

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a analytická toxikologie

Studijní obor: Klinická a analytická toxikologie



Dominika Giampaglia

Vliv pulzní amperometrické detekce na pasivaci pracovní elektrody

Influence of the pulsed amperometric detection on the passivation of working electrode

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problémem pasivace elektrody a otázkou, jak je pasivace ovlivněná využitím pulzních amperometrických metod. Látka sulfamethizol, jež je sulfonamidové antibiotikum působící mimo jiné proti infekcím močových cest, byla vybrána s ohledem na známou vysokou míru pasivace elektrod.

Ke sledování pasivace byla nejprve použita cyklická voltametrie, která sloužila především jako ukazatel chování sulfamethizolu při určitém pH. Bylo změřeno 15 po sobě jdoucích měření roztoku sulfamethizolu bez leštění elektrody na alumině při pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12, které potvrdily, že k pasivaci dochází.

Dále byly použity tři druhy pulzních amperometrických metod, při kterých byl roztok sulfamethizolu změřen při pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12 a bylo sledováno, zda se pasivace nesníží. Ve všech pH byla také proměřena klasická amperometrie, která sloužila jako srovnávací.

Během měření těchto tří pulzních amperometrických metod bylo zjištěno, že pulzní metody obecně dosahují nižší pasivace než klasická amperometrie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí pulzní amperometrické metody, při které byl na elektrodu vkládán měřící potenciál o velikosti 1,3 V, který byl střídán s nulový potenciálem. Touto metodou byla změřena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mez detekce vyšla $5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Abstract

This bachelor thesis deals with the problem of electrode passivation and the question of how passivation is influenced by using of pulsed amperometric methods. Sulfamethizole, which is a sulfonamide antibiotic acting against urinary tract infections, has been selected given to the known high electrode passivation rate.

Cyclic voltammetry was the first technique used to monitor the passivation; it served primarily as an indicator of the behavior of sulfamethizole at a certain pH. Without polishing the electrode on alumina, 15 consecutive measurements of sulfamethizole solution were measured at pH 2, 4, 6, 8, 10 and 12 to confirm that passivation occurs.

In addition, three types of pulsed amperometric methods were used in which the sulfamethizole solution was measured at pH 2, 4, 6, 8, 10 and 12 and it was monitored whether the passivation was reduced. Classical amperometry was also used as a reference.

During the measurement of these three pulsed amperometric methods it was found that pulse methods generally show lower passivation than classical amperometry. The best results were achieved by means of a pulsed amperometric method, in which a measuring potential of 1,3 V was applied on the electrode, alternating with zero potential. With this method, the calibration dependence was measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ to $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The limit of detection was $5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ and the limit of determination was $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Klíčová slova

sulfamethizol

sulfonamidy

průtoková injekční analýza

pulzní amperometrická detekce

pasivace elektrody

Key words

sulfamethizole

sulfonamides

flow injection analysis

pulsed amperometric detection

electrode passivation

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou ČR, projekt č. 17-03868S.

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odbornou pomoc, věcné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Dmytro Bavalovi za konzultaci během měření. Také děkuji své rodině a příteli za umožnění studia a podporu během studia.

Obsah

1. Cíl práce	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Sulfamethizol	10
2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti sulfamethizolu	10
2.1.2 Sulfonamidy	11
2.1.3 Metody stanovení sulfamethizolu	12
2.2 Použité metody.....	13
2.2.1 Průtoková injekční analýza.....	13
2.2.2 Pulzní amperometrická detekce	13
3. Experimentální část	15
3.1 Použité chemikálie	15
3.2 Použitá aparatura	15
3.3 Další použité přístroje.....	16
3.4 Příprava chemikálií.....	16
3.4.1 Příprava zásobního roztoku	16
3.4.2 Příprava Brittonova – Robinsonova pufru (B-R).....	16
3.5 Podmínky měření	17
4. Výsledky a diskuze	18
4.1 Voltametrické měření	18
4.1.1 Vliv pH základního elektrolytu na chování sulfamethizolu	18
4.1.2 Pasivace elektrody.....	19
4.2 Amperometrické měření	22
4.2.1 Amperometrické metody	22
4.2.2 Vliv doby vkládaného potenciálu na elektrodu na pasivaci	26
4.2.3 Asymetrie pulzů	29
4.3 Kalibrační závislost	31
5. Závěr	33
6. Literatura.....	34

Seznam zkratek

pH	Vodíkový exponent (potential of hydrogen)
PABA	Para-aminobenzoová kyselina
PAD	Pulzní amperometrická detekce (pulsed amperometric detection)
MPA	Multi-pulzní amperometrie
FIA	Průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
UV	Ultrafialová detekce
DPV	Diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography-mass spectrometry)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
B-R pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
<i>E</i>	Redoxní potenciál [V]
<i>I</i>	Elektrický proud [A]
<i>t</i>	Čas [s]
<i>c</i>	Molární koncentrace [mol·l ⁻¹]
RSD	Relativní směrodatná odchylka
R ²	Koeficient determinace

1 Cíl práce

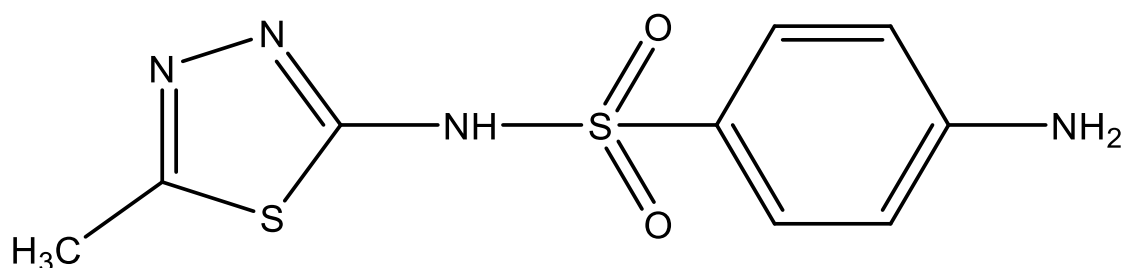
Tato bakalářská práce se věnuje zkoumání vlivu parametrů pulzní amperometrie na pasivaci pracovní elektrody analytem. Jejím cílem je prozkoumat různé programy vkládání pulzů

a parametry pulzu samotného a sledovat přitom zejména relativní pokles výšky píku analytu. Výsledky budou porovnávány s hodnotami získanými pomocí cyklické voltametrie a klasické amperometrie s fixním detekčním potenciálem. Jako testovací analyt je použitý sulfamethizol, který je známý tím, že jeho oxidace má silné pasivační účinky.

2 Teoretická část

2.1 Sulfamethizol

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₉H₁₀N₄O₂S₂

Systematický název: 4-amino-*N*-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzenesulfonamid

CAS číslo: 144-82-1 [1]

2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti sulfamethizolu

Jedná se o bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů.[2] Molekulární hmotnost sulfamethizolu je 270,325 g·mol⁻¹. Teplota tání je 208 °C. Jeden gram sulfamethizolu je rozpustný při pH 7.5 v 5 ml vody, při pH 6.5 ve 4000 ml vody, 40 g methanolu, 30 g ethanolu, 10 g acetonu, 1370 g etheru, 2800 g chloroformu a je prakticky nerozpustný v benzenu. Rozdělovací koeficient oktanol/voda má hodnotu 0,54.[1]

2.1.2 Sulfonamidy

Sulfamethizol je jedním ze sulfonamidových antibiotik. Sulfonamidy jsou syntetická bakteriostatická antibiotika, která působí proti většině gram-pozitivních organismů a mnoha gram-negativním organismům.[3] Kromě sulfamethizolu patří mezi sulfonamidová antibiotika také sulfacetamid, sulfadiazin, sulfadoxin, sulfamethoxazol a další.

Tyto antibiotické látky se obvykle používají k léčbě bakteriálních infekcí močových cest a trávicího systému. Lze je využít i při léčbě popálenin při lokálním použití a také jako veterinární léčivo. Sulfonamidy mohou mít u člověka i nežádoucí účinky, jako například, nevolnosti, průjemy, zvracení, alergické kožní reakce, vznik močových kamenů, hemolytickou anémii a pokles počtu bílých krvinek.

