

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ LÉČIVA METRONIDAZOLU POMOCÍ PEVNÉ BISMUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODY

Tento příspěvek je věnován prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. u příležitosti jeho 75. narozenin a vychází v rámci seriálu Nové pohledy na analytickou chemii.*

JOHANKA JAROŠOVÁ A VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Česká republika
johanka.jarosova@natur.cuni.cz, vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Došlo 4.9.24 přijato 14.10.24.

Pevná bismutová kapková elektroda (SBIde – solid bismuth drop electrode) je nová pracovní elektroda, kterou od roku 2020 komerčně nabízí na českém trhu společnost Metrohm. Cílem této práce bylo ověřit použitelnost SBIde při voltametričtém stanovení modelové organické látky reprezentující elektrochemicky redukovatelné biologicky aktivní sloučeniny – léčiva metronidazolu (antibiotika používaného k léčbě onemocnění způsobených gram-pozitivními i gram-negativními anaerobními bakteriemi). Podle dostupných informací se jedná o vůbec první publikovanou výzkumnou práci využívající SBIde. Za optimálních podmínek (Brittonův-Robinsonův pufr o pH 12,0 byl použit jako základní elektrolyt a povrch pracovní elektrody nebyl elektrochemicky regenerován) byla získána pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) lineární kalibrační závislost metronidazolu v koncentračním rozmezí od 1 do 600 $\mu\text{mol l}^{-1}$, přičemž dosažená mez detekce (LOD) byla 0,41 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti (LOQ) byla 1,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Cyklická voltametrie (CV) na SBIde byla použita pro charakterizaci elektrodového děje při ireverzibilní katodické redukcí metronidazolu. Nově vyvinutá DPV metoda byla rovněž úspěšně použita při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody (LOD = 1,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a LOQ = 5,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a v různých lékových formách (jako srovnávací analytická metoda byla použita UV-Vis spektrofotometrie).

Klíčová slova: metronidazol, antibiotika, analýza léčiv, elektrochemie, diferenční pulzní voltametrie, cyklická voltametrie, pevná bismutová kapková elektroda, UV-Vis spektrofotometrie

Úvod

Bismutové elektrody (BiE) jsou v elektroanalytické chemii využívány jako pracovní elektrody již od roku 2000. Bismut je velmi šetrný k životnímu prostředí a stává se tak vhodným elektrodovým materiálem, kterým lze velmi dobře nahradit kovová rtuť^{1,2}. Pomocí těchto elektrod byly již dříve stanoveny ionty kovů Zn, Cd, Pb, Tl, In, Sn, Sb, Cu, Mn, Cr a Mo (cit.³), též Co a Ni (cit.^{3,4}), ale také některé organické sloučeniny, jako jsou pesticidy nebo léčiva^{1,2}. Mezi základní typy bismutových pracovních elektrod patří bismutové filmové elektrody (BiFE) a bismutové pevné (angl. bulk) elektrody (BiBE), mezi které lze řadit i námi nově zkoumanou pevnou bismutovou kapkovou elektrodu (SBIde, z angl. solid bismuth drop electrode).

BiFE je nejčastěji vyráběna elektrochemickým nanesením tenkého bismutového filmu na povrch pracovní



Bc. Johanka Jarošová studovala v letech 2020–2023 bakalářský obor Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, kde na Katedře analytické chemie vypracovala svoji bakalářskou práci, kterou obhájila v červnu 2023. V současnosti na stejné katedře vypracovává diplomovou práci v rámci navazujícího magisterského studia oboru Analytická chemie, ve které se zabývá využitím pevné bismutové kapkové elektrody při voltametričtém stanovení léčiv. **Výsledky své práce prezentovala na celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2024“, ve které získala zvláštní cenu firmy Metrohm Česká republika za nejlepší práci v oblasti elektroanalytické chemie.**

(substrátové) elektrody za konstantní teploty metodou *in situ* nebo *ex situ*^{1,3,5}. Metoda *in situ* je proveditelná ve dvou variantách. První variantou je vyloučení povlaku bismutu přímo v analyzovaném roztoku. Nejčastěji používaným zdrojem bismutitých iontů je jejich dobře disociovatelná sůl – dusičnan bismutitý^{3,5}. Koncentrace přidávané bismutité soli jsou 10–20krát vyšší než předpokládané koncentrace stanovovaných iontů. Redukce soli probíhá za konstantního potenciálu (–1,0 až –1,4 V vs. Ag|AgCl), který umožňuje vyloučení filmu kovového bismutu. Takto vzniklý film bismutu vydrží pouze jedno měření a nakonec jsou jeho zbytky elektrochemicky odstraněny³. Druhou variantou provedení metody *in situ* je vyredukování kovového bismutu v průběhu samotného měření za pomoci pevného oxidu bismutitého, který je přimíchán do uhlíkových past či inkoustů. Kovový film je vyloučen při potenciálech –0,8 až –1,0 V vs. Ag|AgCl (cit.³). Metoda *ex situ* naopak spočívá ve vyloučení bismutového filmu ze speciálních pokovovacích roztoků. Vyloučené bismutové filmy metodou *ex situ* jsou stabilnější než u metody *in situ* a vydrží tak, pokud při rozpouštěcím kroku nedojde k jejich oxidaci, po celou dobu měření^{3,6–8}.

