 2008
36. Daňhel A. a kol.: *Crystalline silver amalgam – a novel electrode material*. Analyst, č. 136, s. 3656-3662, 2011
37. Fischer J. a kol.: *Investigation of Voltammetric Behaviour of Insecticide Chlorpyrifos on a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode*. Electrochimica Acta, č. 216, s. 510-516, 2016
38. Yosypchuk B., Novotný L.: *Voltammetrické stanovení Cu, Pb, Cd, Zn a Tl pomocí stříbrné pevné amalgamové elektrody*. Chemické Listy, č. 96, s. 756-760, 2002
39. Yosypchuk B., Novotný L.: *Determination of Iodates Using Silver Solid Amalgam Electrodes*. Electroanalysis, č. 14, s. 1138-1142, 2002
40. Baš B. et al.: *Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>*. Talanta, č. 84, s. 1032-1037, 2011
41. Barek J. a kol.: *Voltammetric Determination of N,N-Dimethyl-4-aminocarboxyazobenzene at a Silver Solid Amalgam Electrode*. Electroanalysis, č. 15, s. 1778-1781, 2003
42. Bandžuchová L. a kol.: *Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode*. Electrochimica Acta, č. 56, s. 2411-2419, 2011
43. Fadrná R. a kol.: *Use of Polished and Mercury Film-Modified Silver Solid Amalgam Electrodes in Electrochemical Analysis of DNA*. Electroanalysis, č. 17, s. 452-459, 2005
44. Daňhel A. a kol.: *Electrochemical behaviour of 2,4-dinitrophenylhydrazine as multi-redox centre DNA label at mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode*. Electrochimica Acta, č. 126, s. 122-131, 2014
45. Yosypchuk B., Novotný L.: *Cathodic stripping voltammetry of cysteine using silver and copper solid amalgam electrodes*. Talanta, č. 56, s. 971-976, 2002
46. Šelešovská-Fadrná R. a kol.: *Brdička-type processes of cysteine and cysteine-containing peptides on silver amalgam electrodes*. Analytica Chimica Acta, č. 582, s. 344-352, 2007

47. Švancara I.: *Senzory na bázi uhlíkové pasty*. Ve skriptech: *Senzory*. Vysoká škola chemicko-technologická, s. 67-78, Praha, ISBN 978-80-86238-20-3, 2007
48. Adams R. N.: *Carbon Paste Electrodes*. *Analytical Chemistry*, č. 30, s. 1576 – 1576, 1958
49. Kalcher K., et al.: *Sensors Based on Carbon Paste in Electrochemical Analysis: A Review with Particular Emphasis on the Period 1990-1993*. *Electroanalysis*, č. 7, s. 5-22, 1995
50. Švancara I.: *Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami*. Ve skriptech Barek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 49-58, 2006
51. Švancara I. a kol.: *Carbon paste electrode in modern elektroanalysis*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, č. 31, s. 311-345, 2001
52. Wang Z. et al.: *Electrochemical detection of trace cadmium in soil using a Nafion/stannum film-modified molecular wire carbon paste electrodes*. *Ionics*, č. 19, s. 1687-1693, 2013
53. Švancara I.: *Testing of unmodified carbon paste electrodes*. *Chemické Listy*, č. 93, s. 490-499, 1999
54. Kalcher K.: *Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis*. *Electroanalysis*, č. 2, s. 419-433, 1990
55. Navrátil T.: *Kompozitní elektrody*. Ve skriptech Barek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 113-118, 2006
56. Libánský M. a kol.: *Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou*. *Chemické Listy*, č. 107, s. 247-252, 2013
57. Chýlková J. a kol.: *Proposal for a mercury isolation procedure using cold vapor method in combination with voltammetric determination using a rotating gold electrode*. *Central European Journal of Chemistry*, č. 5, s. 479-495, 2007
58. Šebková S.: *Voltametrické stanovení alizarinové chromové černi PT s využitím kompozitních elektrod*. *Chemické Listy*, č. 100, s. 449-454, 2006
59. Navrátil T.: *Kompozitní elektrody*. Ve skriptech: *Senzory*. Vysoká škola chemicko-technologická, s. 53-60, Praha, ISBN 978-80-86238-20-3, 2007
60. Serra B. et al.: *Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor*. *Analytical Biochemistry*, č. 336, s. 289-294, 2005
61. Zhu L. et al.: *Electrochemiluminescent determination of glucose with a sol-gel derived ceramic-carbon composite electrode as a renewable optical fiber biosensor*. *Sensors and Actuators B*, č. 84, s. 265-270, 2002

