

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Využití modifikovaných uhlíkových elektrod
pro elektrochemické stanovení kolchicinu

Diplomová práce

Autor práce:

Studijní obor:

Forma studia:

Vedoucí práce:

Konzultant práce:

Bc. Eva Müllerová

Analytická chemie

Prezenční

Mgr. Vladimír Halouzka, Ph.D.

Mgr. Daniel Riman

Olomouc 2017

Prohlašuji, že jsem vypracovala tuto diplomovou práci samostatně na základě odborné literatury a zdrojů uvedených v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, aby má diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Bc. Eva Müllerová

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Vladimíru Halouzkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a cenné rady, které mi věnoval během zpracování diplomové práce. Další poděkování patří panu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. za seřízení měřících přístrojů, užitečné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za poskytnutí pomůcek k měření, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Velké díky patří také panu Mgr. Danielu Rimanovi za obětavý přístup a dodávání optimismu během měření a zpracovávání této práce. Děkuji také svým kamarádům, rodině a příteli za podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Eva Müllerová
Název práce:	Využití modifikovaných uhlíkových elektrod pro elektrochemické stanovení kolchicinu
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimír Halouzka, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Daniel Riman
Rok obhajoby práce:	2018
Anotace:	<p>Práce je věnována charakterizaci uhlíkových elektrod jak nemodifikovaných, tak i modifikovaných různými způsoby pro nalezení pracovní elektrody pro elektrochemické stanovení kolchicinu jako nezávislé alternativní metody k metodám spektrofotometrickým a separačním. K charakterizaci elektrod byly použity následující metody: cyklická voltametrie, diferenčně pulsní voltametrie a skenovací elektronová mikroskopie. CFME modifikovaná Zr jiskrovým výbojem dosáhla nejlepších výsledku v rámci charakterizace a zároveň prostřednictvím amperometrických měření byla potvrzena její možná aplikace v průtokových systémech či jako sensor pro stanovení kolchicinu v kapalinové chromatografii s elektrochemickou detekcí.</p>
Klíčová slova:	kolchicin, cyklická voltametrie, diferenčně pulsní voltametrie, amperometrie, modifikace jiskrovým výbojem, elektroforetická depozice, kapalinová chromatografie
Počet stran:	70
Počet příloh:	0
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Eva Müllerová
Title:	The use of modified carbon electrodes for the electrochemical determination of colchicine
Type of thesis:	Diploma
Department:	Department of Analytical chemistry
Supervisor:	Mgr. Vladimír Halouzka, Ph.D.
Consultant:	Mgr. Daniel Riman
The year of presentation:	2018
Annotation:	This thesis focuses on the characterisation of carbon electrodes, both unmodified and modified in different ways to find a suitable working electrode for the electrochemical determination of colchicine as an alternative to spectrophotometric and separation methods. The following methods were used to characterize the electrodes: cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and scanning electrode microscopy. The CFME modified with Zr using spark deposition reached the best results among the characterizations; in addition, amperometric measurements were utilized to confirm its possible use in flow systems or as a sensor for the determination of colchicine in liquid chromatography systems with electrochemical detection.
Keywords:	colchicine, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, amperometry, spark deposition, electrophoretic deposition, liquid chromatography
Number of pages:	70
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	10
2.1.	Rostlinné toxiny a jedy	10
2.1.1.	Kolchicin	10
2.1.2.	Stanovení kolchicinu	15
2.2.	Voltametrické metody	18
2.2.1.	Cyklická voltametrie	19
2.2.2.	Diferenčně pulsní voltametrie.....	21
2.3.	Amperometrie	23
2.4.	Elektroanalytická měření v průtokových systémech.....	24
2.4.1.	Kontinuální průtoková analýza (CFA).....	24
2.4.2.	Průtoková injekční analýza (FIA).....	24
2.4.3.	Sekvenční injekční analýza (SIA).....	25
2.4.4.	Detekční cely	25
3	Experimentální část	27
3.1.	Přístroje a pomůcky.....	27
3.2.	Standardy a chemikálie.....	28
3.3.	Použité kovy	28
3.4.	Konstrukce uhlíkové vláknové mikroelektrody (CFME).....	29
3.5.	Modifikace pracovních elektrod	30
3.5.1.	Elektroforetická depozice	30
3.5.2.	Modifikace jiskrovým výbojem (spark deposition)	31
3.6.	Čištění a aktivace povrchu pracovních elektrod	33
3.7.	Příprava standardních roztoků a mobilní fáze	34
3.8.	Měření.....	35
3.8.1.	Charakterizace modifikovaných a nemodifikovaných uhlíkových elektrod	35

3.8.2.	pH závislost kolchicinu	36
3.8.3.	Cyklická voltametrie kolchicinu	36
3.8.4.	Diferenčně pulsní voltametrie kolchicinu	36
3.8.5.	Amperometrie kolchicinu	37
3.8.6.	Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	37
4	Diskuze a výsledky	39
4.1.	Charakterizace uhlíkových elektrod	39
4.1.1.	Cyklická voltametrie ferrikyanidu	39
4.1.2.	Cyklická voltametrie kolchicinu	46
4.1.3.	Diferenčně pulsní voltametrie kolchicinu	54
4.2.	Amperometrie kolchicinu	56
4.3.	Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	59
5	Závěr	63
6	Summary	64
7	Seznam použité literatury	65

Seznam zkratek

ASV	anodická stripping voltametrie (anodic stripping voltammetry)
B-R pufr	Britton-Robinsonův pufr
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CFA	kontinuální průtoková analýza (continuous flow analysis)
CFME	uhlíková vláknová mikroelektroda (carbon fiber micro electrode)
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
DME	rtuťová kapková elektroda (drop mercury electrode)
DPV	diferenčně pulsní voltametrie (differential pulse voltammetry)
ECL	elektro-chemiluminiscenční detekční systém (electrochemiluminescence)
EDS	energieově disperzní spektroskopie (energy dispersive X-ray spectroscopy)
EPD	elektroforetická depozice (electrophoretic deposition)
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
HMDE	rtuťová visící kapková elektroda (high mercury drop electrode)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IR	infračervené spektrum

	(infra-red)
ITO	elektroda tvořená oxidem cíničitým dopovaným indiem (indium-tin-oxide)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied chemistry)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LSV	linear sweep voltametrie (linear sweep voltammetry)
MF	mobilní fáze
MWCNTs	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (multiwall carbon nanotubes)
p. o.	perorální podání (podání léků ústy) (per os)
PGE	tužková grafitová elektroda (pencil graphite electrode)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)
SIA	sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)
S/N	signál/šum (signal-to-noise ratio)
SPE	tištěná uhlíková elektroda (screen printed electrode)
SWV	square wave voltametrie (square wave voltammetry)
UV	ultrafialové světlo (ultra-violet)
UV/VIS	ultrafialovo/viditelná spektroskopie (ultra-violet/visible spectroscopy)

1 Úvod

Rostlinný alkaloid kolchicin je známý pro své účinné zmírnění bolesti při akutních záchvatech dny. Dále nachází využití jako lék používaný při nádorových onemocnění a akutních zánětlivých onemocnění perikardu. U rostlinných buněk způsobuje polyploiditu a v metalurgii je využíván pro ochranu měkké oceli proti kyselé korozi. Aby se jedinec otrávil, stačí velmi malé množství kolchicinu. K otravám dochází nejčastěji ze sebevražedných pohnutek či předávkováním léků obsahujících kolchicin. Pro prokázání a stanovení kolchicinu existuje mnoho analytických metod. Jsou známy metody: spektrofotometrické, volumetrické, gravimetrické a elektrochemické.

Kolchicin se pro svou snadnou oxidovatelnost řadí do skupiny elektrochemicky aktivních látek, této vlastnosti je využito především k jeho stanovení prostřednictvím elektrochemických metod. Jsou popsána stanovení kolchicinu ve farmaceutických preparátech diferenčně pulsní voltametrií na GCE či anodickou diferenčně pulsní voltametrií na PSE. Své využití nacházejí i modifikované elektrody, např. při square wave anodické stripping voltametrii na GCE modifikované kompozitním filmem složeného z oxidu grafenu a Nafionu stanovení kolchicinu v reálných vzorcích.

Cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat uhlíkové elektrody jak nemodifikované, tak modifikované a vybrat tu nejlepší pracovní elektrodu. K charakterizaci elektrod byly použity metody: cyklická voltametrie, diferenčně pulsní voltametrie a skenovací elektronová mikroskopie. K modifikaci byly použity: elektroforetická depozice a jiskrový výboj. Dalším úkolem bylo najít elektrochemickou metodu pro stanovení kolchicinu v průtoku, jako nezávislou alternativu k metodám spektrofotometrickým a separačním, zde se uplatnila amperometrie. Hlavními nároky bylo, aby příprava a modifikace pracovní elektrody nebyly náročné na čas, finance a nezatěžovaly životní prostředí. Dalším požadavkem bylo otestovat vybranou elektrodu jako sensor v elektrochemické cele v rámci kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

2 Teoretická část

2.1. Rostlinné toxiny a jedy

Rostliny produkují mimo látek potřebných ke svému životu také sekundární metabolity. Ty vznikají jako konečný produkt látkové výměny rostliny. Do živočišných buněk vstupují cestou endocytózy. Jsou biologicky aktivní a mohou působit toxicky na živé organismy nebo mohou mít význam jako léčiva v závislosti na podaném množství a stavu příjemce.

Obsahové látky v rostlinách jsou rozděleny do mnoha skupin: alkaloidy, terpeny, glykosidy, toxické aminokyseliny a aminy, toxické proteiny, fenylypropany, fenoly a fenylové deriváty, polyalkany, lignany, saponiny, kumariny, nitrosloučeniny a azoxysloučeniny, fytoestrogeny a další.

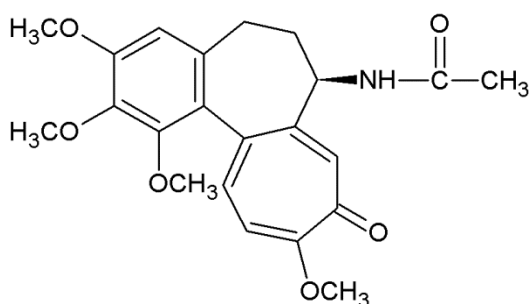
Jednou z nejvýznamnějších skupin těchto látek jsou alkaloidy. Společným znakem alkaloidů je přítomnost jednoho nebo více atomů dusíku. Jsou zabudovány převážně v kruhovém (heterocyklické alkaloidy), někdy v alifatickém řetězci (protoalkaloidy, alkaloidy s exocyklickým atomem dusíku) a mají aminový charakter [1]. Vznikají metabolickou přeměnou aminokyselin, i jiných prekurzorů (pseudoalkaloidy). Heterocyklické alkaloidy můžeme dále rozdělit dle uspořádání základního cyklu na izochinolonové, chinolizidinové, chinolinové, pyridinové, piperidinové, pyrolyzidinové, indolové, terpenové, imidazolové, steroidní aj. Alkaloidy se nejčastěji chovají jako slabé báze s výjimkou kvartérních amonných bází, které jsou silnější.

Izochinolinové alkaloidy mají společnou strukturní jednotku izochinolinové jádro. Jsou rozličných struktur s širokým výskytem a různým spektrem účinku. Právě do této skupiny patří alkaloidy vznikající z tyrosinu, mezi které se řadí i kolchicin [2].

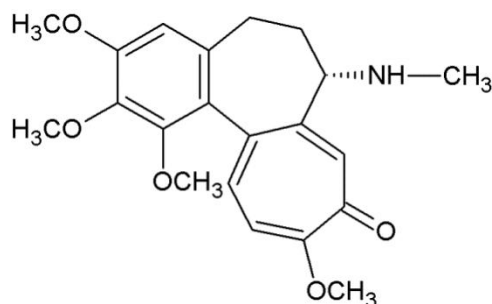
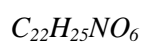
2.1.1. Kolchicin

Kolchicin N -[1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-6,7-dihydro-5H-benzoheptalen-7-yl]acetamid s molekulovou hmotností $M = 399,44$ g/mol, teplotou tání $t_f = 155-157$ °C a jeho derivát demekolcin N -desacetyl- N -methylkolchicin s molekulovou hmotností $M = 371,43$ g/mol a teplotou tání $t_f = 186$ °C se řadí mezi izochinolinové alkaloidy s dusíkem vázaným v postranním řetězci ve formě amidu (aminu v případě demekolcinu). I přes to, že má kolchicin velmi specifickou strukturu (Obr. 1), byl jeho biosyntetický základ dokázán ve

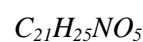
fenylalaninu a tyrosinu [1]. Enolické vlastnosti přítomných methoxy skupin způsobují kyselý charakter kolchicinu a jeho snadnou oxidovatelnost [3]. Kolchicin je nicméně také schopen redukce díky přítomnosti tropolonového kruhu. U tropolonových sloučenin dochází v kyselém prostředí k jednoelektronové redukci a v neutrálním a alkalickém prostředí dochází k dvouelektronové redukci. Prostřednictvím polarografie se podařilo zjistit, že alkoxyderiváty těchto sloučenin se redukují při nižších potenciálech, než samostatné tropolony [4]. Pravděpodobně se redukuje karbonylová skupina, u kolchicinu může také docházet k redukci amidu na amin. Při stanovení však dochází k pasivaci povrchu elektrody výsledným produktem redukce [5]. Demekolcin se od kolchicinu odlišuje nahrazením acetylové skupiny za methylenovou skupinu, viz Obr. 2. Pokusy na krysách bylo zjištěna jeho relativně nízká toxicita při vysoké stathmokineticke účinnosti (vliv na buněčné dělení) [4]. Využití nachází v kombinované chemoterapii s činidly poškozujícími DNA pro léčbu nádorových onemocnění jako je např. leukémie [6], dále při léčbě nádorů rezistentních na klasickou chemoterapii [7]. Mimo jiné je vhodný jako pomocná látka k predikci karcinomů v kombinaci s chemickými činidly [8] či v kombinaci s radiační indukci [9]. Demekolcin spolu s indukcí rentgenového záření byl použit pro určení výše náchylnosti k nádorovým onemocněním u lidí s genetickou poruchou (Alzheimerova nemoc, Downův syndrom) [10].



Obr. 1: Kolchicin



Obr. 2: Demekolcin

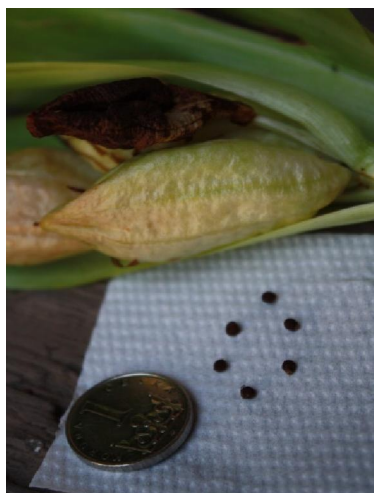


Kolchicin se poprvé podařilo izolovat jako nažloutlou amorfni látku pánům Pelletierovi a Caventouovi, kteří r. 1820 izolovali kolchicin z hlíz ocúnu jesenního [11]. Později r. 1947 F. Šantavý vypracoval jednoduchý postup extrakce kolchicinu ze semen Ocúnu jesenního [4].

Ocún jesenní, také nazývaný podzimní (*Colchicum autumnale*) náležící do čeledi liliovité (*Liliaceae*), je vytrvalá rostlina s neobvyklým životním cyklem. Na jaře vyrůstají pouze ploché zelené listy se semeníky obsahujícími hnědočerná kulovitá semínka a na podzim se objevují šesticípé růžovofialové květy (Obr. 3). Je rozšířen po celé Evropě, nejvíce se mu daří na přihnojovaných a zaplavovaných loukách, dále se vyskytuje na vlhkých hornatých loukách, ve světlých lesích a je také pěstován jako okrasná rostlina na zahradách. Celá rostlina je prudce jedovatá, obsahuje 21 alkaloidů, mezi ně patří nejvíce zastoupený kolchicin a jeho derivát demekolcin. Největší množství kolchicinu se nachází v semenech (0,2-0,6 % z hmotnosti semene) [1]. Zatímco v hlízách je obsaženo větší množství demekolcinu [12]. V kořenech (hlízách) je bohatě vyvinut methylační systém, proto obsahují vyšší množství kolchicinu a demekolcinu oproti demethylovaným látkám přítomným v květech a listech. Hlízy odevzdávají do semen převážně kolchicin, tím se o něj ochuzují, a proto v době jejich dozrávání v nich převažuje demekolcin [4]. Kolchicin lze také extrahovat z gloriózy vznešené (*Gloriosa superba*) [13].



listy se semeníky



detail semeníků a semínek



květ

Obr. 3: Ocún jesenní (Rajnochovice, Hostýnské vrchy)

Toxicita a příznaky otravy

Kolchicin a demekolcin jsou označovány jako mitotický, kapilární a buněčný jed neboli jed dělicího vřetenka se stathmokinétičnou účinností (cytostatika rostlinného původu). V nervových buňkách inhibují rychlý přenos proteinů nebo sacharidů, dále inhibují transport sekrečních vezikul z buněčného centra k plazmatickým membránám. Způsobují také zastavení dělení buněk v metafázi nevytvořením nebo špatně vytvořeným dělicím

vřeténkem (tvorba tubulin-kolchicinového komplexu), primárně působí v buňkách s velikou dělicí schopností (lymfatické orgány, buňky střevního epitelu, kostní dřeň, nádorové tkáně). Přímě brání polymeraci (vzniku) mikrotubulů. Následně tak dochází k rozpadu buněk a zastavení regenerace všech orgánů s vysokou rychlostí dělení buněk v celém organismu. Působí opačným mechanismem než paklitaxel, který také patří do skupiny toxinů dělicího vřeténka. Paklitaxel stimuluje polymeraci mikrotubulů, avšak inhibuje depolymeraci mikrotubulů zpět na tubulin navázáním se na beta-tubulinové podjednotky, zabrání tak rozdělení buňky a buňka následně zahyne. Podobným způsobem poškozuje buňky RTG záření, avšak to působí pouze na jedno místo. Otrava kolchicinem může připomínat otravy jinými sloučeninami např. arsenu a antimonu. K nejčastějším otravám dochází na jaře, kdy hospodářská zvířata mohou spásat zelené listy s dozrávajícími tobolkami, které převyšují ostatní vegetaci. Dále k příjmu rostliny dochází při krmení senem obsahujícím ocún jesenní. Méně časté otravy jsou způsobeny například nátlakovou pastvou na ocúnovitých loukách, kde jsou zvířata nucena konzumovat rostlinu, kterou běžně opomíjejí. (Ovce a kozy jsou odolné vůči toxicitě kolchicinu, avšak kolchicin přechází do mléka a to může mít za následek otravu dětí). Pro malé děti jsou nebezpečné hlavně tobolky se zralými semínky, protože semínka krásně chrastí a dětem to může připomínat mák v makovicích [14]. K intoxikaci dospělých dochází nejčastěji při pokusu o sebevraždu [15, 16] či překročením léčebné dávky [17]. Náhodné otravy bývají následkem záměny listů ocúnu s česnekem medvědím [18, 19]. Za průměrnou letální dávku pro dospělého člověka (p. o.) se považuje 20 až 30 mg kolchicinu, 60 g ocúnových listů nebo 6 g semen [1, 2]. Byla však zaznamenána smrtelná dávka 7 mg (p. o.) [17], ale v jiném případě nebyla smrtelná ani dávka 60 mg (p. o.) [20]. Z jiného zdroje vyplývá, že intravenózně podaný kolchicin je účinný při dávce 0,015 mg/kg, toxický v dávkách vyšších než 0,1 mg/kg a za smrtelnou dávku se považuje 0,8 mg/kg kolchicinu [21]. I zvířata reagují různě, například LD₅₀ pro myš je 6 mg/kg (p. o.), pro kočku je to 0,25 mg/kg (p. o.) a u křečka dávka 150mg/kg (p. o.) nevykazovala žádný efekt [2]. Významný rozdíl v množství smrtelné dávky je pravděpodobně způsoben přecitlivělostí některých lidí (zvířat) na kolchicin, což může působit problém při určování terapeutické dávky [22, 23]. První příznaky otravy lze pozorovat po 2-5 hodinách po požití [1]. U postiženého dochází k dráždění hltanu a jícnu, neschopnosti polykat, zvracení, kolikovým bolestem břicha, prudkému krvavému průjmu a také k častému močení, které přechází v oligurii (snížení vylučování moči). Veliké ztráty tělesných tekutin mají za následek šok [15]. Následuje změna turgoru (napětí) kůže, pokles tělesné teploty, pokles hladiny glukosy, bolest kloubů

a svalů, které mohou přejít do křeče [1]. Kolchicin způsobuje poškození centrální nervové soustavy, postižený upadá do kómatu, tvoří se otok na mozku a otok papily zrakového nervu. K poškození jaterní tkáně či k poškození ledvin nedochází vždy. Trombóza, sepe a alopecie (vypadávání vlasů a ochlupení) jsou další projevy těžké otravy kolchicinem [15, 24]. Otrava končí respirační paralýzou postiženého, tzn. zástavou dechu [1], srdečním selháním [19] a celkovým selháním orgánů [18, 25]. Ke smrti dochází do 7 hodin po požití, ale byly publikovány i případy úmrtí až po dvou [1] či pěti [19] a více dnech [15]. Kolchicin je eliminován žlučí a reabsorbován střevy, což objasňuje dlouhotrvající efekt jednotlivé dávky a tak možnost snadného předávkování [2, 26]. U postiženého se vyvolává zvracení a provede se výplach žaludku pro odstranění toxické látky, dále se podává aktivní uhlí [24], mucilaginóza a teplý čaj [1]. Důležité je také zajištění resuscitační péče. Otravě lze zabránit podáním protilátek specifických na kolchicin, které obsahují tzv. Fab fragmenty (vazebné místo protilátky, kde se váže specificky antigen) [20, 27, 28]. Jejich mechanismus účinku je podobný mechanismu působení Fab fragmentů protilátek specifických pro dioxin. Protilátky se vážou na cílové léčivo a umožňují jeho redistribuci do extracelulárního prostoru a tím odstranění podstatného množství z periferních tkání [29]. V současné době ale nejsou stále komerčně dostupné [13]. U zvířat smrtelná dávka způsobuje ztrátu šlachového reflexu, křeče a paralýzu končící uhynutím zvířete [15].