BiBE se nejčastěji připravuje z bismutového drátku⁵ nebo nasátím roztaveného bismutu do skleněné kapiláry, jejíž konec je následně vyleštěn do tvaru disku^{1,3}. Více podrobností o přípravě a použití BiBE lze najít např. v pracích^{9,10}.

SBiDE (obr. 1) je nová pracovní elektroda komerčně dodávaná na český trh společností Metrohm od roku 2020 (cit.¹¹). Jedná se o kapku zatuhnutého kovového bismutu o průměru přibližně 2 mm na konci skleněné kapiláry. Dle výrobce lze tuto elektrodu použít bez leštění či další modifikace jejího povrchu pro stanovení nízkých koncentrací těžkých kovů v jezerech, řekách, podzemních vodách a především v kontaminované pitné vodě. Lze stanovovat



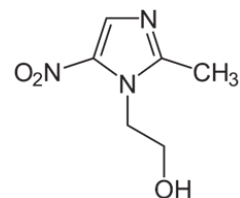
Obr. 1. Pevná bismutová kapková elektroda (SBiDE); převzato z materiálů poskytovaných výrobcem¹¹

nízké koncentrace od jednotek $\mu\text{g l}^{-1}$, někdy je však možné stanovit koncentraci již od jednotek ng l^{-1} . Elektroda je vhodná pro stopovou analýzu iontů těžkých kovů, jako jsou Cd, Pb, Ni, Co a Fe, proto dokáže v těchto stanoveních zcela nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu^{11,12}.

Metronidazol (obr. 2), neboli 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol, je bílý, popřípadě nažloutlý krystalický prášek omezeně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, ethanolu, dichlormethanu a v etheru. Jedná se o antibiotikum vyvinuté v roce 1960, používané pro léčbu onemocnění způsobených gram-pozitivními a gram-negativními anaerobními bakteriemi (především *Bacteroides fragilis*)^{13–16}.

V literatuře jsou jako nejčastější analytické metody pro stanovení metronidazolu uváděny elektrochemické metody (DC voltametrie, diferenční pulzní voltametrie (DPV) či square-wave voltametrie)^{16–18}, separační metoda HPLC–UV¹⁶ nebo optické metody UV-Vis absorpční spektrofotometrie¹⁶ a fluorescenční spektrofotometrie¹⁹. V tab. I jsou uvedeny vybrané příklady stanovení metronidazolu metodou DPV na různých pracovních elektrodách a pro srovnání jsou uvedeny i výsledky této studie. Přítomnost metronidazolu lze také dokázat pomocí lékopisné metody²⁰ složené ze dvou hlavních kroků. Prvním krokem je detekce na základě teploty tání, která se pohybuje v rozmezí 159–163 °C. Druhým krokem je zaznamenání infračerveného absorpčního spektra, které se porovná se spektrem standardu metronidazolu. Stanovení metronidazolu lékopisnou metodou²⁰ spočívá v rozpuštění 0,1500 g vzorku metronidazolu v 50 ml bezvodé octové kyseliny a titraci vzniklého roztoku 0,1M HClO₄. Bod ekvivalence je určen potenciometricky s platinovou indikační elektrodou a kalomelovou nebo argentchloridovou referenční elektrodou.

Metronidazol byl v tomto výzkumu zvolen jako modelové léčivo reprezentující elektrochemicky redukovatelné biologicky aktivní látky. Cílem této práce bylo ověření využitelnosti nového typu komerčně dodávané bismutové pracovní elektrody (SBiDE) při voltametrickém (DPV) stanovení modelové organické látky, přičemž dle dostupných informací se jedná o zcela první ve světě publikovanou práci na toto téma. Cyklická voltametrie (CV) na SBiDE byla v této studii použita pro charakterizaci katodické redukce metronidazolu a nově vyvinutá DPV metoda byla úspěšně aplikována při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody a v různých lékových



Obr. 2. Strukturální vzorec metronidazolu

Tabulka I

Příklady stanovení metronidazolu metodou DPV s uvedením dosažených mezí detekce (*LOD*) a stanovitelnosti (*LOQ*)

Elektroda ^a	Prostředí	Lineární rozsah [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	<i>LOD</i> [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	<i>LOQ</i> [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
AgSE	BR pufr pH 10,0	1–400	0,55	1,8	17
BiF-PLE	BR pufr pH 4,0	0,2–2 a 2–30	0,039	0,13	18
DMIP/CPE	BR pufr pH 5,0	0,4–200	0,091	0,30	21
DNA/GCE	0,1M octanový pufr pH 4,5	1–100	1,7	5,7	22
GCE	0,1M octanový pufr pH 4,5	2,9–100	3,4	11	22
HMDE	BR pufr pH 9,0	0,23–1,8	0,036	0,12	23
m-AgSAE	BR pufr pH 8,0	2–100	0,057	0,19	24
p-AgSA-CE	BR pufr pH 4,0	2–100	1,2	4,0	25
SBiDE	BR pufr pH 12,0	1–600	0,41	1,4	tato práce

^a AgSE – stříbrná pevná elektroda, BiF-PLE – bismutovým filmem modifikovaná tuhá elektroda, DMIP/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná polymerním hybridním filmem s duplexním molekulovým otiskem, DNA/GCE – elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná DNA, GCE – elektroda ze skelného uhlíku, HMDE – visící rtuťová kapková elektroda, m-AgSAE – rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda, p-AgSA-CE – leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda, SBiDE – pevná bismutová kapková elektroda

formách, kde jako srovnávací analytická metoda byla použita UV-Vis spektrofotometrie. Část tohoto výzkumu byla již dříve prezentována na studentské konferenci O cenu Karla Štulíka 2024 (cit.²⁶), přičemž tento článek představuje významné rozšíření soutěžního příspěvku zahrnující rovněž popis dalších experimentů a jejich výsledků.

