

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Stanovení dantrolenu s využitím borem dopované  
diamantové elektrody**

Markéta Kučerová

Bakalářská práce

2016

University of Pardubice  
Faculty of chemical technology

**Determination of dantrolen using boron-doped  
diamond electrode**

Markéta Kučerová

Bachelor thesis

2016

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Kučerová**  
Osobní číslo: **C12175**  
Studijní program: **B2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Stanovení dantrolenu s využitím borem dopované diamantové elektrody**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

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

1. Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod používaných v elektroanalytické chemii.
2. Zpracujte literární rešerši týkající se dantrolenu a problematiky jeho voltametrického chování, resp. možnosti stanovení s využitím jednotlivých voltametrických metod v kombinaci s různými pracovními elektrodami.
3. Ověřte možnosti borem dopované diamantové elektrody při analýze a stanovení dantrolenu na modelových roztocích a navrhnete optimální podmínky stanovení.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

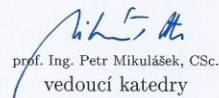
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **22. ledna 2016**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 22. ledna 2016

### **Prohlašuji:**

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 27. 6. 2016

Markéta Kučerová

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D. za pomoc, trpělivost a užitečné rady během teoretické i experimentální části mé bakalářské práce.

## **Anotace**

Obsahem této bakalářské práce je studium voltametričkého chování dantrolenu. Teoretická část je zaměřena na úvod do polarografických a voltametričkých metod a na rozdělení a vlastnosti používaných pracovních elektrod. Pozornost byla také věnována novým elektrodovým materiálům a obzvláště pak borem dopované diamantové elektrodě. V práci je rovněž shrnuto elektrochemické chování dantrolenu na rtuťových elektrodách popsáné v literatuře. V rámci experimentální části bylo studováno voltametričké chování dantrolenu na borem dopované diamantové elektrodě v závislosti na pH a rychlosti polarizace a byla navržena metoda stanovení této látky.

## **Klíčová slova**

voltametrie, dantrolen, borem dopovaná diamantová elektroda

## **Annotation**

The aim of this thesis is to study the voltammetric behavior of dantrolene. The theoretical part focuses on the introduction of the polarographic and voltammetric methods and on the classification and characterization of the commonly used working electrodes. The attention was also paid to the new electrode materials, especially, to boron doped diamond electrode. The electrochemical behavior of dantrolene on mercury electrodes described in literature is also summarized. In the experimental part, the voltammetric behavior of dantrolene on boron doped diamond electrode in dependence on pH and scan rate was studied. Finally, the new method for dantrolene determination was developed.

## **Key words**

voltammetry, dantrolene, boron-doped diamond electrode

# Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část .....	12
1.1 Voltametrie .....	12
1.1.1 Úvod do voltametrie.....	12
1.1.2 Uspořádání elektrochemického článku .....	13
1.1.3 Polarizační křivka.....	15
1.1.4 Polarografické / voltametrické metody .....	16
1.1.5 Pracovní elektrody ve voltametrii .....	19
1.1.6 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) .....	23
1.2 Dantrolen .....	24
1.2.1 Mechanismus účinku a eliminace dantrolenu v organismu .....	25
1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti dantrolenu .....	25
1.2.3 Voltametrické chování dantrolenu .....	26
2 Experimentální část.....	29
2.1 Použité chemikálie .....	29
2.2 Přístrojové vybavení.....	29
2.3 Pracovní postupy .....	29
2.3.1 Voltametrická měření.....	29
2.3.2 Příprava BDDE k měření .....	30
3 Výsledky a diskuze .....	31
3.1 Studium voltametrického chování dantrolenu na BDDE .....	32
3.1.1 Závislost na pH .....	32
3.1.2 Závislost na rychlosti polarizace.....	33
3.2 Vývoj metody stanovení dantrolenu s využitím BDDE.....	34
3.2.1 Metoda DPV .....	34
3.2.2 Metoda DCV .....	38
4 Závěr .....	41
Seznam použité literatury.....	42



## Seznam symbolů a zkratk

$A$	geometrická plocha elektrody [ $\text{cm}^2$ ]
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie (adsorptive stripping voltammetry)
AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie (anodic stripping voltammetry)
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BiFE	bismutová filmová elektroda
BRBS	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	koncentrace látky v roztoku [ $\text{mol/l}$ ]
CE	kompozitní elektroda (composite electrode)
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie (cathodic stripping voltammetry)
CV	cyklická voltametrie
$D$	difúzní koeficient [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
DAN	dantrolen
DCP	stejnoseměrná polarografie (direct current polarography)
DCV	stejnoseměrná voltametrie (direct current voltammetry)
DME	kapající rtuťová elektroda (dropping mercury electrode)
DPP	diferenčně pulsní polarografie
DPV	diferenčně pulsní voltametrie
$E$	potenciál [V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [V]
$E_{\text{fin}}$	konečný potenciál [V]
$E_{\text{in}}$	počáteční potenciál [V]
$E_{\text{m}}$	potenciál obratu [V]
$E_{\text{pa}}$	potenciál anodické vlny [V]
$E_{\text{pc}}$	potenciál katodické vlny [V]
$F$	Faradayova konstanta [C/mol]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
$I$	proud [A]
$I_{\text{c}}$	nabíjecí proud [A]
$I_{\text{lim}}$	limitní difúzní proud [A]
$I_{\text{pa}}$	proud anodické vlny [A]

$I_{pc}$	proud katodické vlny [A]
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
MFE	rtuťová filmová elektroda (mercury film electrode)
$n$	počet vyměněných elektronů
RSD	relativní směrodatná odchylka
SKE	nasyčená kalomelová elektroda
$t$	čas [s]
$U_p$	polarizační napětí [V]
$U_v$	vložené napětí [V]
$v$	rychlost polarizace [V/s]
$\delta$	Nernstova difúzní vrstva [cm]

## Úvod

Dantrolen patří do skupiny myorelaxancií, tedy látek schopných uvolňovat svalové křeče. Konkrétně působí na kosterní svaly, a to tak, že inhibuje sílu jejich jednotlivých kontrakcí. Nachází využití v léčbě spastických stavů, které mohou doprovázet roztroušenou sklerózu, poškození mozku či zranění míchy. Nejvýznamnější je však jeho využití pro léčbu maligní hypertermie. Dantrolen lze stanovovat např. pomocí kapalinové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tato práce je zaměřena na stanovení dantrolenu elektrochemicky.

Výhodou elektrochemických metod je kromě nízkých nákladů na vybavení rovněž vysoká citlivost a přesné výsledky stanovení. Polarografie byla objevena českým vědcem Jaroslavem Heyrovským, kterému byla za tento objev v roce 1959 udělena Nobelova cena za chemii. U voltametrických resp. polarografických metod jsou pro stanovení používány různé pracovní elektrody, ale nejoblíbenější elektrodou díky svým výborným vlastnostem zůstává stále rtuťová kapková elektroda. Rovněž elektrochemické metody, jejichž využití pro stanovení dantrolenu bylo popsáno v literatuře, využívají výhradně rtuťové elektrody. Tato elektroda je však z důvodu obav z toxicity rtuti nahrazována novými elektrodovými materiály, mezi které patří i borem dopovaná diamantová elektroda.

Cílem této bakalářské práce je tedy studium voltametrického chování dantrolenu na borem dopované diamantové elektrodě a návrh metody jejího stanovení.

# 1 Teoretická část

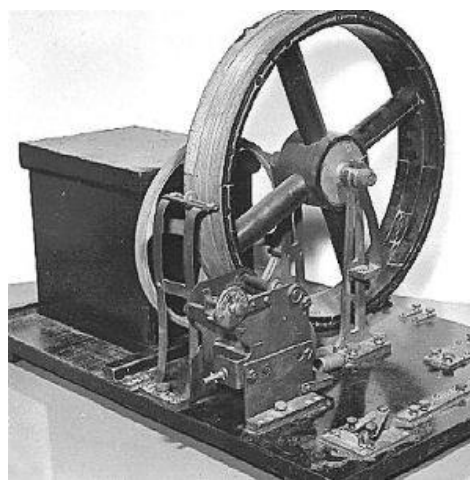
## 1.1 Voltametrie

Voltametrická metoda, při níž je používána jako pracovní elektroda rtuťová kapková elektroda s obnovovaným povrchem, se nazývá polarografie. Tuto metodu objevil v roce 1922 Jaroslav Heyrovský, jehož fotografie je uvedena na obrázku 1A [1]. V roce 1924 sestrojil společně s japonským vědeckým pracovníkem Shikatou automatický přístroj, který nazvali polarograf (Obr. 1B). Podle tohoto přístroje byl pak pojmenován celý nový obor, kterým je již zmíněná polarografie [2]. Ve čtyřicátých a padesátých letech patřila k nejcitlivějším analytickým metodám. Polarograficky se daly stanovit anorganické i organické látky v rozmezí koncentrací  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  mol/l. Rozvoj polarografické analýzy vyvrcholil 26. října 1959, kdy Švédská akademie věd udělila profesoru Heyrovskému Nobelovu cenu [1].

A



B



*Obrázek 1 Jaroslav Heyrovský (A) [3] a originál polarografu J. Heyrovského a M. Shikaty (B) [4]*

### 1.1.1 Úvod do voltametrie

Princip voltametrie spočívá ve sledování procházejícího proudu mezi dvěma elektrodami, které jsou ponořeny v roztoku elektrolytu, v závislosti na potenciálu. Při voltametrickém stanovení slouží jedna elektroda jako pracovní a druhá jako srovnávací. Pracovní elektroda je polarizovatelná, to znamená, že její potenciál je silně ovlivňován procházejícím proudem. Srovnávací elektroda je nepolarizovatelná

a její potenciál na velikosti procházejícího proudu téměř nezávisí. Polarizace elektrod může mít dvojitou příčinu, a to buď chemickou, nebo koncentrační. Chemická polarizace nastává, když u povrchu elektrody vznikají produkty elektrolýzy. Koncentrační polarizace je způsobena snížením koncentrace elektroaktivní látky u povrchu elektrody [5].

Polarizaci u dokonale polarizovatelné elektrody vyvolá i malý proud. Pokud se dokonale polarizovatelná a nepolarizovatelná elektroda zapojí do elektrochemického článku a vloží se mezi ně napětí  $U_v$ , dojde ke změně potenciálu u dokonale polarizovatelné elektrody. Tato změna potenciálu vede k vytvoření polarizačního napětí  $U_p$ , které kompenzuje vložené napětí  $U_v$ . Toto lze vyjádřit jednoduchou rovnicí (1):

$$U_v = U_p \Rightarrow U_v - U_p = 0 \quad (1)$$

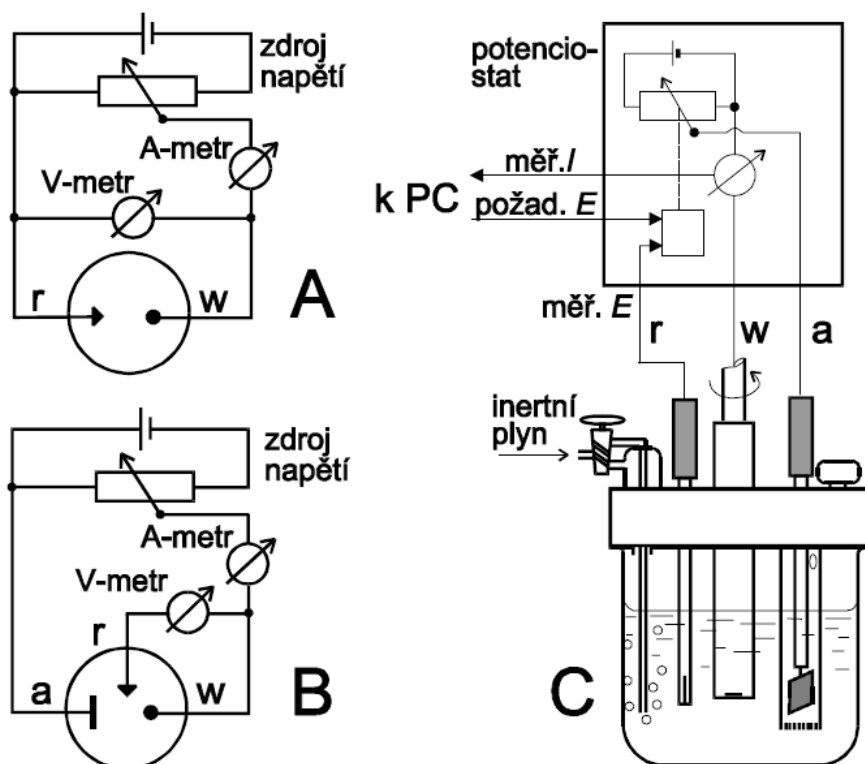
Polarizační napětí je dáno rozdílem potenciálů polarizovatelné a nepolarizovatelné elektrody. Protože je však potenciál nepolarizovatelné elektrody konstantní, bude se při vloženém napětí měnit pouze potenciál elektrody polarizovatelné [5].

Elektrický proud začne článkem procházet teprve potom, co se na polarizovatelné elektrodě začne vylučovat analyt. Elektroda se v tomto případě může chovat jako anoda nebo katoda. Na anodě jsou elektroaktivní látky oxidovány, to znamená, že jsou elektrony z roztoku odčerpávány. Pokud elektrony do roztoku proudí, probíhá redukce a elektroda je katodou [5]. Velikost anodického nebo katodického proudu potom odpovídá koncentraci stanovované látky v roztoku elektrolytu.