Využití kolchicinu

Antimitotické účinky kolchicinu a demekolcinu jsou stále předmětem zkoumání v oblasti vývoje a výzkumu protinádorových léčiv. Neovlivňují pouze růst zhoubného nádoru, ale toxicky působí i na ostatní zdravé buňky v organismu. Proto se neustále pracuje na vyvíjení nových derivátů kolchicinu, které budou jednak účinné proti nádorům, ale zároveň bude potlačena jejich toxicita vůči organismu, který je podroben terapii [30, 31]. Kolchicin je používán při léčbě akutní myeloidní leukémie, kožního karcinomu (mast) a familiární středomořské horečky [1, 32]. Kolchicin a demekolcin jsou také velmi účinné pro zmírnění bolesti při akutních záchvatech dny, způsobují zvýšené vylučování kyseliny močové z organismu. Užívání kolchicinu ve formě masti je bezpečnější oproti klasickému orálnímu podávání z důvodu nižší škodlivosti kolchicinu při nadměrném používání. Další výhodou je kratší expozice léku na kůži, která nevede k zánětům kůže [33]. Farmaceutické preparáty (určené pro léčbu dny) obsahující demekolcin jsou účinnější než preparáty obsahující

prakticky výlučně kolchicin [4]. Kolchicin je dále přidáván ke klasickým lékům při akutním zánětlivém onemocnění perikardu [34].

U rostlinných buněk způsobuje polyploiditu, dochází tak ke zvýšení počtu chromozomů v rostlinách. Tohoto účinku se využívá pro zvýšení výtěžku hektarových výnosů některých plodin (pohanka, pšenice, len). Konkrétně např. pelyněk roční, u kterého se polyploiditou dosáhne vyššího výtěžku alkaloidu artemisininu [35], který se pak používá jako lék proti malárii [36]. Kolchicin může způsobit i přeměnu neplodných rostlinných hybridů na plodné normální rostliny.

Kolchicin je možno využít i v metalurgii, kdy chrání měkkou ocel proti kyselé korozi způsobené různými úpravami oceli pomocí kyselin, např. kyselé moření [37]. Maximálního ochranného účinku bylo dosaženo při spojení s jodidem draselným, kde byl prokázán synergismus v protektivním účinku s těmito dvěma látkami [38].

2.1.2. Stanovení kolchicinu

Použití metod závisí na vlastnostech kolchicinu, které jsou pro některé metody zásadní, např. oxidace a redukce v případě elektroanalytických metod. Značně také záleží na povaze zkoumaného vzorku, na složitosti matrice, zda se jedná o farmaceutické přípravky či tělesné tekutiny (krev, plasma, moč, žluč, žaludeční obsah), kde je nutné provést úpravu vzorku před samotným stanovováním. Každá z metod poskytuje určité výhody i nevýhody. Zásadní roli hrají rychlost a přesnost stanovení, náročnost přístrojového vybavení a požadavky na obsluhu, náklady spojené s analýzou, spotřeba roztoků reagensů, úprava vzorku před analýzou a další. Vývojem analytických metod pro stanovení kolchicinu se zabývá mnoho studií. Jsou známy metody spektrofotometrické [39], volumetrické [40], voltametrické [41, 42], potenciometrické [43], gravimetrické [37, 44, 45], radio a enzymatické imunoanalýzy [46], kapilární elektroforéza [47] a celá řada chromatografických metod [25, 48-52].

V UV/VIS spektroskopii byla pro kolchicin v kyselém i alkalickém prostředí prokázána dvě maxima při 274 nm a 350 nm. V IR spektrech jsou charakteristické pro tropolonové sloučeniny pásy při 3200, 1615, 1553 a 1255 cm^{-1} . Velice jednoduché kvalitativní určení kolchicinu spočívá v chromatografii na papíře Whatmann č. 4, nasyceném formamidem s mobilní fází: benzen-chloroform-formamid (7:3:1), detekce probíhá při dopadajícím UV světlem, jednotlivé alkaloidy vykazují různou barvu. (bez jakékoliv chemické detekce) [4].

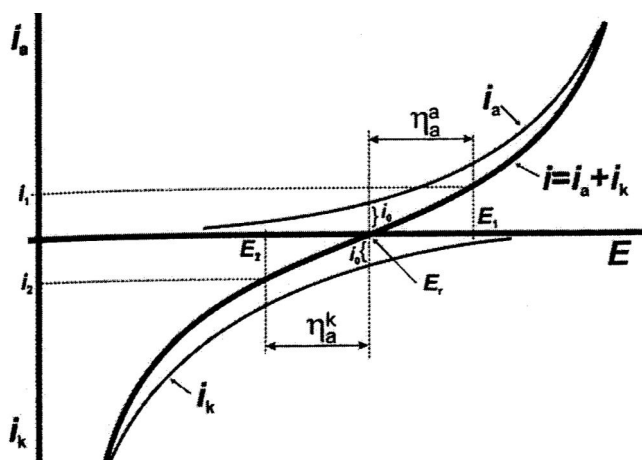
Další možností stanovení jsou elektroanalytické metody, které se vyznačují vysokou citlivostí. Své využití nacházejí především v oblasti analýzy farmaceutických látek, u kterých není vyžadováno zdlouhavé přečišťování vzorku a není nutná ani předběžná separace. Tudíž se snižují i náklady na jednotlivé analýzy. Pro kvantitativní stanovení kolchicinu se nejvíce osvědčila diferenčně pulsní voltametrie. Pro rychlé a velice snadné stanovení kolchicinu v tabletách s limitem detekce 2×10^{-6} mol/l je možné použít jak katodickou diferenčně pulsní voltametrii na GCE [53], tak i anodickou diferenčně pulsní voltametrii na SPE, která je ještě rychlejší, protože není nutné odstraňovat kyslík. (ten ruší stanovení v případě katodické diferenčně pulsní voltametrie, proto je ho potřeba odstranit) V této metodě byl limit detekce $1,026 \times 10^{-7}$ mol/l [54]. I modifikované elektrody hrají významnou roli při stopové analýze kolchicinu v léčivech. CPE upravená pomocí vrstvy vícečetných uhlíkových nanotrubiček (multiwall carbon nanotubes MWCNTs) se osvědčila co by voltametrický selektivní sensor s limitem detekce 8×10^{-9} mol/l [55]. Vyššího limitu detekce $2,6 \times 10^{-7}$ mol/l bylo dosaženo při testování CPE modifikované nanočásticemi oxidu železnatoželezitého (Fe_3O_4). Takto upravená elektroda byla ještě dále testována pro možnost kvantitativního stanovení velmi malého množství jinak elektro-neaktivního BSA (hovězí sérový albumin) díky přímé interakci kolchicinu s BSA [56]. Jinou možností je použití metody square wave anodické stripping voltametrie na GCE modifikované kompozitním filmem složeného z oxidu grafenu a Nafionu, kde byl limit detekce $1,5 \times 10^{-8}$ mol/l. Úpravou povrchu elektrody se dosáhlo silné absorpce kolchicinu na povrch elektrody, vyšší stability elektrody, ale hlavně nedocházelo k nežádoucím interferencím, jak z hlediska organických sloučenin, tak ani anorganických iontů v průběhu analýzy. Takovéto výsledky ukazují možnost použití v reálných vzorcích, kde selhávají z důvodu interferencí jiné metody [57]. Pro stanovení stopového množství kolchicinu v moči metodou adsorptivní stripping voltametrie na HMDE, kde příprava vzorku spočívá pouze v naředění vzorku moči elektrolytem, se podařilo dosáhnout limitu detekce $1,3 \times 10^{-10}$ mol/l [42]. V analytické praxi je však výhodnější spojení vlastností adsorptivní stripping voltametrie s diferenčně pulsní voltametrií na HMDE vnesením procesu nahromadění analytu na povrch elektrody, avšak limit detekce zůstává stejný $1,3 \times 10^{-10}$ mol/l [58]. Modifikací GCE kompozitním filmem tvořeným dihexadecyldihydrogenfosfátem a speciálním typem acetylenových sazí lze dosáhnout většího elektrodového povrchu a tím i zvýšení adsorpce kolchicinu. Na druhou stranu, kolchicin a jeho oxidační produkty zapříčiňují pasivaci elektrodového povrchu, na tento problém bylo nalezeno snadné řešení. Protože pasivace byla slabá, stačilo zařadit mezi jednotlivá měření jednoduchý čistící

krok. Po otestování elektrody metodou DPV bylo dosaženo vyššího limitu detekce 4×10^{-8} mol/l než v předchozích publikacích zaměřených na reálné vzorky [59]. Pro monitorování hladiny kolchicinu v lidském séru byl vyvinut elektro-chemiluminiscenční detekční systém (ECL) s elektricky vyhřívanou elektrodou tvořenou oxidem cíničitým dopovaným indiem (ITO). Kolchicin sám o sobě působením ITO elektrody nevyzáří žádné světlo. Bylo tedy nutné kolchicin derivatizovat bipyridylovým komplexem ruthenia ($\text{Ru}[\text{bpy}]_3^{2+}$). Intenzita elektrochemiluminiscence dosáhla svého maxima v potenciálové oblasti komplexu $\text{Ru}[\text{bpy}]_3^{2+}$ v okamžiku jeho přímé oxidace. Při 42°C byl zjištěn limit detekce 9×10^{-9} mol/l. Tuto metodu je možné aplikovat i na složitější vzorky, kde není možné se vyhnout separaci před samotnou detekcí, lze ji kombinovat s kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou [60].

2.2. Voltametrické metody

Voltametrické metody se těší své rozmanitosti právě díky rozsáhlému bezmála sto let starému výzkumu Jaroslava Heyrovského. Zabýval se elektrolyzou na DME, ze které se v roce 1922 vyvinula polarografie. Tento významný český vědec byl v roce 1959 za svou průkopnickou práci v oblasti elektrochemických metod oceněn Nobelovou cenou. S přibývajícími nároky na citlivost a selektivitu byla však polarografie postupně vytlačena nejprve spektrofotometrickými metodami a později i separačními metodami. Nicméně s rozvojem elektroniky se začali dostávat opět do popředí pulsní polarografické metody, docházelo k vývoji nových elektroanalytických metod (DPV, SWV, ASV) [61]. Příchodem nových elektrodových materiálů, miniaturizací pracovních elektrod a možností tyto systémy snímat a kontrolovat, začaly elektroanalytické metody opět konkurovat spektrometrickým a separačním metodám. Na druhou stranu nejsou schopné svou citlivostí konkurovat např. laserem indukované fluorescenci [62] nebo selektivitou hmotnostní spektrometrii [51], ale své uplatnění nachází v oblasti lékařských a biologických věd [63] či v oblasti monitorování životní prostředí [64-67]. Jejich hlavní výhodou jsou nízké pořizovací, ale i provozní náklady [64], další předností je rychlost, jednoduchost a citlivost stanovení [66].

Základním principem voltametrických metod je měření závislosti proudu, který prochází pracovní elektrodou ponořenou v roztoku na vloženém potenciálu. Tuto závislost vyjadřuje polarizační křivka na Obr. 4 a velikost proudu, který prochází elektrodou v přítomnosti analytu při vhodném potenciálu je analytickým signálem. Měření závislosti proudu na potenciálu lze provést jak v ustáleném stavu, tak i za nestacionárních podmínek.



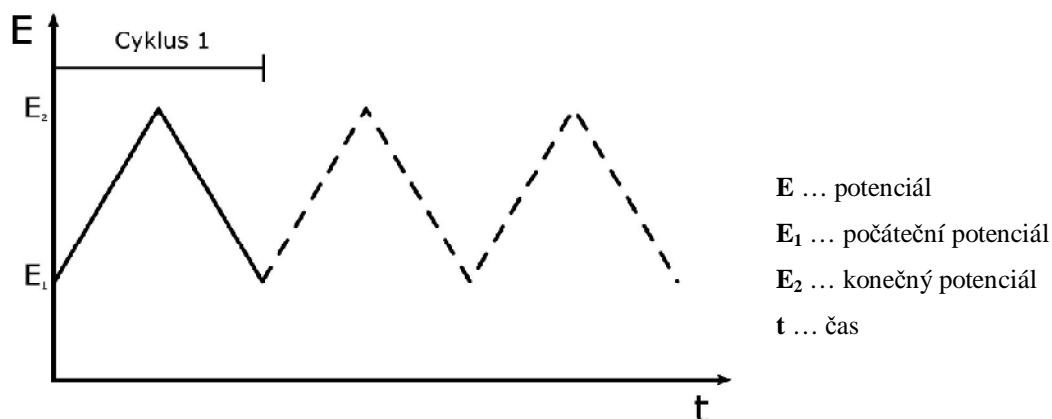
- i_a a i_k – dílčí proudové hustoty
- i – celková (měřená) proudová hustota
- E_r – rovnovážný potenciál ($E_r = E_c^\circ$ pro $c(0x) = c(\text{Red})$)
- i_0 – výměnná proudová hustota
- η_a^a – anodické aktivační přepětí pro proudovou hustotu i_1
- η_a^k – katodické aktivační přepětí pro proudovou hustotu i_2

Obr. 4: Polarizační křivka pro $\alpha = 5$ (koeficient přenosu náboje). Převzato a upraveno z [68]

Podle průběhu vloženého potenciálu se voltametrické metody dělí na stejnosměrné, střídavé a pulsní. Voltametrická cela se skládá z pracovní elektrody ponořené do analyzovaného roztoku a referenční elektrody spojené s analyzovaným roztokem solným můstkem, eventuálně lze ještě přidat elektrodu pomocnou. Potenciál na pracovní elektrodě je udržován potenciostatem. Pracovní elektrody nemusí být pouze stacionární, ale mohou vykonávat rotační nebo vibrační pohyb. Pro voltametrické měření lze zvolit systém dvouelektrodového uspořádání, který má však jednu slabinu v tom, že není znám přesný potenciál pracovní elektrody, protože se část vloženého napětí při průchodu proudu ztratí na odporu analyzovaného roztoku. Proto se v praxi využívá hlavně tříelektrodového zapojení s pomocnou elektrodou, kde se skutečný potenciál měří mezi pracovní a referenční elektrodou za bezproudého stavu. Proud prochází pouze mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Potenciál pracovní elektrody je udržován na požadované hodnotě změnou napětí na pomocné elektrodě prostřednictvím potenciostatu. Tato práce se dále věnuje vybraným nestacionárním (koncentrační gradient se s časem mění) voltametrickým metodám.

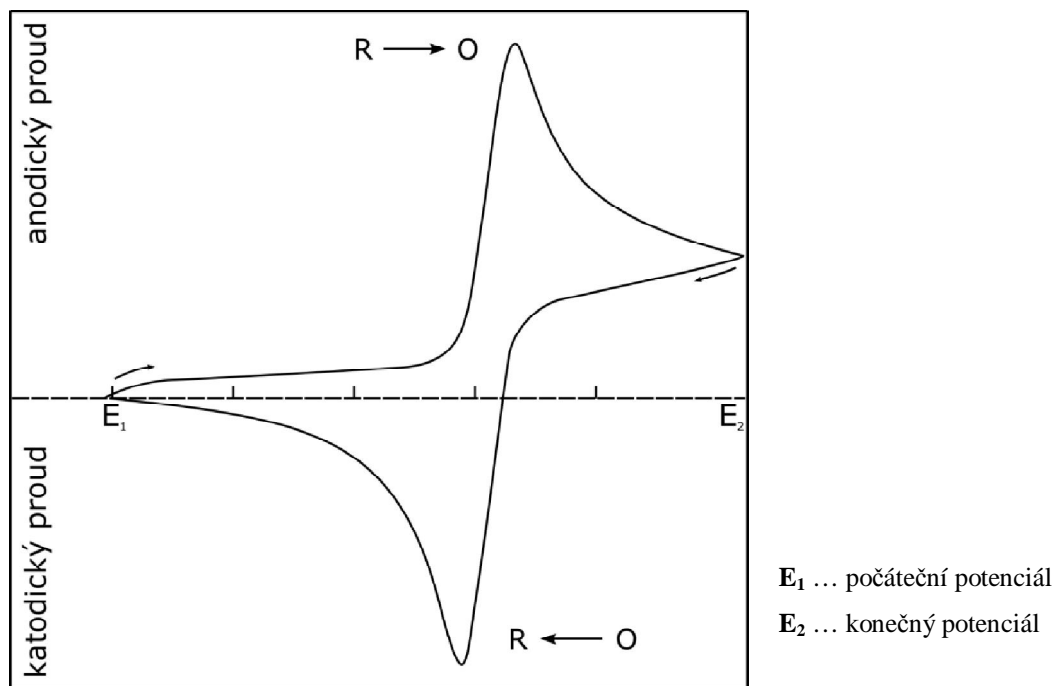
2.2.1. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (dále CV) patří mezi stejnosměrné techniky, kde je proud závislý na čase a polarizační křivka má tvar píku. Výška píku (velikost proudu) závisí nejen na koncentraci analytu, ale také na rychlosti polarizace pracovní elektrody (rychlosti časové změny potenciálu). Využívá se pomalého transportního procesu difuze a zároveň vysoké rychlosti polarizace k detekci produktů elektrodové reakce, které nestihly oddifundovat od elektrody za použití opačného směru potenciálové změny. Potenciál trojúhelníkového průběhu (Obr. 5) se vkládá na stacionární pracovní elektrodu v nemíchaném roztoku, s rychlostí změny dE/dt .



Obr. 5: Schéma potenciálového programu při cyklické voltametii, cyklus je vždy ukončen, pokud vložený potenciál klesne zpět k počáteční hodnotě E_1 , převzato a upraveno z [69]

Samotné měření jednoho cyklu je zahájeno při počátečním potenciálu (E_1), kdy je proveden sken po hodnotu končeného potenciálu (E_2), v tomto bodě se směr skenu otočí a vrací zpět na hodnotu E_1 . Lze provést i více cyklů najednou, pokud se pracuje pouze s jedním takovýmto cyklem, pak se jedná o linear sweep voltametrii (LSV) [70]. Cyklická voltametrie je velmi vhodným nástrojem pro studium elektrochemického chování látek zatím elektrochemicky neprostudovaných a zároveň je většinou prvním experimentem prováděným v rámci elektroanalytické praxe. Nehodí se však pro přímé stanovení analytu. Z cyklického voltamogramu na Obr. 6 lze posoudit o jaký reakční mechanismus se jedná, zda o reverzibilní či ireverzibilní děj. Za měřítko reverzibility se považuje hodnota vzdálenosti katodického a anodického píku v maximu. Dále je možné zjistit redoxní potenciály jednotlivých látek, stanovit jejich koncentraci či sledovat případnou adsorpci látek na elektrodu. Ta se projeví vznikem píků při stejném potenciálu. Z jednoho měření se tak získá mnoho užitečných informací pro další elektrochemické experimenty.



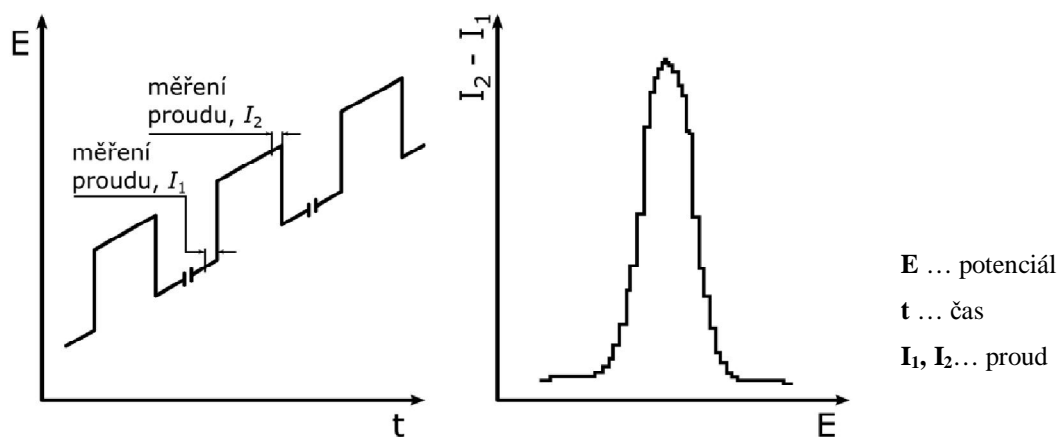
Obr. 6: Cyklický voltamogram (podle IUPAC) reverzibilního systému látky, která je ve výchozím redukovaném stavu, oxiduje se ($R \rightarrow O$) a při zpětném skenu se oxidovaný produkt zpět redukuje ($O \rightarrow R$), převzato a upraveno z [69]

V případě použití mikroelektrody jako pracovní elektrody má cyklický voltamogram sigmoidní tvar. Je to způsobeno převládajícím vlivem radiální difuze.

2.2.2. Diferenčně pulsní voltametrie

Diferenčně pulsní voltametrie (dále DPV) je nyní asi nepoužívanější metodou z voltametrických pulsních metod. Oproti voltametrickým metodám se střídavou složkou potenciálu umožňuje dosáhnout snížení nabíjecího proudu (kapacitního proudu) na minimální zanedbatelnou hodnotu a zároveň dochází ke zvýšení poměru signál/šum (dále S/N), což se projevuje v nižších mezích detekce ($1,3 \times 10^{-10}$ mol/l) [58]. Proto je tato metoda vhodná ke stanovování stopového množství analytu. Napěťový puls o amplitudě desítek až stovek milivoltů a době trvání několik milisekund (řádově desítky milisekund) se vkládá na potenciál, lineárně se měnící s časem. Proud se měří na začátku vkládaného napěťového pulsu a před jeho koncem (Obr. 7). Doba vzorkování proudu se pohybuje mezi 10 až 100 milisekundami. Výsledná křivka v podobě píku (Obr. 7) je dána závislostí rozdílů proudů na potenciálu. Koncentrace analytu je úměrná výšce píku a poloha píku je kvalitativním údajem. DPV umožňuje snadnější rozlišení látek s podobným redoxním potenciálem díky výstupu ve formě píku, proto je také užitečná pro analýzu směsí. Další užitečnou informací je souvislost mezi šířkou píku v polovině jeho výšky a počtem vyměněných elektronů.

Látky s ireverzibilním redoxním dějem poskytují nižší a širší pík, což má za následek horší citlivost a selektivitu stanovení. Právě parametry jako je velikost amplitudy pulsu, doba jeho trvání a rychlost skenování ovlivňují citlivost, selektivitu a rychlost celé analýzy. Například s vyšší amplitudou pulsu roste výška, ale i šířka píku. Běžné nastavení parametrů odpovídá amplitudě napěťového pulsu 25-50 mV, době trvání pulsu 50 ms a rychlosti skenování 5mV/s [69].