Experimentální část

Chemikálie a vzorky

Zásobní roztok metronidazolu (p.a., Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Německo) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven v deionizované vodě. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův (BR) pufr připravený smíchaním zásadité složky (0,2M NaOH (p.a., Penta, Praha, ČR)) s kyselou složkou (85% H_3PO_4 , H_3BO_3 (p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a 99,8% CH_3COOH (p.a., Penta, Praha, ČR)) o koncentraci všech kyselin 0,04 mol l^{-1} . Pro optimalizaci prostředí autentických vzorků pitné vody byl použit vodný roztok chelatonu III (Na_2EDTA , p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentraci 0,1 mol l^{-1} . Pitná voda byla odebrána z vodovodního řádu v budově Chemického ústavu (Hlavova 8, Praha 2) Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

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 srovnávací UV-Vis spektrofotometrické stanovení obsahu metronidazolu v lékových formách.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru Eco-Tribo Polarograf ovládaného programem 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, průměr kapky bismutu 2 mm, Metrohm, Herisau, Švýcarsko), jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda (typ 10-20+polaro Ag 10 10-2014-3, 3M KCl, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Byla použita technika DPV s parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , potenciálový krok 3 mV, šířka pulzu 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), výška pulzu –50 mV a perioda pulzu 150 ms. CV využívala rychlosti polarizace 10–1000 mV s^{-1} a potenciálový krok 3 mV. Ve voltametrické nádobce byly analyzované vzorky o celkovém objemu 20,0 ml.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 v programu UV-Visible ChemStation verze 9.01 (obojí Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Měřeno bylo v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm proti vodnému roztoku BR pufru o daném pH. Absorbance připravených roztoků byla měřena v rozmezí vlnových délek 200–1100 nm.

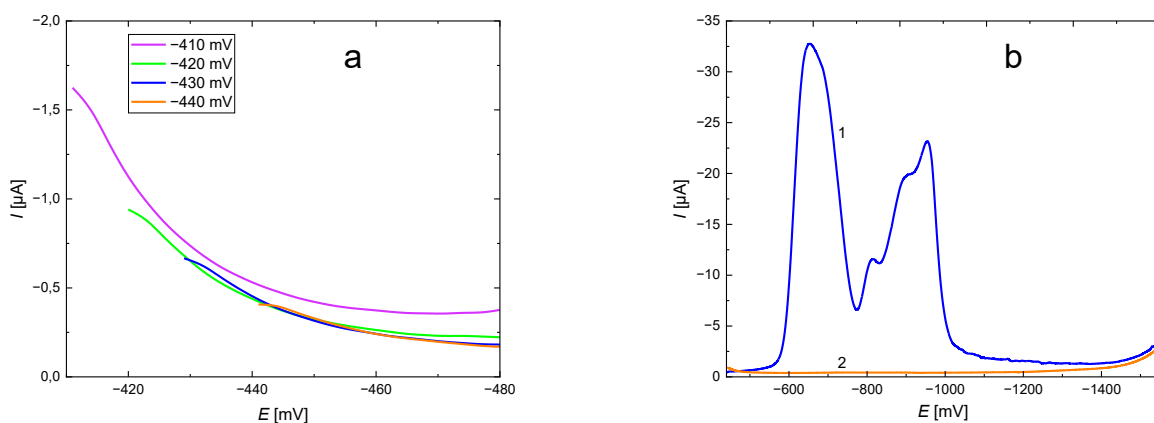
pH bylo měřeno pomocí digitálního pH metru Jenway 3510 (Jenway, Felsted, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Výsledky a diskuse

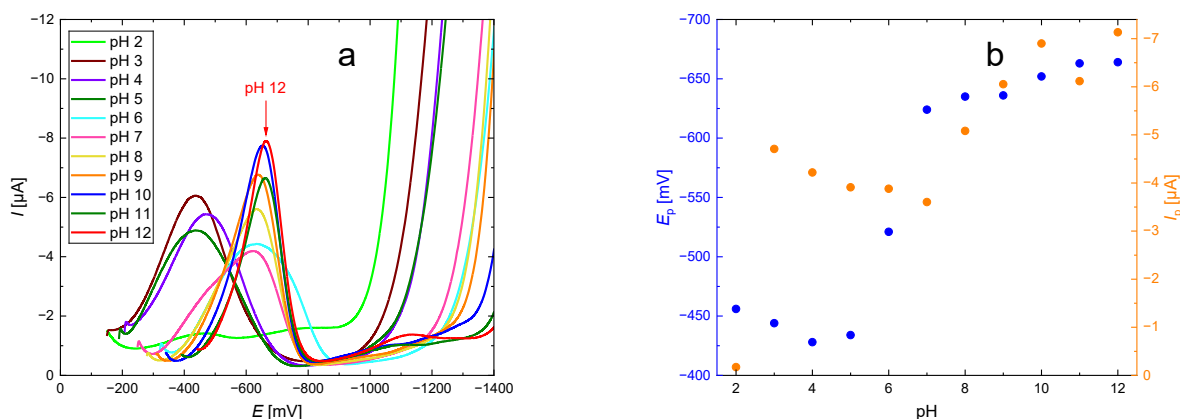
Voltametrické chování metronidazolu na pevné bismutové kapkové elektrodě

Prvním krokem bylo nalezení vhodného počátku potenciálového okna (E_{in}) tak, aby naměřený pík analytu byl co nejlépe vyvinutý, vyhodnotitelný a voltamogramy základního elektrolytu vykazovaly co nejnižší proud pozadí (obr. 3a). SBiDE je velmi citlivá na použití potenciálů, při kterých dochází k tvorbě oxidů bismutu anebo rozpouštění bismutu samotného. Pokud byla bismutová elektroda ponechána v roztoku pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, bismut začal oxidovat a vzniklé oxidy byly následně při prvním voltametrickém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou píku (obr. 3b).