Sulfonamidy jsou strukturními analogy kyseliny para-aminobenzoové (PABA) a proto působí jako kompetitivní antagonisté v mikrobiálních buňkách. Mikroby potřebují PABA, aby vytvořily kyselinu dihydrofolovou, tedy prekurzor kyseliny listové. Kyselina listová je potřeba k tvorbě purinu a pyrimidinu a tedy k syntéze nukleových kyselin.[3]

Historicky prvním průmyslově vyráběným a klinicky aplikovaným sulfonamidovým antibiotikem byl lék zvaný Prontosil. Byl to první lék, který úspěšně léčil bakteriální infekce – předchůdce antibiotik. Za tento objev získal jeho tvůrce Němec Gerhard Domagk v roce 1939 Nobelovu cenu, kterou byl donucen odmítnout.[4]

2.1.3 Metody stanovení sulfamethizolu

Nejběžnější metodou pro stanovení sulfamethizolu, potažmo pro simultánní stanovení více sulfonamidů, je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Stanovení probíhá ve vzorcích krve [5], či sušeném mléce pro kojence [6]. U HPLC je pro stanovování sulfonamidů je nejčastější hmotnostní detekce, pomocí které se stanovuje jejich obsah v různých druzích mas [7], mléku [8], vejcích [9], ale také různých vzorcích kosmetiky [10]. Další možností detekce u vysokoúčinné kapalinové chromatografie je detektor s diodovým polem [11], nebo UV detekce [12].

Další relativně selektivní a citlivou metodou je plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), u které ale nejsou realizovatelné rutinní analýzy reziduí, protože před analýzou tepelně nestálých a netěkavých sulfonamidů je zapotřebí několik kroků čištění.

Pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) lze stanovovat sulfonamidy v mase a ve spodní vodě. Jedná se o separační techniku, jejímiž výhodami jsou rychlé analýzy, vysoké rozlišení, vysoká účinnost, a malá spotřeba vzorku i rozpouštědla ve srovnání s HPLC. [13]

Vzhledem ke struktuře sulfamethizolu je pro jeho stanovení možné použít elektrochemické metody, během nichž lze předpokládat, že bude docházet k rozštěpení molekuly v místech, kde se nachází síra a naváže se místo ní atom kyslíku. Jedná se o možný mechanismus oxidace látek, které mají podobnou strukturu jako sulfamethizol nebo sulfamethoxazol.[14]

Popsána byla stanovení, při kterých byl sulfamethizol stanovován pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV), jejíž výhodou je nenáročnost zpracování vzorků, levnost, rychlost a spolehlivost stanovení, a pomocí které lze stanovovat sulfamethizol ve farmaceutických preparátech [15]. Dále lze ke stanovení sulfamethizolu použít coulometrický detector s obnovitelným pracovním materiálem [16].

2.2 Použité metody

2.2.1 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza je založena na vstřikování kapalného vzorku do pohyblivého nosného proudu vhodného roztoku. Vstřikovaný vzorek tvoří zónu, která je po nástřiku transportována směrem k detektoru, který průběžně zaznamenává absorbanci, potenciál elektrody nebo další fyzikální parametry.

Základní analyzátor pro stanovení analytu pomocí průtokové injekční analýzy se skládá z pumpy, která se používá k pohonu nosného proudu úzkou trubicí, vstřikovacího portu, jehož pomocí je dobře definovaný objem roztoku vzorku vstřikován do nosného proudu a mikroreaktoru, ve kterém vzorek reaguje se složkami nosného proudu, což je poté snímáno průtokovým detektorem a zaznamenáváno.[17]

2.2.2 Pulzní amperometrická detekce

Pulzní amperometrická detekce (PAD) je technika, která je využívána kvůli své vysoké citlivosti a selektivitě a čištění elektrod použitím čistících pulzů. PAD je důležitou detekční technikou pro řadu elektrochemicky aktivních sloučenin a zvláště důležitá je pro analyty, které nelze detekovat ultrafialovou fotometrickou detekcí, jako například organické alifatické sloučeniny a sacharidy. Jiné sloučeniny mají naopak tendenci znečišťovat povrch elektrod, což ztěžuje práci s běžnou amperometrickou detekcí s konstantním potenciálem.

V PAD jsou na elektrodu při konstantním detekčním potenciálu vkládány čistící pulzy. Aplikace čistících pulzů zvyšuje proud pozadí oproti běžné amperometrické detekci s konstantním potenciálem. Je to způsobeno tím, že se elektroda nenechává ekvilibrovat déle než několik set milisekund, než se na ni opět vloží další čistící pulz.[18]

Průtokovou injekční analýzu (FIA) je výhodné kombinovat s metodou selektivní detekce, kterou je multi-pulzní amperometrie (MPA), která je založena na vkládání více měřících pulzů za sebou.[19][20][21][22] Vhodná posloupnost pulzů na pracovní elektrodě umožňuje rozlišení analytů ve směsi bez nezbytnosti její separace, chemické úpravy vzorku, modifikace

elektrody. Tento postup byl použit pro současné stanovení cukrů[23], léčiv[19][21][22], antioxidantů[20][24], či syntetických barviv[25].

Výhodami pulzní amperometrické detekci jsou vysoká citlivost a selektivita a čištění povrchu elektrod během měření pomocí čistících pulzů. Vhodné kombinace potenciálů jednotlivých pulzů mohou umožnit měření analytů, které nelze detekovat ultrafialovou fotometrickou detekcí, jako jsou například organické alifatické sloučeniny a sacharidy. PAD umožňuje on-line pulzní potenciálové čištění a spojení s kapilárními nebo standardními separačními metodami.[18]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

sulfamethizol [4-amino-*N*-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzenesulfonamid (99%, Sigma-Aldrich)]

destilovaná voda (Millipore, USA)

kyselina boritá (min. 99,5%, Lachema, Brno)

kyselina fosforečná (85%, $\rho = 1,71 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Lachner, Neratovice)

kyselina octová (99%, $\rho = 1,06 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Lachner, Neratovice)

hydroxid sodný (8 M, Fluka Analytica, Německo)

3.2 Použitá aparatura

Pro voltametrická měření byla použita aparatura Eco-Tribo Polarograph řízená softwarem PolarPro verze 5.1 (PolaroSensors, Praha). Bylo použito tříelektrodové zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (průměr 3 mm, Metrohm), referentní argentchloridovou elektrodou (Eco-Tribo Polarograph, P 003-05, Česká republika) a s pomocnou platinovou elektrodou (Eco-Tribo Polarograph, R 008-05, Česká republika).

Pro amperometrická měření byla použita pumpa High Pressure pump HPP 5001. Smyčka o objemu 100 μl byla upevněna na dávkovač typu Sample Injector D (ECOM, spol. s.r.o., Česká republika). Jako detektor byl použit Autolab PGSTAT101 řízený softwarem Nova verze 1.11 (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Nizozemsko) v tříelektrodovém zapojení typu wall-jet se stejnou pracovní, referentní i pomocnou elektrodou jako u voltametrického měření.

3.3 Další použité přístroje

pH metr (digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK)
s kombinovanou skleněnou elektrodou

Magnetická míchačka (Microstirrer Magnetic Stirrer, VELP Scientifica, Europe)

Ultrazvuková čistička (PSO2000A, Powersonic, USA)

3.4 Příprava chemikálií

3.4.1 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v destilované vodě za použití ultrazvuku. Pro měření byl použit 10x zředěný roztok, který byl připraven odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku do odměrné baňky a doplněním B-R pufrem o požadovaném pH.

3.4.2 Příprava Brittonova – Robinsonova pufru (B-R)

Pro přípravu B-R pufru byla potřeba kyselá a zásaditá složka. Kyselá složka pufru byla připravena odpipetováním potřebného množství kyseliny borité, kyseliny *o*-fosforečné a kyseliny octové, aby jejich výsledná koncentrace byla $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a doplněním destilovanou vodou v odměrné baňce po rysku. Zásaditá složka pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla připravena odměřením potřebného množství roztoku hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytica, Německo) a doplněním destilovanou vodou na výsledný objem. Pufr byl připraven titrováním kyselé složky pufru roztokem hydroxidu sodného na potřebné pH.

3.5 Podmínky měření

Pomocí cyklické voltametrie a pulzní amperometrické detekce bylo sledováno elektrochemické chování sulfamethizolu.

Cyklická voltametrie byla měřena rychlostí skenu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Bylo měřeno v rozsahu potenciálů od -200 mV do konce potenciálového okna.

U každé z metod PAD byl měřen roztok sulfamethizolu o koncentraci $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bylo použito různých pH u nosných roztoků, konkrétně pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12. U každého pH byla vybrána řada potenciálů, konkrétně od $0,8\text{V}$ do $1,5\text{V}$ po jedné desetíně. Tato řada se lišila u pH 10 a 12. U pH 10 byly nastaveny potenciály od $0,6\text{V}$ do $1,3\text{V}$ a u pH 12 byly nastaveny potenciály od $0,5 \text{ V}$ do $1,2 \text{ V}$. Bylo tak učiněno kvůli posunutému potenciálovému oknu. Byla použita smyčka o objemu $100 \mu\text{l}$ a průtok na pumpě byl nastaven na $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Doba vkládání potenciálů na elektrodu byla 100 ms , není-li uvedeno jinak.