### 1.1.2 Uspořádání elektrochemického článku

Zapojení elektrochemického článku při voltametričtém měření může být dvouelektrodové nebo tříelektrodové. Napětí, které je vkládáno ze zdroje, se měří voltmetrem a ampérmetrem se měří proud procházející článkem. Při dvouelektrodovém uspořádání není přesně znám potenciál pracovní elektrody, protože při průchodu proudu se část vloženého napětí ztratí na odporu analyzovaného roztoku. S výhodou se proto používá tříelektrodové zapojení, u kterého je navíc pomocná elektroda, která má výrazně větší povrch, což má za následek, že je prakticky nepolarizovatelná. Proud potom teče mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Skutečná hodnota potenciálu pracovní elektrody se měří mezi elektrodou

pracovní a srovnávací za bezproudového stavu. U tříelektrodového zapojení se používá jako zdroj napětí elektronický potenciostat, který udržuje napětí na požadované hodnotě [6]. Schéma dvouelektrodového a tříelektrodového uspořádání elektrochemického článku je znázorněno na obrázku 2.



**Obrázek 2** Dvouelektrodové uspořádání (A), tříelektrodové uspořádání (B), příklad realizace u tříelektrodového uspořádání (C), (a – pomocná elektroda, r – referentní elektroda, w – pracovní elektroda) [6]

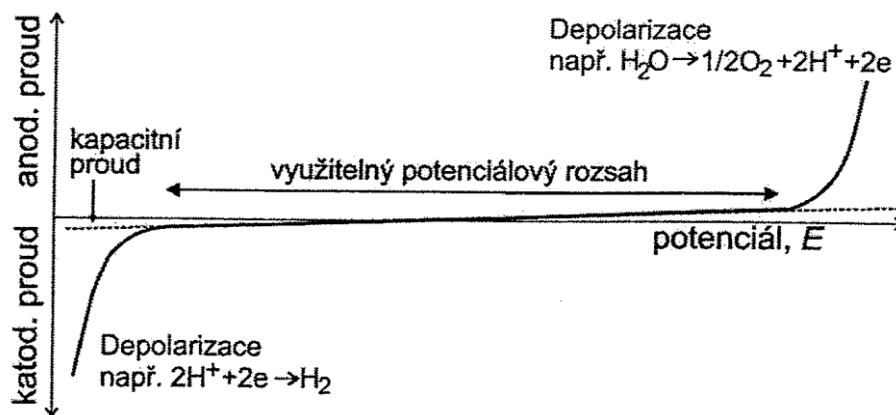
Jako pracovní elektrody se ve voltametii používají nejčastěji elektrody rtuťové nebo pevné, např. kovové (zlaté, stříbrné, platinové) a uhlíkové (elektroda ze skelného uhlíku, uhlíková pastová elektroda aj.). Jako pomocnou elektrodu lze použít platinový drátek a jako referentní elektrody slouží tzv. elektrody druhého druhu, např. nasycená kalomelová elektroda (SKE) nebo argentchloridová elektroda [6].

Transport látky k povrchu pracovní elektrody, popřípadě od pracovní elektrody může být zprostředkován difuzí, migrací a konvekcí. Hnací silou difuze je koncentrační spád, který je vyvolaný úbytkem elektroaktivní látky u povrchu elektrody způsobený elektrolýzou. Migraci vyvolává elektrické pole mezi elektrodami, které působí na

nabité částice v roztoku elektrolytu. Konvekce je tok částic, který může být způsobený mícháním roztoku nebo rozdílnými teplotami [5].

### 1.1.3 Polarizační křivka

Výsledkem voltametrického měření je polarizační křivka, což je závislost proudu protékající pracovní elektrodou na jejím potenciálu. Pokud bude na pracovní elektrodu vkládán potenciál lineárně se měnící s časem pouze v roztoku základního elektrolytu, který je volen tak, aby obsahoval látky oxidující nebo redukující se až při vysokých hodnotách potenciálu pracovní elektrody, poteče touto elektrodou pouze malý nabíjecí (kapacitní) proud,  $I_c$ . Rozsah potenciálů, kdy elektrodou prochází jen  $I_c$ , pak může být využit k analýze. Mohou být stanoveny tedy pouze takové analyty, které se budou v tomto potenciálovém rozsahu oxidovat či redukovat [7]. Polarizační křivka v roztoku základního elektrolytu je uvedena na obrázku 3. Využitelný potenciálový rozsah elektrody je v katodické oblasti omezen vylučováním vodíku a v anodické oblasti oxidací materiálu elektrody nebo rozkladem základního elektrolytu. Tento rozsah závisí na použitém rozpouštědle, složení základního elektrolytu, pH a materiálu pracovní elektrody.



Obrázek 3 Polarizační křivka ve vodném roztoku základního elektrolytu [7]

Bude-li v roztoku přítomna látka, která se v daném rozsahu potenciálů oxiduje nebo redukuje (tzv. depolarizátor), projeví se to na polarizační křivce voltametrickou vlnou. Výška voltametrické vlny odpovídá limitnímu difúznímu proudu,  $I_{lim}$ , pro který platí:

$$I_{lim} = \frac{nFAD}{\delta} c(A) \quad (2)$$

kde  $n$  je počet vyměňovaných elektronů v příslušné elektrodové reakci,  $F$  je Faradayova konstanta,  $A$  je geometrická plocha elektrody,  $D$  je difúzní koeficient příslušné látky,  $c$  je koncentrace příslušné látky a  $\delta$  je Nernstova difúzní vrstva. Limitní difúzní proud je přímo úměrný koncentraci analytu v roztoku a jeho hodnota je tedy ve voltametrické analýze analytickým signálem. Limitní proud je kvantitativní údaj. Kvalitativním údajem je při voltametrické analýze hodnota půlvlnového potenciálu  $E_{1/2}$ , tj. potenciálu v bodě, kdy  $I = I_{\text{lim}}/2$  [7].

Před vlastní analýzou je nutné k roztoku vzorku přidat indiferentní (základní) elektrolyt, který zajistí dostatečnou elektrickou vodivost prostředí. Tímto základním elektrolytem mohou být minerální kyseliny, hydroxidy nebo neutrální soli. Koncentrace indiferentního elektrolytu je podstatně vyšší než koncentrace analytu, čímž je eliminována nežádoucí migrace iontů analytu. Analyzovaný roztok se také obvykle musí zbavit rozpuštěného kyslíku, který by rušil voltametrické stanovení. Kyslík se odstraňuje probubláním inertním plynem, nejčastěji dusíkem [8].

#### 1.1.4 Polarografické / voltametrické metody

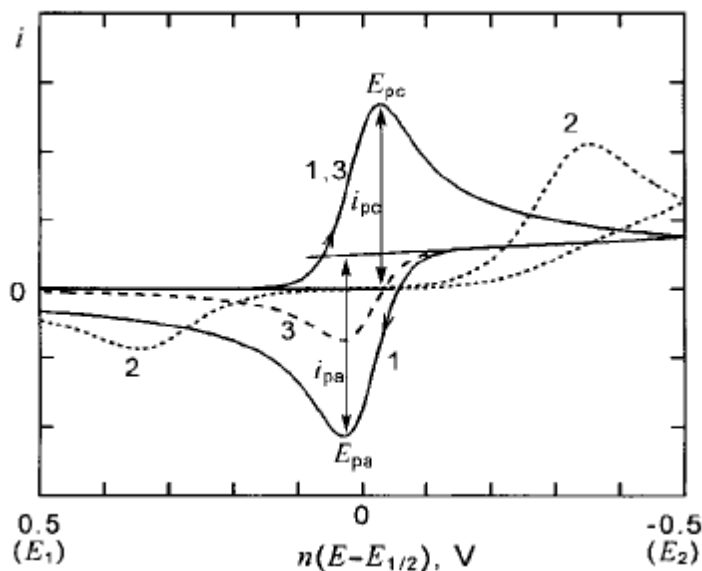
##### 1.1.4.1 DC voltametrie

DC voltametrie (DCV, direct current voltammetry) je základní voltametrická metoda, která bývá také označována jako stacionární voltametrie. Při DCV se potenciál vkládaný na pracovní elektrodu mění lineárně s časem. Tuto metodu lze považovat za stacionární při konstantním potenciálu, protože rychlost změny potenciálu je oproti rychlosti ustavování rovnováhy u elektrody dostatečně malá [7]. Pokud se v roztoku elektrolytu budou nacházet látky schopné oxidace nebo redukce, projeví se to na polarizační křivce proudovou vlnou. Tato proudová vlna pak poskytne informace o kvalitě analyzované látky v podobě půlvlnového potenciálu  $E_{1/2}$  a o koncentraci stanovované látky v podobě hodnoty limitního difúzního proudu  $I_{\text{lim}}$ . Touto metodou lze stanovovat anorganické i organické látky v rozmezí koncentrací  $5 \times 10^{-6}$  až  $2 \times 10^{-2}$  mol/l. Pokud se stanovované látky budou dostatečně lišit hodnotou půlvlnového potenciálu  $E_{1/2}$ , lze je stanovovat současně v jednom vzorku [9]. Rozdíl půlvlnových potenciálů potřebný pro současné stanovení dvou analytů je  $\Delta E_{1/2} > 200$  mV.



#### 1.1.4.2 Cyklická voltametrie

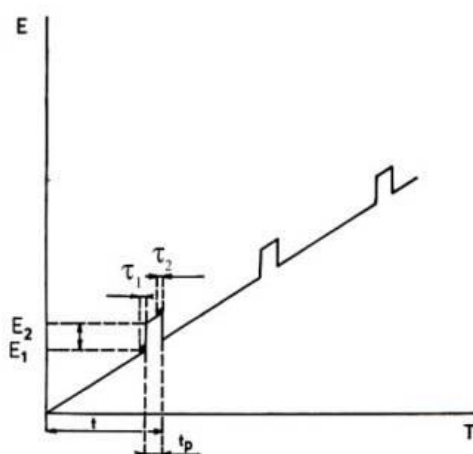
Cyklická voltametrie (CV) je často používaná technika vhodná pro studium redoxního chování látek a získávání informací o probíhajících elektrochemických reakcích. CV poskytuje informace o termodynamice redoxních procesů, kinetice přenosu náboje heterogenních reakcí nebo o adsorpčních procesech [10]. U této metody je potenciál vkládaný na pracovní elektrodu opět lineárně měněn, nejprve z hodnoty  $E_1$  na  $E_2$  (tzv. dopředný sken), a poté zpětně z hodnoty  $E_2$  na  $E_1$  (tzv. zpětný sken). Při dopředném skenu se získá katodický signál, který odpovídá redukcí oxidované formy látky. Při zpětném skenu se sleduje příslušný anodický signál odpovídající zpětné oxidaci redukované formy látky vzniklé při dopředném skenu. Postup může být i obrácený, tedy nejdříve proběhne oxidace analytu a poté se sleduje redukce oxidačního produktu analytu. Při reverzibilní elektrodové reakci jsou anodické a katodické proudové signály zpravidla stejně velké a jsou od sebe vzdálené o rozdíl potenciálů  $(E_p)_a - (E_p)_c = 0,059/n$ , kde  $n$  je počet vyměněných elektronů [9]. S rostoucí ireverzibilitou děje se píky od sebe vzdalují, zaoblují se a může dojít k jejich postupnému snižování až úplnému vymizení. Příklad cyklického voltamogramu je uveden na obrázku 4.



**Obrázek 4** Cyklický voltamogram ( $i_{pc}, i_{pa}$  – proud píky katodického a anodického,  $E_{pc}, E_{pa}$  – potenciál píky katodického a anodického, křivka 1 – reverzibilní reakce, křivka 2 – ireverzibilní reakce, křivka 3 – zvláštní typ reverzibilní reakce) [9]

### 1.1.4.3 Diferenční pulsní voltametrie

Diferenční pulsní voltametrie (DPV) je metodou, při které se pracovní elektroda polarizuje lineárně vzrůstajícím stejnosměrným napětím, na něž jsou vloženy napěťové pulsy trvající několik desítek ms. Amplituda těchto pulsů je konstantní. Závislost potenciálu na čase je znázorněna na obrázku 5. Proud se při DPV měří dvakrát. Nejprve několik ms před vložení pulsu ( $t_1$ ) a následně několik ms před ukončením pulsu ( $t_2$ ). Získají se tedy dvě proudové hodnoty, jejichž difference se zaznamenává v závislosti na hodnotě polarizačního napětí. Výsledkem měření je voltametrická vlna, která má tvar píku. Výška nebo plocha píku udává koncentraci depolarizátoru a poloha píku ( $E_p$ ) je kvalitativním údajem blízkým  $E_{1/2}$  [11]. Metodou DPV lze stanovovat látky do koncentrací  $10^{-7}$  až  $10^{-8}$  mol/l [12]. V porovnání s DCV je možné rozlišit látky s mnohem bližšími hodnotami  $\Delta E_{1/2}$ . Je možné stanovit vedle sebe látky, které se liší v hodnotách  $\Delta E_{1/2}$  minimálně o 50 mV.