Dalším krokem při vývoji DPV metody bylo nalezení vhodného základního elektrolytu. Voltametrické chování metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ bylo zkoumáno ve vodném prostředí BR pufru o pH 2,0–12,0. Z obr. 4a je patrné, že metronidazol ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 3,0–12,0 poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, který odpovídá čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na odpovídající hydroxylaminoskupinu¹⁵. Za povšimnutí jistě stojí skutečnost, že potenciál píku (E_p) metronidazolu se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám v určité sigmoidní závislosti (obr. 4b), přičemž běžný trend pozorovaný u tohoto analytu na elektrodách z jiných materiálů je posun E_p s pH lineární, s hodnotou směrnice blíží se očekávané teoretické hodnotě -59 mV pH^{-1} (cit.^{21,24,25}). Pro tento jev však momentálně nemáme žádné vysvětlení a bude v rámci dalšího výzkumu zkoumán, především prostřednictvím studia



Obr. 3. (a) Nalezení počátku potenciálového okna vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 na SBiDE technikou DPV (cit.²⁶). (b) Příklad prvního (1) a druhého (2) měření ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 na SBiDE technikou DPV při $E_{in} = -440 \text{ mV}$ (cit.²⁶). Barevná verze všech obrázků je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy

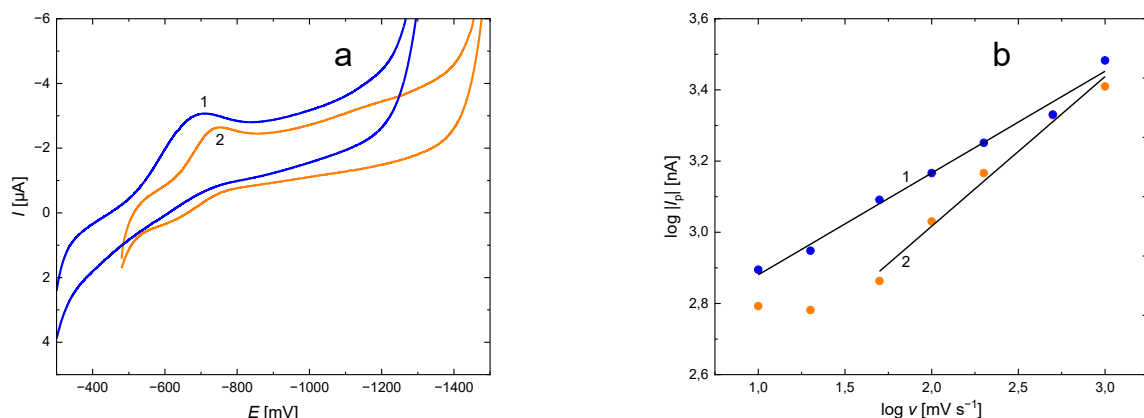


Obr. 4. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE ve vodných roztocích BR pufru o pH 2,0–12,0 (cit.²⁶). (b) Odpovídající závislost potenciálu píku (E_p) a výšky píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na pH

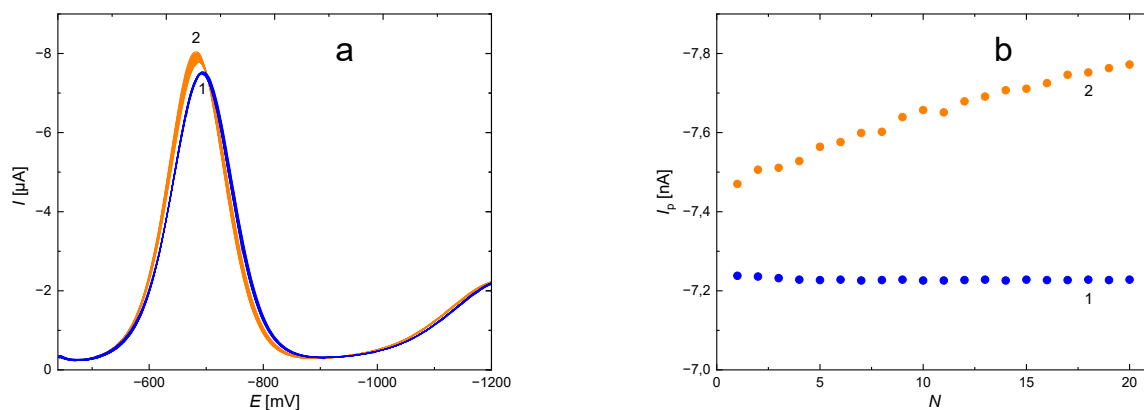
dalších strukturálně podobných elektrochemicky aktivních látek na SBiDE. Jako optimální prostředí pro další měření byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12,0, protože toto prostředí poskytovalo dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu (I_p) analytu (obr. 4b).