Každé měření bylo provedeno minimálně třikrát. Povrch pracovní elektrody ze skelného uhlíku byl před každým dalším novým měřením vyleštěn na alumině, není-li uvedeno jinak.

4 Výsledky a diskuze

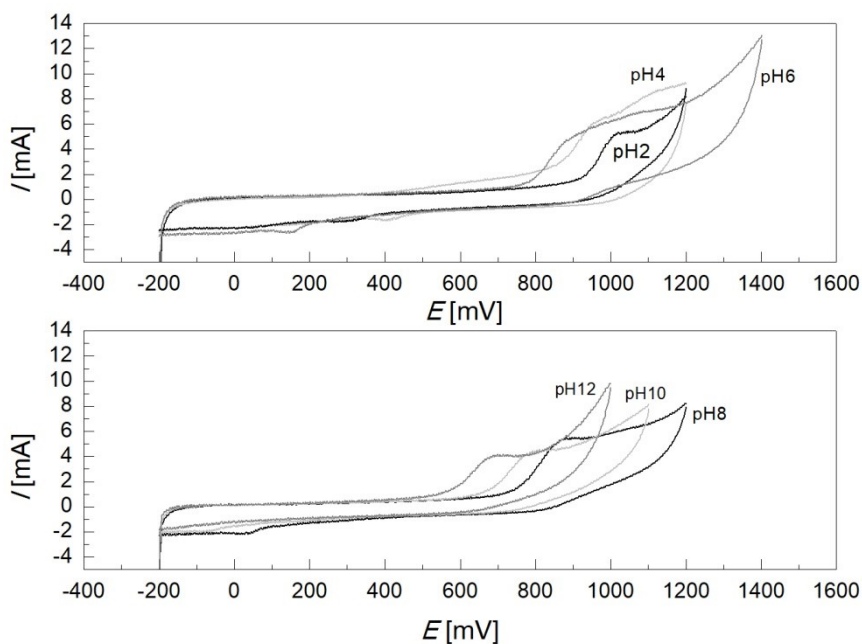
4.1 Voltametrické měření

4.1.1 Vliv pH základního elektrolytu na chování sulfamethizolu

Bylo sledováno chování roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pomocí cyklické voltametrie v prostředí B-R pufru pH 2 až 12 s krokem po dvou jednotkách pH.

V závislosti na zvyšujícím se pH je z Obr. 4.1.1 patrné, že se píky posouvají po potenciálové ose směrem doleva. Z tohoto důvodu byly pozměněny podmínky měření u pH 10 a 12 a to konkrétně zmenšení potenciálového okna. Počáteční potenciál byl u všech pH stejný, -200 mV. Konečný potenciál u pH 10 byl nastaven na 1100 mV a u pH 12 na 1000 mV. Rychlost měření byla nastavena na $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

U pH 4 a 6 je možné sledovat dělení hlavního píku, vzniká zde meziprodukt, protože dochází k protonizaci sulfamethizolu. Výška píku zůstává prakticky konstantní v celém rozsahu pH.



Obr. 4.1.1 Cyklické voltamogramy sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro rozmezí pH 2 až 12. Měřeno na elektrodě ze skelného uhlíku.

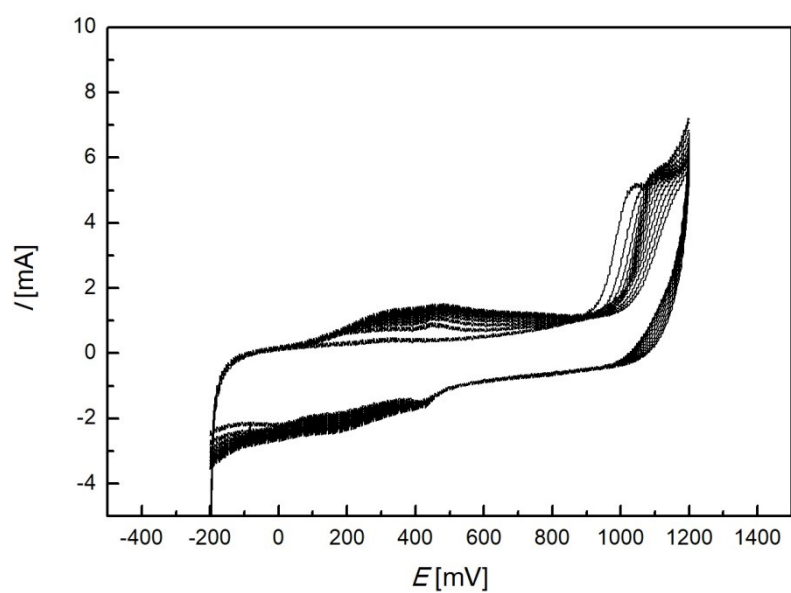
4.1.2 Pasivace elektrody

Pro určení opakovatelnosti měření byly změřeny série 10 měření při pH 2, 6 a 12 roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mezi každým dílčím měřením u každého z pH byla elektroda ze skelného uhlíku vyleštěna na alumině, aby se obnovil povrch elektrody. Cyklický voltamogram tohoto měření je na Obr. 4.1.5.

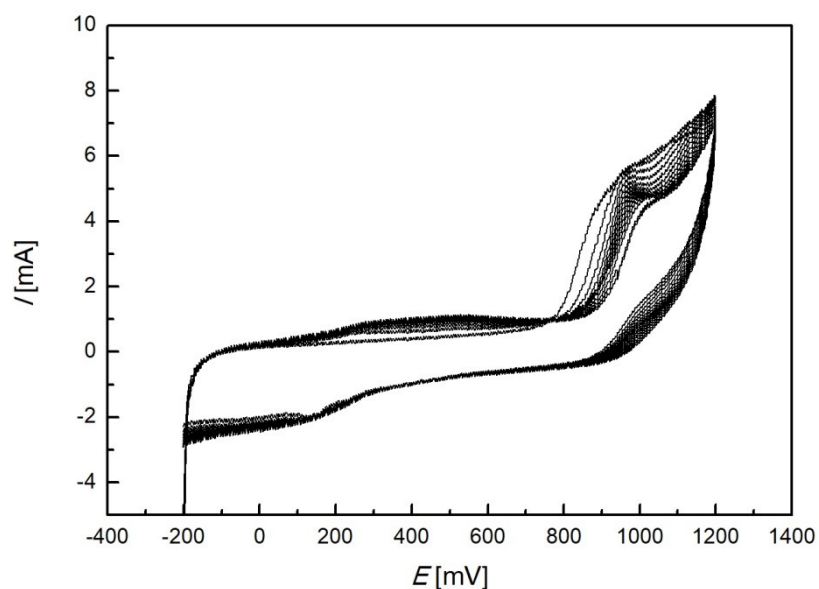
Pasivace elektrody ze skelného uhlíku byla rovněž sledována při pH 2, 6 a 12 základního elektrolytu. Bylo provedeno 15 za sebou jdoucích měření bez čištění elektrody. Byl opět použit roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mezi jednotlivými měřeními byl roztok 10 s míchán a poté byl ještě 5 s před měřením nechán v klidu, aby byl dostatečně zajištěn transport analytu k povrchu elektrody. Cyklické voltamogramy těchto měření jsou na Obr. 4.1.2 pro pH 2, na Obr. 4.1.3 pro pH 6 a na Obr. 4.1.4 pro pH 12.

Proudová odezva v závislosti na zvyšujícím se počtu měření nejprve strmě klesala, ale zhruba u devátého měření se začala proudová odezva ustavovat a další pokles byl mírnější. U pH 2, 6 i 12 docházelo k posunu píku vpravo a relativní pokles píku byl zhruba 20-25 %.