Obrázek 5 Závislost potenciálu na čase pro DPV [13]

### 1.1.4.4 Rozpouštěcí voltametrie

U rozpouštěcí voltametrie se stanovení elektroaktivních látek neprovádí při jejich vylučování na pracovní elektrodě, ale při jejich elektrolytickém rozpouštění. Při rozpouštěcí voltametii se nejprve stanovovaná látka vyloučí na elektrodě při konstantním potenciálu a za intenzivního míchání. V závislosti na obsahu stanovované látky se nechá nahromadění probíhat různě dlouho. Samotné měření se pak zahájí lineární změnou potenciálu, kdy začne probíhat rozpouštění nahromaděných produktů elektrolýzy. Při tomto rozpouštění se zaznamenává

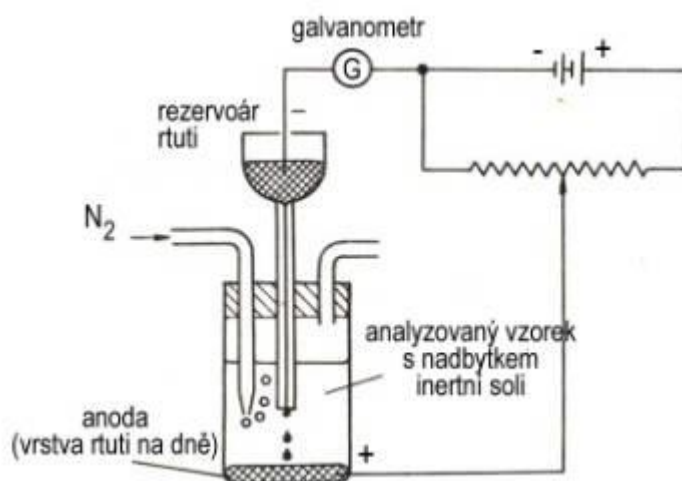
rozpouštěcí voltametrická vlna. Rozpouštěcí voltametrií lze stanovovat látky o koncentraci až  $10^{-12}$  mol/l [14]. Tato metoda se dělí na *anodickou rozpouštěcí voltametrii* (ASV, Anodic Stripping Voltammetry) a *katodickou rozpouštěcí voltametrii* (CSV, Cathodic Stripping Voltammetry). ASV je nejčastěji využívána pro stanovení kationtů kovů. Nejprve dochází k předběžnému elektrolytickému nahromadění analytu na elektrodě, kdy kovové ionty tvoří buď film na povrchu pevných elektrod, nebo amalgám na rtuťové elektrodě. Takto vyloučený kov je pak anodicky rozpouštěn zpět do roztoku. Při katodické rozpouštěcí voltametrii je k nakoncentrování analytu často využíváno oxidace materiálu elektrody. Vznikají kovové ionty, které tvoří s analytem málo rozpustnou sloučeninu, která je posléze katodicky rozpouštěna zpět do roztoku. Vedle uvedených metod se používá ještě *adsorpční rozpouštěcí voltametrie* (AdSV, Adsorptive Stripping Voltammetry), při které nedochází k elektrolytickému nahromadění analytu, ale využívá se adsorpce některých povrchově aktivních látek na povrchu elektrody [15].

### 1.1.5 Pracovní elektrody ve voltametrii

#### 1.1.5.1 Rtuťové pracovní elektrody

Nejčastěji používanými rtuťovými elektrodami jsou rtuťové kapkové elektrody, které lze použít buď jako kapající rtuťové elektrody (DME, dropping mercury electrode) nebo jako visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE, hanging mercury drop electrode). Schéma zapojení DME je uvedeno na obrázku 5. Tato elektroda se skládá ze zásobníku rtuti a z kapiláry, u které je průtok rtuti ovládán jehlovým ventilem. Polarograf řídí elektronicky zdvih a pokles jehly. Zařízení je vybaveno odtrhávačem kapek, který periodicky odtrhává kapku rtuti ve shodě s nastavenou dobou kapky na přístroji [12]. DME je využívána u polarografických metod. Oproti jiným elektrodám má řadu výhod. Povrch elektrody se pravidelně obnovuje během analýzy jejím pravidelným odkapáváním a jsou tak zcela eliminovány problémy s pasivací elektrody. HMDE se liší tím, že celá analýza probíhá na jedné kapce rtuti a povrch se obnovuje mezi jednotlivými měřeními, kdy opět dojde k odkápnutí původní a vytvoření nové rtuťové kapky. Metody využívající stacionární pracovní elektrody (tedy i HMDE) se označují jako voltametrické. Dalšími výhodami rtuťových kapkových elektrod je to, že mají ideálně hladký a reprodukovatelný povrch, který je prakticky nedotčený předchozí elektrolýzou, a vykazují velice dobré elektrochemické vlastnosti, zejm. dokonalá polarizovatelnost a vysoké přepětí vodíku. Malé rozměry

těchto elektrod dovolují provádět měření i v nepatrných objemech zkoumaného roztoku. Nevýhodou rtuťových elektrod je elektrolytické rozpouštění Hg při anodické polarizaci, kdy nemohou být použity v oblasti pozitivních potenciálů [16]. Navíc nejsou mechanicky stabilní a nejsou vhodné pro použití v průtokových analyzátoch. V praxi je mnohem více rozšířená HMDE vzhledem k nižší spotřebě rtuti ve srovnání s DME [10].



**Obrázek 6** Schéma zapojení rtuťové kapající elektrody [17]

Další variantu rtuťových elektrod představují rtuťové filmové elektrody (MFE, mercury film electrode). Tyto elektrody se skládají z velmi tenkého rtuťového filmu (10-100  $\mu\text{m}$ ) a nosiče z vodivého materiálu. Vodivým materiálem bývá nejčastěji skelný uhlík, který je vůči rtuti inertní. Výhodou skleného uhlíku je rovněž snadná úprava jeho povrchu. Rtuťové filmy lze připravit metodou *in situ* nebo *ex situ*. Při postupu *in situ* se rtuťový film elektrolyticky vylučuje přímo v měřeném roztoku spolu s analytem. Při metodě *ex situ* nejprve dojde k vyloučení rtuťového filmu na povrchu vhodného materiálu z roztoku rtuťnaté soli a teprve potom je takto připravená elektroda převedena do analyzovaného roztoku. Zdrojem rtuti pro přípravu rtuťových filmů je obvykle  $\text{HgNO}_3$ . Mezi výhody rtuťových filmových elektrod patří nízký detekční limit, vysoká spolehlivost a citlivost měření. Nevýhodou těchto elektrod je nižší přepětí vodíku a vyšší šum [10, 18].

Rtuť je doposud nejlepším elektrodovým materiálem z hlediska reprodukovatelnosti výsledků [22]. Jeví se rovněž jako nejvhodnější pro voltametrické stanovení založené

na redukci látek. Díky těmto vlastnostem zůstává v elektrochemii rtuť stále oblíbeným materiálem [23]. Kvůli obavám z její toxicity je manipulace s ní omezena legislativou Evropské unie [19].

#### 1.1.5.2 Pevné pracovní elektrody

Pevné pracovní elektrody se obvykle díky širokému potenciálovému anodickému oknu používají pro sledování oxidovatelných látek. Nejčastějšími materiály, které se využívají pro výrobu pevných pracovních elektrod, jsou různé formy uhlíku nebo kovy (např. platina a zlato). Důležitým faktorem při použití pevných elektrod je závislost odezvy na stavu povrchu elektrody. Pro získání reprodukovatelných výsledků je nutné povrch takovýchto elektrod předčistit a vyleštit. Předběžné ošetření je závislé na použitém materiálu. U kovových elektrod je běžným postupem mechanické leštění, zatímco u elektrod na bázi uhlíku jsou to častěji chemické, elektrochemické nebo tepelně povrchové úpravy. Pevné elektrody mohou být stacionární nebo rotující, obvykle v uspořádání rovinného disku. Elektrodový materiál bývá ve formě tyčinky, která je vložena do izolačního materiálu např. teflonu. Diskové elektrody se také používají k měření v průtoku ve spojení s thin-layer, nebo wall-jet detektory. Rostoucí pozornost je věnována tištěným (screen-printed) elektrodám a elektrodám na bázi křemíku v podobě tenkovrstvých čipů [10]. Nevýhodou pevných pracovních elektrod může být špatná regenerace a reprodukovatelnost povrchu, problémy s pasivací a tzv. elektrodová paměť. Jejich výhodou oproti rtuťovým elektrodám je již zmíněný vyšší anodický potenciálový rozsah, mechanická odolnost a nízký elektrický odpor [20].

Dnes je věnována velká pozornost novým elektrodoým materiálům, kterými jsou např. amalgámové elektrody, bismutové filmové elektrody, diamantové filmové elektrody a další uhlíkové materiály [21]. Jedním z důvodů, proč je důležité vyvíjet nové elektrodové materiály, je náhrada rtuťových elektrod s ohledem na obavy související s možnou toxicitou rtuti, resp. jejích sloučenin [22]. Dalším důvodem pro zavádění nových elektrod je snaha dosáhnout co nejlepší selektivity a detekčních schopností [23].

Pevné amalgámové elektrody mohou být tvořeny pevným amalgámem různých kovů (např. Ag, Au, Cu, Ir), ale nejběžnějším typem využívaným v praxi je stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE), kterou u nás v roce 2000 poprvé popsali Novotný a

Yosypchuk [24]. Tyto elektrody se používají buď jako pevné leštěné nebo s povrchem modifikovaným rtuťovým filmem či meniskem [25]. AgSAE se svými elektrochemickými vlastnostmi nejvíce blíží rtuťovým elektrodám, zejm. vysokým přepětím vodíku a tedy širokým potenciálovým oknem v katodické oblasti. Mají i řadu dalších výhodných vlastností, kterými jsou mechanická odolnost, snadná manipulovatelnost, možnost elektrochemické regenerace elektrodového povrchu a netoxický elektrodový materiál [25, 26].

Bismutové elektrody jsou rovněž perspektivní náhražkou rtuťových elektrod. Nejčastěji se používají bismutové filmové elektrody (BiFE), které byly poprvé popsány v práci [27]. Jako substrát pro povlaky bismutu lze použít skelný uhlík, grafit nebo měkké uhlíkové pasty, ale i kovy (např. měď). Vylučování bismutového filmu může pobíhat *in situ* nebo *ex situ*. Při postupu *in situ* se povlak bismutu vylučuje elektrolyticky přímo v měřeném roztoku. Současně probíhá i vylučování analytu za podmínek prekoncentračního kroku anodické rozpouštěcí voltametrie. Zdrojem bismutu v měřeném roztoku je vhodná disociující sůl, obvykle  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , která musí být v analyzovaném roztoku přítomna v dostatečném nadbytku. Koncentrace této soli by měla být  $10\times$  až  $20\times$  vyšší než je předpokládaná koncentrace stanovovaných iontů. Takto připravený Bi film je vždy na konci měření při pozitivním potenciálu z povrchu elektrody rozpuštěn a před další analýzou během akumulace znova vyloučen spolu s analytem. Pokud je film připravován *ex situ*, probíhá vylučování Bi z pokovovacího roztoku  $\text{Bi}^{3+}$  a poté je elektroda přenesena do roztoku elektrolytu s analytem a probíhá vlastní analýza. Takto připravený film může být používán opakovaně pro několik následujících měření. Výhodou bismutových filmových elektrod je relativně vysoké vodíkové přepětí umožňující sledování redukčních reakcí, možnost využití rozpouštěcích technik stejně jako v případě HMDE nebo AgSAE, jejich levná a jednoduchá příprava a malá citlivost na přítomnost kyslíku rozpuštěného v roztocích. Nevýhodou může být horší reprodukovatelnost povrchu a riziko pasivace [23].

Vedle již zmíněných pracovních elektrod směřujících k náhradě rtuti se používají i různé netradiční uhlíkové elektrodové materiály. Pastové uhlíkové elektrody (CPE) se skládají z práškového uhlíku a pojiva. Většinou se používá spektroskopický grafitový prášek a jako pojivo lipofilní organická kapalina např. silikonový nebo parafinový olej [28]. Tyto elektrody mají řadu výhod, významné jsou zejména rychlá

obnovitelnost povrchu, nízký šum, široké potenciálové okno a možnost modifikace povrchu. Nevýhodou uhlíkových pastových elektrod je nízká reprodukovatelnost výsledků [29].

Kompozitní elektrody (CE) jsou tvořené z materiálu představujícího směs alespoň jednoho izolátoru (např. ceresinový vosk, teflon, polyetylen, epoxidové či metakrylátové pryskyřice aj.) a jednoho vodiče (uhlík, práškové kovy aj.), případně různých příměsí (grafit aj.), které umožňují dosažení specifických vlastností materiálu pro stanovení či detekci zvolených analytů [30-33]. CE jsou velmi stabilní, mechanicky odolné, jejich povrch lze obnovovat leštěním i elektrochemicky, mají dlouhou životnost, nepodléhají změnám v prostředí organických rozpouštědel a jejich povrch lze modifikovat. Podle použitého elektrolytu a typu elektrody mohou být CE použitelné v oblasti jak negativních tak i velmi pozitivních potenciálů. Jako všechny pevné elektrody vykazují i CE hůře obnovovatelný povrch než elektrody rtuťové. K nevýhodám pevných elektrod patří i problémy způsobené časovými změnami kvality jejich povrchu. Každá analýza je zatížena „historií“ elektrody, a to jak z hlediska časového, tak i z hlediska kvality a kvantity probíhajících reakcí. Běžně je povrch elektrody atakován různými látkami, „stárne“ a pasivuje se [32, 33].

#### 1.1.6 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Použití diamantové indikační elektrody bylo poprvé popsáno v roce 1992 v práci [34]. Diamant je nejtvrďší forma uhlíku. Je považovaný za výborný materiál pro mnoho aplikací díky neobvyklým fyzikálním a chemickým vlastnostem jako vysoký tepelný odpor, vysoká tepelná vodivost, vysoká odolnost proti korozi, nízký součinitel tření, chemická inertnost a optická průhlednost. Nachází využití ve vysoce výkonných elektronických a elektrooptických zařízeních [35]. Diamant se vyznačuje velmi dobrou mechanickou a chemickou stabilitou. Je to přírodní izolant, proto nelze pro elektroanalytické účely použít samotný diamant, ale je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji jsou používány atomy boru. Výhodou těchto elektrod je jejich mimořádně široké potenciálové okno (v 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je zhruba od -1,5 V do +1,5 V), jejich biokompatibilita, nízká kapacita elektrické dvojvrstvy, která má za následek nízký zbytkový proud a velmi malý šum, dále je to mechanická robustnost a stabilita. Další výhodou je, že nedochází k zanášení povrchu elektrody produkty elektrolýzy [36].