Voltametrické chování metronidazolu na SBiDE bylo rovněž zkoumáno pomocí CV, přičemž hlavní důraz byl kladen na určení reverzibility elektrodové reakce při redukcí nitroskupiny přítomné ve struktuře metronidazolu a na zjištění, jakým dějem je tato reakce, resp. celý elektrodový proces, na SBiDE kontrolována. Vliv různých rychlostí polarizace (10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1}) na chování metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při CV byl zkoumán ve třech různých prostředích – kyselém (BR pufr o pH 3,0), neutrálním (BR pufr o pH 7,0) a zásaditém (BR pufr o pH 12,0). V kyselém prostředí nebylo

možné na získaných voltamogramech vyhodnotit odezvu metronidazolu. CV metronidazolu v neutrálním a zásaditém prostředí při rychlosti polarizace 200 mV s^{-1} jsou zobrazeny na obr. 5a, přičemž je patrné, že elektrodová reakce odpovídající čtyřelektronové redukcí nitroskupiny na odpovídající hydroxylaminoskupinu je i na SBiDE ireverzibilní (resp. v prostředí o pH 12,0 ji lze považovat i za kvazi-reverzibilní). V obou zkoumaných prostředích byly při jednotlivých rychlostech polarizace (v) vyhodnoceny výšky píku (I_p) metronidazolu a do grafu byly vyneseny závislosti $\log |I_p|$ vs. $\log v$ (obr. 5b), z jejichž absolutních hodnot směrnice ($|k|$) je možné určit, jakým krokem (nejčastěji difuze analytu při $|k| = 0,5$, adsorpce analytu při $|k| = 1,0$ či kinetika elektrodové reakce při $0 < |k| < 0,5$) jsou elektrodové děje na SBiDE kontrolovány²⁸. V neutrálním prostředí byla získána závislost logaritmu



Obr. 5. (a) Cyklické voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE při rychlosti polarizace (v) 200 mV s^{-1} ve vodném roztoku BR pufru o pH 7,0 (1) a 12,0 (2). (b) Závislost $\log |I_p|$ metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na $\log v$ změřená pomocí cyklické voltametrie na SBiDE v rozmezí rychlostí polarizace 10–1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufru o pH 7,0 (1) a 12,0 (2)



Obr. 6. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) ($n = 20$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 bez použití regeneračních potenciálů (1) a s regeneračními potenciály $E_{\text{in}_r} = -490 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}_r} = -1500 \text{ mV}$ (2). (b) Odpovídající závislost proudové odezvy (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) ($n = 20$), měřeno na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 technikou DPV bez použití regeneračních potenciálů (1) a s regeneračními potenciály $E_{\text{in}_r} = -490 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}_r} = -1500 \text{ mV}$ (2) (cit.²⁶)

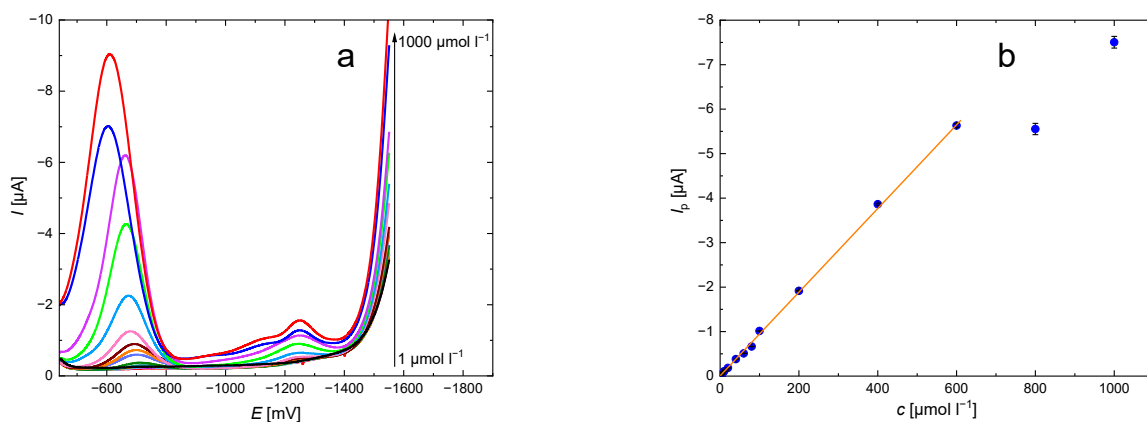
absolutní hodnoty výšky píku metronidazolu na logaritmu rychlosti polarizace s absolutní hodnotou směrnice 0,29 a $r^2 = 0,9891$ (obr. 5b, závislost 1). To značí, že v tomto prostředí je elektrodový děj kontrolovaný čistě kinetikou elektrodové reakce, tedy její nízkou rychlostí. V zásaditém prostředí (obr. 5b, závislost 2) nelze získanou závislost spolehlivě proložit přímkou v celém studovaném intervalu rychlostí polarizace, avšak je možné ji proložit v rozmezí vyšších rychlostí polarizace 50–1000 mV s^{-1} a získat absolutní hodnotou směrnice 0,42 a $r^2 = 0,9871$, které nasvědčují ději kontrolovanému spíše difuzí; v rozmezí rychlostí polarizace 50–200 mV s^{-1} je vliv difuze již zcela převažující ($|k| = 0,50$ a $r^2 = 0,9965$).