Obr. 7: Potenciálový program a proudová odezva při DPV, převzato a upraveno z [68]

2.3. Amperometrie

Jde o nejběžnější techniku pro měření v proudících kapalinách. Při konstantním potenciálu vloženém na pracovní elektrodu, který odpovídá limitnímu proudu analytu, se měří proud, který je zaznamenán při průchodu analytu měřicí celou. Sleduje se proud v závislosti na čase. Výsledkem amperometrického měření je graf se zaznamenanými proudovými odezvami v podobě ostrých píků. Z výšky píku se stanovuje koncentrace daného analytu. Míra konverze analytu se pohybuje kolem 10 %, oproti 100% konverzi v případě coulometrie [69]. K měření lze použít stejnou instrumentaci jako u CV. Pokud je třeba zvýšit citlivost měření, využije se pulsních metod jako je např. DPV nebo voltametrie s lineárním polarizačním napětím (LSV). Měření při příliš vysokém potenciálu vede ke zvýšení šumu pozadí závislého na průtoku. Ke zvýšení šumu pozadí způsobeného přítomností kyslíku dochází také při redukci. Největším problémem bývá použití PEEKových kapilár, protože stěna PEEKové kapiláry je propustná pro kyslík. Dalším příčinou, která nepříznivě ovlivňuje velikost šumu pozadí, jsou pulsy čerpadla. Již zmíněný potenciál neovlivňuje pouze citlivost, šum pozadí, ale také selektivitu amperometrických měření. Obecně platí, že s nižším potenciálem je možné detekovat analyty s větší selektivitou. Vhodný potenciál pro samotná amperometrická měření určitého analytu se získá z cyklického voltamogramu. Hlavní podmínkou amperometrie a celkově elektroanalytických metod je, aby stanovovaný analyt byl schopen redoxní reakce, pokud tomu tak není nebo se vyskytují analyty s nedokonalým redoxním systémem, je nutné přistoupit k derivatizaci elektroinaktivních analytů formou zavedení elektroaktivní funkční skupiny použitím různých chemických a biochemických derivatizačních schémat. Derivatizaci je možné provést před kolonou (tzv. pre-column), nebo po průchodu analytu kolonou (tzv. post-column). Post-column derivatizace může posloužit k úpravě podmínek pro co nejúčinnější elektrochemickou detekci [69].

2.4. Elektroanalytická měření v průtokových systémech

Průtokové systémy jsou potřeba všude tam, kde je nutné sledovat koncentraci určité složky v kontinuálních procesech, ať už se jedná o průmysl, kde je třeba udržovat optimální pracovní podmínky, nebo sledování polutantů v životním prostředí. Nepostradatelné jsou také v medicíně pro sledování biogenních iontů (např. K^+ , Na^+ a Ca^+) v krevním řečišti pacienta. Klinické či průmyslové kontrolní laboratoře se každý den potýkají s úkolem stanovit veliké množství podobných vzorků. Aby se zamezilo chybám nejčastěji způsobených lidskou rukou, snížily se náklady a zkrátil se celkový čas analýz lze využít laboratorních robotů, které jsou však nákladné a nejsou schopné okamžitě reagovat na změnu typu analýzy. Vhodnějším řešením je umístit vzorek do proudu nosné kapaliny, kde je vzorek unášen k jednotlivým procesům včetně závěrečné detekce. Detekční metody v průtokových systémech mohou být různé. Volba vhodné detekční metody závisí jednak na charakteru zkoumaných analytů, na spolehlivosti výsledků, na požadavcích ohledně konstrukce detektoru (jeho geometrie a velikost). Nejčastěji používanou metodou v průtokovém měření je amperometrie, dále to mohou být coulometrická měření a potenciometrická měření. Potenciometrie je známá pomalou odezvou pracovních elektrod, proto se prakticky nehodí pro spojení s chromatografickými metodami či kapilární elektroforézou.

2.4.1. Kontinuální průtoková analýza (CFA)

Starší metoda, která byla vyvinuta v roce 1957. Jedná se o průtokovou techniku detekce bez separace. Jednotlivé vzorky jsou nasávány jako široké zóny oddělené vzduchovými bublinkami. Do systému lze přidávat různá reakční činidla. Detekce probíhá v ustáleném stavu, tzn. po ukončení reakce v detekční cele.

2.4.2. Průtoková injekční analýza (FIA)

FIA je novější průtoková technika s detekcí bez separace, vyvinutá v 70. letech. Hlavním rozdílem oproti předchozí technice CFA je nastříkání jednotlivých vzorků (řádově μl) jako úzkých zón do proudu nosné kapaliny, jednotlivé zóny od sebe nejsou nijak oddělené. Použití reakčních činidel zde hraje velikou roli, hlavně pro usnadnění detekce. Detekce často probíhá v neustáleném stavu, před ukončením reakce. FIA dosahuje horší citlivosti než CFA kvůli ředění vzorku nosným médiem. Avšak FIA je schopná zpracovat dvakrát více vzorků než CFA. FIA je snáze použitelná pro elektrochemické detekční techniky.

2.4.3. Sekvenční injekční analýza (SIA)

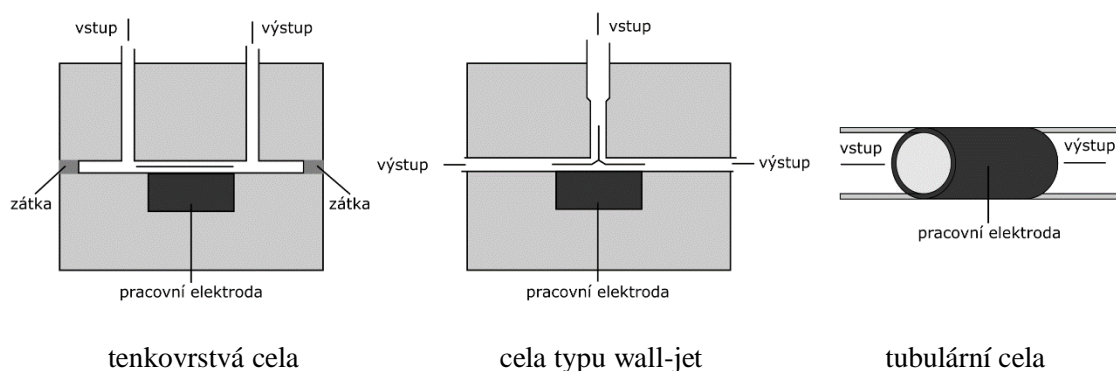
SIA představuje nejnovější způsob analýzy vzorků v proudících kapalinách z roku 1991. Oproti předchozím dvěma technikám všechny reakční mechanismy SIA jsou programově kontrolovány počítačem. SIA je tak plně automatickou technikou, která používá vícecestný ventil a dvousměrnou pumpu. Velikou výhodou je menší spotřeba vzorků a činidel, tím je SIA šetrnější k životnímu prostředí. Je ideální technikou pro lokální monitoring.

2.4.4. Detekční cely

Velký důraz je kladen na konstrukci detekční cely. Volený objem cely je závislý jednak na způsobu měření a také na rychlosti a reprodukovatelnosti transportu analytu k pracovní elektrodě. V průmyslu, kde je spíše stanovován větší objem vzorku, se používají větší cely, o objemu několika mililitrů. Na druhé straně klinické analyzátoři vyžadují menší cely z důvodu podstatně menšího objemu průtoku vzorku (např. krve). Metody, které pracují s oddělenými zónami vzorku (např. HPLC, CE, CFA, FIA), je možné charakterizovat počtem teoretických pater. Podle počtu teoretických pater je určována účinnost daného systému, počet teoretických pater také charakterizuje stupeň rozmytí zón analytů. Zatímco u metod CFA a FIA se pohybuje počet teoretických pater okolo stovky, objem patra pak zhruba odpovídá desítkám až stovkám mikrolitrů. U metod HPLC a CE je počet teoretických pater mnohem vyšší. Při klasické HPLC je to několik tisíc a při kapilární HPLC či při CE jsou to až statisíce, pak je objem patra roven několika mikrolitrům či zlomkům nanolitrů. Aby nedocházelo k rozmytí zón analytů ze strany chybně zvoleného objemu detekční cely, je nutné dodržovat obecné pravidlo, kdy objem detekční cely by neměl přesahovat objem jednoho teoretického patra. I z hlediska transportu analytu k povrchu pracovní elektrody je velice výhodné volit co nejmenší objem detekční cely. Dráha analytu se tak zkrátí a bývá srovnatelná s tloušťkou difuzní vrstvy, výsledkem je reprodukovatelnější rychlost transportu. Potřeba nízkého mrtvého objemu s sebou nese zvýšené nároky na geometrii detekční cely a také na umístění elektrod. Vzdálenost mezi výstupem z kolony a pracovní elektrodou ovlivňuje rozmytí zón analytů (Obr. 9). Další nároky jsou kladeny na potlačení vlivu ohmické polarizace, snadnou údržbu.

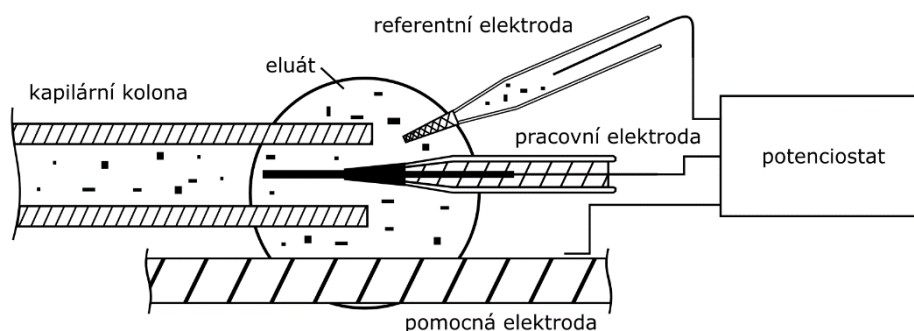
Pro amperometrická detektory se nejvíce používají tři základní konstrukční typy detekčních cel: tenkovrstvá (thin-layer), wall-jet („proti zdi“) a tubulární (tubular) viz Obr. 8. U tenkovrstvé cely kapalina omývá elektrodu, která tvoří tenkou vrstvu. Cely typu wall-jet je specifická tím, že eluát z kolony tryská přímo na pracovní elektrodu, kterou je

možné kdykoli, kdy je potřeba jednoduše vyměnit. V případě tubulární cely je pracovní elektroda tvořena trubicí. Referentní a pomocná elektroda by měly být umístěny po proudu analytu blízko pracovní elektrody, tak aby reakční produkty na pomocné elektrodě neinterferovali s pracovní elektrodou. Referentní elektroda by měla být umístěna co nejbližší pracovní elektrodě, nejlépe naproti ní pokud je to možné, nebo v případě tubulárního typu je umístěna po proudu za ní.



Obr. 8: Schéma konstrukčních typů detekčních cel v amperometrii, tubulární cely: průřez pracovní elektrodou, převzato a upraveno z [68]

Na Obr. 9 je uvedeno schéma elektrochemické detekční cely pro CE, kde se snadno dosáhne miniaturního objemu detekčního prostoru zasunutím uhlíkové vláknové mikroelektrody do konce spojovací kapiláry. Stejného systému detekční cely využívá i technika HPLC [71].



Obr. 9: Schéma tříelektrového uspořádání amperometrické detekční cely s pracovní elektrodou tvořenou CFME, vhodný systém pro HPLC a CE, převzato a upraveno z [69]

3 Experimentální část

3.1. Přístroje a pomůcky

Elektrochemické experimenty byly provedeny na přístroji Nanoampere electrochemical Workstation (L-Chem, Česká republika) s elektromagnetickou míchačkou (MIX 1 eco, 2mag, Německo). Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení, pracovní elektrodu tvořila CFME, SPE, GCE či PGE. Referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda Ag/AgCl (CHI-111, CH Instruments, U.S.A.) a platinový drátek o průměru cca 1mm představoval elektrodu pomocnou. Modifikace elektrod byly provedeny prostřednictvím laboratorního zdroje Matrix MPS-3003L-3 a home-made stejnosměrného zdroje vysokého napětí sestaveného z 10 kHz oscilátoru, transformátoru a pěti stupňového Cockroft-Waltonova generátoru (kaskádový generátor). Pro testování modifikované elektrody jako pracovní elektrody v rámci elektrochemického detektoru bylo využito systému sestávajícího z pumpy (Shimadzu LC-10AD), nástřikového ventilu se smyčkou 20 μ l (Rheodyne, Cotati, USA), kolony EC 250/2 NUCLEODUR C8 Gravity 5 μ m, 250 x 2,1 mm I. D. (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) a potenciostatu COULOCHEM III (ESA Inc, MA Chelmsford, USA). Dávkování vzorku bylo provedeno mikrostříkačkou Hamilton (Reno, USA). Použita byla home-made elektrochemická cela s pracovní elektrodou CFME modifikovanou zirkoniem a referentní elektrodou Ag/AgCl (CHI-111, CH Instruments, U.S.A.). Mobilní fáze byly upravovány prostřednictvím pH metru InoLab 720 (WTW, Weilheim, Německo) tvořeného kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41-3 (WTW, Weilheim, Německo). Nanesené kovové/uhlíkové vrstvy byly zkoumány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Tescan Vega3.

3.2. Standardy a chemikálie

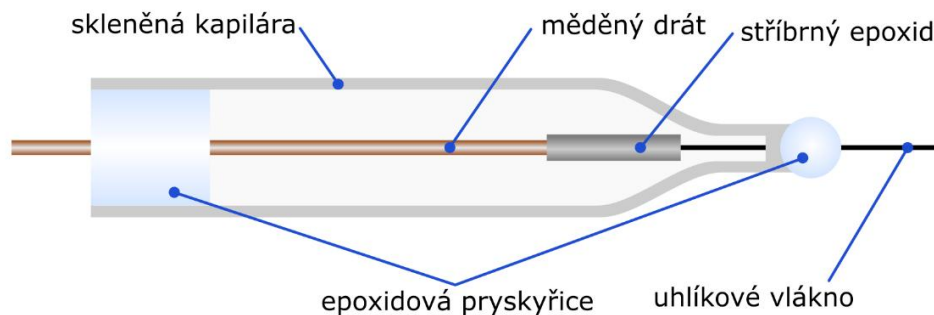
§	ultračistá voda (Millipore Smart Direct Q 3 UV)	
§	uhlíková vlákna (Pro Systems, Havel Composites, Přeaslavice, ČR)	
§	grafit (tuha 0,7 mm, KOH-I-NOOR)	
§	kolchicin $\geq 95\%$ HPLC (Sigma-Aldrich)	M = 399,44 g/mol
§	stříbrná dvousložková epoxidová pryskyřice (epotek H2OE, Epoxy Technology, Inc., USA)	
§	dvousložková epoxidová pryskyřice (Havel Composites, Přeaslavice, ČR)	
§	dichlormethan p. a. (Sigma-Aldrich)	M = 84,93 g/mol
§	isopropanol p. a. (Sigma-Aldrich)	M = 60,10 g/mol
§	kyselina sírová p. a. 95-97% (Sigma Aldrich)	M = 98,08 g/mol
§	kyselina chloristá p. a. 70,0-72,0% (Sigma Aldrich)	M = 84,93 g/mol
§	hexakvanoželezitan draselný (Sigma Aldrich)	M = 329,24 g/mol
§	chloristan sodný 85-102,0% (Sigma Aldrich)	M = 122,44 g/mol
§	acetonitril $\geq 99,9\%$ HPLC Plus (Sigma Aldrich)	M = 41,05 g/mol
§	fosforečnan sodný monobasický 99% (Sigma Aldrich)	M = 119,98 g/mol
§	fosforečnan sodný dibasický $\geq 99,0\%$ (Sigma Aldrich)	M = 141,96 g/mol

3.3. Použité kovy

§	Au (Alfa Aesar, 99,999%)	M = 196,97 g/mol
§	Fe (Alfa Aesar, 99,999%)	M = 55,845 g/mol
§	Mo (Alfa Aesar, 99,95%)	M = 95,94 g/mol
§	Pd (Alfa Aesar, 99,999%)	M = 106,42 g/mol
§	Pt (Alfa Aesar, 99,999%)	M = 195,084 g/mol
§	W (Plansee, 99,999%)	M = 183,84 g/mol
§	Zr (Alfa Aesar, 99,999%)	M = 91,224 g/mol

3.4. Konstrukce uhlíkové vláknové mikroelektrody (CFME)

Uhlíková vlákna byla nejprve čištěna dvouminutovou sonifikací v dichlormethanu v ultrazvukové lázni (ultrasonifikátor Sonorex, Bandelin). Prostřednictvím stříbrné epoxidové pryskyřice bylo sonifikované vlákno připevněno na předem očištěný měděný drátek. Dokonalého vytvrzení spoje uhlíkového vlákna a měděného drátku tvořeného stříbrnou epoxidovou pryskyřicí bylo dosaženo po 30 min zahřívání v sušárně vytemperované na 120°C. Takto připevněné uhlíkové vlákno bylo poté vsunuto do skleněné kapiláry, která byla následně utěsněna na obou stranách epoxidovou pryskyřicí (Obr. 10). Po 24 hodinách při pokojové teplotě došlo k úplnému vytvrzení pryskyřice. Pokud by se epoxidová pryskyřice dostala na povrch vlákna, způsobila by znehodnocení elektrodového povrchu a tím i celé mikroelektrody.



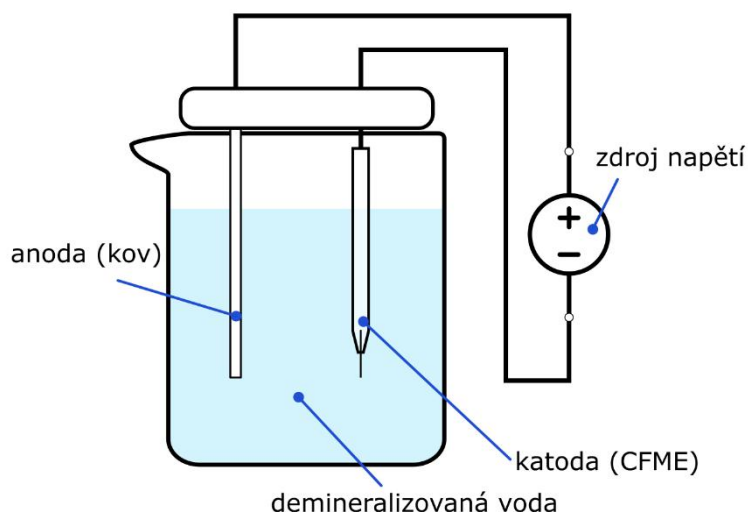
Obr. 10: Schéma CFME

3.5. Modifikace pracovních elektrod

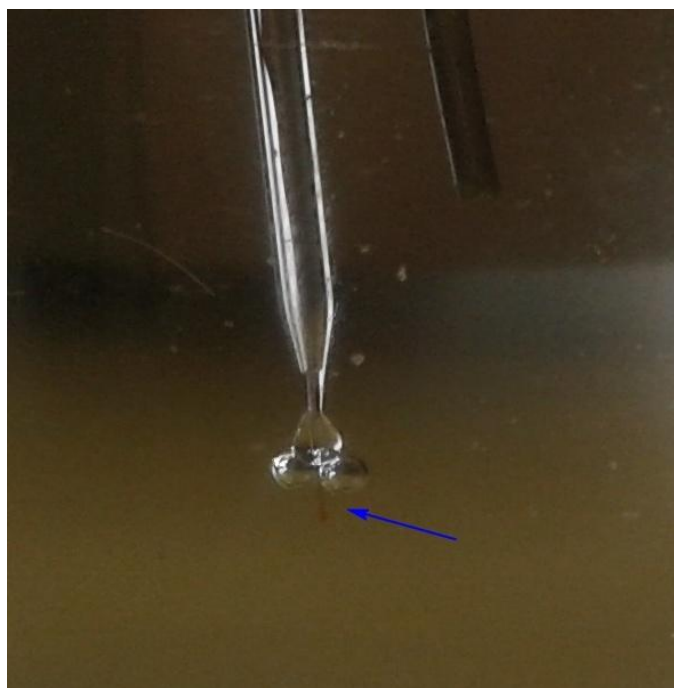
CFME byla modifikována elektroforetickou depozicí (EPD) a depozicí jiskrovým výbojem. Povrch SPE byl modifikován pouze jiskrovým výbojem.

3.5.1. Elektroforetická depozice

Před samotným provedením depozice bylo nutné upravit délku vlákna a očistit jeho povrch sonifikací v dichlormethanu. Depozice probíhala v dvouelektrodevém uspořádání (Obr. 11). Katoda (CFME) a anoda (kov/uhlík) byly ponořeny do ultračisté vody. V průběhu depozice docházelo k vytváření kovové či uhlíkové vrstvy na povrchu CFME. Tvorbu kovové vrstvy bylo možné u některých kovů pozorovat pouhým okem (Obr. 12) jako postupné zvětšování průměru vlákna. Depozice probíhala při napětí 20 V po dobu 10 až 30 min.



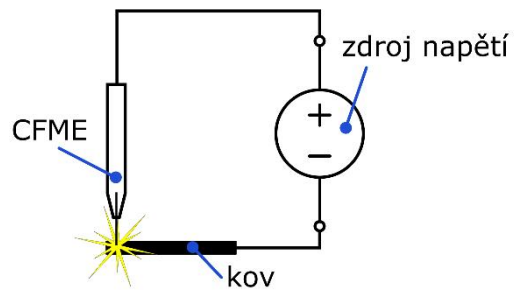
Obr. 11: Schéma elektroforetické depozice



Obr. 12: Elektroforetická depozice železa (rozšířené uhlíkové vlákno s kovovou vrstvou tvořenou Fe), podmínky depozice: 20 V, 30 min

3.5.2. Modifikace jiskrovým výbojem (spark deposition)

Poměrně jednoduchá, rychlá a účinná metoda, která využívá elektrického (jiskrového) výboje mezi dvěma elektrodami k přenosu materiálu jedné elektrody na druhou a opačně (Obr. 13). Elektroda určená k modifikaci (CFME, SPE) byla zapojena ke kladnému pólu (+) a kov/uhlík k zápornému pólu (-). Při opačném zapojení elektrod by se kovy dostávaly na povrch CFME/SPE ve velmi malém nebo žádném množství, protože k uvolnění materiálu dochází hlavně u elektrody připojené k zápornému pólu [72]. U CFME bylo před samotnou depozicí zkráceno vlákno na cca 3 mm. Při přiblížení uhlíkového vlákna k protielektrodě na vzdálenost méně než 1 mm proběhl jiskrový výboj, při němž došlo k depozici kovu/uhlíku na elektrodě. Povrch uhlíkového vlákna byl navíc oxidačně aktivován vysokou teplotou výboje. Elektroda byla modifikována třemi jiskrovými výboji. Napětí na zdroji bylo nastaveno na 200 až 700 V. V případě SPE bylo třeba provést 30 až 50 jiskrových výbojů rovnoměrně rozmístěných po povrchu SPE.