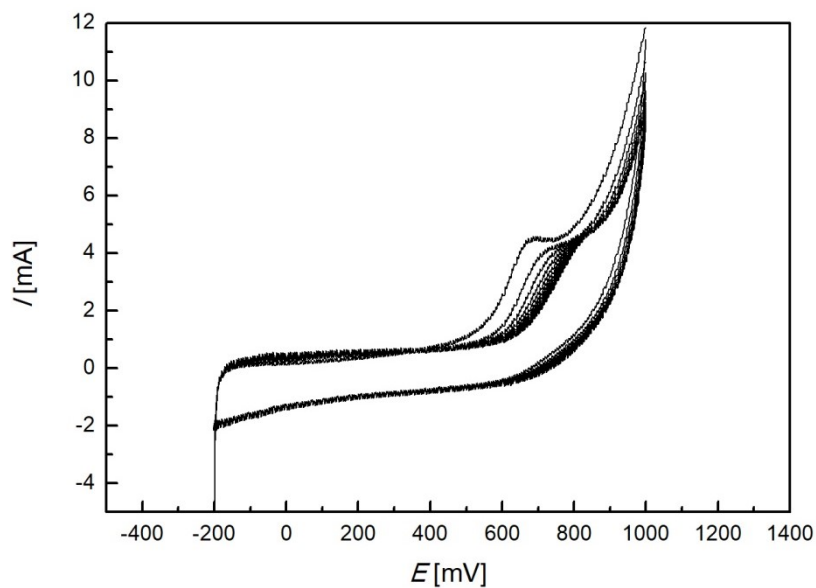
Posledním měřením za použití cyklické voltametrie byl pokus, zda by se leštění elektrody na alumině nedalo nahradit ponořením a zamícháním pasivované elektrody v kádince s acetonem, ve kterém se sulfamethizol dobře rozpouští. Během měření za pomoci acetonu však k pasivaci docházelo. Byla vyzkoušena i jiná doba ponoření a míchání s elektrodou v acetonu v rozmezí od 13 s do 60 s, která ale nepřinesla jiný výsledek. K pasivaci docházelo bez ohledu na dobu ponoření elektrody v acetonu. Cyklický voltamogram vlivu ponoření a zamíchání elektrodou v kádince s acetonem je na Obr. 4.1.5. U pokusu s acetonem docházelo k ustálení pasivace, ale k tomu docházelo i při měření 15 cyklů bez použití aluminy.



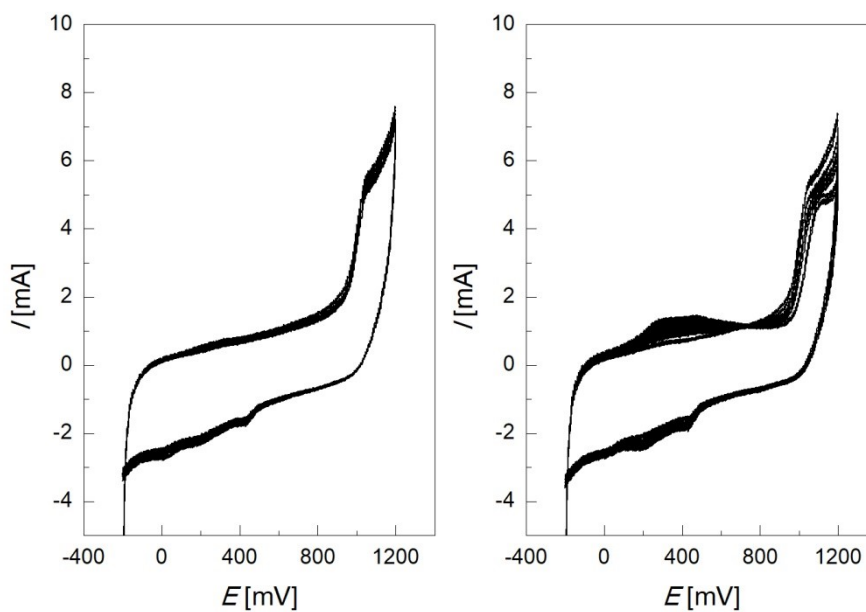
Obr. 4.1.2 Cyklický voltamogram sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí B-R pufru pH 2. Bez leštění elektrody na alumině, 15 po sobě jdoucích cyklů.



Obr. 4.1.3 Cyklický voltamogram sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí B-R pufru pH 6. Bez leštění elektrody na alumině, 15 po sobě jdoucích cyklů.



Obr. 4.1.4 Cyklický voltamogram sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí B-R pufru pH 12. Bez leštění elektrody na alumině, 15 po sobě jdoucích cyklů.



Obr. 4.1.5 Cyklické voltamogramy sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí B-R pufru pH 6. Obrázek vlevo znázorňuje měření s elektrodou leštěnou před každým měřením na alumině. Obrázek vpravo znázorňuje měření s elektrodou ponořenou do acetonu před každým měřením.

4.2 Amperometrické měření

4.2.1 Amperometrické metody

Pomocí průtokové injekční analýzy s různými metodami amperometrické detekce byla sledována pasivace elektrody ze skelného uhlíku při měření roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a bylo sledováno, jaký bude vliv použité metody na míru pasivace. Bylo měřeno v prostředí o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12 a prováděno 10 opakovaných nástřiků.

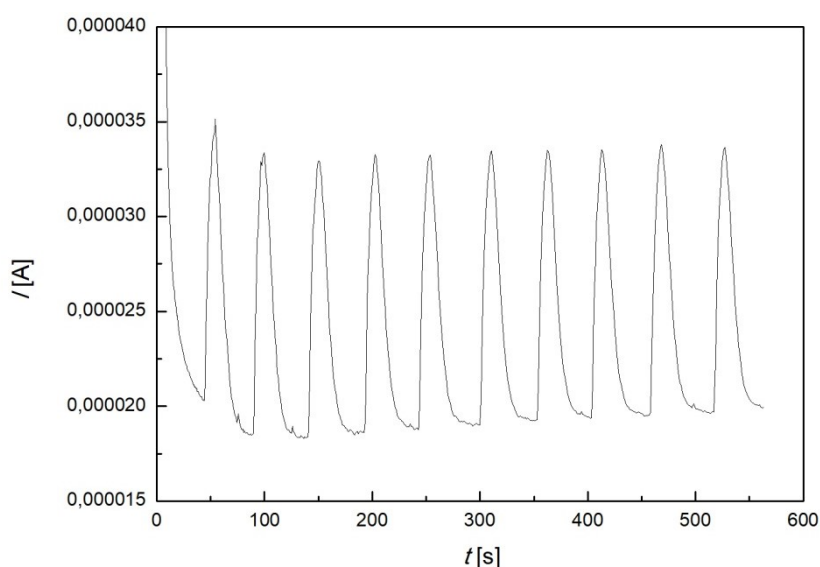
Používaná amperometrická detekce zahrnovala čtyři metody. Jednalo se o metodu „Hradby“, kdy se vždy nastavený měřicí potenciál střídal s nulovým potenciálem na elektrodě, další metodou byly „Schody“, kdy bylo vloženo na elektrodu několik po sobě jdoucích měřících potenciálů, které se neprokládaly nulovou hodnotou a poslední metodou byly „Mrakodrapy“, u kterých se několik stejných po sobě jdoucích měřících potenciálů jako u předchozí metody prokládaly nulovou hodnotou potenciálu vždy po každém potenciálu zvlášť. Čtvrtou metodou byla klasická amperometrie, pro kterou byl konkrétní vhodný potenciál pro měření při určitém pH vybrán po vynesení hydrodynamických voltamogramů z metod Hradby, Schody a Mrakodrapy. U pH 2, 4, 6 a 8 byl zvolen potenciál 1,3V, u pH 10 byl zvolen potenciál 1,2V a u pH 12 potenciál o velikosti 1,1V. Délka pulzu u všech čtyř metod byla 100 ms.

Na Obr. 4.2.1 je znázorněn graf metody Hradby v prostředí pH 6. Na Obr. 4.2.2 je graf metody Schody v prostředí pH 6. Obr. 4.2.3 znázorňuje metody Mrakodrapy v prostředí pH 6. Graf klasické amperometrie v prostředí pH 6 je na Obr. 4.2.4. Grafy metod Schody a Mrakodrapy, které byly měřeny s několika různými potenciály, obsahují více než jednu křivku, což je způsobeno tím, že je každá jednotlivá křivka vynášena jen z jednoho potenciálu. Na grafech těchto dvou metod je vidět, že se zvyšujícím se potenciálem roste výška píku i velikost pozadí a u jednotlivých potenciálů je zřejmá pasivace a tudíž i zmenšení píků. Zvyšující se pozadí je způsobeno rozkladem základního elektrolytu. Píky metody Mrakodrapy jsou menší než u metody Hradby a nejsou zcela symetrické, což je způsobeno nižším počtem bodů na pík.