Dále bylo zjišťováno, zda je nutné provádět elektrochemickou regeneraci při opakovaných DPV stanoveních metronidazolu na SBiDE, aby nedocházelo k pasivaci pracovní elektrody a stanovení vykazovala dobrou opakovatelnost. Regenerační potenciály²⁷ $E_{\text{in,r}} = -490$ mV a $E_{\text{fin,r}} = -1500$ mV byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech). Aplikované regenerační potenciály mírně zvýšily proudovou odezvu metronidazolu (obr. 6a), avšak zhoršily opakovatelnost (docházelo k postupnému nárůstu výšky píku; obr. 6b, sada bodů 2 s hodnotou $s_r = 1,2$ %, $n = 20$), proto byla následující měření technikou DPV prováděna bez vkládání těchto regeneračních potenciálů (obr. 6b, sada bodů 1 s hodnotou $s_r = 0,045$ %, $n = 20$).

Voltametrické stanovení metronidazolu na pevné bismutové kapkové elektrodě

Kalibrační závislosti metronidazolu byly měřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} . Kalibrace byla proměřena kromě optimálního prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 také v prostředích o pH 3,0 a 7,0. Jevilo se jako zajímavé zjistit, jaký průběh bude mít koncentrační závislost metronidazolu v kyselém či neutrálním prostředí, avšak bylo potvrzeno, že pro stanovení metronidazolu je kyselé i neutrální prostředí nevyhovující. Kalibrační závislost v prostředí BR pufru o pH 12,0 je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu $1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Mez stanovitelnosti (LOQ ; $10\sigma/k$) činila $1,4$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ a mez detekce (LOD ; $3\sigma/k$) $0,41$ $\mu\text{mol l}^{-1}$. Na obr. 7a jsou znázorněny DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) v prostředí BR pufru o pH 12,0. Na obr. 7b je zobrazena odpovídající kalibrační závislost výšky píku metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}). V tab. II jsou uvedeny parametry jednotlivých kalibračních přímk.

U řady organických elektrochemicky aktivních sloučenin je možné pro další zvýšení citlivosti jejich stanovení (a tedy snížení hodnot LOD a LOQ) využít vložením potenciálně stimulovanou adsorpční akumulaci analytu na povrch pracovní elektrody^{29,30}. V případě stanovení metronidazolu na SBiDE však nebylo možné techniku diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie použít, proto-



Obr. 7. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1\text{--}1000$ $\mu\text{mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0; černá barva značí základní elektrolyt (cit.²⁶). (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1\text{--}1000$ $\mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: I_p [nA] = $-9,47c$ [$\mu\text{mol l}^{-1}$] + $0,585$; $r^2 = 0,9993$ (cit.²⁶)

Tabulka II

Parametry kalibračních přímk metronidazolu pro techniku DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0

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

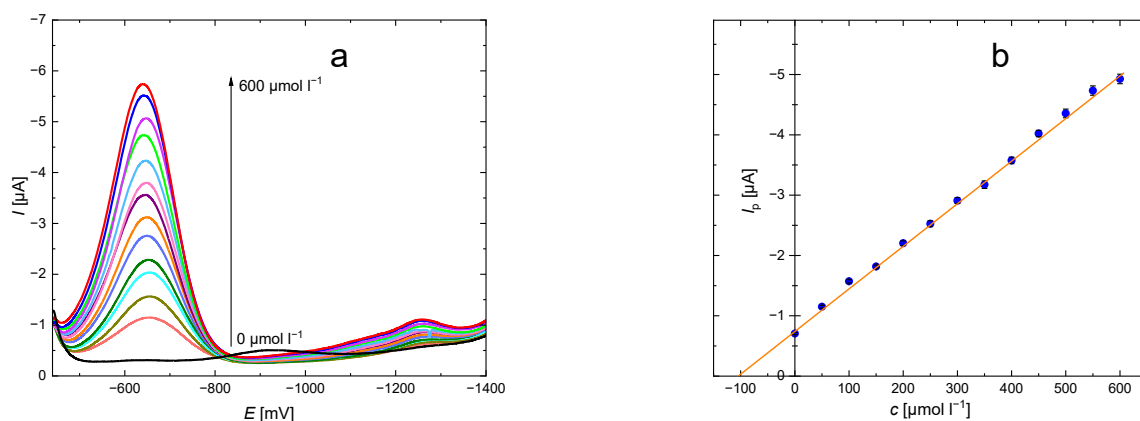
že mezi začátkem využitelného potenciálového okna ohraničeného elektrochemickou oxidací povrchu bismutové kapky (−440 mV, obr. 3a) a mezi potenciálem píku metronidazolu (cca −700 mV, obr. 7a) se nenachází žádné pro tento účel vhodné akumulární potenciály, při kterých by buďto nedocházelo k degradaci povrchu pracovní elektrody, nebo k nechtěné elektrolýze metronidazolu.

