

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Johanka Jarošová

VYUŽITÍ PEVNÉ BISMUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODY
PŘI STANOVENÍ LÉČIVA METRONIDAZOLU

Use of a Solid Bismuth Drop Electrode in the Determination of
the Drug Metronidazole

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2023

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (projekt SVV260690) a finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR 20-01589S).

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 19. května 2023

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za ochotu, profesionální vedení, cenné rady, přístup a trpělivost v průběhu celé mé bakalářské práce. Chtěla bych také poděkovat celé laboratoři č. 113 za vřelé přijetí do kolektivu a vytvoření příjemné atmosféry pro práci.

Dále bych chtěla poděkovat mým kamarádům a příteli za podporu nejen během studia na univerzitě.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, za to že mi umožnila žít a studovat v Praze a byla mi vždy velkou oporou.

Abstrakt

Předmětem předkládané bakalářské práce bylo studium nové komerční pevné kapkové bismutové elektrody (S_{Bi}DE) a její využití k nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Voltametrické chování vybraného léčiva bylo studováno v závislosti na pH vodného roztoku Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufr). Jako optimální prostředí pro stanovení léčiva metronidazol na S_{Bi}DE bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 12, ve kterém byly proměřeny koncentrační závislosti metronidazolu v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Mez stanovitelnosti (L_Q) činila $1,38 \cdot 10^{-6}$ mol/L a mez detekce (L_D) činila $4,41 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

Nově vyvinutá voltametrická metoda byla využita pro stanovení léčiva metronidazolu v lékových formách v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL, tableť Entizol 250 mg, vaginální tableť Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 mL.

Zvolená voltametrická metoda byla porovnána s analytickou metodou UV–VIS absorpční spektrometrií v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 v koncentračním rozmezí metronidazolu $2 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Klíčová slova

Analýza léčiv

Diferenční pulzní voltametrie

Metronidazol

Pevná bismutová kapková elektroda

UV–VIS absorpční spektrometrie

Abstract

The subject of the present Bachelor Thesis was the study of a new commercial solid bismuth drop electrode (S_{Bi}DE) and its use to find optimal conditions for the voltammetric determination of the drug metronidazole using the differential pulse voltammetry technique (DPV).

The voltammetric behavior of the selected drug was studied as a function of pH of aqueous Britton-Robinson buffer (BR buffer) solution. BR buffer at pH 12 was chosen as the optimal medium for the determination of the drug metronidazole on S_{Bi}DE, in which the concentration dependence of metronidazole was measured in the range of $1 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-4}$ mol/L. The limit of quantification (L_Q) was 1.38×10^{-6} mol/L and the limit of detection (L_D) was 4.41×10^{-7} mol/L.

The newly developed voltammetric method was used for the determination of metronidazole in the pharmaceutical forms Efloran infusion solution 500 mg/100 mL, Entizol 250 mg tablet, Entizol 500 mg vaginal tablet and Noridem infusion solution 500 mg/100 mL.

The selected voltammetric method was compared with the analytical method by UV–VIS absorption spectrometry in the environment of aqueous BR buffer solution at pH 12 in the concentration range of metronidazole $2 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$ mol/L.

Key Words

Drug Analysis

Differential Pulse Voltammetry

Metronidazole

Solid Bismuth Drop Electrode

UV–VIS Absorption Spectrometry

Seznam použitých zkratk

<i>A</i>	absorbance
AgSE	stříbrná pevná elektroda
BiBE	bismutová pevná elektroda
BiE	bismutová elektroda
BiF-AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná bismutovým filmem
BiF-AuE	zlatá elektroda modifikovaná bismutovým filmem
BiF-CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná bismutovým filmem
BiF-CuE	měděná elektroda modifikovaná bismutovým filmem
BiFE	bismutová filmová elektroda
BiF-GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná bismutovým filmem
BiF-PLE	tuhová elektroda modifikovaná bismutovým filmem
Bi ₂ O ₃ -BiBE	bismutová pevná elektroda modifikovaná oxidem bismutitým
Bi ₂ O ₃ -GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná oxidem bismutitým
BiPE	bismutová pastová elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace [mol/L]
DCV	„direct current“ voltametrie
DMIP/CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná duplexní polymerní hybridní fólií s molekulárním otiskem
DPV	diferenční pulzní voltametrie
<i>E</i>	elektrodový potenciál [mV]
<i>E</i> _{fin}	konečný elektrodový potenciál [mV]
<i>E</i> _{fin_r}	konečný regenerační elektrodový potenciál [mV]
<i>E</i> _{in}	počáteční elektrodový potenciál [mV]
<i>E</i> _{in_r}	počáteční regenerační elektrodový potenciál [mV]
<i>E</i> _p	elektrodový potenciál píku [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	elektrický proud [nA]
<i>I</i> _p	elektrický proud píku [nA]

λ	vlnová délka [nm]
L_D	mez detekce [mol/L]
L_Q	mez stanovitelnosti [mol/L]
LSBiF-AgSAE	velkoplošná stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná bismutovým filmem
m	hmotnost látky [mg]
n	počet měření
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PCHAGCE	elektroda z aktivního skelného uhlíku modifikovaná poly(chromotropem 2B)
PtNP/PFF/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná platinovými nanočásticemi a polyfurfuralovým filmem
r	korelační koeficient
SBiDE	pevná bismutová kapková elektroda
SWV	„square-wave“ voltametrie
w	hmotnostní zlomek [%]

Obsah

1. Teoretický úvod.....	9
1.1 Cíle práce	9
1.2 Bismutové elektrody	9
1.2.1 Bismutová filmová elektroda.....	11
1.2.2 Bismutová pevná elektroda	13
1.2.3 Pevná bismutová kapková elektroda	13
1.3 Nitroimidazolová léčiva.....	14
1.3.1 Metronidazol.....	14
2. Experimentální část.....	18
2.1 Reagencie.....	18
2.2 Aparatura	18
2.3 Pracovní postupy.....	19
2.3.1 Voltametrie	19
2.3.2 Spektrometrie	19
2.3.3 Vyhodnocení výsledků a statistické zpracování dat	20
3. Výsledky a diskuse.....	23
3.1 Diferenční pulzní voltametrie	23
3.1.1 Vliv pH	23
3.1.2 Vliv regenerace na SBiDE.....	25
3.1.3 Kalibrační závislost	27
3.2 Voltametrické stanovení metronidazolu v léčivech.....	32
3.3 Spektrometrické stanovení metronidazolu v léčivech	37
4. Závěr.....	42
5. Literatura	43

1. Teoretický úvod

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo využít novou komerční pevnou kapkovou bismutovou elektrodu (SBiDE) pro stanovení léčiva metronidazol.

Dalším cílem bylo ověřit využití nově vyvinuté metody při stanovení metronidazolu v lékových formách v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL, tableť Entizol 250 mg, vaginální tableť Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 mL a srovnat výsledky těchto stanovení se srovnávací analytickou metodou, což byla v tomto případě UV–VIS absorpční spektrometrie.

1.2 Bismutové elektrody

Bismutové elektrody (BiE) jsou pro elektroanalytické účely využívány již od roku 2000. Díky nízké toxicitě je bismut šetrný k životnímu prostředí a stává se tak vhodným elektrodovým materiálem, kterým lze velmi dobře nahradit rtuť^{1,2}. Za laboratorní teploty je bismut pevný stříbrolesklý kov, čímž se zásadně liší od kapalné rtuti, proto se jako elektrodový materiál zcela nemůže vyrovnat lehce obnovitelnému povrchu jejich kapek³. V anodické oblasti mají BiE omezené potenciálové okno, zato v katodické oblasti je potenciálové okno značně široké, proto vykazují obdobné elektroanalytické vlastnosti jako rtuťové elektrody^{1,4}. Jsou velmi málo citlivé na výskyt kyslíku v pracovních roztocích, proto často nevyžadují jeho odstranění, avšak mají také některé nevýhody, jako je například nižší citlivost^{3,4} či problémy s pasivací povrchu⁵.

BiE byly již dříve využity k stanovování iontů kovů Zn, Cd, Pb, Tl, In, Sn, Sb, Cu, Mn, Cr a Mo (cit.³), Co, Ni (cit.^{3,6}). Pomocí těchto elektrod byly stanoveny i některé organické sloučeniny – pesticidy, léčiva nebo další biologicky významné organické látky^{1,2}. V tabulce 1.1 jsou vypsány příklady již stanovených organických sloučenin a léčiv pomocí různých BiE.

Nejčastěji používanými detekčními technikami pro stanovení nízkých koncentrací analytů se při použití BiE staly diferenční pulzní voltametrie (DPV), „square-wave“ voltametrie (SWV)^{1,4,6,7} či katodická adsorpční rozpouštěcí voltametrie⁶. Cyklická voltametrie a DC voltametrie jsou pak méně používané detekční techniky¹.

Tabulka 1.1

Příklady stanovovaných organických látek a léčiv pomocí různých BiE. Všechny původní literární zdroje jsou uvedeny v těchto přehledových referátech^{1,3-5,9}.

Elektroda	Léčiva	Ostatní organické látky
BiBE	daunomycin	mononitrofenoly dinitrofenoly nitrobenzaldehyd nitrobenzoová kyselina 5-nitroindazol
BiF-GCE	sulfadiazin kolchicin sildenafil aminosalicylátová léčiva insulin	2,4-dinitrofenol 2-nitrofenol bromofenoxim
Bi ₂ O ₃ -BiBE		2-nitrofenol
BiF-AgSAE		2-amino-6-nitrobenzothiazol
LSBiF-AgSAE		5-nitrobenzimidazol
BiF-AuE		5-nitrobenzimidazol 4-nitrofenol
BiF-PLE		4-nitrofenol 2-nitrofenol
BiF-CPE		nitrobenzen
BiFE		thiamethoxam imidaklopid acetamiprid klothianidin metamitron
BiF-CuE	vitamín B12	
Bi ₂ O ₃ -GCE	cilostazol	

Z ryzího bismutu (např. bismutového drátu) lze vyrobit celokovovou bismutovou elektrodu (BiBE)³. Diskové elektrody ze skelného uhlíku (GCE), u kterých lze elektrochemickou aktivací zvýšit adhezi bismutu³, jsou nejrozšířenějším typem nosiče pro bismutové filmy^{3,8}. Jejich levnější variantou jsou pak elektrody z grafitu

impregnované voskem³ nebo grafitové elektrody na bázi tuhy, musí se však počítat s menší plochou elektrody a pórovitostí tuhy^{3,8}. Pro tyto účely lze použít i měkké uhlíkové pasty (CPE)^{3,9}. Dalším typem nosiče pro bismut jsou vláknové a drátkové mikroelektrody využívající se pro stanovování analytů ve vysoce zředěných roztocích s efektivním přenosem hmoty bez potřeby míchání^{3,8}. Laboratorně se připravují z uhlíkových, platinových nebo zlatých drátků, na které je metodou *in situ* (vyloučení v analyzovaném roztoku) nanesen bismutový film³. Vhodnými nosiči mohou být dále tištěné (např. sítotiskové) elektrody používané pro měření v proudících kapalinách, jejichž hlavní vlastností je sériová výroba a jednorázová aplikace, nebo elektricky vyhřívané elektrody, které lze použít při měření za zvýšených teplot. Posledními známými typy nosičů pro bismut jsou žlábkové elektrody, které mohou být součástí detekčních cel pro průtokové analýzy³.