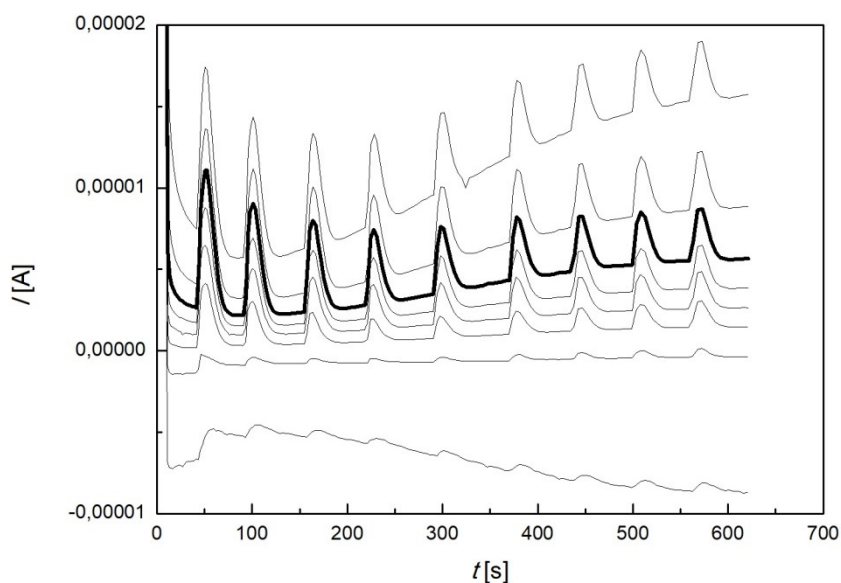
Během měření klasické amperometrie docházelo k výrazně větší pasivaci než u pulzních amperometrických metod. Při porovnání potenciálů o velikosti 1,3 V metod Hradby, Schody a Mrakodrapy z grafů je zřejmé, že k nejmenší pasivaci docházelo během měření metodou Hradby. Z toho vyplývá, že využití pulzních amperometrických metod způsobilo snížení pasivace elektrody.

Z Tab. 4.2.1 lze vyčíst, že u klasické amperometrie se při zvyšujícím se pH snižovala pasivace, ale ne natolik, aby se dalo říci, že nedochází k pasivaci. Výjimkou je pH 12, kde byl naopak poslední pík vyšší než první. Metoda Hradby vykazovala téměř u všech pH nejnižší relativní pokles velikosti píků, což je pravděpodobně způsobeno tím, že byl měřicí potenciál (1,3 V) na elektrodu vkládán pouze po omezenou dobu. U metody Schody docházelo k velké pasivaci, což dokazují i vysoké hodnoty relativního poklesu velikosti píků. U některých pH se hodnota relativního poklesu přibližovala hodnotám u klasické amperometrie. U metody Mrakodrapy byl zaznamenán vyšší relativní pokles než u metod Hradby.

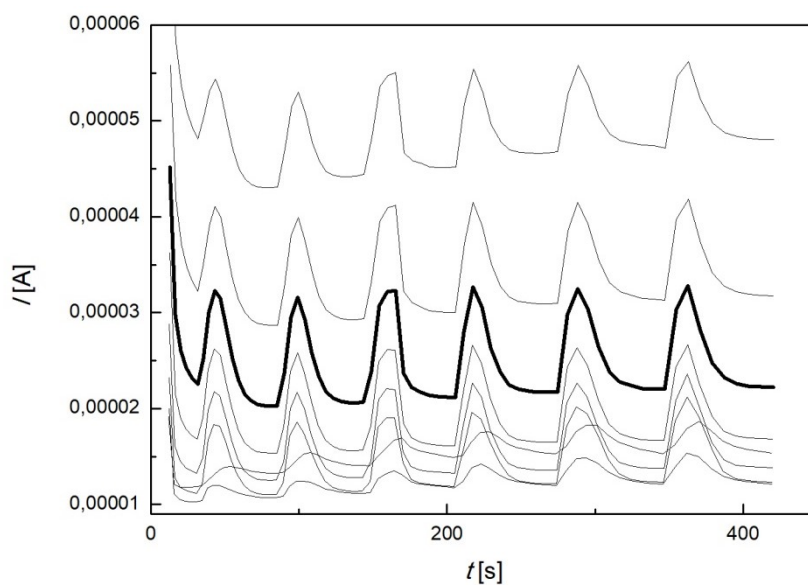
Po proměření všech výše zmíněných pH u všech metod a po prostudování všech naměřených dat a vynesení grafů, byla vybrána k dalšímu měření metoda Hradby a jako optimální pH bylo zvoleno pH 6, při kterém během měření u metody Hradby docházelo téměř k nejmenší pasivaci a u kterého byly píky nejvyšší.



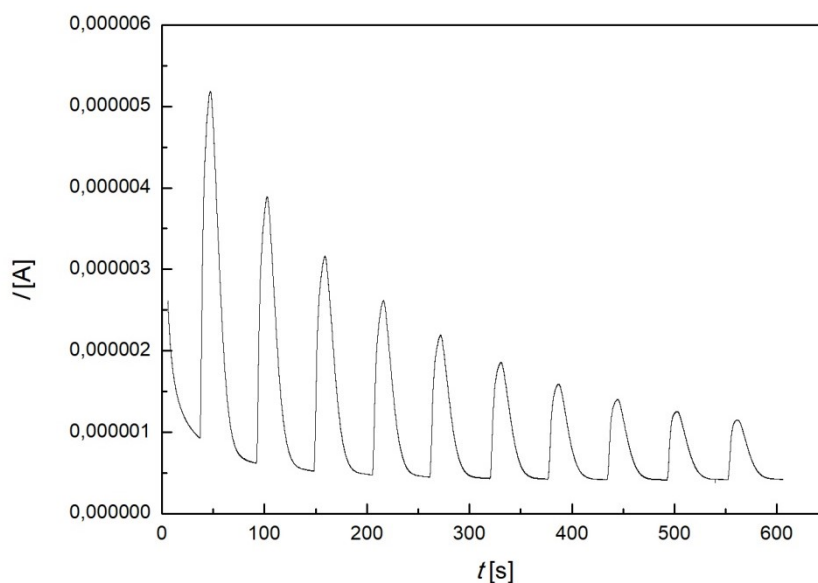
Obr. 4.2.1 Graf měření roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku, velikost měřicího potenciálu 1,3 V. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.



Obr. 4.2.2 Graf měření roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Schody na elektrodě ze skelného uhlíku. Velikost měřících potenciálů je 0,8 V až 1,5 V, které jsou v grafu znázorněny vzestupně. Zvýrazněné píky jsou při $E=1,3 \text{ V}$. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.



Obr. 4.2.3 Graf měření roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Mrakodrapy na elektrodě ze skelného uhlíku. Velikost měřících potenciálů je 0,8 V až 1,5 V, které jsou v grafu znázorněny vzestupně. Zvýrazněné píky jsou při $E=1,3 \text{ V}$. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.



Obr. 4.2.4 Graf měření roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ klasickou amperometrií na elektrodě ze skelného uhlíku, velikost měřícího potenciálu je 1,3 V. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.

Tab. 4.2.1 Hodnoty relativního poklesu a relativní směrodatné odchylky pro metody Hradby, Mrakodrapy, Schody a klasickou amperometrii v prostředí pH 6. Velikost sledovaného potenciálu byla 1,3 V, výjimka byla u pH 10, kde byla velikost sledovaného potenciálu 1,2 V a u pH 12, kde byla velikost sledovaného potenciálu 1,1 V.

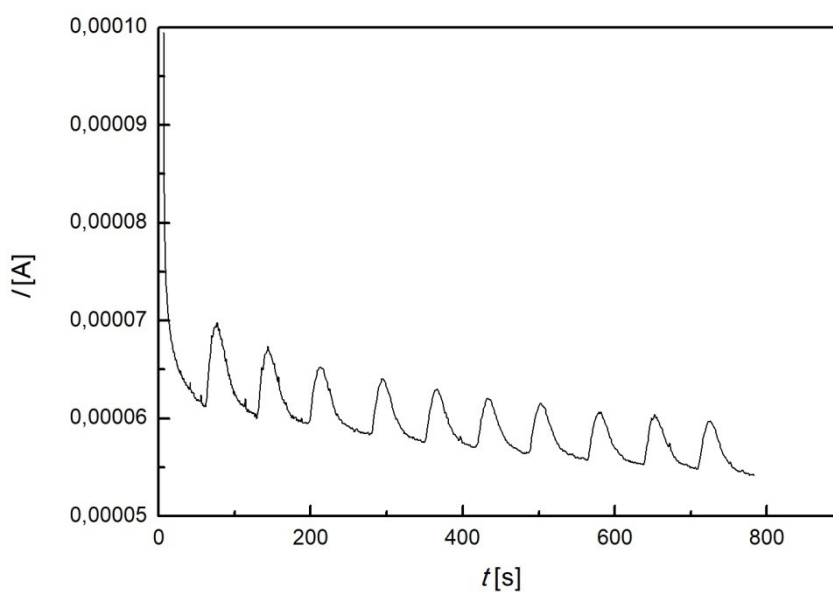
Metody	Hradby		Mrakodrapy		Schody		Klasická amperometrie	
	Relativní pokles %	RSD %	Relativní pokles %	RSD %	Relativní pokles %	RSD %	Relativní pokles %	RSD %
2	7,64	3,48	13,26	5,74	43,70	16,26	93,97	122,37
4	32,73	13,18	28,31	10,57	85,49	5,04	91,14	79,96
6	11,25	4,35	10,71	4,33	59,45	33,95	81,91	59,24
8	7,72	2,80	21,49	3,43	36,78	15,18	65,45	42,08
10	14,73	6,67	28,28	11,73	28,82	10,49	51,37	20,77
12	20,35	7,27	26,46	10,40	28,79	11,51	-12,30	5,31

