

# PEVNÁ BISMUTOVÁ KAPKOVÁ ELEKTRODA – NOVÝ NÁSTROJ PRO VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ ELEKTROCHEMICKY REDUKOVATELNÝCH ORGANICKÝCH SLOUČENIN

JOHANKA JAROŠOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

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

Klíčová slova: metronidazol, antibiotika, analýza léčiv, elektrochemie, diferenční pulzní voltametrie, pevná bismutová kapková elektroda

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20240061>

## Úvod

Pevná bismutová kapková elektroda (SBI<sub>DE</sub>, z angl. solid bismuth drop electrode) je nová pracovní elektroda komerčně dodávaná na český trh společností Metrohm od roku 2020. Dle výrobce lze tuto elektrodu použít pro stanovení nízkých koncentrací těžkých kovů v jezerech, řekách, podzemních vodách a především v kontaminované pitné vodě. Lze stanovovat nízké koncentrace od jednotek  $\mu\text{g l}^{-1}$ , někdy je však možné stanovit koncentraci již od jednotek  $\text{ng l}^{-1}$ . Elektroda je vhodná pro stopovou analýzu iontů těžkých kovů, jako jsou Cd, Pb, Ni, Co i Fe, proto dokáže v těchto stanoveních zcela nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu<sup>1,2</sup>.

Metronidazol, 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*)<sup>3–6</sup>.

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 (SBI<sub>DE</sub>) při voltametrickém stanovení modelové organické látky, přičemž dle dostupných informací se jedná o zcela první ve světě publikovanou práci na toto téma. Nově vyvinutá diferenčně pulzně voltametrická metoda byla rovněž úspěšně aplikována při stanovení metronidazolu v různých lékových formách.

## 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 smícháním zásadité složky (NaOH o koncentraci  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  (p.a., Penta, Praha, ČR)) s kyselou složkou ( $85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a  $99,8\% \text{ CH}_3\text{COOH}$  (p.a., Penta, Praha, ČR)) o koncentraci všech kyselin  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ .

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 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 SBI<sub>DE</sub> (typ 6.0346.000, Metrohm, Herisau, Švýcarsko), jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda (typ 10-20+polara Ag 10 10-2014-3,  $3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ , Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Byla použita technika diferenční pulzní voltametrie (DPV) s parametry: šířka pulzu 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), perioda pulzu 150 ms a výška pulzu  $-50 \text{ mV}$ . Ve voltametrické nádobce byly analyzované vzorky o celkovém objemu 20 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.

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

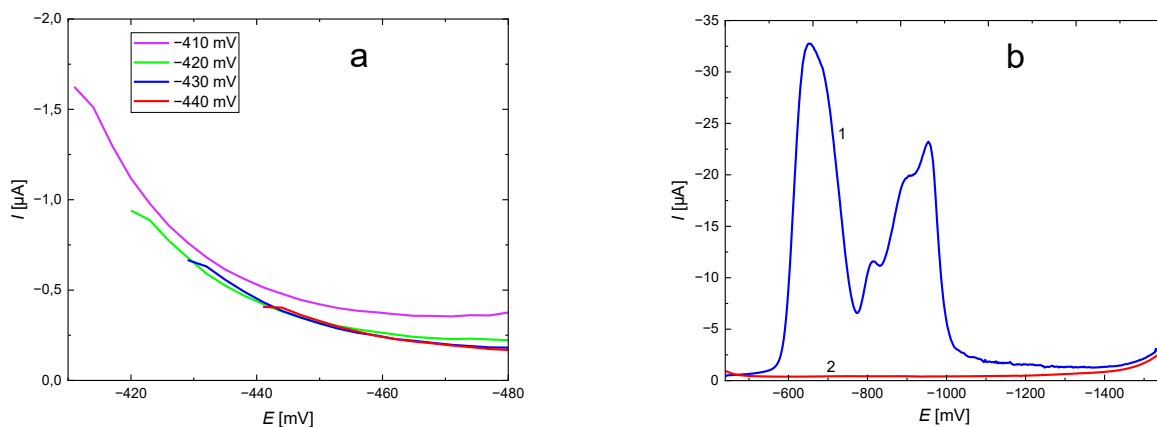
## Výsledky a diskuse

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. 1a). SBiDE je velmi citlivá na použití potenciálů, při kterých dochází k tvorbě oxidů bismutu anebo rozpouštění bismutu samotného. Pokud byla bismutová elektroda ponechána v pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, bismut začal oxidovat a vzniklé oxidy byly následně při prvním voltametričtém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou (obr. 1b).