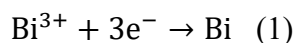
Povrchy bismutových elektrod se na základě jejich typu obnovují odlišně. U uhlíkových pastových elektrod s práškovým bismutem (BiF-CPE) a bismutových pastových elektrod (BiPE) stačí pouze použitou pastu šetrně setřít. Tyto pastové elektrody, které obsahují ve své pastě 8–33 % bismutu, mají konstantní vlastnosti po dobu několika dní³. Obnova povrchů u čidel z kompaktního bismutu je složitější. Lze je obnovit mechanickým leštěním s případným dodatečným čištěním ultrazvukem, nebo je nutné provést chemickou či elektrochemickou regeneraci^{3,9}.

1.2.1 Bismutová filmová elektroda

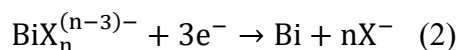
Bismutová filmová elektroda (BiFE) je nejčastěji vyráběna elektrochemickým nanesením tenkého bismutového filmu na povrch pracovní elektrody za konstantní teploty metodou *in situ* (vyloučení v analyzovaném roztoku) nebo *ex situ* (depozice z pokovovacích roztoků)^{1,3,11}. BiFE připravené metodami *in situ* a *ex situ* mohou být považovány za vhodnou netoxickou alternativu k běžným rtuťovým filmovým elektrodám, které jsou často v literatuře označovány jako toxické, protože se pro jejich přípravu využívají rozpustné anorganické soli rtuť¹⁰.

In situ metoda je vhodná pro analýzu iontů kovů⁴. První variantou provedení metody *in situ* je vyloučení povlaku bismutu přímo v analyzovaném roztoku^{3,6,11}. Jako zdroj bismutu je nejčastěji používána sůl $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, která dobře disociuje. Koncentrace přidávané bismutité soli jsou 10–20krát vyšší než předpokládané koncentrace stanovovaných iontů³. Redukce soli probíhá za konstantního potenciálu (–1,4 až –1,0 V vs. Ag/AgCl), který

umožňuje vyloučení filmu bismutu, ale také redukci stanovovaných iontů³. Takto vzniklý film bismutu vydrží pouze jedno měření a nakonec jsou jeho zbytky elektrochemicky odstraněny³. Jako vhodné prostředí pro elektrodepozici bismutu je dnes hojně využíván octanový pufr nebo jiný kyselý pufr^{3,11,12}. Elektrochemické vylučování bismutu probíhá prostřednictvím následujících chemických reakcí:



Rovnice 1 platí pro elektrolyty, které neobsahují komplexotvorné složky.



Rovnice 2 platí pro elektrolyty, které obsahují komplexotvorné složky (např. hydroxidy, bromidy, chloridy)³.

Při používání velmi nízkých koncentrací Bi^{3+} může dojít k hydrolýze bismutité soli (viz rovnice 3)³:



Nejběžněji se koncentrace bismutitých iontů pohybuje v řádech jednotek až tisíců mg/L, avšak nejběžnější koncentrační rozmezí je 50 – 500 mg/L^{1,11}. Dále je prokázáno, že přítomnost bromidu draselného nebo bromidu sodného zvyšuje adhezi filmu na povrch vodiče^{3,11}.

Druhou variantou provedení metody *in situ* je postup, při kterém dochází k vyredukování kovového bismutu v průběhu samotného měření. K této modifikaci byl již dříve použit pevný oxid bismutitý přimíchaný do uhlíkových past či uhlíkových inkoustů. Kovový film byl vyloučen při potenciálech –1,0 až –0,8 V vs Ag/AgCl (cit.³).

V metodě *ex situ* dochází k vyloučení bismutového filmu ze speciálních pokovovacích roztoků. Tato metoda byla v jiných studiích použita při stanovování niklu v komplexu s dimethylglyoximem pomocí katodické adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Vyloučené bismutové filmy metodou *ex situ* jsou více stabilnější než u metody *in situ* a vydrží tak, pokud při rozpouštěcím kroku nedojde k jejich oxidaci, po celou dobu měření. Tato metoda přípravy bismutových filmů se rovněž používá při většině voltametrických analýz organických látek³.

K přípravě BiFE je využíváno různých elektricky vodivých materiálů (elektrodových substrátů), jako je například měď^{1,6,11}, skelný uhlík^{1,6,10,11}, grafit, uhlíková pasta, olovo^{1,2,11}, mezoporézní platina, sítotiskový uhlíkový inkoust^{1,11} nebo diamant dopovaný borem⁴.

1.2.2 Bismutová pevná elektroda

Bismutová pevná elektroda (BiBE) se nejčastěji vyrábí z bismutového drátku¹¹, který je obalen vhodným izolantem (např. teflonové pouzdro)^{3,10}, nebo také nasátím roztaveného bismutu do skleněné kapiláry^{1,3}. Výroba těchto elektrod je levná, snadná a rychlá. Jednou z výhod je snadno obnovitelný povrch, a to mechanickým oleštěním nebo oříznutím konce kapiláry^{1,3,5,11}.

1.2.3 Pevná bismutová kapková elektroda

Pevná bismutová kapková elektroda (SBIDE, z anglického výrazu „solid bismuth drop electrode“) je nová pracovní elektroda komerčně dodávaná na český trh společností Metrohm od roku 2020 (obr. 1.1). Dle výrobce lze tuto elektrodu použít pro stanovení nízkých koncentrací těžkých kovů v jezerech, řekách, podzemních vodách a především v kontaminované pitné vodě. Lze stanovovat nízké koncentrace od $\mu\text{g/L}$, někdy je však možné stanovit koncentraci již od ng/L . Elektroda je vhodná pro stopovou analýzu iontů Cd, Pb, Ni, Co i Fe, proto dokáže zcela nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu. SBIDE je tvořena 2mm bismutovou kapkou na konci zúžené skleněné kapiláry, přičemž povrch této kapky představuje aktivní elektrodový povrch pro elektrochemická měření. Elektrodu lze pouze elektrochemicky aktivovat, neleští se a nenanáší se na ni žádný film¹³.



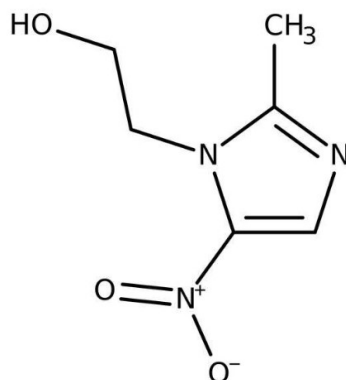
Obr. 1.1 Pevná bismutová kapková elektroda (SBIDE) o délce 124 mm od společnosti Metrohm (převzato z cit. ¹³).

1.3 Nitroimidazolová léčiva

Nitroimidazolová léčiva jsou biologicky aktivní nitroheterocyklické sloučeniny, které se používají proti onemocnění způsobenými gram-pozitivními či gram-negativními bakteriemi nebo prvoky¹⁴. Mezi nejdůležitější léčiva s nitroskupinou v poloze 5 patří metronidazol, nimorazol, tinidazol^{14,15}, ornidazol a dimetridazol¹⁴. Léčiva mají antimikrobiální a mutagenní účinek¹⁴.

Během syntézy je nitroskupina v poloze 5 na nitroimidazolovém kruhu nepostradatelná, dodává molekulám vysoký redukční potenciál a právě redukce této skupiny usmrcuje citlivé buňky. Vzniklé meziproducty přerušují řetězce DNA, což dokazuje antimikrobiální účinek. Při redukci 5-nitroimidazolů v hypoxických buňkách nebo anaerobních organismech může docházet k elektrochemickým procesům, které mohou poškodit důležité biomolekuly, což dokazuje mutagenní účinek^{14,16}.

1.3.1 Metronidazol



Obr. 1.2 Strukturální vzorec metronidazolu.

Metronidazol (obr. 1.2) neboli 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol je bílý, popřípadě nažloutlý krystalický prášek těžce rozpustitelný ve vodě, acetonu, 96% ethanolu, dichlormethanu a v etheru¹⁷. Jedná se o antibiotikum, vyvinuté v roce 1960, používané pro léčbu onemocnění způsobených gram-pozitivními a gram-negativními anaerobními bakteriemi^{14,16,18,19} (např. *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*) nebo anaerobními prvoky (např. *Trichomonas*, *Treponema*, *Histomonas*) u lidí a domácích zvířat. Je to účinná antimikrobiální látka proti Vincentovým organismům (bakterie rodu *Fusobacterium* a spirocheta rodu *Borrelia*: *F. fusiforme*, *B. vincentii*)¹⁹, amébám²⁰ nebo Crohnově chorobě. Kromě léčivých účinků způsobuje genotoxicitu, mutagenní nebo karcinogenní účinky. Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny

(IARC) způsobuje u některých zvířat spolu s doplňky stravy rakovinu, a proto je metronidazol v několika zemích zakázán. Karcinogenita u lidí prokázána nebyla, ale i tak je potřebné, u těch, kdo používají metronidazol, hlídat hladinu jeho koncentrace v těle. Nadměrná koncentrace metronidazolu v těle může způsobit periferní a optickou neuropatii, neutropenii, encefalopatii, záchvaty nebo mozečkovou ataxii¹⁹. Dalšími nežádoucími účinky jsou pak bolesti hlavy, kovová chuť v ústech či gastrointestinální poruchy^{15,21}.

Existují čtyři fáze cytotoxického účinku metronidazolu. První fází je vstup do bakteriální buňky, druhou fází je redukce nitroskupiny, třetí fází je působení redukováných vedlejších cytotoxických produktů a čtvrtou fází je uvolnění neaktivních konečných produktů²⁴. Nejdůležitější je druhá fáze, redukce nitroskupiny, kde dochází k tvorbě meziproduktů i volných radikálů, které následně reagují a přerušují řetězce s DNA, RNA anebo s buněčnými proteiny, proto dochází k mutagením a karcinogením účinkům^{14,22,23}.

Perorálním podáním se metronidazol velmi rychle vstřebává, vaginálním podáním se vstřebává pomaleji²⁴. Metronidazol se velmi málo váže na plazmatické proteiny, v játrech je metabolizován a glukuroniduje, nebo je jeho malé množství, působením bakteriemi střevní flory, redukováno^{24,15}. Studie prokázaly, že velká část metronidazolu spolu s jeho metabolity je vylučována močí (33–44 % dávky)²⁴ s biologickým poločasem 6–10 hodin (cit.¹⁵). U těhotných žen je metronidazol také vylučován prostřednictvím mateřského mléka²⁴.