4.2.2 Vliv doby vkládaného potenciálu na elektrodu na pasivaci

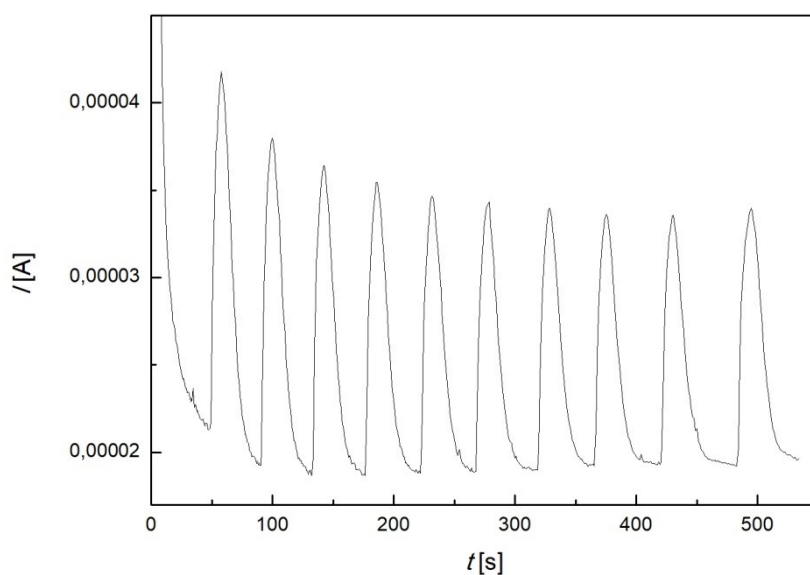
U metody Hradby při pH 6 bylo vyzkoušeno, zda by se pasivace nedala zmenšit změnou nulového potenciálu vkládaného na elektrodu za nenulovou hodnotu. Byly tedy porovnány hodnoty výšek píků u měření, kdy byl nastaven nulový potenciál, který se střídal s potenciálem o velikosti 1,3 V s hodnotami u měření, kdy byl nulový potenciál zaměněn za 0,4 V a 0,8 V. Pasivace se ale zvětšila, takže jako optimální podmínka zůstal střídající se nulový potenciál s nenulovým potenciálem s hodnotou 1,3V.

Dalším pokusem, jak snížit pasivaci, byla změna doby potenciálů vkládaných na elektrodu. Byla zvolena řada časů, konkrétně 25 ms, 45 ms, 60 ms, 150 ms, 300 ms, 450 ms, 600 ms, 750 ms, 900 ms a 1000 ms. Tyto jednotlivé časy znázorňují dobu, po kterou byly stejně dlouhý nulový a nenulový potenciál vkládány na elektrodu. U vysokých časů potenciálů vkládaných na elektrodu byla zaznamenána vyšší pasivace elektrody než u nižších časů.

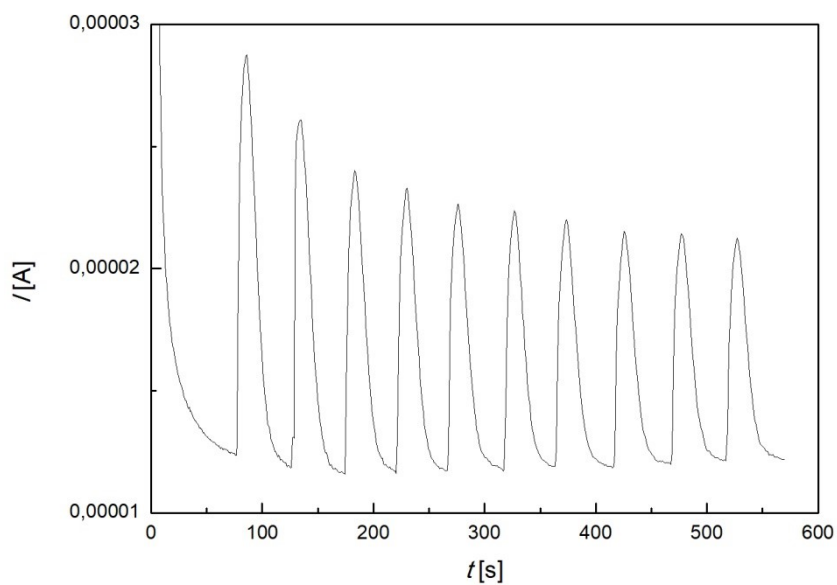
Na Obr. 4.2.5 je zobrazen záznam doby vkládaného potenciálu na elektrodu o velikosti 25 ms, jehož relativní pokles je 40 %. Obr. 4.2.7 zobrazuje dobu 150 ms, při které docházelo k relativnímu poklesu o něco málo vyšší než 40 %. Čas 900 ms, který je zobrazen na Obr. 4.2.8, vykazoval relativní pokles okolo 60 %. Jako optimální doba vkládaného potenciálu na elektrodu byl vybrán čas 60 ms, jehož FIA záznam je zobrazen na Obr. 4.2.6. Relativní pokles velikosti píků je u 60 ms zhruba 30 %.



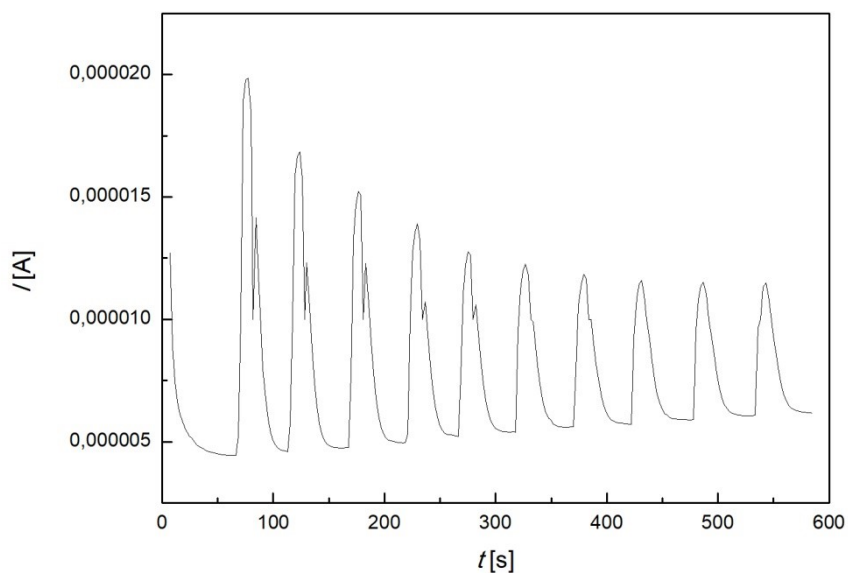
Obr. 4.2.5 Změna doby vkládaných potenciálů ze 100 ms na 25 ms. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.



Obr. 4.2.6 Změna doby vkládaných potenciálů ze 100 ms na 60 ms. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.



Obr. 4.2.7 Změna doby vkládaných potenciálů ze 100 ms na 150 ms. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.

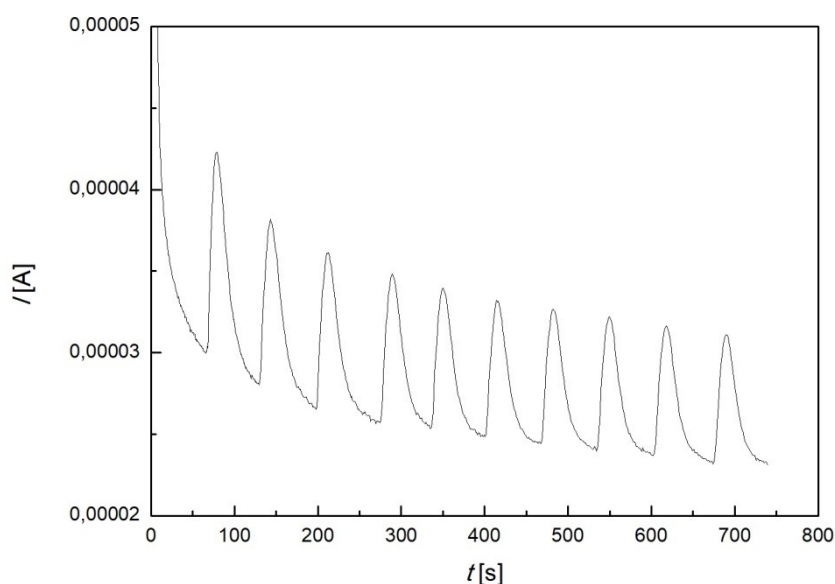


Obr. 4.2.8 Změna doby vkládaných potenciálů ze 100 ms na 900 ms. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Nosný roztok je B-R pufr pH 6.