Obr. 13: Schéma modifikace jiskrovým výbojem CFME

3.6. Čištění a aktivace povrchu pracovních elektrod

Elektrodový povrch nemodifikované CFME byl očištěn sonifikací v isopropanolu po dobu několika sekund.

SPE elektrodu stačilo opláchnout ultračistou vodou.

Úprava elektrodového povrchu GCE zahrnovala několik kroků. Za prvé byla elektroda opláchnuta ultračistou vodou, po té byl povrch vyleštěn na leštící tkanině (Microcloth, Buehler, USA) pomocí malého množství suspenze aluminy (Al_2O_3 , <50 nm, Sigma-Aldrich, Vídeň, Rakousko) v ultračisté vodě. Na závěr byla elektroda očištěna sonifikací v ultračisté vodě pod dobu několika sekund a po té ještě bylo provedeno pět cyklů CV v roztoku H_2SO_4 o koncentraci 0,1 mol/l pro dokonalé vyčištění a aktivaci elektrodového povrchu. Pro CV byly nastaveny tyto parametry:

§ počáteční potenciál: -200 mV

§ konečný potenciál: 1400 mV

§ rychlost skenování: 100 mV/s

Elektrodový povrch PGE byl očištěn stejným způsobem jako u CFME a byl dále aktivován pěti cykly CV v 0,1 mol/l roztoku H_2SO_4 s těmito parametry:

§ počáteční potenciál: -200 mV

§ konečný potenciál: 1400 mV

§ rychlost skenování: 100 mV/s

3.7. Příprava standardních roztoků a mobilní fáze

Zásobní roztok kolchicinu o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním stanoveného množství kolchicinu v ultračisté vodě a uchováván byl ve tmě při 4 °C. Stejným způsobem byl připraven i skladován zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného (dále ferrikyanid) o finální koncentraci 0,1 mol/l. Zásobního roztok elektrolytu chloridu draselného (dále KCl) byl nachystán obdobně jako zásobní roztok ferrikyanidu, bylo naváženo a rozpuštěno takové množství KCl aby se dosáhlo výsledné koncentrace 0,1 mol/l, roztok byl skladován při 4 °C. Příprava dvou zásobních roztoků elektrolytů kyseliny sírové (dále H_2SO_4) a chloristé (dále $HClO_4$) byla provedena naředěním kyselin ultračistou vodou na požadovanou koncentraci 0,1 mol/l. Roztoky elektrolytů byly skladovány při laboratorní teplotě.

Britton-Robinsonův pufr (dále B-R pufr) byl připraven smícháním roztoku obsahujícím 0,04 mol/l H_3PO_4 , 0,04 mol/l CH_3COOH a 0,04 mol/l H_3BO_3 s roztokem 0,2 mol/l NaOH podle požadované hodnoty pH.

Fosfátový pufr byl přichystán rozpuštěním požadovaného množství fosforečnanu monosodného (dále NaH_2PO_4) v ultračisté vodě, následovala úprava pH hodnoty pomocí koncentrované kyseliny fosforečné a filtrace pufru. Míchání mobilní fáze bylo provedeno v poměru 35 % (v/v) acetonitril (100% ACN) a 65 % (v/v) pufr (fosfátový pufr 100 mmol/l). Před každým měřením byla připravena vždy nová mobilní fáze.

3.8. Měření

3.8.1. Charakterizace modifikovaných a nemodifikovaných uhlíkových elektrod

Nemodifikované i modifikované elektrody CFME, SPE, GCE a PGE byly nejprve otestovány jako pracovní elektrody pomocí cyklické voltametrie. K testování byl použit základní elektrolyt 0,1 mol/l KCl obsahující ferrikyanid o koncentraci 1 mmol/l. Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení, jako pracovní elektroda se vystřídaly všechny výše jmenované elektrody, referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda Ag/AgCl a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek. Parametry CV byly nastaveny následovně:

- § počáteční potenciál: 700 mV
- § konečný potenciál: -200 mV
- § rychlost skenování: 50 mV/s
- § filtr: 10

Každá elektroda byla před samotným měřením opláchnuta ultračistou vodou a ponořena nejprve do 0,1 mol/l roztoku základního elektrolytu KCl. Byl změřen tzv. blank. Následovalo měření v 0,1 mol/l roztoku KCl obsahujícím ferrikyanid o koncentraci 1 mmol/l. Srovnáním naměřených cyklických voltamogramů všech použitých elektrod bylo vyhodnoceno, zda je elektroda vhodná k dalšímu měření, nebo zda je potřeba provést znovu vyleštění v případě GCE, jiný způsob modifikace či zvolení nové pracovní elektrody v případě CFME, SPE a PGE.

3.8.2. pH závislost kolchicinu

Experiment byl uskutečněn na nemodifikované GCE pomocí CV v základním elektrolytu 0,1 mol/l HClO₄ pro pH hodnotu 1 a v rozsahu pH 2 až 12 v B-R pufru. GCE elektroda byla před každým měřením přeleštěna. Bylo provedeno celkem šest měření se vzrůstající hodnotou pH elektrolytu (2; 4,3; 6,3; 8,6; 10,9; 12,2). Koncentrace kolchicinu ve všech roztocích byla 0,1 mmol/l. pH závislost byla zjišťována z důvodu změny potenciálu oxidace kolchicinu při změně pH měřeného roztoku. Měření CV bylo provedeno s následujícími parametry:

- § počáteční potenciál: 800 mV
- § konečný potenciál: 1400 mV
- § rychlost skenování: 50 mV/s
- § filtr: 10

3.8.3. Cyklická voltametrie kolchicinu

Na všech pracovních elektrodách modifikovaných i nemodifikovaných (CFME, SPE, GCE a PGE) byly naměřeny cyklické voltamogramy kolchicinu v tříelektrodovém zapojení s referenční argentchloridovou elektrodou Ag/AgCl a platinovým drátkem coby pomocnou elektrodou. Experimenty byly měřeny ve dvou základních elektrolytech: 0,1 mol/l H₂SO₄ a 0,1 mol/l HClO₄. Koncentrace kolchicinu ve všech měřených roztocích byla 0,1 mmol/l. Před každým měřením kolchicinu byl roztok míchán rychlostí 120 otáček/min po dobu 30 s. Měření CV bylo uskutečněno s těmito parametry:

- § počáteční potenciál: 800 mV
- § konečný potenciál: 1400 mV
- § rychlost skenování: 50 mV/s
- § filtr: 10

3.8.4. Diferenčně pulsní voltametrie kolchicinu

Všechny experimenty byly měřeny v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou tvořenou jednak nemodifikovanou SPE, ale také modifikovanou SPE jiskrovým výbojem (grafit, W, Zr). Referenční elektrodu tvořila argentchloridová elektroda Ag/AgCl a platinový drátek představoval elektrodu pomocnou. Jako základní elektrolyt byla použita

0,01 mol/l HClO₄ a kolchicin byl přítomen o koncentraci 6 μmol/l. Před měření byla vždy provedena aktivace elektrody prostřednictvím pěti cyklů CV s těmito parametry:

- § počáteční potenciál: 800 mV
- § konečný potenciál: 1400 mV
- § rychlost skenování: 100 mV/s

Dále samotnému měření předcházela prekoncentrace analytu (kolchicinu) na povrch elektrody v míchaném roztoku při 120 otáčkách/min po dobu 240 s v zapojeném obvodu (800 mV). Parametry pro měření DPV byly následující:

- § počáteční potenciál: 800 mV
- § konečný potenciál: 1400 mV
- § rychlost skenování: 20 mV/s
- § filtr: 10
- § šířka pulsu: 50 ms
- § doba trvání pulsu: 200 ms
- § výška pulsu: 50 mV

3.8.5. Amperometrie kolchicinu

Amperometrické měření bylo využito k výběru vhodné pracovní elektrody pro kapalinovou chromatografii (dále LC). Elektrolyt o koncentraci 0,01 mol/l HClO₄ a objemu 20 ml byl po celou dobu experimentu míchán (150 otáček/min). Kolchicin byl do elektrolytu postupně zaváděn (po 30 s) jako 30 μl, 150 μl a 300 μl přídavky o výsledné koncentraci 1 μmol/l, 5 μmol/l a 10 μmol/l. Opět byl využit systém tří elektrod, jako v předchozích experimentech s tím rozdílem, že jako pracovní elektroda byla použita nemodifikovaná i modifikovaná CFME. Parametry pro amperometrická měření byly nastaveny takto:

- § rychlost míchání roztoku: 150 otáček/min
- § potenciál: 1300 mV
- § rychlost skenování: 4 skeny/s
- § filtr: 1

3.8.6. Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Měření probíhalo v detekční cele tvořené pracovní elektrodou CFME modifikovanou Zr (modifikace jiskrovým výbojem) vloženou tak, aby uhlíkové vlákno o délce asi 3 mm bylo vsunuto do kapiláry, která přiváděla eluát z kolony. Referentní elektroda byla tvořena argentchloridovou elektrodou Ag/AgCl a platinový drátek představoval pomocnou

elektrodu. Dle potřeby, lze celu ještě více miniaturizovat, pak by namísto referentní a pomocné elektrody byla použita pouze jedna elektroda a to pseudoreferentní v podobě šroubu z nerezavějící oceli, jak je možné vidět na Obr. 14. Jako mobilní fáze (dále MF) byla použita ACN/fosfátový pufr 100 mmol/l 35/65 % (v/v). Vodný roztok kolchicinu byl nastříkovan o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Nastavení parametrů pro kapalinovou chromatografii proběhlo takto:

- § pH hodnota MF: 4,6
- § průtok MF: 300 $\mu\text{l/min}$
- § teplota systému: 45 $^{\circ}\text{C}$
- § pracovní potenciál 1500 mV
- § nástřik 50 μl (objem smyčky: 20 μl)
- § citlivost 10 nA (10 nA odpovídá 1000 mV)



Obr. 14: Fotografie elektrochemické detekční cely při dvouelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou CFME, 5x zvětšeno, strana fotografie odpovídá ve skutečnosti asi 1,5 cm, převzato z [73]

4 Diskuze a výsledky

4.1. Charakterizace uhlíkových elektrod

4.1.1. Cyklická voltametrie ferrikyanidu

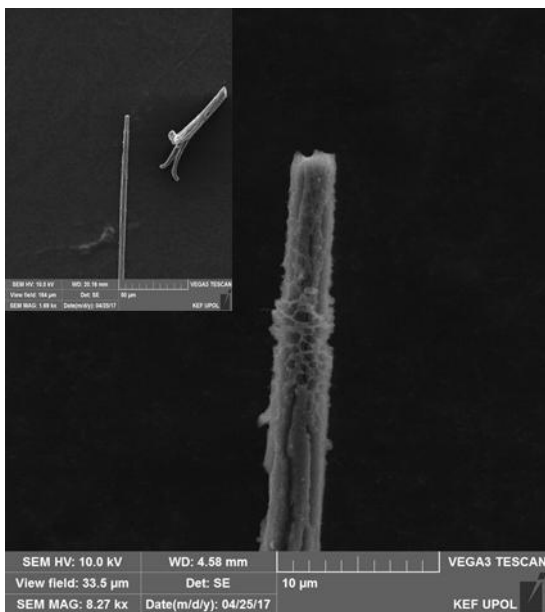
Nemodifikované i modifikované uhlíkové elektrody byly testovány prostřednictvím cyklické voltametrie v roztoku ferrikyanidu o koncentraci 1 mmol/l v 0,1 mol/l KCl. Ferrikyanid je známý elektrochemický standard. Využívá se zde reakčního mechanismu, redukce železitých iontů na železnaté a oxidace železnatých iontů na železité (1).



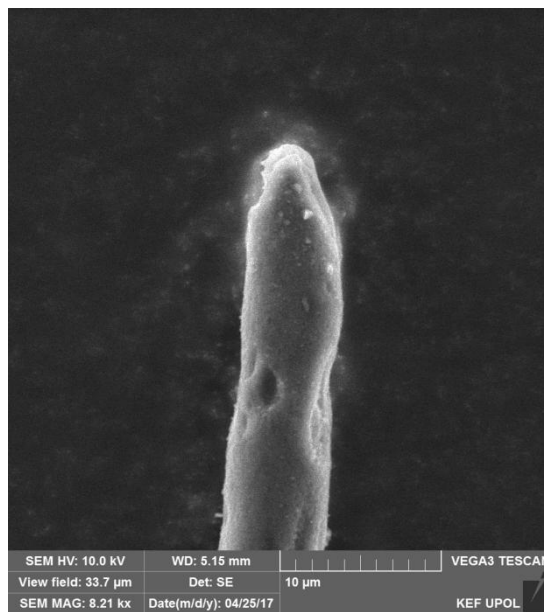
Při testování funkčnosti pracovních elektrod byla sledována proudová odezva, tvar křivek a reverzibilita systému. Tímto jednoduchým principem byla ověřena funkčnost každé pracovní elektrody.

Modifikace jiskrovým výbojem

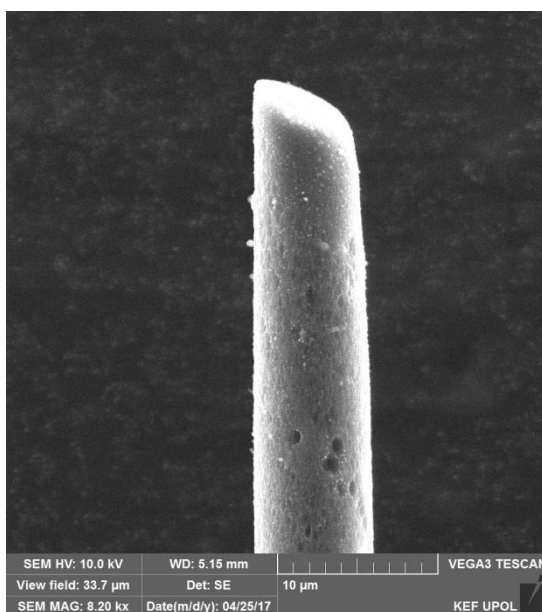
Modifikace probíhala mezi dvěma elektrodami. CFME/SPE byla připojena ke kladnému pólu (+) a druhá elektroda (W, Pt, Zr, Pd, Fe, Au, Mo a grafit) k zápornému pólu (-). Velikost použitého napětí závisela na typu modifikované uhlíkové elektrody. Při modifikaci CFME napětí odpovídalo 210 V a v případě SPE bylo napětí nastaveno na 680 V. Jak již bylo uvedeno, u CFME postačily 3 jiskrové výboje s protielektrodou (W, Pt, Zr, Pd, Fe, Au, Mo a grafit), ale u SPE bylo nutné provést 30 jiskrových výbojů, které byly rovnoměrně rozmístěné na povrchu SPE. Na Obr. 15 je možné pozorovat, že i při stejném zvětšení mikroskopu je uhlíkové vlákno o něco užší než na ostatních snímcích (Obr. 16 a 17). Je možné, že došlo ke „svléknutí“ části modifikované grafitové vrstvy. Nadeponovaný grafit způsobil narušení povrchu uhlíkového vlákna, a zároveň zaoblení hran. Na Obr. 16 u nadeponovaného wolframu si lze všimnout zkoseného konce, zaoblených hran a celkového narušení povrchu uhlíkového vlákna. Naproti tomu zirkonium bylo nedeponováno v podobě jemné krupičky, kterou je možné pozorovat na Obr. 17. Pomocí energiově disperzní spektroskopie (dále EDS) se však nepodařilo potvrdit přítomnost deponovaného kovu na povrchu vlákna CFME, protože množství kovu může být velice malé.



Obr. 15: SEM snímek CFME modifikované C (jiskrovým výbojem) při 210 V

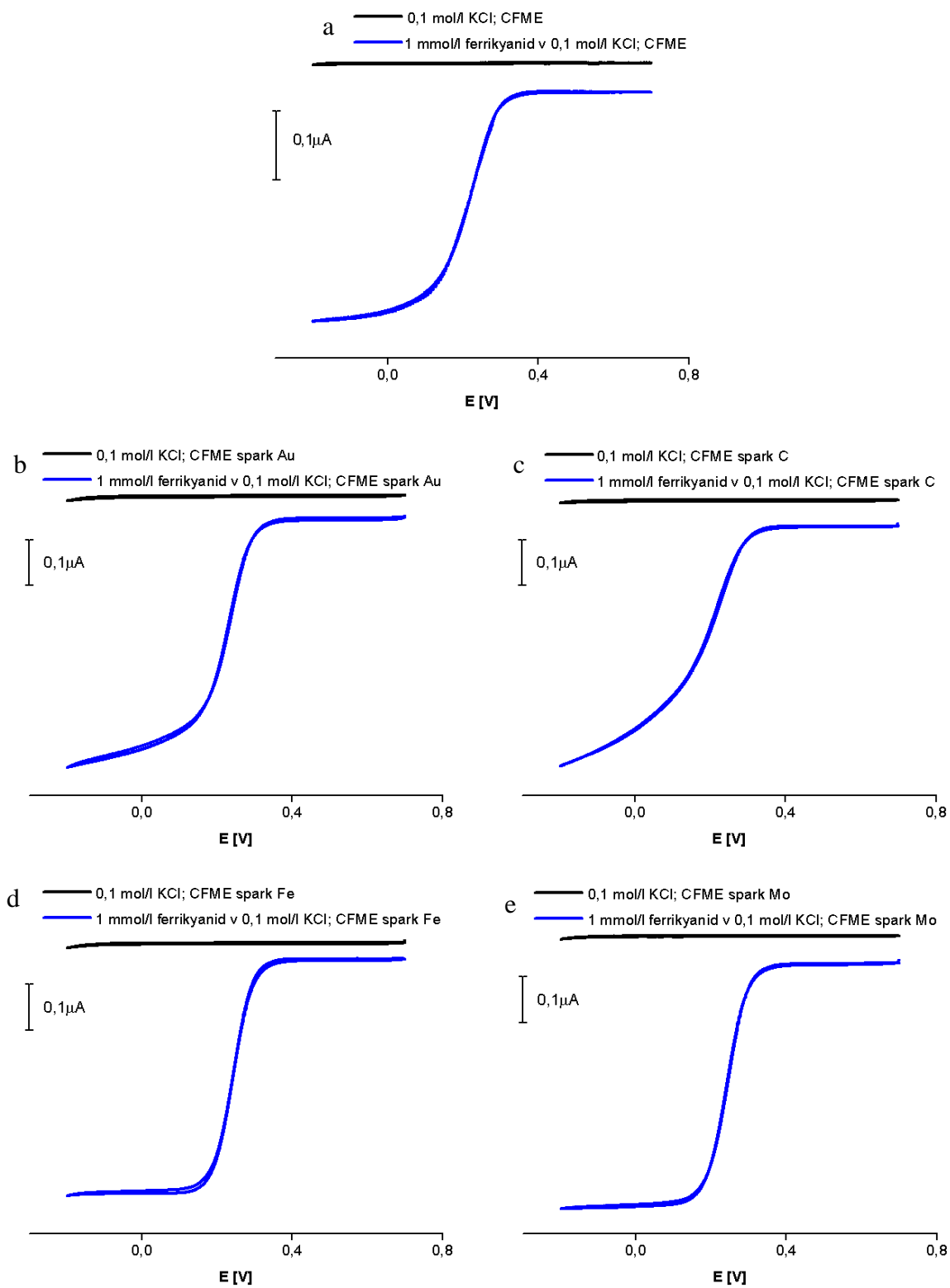


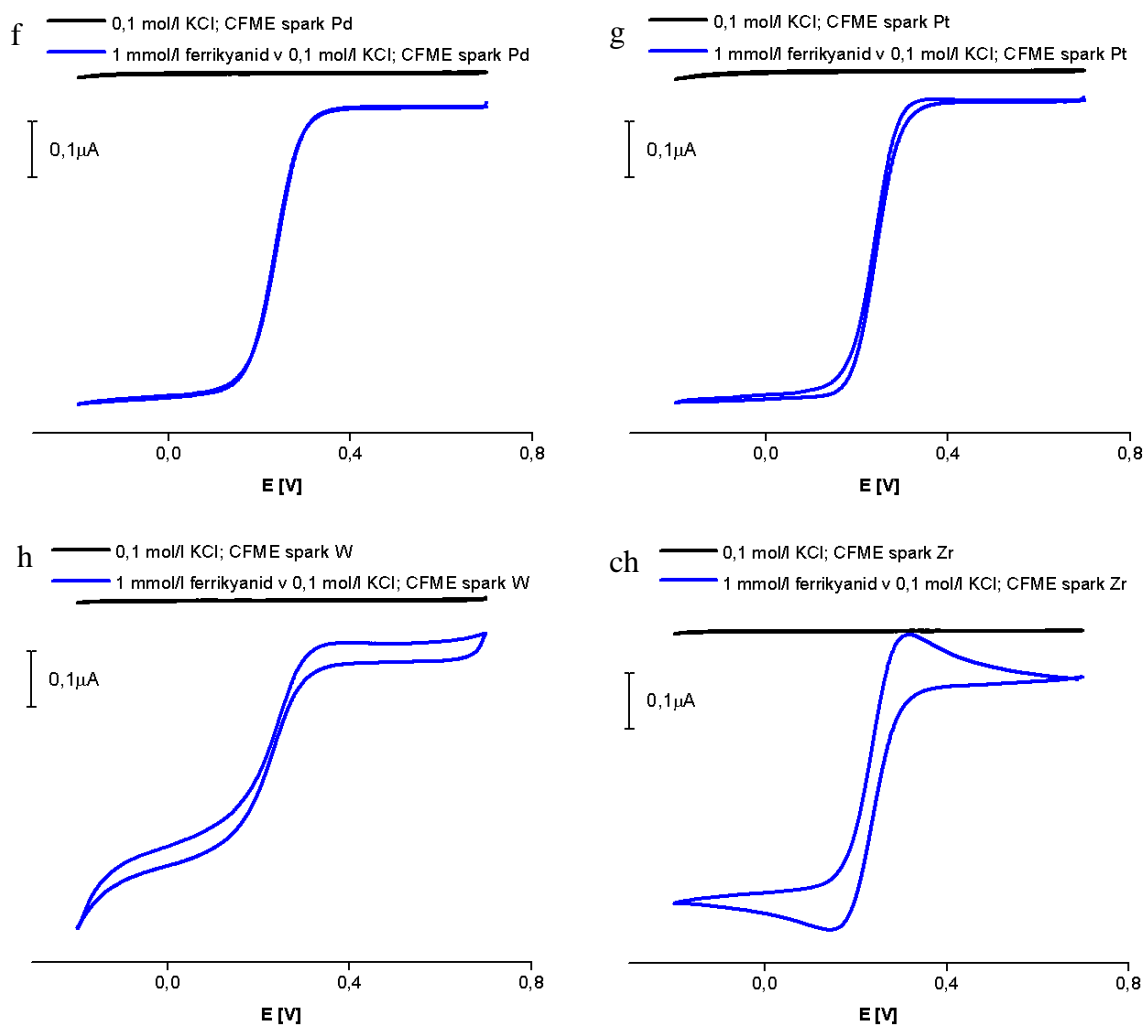
Obr. 16: SEM snímek CFME modifikované W (jiskrovým výbojem) při 210 V