V literatuře jsou jako nejčastější metody pro stanovení metronidazolu uváděny elektrochemické metody DPV, SWV či DCV^{19,22,23}, separační metoda HPLC–UV¹⁹ nebo UV–VIS či fluorescenční spektrometrie^{19,25}. Přítomnost metronidazolu lze dokázat podle lékopisné metody složené ze dvou hlavních kroků. Prvním krokem je detekce pomocí teploty tání, která se pohybuje v rozmezí 159–163 °C. Druhým krokem je vytvoření směsi, která obsahuje 10 mL původního vzorku, 10 g práškového zinku, 1 mL vody (*aqua purificata*) a 0,25 mL zředěné kyseliny chlorovodíkové (obsahuje 73 g/L HCl; 20 g HCl je zředěno vodou na 100 mL). Směs je pomocí vodní lázně zahřívána po dobu 5 min a následně zchlazena. Poté lze provést důkazovou reakci na primární aromatické aminy. Důkazová reakce spočívá v okyselení vzniklého roztoku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (obsahuje 73 g/L HCl; 20 g HCl je zředěno vodou na 100 mL), ke

kterému jsou následně přidány 0,2 mL dusitanu sodného ($c = 100 \text{ g/L}$). Po 1 až 2 min je k roztoku přidán 1 mL 2-naftolu (5 g 2-naftolu je rozpuštěno ve 40 mL zředěného hydroxidu sodného (8,5 g hydroxidu sodného je zředěno vodou na 100 mL) a zředěno vodou na 100 mL). V případě, že se jedná o primární aromatické aminy roztok je zbarven do oranžové až červené barvy nebo vznikne stejně zabarvená sraženina. Stanovení metronidazolu lékopisnou formou spočívá v rozpuštění 0,1500 g vzorku metronidazolu v 50 mL bezvodé kyseliny octové a vzniklý roztok je titrován kyselinou chloristou ($c = 0,1 \text{ mol/L}$). Bod ekvivalence je určen pomocí potenciometrické indikace (s platinovou indikační elektrodou a kalomelovou nebo argentchloridovou referentní elektrodou). Pro výpočet množství metronidazolu ve vzorku odpovídá 1 mL kyseliny chloristé ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) 17,12 mg metronidazolu¹⁷.

Při použití voltametrických metod jsou elektrody ze skelného uhlíku, zlata, uhlíkových vláken nebo uhlíkové pastové elektrody či visící rtuťová kapková elektroda během redoxních reakcí velmi náchylné k nežádoucí adsorpci metronidazolu a produktů jeho redukčních přeměn. Tyto sloučeniny tak pasivují povrch elektrody, což vede ke zhoršení citlivosti nebo selektivity, proto jsou nejčastěji používány chemicky modifikované elektrody¹⁹.

V tabulce 1.2 jsou uvedeny příklady stanovení metronidazolu metodou DPV, která byla později v bakalářské práci používána.

Tabulka 1.2 Příklady stanovení metronidazolu metodou DPV.

Elektroda	Lineární rozsah [μmol/L]	L_D [μmol/L]	Matrice vzorku	Literatura
AgSE	1 – 400	0,55	deionizovaná voda	23
HMDE	0,01 – 1	0,0025	sérum	26
BiF-PLE	2 – 30	0,039	tableta, sérum	22
CPE	1 – 500	0,297	tableta	27
GCE	0,1 – 150	0,025	tableta, moč, sérum	28
PtNP/PFF/GCE	2,5 – 500	0,05	lidské sérum	29
PCHAGCE	10 – 400	0,33	léčiva	30
DMIP/CPE	0,4 – 200	0,091	lidské sérum, moč, léčiva	31

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztok metronidazolu (Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L byl připraven rozpuštěním 17,12 mg v 100 mL deionizované vody. Následným ředěním zásobního roztoku byly připraveny roztoky o nižších koncentracích. Roztoky byly připraveny ve skleněných odměrných baňkách, uzavřeny plastovou zátkou a uchovány ve tmě při laboratorní teplotě.

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr byl připraven smícháním pevného hydroxidu sodného o koncentraci 0,2 mol/L (p.a. Penta, Praha, ČR) s kyselou složkou o koncentraci všech kyselin 0,04 mol/L, která obsahovala 85% kyselinu trihydrogenfosforečnou (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR), pevnou kyselinu boritou (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR) a 99,8% octovou kyselinu (p.a., Penta, Praha, ČR).

Léčiva, infuzní roztok Efloran 500 mg/100 mL (KRKA, Slovinsko), tableta Entizol 250 mg (Polpharma, Polsko), vaginální tableta Entizol 500 mg (Polpharma, Polsko) a infuzní roztok Noridem 500 mg/100 mL (Noridem Enterprises Limited, Kypr), byla použita pro voltametrické a spektrometrické stanovení obsahu metronidazolu v lékových formách.

2.2 Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru Eco-Tribo Polarograf (v Microsoft Windows XP Professional, verze 2002), Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Pro měření bylo použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita SBiDE (typ 6.0346.000, Metrohm, Praha, ČR), jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda (typ 10-20+polaro Ag 10 10-2014-3, 3mol/L KCl, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Při měření pomocí DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulzy o šířce 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), periodě pulzu 150 ms a výšce -50 mV.

Spektrometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 v programu UV-Visible ChemStation verze 9.01 (obojí Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Pomocí digitálního pH metru Jenway 3510 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou byly připraveny vodné roztoky BR pufru o různém pH.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltmetrie

Pro měření pH závislostí byly připraveny 20mL roztoky (18 mL vodného roztoku BR pufru o příslušném pH s 2 mL zásobního roztoku metronidazolu). Roztoky byly následně kvantitativně převedeny do voltametrické nádoby. Základní elektrolyt tvořilo 20 mL vodného roztoku BR pufru o příslušném pH. Roztoky ve voltametrické nádobce byly probublány dusíkem (z centrálního rozvodu v budově Chemického ústavu PŘF UK Praha) po dobu 5 minut, ten byl přiváděn přes promývačku s deionizovanou vodou.

Kalibrační závislosti byly měřeny s 20mL roztoky vodného roztoku BR pufru o příslušném pH s odpovídajícím množstvím zásobního roztoku metronidazolu. Roztoky byly následně kvantitativně převedeny do voltametrické nádoby a probublány dusíkem.

Voltametrické stanovení množství metronidazolu v léčivech bylo prováděno v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL, v tabletě Entizol 250 mg, vaginální tablety Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 mL. Obě tablety byly zváženy a rozetřeny v třecí misce. Zásobní roztoky tablet byly připraveny kvantitativním převedením příslušného množství tablet do odměrných baněk, které byly následně doplněny deionizovanou vodou po rysku. Zásobní roztoky infuzních roztoků byly připraveny odpipetováním příslušného množství těchto roztoků do odměrných baněk, které byly následně doplněny deionizovanou vodou po rysku. Pro voltametrické měření byly připraveny 20mL vzorky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s příslušným množstvím zásobního roztoku léčiva a standardu metronidazolu. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádoby a probublány dusíkem.

V programu Polar Pro 5.1 byly následně 10 krát proměřeny voltametrické křivky. Posledních pět křivek bylo vyhodnoceno a získané výsledky statisticky zpracovány.

2.3.2 Spektrometrie

Spektrometrie byla použita jako srovnávací analytická metoda pro stanovení množství metronidazolu v léčivech. Pro spektrometrická měření byly připraveny 10mL vzorky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s příslušným množstvím zásobního

roztoku léčiva a standardu metronidazolu. Měření byla prováděna v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Měření probíhalo proti vodnému roztoku BR pufru o daném pH. Absorbance připravených roztoku byla měřena v rozmezí vlnových délek 200–1100 nm.

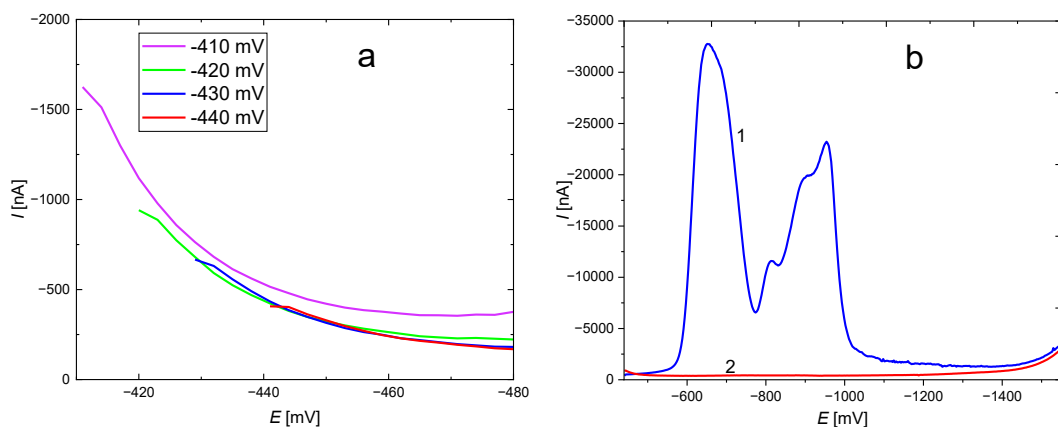
V programu UV–Visible ChemStation 9.01 byly 3krát měřeny křivky absorpčních spekter, které byly poté vyhodnoceny a získané výsledky statisticky zpracovány.

2.3.3 Vyhodnocení výsledků a statistické zpracování dat

Výpočty byly prováděny a předkládané grafy tvořeny v programech MS Excel 2016 (Microsoft Corporation) a Origin 2023 (Origin Lab Corporation, USA).

Pro každé zkoumané pH byl stanovován počátek potenciálového okna tak, aby naměřený pík analytu byl co nejlépe vyvinutý, vyhodnotitelný a voltamogramy základního elektrolytu vykazovaly co nejnižší proud pozadí. Počátek potenciálového okna byl stanovován nejprve v neutrálním prostředí (pH 7). Po následném prozkoumání chování elektrody byly stanovovány počátky potenciálových oken pro pH 8–12, poté pro pH 2–6. Na obr. 2.1 (a) je znázorněn příklad stanovení počátku potenciálového okna vodného roztoku BR pufru o pH 12. Jako počátek potenciálového okna byla vybrána hodnota $E_{in} = -440$ mV. V tabulce 2.1 jsou uvedeny hodnoty potenciálových oken pro jednotlivá pH. Na obr. 2.1 (b) je znázorněn příklad prvního měření na SBiDE. Pokud byla bismutová elektroda ponechána v pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, bismut začal oxidovat a vzniklé oxidy byly následně při prvním voltametričtém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou.

Vyhodnocení DP voltamogramů analytu je znázorněno na obr. 2.2. Po vyhodnocení voltamogramu byl získán potenciál píku E_p a proud píku I_p .

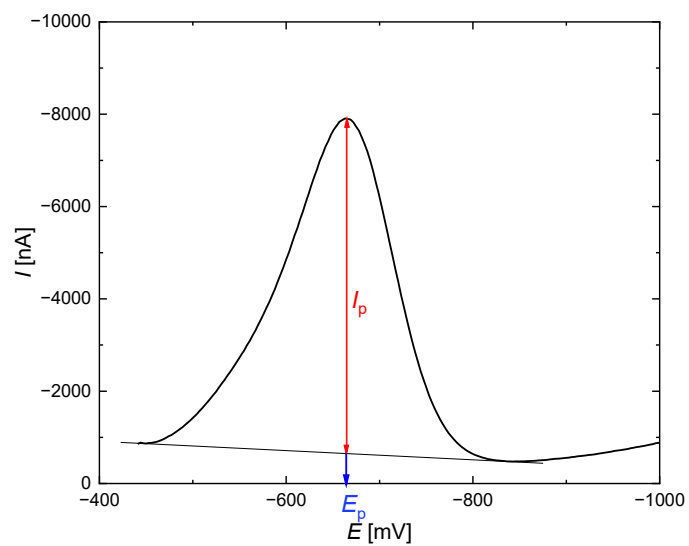


Obr. 2.1 (a) Stanovení počátku potenciálového okna vodného roztoku BR pufru o pH 12 na SBiDE technikou DPV. (b) Příklad prvního měření ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 na SBiDE technikou DPV (1) při $E_{in} = -440$ mV, příklad druhého měření ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 na SBiDE technikou DPV při $E_{in} = -440$ mV (2).