Aplikovatelnost nově vyvinuté DPV metody byla ověřena při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody. Pitná voda byla odebrána z vodovodní sítě v budově Chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Autentické vzorky o objemu 20,0 ml byly tvořeny 18,0 ml pitné vody obsahující přídavný standard metronidazolu o určité koncentraci a 2,0 ml BR pufru o pH 12,0, které navíc obsahovaly nezbytný přídavek 100 μl roztoku chelatonu III o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ pro potlačení interferujícího vlivu kationtů přítomných v pitné vodě^{6,7}. Kalibrační závislost metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody byla měřena v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ s rovnicí regrese celkové lineární závislosti: $I_p [\text{nA}] = -6,47c [\mu\text{mol l}^{-1}] - 132$; $r^2 = 0,9586$ ($LOD = 1,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $LOQ = 5,8 \mu\text{mol l}^{-1}$). Z nižší hodnoty směrnice získané závislosti oproti závislostem z obr. 7b a tab. II je patrné, že matrice pitné vody mírně

snižuje citlivost stanovení, přičemž určitou roli zde hraje i nařazení autentických vzorků pitné vody základním elektrolytem v objemovém poměru 9:1.

Stanovení metronidazolu v lékových formách

Voltametrické stanovení metronidazolu v léčivech bylo prováděno metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek 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. Pro měření metodou DPV byly připraveny roztoky 20,0 ml BR pufru o pH 12,0, které obsahovaly 200 μl zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 50 μl zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 50 μl . Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Na obr. 8a jsou pro ilustraci ukázány DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané při jeho stanovení v tabletě Entizol 250 mg a na obr. 8b je znázorněna závislost výšky píku na kon-

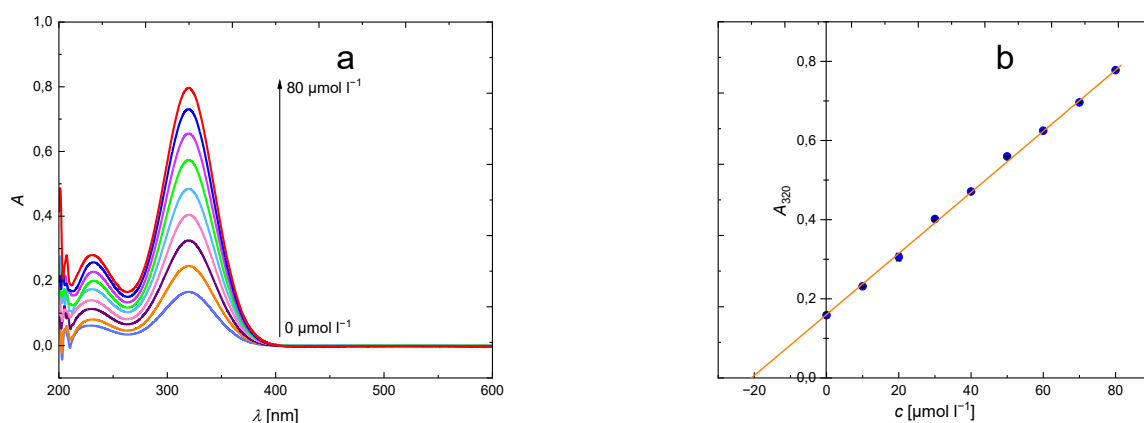


Obr. 8. (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0-600 \mu\text{mol l}^{-1}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0-600 \mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$

Tabulka III

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0

Léčivo	$c_{\text{standard metronidazolu}} [\mu\text{mol l}^{-1}]$	Směrnice [mA l mol^{-1}]	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



Obr. 9. (a) Absorpční spektra metronidazolu zaznamenaná v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přidaným standardem analytu ($c = 0\text{--}80\ \mu\text{mol l}^{-1}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0. (b) Závislost absorbance při vlnové délce 320 nm (A_{320}) na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0\text{--}80\ \mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$

centraci přidaného standardu metronidazolu v této tabletě. V tab. III jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech.

Jako srovnávací metoda k voltametričkému stanovení metronidazolu v léčivech pomocí metody přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek byla použita UV-Vis absorpční spektrofotometrie. Pro měření metodou přidavku standardu byly připraveny roztoky 10,0 ml BR pufru o pH 12,0, které obsahovaly 200 μl zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 100 μl zásobní-

ho roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-3}\ \text{mol l}^{-1}$), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 μl . Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $6 \cdot 10^{-5}\ \text{mol l}^{-1}$. Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $8 \cdot 10^{-5}\ \text{mol l}^{-1}$. Na obr. 9a jsou pro ukázkou uvedeny UV-Vis absorpční spektra metronidazolu zaznamenané při jeho stanovení v tabletě Entizol 250 mg, na obr. 9b je znázorněna odpovídající závislost absorbance při vlnové délce 320 nm na koncen-

Tabulka IV

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí UV-Vis spektrofotometrie při vlnové délce 320 nm v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm

Léčivo	$c_{\text{standard metronidazolu}} [\mu\text{mol l}^{-1}]$	Směrnice [l mol^{-1}]	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 V

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

Léčivo	$w_{\text{voltametrie}} [\%]$	$w_{\text{spektrofotometrie}} [\%]$	$w_{\text{voltametrie}} / w_{\text{spektrofotometrie}} [\%]$
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

traci přidaného standardu metronidazolu. V tab. IV jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tab. V jsou porovnané výsledky získané pomocí DPV na SBiDE a UV-Vis spektrofotometrie.

Závěr

V této práci byla studována nová komerčně dostupná pracovní elektroda – pevná kapková bismutová elektroda (SBiDE) – a zkoumáno její využití pro voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV). Za optimálních podmínek bylo v prostředí BR pufru o pH 12,0 dosaženo $LOD = 0,41 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $LOQ = 1,4 \mu\text{mol l}^{-1}$. Nově vyvinutá DPV metoda byla rovněž úspěšně použita při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody ($LOD = 1,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $LOQ = 5,8 \mu\text{mol l}^{-1}$) a v různých 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. Jako srovnávací analytická metoda byla u lékových forem použita UV-Vis spektrofotometrie.