62. Shankaran D. R. et al.: *Sol-gel derived metal dispersed ceramic-graphite composite electrode for amperometric determination of dopamine*. *Analytica Chimica Acta*, č. 478, s. 321-327, 2003
63. Navrátil T., Kopanica M.: *Analytical Application of Silver Composite Electrode*. *Review in Analytical Chemistry*, č. 33, s. 153-166, 2002
64. Navrátil T., Berek J.: *Analytical Application of Composite Solid Electrode*. *Critical Review in Analytical Chemistry*, č. 39, s. 131-147, 2009
65. Šebková S.: *Stanovení chloridů na stříbrných kompozitních elektrodách*. *Chemické Listy*, č. 97, s. 201-205, 2003
66. Navrátil T. a kol.: *Anodic Stripping Voltammetry for Arsenic Determination on Composite Gold Electrode*. *Chemical Analysis (Warsaw)*, č. 48, s. 265, 2003
67. Iwaki M. et al.: *Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, č. 209, s. 1129-1133, 1983
68. Swain G.M., Ramesham R.: *The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline thin-film electrodes*. *Analytical Chemistry*, č. 65, s. 345-351 1993
69. Berek J.: *Diamantové pracovní elektrody*. Ve skriptech Berek J.: *Možnosti inovací v elektrochemické chemii*. Praha, s. 119-124, 2006
70. Yosypchuk O. a kol.: *Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě*. *Chemické Listy*, č. 104, s. 186-190, 2010
71. Pecková K. a kol.: *Boron-Doped Diamond Film Electrodes-New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, č. 39, s. 148-172, 2009
72. Musilová J. a kol.: *Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek*. *Chemické Listy*, č. 103, s. 469-478, 2009
73. Yang W. S. et al.: *DNA-modified nanocrystalline diamond thin-film as stable, biologically active substrates*. *Nature Materials*, č. 1, s. 253-257, 2002
74. Troupe C. E. et al.: *Diamond-based glucose sensors*. *Diamond and Related Materials*, č. 7, s. 575-580, 1998
75. Huang L. C. L., Chang H. C.: *Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds*. *Langmuir*, č. 20, s. 5879-5884, 2004
76. Zavazalová J. a kol.: *Boron Doped Diamond Electrodes in Voltammetry: New Designs and Applications. An Overview*. *Sensing in Electroanalysis, Pardubice*, č. 8, s. 21-34, 2013/2014

77. Ando T. et al.: *Vapour-phase Oxidation of Diamond Surface in O<sub>2</sub> studied by Diffuse Reflectance Fourier-transform Infrared and Temperature-programmed Desorption Spectroscopy*. J. Chem. Soc. Faraday Trans, č. 89, s. 3635-3640, 1993
78. Pleskov Yu. V.: *Electrochemistry of Diamond: A Review*. Russian Journal of Electrochemistry, č. 38, s. 1275-1291, 2002
79. Suffredini H. B. et al.: *Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment*. Electrochimica Acta, č. 49, s. 4021-4026, 2004
80. Vlčková Živcová Z. a kol.: *Electrochemistry and in situ Raman spectroelectrochemistry of low and high quality boron doped diamond layers in aqueous electrolyte solution*. Electrochimica Acta, č. 87, s. 518-525, 2013
81. Fischer A. E. et al.: *Electrochemical Performance of Diamond Thin-Film Electrodes from Different Commercial Sources*. Analytical Chemistry, č. 76, s. 2553-2560, 2004
82. Girard H. et al.: *Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes*. Diamond and Related Materials, č. 16, s. 316-325, 2007
83. Ferreira N. G. et al.: *Kinetic study diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems*. Diamond and Related Materials, č. 11, s. 1523-1531, 2002
84. Šelešovská R. et al.: *Surface and electrochemical characterization of boron-doped diamond electrodes prepared under different conditions*. Monatsh Chem, č. 147, s. 1353-1364, 2016
85. Vosáhlová J.: *Borem dopované diamantové elektrody: Využití pro stanovení redukovatelných organických látek*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, s. 79, 2015
86. Salazar-Banda G. R. et al.: *Ultramicroelectrode array behavior of electrochemically partially blocked boron-doped diamond surface*. Journal of the Brazilian Chemical Society, č. 24, 2013, ISSN 0103-5053
87. Hutton L. A. et al.: *Examination of the Factors Affecting the Electrochemical Performance of Oxygen-Terminated Polycrystalline Boron-Doped Diamond Electrodes*. Analytical Chemistry, č. 85, s. 7230-7240, 2013
88. Vosáhlová J.: *Vliv koncentrace bóru na elektrochemické vlastnosti bórem dopovaných diamantových elektrod v elektroanalýze*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, s. 47, 2013
89. Joliver J.: *Role of Leucovorin Dosing and Administration Schedule*. European Journal of Cancer, č. 31, s. 1311-1315, 1995