Tabulka 2.1

Přehled rozmezí potenciálových oken při DPV stanovení metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) ohraničených počátečním (E_{in}) a koncovým potenciálem (E_{fin}), měřeno na SBiDE (vs. Ag/AgCl) ve vodném prostředí BR pufru při různých pH.

pH	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]
2,0	-150	-1100
3,0	-150	-1200
4,0	-160	-1250
5,0	-190	-1300
6,0	-220	-1300
7,0	-250	-1400
8,0	-280	-1400
9,0	-310	-1400
10,0	-340	-1500
11,0	-390	-1500
12,0	-440	-1550



Obr. 2.2 Způsob vyhodnocení DP voltamogramu metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L v prostředí BR pufru o pH 12. Proud píku je označen jako I_p , potenciál píku je označen jako E_p .

3. Výsledky a diskuse

3.1 Diferenční pulzní voltametrie

3.1.1 Vliv pH

Chování metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) bylo zkoumáno technikou DPV na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 2–12. Metronidazol ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 3–12 poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, který odpovídá čtyřelektronové ireversibilní redukci nitroskupiny na hydroxylamin¹⁹. Hodnoty získaných potenciálů píku a proudů píku metronidazolu při různých hodnotách pH jsou uvedeny v tabulce 3.1. Voltamogramy při sudých a lichých hodnotách pH jsou ukázány na obr. 3.1.

Výška píku metronidazolu ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 3–7 postupně klesá, za to v rozmezí pH 8–10 a pH 12 vzrůstá. Za povšimnutí stojí výška píku metronidazolu ve vodném prostředí BR pufru o pH 11, která je oproti výšce píku v prostředí o pH 10 a 12 značně nižší a odpovídá tak výšce píku metronidazolu ve vodném prostředí BR pufru o pH 9. Metronidazol ve vodném prostředí BR pufru o pH 2 poskytuje dva ne zcela dobře vyvinuté píky.

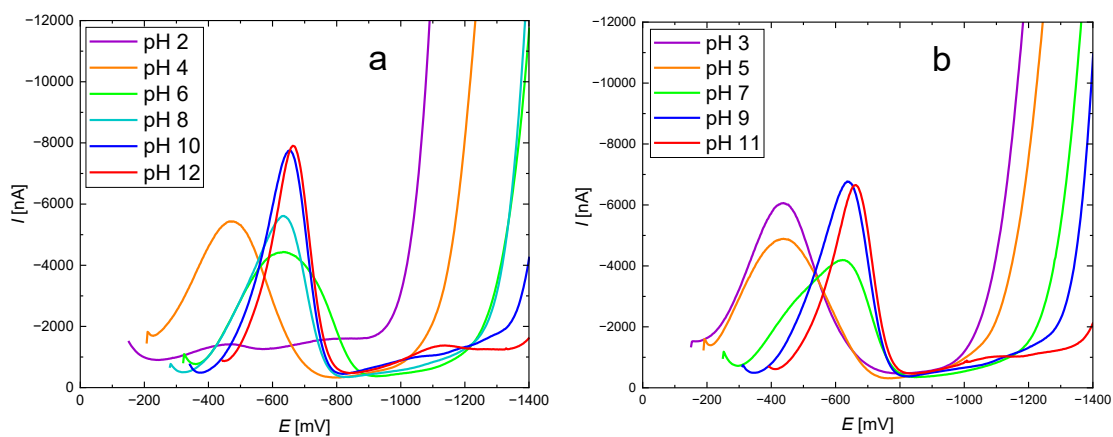
Potenciály píku metronidazolu by se při změně pH prostředí měly ideálně posunovat o 59 mV. Čím kyselejší prostředí, tím by se potenciály píku měly posouvat směrem k pozitivnějším potenciálům. Čím zásaditější prostředí, tím by se potenciály píku měly posouvat směrem k negativnějším potenciálům. Tento trend však u SBiDE neplatí. Potenciály píku metronidazolu se ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 2–5 pohybují okolo -440 ± 15 mV. Ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 7–12 se potenciály píku metronidazolu pohybují okolo -640 ± 20 mV. Za povšimnutí stojí potenciál píku ve vodném roztoku BR pufru o pH 6, který se pohybuje okolo -500 mV a je tak vzdálen o téměř 100 mV od potenciálů píku ve vodném roztoku BR pufru o pH 5 a 7.

Jako optimální prostředí pro další měření byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12, pro dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu.

Tabulka 3.1

Vliv pH na potenciály píku (E_p) a proudy píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) zkoumaný technikou DPV na SBiDE ve vodném prostředí BR pufru v rozmezí pH 2–12.

pH	E_p [mV]	I_p [nA]
2,0	-456	-171
3,0	-444	-4708
4,0	-428	-4218
5,0	-434	-3910
6,0	-521	-3880
7,0	-624	-3604
8,0	-635	-5083
9,0	-636	-6054
10,0	-652	-6901
11,0	-663	-6117
12,0	-664	-7134

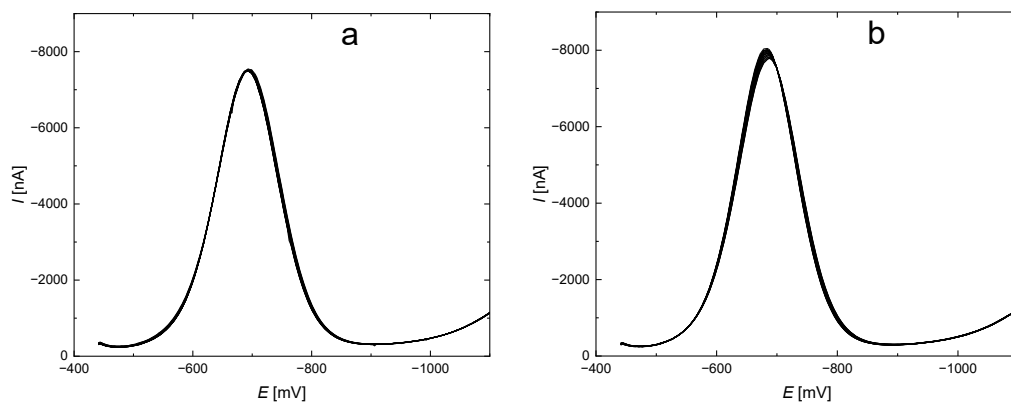


Obr. 3.1 DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) zaznamenané na SBiDE ve vodných roztocích BR pufru o různých pH, (a) sudé hodnoty pH, (b) liché hodnoty pH.

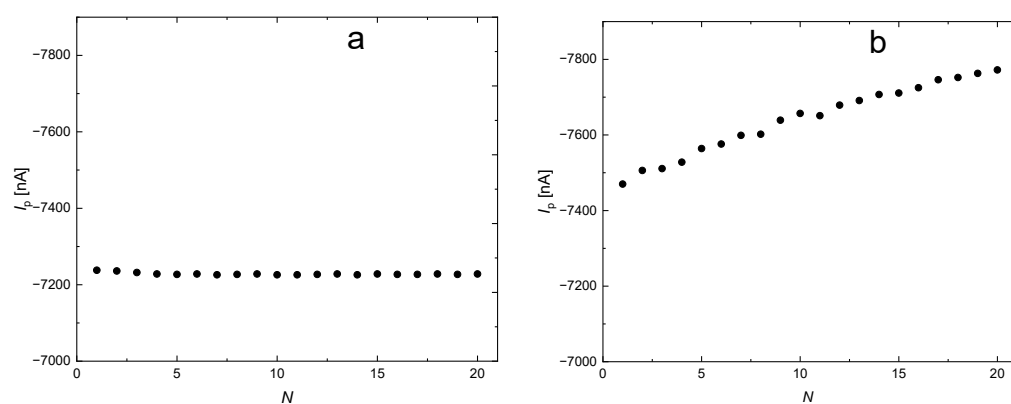
3.1.2 Vliv regenerace na SBiDE

Bylo zjišťováno, zda je zapotřebí zakomponovat elektrochemickou regeneraci při opakovaných DPV stanoveních metronidazolu na SBiDE, aby nedocházelo k pasivaci pracovní elektrody a stanovení vykazovala dobrou opakovatelnost. Za tímto účelem bylo zkoumáno využití dvojice regeneračních potenciálů. Proudová odezva byla pozorována při 20 po sobě následujících stanoveních analytu. DP voltamogramy byly zaznamenávány ve vodném roztoku BR pufru o pH 12, které bylo zvoleno jako optimální prostředí z důvodu dobře vyvinutého píku a nejvyšší proudové odezvy. Regenerační potenciály $E_{in_r} = -490$ mV a $E_{fin_r} = -1500$ mV byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech). Hodnoty regeneračních potenciálů byly zvoleny na základě šířky používaného potenciálového okna (tabulka 2.1), přičemž E_{in_r} byl o 50 mV negativnější než E_{in} a E_{fin_r} byl o 50 mV pozitivnější než E_{fin} , aby se předešlo nechtěné degradaci povrchu pracovní elektrody při samotné regeneraci. DP voltamogramy bez zařazené regenerace jsou znázorněny na obr. 3.2 (a). Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činí 0,05 %. DP voltamogramy se zakomponovanou regenerací jsou znázorněny na obr. 3.2 (b). Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činí 1,2 %. Závislost velikosti proudu píku analytu na počtu stanovení bez zařazené regenerace je zobrazena na obr. 3.3 (a) a na obr. 3.3 (b) se zakomponovanou regenerací.

Aplikované regenerační potenciály mírně zvýšily proudovou odezvu metronidazolu, avšak zhoršily opakovatelnost (docházelo k postupnému nárůstu výšky píku), proto byla následující měření technikou DPV prováděna bez vkládání těchto regeneračních potenciálů. Pro ustálení signálu bylo každé měření 10krát opakováno a posledních 5 naměřených křivek bylo vyhodnoceno a statisticky zpracováno.



Obr. 3.2 DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12, (a) měřeno bez regeneračních potenciálů ($n = 20$), (b) měřeno s regeneračními potenciály $E_{in_r} = -490$ mV, $E_{fin_r} = -1500$ mV ($n = 20$).



Obr. 3.3 Závislost proudové odezvy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na počtu měření, měřeno na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 technikou DPV, (a) měřeno bez regeneračních potenciálů ($n = 20$), (b) měřeno s regeneračními potenciály $E_{in_r} = -490$ mV, $E_{fin_r} = -1500$ mV ($n = 20$).