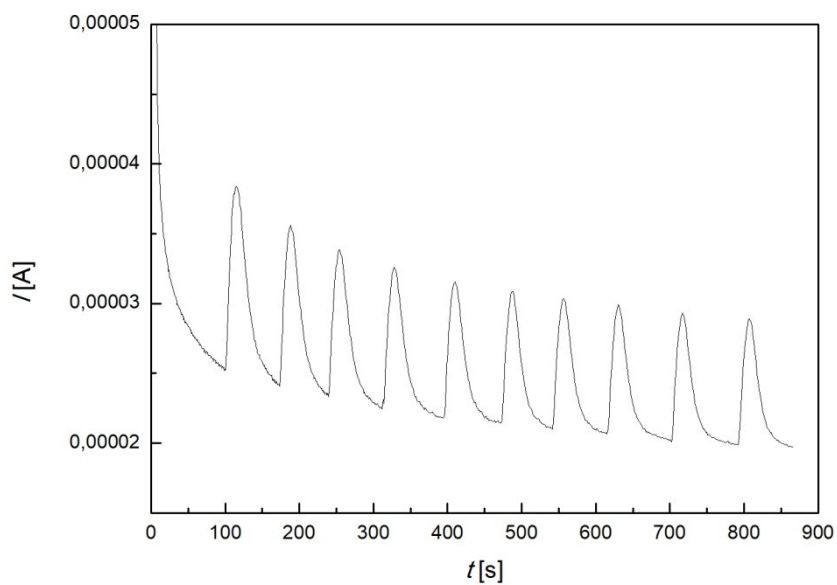
4.2.3 Asymetrie pulzů

Dalším parametrem, jehož vliv na pasivaci byl testován, je změna doby vloženého nulového potenciálu na elektrodu oproti zvolenému potenciálu o velikosti 1,3 V, který byl vkládán na elektrodu po dobu 60 ms u metody Hradby při pH 6. Bylo zvoleno několik vyšších i nižších časů, konkrétně 30 ms, 70 ms, 100 ms, 200 ms a 450 ms. Na Obr. 4.2.9 je zobrazen záznam střídajícího měřicího potenciálu o velikosti 1,3 V, který byl vkládán na elektrodu po dobu 60 ms a nulový potenciál, který byl na elektrodu vkládán po dobu 30 ms. Na Obr. 4.2.10 je zobrazen záznam, kdy byl potenciál o velikosti 1,3 V vkládán na elektrodu po dobu 60 ms a nulový potenciál po dobu 70 ms. Na Obr. 4.2.11 je znázorněn záznam, který byl měřen měřicím potenciálem 1,3 V po dobu 60 ms a nulovým potenciálem po dobu 100 ms.

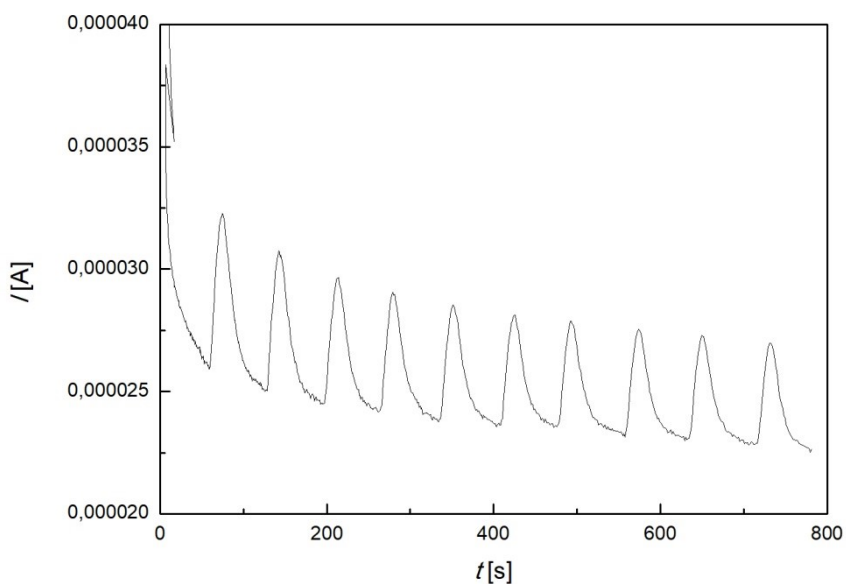
S měnění se dobou vkládaného nulového potenciálu na elektrodu nedocházelo k žádným větším změnám u pasivace. U všech výše zmíněných časů docházelo k relativnímu poklesu velikosti píků okolo 30 %. Změna doby u nulového potenciálu tudíž neměla žádný vliv na pasivaci elektrody.



Obr. 4.2.9 Asymetrie pulzů měřena metodou Hradby. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v nosném roztoku B-R pufru pH 6. Pulz 1,3 V (60 ms)/0 V (30 ms).



Obr. 4.2.10 Asymetrie pulzů měřena metodou Hradby. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v nosném roztoku B-R pufru pH 6. Pulz 1,3 V (60 ms)/0 V (70 ms).

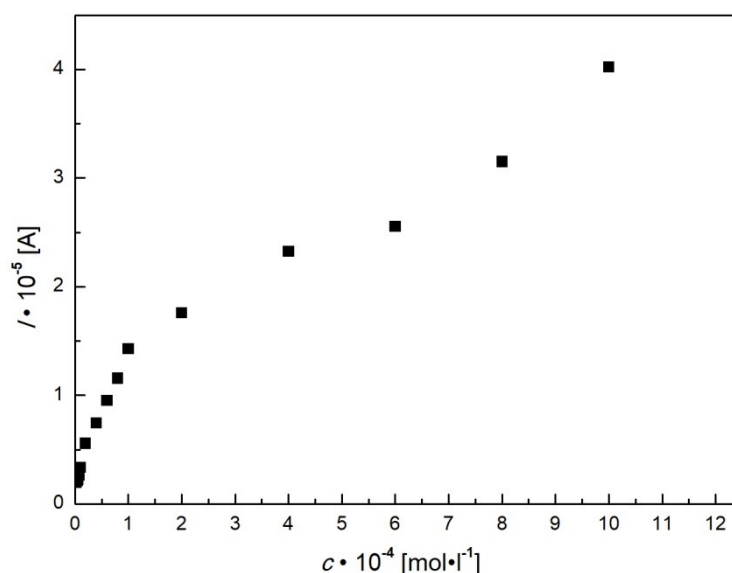


Obr. 4.2.11 Asymetrie pulzů měřena metodou Hradby. Měřen byl roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v nosném roztoku B-R pufru pH 6. Pulz 1,3 V (60 ms)/0 V (100 ms).

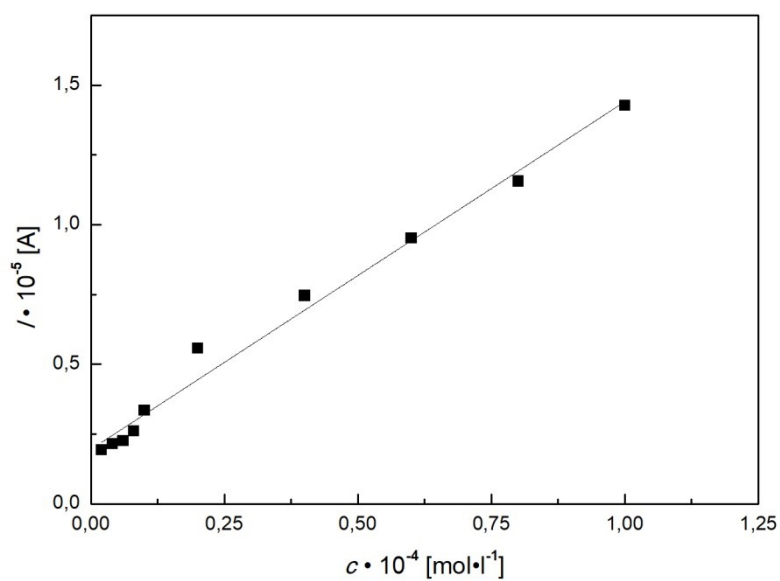
4.3 Kalibrační závislost

Pro ověření využitelnosti pulzní amperometrie byla změřena koncentrační závislost za optimálních podmínek, tj. metoda Hradby s měřícím potenciálem o velikosti 1,3 V, který se střídá po 60 ms s nulovým potenciálem. Nosný roztok měl pH 6. Tyto podmínky byly vybrány z důvodu nejmenší pasivace a největšího signálu. Byly změřeny koncentrace roztoku sulfamethizolu od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, v každém koncentračním řádu bylo změřeno vždy pět hodnot.