U infuzního roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablety Entizol 250 mg a vaginální tablety Entizol 500 mg jsou hodnoty stanoveného množství léčiva metronidazolu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) za daných optimálních podmínek při použití DPV na SBiDE a UV-Vis spektrofotometrie srovnatelné. U infuzního roztoku Noridem 500 mg/100 ml bylo voltametrickou metodou stanoveno 78 % metronidazolu a spektrofotometrickou metodou bylo stanoveno 106 % metronidazolu. Z toho vyplývá, že DPV na SBiDE je vhodná pro stanovení metronidazolu v následujících lékových formách: infuzní roztok Efloran 500 mg/100 ml, tableta Entizol 250 mg a vaginální tableta Entizol 500 mg.

LITERATURA

- Lezi N., Vyskočil V., Economou A., Barek J., v knize: *Sensing in Electroanalysis, Vol. 7* (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vytřas K., ed.), str. 71–78. University Press Centre, Pardubice 2012.
- Abdallah R., Derghane A., Lou Y.-Y., Merdrignac-Conanec O., Floner D., Geneste F.: *J. Electroanal. Chem.* 839, 32 (2019).
- Švancara I., Vytřas K.: *Chem. Listy* 100, 90 (2006).
- Hutton E. A., Ogorevc B., Hočevar S. B., Smyth M. R.: *Anal. Chim. Acta* 557, 57 (2006).
- Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 117, 3 (2023).
- Deýlová D., Vyskočil V., Barek J., Economou A.: *Talanta* 102, 68 (2012).
- Deýlová D., Vyskočil V., Economou A., Mansfeldová V., Barek J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 9, 4653 (2014).
- Švancara I., Sýs M.: *Chem. Listy* 118, 525 (2024).
- Prchal V., Ottenschlägerová A., Vyskočil V., Barek J.: *Anal. Lett.* 49, 49 (2016).
- Prchal V., Vyskočil V., Barek J.: *J. Electrochem. Soc.* 164, H316 (2017).
- Metrohm: https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html, staženo 24. 8. 2024.
- Švancara I., Prior C., Hočevar S. B., Wang J.: *Electroanalysis* 22, 1405 (2010).
- Raether W., Hänel H.: *Parasitol. Res.* 90, S19 (2003).
- Edwards D. I.: *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9 (1993).
- Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C.: *Drugs* 54, 679 (1997).
- Meenakshi S., Rama R., Pandian K., Gopinath S. C. B.: *Microchem. J.* 165, 106151 (2021).
- Mráček O., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 115, 669 (2021).
- Asadpour-Zeynali K., Majidi M. R., Najafi-Marandi P., Noriyaray Z.: *J. Chin. Chem. Soc.* 60, 1253 (2013).
- Yang X., Liu M., Yin Y., Tang F., Xu H., Liao X.: *Sensors* 18, 964 (2018).
- Český lékopis*. Grada Publishing, Praha 2017.
- Xiao N., Deng J., Cheng J., Ju S., Zhao H., Xie J., Qian D., He J.: *Biosens. Bioelectron.* 81, 54 (2016).
- Brett A. M. O., Serrano S. H. P., Gutz I., La-Scalea M. A.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42, 175 (1997).
- Gui Y., Ni Y. N., Kokot S.: *Chin. Chem. Lett.* 22, 591 (2011).
- Škvorová L.: *Voltametrické stanovení vybraných nitroimidazolových léčiv. Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012.
- Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčová Z., Škvorová L., Tvrđíková J., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 129 (2011).
- Jarošová J., Vyskočil V.: *Czech Chem. Soc. Symp. Ser.* 22, 61 (2024). doi: 10.54779/ccsss20240061.
- Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2957 (2011).
- Brett C. M. A., Brett A. M. O.: *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).
- Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 103, 889 (2009).

J. Jarošová and V. Vyskočil (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, Czech Republic): **Voltammetric Determination of the Drug Metronidazole Using a Solid Bismuth Drop Electrode**

Solid bismuth drop electrode (SBiDE) is a new working electrode commercially available on the Czech market since 2020 by the company Metrohm. The aim of this work was to verify the applicability of SBiDE for the voltammetric determination of a model organic substance

representing electrochemically reducible biologically active compounds, namely, the drug metronidazole (an antibiotic used to treat diseases caused by both Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria). To the best of our knowledge, this is the very first published research work using SBiDE. Under optimum conditions (Britton-Robinson buffer of pH 12.0 was used as the supporting electrolyte and the working electrode surface was not electrochemically regenerated), a linear calibration dependence of metronidazole was obtained using differential pulse voltammetry (DPV) in the concentration range from 1 to 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with the limits of detection (*LOD*) and quantification (*LOQ*) of 0.41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Cyclic voltammetry (CV) on SBiDE was

used to characterize the electrode process of the irreversible reduction of metronidazole. The newly developed DPV method was also successfully applied for the determination of metronidazole in authentic drinking water samples (*LOD* = 1.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and *LOQ* = 5.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and in various dosage forms (UV-Vis spectrophotometry was used as a comparative analytical method).

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: metronidazole, antibiotics, drug analysis, electrochemistry, differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry, solid bismuth drop electrode, UV-Vis spectrophotometry



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.