3.1.3 Kalibrační závislost

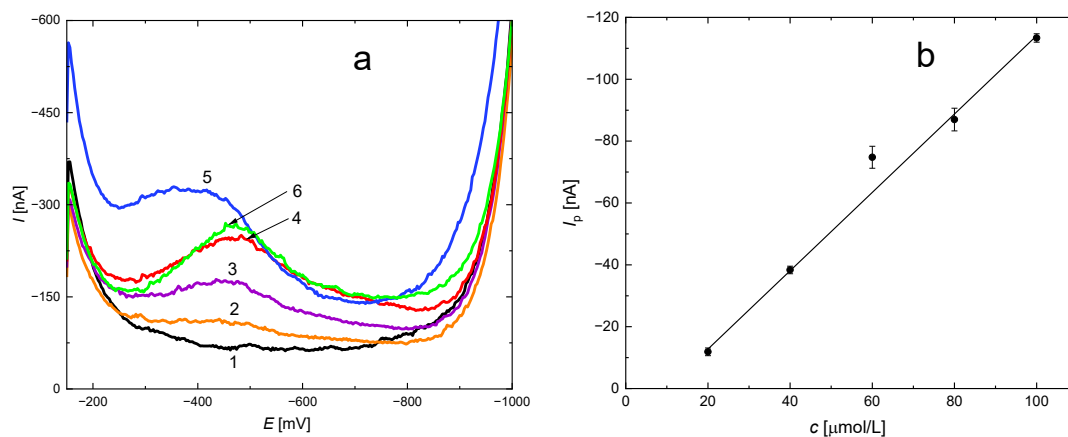
Kalibrační závislosti metronidazolu byly měřeny technikou DPV v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Kalibrace byla proměřena kromě optimálního prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 (viz kapitola 3.1.1) také v prostředích o pH 3 a 7. Jelikož se v případě SBiDE jedná o pracovní elektrodu, která byla v naší laboratoři zkoumána poprvé, jevílo se jako zajímavé zjistit, jaký průběh bude mít koncentrační závislost metronidazolu v prostředích odpovídajících kyselému a neutrálnímu charakteru.

Jako první byl použit vodný roztok BR pufru o pH 3, kvůli nejlépe vyvinutému píku metronidazolu v kyselém prostředí (obr. 3.1 b). Pro další měření byl použit vodný roztok BR pufru o pH 7, kvůli atypickému tvaru píku metronidazolu v neutrálním prostředí (obr. 3.1 b), a jako poslední byl použit vodný roztok BR pufru o pH 12, z důvodu nejlépe vyvinutého píku v zásaditém prostředí (obr. 3.1 a).

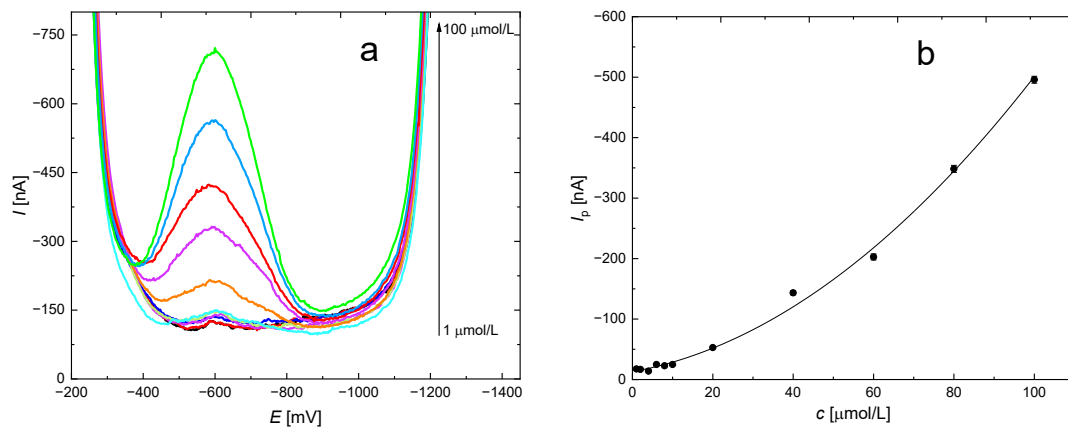
Na obr. 3.4 (a) jsou znázorněny DP voltamogramy metronidazolu ($c = 2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí BR pufru o pH 3. Nejnižší vyhodnotitelný pík metronidazolu v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 3 byl získán při $c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Na obr. 3.4 (b) je znázorněna lineární kalibrační závislost proudové odezvy metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L).

Na obr. 3.5 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí BR pufru o pH 7. Nejnižší vyhodnotitelný signál metronidazolu v tomto prostředí byl získán při $c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Na obr. 3.5 (b) je znázorněna kalibrační závislost proudu píku metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L), avšak získaná data lze v tomto koncentračním rozmezí metronidazolu proložit pouze nelineární funkcí, zde polynomickou funkcí druhého stupně.

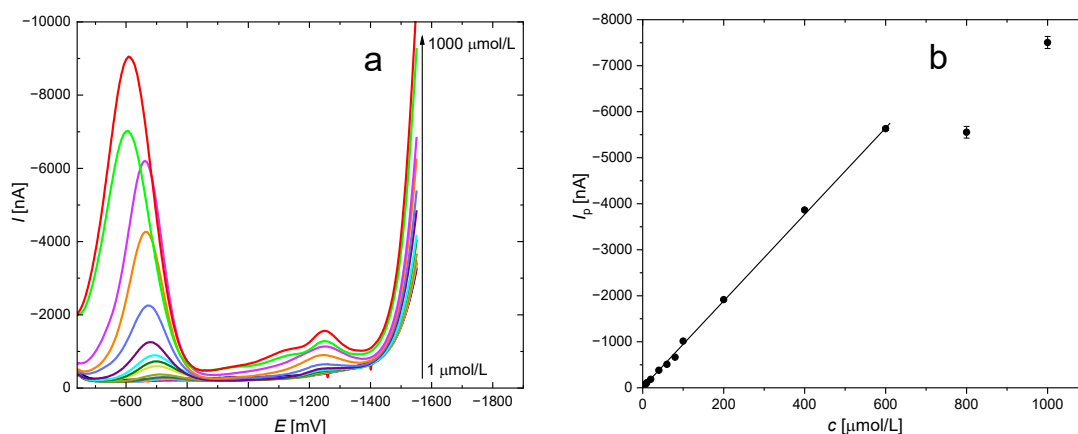
Na obr. 3.6 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) v prostředí BR pufru o pH 12. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace metronidazolu v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 činila $c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Na obr. 3.6 (b) je znázorněna kalibrační závislost velikosti píku metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Z grafu vyplývá, že získaná závislost je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu $c = 1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol/L.



Obr. 3.4 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 3: (1) základní elektrolyt, (2) metronidazol o koncentraci 20 $\mu\text{mol/L}$, (3) metronidazol o koncentraci 40 $\mu\text{mol/L}$, (4) metronidazol o koncentraci 60 $\mu\text{mol/L}$, (5) metronidazol o koncentraci 80 $\mu\text{mol/L}$, (6) metronidazol o koncentraci 100 $\mu\text{mol/L}$. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 20 - 100 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: $y = -1,26x + 10,4$; $r^2 = 0,9814$.



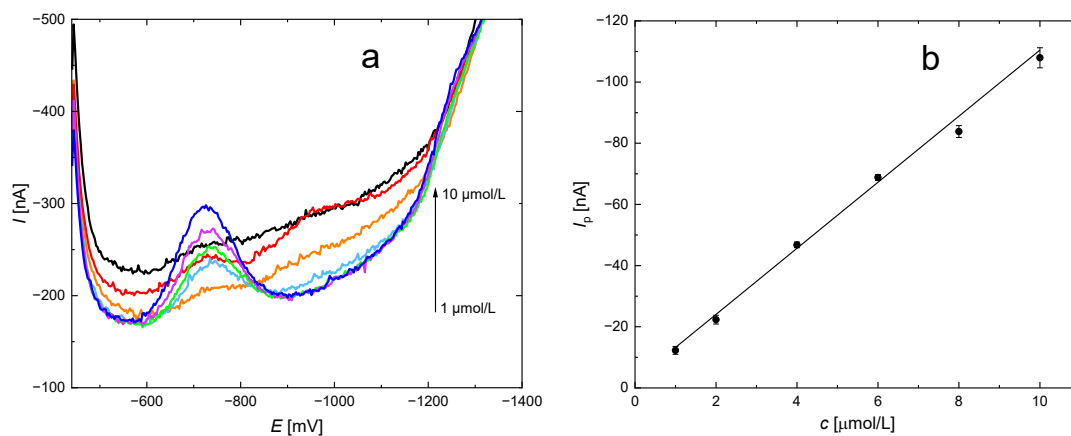
Obr. 3.5 (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 - 100 \mu\text{mol/L}$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 7. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1 - 100 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: $y = -0,0337x^2 - 1,45x - 12,1$; $r^2 = 0,9970$.



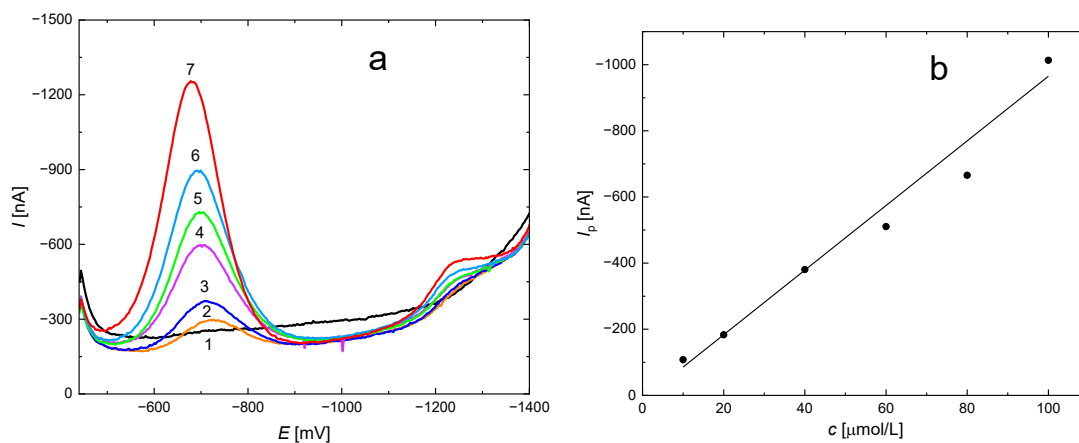
Obr. 3.6 (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 - 1000 \mu\text{mol/L}$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1 - 1000 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: $y = -9,47x - 0,585$; $r^2 = 0,9993$.

Z dosud získaných kalibračních závislostí vyplývá, že jako optimální prostředí pro DPV stanovení metronidazolu na SBiDE je nejvhodnější vodný roztok BR pufru o pH 12. Na obr. 3.7 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, na obr. 3.8 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, na obr. 3.9 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$. Kalibrační závislosti proudu píku metronidazolu na jeho koncentraci jsou znázorněny na obr. 3.7 (b) pro metronidazol o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, na obr. 3.8 (b) pro metronidazol o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ a na obr. 3.9 (b) pro metronidazol o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$. Zde je patrné, že získaná závislost je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu $c = 1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

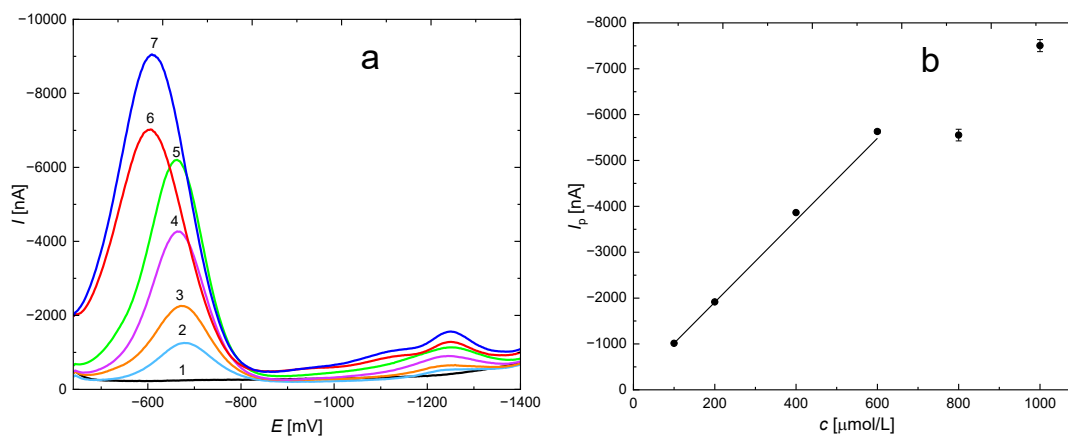
Jako optimální prostředí byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12, kvůli dobře vyvinutému píku, nejvyšší proudové odezvě a možné lineární kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu metronidazolu $c = 1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. V tabulce 3.2 jsou uvedeny parametry jednotlivých kalibračních přímk. Mez stanovitelnosti byla počítána jako koncentrace studované látky odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (10σ ; pro počet měření $n = 5$) stanovení sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky³².