Borem dopované diamantové filmy lze připravit metodou chemické depozice par, při které je nejčastěji používaná směs methanu a vodíku. Dopování borem je pak zajištěno přidáváním diboranu do směsi plynů [37]. Objemový poměr methanu a vodíku při depozici je 0,5 až 0,2 % a tlak se pohybuje od 1,3 až do 13 kPa. Při depozici se používají buď žhavená vlákna o teplotě 2100 °C nebo je využíváno mikrovlnného ohřevu s výkonem 1000 až 1300 W. V reaktoru je přítomen atomární kyslík, který zabraňuje depozici nenasycených  $sp^2$ - hybridizovaných uhlíkových struktur. Tímto je potlačován vznik grafitického uhlíku v diamantovém filmu. Nosičem pro diamantový film bývá destička z křemíku s nízkým odporem, wolfram nebo molybden. Předem je nutno destičku očistit a přešetřit brusnou směsí, která se skládá z diamantového prášku a  $B_2O_3$ . Částice, které se zachytí na povrchu destičky, pak slouží jako krystalizační centra pro růst diamantového filmu. Za těchto podmínek se rychlost tvorby diamantového filmu pohybuje v rozmezí 0,1 až 1  $\mu m$  za hodinu. Depozice filmu o tloušťce několik mikrometrů pak trvá řádově 24 hodin [38]. Vlastnosti BDDE připravených za různých podmínek depozice filmu s různým obsahem boru od 1000 do 20000 ppm byly popsány v literatuře [39].

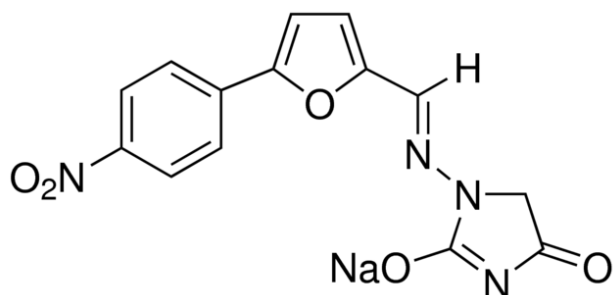
Borem dopovaná diamantová elektroda se využívá zejména při analýze oxidovatelných organických látek. Příkladem může být analýza potravin, konkrétně stanovení alkaloidu harmalinu v přírodních potravinářských výrobcích [40], fenolických antioxidantů v potravinách [41] nebo stanovení kofeinu ve vzorcích nápojů [42]. Byla popsána řada metod pro stanovení fenolů, nitrofenolů nebo aminů [43, 44]. Byly analyzovány různé karcinogenní látky [45, 46], léčiva [47, 48] nebo pesticidy [49-53]. Vedle organických látek ale mohou být stanoveny i kovy [54, 55]. Je zřejmé, že BDDE je možné použít ve velkém množství různých analytických aplikací a jsou tedy velmi perspektivními elektrodami pro budoucnost elektrochemie.

## 1.2 Dantrolen

Dantrolen (DAN) byl poprvé syntetizován v roce 1967 jako možné antibiotikum. Jeho strukturní vzorec je uveden na obrázku 7. Při pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že vyvolává svalovou slabost a našel tedy využití k dlouhodobé léčbě svalových křečí různého původu [56]. Dá se použít ke zmírnění spastických stavů, které mohou doprovázet roztroušenou sklerózu, poškození mozku či zranění míchy. Nejdůležitější je jeho použití při léčbě maligní hypertermie, kterou může vyvolat celková anestezie nebo podání neuroleptik [57]. Do terapie maligní hypertermie byl



DAN zařazen v roce 1975 v perorální formě a v roce 1979 ve formě intravenózní, která byla pro léčbu maligní hypertermie rozhodující. Po podání DAN se mohou objevit nežádoucí účinky, kterými jsou svalová slabost, závratě, únava, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, průjem. Může se objevit také dechová deprese a sedace [58].



*Obrázek 7* Strukturální vzorec dantrolenu sodného [59]

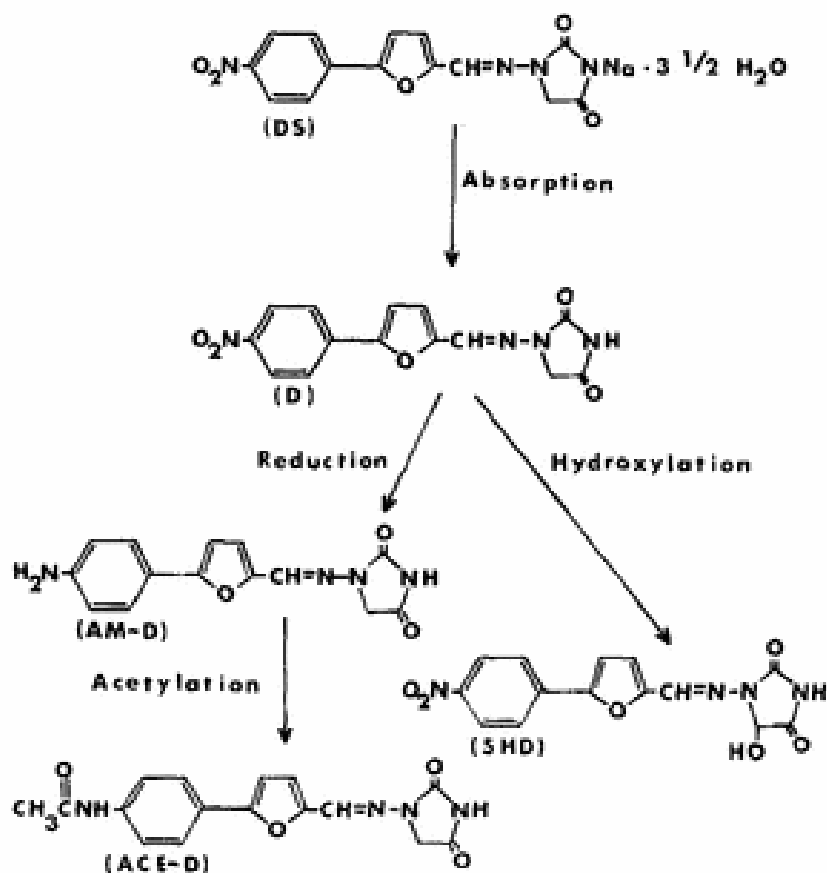
### 1.2.1 Mechanismus účinku a eliminace dantrolenu v organismu

Mechanismus účinku DAN spočívá v tom, že inhibuje sílu jednotlivých kontrakcí kosterního svalu. Blokuje uvolnění kalciových iontů ze sarkoplazmatického retikula, aniž by ovlivňoval jejich zpětné vstřebávání. Je-li DAN podáván v terapeutickém množství, nepůsobí na hladkou svalovinu ani na myokard [57]. Eliminační poločas DAN se odhaduje na 12 hodin, u dětí je to přibližně 10 hodin. V jaterních mikrozomech se metabolizuje na 5-hydroxydantrolen, který působí jako relaxant kosterního svalstva. Součástí molekuly DAN je nitroskupina umístěná na benzenovém jádře. Redukcí této skupiny pak vzniká aminodantrolen, který je metabolizován na acetylovaný derivát. DAN a jeho metabolity jsou potom vylučovány převážně močí a žlučí [60]. Na obrázku 8 je popsána metabolická cesta DAN.

### 1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti dantrolenu

Dantrolen sodný je hydratovaná 1-[5-(4-nitrofenyl)-2-furanyl-metylen-amino]-2,4-imidazolidindiová-sodná sůl. Molekula je rovinná s výjimkou fenolového kruhu, který se otáčí přibližně 30° ven z roviny kruhu furanu[56]. Jedná se o pevnou žlutou krystalickou sůl, která je silně lipofilní a tedy velmi špatně rozpustná ve vodě. Rozpouští se v organických rozpouštědlech jako je dimethylsulfoxid a dimethylformamid. Rozpustnost dantrolenu v DMSO je přibližně 2,5 mg/ml a v DMF je to 12,5 mg/ml. Krystalická sůl by se měla skladovat při teplotě -20 °C, při

které vydrží být stabilní přibližně 2 roky. Molekulová hmotnost dantrolenu sodného činí 336,23 g/mol [62].



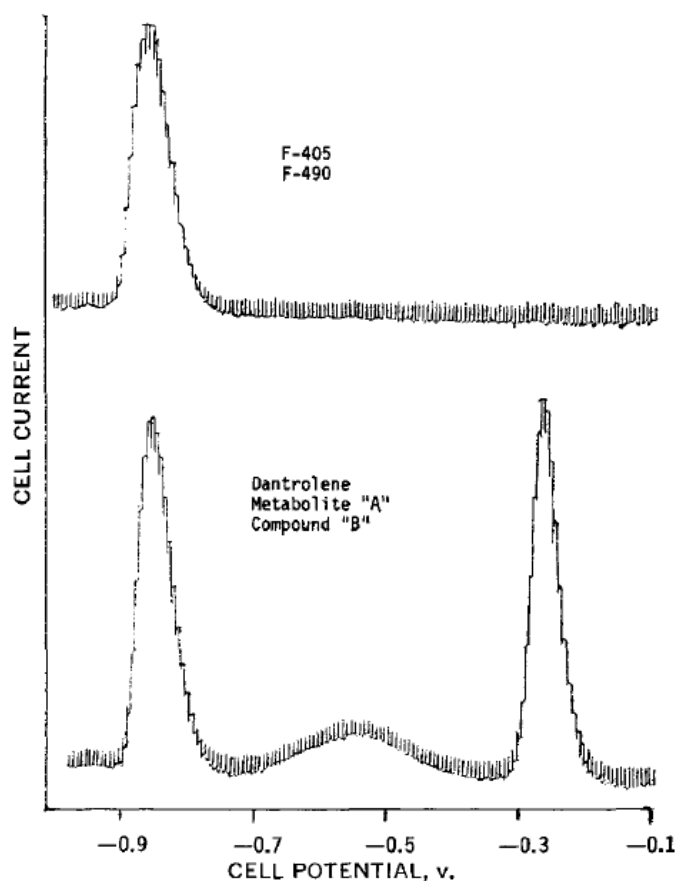
**Obrázek 8** Metabolická cesta dantrolenu sodného, kde AM-D je aminodantrolen, ACE-D je acetylovaný derivát DAN a 5HD je 5-hydroxydantrolen [61]

### 1.2.3 Voltametrické chování dantrolenu

V literatuře jsou popsány práce týkající se stanovení DAN pomocí kapalinové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s různými detekčními systémy [63, 64, 65]. Tyto metody umožňují přesné a citlivé stanovení, ale často vyžadují složitou a časově náročnou předúpravu vzorku. Navíc instrumentální vybavení je finančně velmi náročné. Elektroanalytické metody představují poměrně levnou alternativu k těmto technikám, která často nevyžaduje žádnou nebo jen jednoduchou úpravu vzorků před vlastní analýzou. Navíc tyto metody jsou velice citlivé, přesné a často i dostatečně selektivní.

O voltametrickém resp., polarografickém chování DAN pojednávají 4 práce [66-69], které všechny využívají rtuťové elektrody a soustředí se na redukční chování analytu.

V první práci [66] stanovovali autoři DAN a jeho metabolity pomocí diferenční pulsní polarografie. Měření probíhala v tříelektrovém uspořádání, kdy jako pracovní elektroda sloužila DME, jako referentní SKE a pomocnou elektrodou byl platinový drátek, v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (BRBS) o pH 4. Záznamy získané při DP polarografii DAN a jeho metabolitů jsou uvedeny na obrázku 8. Je zřejmé, že nitroskupina přítomná v molekule DAN, resp. jeho oxidačních produktů se redukovala při potenciálech  $-0,26$  a  $-0,58$  V. Pro DAN i oba jeho metabolity je společný signál při potenciálu  $-0,86$  V, který odpovídá redukcí azomethinové vazby. Na obrázku 9A je tedy uveden záznam pro redukovaný metabolit DAN, který již neobsahuje nitroskupinu. Na obrázku 9B je zaznamenán katodický DP polarogram odpovídající redukcí DAN, resp. jeho oxidačního metabolitu. Navržená metoda byla aplikována při analýze biologických vzorků (moč, krevní plazma). Detekční limit (LOD) byl  $3 \times 10^{-7}$  mol/l [66].



**Obrázek 9** Diferenční pulsní polarogram redukčního metabolitu (A) a DAN, resp. jeho oxidačního metabolitu (B) [66]

Polarografickým stanovením DAN se zabývala rovněž práce Reddyho a kol. [68]. Autoři se zaměřili na studium polarografického chování látky a sledovali zejména vliv pH na odezvu analytu. Jako optimální pro stanovení zvolili opět pH 4 a dosáhli hodnoty LOD  $7 \times 10^{-7}$  mol/l [68]. I v práci [69] byl DAN redukován na DME v prostředí o pH 3 ve dvou krocích, kdy byly získány dva píky při potenciálech  $-0,18$  a  $-0,81$  V. První pík podle autorů odpovídá 4-elektronové redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu a druhý redukci azomethinové skupiny. Tato práce však nebyla zaměřena na stanovení DAN, ale na studium jeho fyzikálně chemických vlastností, např. pro stanovení  $pK_a$  [69].

Ghoneim ve své práci [67] stanovoval DAN ve farmaceutickém přípravku pomocí různých voltametrických technik a při různých hodnotách pH (2-11). Jako základní elektrolyt použil BRBS. Měření probíhala rovněž v tříelektrodovém uspořádání, kdy jako pracovní elektrody sloužily DME nebo HMDE, jako referentní byla použita argentchloridová elektroda a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek [67]. Dosažené detekční limity jednotlivých metod jsou spolu s hodnotami pH, při kterých byly získány, shrnuty v následující tabulce 1.