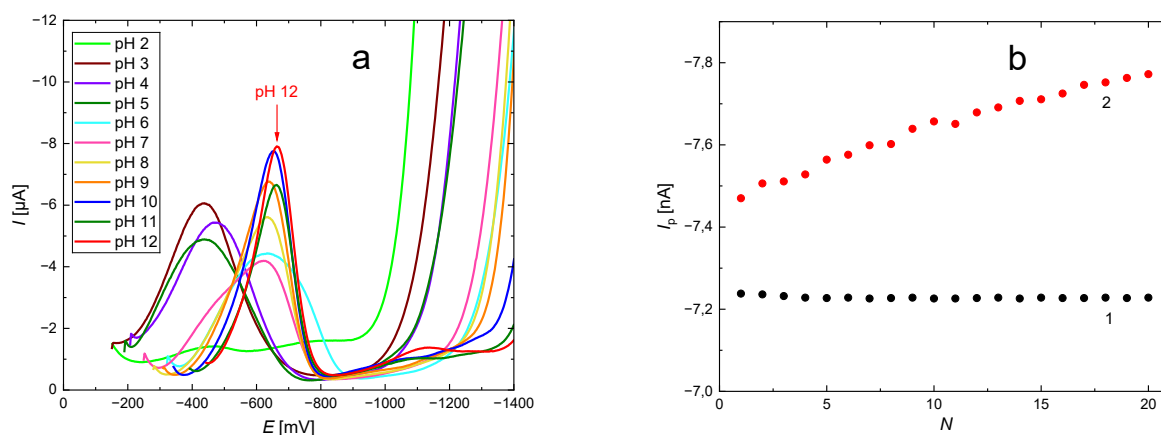
Dalším krokem při vývoji DPV metody bylo nalezení vhodného základního elektrolytu. Chování metronidazolu bylo zkoumáno ve vodném prostředí BR pufru

o pH 2,0–12,0. Z obr. 2a 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 hydroxylamin<sup>5</sup>. Jako optimální prostředí pro další měření byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12, pro dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu analytu.

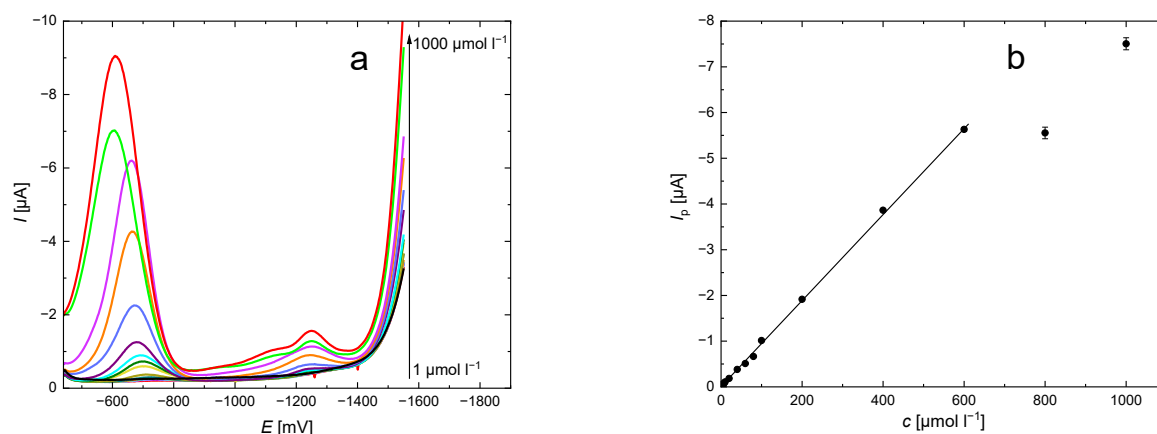
Dále bylo zjišťováno, zda je zapotřebí zakomponovat elektrochemickou regeneraci při opakovaných DPV stanoveních metronidazolu na SBiDE, aby nedocházelo k pasivaci pracovní elektrody a stanovení vykazovala dobrou opakovatelnost. Regenerační potenciály<sup>7</sup>  $E_{in,r} = -490$  mV a  $E_{fin,r} = -1500$  mV byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech). Aplikované regenerační potenciály mírně zvýšily proudovou odezvu metronidazolu, avšak zhoršily opakovatelnost (docházelo k postupnému nárůstu výšky



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



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



Obr. 3. (a) DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1\text{--}1000 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ( $c = 1\text{--}1000 \mu\text{mol l}^{-1}$ ); chybové úsečky pro  $n = 5$ ; rovnice regrese:  $I_p [\text{nA}] = -9,47c [\mu\text{mol l}^{-1}] - 0,585$ ;  $r^2 = 0,9993$

Tabulka I

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

$c [\mu\text{mol l}^{-1}]$	Směrnice [ $\text{mA l mol}^{-1}$ ]	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

píku), proto byla následující měření technikou DPV prováděna bez vkládání těchto regeneračních potenciálů (obr. 2b).