Obr. 3.7 (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 - 10 \mu\text{mol/L}$) zaznamenaná na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1 - 10 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n=5$.



Obr. 3.8 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12: (1) základní elektrolyt, (2) metronidazol o koncentraci $10 \mu\text{mol/L}$, (3) metronidazol o koncentraci $20 \mu\text{mol/L}$, (4) metronidazol o koncentraci $40 \mu\text{mol/L}$, (5) metronidazol o koncentraci $60 \mu\text{mol/L}$, (6) metronidazol o koncentraci $80 \mu\text{mol/L}$, (7) metronidazol o koncentraci $100 \mu\text{mol/L}$. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 10 - 100 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n=5$.



Obr. 3.9 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12: (1) základní elektrolyt, (2) metronidazol o koncentraci 100 $\mu\text{mol/L}$, (3) metronidazol o koncentraci 200 $\mu\text{mol/L}$, (4) metronidazol o koncentraci 400 $\mu\text{mol/L}$, (5) metronidazol o koncentraci 600 $\mu\text{mol/L}$, (6) metronidazol o koncentraci 800 $\mu\text{mol/L}$, (7) metronidazol o koncentraci 1000 $\mu\text{mol/L}$. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 100 - 1000 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n=5$.

Tabulka 3.2

Parametry kalibračních přímk metronidazolu pro techniku DPV v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12, měřeno na SBiDE.

c [$\mu\text{mol/L}$]	Směrnice [$\text{mA}\cdot\text{L/mol}$]	Úsek [nA]	r^2	L_Q [mol/L]
1 – 10	-10,2	-2,62	0,9963	$1,38\cdot 10^{-6}$
10 – 100	-9,43	10,2	0,9723	
100 – 600	-9,30	-84,8	0,9976	

3.2 Voltametrické stanovení metronidazolu v léčivech

Voltametrické stanovení množství metronidazolu v léčivech bylo prováděno pomocí metody přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL, v tabletě Entizol 250 mg, vaginální tabletě Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 mL.

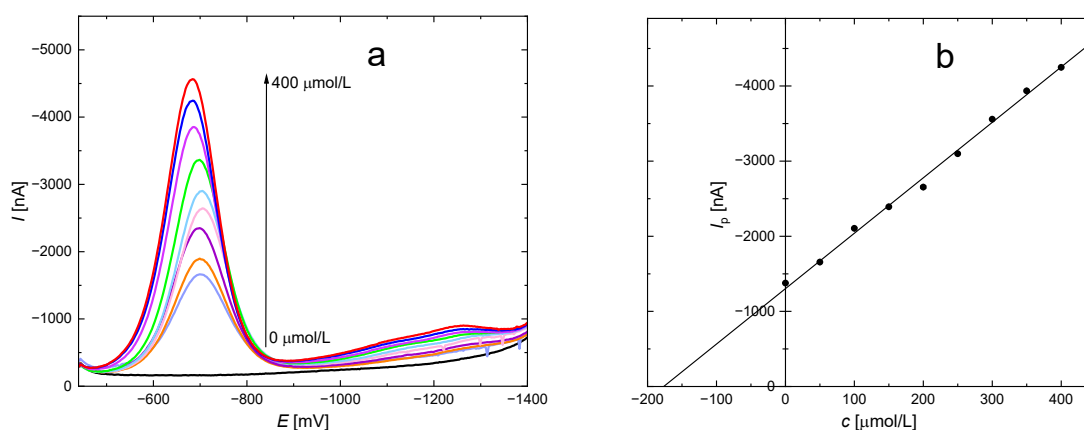
Zásobní roztoky infuzních roztoků Efloran a Noridem o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/L (koncentrace teoreticky vycházející z množství léčiva deklarovaného výrobcem) byly připraveny odpipetováním 1,71 mL daných lékových forem do 5mL odměrných baněk, které byly doplněny deionizovanou vodou po rysku. Tablety Entizol 250 mg a Entizol 500 mg byly zváženy a rozetřeny v třecí misce ($m_{\text{Entizol 250 mg}} = 0,2918$ g, $m_{\text{Entizol 500 mg}} = 0,6942$ g). Zásobní roztoky těchto tablet byly připraveny kvantitativním převedením 8,56 mg do 5mL odměrných baněk, které byly doplněny deionizovanou vodou po rysku.

Pro měření metodou DPV byly připraveny 20mL roztoky vodného roztoku BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200 μ L zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 50 μ L zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/L), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 50 μ L. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádoby a před analýzou probublány 5 min dusíkem. Pro ustálení signálu bylo každé stanovení 10krát opakováno a posledních 5 naměřených křivek bylo vyhodnoceno. Jako srovnávací analytická metoda byla použita UV–VIS spektrometrie (viz kapitola 3.3).

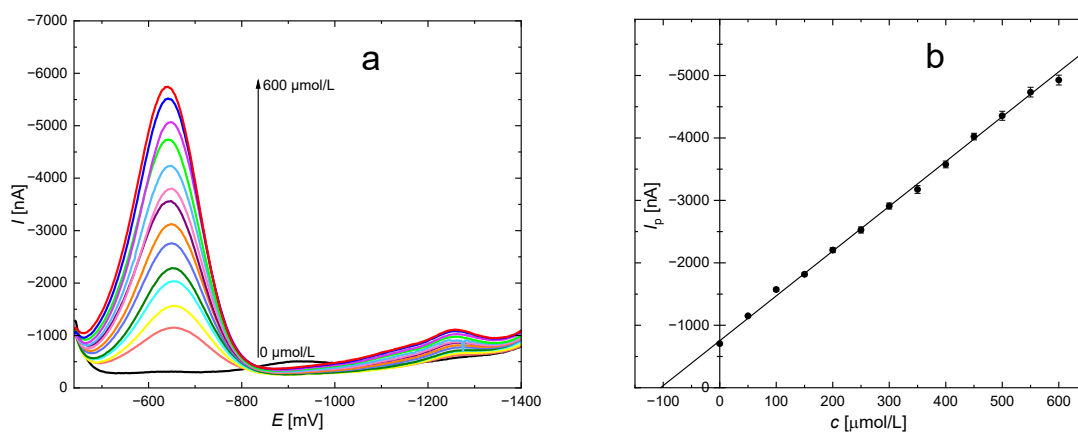
Nejprve byl analyzován vzorek infuzního roztoku Efloran. Jelikož jeho expirační doba vypršela před 7 lety, bylo toto měření považováno za zkušební a pozorovalo se, zda aplikace metody přidavku standardu je spolehlivá. Stanovení metronidazolu v tomto infuzním roztoku probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Na obr. 3.10 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu v infuzním roztoku Efloran, na obr. 3.10 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Po vyhodnocení naměřených výsledků a následně jejich srovnání s výsledky z UV–VIS spektrometrie bylo zjištěno, že měření metodou přidavku standardu je do jisté míry spolehlivé (viz tabulka 3.7 v kapitole 3.3; vyšší obsah metronidazolu byl pravděpodobně způsoben postupným dlouhodobým odpařováním rozpouštědla od okamžiku prvního otevření před více než 7 roky) a následovalo měření tablety Entizol 250 mg, tablety Entizol 500 mg a později také

infuzního roztoku Noridem, který byl obstarán jako poslední. Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Na obr. 3.11 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg, na obr. 3.11 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Na obr. 3.12 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu v tabletě Entizol 500 mg, na obr. 3.12 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Na obr. 3.13 (a) jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu v infuzním roztoku Noridem, na obr. 3.13 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. V tabulce 3.3 jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tabulce 3.4 jsou uvedeny hodnoty spočteného množství metronidazolu v jednotlivých léčivech.

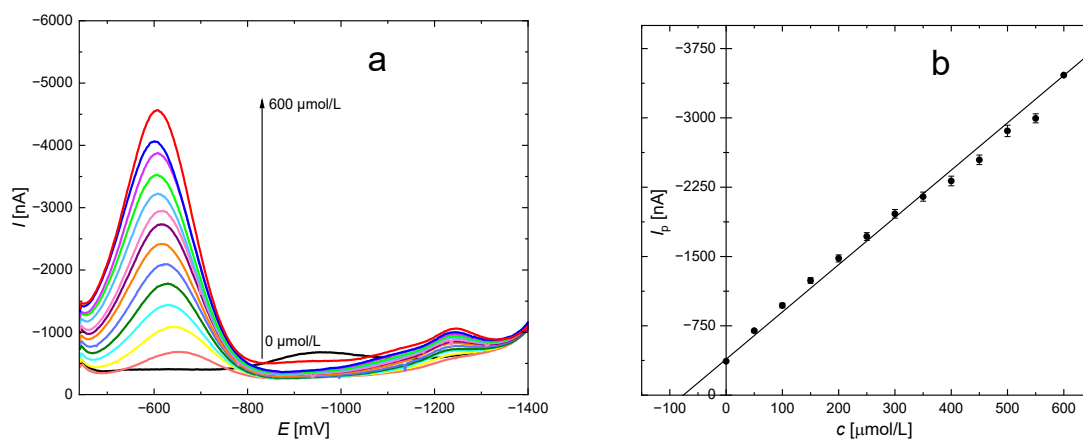
Výška proudové odezvy a tvar křivek jsou u jednotlivých léčiv odlišné. Rozdílnosti mohla zapříčinit různorodost matrice.



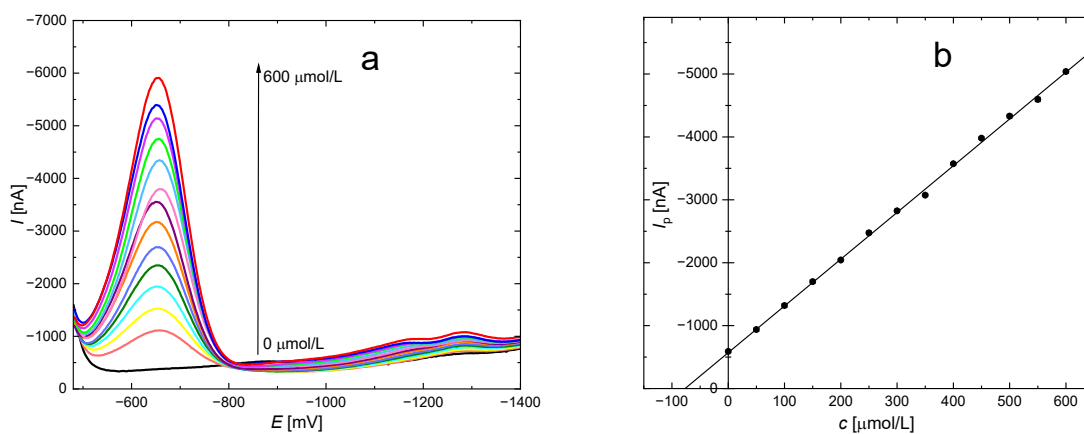
Obr. 3.10 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiBE ve vzorcích tvořených podílem infuzního roztoku Efloran a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 400 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v infuzním roztoku Efloran ($c = 0 - 400 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obř. 3.11 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obř. 3.12 (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 500 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 500 mg ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obr. 3.13 DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SbIbE ve vzorcích tvořených podílem infuzního roztoku Noridem a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v infuzním roztoku Noridem ($c = 0 - 600 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.