**Tabulka 1** Detekční limity použitých metod [67]

Elektroda	Metoda	Elektrolyt	LOD [mol/l]
DME	DCP	BRBS (pH 5)	$3,0 \times 10^{-6}$
DME	DPP	BRBS (pH 5)	$3,0 \times 10^{-7}$
HMDE	LS-AdCSV	BRBS (pH 11)	$1,8 \times 10^{-9}$
HMDE	DP-AdCSV	BRBS (pH 11)	$3,0 \times 10^{-9}$
HMDE	SW-AdCSV	BRBS (pH 11)	$2,1 \times 10^{-10}$

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Standardní roztok DAN o látkové koncentraci 0,001 mol/l byl připraven rozpuštěním navážky 0,01681 g pevného DAN (98%, Sigma-Aldrich, Česká republika) v metanolu (Penta-Švec, Česká republika). Takto připravený roztok byl pro další měření uchováván v lednici. Pro přípravu základního elektrolytu byl používán Brittonův-Robinsonův pufr (BRBS). Požadované hodnoty pH B-R pufru byly připravovány pod pH-metrem mísením kyselé a alkalické složky. Kyselá složka obsahovala  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}$  o látkové koncentraci 0,04 mol/l (vše Lachema, Brno, Česká republika). Alkalickou složku tvořil NaOH o látkové koncentraci 0,2 mol/l (Lachema, Brno, Česká republika). Jako základní elektrolyt byl rovněž používán roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o různých koncentracích připravený z 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Penta-Švec, Česká republika).

### 2.2 Přístrojové vybavení

Všechny voltametrické experimenty byly prováděny pomocí počítačem řízeného Eco-Tribo Polarografu (Polaro-Sensors, Česká republika) vybaveného programem POLAR.PRO (verze 5.1). Měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda sloužila borem dopovaná diamantová elektroda ( $7.07 \text{ mm}^2$ ) s poměrem B/C (bor/uhlík) v plynné fázi 1000 ppm (deklarované výrobcem Windsor Scientific, Anglie), jako referentní byla použita nasycená argentschloridová elektroda (sat. Ag/AgCl) a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek (obě Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Měření probíhala při laboratorní teplotě ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Pro přípravu BRBS o požadované hodnotě pH byl použit pH-metr Accumet AB150 (Fisher Scientific, USA) a roztoky DAN byly připraveny použitím ultrazvukové lázně Bandelin Sonorex (Schalltec, Germany).

### 2.3 Pracovní postupy

#### 2.3.1 Voltametrická měření

Cyklická voltametrie (CV) a stacionární voltametrie (DCV) byly použity pro studium voltametrického chování DAN na BDDE. Byly zaznamenány závislosti získaných signálů na pH a na rychlosti polarizace. První pokusné měření CV bylo provedeno v rozmezí potenciálů od  $-800 \text{ mV}$  do  $+2000 \text{ mV}$  s rychlostí polarizace  $50 \text{ mV/s}$ .

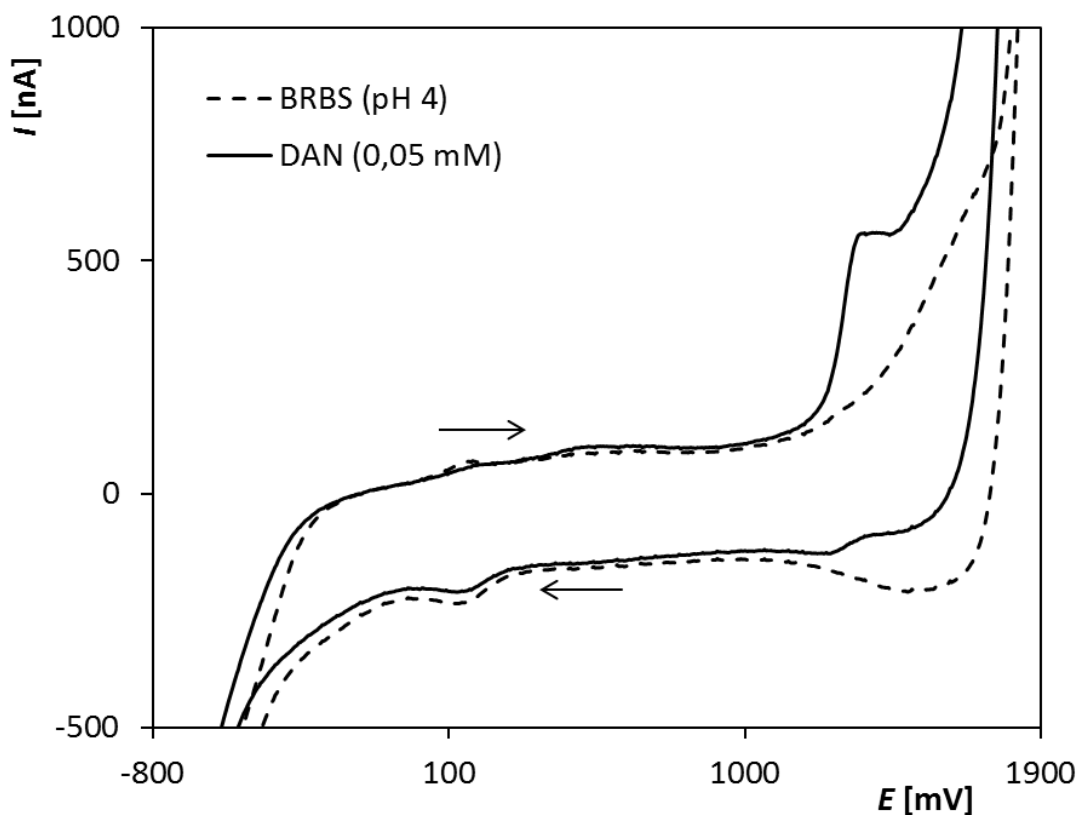
Voltametrické chování DAN v závislosti na pH elektrolytu bylo zkoumáno rovněž metodou CV za stejných podmínek. Vliv rychlosti polarizace byl zaznamenán v rozmezí potenciálů od  $-500$  mV do  $+1800$  mV s rychlostí polarizace 25-500 mV/s. DCV a DPV byly testovány pro stanovení DAN. Pro metodu DPV byly optimalizovány následující parametry: rychlost polarizace ( $v$ ) 40 mV/s, výška pulzu  $+50$  mV a šířka pulzu 20 ms. Pro metodu DCV byla jako optimální rychlost polarizace zvolena hodnota 200 mV/s. Výšky píků byly vyhodnocovány od základní linie tvořené přímkou spojující minima před a za píkem.

### 2.3.2 Příprava BDDE k měření

Příprava BDDE probíhala vždy pouze jednou na začátku práce prostředí v  $H_2SO_4$  o koncentraci 0,1 mol/l. V prvním kroku byl na elektrodu vložen čistící potenciál  $+2000$  mV po dobu 60 s. Při pozitivním potenciálu probíhá oxidace možných kontaminantů přítomných na povrchu elektrody. Poté byla elektroda katodicky terminována vodíkem při potenciálu  $-1000$  mV rovněž po dobu 60 s. Ve druhém kroku bylo na pracovní elektrodu vloženo 20 potenciálových cyklů v rozsahu potenciálů od  $-1000$  mV do potenciálu  $+2000$  mV, během nichž došlo k ustálení odezvy elektrody. Po ukončení této čistící procedury byla BDDE připravena k měření. Během práce pak již nebyla prováděna žádná regenerace elektrodového povrchu.

### 3 Výsledky a diskuze

Na úvod experimentální části práce byl změřen cyklický voltamogram DAN na BDDE. Měření probíhalo v prostředí BRBS o pH 4 od počátečního potenciálu ( $E_{in}$ ) -800 mV do potenciálu obratu ( $E_m$ ) +2000 mV rychlostí polarizace ( $v$ ) 50 mV/s. Koncentrace DAN v roztoku byla  $5 \times 10^{-5}$  mol/l. Získaný cyklický voltamogram je uveden na obrázku 10. Po přidavku DAN do polarografické nádoby k základnímu elektrolytu byl pozorován jeden výrazný oxidační signál okolo potenciálu +1350 mV. Při zpětném skenu byl pak zaznamenán také katodický signál kolem potenciálu +1250 mV. Výška katodického signálu je však v porovnání s anodickým  $10 \times$  menší a také rozdíl potenciálů obou píků je větší (cca 100 mV) než je teoretická hodnota odpovídající reverzibilnímu průběhu elektrodové reakce. Proto se v případě sledované oxidačně-redukční reakce DAN na BDDE jedná o quazi-reverzibilní elektrochemický proces. Vzhledem k intenzitě byl pro další studie využíván pouze oxidační signál, který dosahoval mnohem vyšších proudových hodnot a jevil se proto vhodnějším pro analytické účely.

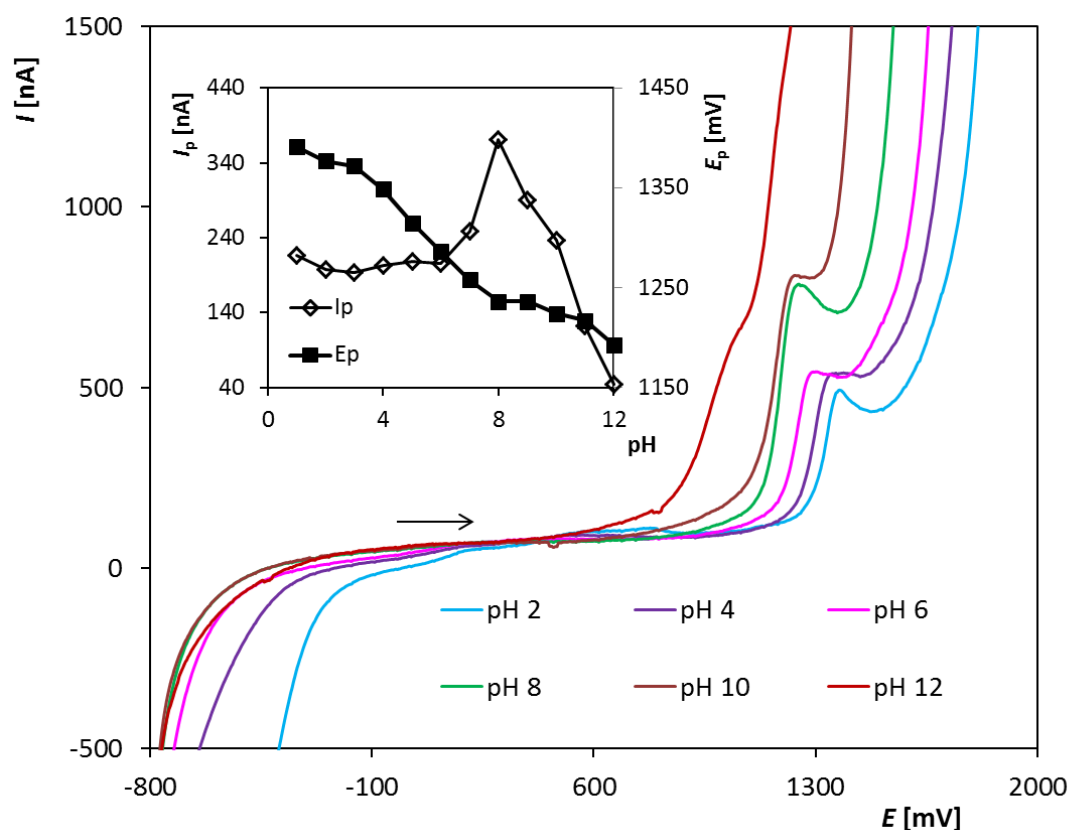


**Obrázek 10** Cyklický voltamogram DAN o koncentraci  $5 \times 10^{-5}$  mol/l v prostředí BRBS o pH 4 zaznamenaný na BDDE. Parametry:  $E_{in} = -800$  mV,  $E_{fin} = +1900$  mV,  $v = 50$  mV/s

### 3.1 Studium voltametrického chování dantrolenu na BDDE

#### 3.1.1 Závislost na pH

Studium voltametrického chování DAN v závislosti na pH probíhalo rovněž metodou CV v prostředí  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci 0,05 mol/l (pH 1) a BRBS v rozsahu pH (2-12). Měření probíhalo v rozsahu potenciálů  $E_{in}$  -800 mV až  $E_m$  +1900 mV rychlostí polarizace 50 mV/s. Pro tuto studii byla rovněž použita koncentrace DAN  $5 \times 10^{-5}$  mol/l. Záznam anodických částí vybraných voltametrických křivek je uveden na obrázku 11. Z vložené závislosti  $I_p$  a  $E_p$  na pH je patrné, že v kyselém prostředí se  $I_p$  prakticky nemění, v neutrálním prostředí roste do maximální hodnoty  $I_p$  při pH 8 a poté opět rychle klesá. Rovněž dochází k posunu polohy oxidačního píku směrem k negativnějším potenciálům s rostoucí hodnotou pH. Vzhledem k výšce a tvaru sledovaného signálu byl pro všechna následující měření jako základní elektrolyt zvolen BRBS o pH 8.