Obr. 17: SEM snímek CFME modifikované Zr (jiskrovým výbojem) při 210 V

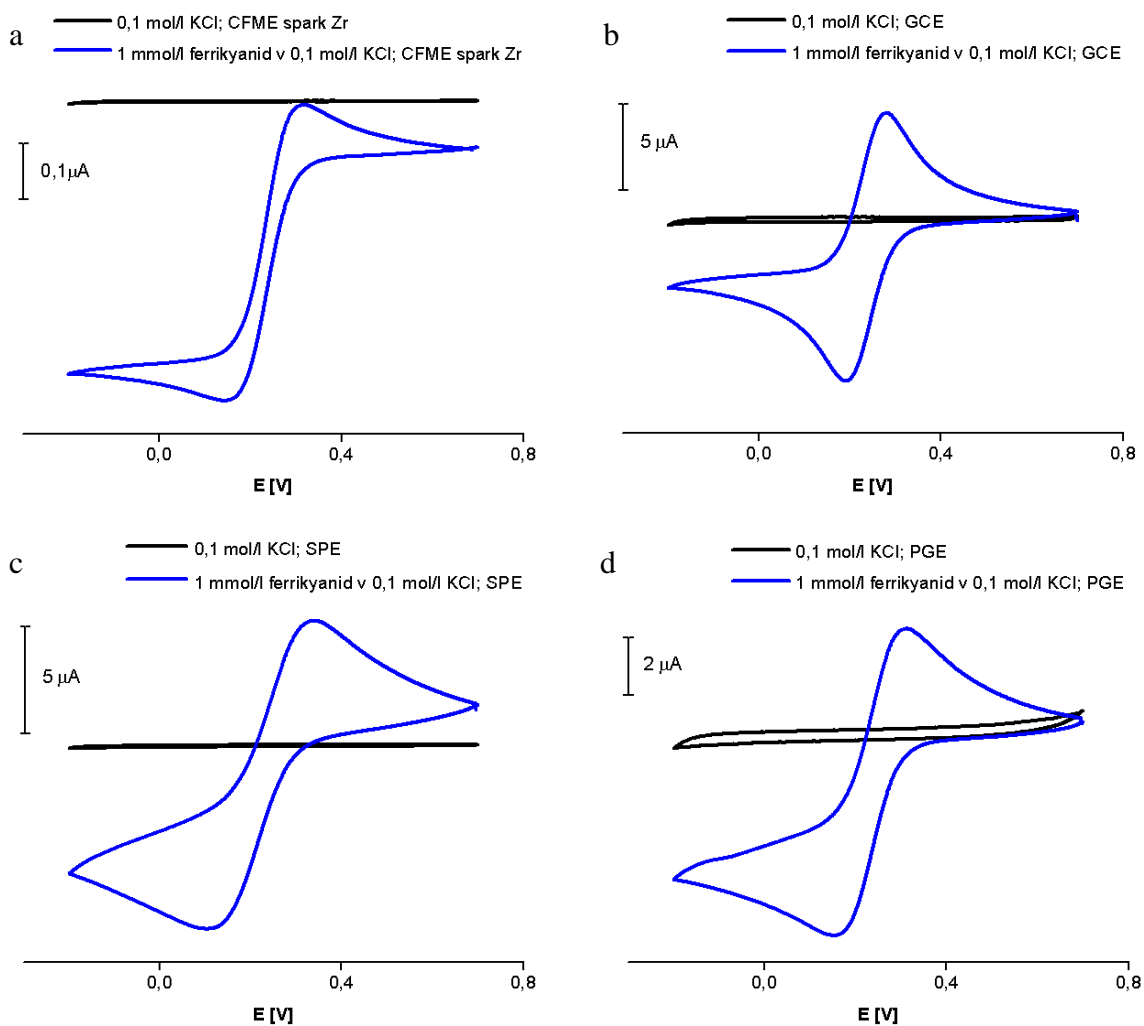
Na cyklických voltamogramech na Obr. 18 a), b), c), d), e), f) lze opět pozorovat sigmoidní tvar křivek typický pro radiální transport elektronů. Na Obr. 18 ch) lze vidět odlišný tvar křivky, protože výška vlny závisí na povrchu CFME, je možné se domnívat, že se může CFME modifikovaná Zr (jiskrovým výbojem) odlišovat od ostatních modifikovaných CFME větším elektrodovým povrchem, ale zároveň může ztratit charakter mikroelektrody.





Obr. 18: Cyklické voltamogramy 1 mmol/l ferrikyanidu v 0,1 mol/l KCl, porovnání nemodifikované CFME a CFMEs modifikovaných jiskrovým výbojem (spark), **a)** nemodifikovaná CFME, **b)** spark Au, **c)** spark C, **d)** spark Fe, **e)** spark Mo, **f)** spark Pd, **g)** spark Pt, **h)** spark W, **ch)** spark Zr

Tvar křivky CFME modifikované Zr (jiskrovým výbojem) se podobá křivkám cyklických voltamogramů elektrod s větším povrchem jako je GCE, SPE a PGE (Obr. 19).



Obr. 19: Cyklické voltamogramy 1 mmol/l ferrikyanidu v 0,1 mol/l KCl, porovnání modifikované CFME spark Zr a nemodifikovaných uhlíkových elektrod **a)** CFME spark Zr, **b)** GCE, **c)** SPE, **d)** PGE)

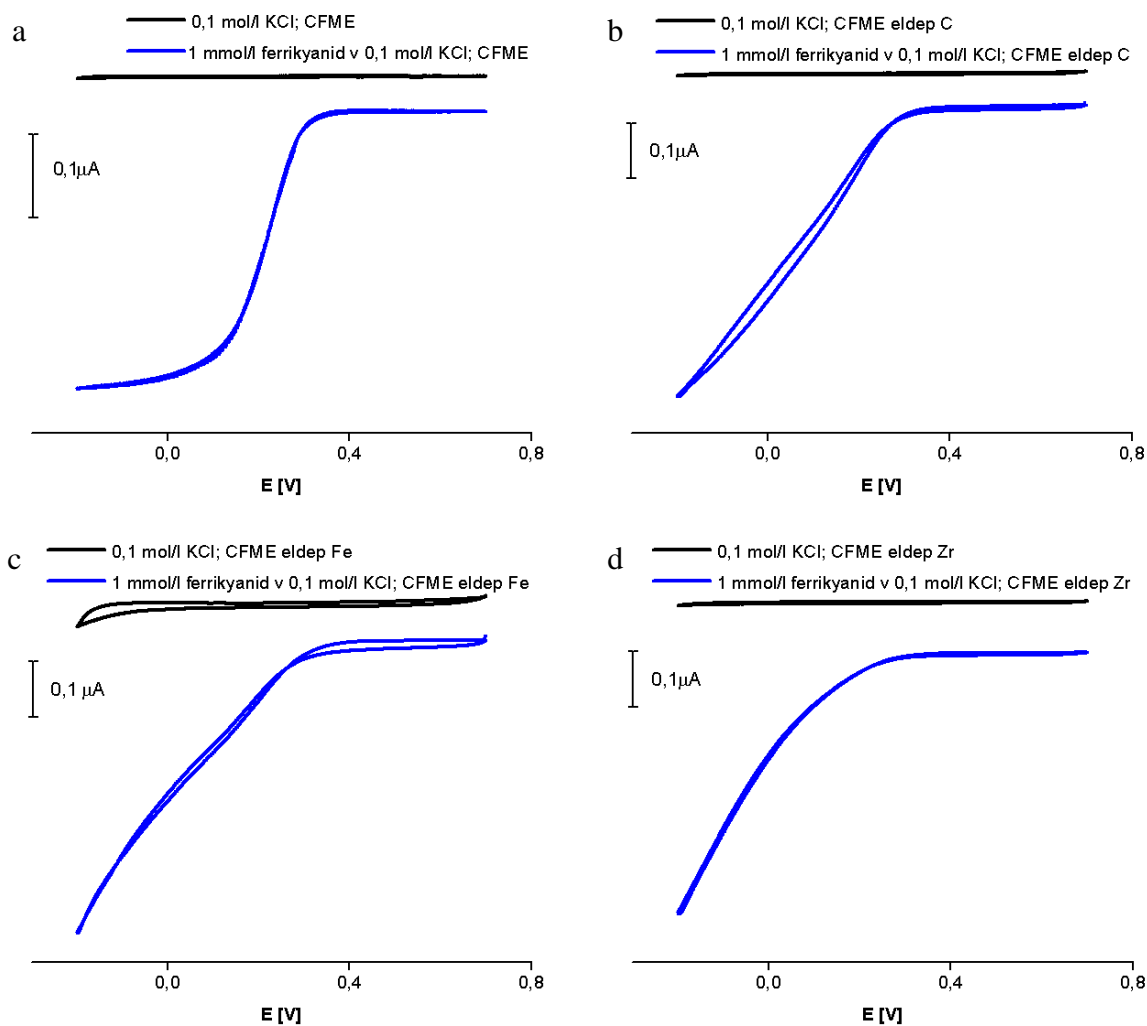
Elektroforetická depozice

Dva kovy (Fe a Zr) a grafit (dále C) byly vybrány pro tento způsob modifikace CFME. Vzhledem k předchozím experimentálním zkušenostem [74] byly zvoleny následující parametry:

§ napětí: 20 V

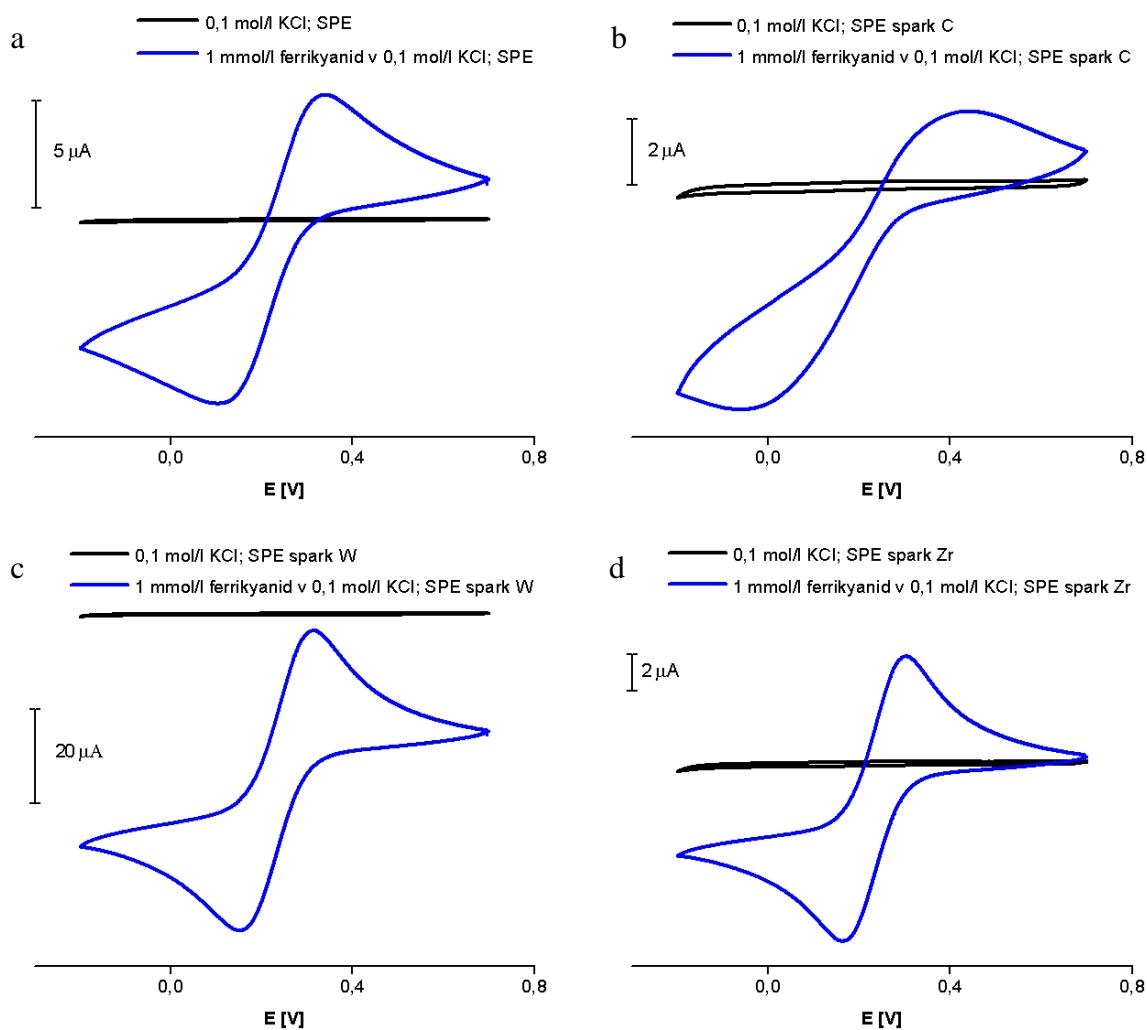
§ čas depozice: 15/30 min

Depoziční čas 30 min byl nastaven při modifikaci C. U Fe a Zr byl depoziční čas 15 min, protože po 30 minutách depozice bylo sice uhlíkové vlákno CFME znatelně obohaceno o vrstvu Fe/Zr, ale tato vrstva byla natolik silná, že docházelo k jejímu odlupování a modifikovaná elektroda tak byla znehodnocena, což se potvrdilo následným měřením CV. Depozice probíhala v celé s ultračistou vodou, do které byly ponořeny CFME představující katodu a anoda, která byla tvořena Fe, Zr nebo C. Po provedení depozice byly modifikované CFMEs také prověřeny změřením cyklických voltamogramů ferrikyanidu o koncentraci 1 mmol/l v 0,1 mol/l KCl. Na Obr. 20 je možné pozorovat omezení anodického a katodického píku na cyklických voltamogramech naměřených v roztoku 1 mmol/l ferrikyanidu v 0,1 mol/l KCl na CFMEs modifikovaných elektroforetickou depozicí při srovnání s předchozími cyklickými voltagramy na Obr. 18. Tato skutečnost mohla být způsobena dvěma možnostmi. Za prvé, modifikací došlo ke zvětšení povrchu elektrody, za druhé kov/uhlík se nadeponovaly jiným způsobem (vznikla jiná struktura kovu/uhlíku na povrchu vlákna), než v případě modifikace jiskrovým výbojem.



Obr. 20: Cyklické voltamogramy 1 mmol/l ferrikyanidu v 0,1 mol/l KCl, porovnání nemodifikované CFME a CFMEs modifikovaných elektroforetickou depozicí (eldep), **a)** nemodifikovaná CFME, **b)** eldep C, **c)** eldep Fe, **d)** eldep Zr

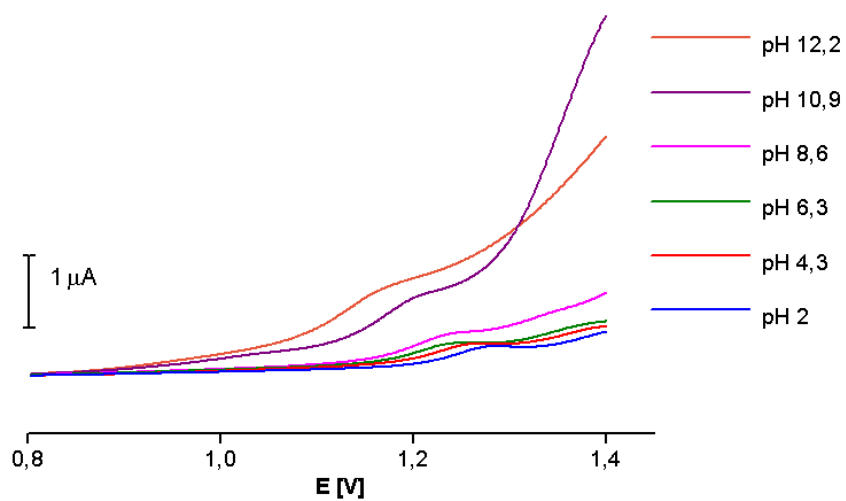
SPEs modifikované jiskrovým výbojem byly také otestovány měřením cyklických voltamogramů v roztoku ferrikyanidu o koncentraci 1 mmol/l v 0,1 mol/l KCl. (Obr. 21 a), b), c)). Po modifikaci SPE Zr, ale hlavně modifikací W došlo ke zvýšení proudové odezvy a celkově ke zlepšení reverzibility v porovnání s cyklickým voltamogramem ferrikyanidu nemodifikované SPE (Obr. 21 d))



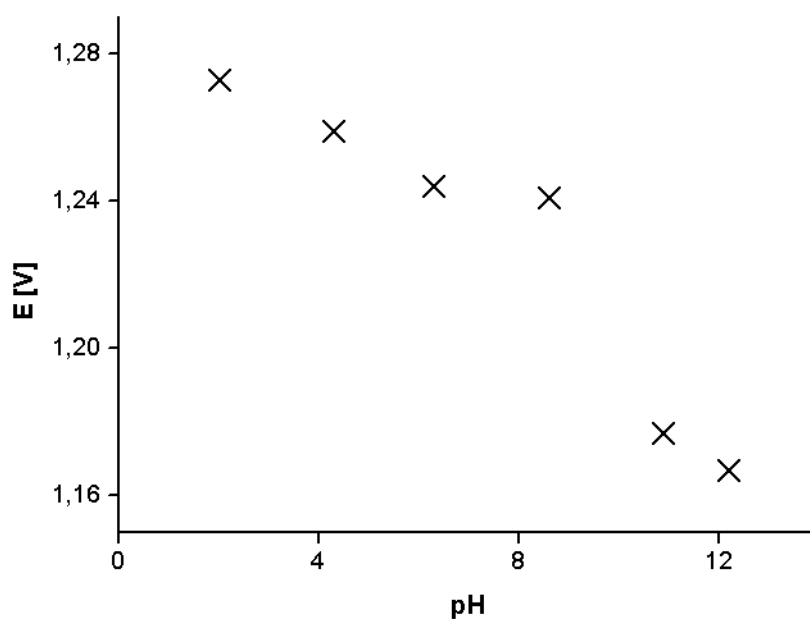
Obr. 21: Cyklické voltamogramy 1 mmol/l ferrikyanidu v 0,1 mol/l KCl, porovnání nemodifikované SPE a SPEs modifikovaných jiskrovým výbojem (spark), **a)** nemodifikovaná SPE, **b)** spark C, **c)** spark W, **d)** spark Zr

4.1.2. Cyklická voltametrie kolchicinu

Nejprve byl prozkoumán vliv pH základního elektrolytu na velikost potenciálu, při kterém docházelo k oxidaci kolchicinu. Prostřednictvím GCE bylo naměřeno několik cyklických voltamogramů kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l při různém pH základního elektrolytu. (Obr. 22) K posunu potenciálu k nižším hodnotám dochází při zvyšování pH základního elektrolytu (Obr. 23).



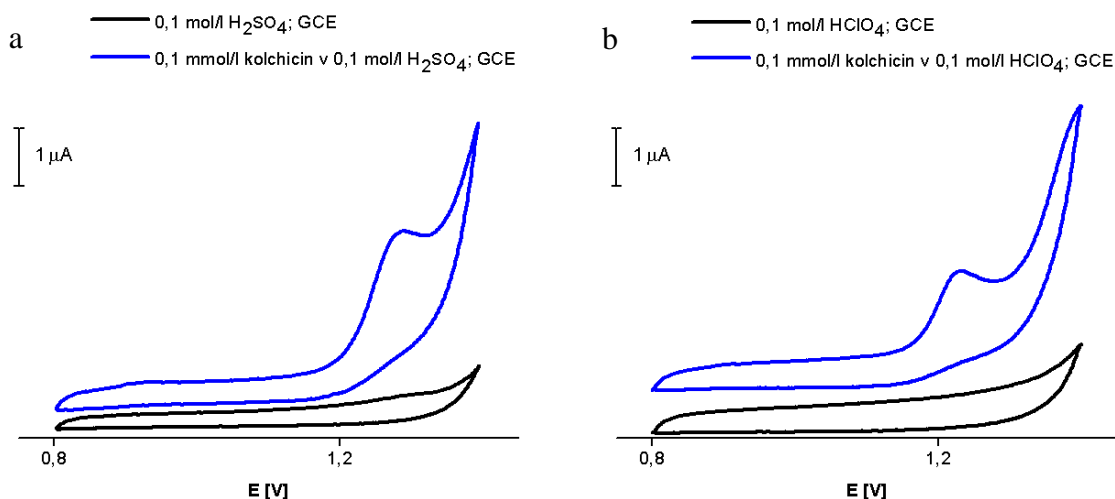
Obr. 22: Cyklické voltamogramy v 0,1 mmol/l roztoku kolchicinu naměřené na GCE při různém pH základního elektrolytu, pH 2 až pH 12,2 (B-R pufr)



Obr. 23: Graf závislosti potenciálu (E) na pH základního elektrolytu

Dalším úkolem bylo najít vhodný elektrolyt pro měření cyklických voltamogramů v roztoku kolchicinu. Nejprve byl testován elektrolyt H_2SO_4 o koncentraci 0,1 mol/l dle článku [57]. Měření bylo provedeno pomocí GCE elektrody a roztoku kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l. Stejným způsobem byl podle článku [60] testován i druhý

elektrolyt HClO_4 o stejné koncentraci 0,1 mol/l. Z Obr. 24 a), b) vyplývá, že kolchicin má vyšší odezvu v elektrolytu HClO_4 . Odezva kolchicinu v elektrolytu HClO_4 byla 0,57 μA a v elektrolytu H_2SO_4 byla 0,4 μA . Také je na Obr. 24 a), b) možné pozorovat posun potenciálu, při kterém se oxiduje kolchicin, v případě elektrolytu HClO_4 je to 1,23 V a v případě elektrolytu H_2SO_4 to je 1,27 V.