Tabulka 3.3

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí DPV na SbIbE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12.

Léčivo	c_{standard} metronidazolu [$\mu\text{mol/L}$]	Směrnice [$\text{mA}\cdot\text{L/mol}$]	Úsek [nA]	r^2
Infuzní roztok Efloran	0 – 400	-7,31	-132	0,9961
Tableta Entizol 250 mg	0 – 600	-7,08	-775	0,9982
Tableta Entizol 500 mg	0 – 600	-4,80	-466	0,9944
Infuzní roztok Noridem	0 – 600	-7,42	-580	0,9991

Tabulka 3.4

Spočtené množství metronidazolu v jednotlivých léčivech vztažené k deklarovanému množství metronidazolu na obalech léčiv. Měřeno pomocí DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12.

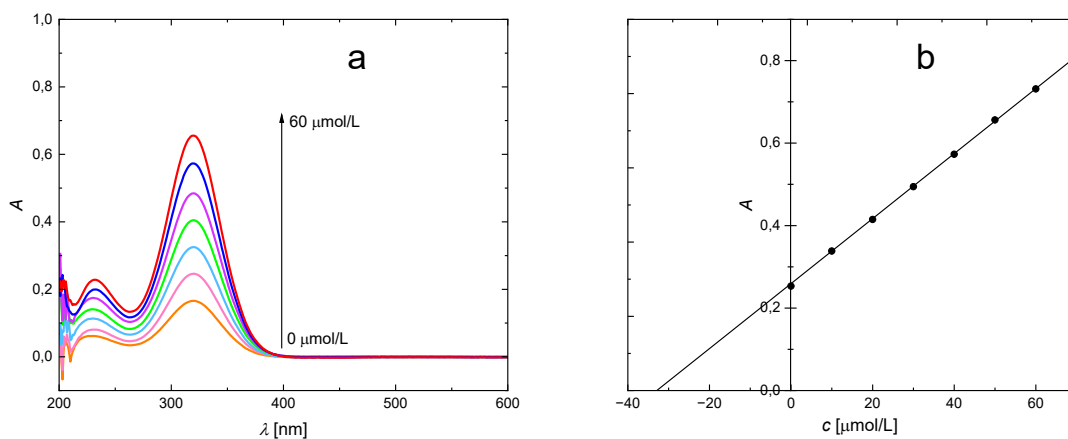
Léčivo	C_{standard} metronidazolu [$\mu\text{mol/L}$]	m deklarované [mg]	m vypočtené [mg]	w [%]
Infuzní roztok Efloran	0 – 400	500	900	180
Tableta Entizol 250 mg	0 – 600	250	318	127
Tableta Entizol 500 mg	0 – 600	500	670	134
Infuzní roztok Noridem	0 – 600	500	390	78

3.3 Spektrometrické stanovení metronidazolu v léčivech

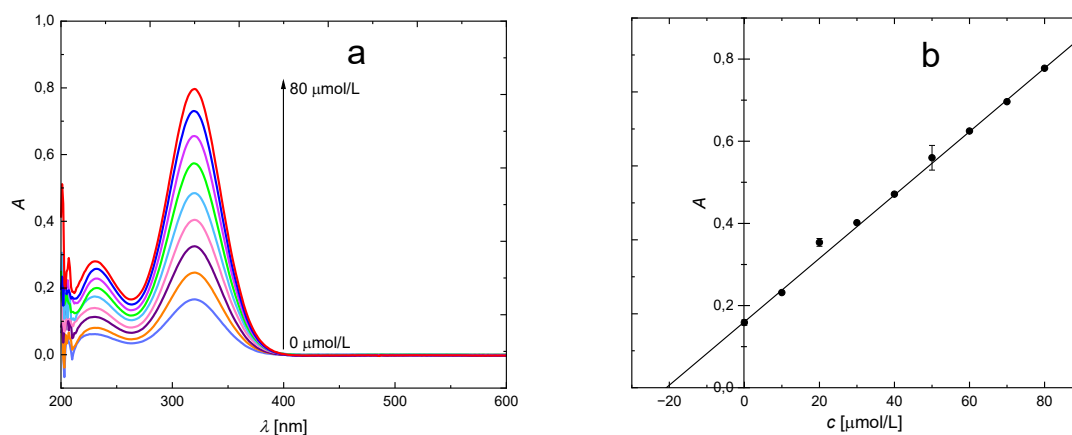
Jako srovnávací metoda k voltametričkému stanovení metronidazolu v léčivech (infuzní roztok Efloran 500 mg/100 mL, tableta Entizol 250 mg, vaginální tableta Entizol 500 mg a infuzní roztok Noridem 500 mg/100 mL) pomocí metody přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek byla použita UV–VIS absorpční spektrometrie.

Zásobní roztoky léčiv (viz kapitola 3.2) byly pro spektrometrické měření 10krát zředěny. Pro měření pomocí metody přidavku standardu byly připraveny 10mL roztoky vodného roztoku BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200 μL zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 100 μL zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 μL . Roztoky byly proměřovány v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Měření probíhalo proti vodnému roztoku BR pufru o pH 12. Křivky absorpčních spekter byly 3krát měřeny a poté vyhodnoceny.

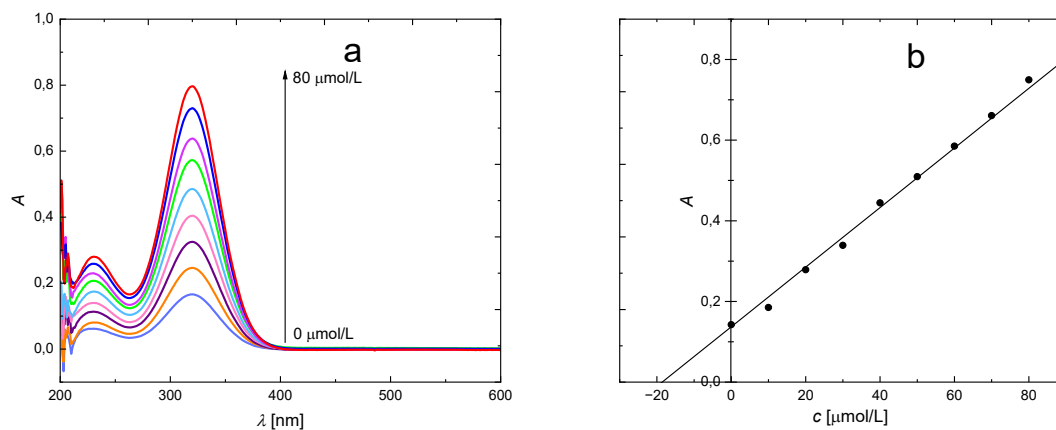
Na obr. 3.14 (a) jsou znázorněny absorpční spektra metronidazolu v infuzním roztoku Efloran (koncentrace přidaného standardu činí $1 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-5}$ mol/L), na obr. 3.14 (b) je znázorněna závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Na obr. 3.15 (a) jsou znázorněny absorpční spektra metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg (koncentrace přidaného standardu činí $1 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-5}$ mol/L), na obr. 3.15 (b) je znázorněna závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Na obr. 3.16 (a) jsou znázorněny absorpční spektra metronidazolu v tabletě Entizol 500 mg (koncentrace přidaného standardu činí $1 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-5}$ mol/L), na obr. 3.16 (b) je znázorněna závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. Na obr. 3.17 (a) jsou znázorněny absorpční spektra metronidazolu v infuzním roztoku Noridem (koncentrace přidaného standardu činí $1 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-5}$ mol/L), na obr. 3.17 (b) je znázorněna závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu. V tabulce 3.5 jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tabulce 3.6 jsou uvedeny hodnoty spočteného množství metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tabulce 3.7 jsou pak porovnané výsledky získané pomocí DPV na SBiDE a UV–VIS spektrometrie.



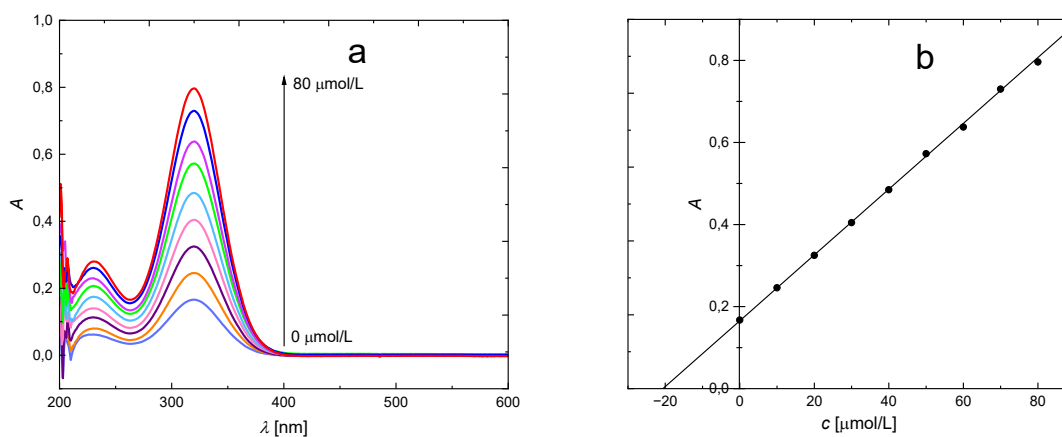
Obr. 3.14 (a) Absorpční spektra zaznamenaná v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem infuzního roztoku Efloran a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 60 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. (b) Závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v infuzního roztoku Efloran ($c = 0 - 60 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obr. 3.15 (a) Absorpční spektra zaznamenané v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. (b) Závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obr. 3.16 (a) Absorpční spektra zaznamenané v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 500 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. (b) Závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 500 mg ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.



Obr. 3.17 (a) Absorpční spektra zaznamenané v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem infuzního roztoku Noridem a přidaným standardem analytu ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. (b) Závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v infuzním roztoku Noridem ($c = 0 - 80 \mu\text{mol/L}$); chybové úsečky pro $n = 5$.

Tabulka 3.5

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí UV–VIS spektrometrie zaznamenané v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm.

Léčivo	c_{standard} metronidazolu [$\mu\text{mol/L}$]	Směrnice [L/mol]	Úsek	r^2
Infuzní roztok Efloran	0 – 60	$7,96 \cdot 10^{-3}$	0,256	0,9999
Tableta Entizol 250 mg	0 – 80	$7,76 \cdot 10^{-3}$	0,167	0,9957
Tableta Entizol 500 mg	0 – 80	$7,60 \cdot 10^{-3}$	0,131	0,9940
Infuzní roztok Noridem	0 – 80	$7,94 \cdot 10^{-3}$	0,167	0,9995

Tabulka 3.6

Spočtené množství metronidazolu v jednotlivých léčivech vztažené k deklarovanému množství metronidazolu na obalech léčiv. Měřeno pomocí UV–VIS spektrometrie v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm.