**Obrázek 11** Anodická část cyklických voltamogramů DAN v závislosti na pH elektrolytu zaznamenaná na BDDE. Metoda CV, elektrolyty: 0,05mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH1), BRBS (pH 2-12), parametry:  $E_{in} = -800$  mV,  $E_m = +1900$  mV,  $v = 50$  mV/s,  $c_{DAN} = 5 \times 10^{-5}$  mol/l. Vložený graf závislosti  $I_p$  a  $E_p$  DAN na pH elektrolytu

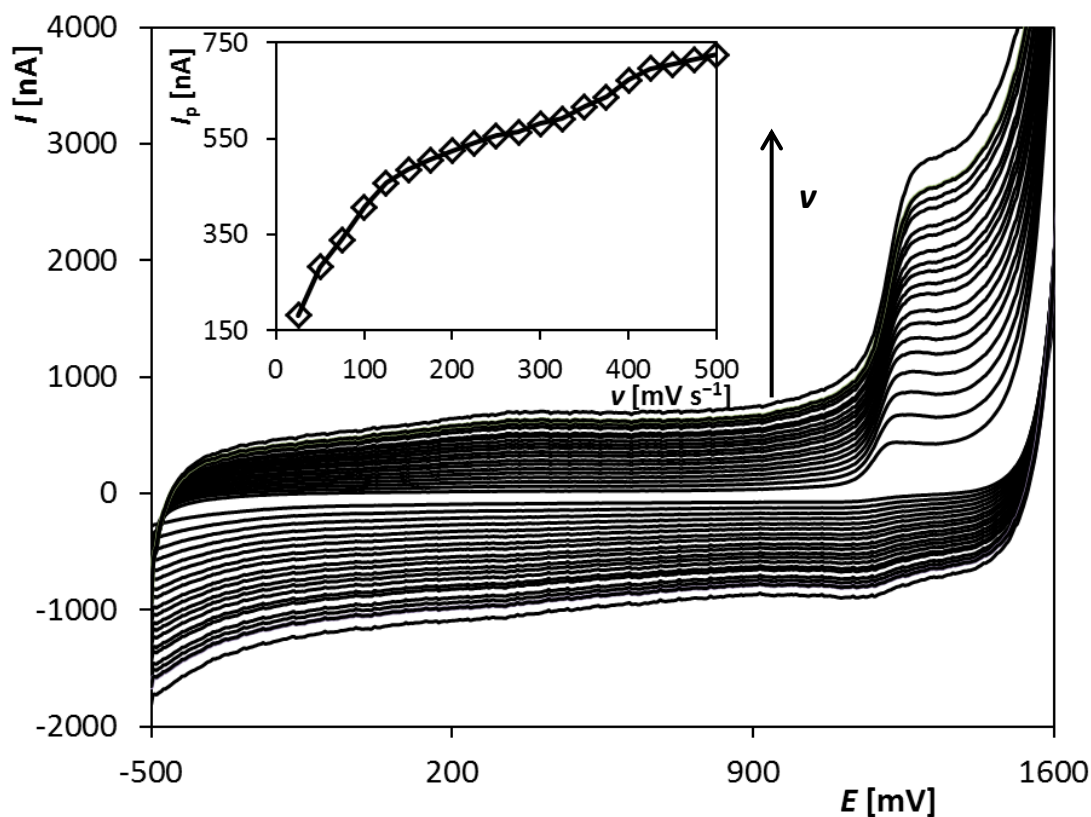


### 3.1.2 Závislost na rychlosti polarizace

Dalším studovaným parametrem byla rychlost polarizace, a to z důvodu určení řídicího děje probíhající elektrodové reakce. Měření probíhalo metodou CV v prostředí BRBS o pH 8 s nastaveným rozsahem potenciálů  $-500$  mV až  $+1800$  mV. Během měření byl v roztoku přítomen DAN o koncentraci  $5 \times 10^{-5}$  mol/l. Rychlost polarizace byla postupně zvyšována po  $25$  mV/s z hodnoty  $25$  mV/s do hodnoty  $500$  mV/s. Naměřené cyklické voltamogramy jsou znázorněny na obrázku 12.  $I_p$  rostla s rostoucí  $v$  a vrchol vlny se posouval k negativnějším potenciálům. Z vložené závislosti  $I_p$  na  $v$  ale vyplývá, že výška píku nerostla lineárně a sledovaná reakce tedy není řízena adsorpcí. Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  naopak vykazovala průběh blízký se lineárnímu, což vede k předpokladu, že se jedná o difuzně řízenou elektrodovou reakci. Pro upřesnění řídicího děje byla vynesena rovněž logaritmická závislost  $\log(I_p)$  na  $\log(v)$ , která může být charakterizována následující rovnicí (3) s příslušným koeficientem determinace:

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,424 \pm 0,016) \log(v[\text{mVs}^{-1}]) + (1,727 \pm 0,037),$$
$$R^2 = 0,9752. \quad (3)$$

Z logaritmické závislosti je rozhodující hodnota směrnice uvedené rovnice. Pokud se blíží hodnotě  $0,5$ , jedná se o difuzně řízenou reakci. Pokud se blíží hodnotě  $1$ , jde o reakci řízenou adsorpcí. V případě, že se hodnota směrnice blíží  $0$ , jedná se o kineticky řízenou reakci. V případě sledovaného oxidačního píku DAN je hodnota směrnice  $(0,424 \pm 0,016)$ , což svědčí o difuzně řízené elektrodové reakci. Navíc vzhledem k tomu, že hodnota  $0,5$  neleží v uvedeném intervalu spolehlivosti, ale je nižší, bude pravděpodobně proces ovlivněn kinetikou nějaké předřazené nebo následné reakce.



**Obrázek 12** Cyklické voltamogramy DAN v závislosti na rychlosti polarizace zaznamenané na BDDE. Metoda: CV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = -500$  mV,  $E_m = +1800$  mV,  $v = 25$ -500 mV/s. Vložený graf závislosti  $I_p$  DAN na rychlosti polarizace

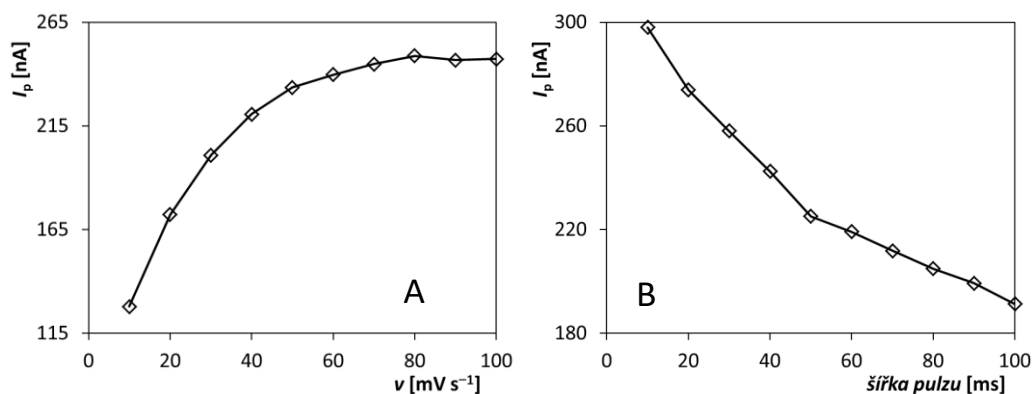
## 3.2 Vývoj metody stanovení dantrolenu s využitím BDDE

### 3.2.1 Metoda DPV

Vzhledem k tomu, že DPV představuje velmi citlivou elektroanalytickou metodu, byla vybrána i pro stanovení DAN s využitím BDDE. Nejdříve byly testovány jednotlivé parametry DPV jako rychlost polarizace, výška a šířka pulzu. Koncentrace DAN v polarografické nádobce byla při všech optimalizačních experimentech  $2 \times 10^{-5}$  mol/l a měření probíhala v rozsahu potenciálů  $E_{in}$   $-200$  mV až  $E_{fin}$   $+1800$  mV.

Prvním studovaným parametrem byla rychlost polarizace ( $v$ ). V případě DPV nemůže tento parametr nabývat stejně vysokých hodnot jako u CV, resp. DCV. Proto byla  $v$  postupně měněna v rozmezí hodnot 10-100 mV/s, a to po 10 mV/s. Další parametry jako výška a šířka pulzu byly při této studii konstantní, a to  $+50$  mV, resp.

50 ms. Výsledná závislost  $I_p$  na  $v$  je znázorněna na obrázku 13A. Z tohoto obrázku je patrné, že velikost signálu nejprve významně rostla se zvyšující se  $v$ , a to až do hodnoty 50 mV/s. Při dalším zvyšování rychlosti polarizace se již sledovaný signál v podstatě neměnil. Docházelo pouze k jeho mírnému rozšiřování. Pro další měření byla vzhledem k výšce a tvaru měřeného píku zvolena hodnota  $v$  40 mV/s.



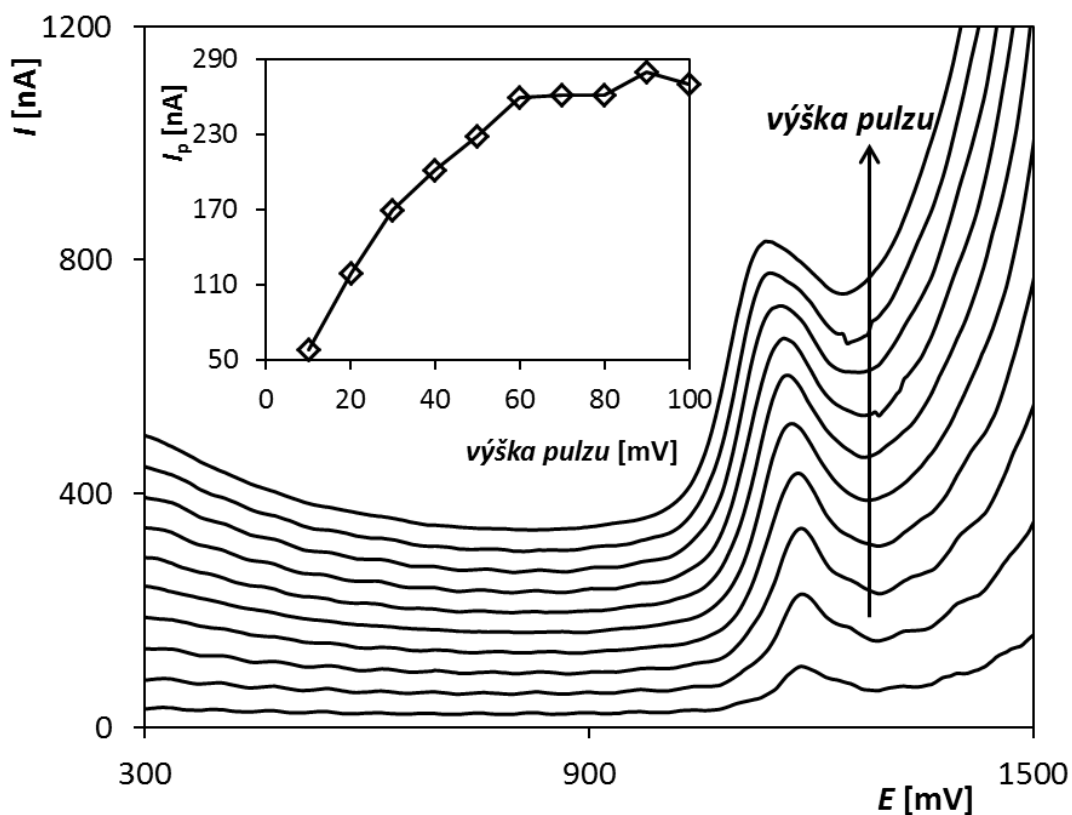
**Obrázek 13** Závislosti  $I_p$  na rychlosti polarizace (A) a šířce pulzu (B) získané s využitím BDDE.

Metoda: DPV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = +200$  mV,  $E_{fm} = +1500$  mV,  $v = 10$ - $100$  mV/s (A), 40 mV/s (B), výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms (A) a 10-100 ms (B),  $c_{(DAN)} = 2 \times 10^{-5}$  mol/l

Dalším studovaným parametrem byla výška pulzu. Měření probíhalo s již optimalizovanou rychlostí polarizace 40 mV/s a šířka pulzu byla nastavena na 50 ms. Hodnota výšky pulzu byla během měření postupně zvyšována po 10 mV v rozsahu od +10 mV do +100 mV. Získané voltametrické křivky jsou uvedeny na obrázku 14. Z obrázku je patrné, že velikost signálu rostla se zvyšující se výškou pulzu. Zároveň také docházelo k rozšiřování proudových signálů, což vedlo ke zhoršení jejich vyhodnotitelnosti. Z vložené závislosti  $I_p$  na výšce pulzu je patrné, že hodnota  $I_p$  rostla se zvyšující se výškou pulzu až do hodnoty 60 mV. Při dalším zvyšování výšky pulzu již hodnota  $I_p$  dále nerostla. Pro další měření byla jako optimální zvolena hodnota výšky pulzu 50 mV, která se nachází v lineární oblasti získané závislosti.

Posledním optimalizovaným parametrem byla šířka pulzu. Měření probíhalo s již optimalizovanou rychlostí polarizace 40 mV/s a výškou pulzu 50 mV. Hodnota šířky pulzu byla během měření postupně zvyšována po 10 ms v rozsahu od 10 ms do 100 ms. Závislost  $I_p$  na šířce pulzu je uvedena na obrázku 13B. Z této závislosti je

patrné, že docházelo k postupnému snižování  $I_p$  s narůstající šířkou pulzu. Pro další měření byla vybrána hodnota šířky pulzu 20 ms.