Z Obr. 4.3.1 je patrné, že kalibrační závislost není po celé své délce lineární. Lineární je v rozsahu koncentrací $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, tato část závislosti je ukázána na Obr. 4.3.2. Dosažená mez detekce je $5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti je $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky kalibrační závislosti jsou uvedeny v Tab. 4.3.1. Koefficient determinace má hodnotu 0,9877, což není zcela vyhovující hodnota.



Obr. 4.3.1 Kalibrační závislost sulfamethizolu pro koncentrace $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nosný roztok je B-R pufr pH 6. Měřeno metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Pulz 1,3 V (60 ms)/0 V (60 ms).



Obr.4.3.2 Kalibrační závislost sulfamethizolu pro koncentrace $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nosný roztok je B-R pufr pH 6. Měřeno metodou Hradby na elektrodě ze skelného uhlíku. Pulz 1,3 V (60 ms)/0 V (60 ms).

Tab. 4.3.1 Parametry kalibrační závislosti měření sulfamethizolu.

Koncentrační rozmezí [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]	Úsek [A]	R^2
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	0,124	$1,96 \cdot 10^{-6}$	0,9877

5 Závěr

Byla sledována pasivace elektrody ze skelného uhlíku sulfamethizolem pomocí cyklické voltametrie, klasické amperometrie a třech různých metod pulzní amperometrie.

Během měření 15 po sobě jdoucích cyklů cyklickou voltametrií v prostředí pH 2, 6 a 12 bez leštění na alumině docházelo k pasivaci elektrody. Relativní pokles velikosti píků byl u všech tří pH okolo 20-25 %, což je výrazně méně oproti klasické amperometrii, kde relativní pokles přesahoval 50 %. Nižší relativní pokles u cyklické voltametrie oproti klasické amperometrii může být způsoben zpětným skenem, který elektrodu trochu čistil.

Pulzní amperometrické metody povětšinou pasivaci snižovaly v porovnání s cyklickou voltametrií a klasickou amperometrií. Výjimkou je metoda Schody, která vykazovala vyšší relativní pokles píků než cyklická voltametrie. Metody Schody a Mrakodrapy mají tu nevýhodu, že se na elektrodu vkládá více potenciálů po sobě, včetně vyšších potenciálů. Metoda Hradby byla nastavena tak, že se na elektrodu vkládal pouze jen měřicí potenciál, který se střídal s nulovým potenciálem, a tudíž byl na elektrodu vkládán měřicí potenciál po kratší dobu než u dalších dvou pulzních amperometrických metod, což mohlo způsobit menší pasivaci u metody Hradby.

Jako optimální podmínky pro měření byla zvolena metoda Hradby v prostředí B-R pufru o pH 6, měřicí potenciál měl velikost 1,3 V a stejně jako nulový potenciál byl vkládán na elektrodu po dobu 60 ms. Za těchto podmínek byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, přičemž v každém koncentračním řádu bylo změřeno vždy pět hodnot. Dosažená mez detekce je $5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti je $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

V dříve popsané práci, kde byl vzorek sulfamethizolu sledován pomocí HPLC s amperometrickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě byla nalezena mez detekce $0,34 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. [26] Omezení míry pasivace elektrody je tedy, na druhou stranu, doprovázeno zvýšením meze detekce přibližně o jeden řád.

6 Literatura

- [1] “Reaxys.” Sulfamethizole:
https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/RX001_3577075105965442956/UlgwMDE9UyNIMDAyPUMjSDAwMT1S/list/1558378251349/1/desc/IDE.NUMREF///.
[staženo 20.5.2019].
- [2] Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2017*. Grada, 2017.
- [3] J.K. Aronson, “Sulfonamides,” *Meyler’s Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. 555–569, Elsevier, Oxford 2016.
- [4] American Chemical Society, *Chemical and engineering news of American Chemical Society*. The American Chemical Society, 2009.
- [5] W. Yu, K. Li, Z. Liu, H. Zhang, a X. Jin, “Novelty aqueous two-phase extraction system based on ionic liquid for determination of sulfonamides in blood coupled with high-performance liquid chromatography,” *Microchemical Journal*, 136, 263–269, 2018.
- [6] S. Gao, X. Yang, W. Yu, Z. Liu, a H. Zhang, “Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography,” *Talanta*, 99, 875–882, 2012.
- [7] S. Y. Q. Pang G.F., Cao Y. Z., Zhang J.J., Jia G.Q., Fan C.L., Li X.M. a Liu Y.M., “Simultaneous determination of 16 sulfonamides in poultry meat by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 33, 1252–1256, 2005.
- [8] M. A. Raviolo, M. Rambla-Alegre, J. Clausell-Tormos, M.-E. Capella-Peiró, S. Carda-Broch a J. Esteve-Romero, “Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography,” *Analytica Chimica Acta*, 593, 152–156, 2007.
- [9] M. N. S. de la Cruz, R. F. Soares, A. S. F. Marques a F. R. de Aquino-Neto, “Development and validation of analytical method for sulfonamide residues in eggs by liquid chromatography Tandem Mass Spectrometry based on the Commission Decision 2002/657/EC,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 454–461, 2011.
- [10] T. Y. Z. Ma Q., Wang C., Wang X., Bai H., Dong Y.Y., Wu T., Zhang Q. a Wang J.B., “Simultaneous Determination of 22 Sulfonamides in Cosmetics by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Chinese journal of analytical chemistry,” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36, 1683–1689, 2008.
- [11] J. M. K. J. K. Premarathne, D. A. Satharasinghe, A. R. C. Gunasena, D. M. S. Munasinghe a P. Abeynayake, “Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography,” *Food Control*, 72, 276–282, 2017.

- [12] N. L. Han J., Wang Y., Liu Y., Li Y., Lu Y. a Yan Y., “Ionic liquid-salt aqueous two-phase extraction based on salting-out coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water and food,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 1245–1255, 2013.
- [13] J. J. Soto-Chinchilla, A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia a C. Cruces-Blanco, “Application of capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking to the sensitive determination of sulfonamides in meat and ground water,” *Electrophoresis*, 27, 4060–4068, 2006.
- [14] A. Yari a A. Shams, “Silver-filled MWCNT nanocomposite as a sensing element for voltammetric determination of sulfamethoxazole,” *Analytica Chimica Acta*, 1039, 51–58, 2018.
- [15] S. M. Ghoreishi, M. Behpour, A. Khoobi a Z. Moghadam, “Determination of Trace Amounts of Sulfamethizole Using a Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Electrode: Application of Experimental Design in Voltammetric Studies,” *Analytical Letters*, 46, 323–339, 2013.
- [16] D. H. Mika J., Barek J. a Zima J., “Flow-through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis nad HPLC,” *Electrochimica Acta*, 154, 397–403, 2015.
- [17] J. Růžička a E. H. Hansen, *Flow injection analysis*. J. Wiley, New York, 1988.
- [18] M. A. Islam, P. Mahbub, P. N. Nesterenko, B. Paull a M. Macka, “Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems - A review,” *Analytica Chimica Acta*, 1052, 10–26, 2019.
- [19] J. S. Stefano, R. H. O. Montes, E. M. Richter a R. A. A. Muñoz, “Flow-Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry for Simultaneous Determination of Paracetamol and Naproxen Using a Homemade Flow Cell for Screen-Printed Electrodes,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 484–491, 2014.
- [20] D. Baval, A. Economou, J. Zima, J. Barek a H. Dejmekova, “Simultaneous determination of tert-butylhydroquinone, propyl gallate, and butylated hydroxyanisole by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection,” *Talanta*, 178, 231–236, 2018.
- [21] W. Torres Pio dos Santos, E. G. Nascimento de Almeida, H. E. Alves Ferreira, D. T. Gimenes a E. M. Richter, “Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection,” *Electroanalysis*, 20, 1878–1883, 2008.
- [22] R. E. Silva W. C., Pereira P. F., Marra M. C. T., Gimenes D. R., Cunha R. B., da Silva R. A. A. a Munoz R. A. M., “A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection,” *Electroanalysis*, 23, 2764–2770, 2011.
- [23] W. Surareungchai, W. Deepunya a P. Tasakorn, “Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose,” *Analytica Chimica Acta*, 448, 215–220, 2001.
- [24] Medeiros R.A., Lourencao B.C., Rocha R.C. a Fatibello O., “Simple Flow Injection

Analysis System for Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode,” *Analytical Chemistry*, 82, 8658–8663, 2010.

- [25] R. A. Medeiros, B. C. Lourencao, R. C. Rocha-Filho a O. Fatibello-Filho, “Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode,” *Talanta*, 99, 883–889, 2012.
- [26] H. Dejmkova, M. Mikes, J. Barek a J. Zima, “Determination of Sulfamethizole Using Voltammetry and Amperometry on Carbon Paste Electrode,” *Electroanalysis*, 25, 189–194, 2013.