Léčivo	c_{standard} metronidazolu [$\mu\text{mol/L}$]	m deklarované [mg]	m vypočtené [mg]	w [%]
Infuzní roztok Efloran	0 – 60	500	805	161
Tableta Entizol 250 mg	0 – 80	250	327	131
Tableta Entizol 500 mg	0 – 80	500	595	119
Infuzní roztok Noridem	0 – 80	500	530	106

Tabulka 3.7

Hodnoty spočteného množství metronidazolu v léčivech vztahené k deklarovanému množství metronidazolu na obalech léčiv získané pomocí nově vyvinuté metody ($w_{\text{voltametrie}}$) a srovnávací analytické metody ($w_{\text{spektrometrie}}$). Poměr výše uvedených hodnot $w_{\text{voltametrie}} / w_{\text{spektrometrie}}$ pak udává skutečnou výtěžnost metody DPV na SBiDE vůči analytické srovnávací metodě.

Léčivo	$w_{\text{voltametrie}}$ [%]	$w_{\text{spektrometrie}}$ [%]	$w_{\text{voltametrie}} / w_{\text{spektrometrie}}$ [%]
Infuzní roztok Efloran	180	161	112
Tableta Entizol 250 mg	127	131	97
Tableta Entizol 500 mg	134	119	113
Infuzní roztok Noridem	78	106	74

4. Závěr

V této bakalářské práci byla studována nová komerční pracovní pevná kapková bismutová elektroda (S_{Bi}DE) a její využití pro voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Optimální prostředí pro stanovení léčiva na S_{Bi}DE bylo nalezeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 12, kde byla získána lineární kalibrační závislost v koncentračním rozsahu metronidazolu $1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Mez stanovitelnosti (L_Q) činila $1,38 \cdot 10^{-6}$ mol/L, mez detekce (L_D) tedy $4,41 \cdot 10^{-7}$ mol/L, což je hodnota velmi dobře srovnatelná s ostatními publikovanými DPV metodami (tabulka 1.2). Jelikož se jedná o pracovní elektrodu, která nebyla doposud v naší laboratoři zkoumána, byla kalibrační závislost metronidazolu kromě zásaditého prostředí (pH 12) proměřena také v kyselém (pH 3) a neutrálním (pH 7) prostředí vodného roztoku BR pufru. Avšak pro stanovení metronidazolu je kyselé i neutrální prostředí vodného roztoku BR pufru nevyhovující.

Nově vyvinutá voltametrická metoda DPV byla využita za dříve získaných optimálních podmínek pro stanovení léčiva metronidazolu v lékových formách v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL, tablete Entizol 250 mg, vaginální tablete Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 mL.

Zvolená voltametrická metoda byla porovnána s analytickou metodou UV–VIS absorpční spektrometrií v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12. Největší množství metronidazolu bylo voltametricky (180 %) i spektrometricky (161 %) stanoveno v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 mL. Tento infuzní roztok je více jak sedm let starý, proto došlo k jeho zkoncentrování a obsahuje tak zvýšené množství metronidazolu.

U infuzního roztoku Efloran 500 mg/100 mL, tablety Entizol 250 mg a tablety Entizol 500 mg jsou hodnoty stanoveného množství léčiva metronidazolu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) za daných optimálních podmínek při použití DPV na S_{Bi}DE a UV–VIS spektrometrie srovnatelné (tabulka 3.7). U infuzního roztoku Noridem bylo voltametrickou metodou stanoveno 78 % metronidazolu a spektrometrickou metodou bylo stanoveno 106 % metronidazolu. Z toho vyplývá, že DPV na S_{Bi}DE je vhodná pro stanovení metronidazolu v lékových formách: infuzní roztok Efloran 500 mg/100 mL, tableta Entizol 250 mg a vaginální tableta Entizol 500 mg.

5. Literatura

1. N. LEZI, V. VYSKOČIL, A. ECONOMOU, J. BAREK: Electroanalysis of organic compounds at bismuth electrodes: A short review. *Sensing in Electroanalysis* **7**, 71–78 (2012).
2. R. ABDALLAH, A. DERGHANE, Y. LOU, O. MERDRIGNAC-CONANEC, D. FLONER, F. GENESTE: New porous bismuth electrode material with high surface area. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **839**:2, 32–38 (2019). doi:10.1016/j.jelechem.2019.03.023
3. I. ŠVANCARA, K. VYTRĚS: Elektroanalýza s bismutovými elektrodami. *Chemické listy* **100**:2, 90–113 (2006).
4. F. ARDUINI, J. Q. CALVO, G. PALLESCHI, D. MOSCONE, A. AMINE: Bismuth-modified electrodes for lead detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**:11, 1295–1304 (2010). doi:10.1016/j.trac.2010.08.003
5. V. PRCHAL, A. OTTENSCHLAGEROVA, V. VYSKOCIL, J. BAREK: Voltammetric determination of 5-nitroindazole using a bismuth bulk electrode. *Analytical Letters* **49**:1, 49–55 (2015). doi:10.1080/00032719.2014.996810
6. E. A. HUTTON, B. OGOREVC, S. B. HOČEVAR, M. R. SMYTH: Bismuth film microelectrode for direct voltammetric measurement of trace cobalt and nickel in some simulated and real body fluid samples. *Analytica Chimica Acta* **557**:1–2, 57–63 (2006). doi:10.1016/j.aca.2005.10.003
7. O.E. TALL, D. BEH, N. JAFFREZIC-RENAULT, O. VITTORI: Electroanalysis of some nitro-compounds using bulk bismuth electrode. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **90**:1, 40–48 (2009). doi:10.1080/03067310902871265
8. J. WANG: Stripping analysis at bismuth electrodes: A review. *Electroanalysis* **17**:15–16, 1341–1346 (2005). doi:10.1002/elan.200403270
9. M. BUČKOVÁ, P. GRÜNDLER, G. FLECHSIG: Adsorptive stripping voltammetric detection of daunomycin at a bismuth bulk electrode. *Electroanalysis* **17**:5–6, 440–444 (2005). doi:10.1002/elan.200403178
10. R. PAULIUKAITĖ, S. B. HOČEVAR, B. OGOREVC, J. WANG: Characterization and applications of a bismuth bulk electrode. *Electroanalysis* **16**:9, 719–723 (2004). doi:10.1002/elan.200302783

11. P. DVOŘÁK, V. VYSKOČIL: Netradiční filmové elektrody ve voltametrické a ampérometrické analýze organických sloučenin. *Chemické listy* **117**:1, 3–12 (2023). doi:10.54779/chl20230003
12. A. ECONOMOU: Bismuth-film electrodes: Recent developments and potentialities for electroanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**:4, 334–340 (2005). doi:10.1016/j.trac.2004.11.006
13. METROHM: *Bismuth drop electrode* [online]. Dostupné z <https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html> [cit. 24.4.2023]
14. W. RAETHER, H. HÄNEL: Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research* **90**:S1, S19–S39 (2003). doi:10.1007/s00436-002-0754-9
15. *Nitroimidazolová antibiotika* [online]. Dostupné z <<https://webservices3.lf1.cuni.cz/printbook-render/data/eZJOAR4q7P6sraxzCYidmN0fcEgtUW9IpwL5K2kX/Article.pdf>> [cit. 24.4.2023]
16. D. I. EDWARDS: Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**:1, 9–20 (1993). doi:10.1093/jac/31.1.9
17. *Český lékopis*. Grada Publishing, Praha 2017.
18. C. D. FREEMAN, N. E. KLUTMAN, K. C. LAMP: Metronidazole. *Drugs* **54**:5, 679–708 (1997). doi:10.2165/00003495-199754050-00003
19. S. MEENAKSHI, R. RAMA, K. PANDIAN, S.C.B. GOPINATH: Modified electrodes for electrochemical determination of metronidazole in drug formulations and biological samples: An overview. *Microchemical Journal* **165**, 1–16 (2021). doi:10.1016/j.microc.2021.106151
20. H. B. FUNG, T. DOAN: Tinidazole: A nitroimidazole antiprotozoal agent. *Clinical Therapeutics* **27**:12, 1859–1884 (2005). doi:10.1016/j.clinthera.2005.12.012
21. L. JOKIPII, A. M. JOKIPII: Comparative evaluation of the 2-methyl-5-nitroimidazole compounds dimetridazole, metronidazole, secnidazole, ornidazole, tinidazole, carnidazole, and panidazole against bacteroides fragilis and other bacteria of the bacteroides fragilis group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **28**:4, 561–564 (1985). doi:10.1128/AAC.28.4.561

22. K. ASADPOUR-ZEYNALI, M. R. MAJIDI, P. NAJAFI-MARANDI, Z. NORYSARAY: Electrocatalytic reduction of metronidazole on bismuth modified pencil-lead electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society* (2013). doi:10.1002/jccs.201300117
23. O. MRÁČEK, V. VYSKOČIL: Voltametrické stanovení metronidazolu pomocí stříbrné pevné elektrody. *Chemické listy* **115**:12, 669–667 (2021).
24. K. C. LAMP, C. D. FREEMAN, N. E. KLUTMAN, M K. LACY: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics* **36**:5, 353–373 (1999). doi:10.2165/00003088-199936050-00004
25. X. YANG, M. LIU, Y. YIN, F. TANG, H. XU, X. LIAO: Green, hydrothermal synthesis of fluorescent carbon nanodots from gardenia, enabling the detection of metronidazole in pharmaceuticals and rabbit plasma. *Sensors* **18**:4 (2018). doi:10.3390/s18040964
26. Z. WANG, H. ZHOU, S. ZHOU: Study on the determination of metronidazole in human serum by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta* **40**:7, 1073–1075 (1993). doi:10.1016/0039-9140(93)80168-Q
27. Y. NIKODIMOS, M. AMARE: Electrochemical determination of metronidazole in tablet samples using carbon paste electrode. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2016**, 3612943 (1–7) (2016). doi:10.1155/2016/3612943
28. A. MAO, H. LI, L. YU, X. HU: Electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes and chitosan-nickel complex for sensitive determination of metronidazole. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **799**, 257–262 (2017). doi:10.1016/j.jelechem.2017.05.049
29. J. HUANG, X. SHEN, R. WANG, Q. ZENG, L. WANG: A highly sensitive metronidazole sensor based on a Pt nanospheres/polyfurfural film modified electrode. *RSC Advances* **7**:1, 535–542 (2017). doi:10.1039/C6RA25106D
30. X. LI, G. XU: Simultaneous determination of ranitidine and metronidazole in pharmaceutical formulations at poly(chromotrope 2B) modified activated glassy carbon electrodes. *Journal of Food and Drug Analysis* **22**:3, 345–349 (2014). doi:10.1016/j.jfda.2013.09.050
31. N. XIAO, J. DENG, J. CHENG, S. JU, H. ZHAO, J. XIE, D. QIAN, J. HE: Carbon paste electrode modified with duplex molecularly imprinted polymer hybrid film for metronidazole detection. *Biosensors and Bioelectronics* **81**, 54–60 (2016). doi:10.1016/j.bios.2016.02.041
32. D. HARVEY: *Modern analytical chemistry*. McGraw-Hill, Toronto 2000.