Kalibrační závislosti metronidazolu byly měřeny v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Kalibrace byla proměřena kromě optimálního prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 také v prostředích o pH 3 a 7. Jevilo se jako zajímavé zjistit, jaký průběh bude mít koncentrační závislost metronidazolu v prostředích odpovídajících kyselému a neutrálnímu charakteru, avšak pro stanovení metronidazolu je kyselé i neutrální prostředí nevyhovující. Kalibrační závislost v prostředí BR pufru o pH 12 je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ;  $10\sigma/k$ ) činila  $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  a mez detekce ( $L_D$ ;  $3\sigma/k$ ) tedy

$4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Na obr. 3a jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí BR pufru o pH 12. Na obr. 3b je zobrazena odpovídající kalibrační závislost velikosti píku metronidazolu na jeho koncentraci ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ). V tabulce I jsou uvedeny parametry jednotlivých kalibračních přímk.

Voltametrické stanovení množství metronidazolu v léčivech bylo prováděno metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, v tabletech Entizol 250 mg, vaginální tabletech Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml. Pro měření metodou DPV byly připraveny 20ml roztoky BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku standardu ( $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ), jehož

Tabulka II

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

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

Tabulka III

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

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

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

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

objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 50  $\mu\text{l}$ . 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  $5 \cdot 10^{-5}$  –  $6 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol l}^{-1}$ . V tabulce II jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech.

Jako srovnávací metoda k voltametričkému stanovení metronidazolu v léčivech metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek byla použita UV-Vis absorpční spektrometrie. Pro měření metodou přidavku standardu byly připraveny 10ml roztoky BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku standardu ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$   $\text{mol l}^{-1}$ ), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100  $\mu\text{l}$ . 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  $1 \cdot 10^{-5}$  –  $8 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol l}^{-1}$ . V tabulce III jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tabulce IV jsou porovnané výsledky získané pomocí DPV na SBiDE a UV-Vis spektrometrie.

## Závěr

V této práci byla studována nová komerčně dostupná pracovní elektroda – pevná kapková bismutová elektroda (SBiDE) – a její využití pro voltametričké stanovení léčiva metronidazolu technikou diferenční pulzní voltametrie (DPV). Za optimálních podmínek bylo v prostředí BR pufru o pH 12,0 dosaženo  $L_D = 4,1 \cdot 10^{-7}$   $\text{mol l}^{-1}$  a  $L_Q = 1,4 \cdot 10^{-6}$   $\text{mol l}^{-1}$ .

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

Zvolená voltametričká metoda byla porovnána se srovnávací analytickou metodou (UV-Vis absorpční spektrometrie), přičemž stanovení probíhala v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12. U infuzního roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablety Entizol 250 mg a tablety Entizol 500 mg jsou hodnoty stanoveného množství léčiva metronidazolu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) za daných optimálních podmínek při použití DPV na SBiDE a UV-Vis spektrometrie srovnatelné. U infuzního roztoku Noridem bylo voltametričkou metodou stanoveno 78 % metronidazolu a spektrofotometričnou 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

1. Metrohm: [https://www.metrohm.com/cs\\_cz/products/6/0346/60346000.html](https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html), staženo 24. 4. 2023.
2. Švancara I., Prior C., Hočevar S. B., Wang J.: *Electroanalysis* 22, 1405 (2010).
3. Raether W., Hänel H.: *Parasitol. Res.* 90, S19 (2003).
4. Edwards D. I.: *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9 (1993).
5. Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C.: *Drugs* 54, 679 (1997).
6. Meenakshi S., Rama R., Pandian K., Gopinath S. C. B.: *Microchem. J.* 165, 1 (2021).
7. Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2957 (2011).

**J. Jarošová and V. Vyskočil** (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Solid Bismuth Drop Electrode – A New Tool for Voltammetric Determination of Electrochemically Reducible Organic Compounds**

Solid bismuth drop electrode (SbIDE) is a new working electrode commercially available on the Czech market from 2020 by the company Metrohm. The aim of this work was to verify the applicability of the SbIDE in the voltammetric determination of a model organic substance. According to the available information, this is the very first published work on this topic. Metronidazole (an antibiotic used to treat diseases caused by both Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria) was chosen in this study as a model drug representing electrochemically reducible biologically active compounds. Under optimum conditions (Britton-Robinson buffer of pH 12.0 used as the supporting electrolyte and no electrochemical regeneration of the working electrode surface), a linear calibration dependence of metronidazole was recorded 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. The newly developed differential pulse voltammetric (DPV) method has also been successfully applied in the determination of metronidazole in various dosage forms.

**Keywords:** metronidazole, antibiotics, drug analysis, electrochemistry, differential pulse voltammetry, solid bismuth drop electrode



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.