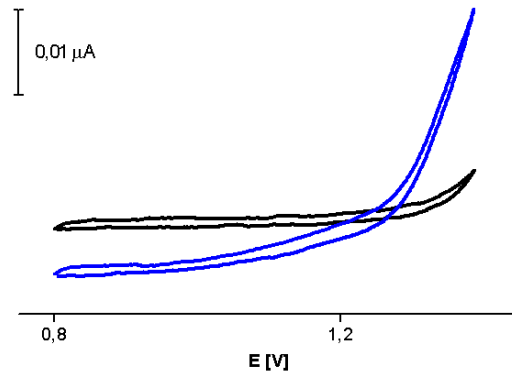


Obr. 24: Cyklické voltamogramy 0,1 mmol/l kolchicinu **a)** v 0,1 mol/l H_2SO_4 .

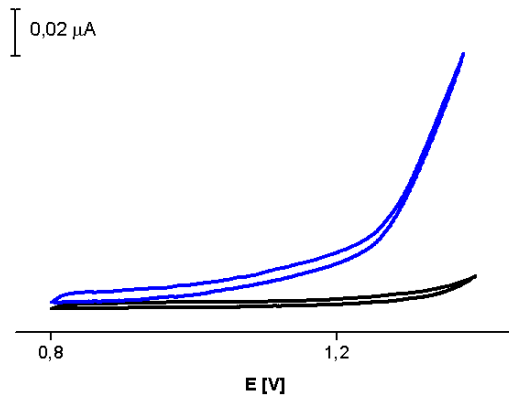
b) v 0,1 mol/l HClO_4 , nemodifikovaná GCE

Odezva kolchicinu byla následně testována na CFMEs modifikovaných jiskrovým výbojem prostřednictvím měření cyklických voltamogramů v roztoku kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l v 0,1 mol/l HClO_4 . Nejlépe se osvědčily CFMEs modifikované C, W a Zr, na kterých se kolchicin oxidoval při 1,25 V (Obr. 25 c), h), ch)). U ostatních cyklických voltamogramů bylo pozorováno, že oxidační píky buď zcela chybí, nebo jsou slabě naznačeny, např. na Obr. 25 d) CFME modifikované Fe.

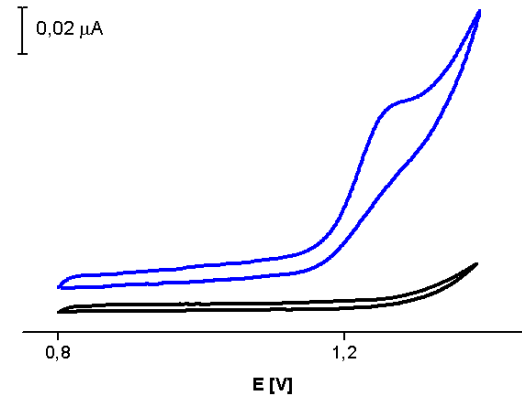
a — 0,1 mol/l HClO₄; CFME
 — 0,1 mmol/l kolchicin v 0,1 mol/l HClO₄; CFME



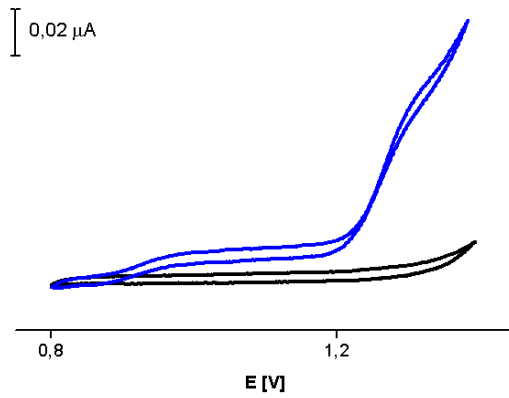
b — 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Au
 — 0,1 mmol/l kolchicin v 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Au



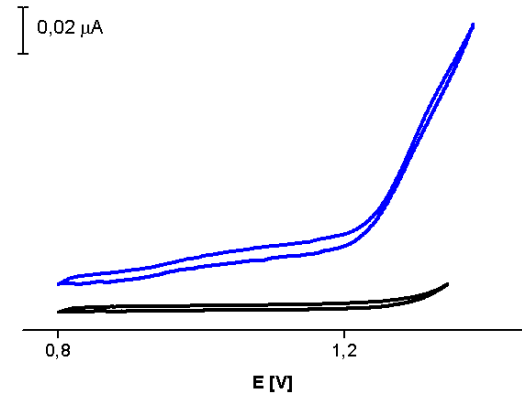
c — 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark C
 — 0,1 mmol/l kolchicin v 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark C

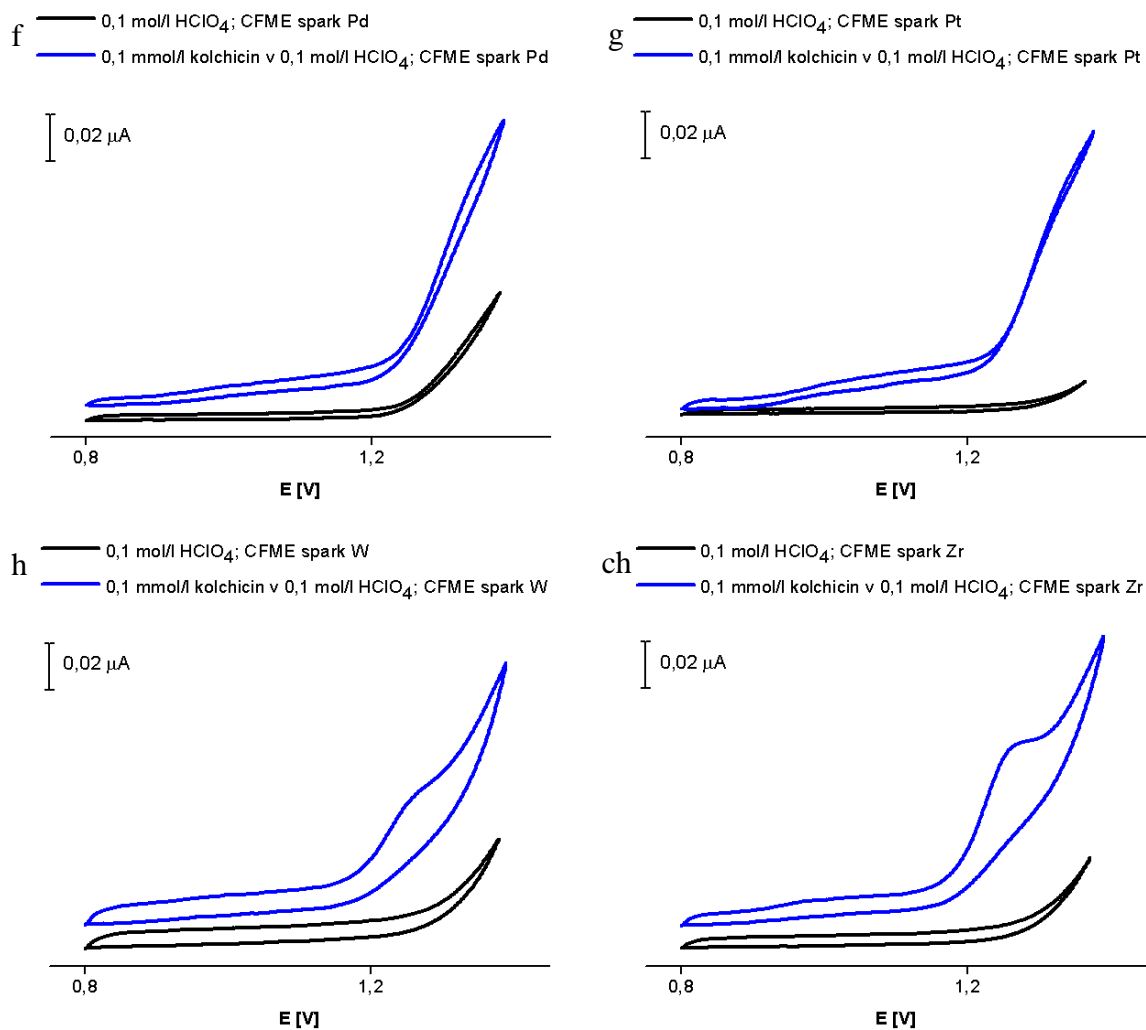


d — 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Fe
 — 0,1 mmol/l kolchicin v 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Fe



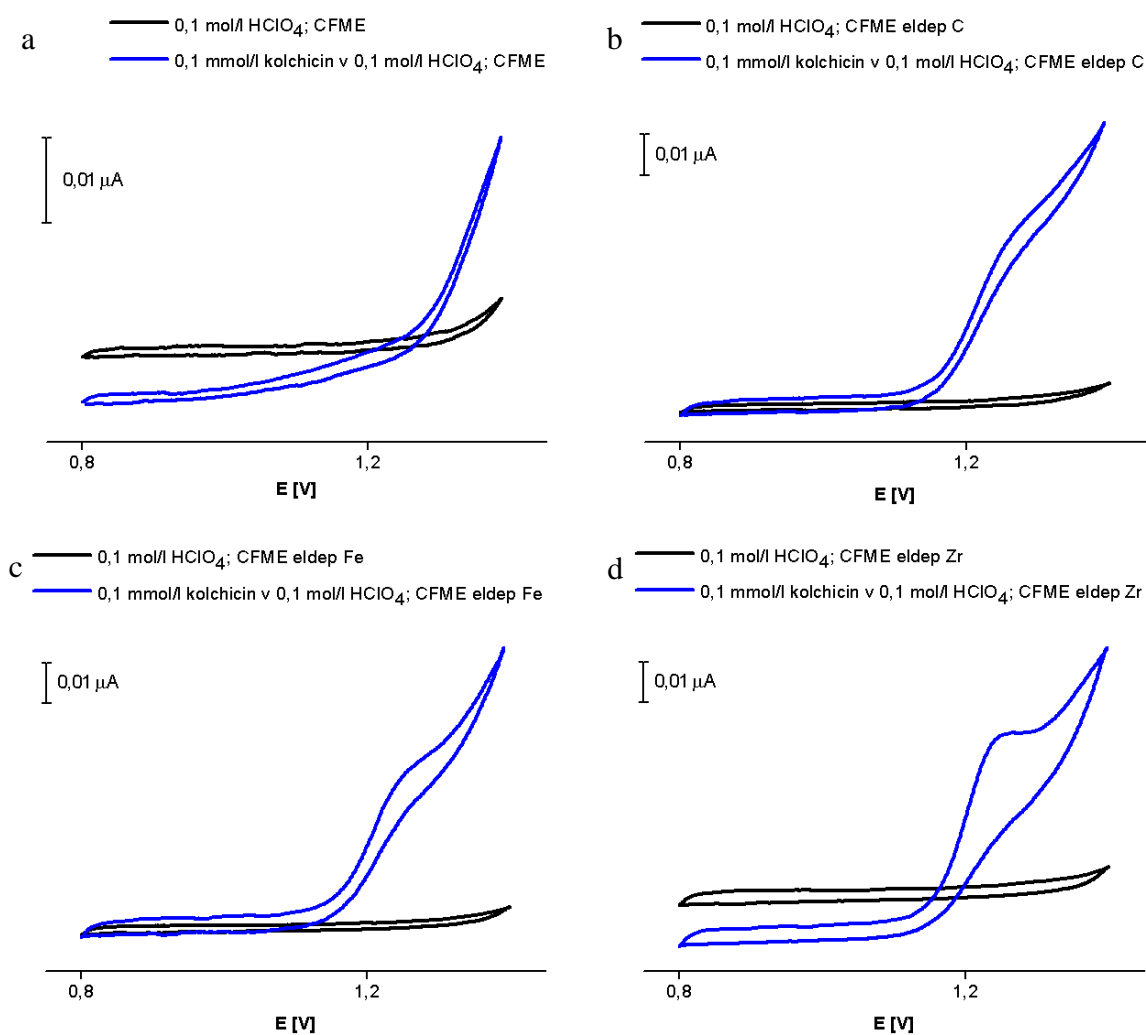
e — 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Mo
 — 0,1 mmol/l kolchicin v 0,1 mol/l HClO₄; CFME spark Mo





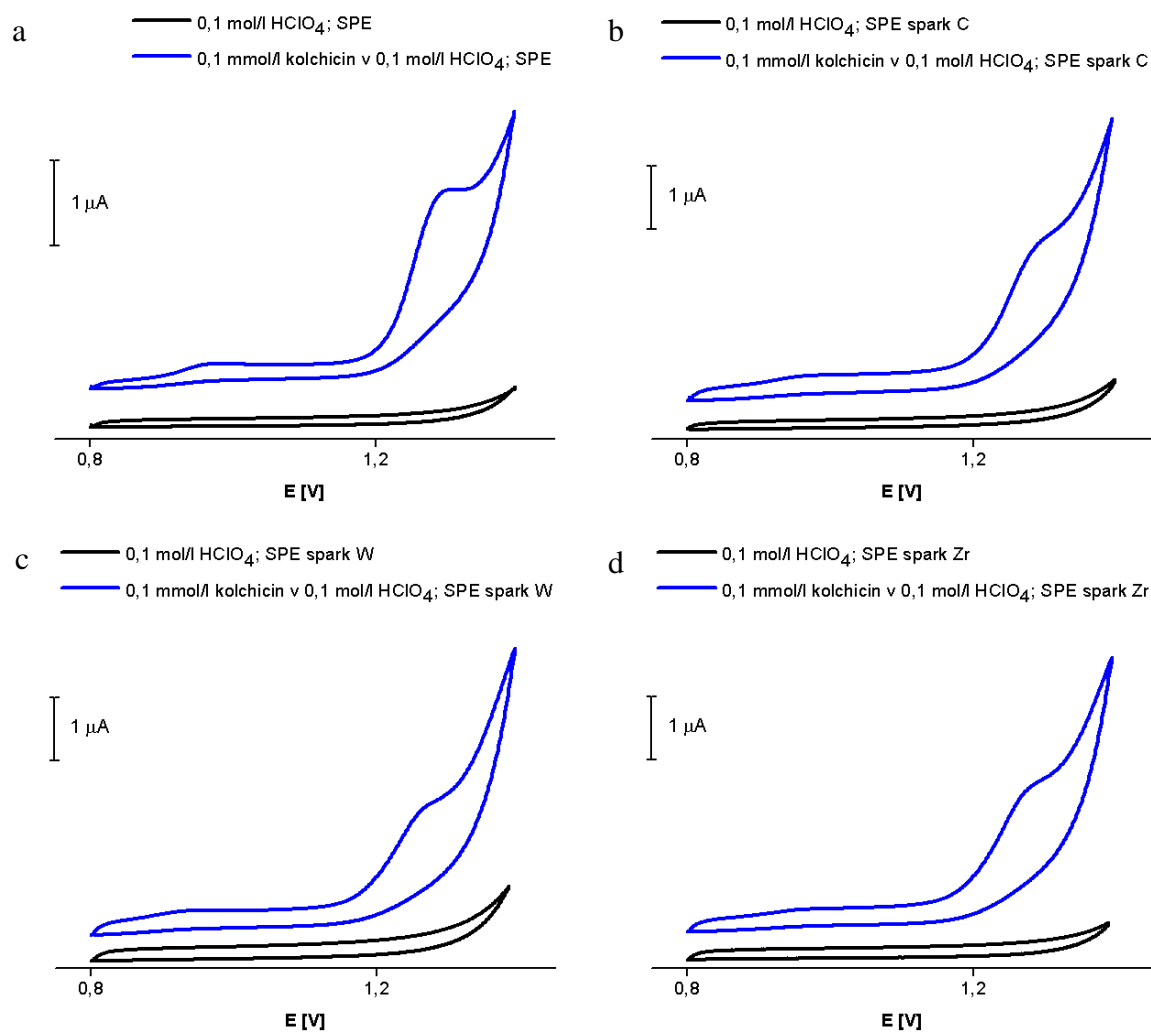
Obr. 25: Cyklické voltamogramy 0,1 mmol/l kolchicinu v 0,1 mol/l HClO₄, porovnání nemodifikované CFME a CFMEs modifikovaných jiskrovým výbojem (spark), **a**) nemodifikovaná CFME, **b**) spark Au, **c**) spark C, **d**) spark Fe, **e**) spark Mo, **f**) spark Pd, **g**) spark Pt, **h**) spark W, **ch**) spark Zr

Obr. 26 zobrazuje cyklické voltamogramy kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l v 0,1 mol/l HClO₄ naměřených na CFMEs modifikovaných elektroforetickou depozicí. Největší odezvu vykazovala CFME modifikovaná Zr, menší pík poskytovala CFME modifikovaná Fe. Nejmenší odezvu na kolchicin měla CFME modifikovaná C.



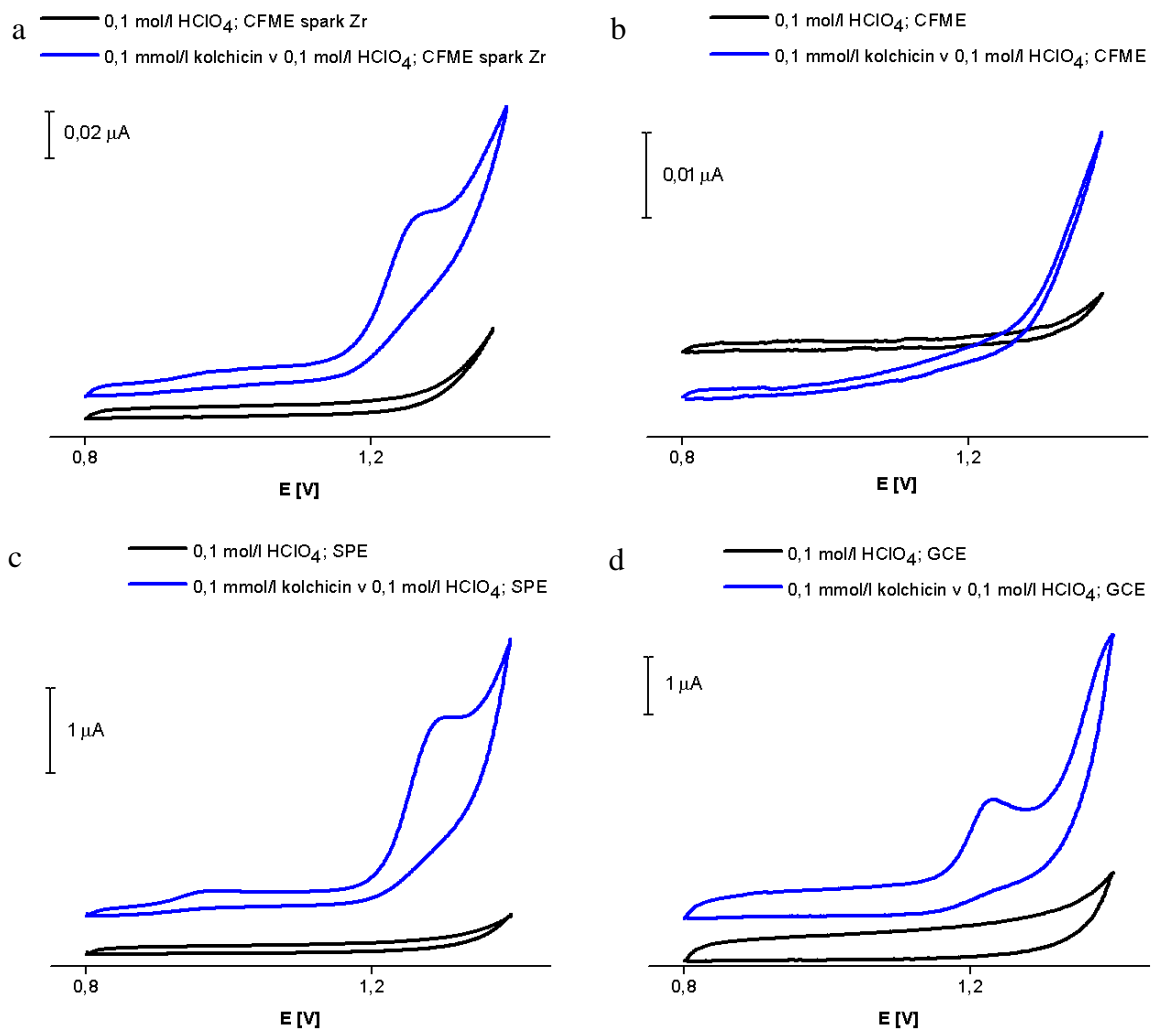
Obr. 26: Cyklické voltamogramy 0,1 mM kolchicinu v 0,1 M HClO₄, porovnání nemodifikované CFME a CFMEs modifikovaných elektroforetickou depozicí (eldep), **a)** nemodifikovaná CFME, **b)** eldep C, **c)** eldep Fe, **d)** eldep Zr

SPEs modifikované depozicí jiskrovým výbojem dávaly velmi malou odezvu na kolchicin, lišila se pouze velikost potenciálu, při kterém docházelo k oxidaci kolchicinu. SPE modifikovaná C poskytovala oxidační pík kolchicinu při 1,28 V, SPE modifikovaná W při 1,26 V, a SPE modifikovaná Zr při 1,27 V. Po srovnání s nemodifikovanou SPE na Obr. 29 je jasné, že modifikace jiskrovým výbojem nepřinesla žádný užitek.