**Obrázek 14** DP voltamogramy DAN o koncentraci  $2 \times 10^{-5}$  mol/l zaznamenané při různých výškách pulzu na BDDE. Metoda: DPV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = +200$  mV,  $E_{fin} = +1500$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 10-100 mV, šířka pulzu = 50 ms. Vložený graf závislosti  $I_p$  na výšce pulzu

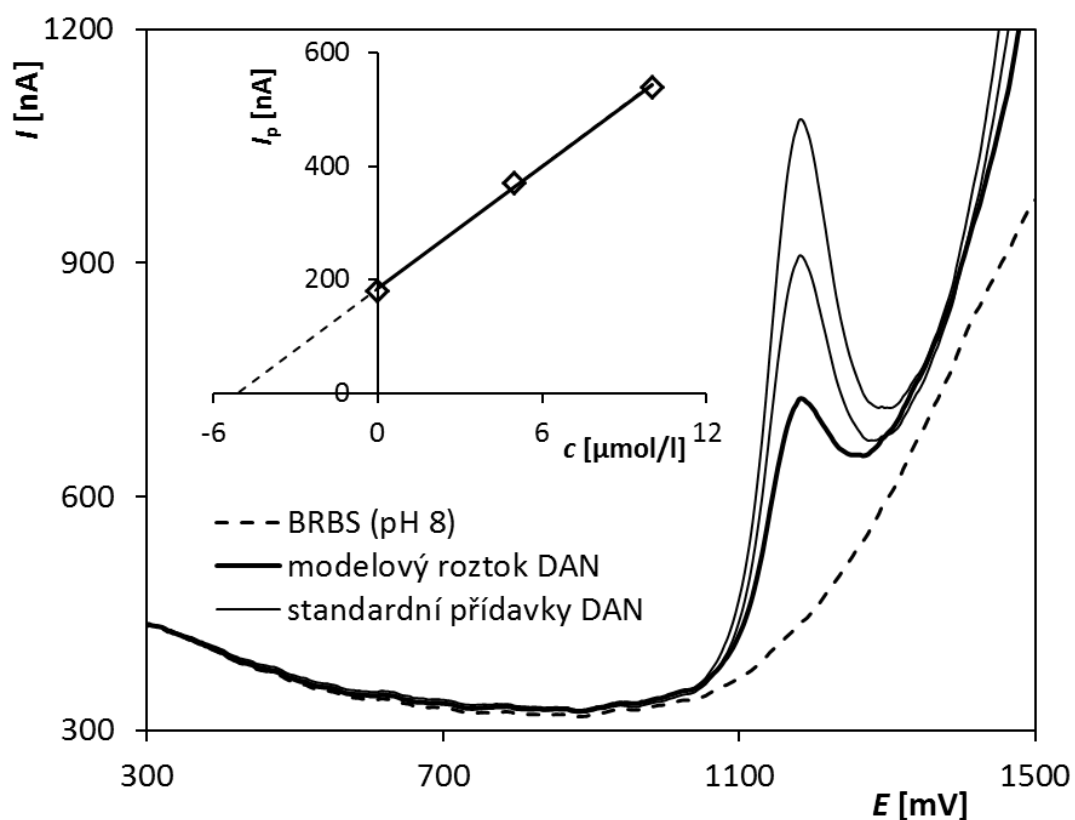
Navržené parametry metody DPV byly ověřeny při opakovaném měření při stejné koncentraci DAN v polarografické nádobce, kdy koncentrace DAN byla  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. Bylo provedeno 11 měření, vyhodnoceny výšky získaných proudových signálů a byla vypočtena hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD(11)) 5,8 %. Tato hodnota nesevídčí o příliš dobré opakovatelnosti měření. Dále byla proměřena řada koncentračních závislostí, z nichž byl zjištěn poměrně úzký lineární dynamický rozsah (LDR) navržené metody pro stanovení DAN, a to  $2 \times 10^{-6}$ - $4 \times 10^{-5}$  mol/l.

Opakovatelnost stanovení DAN metodou DPV byla ověřena v modelových roztocích o koncentracích  $1 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. Měření probíhalo metodou standardního přídatku a pokaždé byly přidány minimálně 2-3 přídatky standardního roztoku DAN. Příklad jednoho takového stanovení je uveden na obrázku 15. Stanovení bylo

vždy 5× zopakováno a byla vypočítána průměrná koncentrace DAN v roztoku s příslušným intervalem spolehlivosti a hodnota RSD opakovaného stanovení. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. Z té vyplývá, že stanovení DAN pomocí DPV je dostatečně přesné a vzhledem k hodnotám získaných RSD(5) < 5 i dobře opakovatelné.

**Tabulka 2** Výsledky opakovaných stanovení DAN v modelových roztocích pro metodu DPV

Dáno [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD(5) [%]
$1 \times 10^{-5}$	(1,020±0,031)	96,0-106,0	4,7
$5 \times 10^{-6}$	(4,981±0,055)	97,6-101,1	1,7



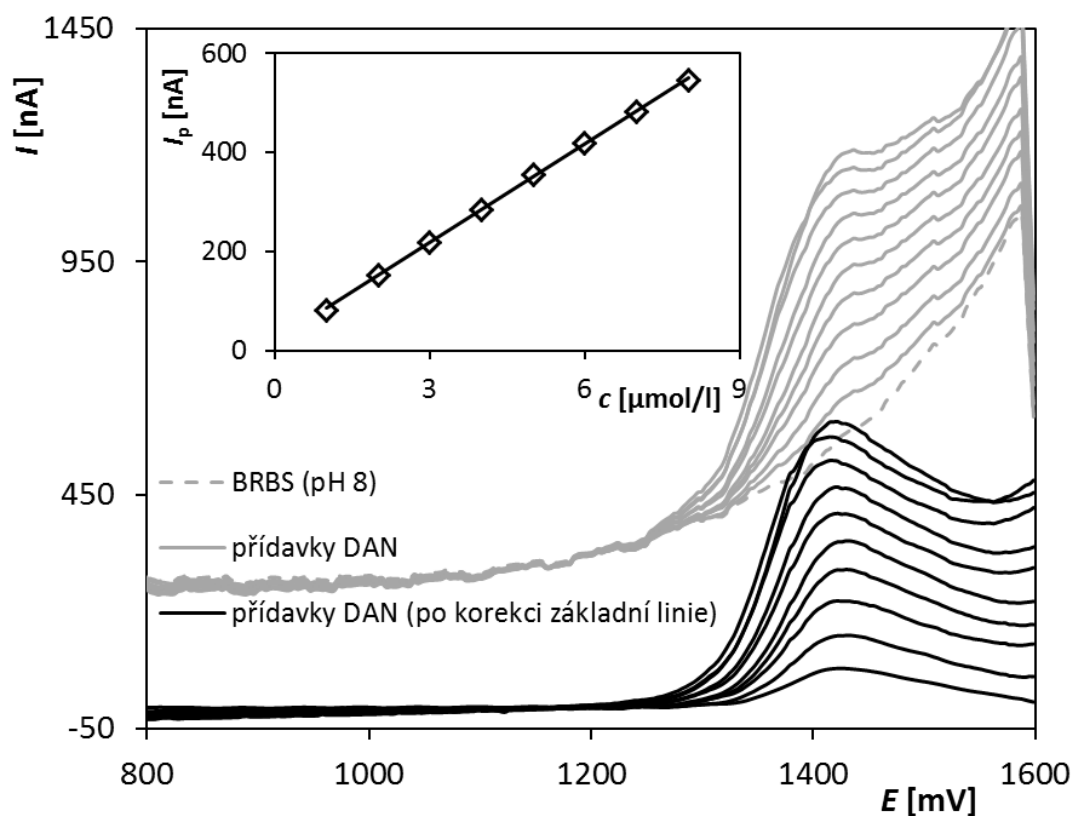
**Obrázek 15** Záznam stanovení DAN v modelovém roztoku metodou standardního přidavku. Metoda: DPV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = +200$  mV,  $E_{fin} = +1500$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $c_{DAN} = 5 \times 10^{-6}$  mol/l,  $V_{(stand. rozt.)} = 50$   $\mu\text{l}$ ,  $c_{(stand. rozt.)} = 1 \times 10^{-3}$  mol/l.

Vložený graf: Grafické vyhodnocení metody standardního přidavku.

### 3.2.2 Metoda DCV

Vzhledem k tomu, že s využitím DPV nebylo dosaženo příliš dobré opakovatelnosti měření a současně naměřený lineární dynamický rozsah byl relativně úzký, byla pro stanovení DAN otestována rovněž DC voltametrie.

Nejdříve byla ověřena opakovatelnost měření metodou DCV, a to změřením 11 křivek DAN o stejné koncentraci ( $5 \times 10^{-6}$  mol/l) v polarografické nádobce. Z odečtených hodnot  $I_p$  byla vypočtena RSD(11) 1,3%. Poté byla i metodou DCV proměřena řada koncentračních závislostí DAN na BDDE. Z těchto závislostí pak byl zjištěn LDR pro tuto metodu  $5 \times 10^{-7}$ - $3 \times 10^{-5}$ , který je širší v porovnání s DPV. DCV navíc umožňuje měření i při nižších koncentracích než DPV. Příklad jedné ze získaných závislostí je uveden na obrázku 15. Koncentrace DAN v roztoku se při tomto měření pohybovala v rozsahu  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Vyhodnocení výšek měřených signálů bylo v případě DCV při nižších koncentracích prováděno po odečtení základní linie. Tento způsob vyhodnocení je rovněž naznačen na obrázku 16.



**Obrázek 16** DC voltamogramy zaznamenané při různých koncentracích DAN na BDDE. Metoda: DCV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = +200$  mV,  $E_{fm} = +1500$  mV,  $v = 200$  mV/s,  $c_{(DAN)} = 1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Vložený graf závislosti  $I_p$  na koncentraci DAN.

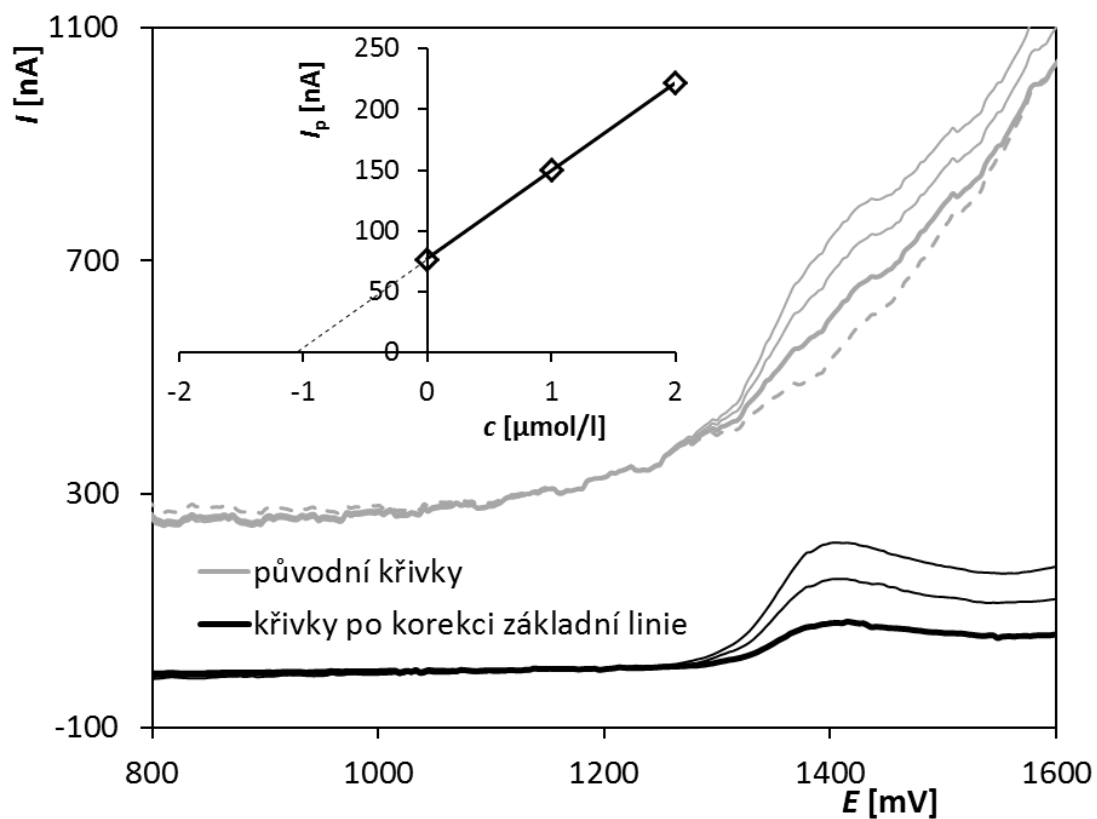
Ze změřených voltametrických křivek je zřejmé, že proudová odezva rostla se zvyšující se koncentrací DAN v polarografické nádobce a z vložené závislosti  $I_p$  na  $c_{\text{DAN}}$  vyplývá, že tento nárůst byl lineární. Statistické parametry navržené metody, jako je mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny z koncentračních závislostí měřených při nejnižších vyhodnotitelných signálech odpovídajících koncentraci DAN od  $5 \times 10^{-7}$  do  $8 \times 10^{-7}$  mol/l. LOD v tomto případě činil  $1,0 \times 10^{-7}$  mol/l a LOQ  $3,4 \times 10^{-7}$ . Tyto výsledky ukazují, že metoda DCV v kombinaci s BDDE je pro stanovení DAN velmi citlivou elektrochemickou metodou zejména s ohledem na použitou pracovní elektrodu.

Opakovatelnost stanovení DAN metodou DCV byla stejně jako pro DPV ověřena analýzou modelových roztoků. Bylo opět provedeno 5 opakovaných stanovení pro dvě různé koncentrace DAN v roztoku  $5 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-6}$  mol/l. Měření probíhalo metodou standardního přídávku a pokaždé byly přidány 2-3 přídávky standardního roztoku DAN. Záznam jedné z provedených analýz je uveden na obrázku 17. Ze získaných výsledků byla vypočítána průměrná koncentrace a hodnota RSD opakovaného stanovení. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 3. Je zřejmé, že výsledky jsou správné a stanovení pomocí DCV v kombinaci s BDDE je velmi dobře opakovatelné.

Z porovnání výsledků dosažených s využitím DPV a DCV vyplývá, že DC voltametrie je vhodnější metodou pro stanovení DAN s využitím BDDE, protože umožňuje dosažení nižšího detekčního limitu i širšího lineárního dynamického rozsahu.

