

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Martin Baroch

MODIFIKACE DETEKTORU Z UHLÍKOVÉ PLSTI
MĚDĚNÝMI MIKROČÁSTICEMI

Modification of carbon felt detector with copper microparticles

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
Bc. Martin Baroch

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 17-03868S)

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí práce, RNDr. Haně Dejmkové Ph.D., za její pomoc, cenné připomínky a za čas, který mi velmi ochotně věnovala. A v neposlední řadě velký dík patří celé laboratoři 112 a katedře analytické chemie za všemožnou pomoc, nápady a trpělivost při vypracování této diplomové práce.

Klíčová slova

HPLC, FIA, amperometrická detekce, uhlíková plst, elektroda z uhlíkové plsti, aminokyseliny, fenylalanin, měď, tištěná cela

Key words

HPLC, FIA, amperometric detection, carbon felt, carbon felt electrode, amino acids, phenylalanine, copper, printed cell

Abstrakt

Prvním cílem této práce bylo připravení mědi modifikované elektrody z uhlíkové plsti tak, aby jí bylo možné detekovat aminokyseliny, které jsou na běžných elektrodách elektrochemicky neaktivní. Jako modelový vzorek sloužil roztok fenylalaninu o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Elektroda modifikovaná pomocí elektrochemického nanášení mědi ze směsného roztoku síranu měďnatého a síranu sodného poskytovala velmi nízké odezvy, které v průběhu prvních měření klesly, zřejmě kvůli nedostatečnému množství nanesené mědi. Proto byly další experimenty prováděny s použitím mikročástic mědi jako modifikátoru. Mikročástice aktivované pomocí kyseliny dusičné o koncentraci 80 mmol dm^{-3} byly nanášeny na plst pomocí míchání plsti v suspenzi mikročástic mědi a kapáním této suspenze na různé strany plsti – na stranu u kapiláry (proximální), u kontaktu s měrnou nádobkou (distální) a mezi dvě poloviny uhlíkové plsti (sandwichové). Jako nejvhodnější se z hlediska stability a velikosti signálu jeví elektrody modifikované v distálním a sandwichovém uspořádání. V poslední fázi byla proto na těchto elektrodách změřena kalibrační závislost pro fenylalanin v rozsahu $0,025 \text{ mmol dm}^{-3}$ až $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Pro ověření funkčnosti a použitelnosti elektrod byl pro analýzu reálného vzorku využit doplněk stravy s obsahem lysinu, kdy koncentrace této aminokyseliny byla stanovována metodou standardního přídatku.

Sekundárním cílem této práce bylo zmenšení elektrochemické cely pro průtokové metody, v tomto případě HPLC, za použití 3D tisku. Do vytištěné cely byla umístěna pracovní elektroda z uhlíkové plsti, referenční argentschloridová a pomocná platinová elektroda. Použitelnost této cely byla ověřena na syntetických antioxidantech propylgallátu, butylhydroxyanisolu, terc-butylhydrochinonu a butylhydroxytoluenu, u kterých je známé elektrochemické chování ve skleněné cele.

Antioxidanty bylo nutné nejdříve z jejich směsi separovat pomocí HPLC na koloně Lichrospher® RP-18 ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) a gradientové eluce mobilní fáze, kdy během osmi minut byl obsahu methanolu zvyšován z 55 % na 95 % a následně byl tento obsah 2 minuty udržován, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr o koncentraci 50 mmol dm^{-3} a $\text{pH} = 4,5$.

Při porovnání získaných hydrodynamických voltamogramů nebyly patrné výrazné rozdíly mezi skleněnou a tištěnou celou. Významné změny byly nalezeny při porovnání vlivu typu

cely na rozšíření píku, kdy na tištěné cele bylo dosaženo téměř žádného vlivu na rozšíření oproti cele skleněné, kde docházelo ke změně píků až o 60 %.

Dalším benefitem tištěné cely bylo vymizení nepravidelnosti základní linie v podobě neznámého píku, snížení šumu základní linie a zároveň téměř k vymizení jejího driftu což vedlo ke snížení limitu detekce BHT z původních $15,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na $5,97 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Abstract

The first aim of this work was to develop copper modified carbon felt electrode for detection of amino acids, which are not electrochemically active on ordinary carbon electrodes. Phenylalanine solution at a concentration 1.0 mmol dm^{-3} was chosen as the testing solution.

Electrode modified with electrochemical deposition of copper from mixture of copper(II) sulphate and sodium sulphate provided very low responses which were decreasing during first measurements, apparently because of insufficient amount of copper. Therefore, further experiments were performed using copper microparticles as a modifier. Copper microparticles activated in nitric acid at a concentration 80 mmol dm^{-3} were applied at carbon felt by several techniques and in different parts of the felt, i.e. by stirring the felt in microparticles suspension, by dripping of the suspension to the part of the felt in contact with capillary (proximal), between two parts of the carbon felt (sandwich) and at a part of the carbon felt in contact with electrolyte in a measuring cell (distal). Electrodes modified in the distal and in the sandwich arrangement were chosen as the best ones. In the last part, calibration dependences for phenylalanine in concentration range from $0.025 \text{ mmol dm}^{-3}$ to 1.0 mmol dm^{-3} were measured on the last two electrodes. Since a real sample of phenylalanine wasn't found, a food supplement containing lysine was used for a verification of functionality and usability of the electrodes. Concentration of lysine in the drug was determined by standard addition method.