Obr. 29: Cyklické voltamogramy 0,1 mmol/l kolchicinu v 0,1 mol/l HClO₄, porovnání nemodifikované SPE a modifikovaných SPEs depozicí jiskrovým výbojem (spark), a) nemodifikovaná SPE, b) spark C, c) spark W, d) spark Zr

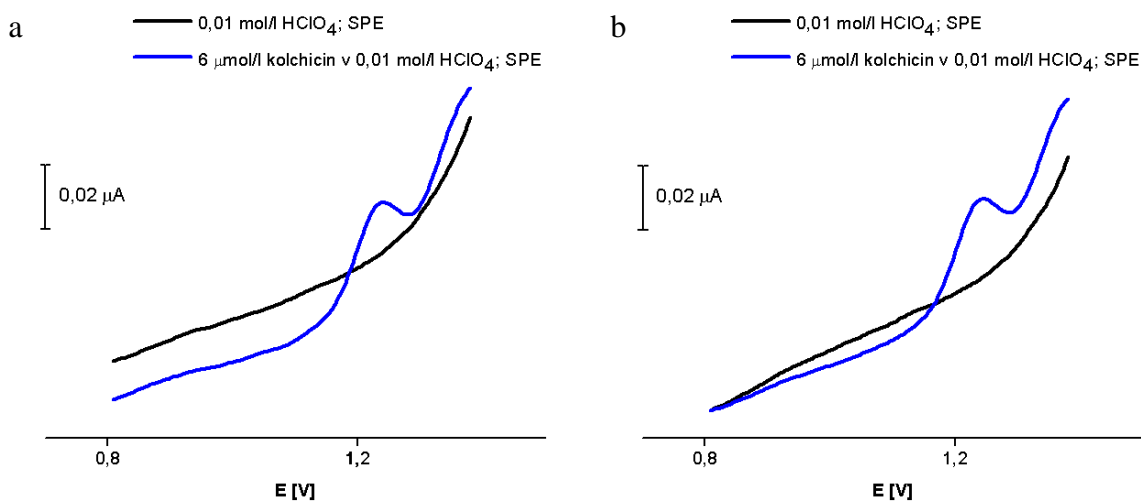
Z provedených měření na nemodifikovaných a modifikovaných CMFEs se nejvíce osvědčila CFME modifikovaná Zr jiskrovým výbojem, protože splnila požadavky funkčnosti v rámci měření CV ferrikyanidu, a vykazovala i nejvyšší odezvu při měření CV kolchicinu v porovnání s ostatními CFMEs. V porovnání s ostatními uhlíkovými elektrodami (SPE, GCE) na Obr. 30, CFMe spark Zr má nižší odezvu na kolchicin, mělo by se ovšem brát v úvahu, že se jedná o mikroelektrodu. Právě díky své velikosti je velice vhodná pro využití jako sensor v elektrochemickém detektoru např. v LC či v CE.



Obr. 30: Porovnání cyklických voltamogramů změřených v roztoku kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l v 0,1 mol/l HClO₄ na uhlíkových elektrodách, **a)** CFME spark Zr, **b)** CFME, **c)** SPE, **d)** GCE

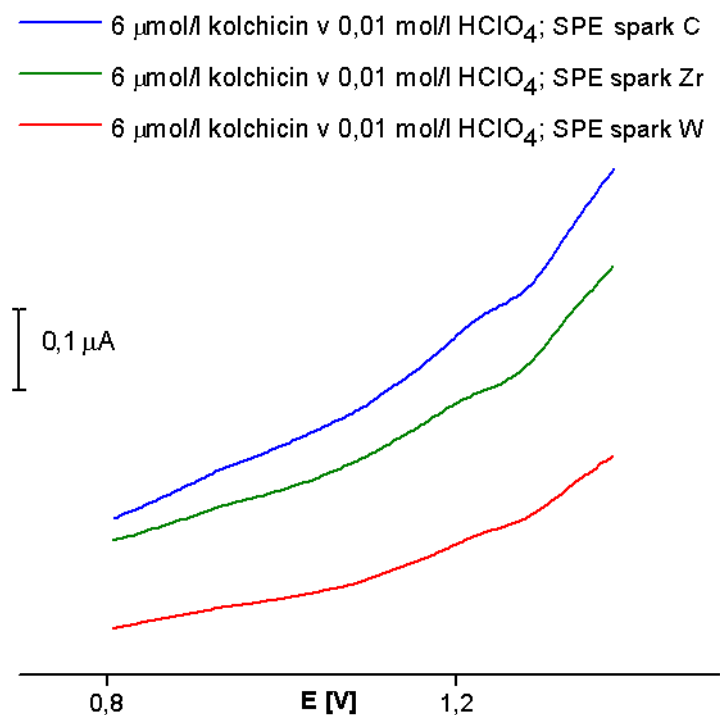
4.1.3. Diferenčně pulsní voltametrie kolchicinu

Modifikované a nemodifikované SPEs byly dále testovány pomocí metody DPV podle [54]. Na Obr. 31 a) je zobrazen voltamogram naměřený bez prekoncentrace, na Obr. 31 b) je voltamogram naměřený s prekoncentrací 240 s při 120 otáčkách/min v zapojeném obvodu (800 mV). Kolchicin se v obou případech oxidoval při 1,24 V, ale očekávané zvýšení odezvy po prekoncentraci se neprojeвило. Došlo pouze ke snížení linie základního elektrolytu.



Obr. 31: Voltamogramy DPV, 6 $\mu\text{mol/l}$ kolchicin v 0,01 mol/l HClO_4 , a) SPE bez prekoncentrace, b) SPE s prekoncentrací 240 s

Na Obr. 32 je zobrazeno srovnání DPV voltamogramů naměřených v roztoku 6 $\mu\text{mol/l}$ kolchicinu v 0,01 mol/l HClO_4 na SPEs modifikovaných depozicí jiskrovým výbojem a s prekoncentrací 240 s při 120 otáčkách/min v zapojeném obvodu (800 mV).



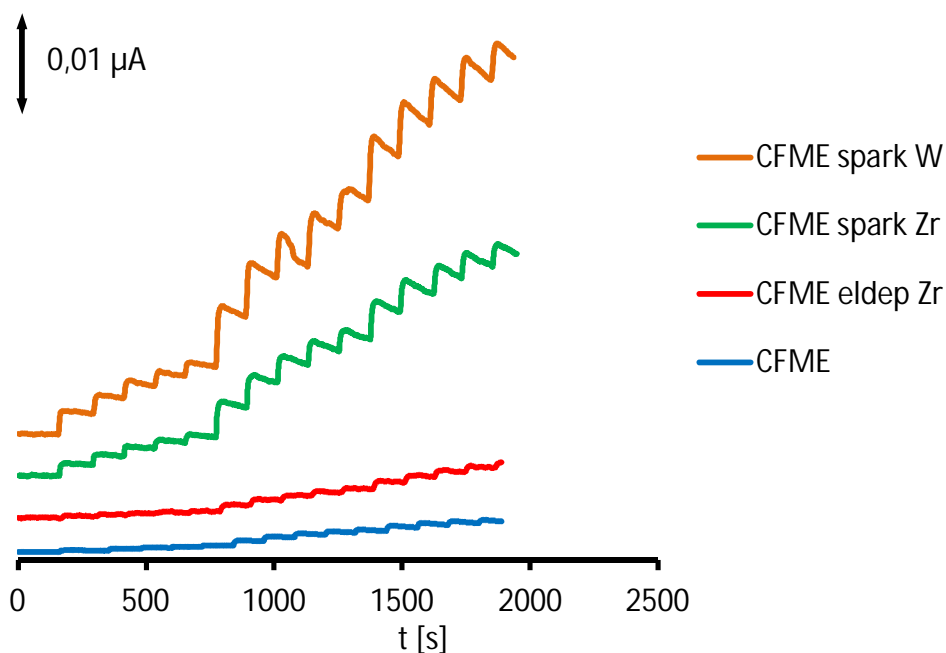
Obr. 32: Srovnání DPV voltamogramů naměřených v roztoku 6 $\mu\text{mol/l}$ kolchicinu v 0,01 mol/l HClO_4 , SPEs modifikované depozicí jiskrovým výbojem (spark), prekoncentrace 240 s

Výsledkem obou experimentů bylo zjištění, že prekoncentrace ani modifikace s prekoncentrací neměla očekávaný přínos. Proto se dále nepokračovalo s dalším měřením DPV.

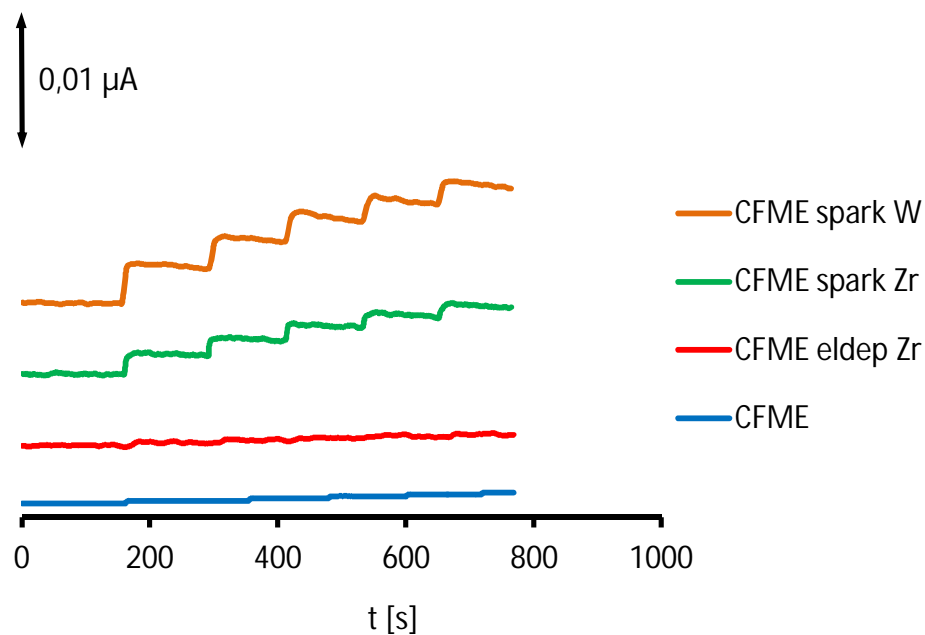
4.2. Amperometrie kolchicinu

Na základě předchozích experimentů byly pro amperometrická měření vybrány tyto elektrody: nemodifikovaná CFME, CFME modifikovaná elektroforetickou depozicí Zr a CFMEs modifikované jiskrovým výbojem (W, Zr). Uvedené elektrody byly otestovány pro následné využití jako pracovní elektrody v elektrochemickém detektoru v LC či CE. Samotná amperometrie, jako elektrochemická metoda je vhodná pro stanovení kolchicinu v tabletách.

Potenciál byl stanoven dle předchozích měření CV kolchicinu na 1300 mV. Kolchicin byl dávkován do měřicí cely tak, aby se koncentrace v cele změnila o 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$. Z Obr. 33 by se mohlo zdát, že nejvíce vyhovující elektrodou bude CFME spark W, díky nejvyšší proudové odezvě na kolchicin. Problémem je nízký poměr signál/ šum a také nelinearita.

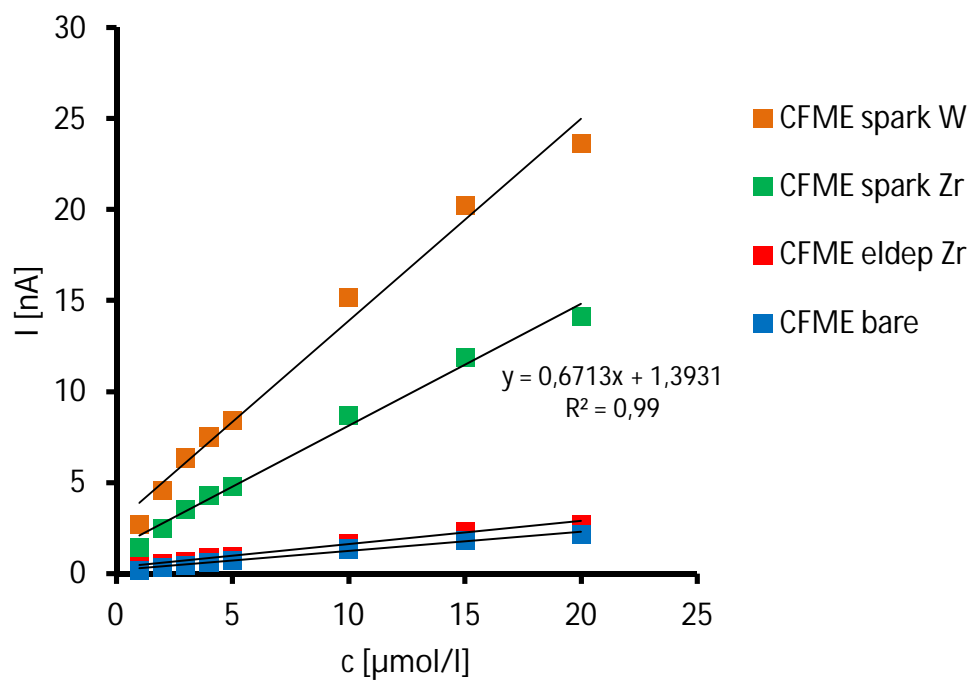


Obr. 33: Srovnání amperometrických záznamů znázorňujících aktuální odezvu postupných přidávků kolchicinu o výsledné koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, naměřeno na nemodifikované CFME a modifikovaných CFMEs elektroforetickou depozicí (eldep) a jiskrovým výbojem (spark)



Obr. 34: Detailní srovnání amperometrických záznamů znázorňujících aktuální odezvu postupných prvních pěti přidavků kolchicinu o výsledné koncentraci $1 \mu\text{mol/l}$, naměřeno na nemodifikované CFME a modifikovaných CFMEs elektroforetickou depozicí (eldep) a jiskrovým výbojem (spark)

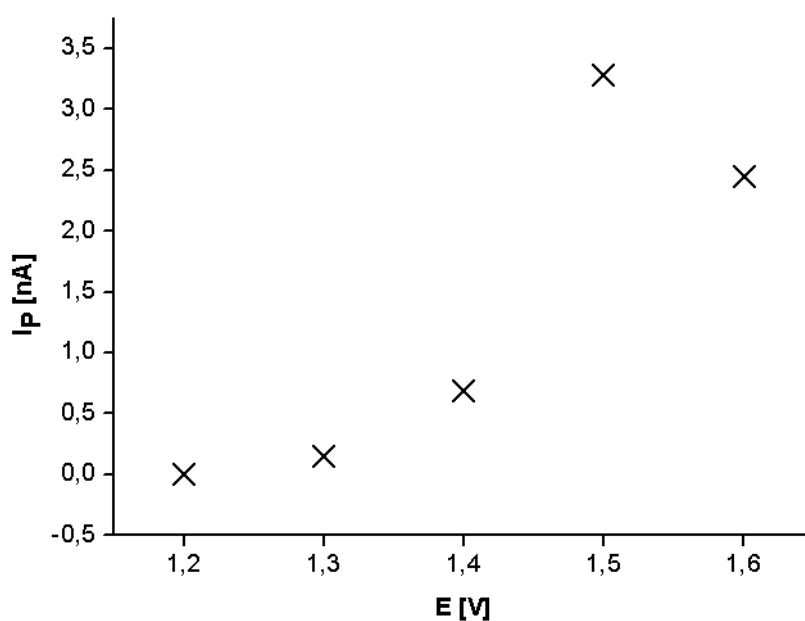
CFME modifikovaná Zr jiskrovým výbojem (dále CFME spark Zr) byla vybrána jako pracovní elektroda pro měření v LC, nejen na základě měření CV v roztoku ferrikyanidu a kolchicinu. V amperometrii měla nejvyšší poměr signál/šum, její lineární rozsah byl ($1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) a limit detekce dosahoval $0,3 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$. Protože se jedná o testování způsobu úpravy elektrody a nikoli o vývoj analytické metody, je rovnice regresní přímky a hodnota spolehlivosti R zobrazena na Obr. 35 pouze pro CFME spark Zr.



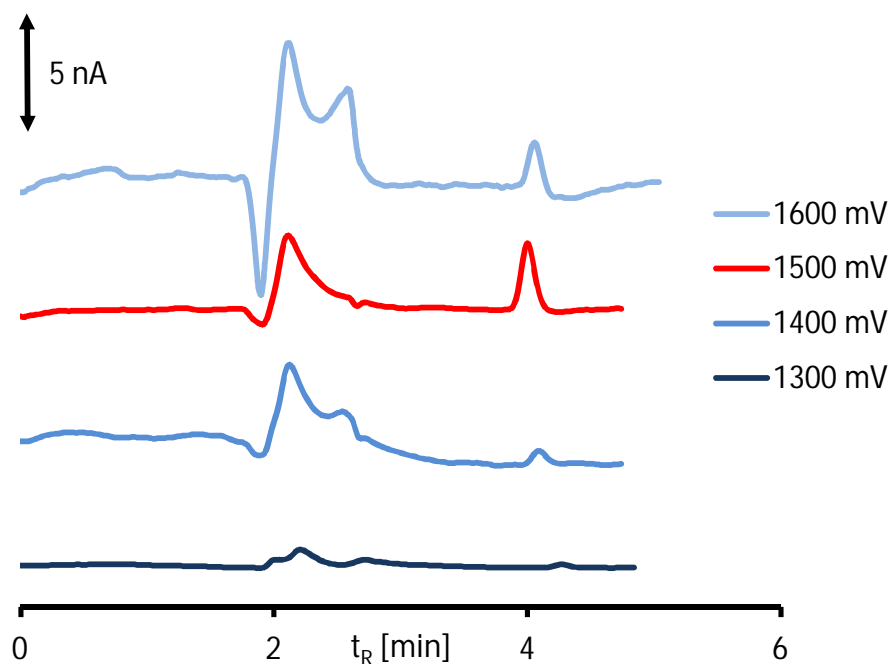
Obr. 35: Kalibrační křivky kolchicinu pro nemodifikovanou CFME, CFME modifikovanou elektroforetickou depozicí (eldep) a pro CFMEs modifikované jiskrovým výbojem (spark), rovnice regresní přímky a hodnota spolehlivosti R je uvedena pro CFME modifikovanou Zr jiskrovým výbojem

4.3. Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Pracovní potenciál byl stanoven na základě série měření kolchicinu pomocí LC při různých potenciálech (v rozsahu 1200-1600 mV), výsledkem bylo vynesení závislosti výšky píku kolchicinu (I_p) na potenciál (E) viz Obr. 36 a následovalo samotné určení potenciálu, při kterém bude nejvyšší odezva na kolchicin, viz Obr. 37. Nejvyšší pík byl získán při zvoleném potenciálu 1500 mV.

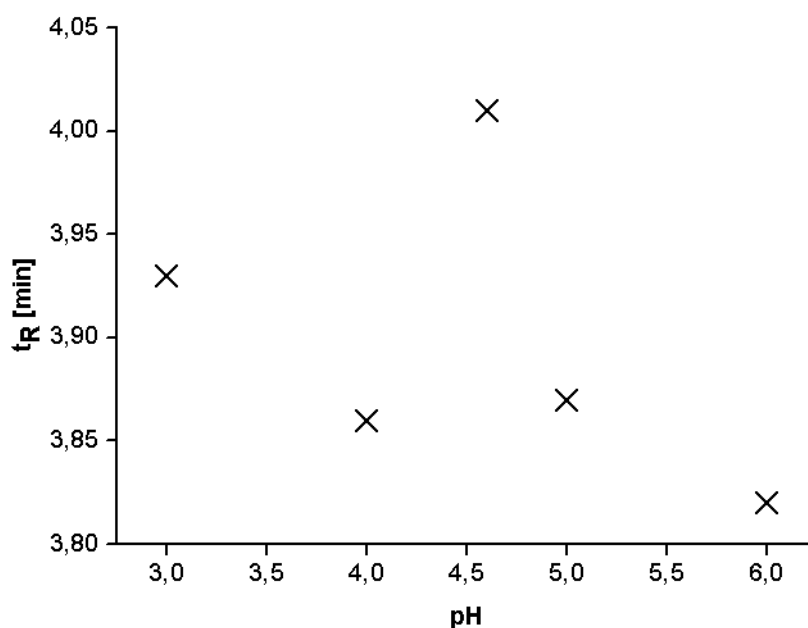


Obr. 36: Graf závislosti výšky píku kolchicinu (I_p) na potenciálu (E)

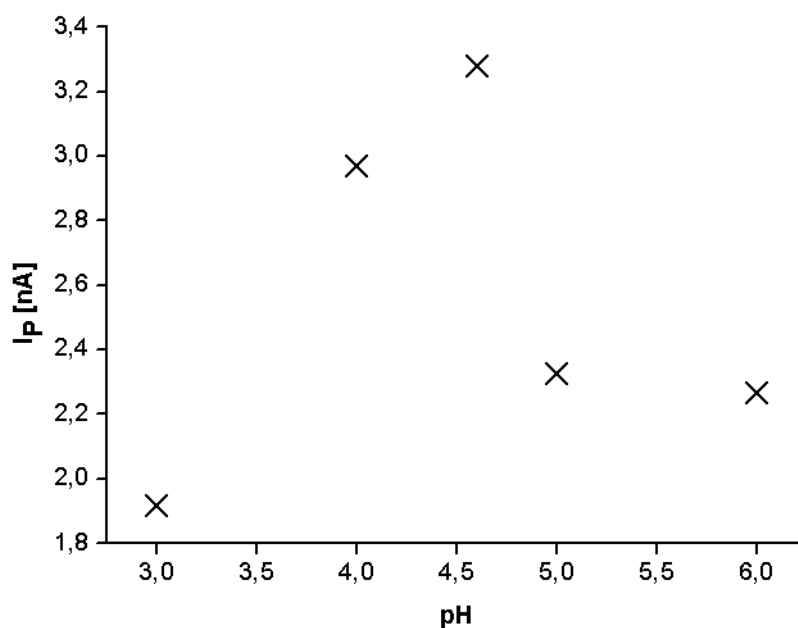


Obr. 37: Chromatogram kolchicinu o koncentraci $10 \mu\text{mol/l}$, srovnání křivek v závislosti na zvoleném potenciálu

Podobným způsobem bylo určeno i optimální pH MF. Za prvé bylo testováno jakým způsobem pH MF ovlivňuje retenční čas (t_R) kolchicinu (Obr. 38), za druhé jaký vliv má pH MF na výšku píku kolchicinu (Obr. 39).