**Tabulka 3** Výsledky opakovaných stanovení DAN v modelových roztocích pro metodu DCV

Dáno [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD(5) [%]
$5 \times 10^{-6}$	(4,970±0,033)	98,0-100,6	1,0
$1 \times 10^{-6}$	(1,022±0,033)	97,0-108,0	4,8



**Obrázek 17** Záznam stanovení DAN v modelovém roztoku metodou standartního přidavku. Metoda: DCV, elektrolyt: BRBS (pH 8), parametry:  $E_{in} = +200$  mV,  $E_{fin} = +1800$  mV,  $v = 200$  mV/s,  $c_{DAN} = 1 \times 10^{-6}$  mol/l,  $V_{(stand. rozt.)} = 10$   $\mu\text{l}$ ,  $c_{(stand. rozt.)} = 1 \times 10^{-3}$  mol/l. Vložený graf: Grafické vyhodnocení metody standartního přidavku



## 4 Závěr

Teoretická část bakalářské práce popisuje základní principy voltametrie, voltametrické resp. polarografické metody a používané pracovní elektrody. Největší pozornost je pak věnována borem dopované diamantové elektrodě, která byla využita pro stanovení DAN. Nejvýznamnější kapitolou je shrnutí poznatků týkajících se studia voltametrického chování DAN s využitím různých polarografických a voltametrických technik v kombinaci se rtuťovými pracovními elektrodami.

Cílem experimentální části bylo studium voltametrického chování DAN s využitím BDDE a návrh metody jejího stanovení. Bylo zjištěno, že DAN v kyselém prostředí poskytuje jeden výrazný oxidační signál okolo potenciálu +1350 mV. Při zpětném skenu byl rovněž pozorován odpovídající katodický signál při potenciálu +1250 mV. Vzhledem k poloze a poměru výšek uvedených signálů se jedná o quazi-reverzibilní reakci. Nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný signál DAN byl pozorován v prostředí BRBS o pH 8, který byl zvolen jako základní elektrolyt pro všechny následující experimenty. Pro stanovení DAN byly testovány metody DPV a DCV. U obou metod byly optimalizovány parametry, které byly ověřeny analýzou modelových roztoků o různé koncentraci. Z porovnání dosažených výsledků je patrné, že DC voltametrie je vhodnější metodou pro stanovení DAN s využitím BDDE, protože umožňuje dosažení nižšího detekčního limitu ( $1,0 \times 10^{-7}$  mol/l) i širšího lineárního dynamického rozsahu ( $5 \times 10^{-7}$ - $3 \times 10^{-5}$ ).

## Seznam použité literatury

1. BAREK J.: *Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii*. Chem. Listy 91, 1038 (1997).
2. JINDRA J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882-1989*. Libri, Praha, (2009).
3. PŘÍBĚH KAPKY: *Jaroslav Heyrovský, první český Nobelista*. [online]. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.jh-inst.cas.cz/heyrovsky/index.php?lang=cz>.
4. CONVERTER: *Jaroslav Heyrovský*. [online]. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>.
5. KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava (2003).
6. OPEKAR F., JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ P., PLZÁK Z.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha (2003).
7. BAREK J., OPEKAR F., ŠTULÍK K.: *Elektroanalytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2005).
8. PRAUS P., VONTOROVÁ J.: *Analytická chemie II*. Technická univerzita Ostrava, Ostrava (2015).
9. IZUTSU K.: *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2002).
10. WANG J.: *Analytical electrochemistry*. Wiley-VCH, New York (2000).
11. CHÝLKOVÁ J., ŠELEŠOVSKÁ R., TOMÁŠKOVÁ M.: *Ekoanalýza I*. Univerzita Pardubice, Pardubice (2013).
12. KALVODA R.: *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. Nakladatelství technické literatury, Praha (1985).
13. ENCYKLOPEDIE LABORATORNÍ MEDICÍNY PRO KLINICKOU PRAXI: *Diferenční pulsní polarografie*. [online]. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/JVAMF.htm>.
14. KŘÍŽENECKÁ S.: *Základy analytické chemie*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem (2007).
15. KALVODA R.: *Adsorpční rozpouštěcí voltametrie v knize Nové směry v analytické chemii*. Nakladatelství technické literatury, Praha (1988).
16. HEYROVSKÝ J., ZUMAN P.: *Úvod do praktické polarografie*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1964).

17. ENCYKLOPEDIIE LABORATORNÍ MEDICÍNY PRO KLINICKOU PRAXI: *Difúze v nestacionárním stavu-polarografie*. [online]. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVAMG.htm>.
18. MALEKI N., ABSALAN G., SAFAVI A., FARJAMI E.: *Ultra trace adsorptive stripping voltammetric determination of atrazine in soil and water using mercury film electrode*. *Anal. Chim. Acta* 581, 37 (2007).
19. EUROPEAN PARLIAMENT: *Regulation (ec) no 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC*, (2006).
20. OZKAN S. A.: *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*. HNB Pub., New York (2011).
21. BAREK J., PECKOVÁ K., VYSKOČIL V.: *Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii*. *Chem. Listy* 103, 889 (2009).
22. YOSYPCHUK B., BAREK J.: *Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti*. *Chem. Listy* 103, 284 (2009).
23. ŠVANCARA I., VYTRĚS K.: *Elektrolýza s bizmutovými elektrodami*. *Chem. Listy* 100, 90 (2006).
24. NOVOTNÝ L, YOSYPCHUK B.: *Pevné stříbrné amalgámové elektrody*. *Chem. listy* 94, 1118 (2000).
25. YOSYPCHUK B., BAREK J.: *Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes*. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
26. YOSYPCHUK B., NOVOTNÝ L.: *Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements*. *Electroanal.* 14, 1733 (2002).
27. WANG J., LU J. M., HOČEVAR S. B., FARIAS P. A. M., OGOREVC B.: *Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry*. *Anal. Chem.* 72, 3218 (2000).

28. MIKYSEK T., STOČES M., ŠVANCARA I., VYTRÁS K.: *Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod*. Chem. Listy 108, 513 (2014).
29. WANG J., KIRGÖZ U. A., MO J., LU J., KAWDE A. N., MUCK A.: *Glassy carbon paste electrodes*. Electrochem. Commun. 3, 203 (2001).
30. PETERSEN S.L., TALLMAN D.E.: *Silver composite electrode for voltammetry*. Anal. Chem. 60, 82 (1988).
31. TALLMAN D.F., PETERSEN S.L.: *Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications*. Electroanal. 2, 499 (1990).
32. NAVRÁTIL T.: *Composite solid electrodes - Tool for organic electrochemistry*. Cur. Org. Chem. 15, 3029 (2011).
33. NAVRÁTIL T., BAREK J.: *Analytical Application of Composite Solid Electrode*. Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 131 (2009).
34. PATEL K., HASHIMOTO K., FUJISHIMA A.: *Application of boron-doped CVD-diamond to photoelectrode*. Denk. Kag. 60, 659 (1992).
35. SWAIN G. M., RAMESHAM R.: *The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline thin film electrodes*. Anal. Chem. 65, 345 (1993).
36. VYSKOLČIL V., DAŇHEL A., FISCHER J.: *Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů*. Chem. Listy 104, 1181 (2010).
37. MUSILOVÁ J., BAREK J., PECKOVÁ K.: *Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek*. Chem. Listy 103, 469 (2009).
38. BAREK J.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2006).
39. ŠELEŠOVSKÁ R., ŠTĚPÁNKOVÁ M., JANÍKOVÁ L., NOVÁKOVÁ K., VOJS M., MARTON M., BEHÚL M.: *Surface and electrochemical characterization of boron-doped diamond electrodes prepared under different conditions*. Monats. Chem. (2016), DOI: 10.1007/s00706-015-1640-3.
40. ŠVORC L', CINKOVÁ K., SAMPHAO A., STANKOVIC D. M., MEHMETI E., KALCHER K.: *Voltammetric determination of harmaline in natural food products using boron-doped diamond electrode*. J. Electroanal. Chem. 744, 37 (2015).
41. MEDEIROS R.A., ROCHA-FILHO R.C., FATIBELLO-FILHO O.: *Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode*. Food Chem. 123, 886 (2010).

42. ŠVORC L., TOMČÍK P., SVÍTKOVÁ J., RIEVAJ M., BUSTIN D.: *Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on boron-doped diamond electrode*. Food chem. 135, 1198, (2012).
43. PEDROSA V.D., CODOGNOTO L., AVACA L.A.: *Electroanalytical determination of 4-nitro-phenol by square wave voltammetry on diamond electrodes*. J. Braz. Chem. Soc. 14, 530 (2003).
44. ČÍŽEK K., BAREK J., FISCHER J., PECKOVÁ K., ZIMA J.: *Voltammetric determination of 3-nitrofluoranthene and 3-aminofluoranthene at boron-doped diamond thin-film electrode*. Electroanal. 19, 1295 (2007).
45. BAREK J., JANDOVÁ K., PECKOVÁ K., ZIMA J.: *Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped diamond film electrode*. Talanta 74, 421 (2007).
46. PECKOVÁ K., MOCKO V., OPEKAR F., SWAIN G.M., ZIMA J., BAREK J.: *Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu*. Chem. Listy 100, 124 (2006).
47. ŠELEŠOVSKÁ R., JANÍKOVÁ-BANŽUCHOVÁ L., CHÝLKOVÁ J.: *Sensitive Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Determination of the Chemotherapeutic Drug Methotrexate in Pharmaceutical and Biological Samples*. Electroanal. 27, 42 (2015).
48. ŠVORC L., SOCHR J., SVÍTKOVÁ J., RIEVAJ M., BUSTIN D.: *Rapid and sensitive electrochemical determination of codeine in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond film electrode*. Electrochim. Acta 87, 503 (2013).
49. BANŽUCHOVÁ L., ŠVORC L., SOCHR J., SVÍTKOVÁ J., CHÝLKOVÁ J.: *Voltammetric method for sensitive determination of herbicide picloram in environmental and biological samples using boron-doped diamond film electrode*. Electrochim. Acta 111, 242 (2013).
50. ŠVORC L., RIEVAJ M., BUSTIN D.: *Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode*. Sens. Actuat. B 181, 294 (2013).
51. ŠELEŠOVSKÁ R., JANÍKOVÁ L., PITHARTOVÁ K., CHÝLKOVÁ J., TOMÁŠKOVÁ M.: *Sensitive voltammetric determination of herbicide terbutryn*

- using solid electrodes based on silver amalgam and boron-doped diamond. *Monats. Chem.* 147, 207 (2016).
52. CHÝLKOVÁ J., TOMÁŠKOVÁ M., ŠVANCARA I., JANÍKOVÁ L., ŠELEŠOVSKÁ R.: *Determination of methiocarb pesticide using differential pulse voltammetry with a boron-doped diamond electrode.* *Anal. Meth.* 7, 4671 (2015).
  53. ŠELEŠOVSKÁ R., JANÍKOVÁ L., CHÝLKOVÁ J.: *Green electrochemical sensors based on boron doped diamond and silver amalgam for sensitive voltammetric determination of herbicide metamitron.* *Monatsh. Chem.* 146, 795 (2015).
  54. HONÓRIO G.G., AZEVEDO G.CH., MATOS M.A.C., M.A.L. DE OLIVEIRA M.A.L, MATOS R.C.: *Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry.* *Food Control* 36, 42 (2014).
  55. VELAZQUEZ-PENA S., LINARES-HERNÁNDEZ I., MARTÍNEZ-MIRANDA V., BARRERA-DÍAZ C, BILYEU B.: *Azo dyes as electron transfer mediators in the electrochemical reduction of Cr(VI) using boron-doped diamond electrodes.* *Fuel* 110, 12 (2013).
  56. GERBERSHAGEN M. U., FIEGE M., KRAUSE T., AGARWAL K., WAPPLER F.: *Dantrolen-Pharmakologische und therapeutische Aspekte.* *Anaesthesist* 52, 238 (2003).
  57. LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M.: *Farmakologie a toxikologie.* Grada, Praha (2002).
  58. SUCHOPÁR J.: *Remedia Compendium.* Panax Infopharm, Praha, (2002).
  59. SIGMA-ALDRICH: *Dantrolene sodium salt.* [online]. [cit. 2016-05-30]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5160?lang=en&region=CZ>.
  60. KRAUSE T., GERBERSHAGEN M. U, FIEGE M., WEIBHORN R., WAPPLER F.: *Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments.* *Anaesthesist* 59, 364 (2004).
  61. ELLIS, K. O.; WESSELS, F. L. *Muscle relaxant properties of the identified metabolites of dantrolene.* *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology,* 301, 237 (1978).

62. CAYMAN CHEMICAL: *Dantrolene (sodium salt)*. [online]. [cit. 2016-05-15].  
Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/product/14326>
63. SAXENA S. J., HONIGBERG I. L., STEWART J. T., VALLNER J. J.: *Liquid Chromatography in Pharmaceutical analysis VII: Determination of Dantrolene Sodium in Biological Fluids*. J. Pharm. Sci. 66, 751 (1977).
64. LALANDE M., MILLS P., PETERSON R. G.: *Determination of dantrolene and its reduced and oxidized metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. B 430, 187 (1988).
65. WUIS E. W., GRUTTERS A. C. L. M., VREE T. B., VAN DER KLEYN E.: *Simultaneous determination of dantrolene and its metabolites, 5-hydroxydantrolene and nitro-reduced acetylated dantrolene (F 490), in plasma and urine of man and dog by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. B 231, 401 (1982).
66. COX P. L., HEOTIS J. P., POLIN D., ROSE G. M.: *Quantitative determination of Dantrolene Sodium and Its Metabolites by differential Pulse Polarography*. J. Pharm. Sci. 58, 987, (1969).
67. GHONEIM, E. M.: *Electroreduction of the muscle relaxant drug dantrolene sodium at the mercury electrode and its determination in bulk form and pharmaceutical formulation*. Chem. Pharm. Bull. 55, 1483 (2007).
68. REDDY, C. S., et al.: *Differential pulse polarographic determination of dantrolene*. Ind. J. Pharm. Sci. 54, 41 (1992).
69. LIVERTOUX M. H., JAYYOSI Z., BATT A. M.: *Study of the physicochemical properties of aqueous dantrolene sodium by deferential pulse polarography*. Talanta 35, 613 (1988).