90. Jolivet J. et al.: *The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate*. N. Engl. J. Med., č. 309, s. 1094-1104, 1983
91. Sotos GA et al.: *Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil*. Cancer Treat Rev, č. 20, s. 11-49, 1994
92. Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1272/2008 *o klasifikaci, označování a balení látek a směsí*. Prosinec 2008
93. Bezpečnostní list: *Leucovorin calcium*. Sigma-Aldrich – PHR1541
94. Šelešovská R. a kol.: *Voltammetric determination of leucovorin using silver solid amalgam electrode*. Electrochimica Acta, č. 60, s. 375-383, 2012
95. Voet D., Voetová J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha, ISBN 80-85605-44-9, 1994
96. Bleyer W. A.: *The clinical Pharmacology of Methotrexate*. Cancer, č. 41, s. 36-51, 1978
97. Martínková J. a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Grada, Praha 2007, s. 347, ISBN 978-802-4713-564.
98. Bandžuchová L.: *Elektroanalytické chování folátů a látek souvisejících*. Disertační práce, Univerzita Pardubice, s. 139, 2012
99. Belz S. et al.: *High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid*. Journal of Chromatography B., č. 661, s. 109-118, 1994
100. Mandl A., Lindner W.: *Improved detection of leucovorin in mixed folates and antifolates by reversed-phase liquid chromatography and on-line post-column UV irradiation*. Chromatographia, č. 43, s. 327-330, 1996
101. Schleyer E. et al.: *Highly sensitive coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantitation of the diastereomers of leucovorin and 5-methyltetrahydrofolate in serum and urine*. J. Chromatogr B. Biomed Appl, č. 669, s. 319-330, 1995
102. Espinosa-Mansilla A. et al.: *Selection of the wavelength range and spectrophotometric determination of leucovorin and methotrexate in human serum by a net analyte signal based method*. Talanta, č. 58, s. 255-263, 2002
103. Merás I. D. et al.: *Kinetic fluorimetric study of the oxidation reaction of folinic acid (leucovorin) with potassium permanganate. Determination in human urine*. Talanta, č. 55, s. 623-630, 2001
104. Shibukawa A. et al.: *Simultaneous chiral separation of leucovorin and its major metabolite 5-methyl-tetrahydrofolate by capillary electrophoresis using cyclodextrins as*

- chiral selectors: Estimation of the formation constant and mobility of the solute-cyclodextrin complexes. Chromatographia, č. 35, s. 419-429, 1993*
105. Stejskal D., Heyrovský M.: *Vyvinutí metod vyšetření metabolismu kyseliny listové pomocí polarografické analýzy. Závěrečná zpráva projektu (reg. č.: 1544-2). Všeobecná Fakultní Nemocnice, Praha 2, 1993-1994.*
106. Deshpande A. G. S.: *Development of Micro Analytical Devices. Dissertation, University of Cambridge, s. 252, 2009*
107. Nicholson R. S.: *Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. Analytical Chemistry, č. 37, s. 1351-1355, 1965*
108. Chen P., McCreery R.L.: *Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes by Specific Surface Modification. Analytical Chemistry, č. 68, s. 3958-3965, 1996*
109. Gerhardt G., Adams R. N.: *Determination of Diffusion Coefficients by Flow Injection Analysis. Analytical Chemistry, č. 54, s. 2618-2620, 1982*
110. Kovach P. M. et al.: *Electrochemistry at Partially Blocked Carbon-Fiber Microcylinder Electrodes. The Journal of Physical Chemistry, č. 90, s. 4612-4617, 1986*