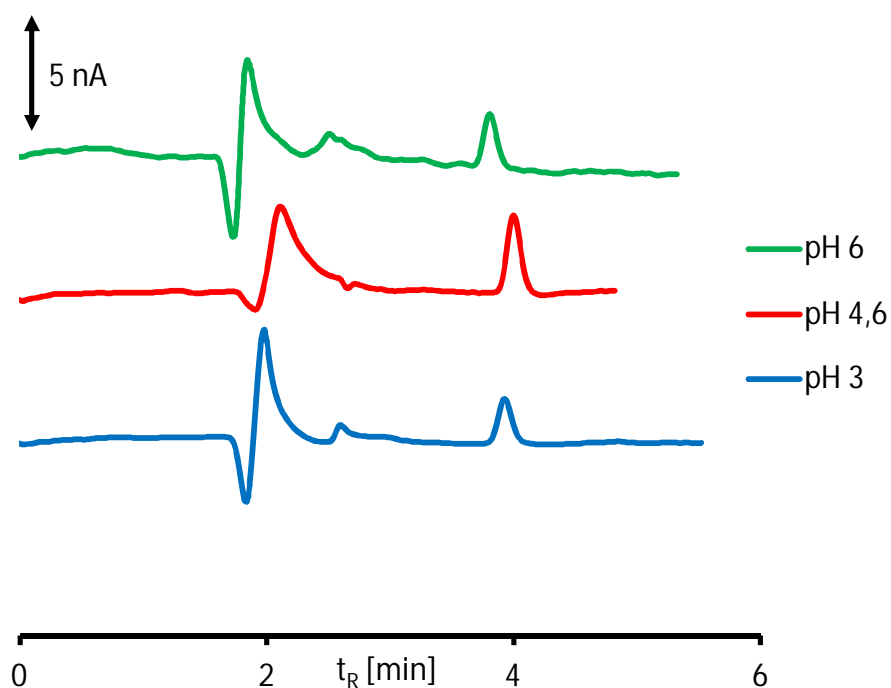


Obr. 38: Graf závislosti retenčního času kolchicinu (t_R) na pH MF



Obr. 39: Graf závislosti výšky píku kolchicinu (I_p) na pH MF

Na Obr. 40 je možné pozorovat, že výška píku skutečně závisí na pH MF a proto jsme zvolili jako optimální pH MF hodnotu 4,6. Odezva na mrtvý čas systému byla způsobena vysokou citlivostí elektrochemické detekce na změnu průtokové rychlosti a složení MF (vodný roztok kolchicinu).



Obr. 40: Chromatogram kolchicinu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$, srovnání křivek v závislosti na pH MF

Naměřená data by mohla posloužit jako základ pro vývoj nové metody pro stanovení kolchicinu pomocí LC s využitím elektrochemického sensoru v podobě CFME spark Zr. Otvírá se tak možnost stanovení kolchicinu v reálných vzorcích (moč, sérum, plasma), kde je zapotřebí separace před samotným stanovením. Konkrétně, s rostoucím počtem pacientů trpících dnou, u kterých je nezbytné sledovat hladinu kolchicinu v plasmě, protože je velmi tenká hranice, kdy je kolchicin ještě lékem a kdy už působí jako jed, se přímo nabízí vyvinout novou metodu, která by spolehlivě stanovila stopové množství kolchicinu. Zároveň by mohla být vhodnou alternativou k ostatním analytickým metodám uvedeným v teoretické části.

5 Závěr

Účelem předkládané práce bylo charakterizovat nemodifikované a modifikované uhlíkové elektrody (CFME, SPE, GCE a PGE) a vybrat tu nejlepší elektrodu pro elektrochemické stanovení kolchicinu jako nezávislé alternativy k metodám spektrofotometrickým a separačním. Dále měla práce za cíl otestovat možnost použití vybrané pracovní elektrody jako sensoru v rámci kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Základní testování nemodifikovaných a modifikovaných uhlíkových elektrod (CFME, SPE, GCE a PGE) probíhalo prostřednictvím cyklické voltametrie v roztoku ferrikyanidu draselného o koncentraci 1 mmol/l v 0,1 mol/l KCl, známého jako elektrochemický standard z důvodu reverzibilního reakčního mechanismu, který se projevuje přítomností katodického a anodického píku. Hlavním ukazatelem funkčnosti elektrody byla proudová odezva a reverzibilita systému. Na nemodifikované GCE byly změřeny cyklické voltamogramy v roztoku kolchicinu o koncentraci 0,1 mmol/l pro otestování dvou různých základních elektrolytů 0,1 mol/l HClO₄ a 0,1 mol/l H₂SO₄. Na základě výsledků CV byla jako základní elektrolyt použita 0,1 mol/l HClO₄. Porovnáním naměřených cyklických voltamogramů v roztoku kolchicinu byly vybrány elektrody s největší proudovou odezvou na kolchicin. Pro další testování byly vybrány CFMEs modifikované pomocí jiskrového výboje (W, Zr) a elektroforetickou depozicí (Zr).

Ze všech provedených experimentů měla nejvyšší poměr signálu k šumu CFME upravená jiskrovým výbojem se zirkonovou protielektrodou. Splnila požadavky funkčnosti v rámci měření CV ferrikyanidu draselného a měla vysoký oxidační pík kolchicinu v cyklické voltametii. Při amperometrických měřeních vykazovala nejvyšší poměr signál/šum, limit detekce dosahoval $0,3 \times 10^{-6}$ mol/l, limit kvantifikace 1×10^{-6} mol/l kolchicinu.

CFME modifikovaná Zr jiskrovým výbojem byla použita jako pracovní elektroda jako elektrochemický detektor pro HPLC. Podařilo se optimalizovat základní parametry měření (pH, pracovní potenciál) pro vývoj metody stanovení kolchicinu pomocí HPLC – ECD ve vzorcích tělních tekutin (moč, plasma).

6 Summary

The aim of this thesis was to characterize unmodified and modified carbon electrode (CFME, SPE, GCE and PGE) and to choose the most suitable electrode for the electrochemical determination of colchicine as an alternative to spectrophotometric and separation methods. Another aim was to test the possibility of utilizing the chosen working electrode as a sensor in liquid chromatography with electrochemical detection.

The basic testing of the unmodified and modified carbon electrodes (CFME, SPE, GCE and PGE) was carried out using cyclic voltammetry in a solution of potassium ferricyanide (1 mmol/l) in potassium chloride (0.1 mol/l), also known as an electrochemical standard used in reversible reaction mechanisms, which is demonstrated by the presence of a cathodic and an anodic peak. The main proof of the functionality of the electrode was the current response and the reversibility of the system. The unmodified GCE electrode provided cyclic voltammograms for the measurement of a solution of colchicine with the concentration of 0.1 mmol/l when tested in two different basic electrolytes: 0.1 mol/l HClO₄ and 0.1 mol/l H₂SO₄. Based on the results of the CV, the 0.1 mol/l HClO₄ was chosen as the basic electrolyte for further measurements. The cyclic voltammograms for the different electrodes were compared and the electrodes with the highest current responses for colchicine were chosen for additional testing. The chosen electrodes were CFMEs modified by spark deposition (W, Zr) and electrophoretic deposition (Zr).

Out of all the carried out experiments the CFME modified by spark deposition with zirconium counter electrode had the highest signal-to-noise ratio. It satisfied the functionality conditions for the CV measurement of potassium ferricyanide and showed a high oxidation peak of colchicine in cyclic voltammetry. The electrode also showed the highest signal-to-noise ratio during amperometric measurements, with the limit of detection of colchicine at 0.3×10^{-6} mol/l and limit of quantification at 1.10^{-6} mol/l.

The CFME modified by Zr spark deposition was used as the working electrode for the electrochemical detection in liquid chromatography. The basic method parameters (pH, working potential) were optimized for the development of a method for the determination of colchicine using HPLC – ECD in bodily fluids (urine, plasma).

7 Seznam použité literatury

- [1] J. Baloun, L. Jahodář, I. Leifertová, S. Šípek, Rostliny způsobující otravy a alergie, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha, 1989.
- [2] V. Hrdina, R. Hrdina, L. Jahodář, Z. Martinec, V. Měrka, Přírodní toxiny a jedy Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, Praha: Galén, 2004.
- [3] O.J. EIGSTI, P. DUSTIN, Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry, The Iowa State College Press, Iowa, U.S.A., 1955.
- [4] F. Šantavý, Alkaloidy ocúnovitých rostlin a jejich deriváty, Státní zdravotnické nakladatelství Praha, 1958.
- [5] C. Cristea, E. Bodoki, V. Sima, R. Sandulescu, Modified Screen Printed Electrodes for the Development of Biosensors, *Ifmbe Proc*, 26 (2009) 89-92.
- [6] X.Y. Shang, Y. Shiono, Y. Fujita, S. Oka, Y. Yamazaki, Synergistic enhancement of apoptosis by DNA- and cytoskeleton-damaging agents: A basis for combination chemotherapy of cancer, *Anticancer Res.*, 21 (2001) 2585-2589.
- [7] M.E. Gasparian, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, D.S. Izyumov, A.Y. Lomakin, E.N. Popova, A.V. Yagolovich, O.Y. Pletjushkina, D.A. Dolgikh, B.V. Chernyak, Cytoskeleton inhibitors combined with TRAIL induce apoptosis in HeLa carcinoma cells overexpressing antiapoptotic protein bcl-2, *Biochem.-Moscow*, 73 (2008) 358-362.
- [8] L.Y. Wang, M.S. Lai, S.J. Huang, C.Y. Hsieh, M.M. Hsu, C.J. Chen, INCREASED SISTER-CHROMATID EXCHANGE FREQUENCY IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA AND CERVICAL-CANCER PATIENTS, *Anticancer Res.*, 14 (1994) 105-107.
- [9] T.A. Buchholz, X.F. Wu, Radiation-induced chromatid breaks as a predictor of breast cancer risk, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 49 (2001) 533-537.
- [10] K.K. Sanford, R. Parshad, F.M. Price, R.E. Tarone, M.B. Schapiro, X-RAY-INDUCED CHROMATID DAMAGE IN CELLS FROM DOWN-SYNDROME AND ALZHEIMER-DISEASE PATIENTS IN RELATION TO DNA-REPAIR AND CANCER PRONENESS, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 70 (1993) 25-30.
- [11] P.J. Pelletier, J. Caventou, *Ann. Chim. (Phys)*, 14 (1820) 69.
- [12] L. Grycová, Kvartérní protoberberinové alkaloidy, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, 2007.
- [13] Y. Finkelstein, S.E. Aks, J.R. Hutson, D.N. Juurlink, P. Nguyen, G. Dubnov-Raz, U. Pollak, G. Koren, Y. Bentur, Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug, *Clin Toxicol*, 48 (2010) 407-414.
- [14] M. Hejcman, P. Hejcmanová, V. Pavlů, J. Gaisler, A. Fučíková, Ocún jesenní (*Colchicum autumnale*) aneb Výlet do světa jedovatých rostlin luk a pastvin, *Náš chov*, 66 (2006) 79-80.
- [15] D. Heaney, C.B. Derghazarian, G.F. Pineo, M.A. Ali, Massive colchicine overdose: a report on the toxicity, *Am J Med Sci*, 271 (1976) 233-238.
- [16] S.T. Milne, P.D. Meek, Fatal colchicine overdose: report of a case and review of the literature, *Am J Emerg Med*, 16 (1998) 603-608.
- [17] M.P.j. Arroyo, S. Sanders, H. Yee, D. Schwartz, H. Kamino, B.E. Strober, Toxic epidermal necrolysis-like reaction secondary to colchicine overdose, *Brit J Dermatol*, 150 (2004) 581-588.

- [18] J. Fuchs, C. Rauber-Luthy, H. Kupferschmidt, J. Kupper, G.A. Kullak-Ublick, A. Ceschi, Acute plant poisoning: Analysis of clinical features and circumstances of exposure, *Clin Toxicol*, 49 (2011) 671-680.
- [19] Z. Sundov, Z. Nincevic, M. Definis-Gojanovic, M. Glavina-Durdov, I. Jukic, N. Hulina, A. Tonkic, Fatal colchicine poisoning by accidental ingestion of meadow saffron-case report, *Forensic Sci Int*, 149 (2005) 253-256.
- [20] F.J. Baud, A. Sabouraud, E. Vicaut, P. Taboulet, J. Lang, C. Bismuth, J.M. Rouzioux, J.M. Scherrmann, Treatment of Severe Colchicine Overdose with Colchicine-Specific Fab Fragments, *New Engl J Med*, 332 (1995) 642-645.
- [21] E. Niel, J.M. Scherrmann, Colchicine today, *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, 73 (2006) 672-678.
- [22] J.G. Macleod, L. Phillips, Hypersensitivity to Colchicine, *Ann Rheum Dis*, 6 (1947) 224-229.
- [23] S.A. Axenovich, A.R. Kazarov, A.D. Boiko, G. Armin, I.B. Roninson, A.V. Gudkov, Altered expression of ubiquitous kinesin heavy chain results in resistance to etoposide and hypersensitivity to colchicine: Mapping of the domain associated with drug response, *Cancer Res*, 58 (1998) 3423-3428.
- [24] A. Folpini, P. Furfori, Colchicine Toxicity - Clinical-Features and Treatment - Massive Overdose Case-Report, *J Toxicol-Clin Toxic*, 33 (1995) 71-77.
- [25] M. Deveaux, N. Hubert, C. Demarly, Colchicine poisoning: case report of two suicides, *Forensic Sci Int*, 143 (2004) 219-222.
- [26] M.J. Maxwell, P. Muthu, P.E. Pritty, Accidental colchicine overdose. A case report and literature review, *Emerg Med J*, 19 (2002) 265-267.
- [27] A. Sabouraud, M. Urtizberea, M. Grandgeorge, P. Gattel, M.E. Makula, J.M. Scherrmann, Dose-Dependent Reversal of Acute Murine Colchicine Poisoning by Goat Colchicine-Specific Fab Fragments, *Toxicology*, 68 (1991) 121-132.
- [28] N. Terrien, M. Urtizberea, J.M. Scherrmann, Reversal of advanced colchicine toxicity in mice with goat colchicine-specific antibodies, *Toxicol Appl Pharmacol*, 104 (1990) 504-510.
- [29] E.M. Antman, T.L. Wenger, V.P. Butler, E. Haber, T.W. Smith, Treatment of 150 Cases of Life-Threatening Digitalis Intoxication with Digoxin-Specific Fab Antibody Fragments - Final Report of a Multicenter Study, *Circulation*, 81 (1990) 1744-1752.
- [30] J.D. Bagnato, A.L. Eilers, R.A. Horton, C.B. Grissom, Synthesis and characterization of a cobalamin-colchicine conjugate as a novel tumor-targeted cytotoxin, *J Org Chem*, 69 (2004) 8987-8996.
- [31] A. Kumar, B. Singh, G. Mahajan, P.R. Sharma, S.B. Bharate, M.J. Mintoo, D.M. Mondhe, A novel colchicine-based microtubule inhibitor exhibits potent antitumor activity by inducing mitochondrial mediated apoptosis in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells, *Tumor Biol*, 37 (2016) 13121-13136.
- [32] G.B.E. Jemec, L. Kemeny, D. Miech, *Non-Surgical Treatment of Keratinocyte Skin Cancer*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2010.
- [33] S. Maduri, V.R. Atla, Formulation of colchicine ointment for the treatment of acute gout, *Singap Med J*, 53 (2012) 750-754.
- [34] Y. Adler, P. Charron, The 2015 ESC Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases, *Eur Heart J*, 36 (2015) 2873-2874.
- [35] T.E. Wallaart, N. Pras, W.J. Quax, Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type, *Planta Med*, 65 (1999) 723-728.
- [36] H.M. Ismail, V. Barton, M. Phanchana, S. Charoensutthivarakul, M.H.L. Wong, J. Hemingway, G.A. Biagini, P.M. O'Neill, S.A. Ward, Artemisinin activity-based probes

- identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7, *P Natl Acad Sci USA*, 113 (2016) 2080-2085.
- [37] M.K. Pavithra, T.V. Venkatesha, M.K.P. Kumar, N.S. Anantha, Electrochemical, gravimetric and quantum chemical analysis of mild steel corrosion inhibition by colchicine in 1 M HCl medium, *Res. Chem. Intermed.*, 42 (2016) 2409-2428.
- [38] M.K. Pavithra, T.V. Venkatesha, M.K.P. Kumar, N.S. Anantha, Synergistic effect of colchicine and iodide ions on the corrosion of mild steel in 0.5 M H₂SO₄, *Res. Chem. Intermed.*, 41 (2015) 5781-5796.
- [39] T.M. Sarg, M.M. Eldomiaty, M.M. Bishr, O.M. Salama, A.R. Elgindy, Thin-Layer Chromatographic Scanner, Spectrophotometric and High-Performance Liquid-Chromatographic Methods for the Determination of Colchicine, *Analyst*, 114 (1989) 575-578.
- [40] M.S. Karawya, A.M. Diab, COLORIMETRIC AND VOLUMETRIC ASSAYS OF COLCHICINE IN GALENICALS AND IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58 (1975) 1171-1173.
- [41] E. Bishop, W. Hussein, Anodic Voltammetry of Colchicine, *Analyst*, 109 (1984) 623-625.
- [42] J. Wang, M. Ozsoz, Trace Measurements of Colchicine by Adsorptive Stripping Voltammetry, *Talanta*, 37 (1990) 783-787.
- [43] K. Florey, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Elsevier Science 1981.
- [44] S.K. Talapatra, B. Talapatra, *Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*, Springer Berlin Heidelberg 2015.
- [45] D.B. Troy, J.P. Remington, P. Beringer, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins 2006.
- [46] A. Poulev, B. Deusneumann, E. Bombardelli, M.H. Zenk, Immunoassays for the Quantitative-Determination of Colchicine, *Planta Med*, 60 (1994) 77-83.
- [47] Q. Wang, H.D. Qiu, J. Li, H.F. Han, X. Liu, S.X. Jiang, Novel approach to improve the detection of colchicine via online coupling of ionic liquid-based single-drop microextraction with capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 34 (2011) 594-600.
- [48] F. Alali, K. Tawaha, R.M. Qasaymeh, Determination of colchicine in *Colchicum steveni* and *C. hierosolymitanum* (colchicaceae): comparison between two analytical methods, *Phytochemical Analysis*, 15 (2004) 27-29.
- [49] Y. Jiang, J. Wang, Y.W. Wang, H. Li, J.P. Fawcett, J.K. Gu, Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 850 (2007) 564-568.
- [50] E. Bodoki, R. Oprean, L. Vlase, M. Tamas, R. Sandulescu, Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts, *J Pharmaceut Biomed*, 37 (2005) 971-977.
- [51] G. Hamscher, B. Priess, H. Nau, E. Panariti, Determination of colchicine residues in sheep serum and milk using high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 77 (2005) 2421-2425.
- [52] C.V. Clevenger, T.F. August, L.M. Shaw, Colchicine Poisoning - Report of a Fatal Case with Body-Fluid Analysis by Gc/Ms and Histopathologic Examination of Postmortem Tissues, *J Anal Toxicol*, 15 (1991) 151-154.
- [53] E. Bodoki, R. Sandulescu, L. Roman, Method validation in quantitative electrochemical analysis of colchicine using glassy carbon electrode, *Cent Eur J Chem*, 5 (2007) 766-778.

- [54] E. Bodoki, S. Laschi, I. Palchetti, R. Sandulescu, M. Mascini, Electrochemical behavior of colchicine using graphite-based screen-printed electrodes, *Talanta*, 76 (2008) 288-294.
- [55] K. Zhang, J. Zhou, J. Liu, K.J. Li, Y.F. Li, L.X. Yang, B.X. Ye, Sensitive determination of colchicine at carbon paste electrode doped with multiwall carbon nanotubes, *Anal Methods-Uk*, 5 (2013) 1830-1836.
- [56] W. Wen, Y.M. Tan, H.Y. Xiong, S.F. Wang, Voltammetric and Spectroscopic Investigations of the Interaction between Colchicine and Bovine Serum Albumin, *Int J Electrochem Sc*, 5 (2010) 232-241.
- [57] F. Wang, J. Zhou, Y. Liu, S.J. Wu, G. Song, B.X. Ye, Electrochemical oxidation behavior of colchicine on a graphene oxide-Nafion composite film modified glassy carbon electrode, *Analyst*, 136 (2011) 3943-3949.
- [58] P.M. Bersier, J. Bersier, Polarographic, Voltammetric, and Hplc-Ec of Pharmaceutically Relevant Cyclic-Compounds, *Electroanal*, 6 (1994) 171-191.
- [59] H.J. Zhang, Electrochemistry and voltammetric determination of colchicine using an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite film modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, 68 (2006) 197-201.
- [60] Y.T. Chen, Y.Y. Jiang, Z.Y. Lin, J.J. Sun, L. Zhang, G.N. Chen, Fabrication of an electrically heated indium-tin-oxide electrode for electrochemiluminescent detection system, *Analyst*, 134 (2009) 731-737.
- [61] W.F. Smyth, A.D. Woolfson, Drug Assays - the Role of Modern Voltammetric Techniques, *J Clin Pharm Ther*, 12 (1987) 117-134.
- [62] A.B. Anderson, C.M. Ciriacks, K.M. Fuller, E.A. Arriaga, Distribution of zeptomole-abundant doxorubicin metabolites in subcellular fractions by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Analytical chemistry*, 75 (2003) 8-15.
- [63] P.T. Kissinger, J.B. Hart, R.N. Adams, Voltammetry in brain tissue — a new neurophysiological measurement, *Brain Research*, 55 (1973) 209-213.
- [64] D.E. Mays, A. Hussam, Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in the environment-A review, *Anal Chim Acta*, 646 (2009) 6-16.
- [65] D. Du, X.P. Ye, J.D. Zhang, Y. Zeng, H.Y. Tu, A.D. Zhang, D.L. Liu, Stripping voltammetric analysis of organophosphate pesticides based on solid-phase extraction at zirconia nanoparticles modified electrode, *Electrochem Commun*, 10 (2008) 686-690.
- [66] J.M. Gong, L.Y. Wang, D.D. Song, X.L. Zhu, L.Z. Zhang, Stripping voltammetric analysis of organophosphate pesticides using Ni/Al layered double hydroxides as solid-phase extraction, *Biosens Bioelectron*, 25 (2009) 493-496.
- [67] R. Pongratz, K.G. Heumann, Determination of monomethylcadmium in the environment by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Analytical chemistry*, 68 (1996) 1262-1266.
- [68] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Nakladaelství Karolinum, Praha, 2005.
- [69] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., Publication 2006.
- [70] R.G. Compton, A.C. Fisher, M.H. Latham, C.M.A. Brett, A.M.C.F.O. Brett, Wall-Jet Electrode Linear Sweep Voltammetry, *J Phys Chem-Us*, 96 (1992) 8363-8367.
- [71] Z. Bartosova, D. Riman, P. Jakubec, V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, Electrochemically Pretreated Carbon Microfiber Electrodes as Sensitive HPLC-EC Detectors, *Sci World J*, (2012).
- [72] D. Riman, D. Jirovsky, J. Hrbac, M.I. Prodromidis, Green and facile electrode modification by spark discharge: Bismuth oxide-screen printed electrodes for the screening of ultra-trace Cd(II) and Pb(II), *Electrochem Commun*, 50 (2015) 20-23.

[73] D. Riman, Elektrody z uhlíkového mikrovlákná jako amperometrické detektory pro HPLC s isokratickou i gradientovou elucí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2013.

[74] E. Müllerová, Studium kombinované elektrochemické/elektroforetické depozice kovů na uhlíkové elektrody, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2015.