Secondary aim of this work was to miniaturize electrochemical cell for flow methods, in this case HPLC, with usage of 3D printing. Into printed cell working carbon felt electrode, auxiliary platinum electrode and reference silver chloride electrode were placed. Usability of this cell was tested on synthetic antioxidants, namely propylgallate, butylhydroxyanisole, tert-butylhydroquinone and butylhydroxytoluene, because electrochemical behaviour of these analytes is known in glass overflow cell.

Before electrochemical detection was necessary to separate these analytes by HPLC separation on column Lichrospher® RP-18 ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) and gradient elution of mobile phase consisted of increasing methanol content from 55 % to 95 % for 8 minutes, subsequently was this content of methanol held for 2 minutes. Rest of mobile phase was formed by acetate-phosphate buffer at concentration 50 mmol dm^{-3}

and pH = 4.5.

When comparing obtained hydrodynamic voltammograms, there were no significant differences between glass and printed cell. Significant changes were found when comparing the influence of the cell type to the wide of the peak, with almost no effect on the extension compared to the glass cell, where peaks were changed almost by 60%.

Another benefit of the printed cell was the disappearance of the baseline irregularity in the form of an unknown peak, the reduction of noise, and almost the disappearance of drift of the baseline, which led to a reduction of detection limit for BHT from $15.4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ to $5.97 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Seznam použitých zkratek a symbolů

Phe – Fenylalanin

CF – Uhlíková plst

CPE – Uhlíková pastová elektroda

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

FIA – průtoková injekční analýza

PEEK – polyetheretherketon

LOD – limit detekce (limit of detection)

LOQ – limit stanovitelnosti (limit of quantification)

BHA – butylhydroxyanisol

BHT – butylhydroxytoluen

tBHQ – terciární butylhydrochinon

PG – propylgallát

p.a. – pro analýzu

pH – záporný dekadický logaritmus vodíkového exponentu

E – potenciál

I – proud

$c_{\text{Red}}(\text{out})$ – koncentrace redukované formy látky na výstupu z detektoru

$c_{\text{Red}}(\text{in})$ – koncentrace redukované formy látky na vstupu do detektoru

$c_{\text{Ox}}(\text{in})$ – koncentrace oxidované formy látky na vstupu do detektoru

$c_{\text{Ox}}(\text{out})$ – koncentrace oxidované formy látky na výstupu z detektoru

R – stupeň přeměny analytu

I_{lim} – celkový limitní proud

i_{lim} – lokální limitní proud

n – počet vyměňovaných elektronů

F – Faradayova konstanta

Q_V – Objemový průtok

U – Lineární průtok

v – Objemový průtok

A – Plocha průřezu elektrody

L – celková délka elektrody

s – měrná plocha elektrody

a – vnitřní plocha elektrody

m_{Ox} – koeficient převodu hmoty

x – vzdálenost místa od vstupu do elektrody

b – šířka obdélníkového kanálu v detektoru

α (alfa) – koeficient proudění

Obsah

1	Úvod	13
1.1	Cíle práce.....	13
2	Teoretická část	14
2.1	Aminokyseliny	14
2.2	Detekce aminokyselin	16
2.2.1	Princip detekce aminokyselin neelektrochemickými metodami	16
2.2.2	Princip detekce aminokyselin elektrochemickými metodami	17
2.3	Modifikace uhlíkových elektrod	21
2.4	Matematický popis průlinčitých elektrod [28, 40]	23
2.5	Konstrukce průtokových amperometrických detektorů	26
2.6	Geometrie detektorů a elektrod na bázi uhlíkové plsti.....	27
3	Experimentální část	31
3.1	Použité chemikálie	31
3.1.1	Příprava fosfátového pufru	31
3.1.2	Příprava acetátového pufru	31
3.1.3	Příprava roztoků pro elektrochemické nanášení mědi.....	31
3.1.4	Příprava roztoků aminokyselin	32
3.1.5	Příprava suspenze mikročástic mědi.....	32
3.1.6	Příprava ninhydrinového činidla.....	32
3.1.7	Příprava roztoků antioxidantů.....	32
3.1.8	Příprava acetátovo-fosfátového pufru.....	33
3.2	Použitá aparatura a přístroje.....	34
3.2.1	Stanovení aminokyselin na mědi modifikované elektrodě z uhlíkové plsti 34	
3.2.2	Měření na miniaturizované cele.....	34
3.3	Další použité vybavení	34
3.4	Konstrukce miniaturizované cely.....	35
3.5	Modifikace pracovních elektrod.....	35
3.5.1	Modifikace elektrochemickým nanášením mědi	35
3.5.2	Míchání plsti v suspenzi mikrokuliček mědi	36
3.5.3	Kapání suspenze mědi na povrch elektrod.....	36
3.6	Spektrometrické stanovení L-lysinu v reálném vzorku.....	37

4	Výsledky a diskuze.....	38
4.1	Modifikace uhlíkové plsti pomocí mědi a její využití.....	38
4.1.1	Modifikace elektrochemickým nanášením mědi	38
4.1.2	Kapání suspenze měděných mikročástic – proximální strana	40
4.1.3	Míchání plsti v suspenzi mikrokuliček mědi	44
4.1.4	Kapání suspenze - “sandwich”	52
4.1.5	Kapání suspenze – distální strana	60
4.1.6	Stanovení lysinu v reálném vzorku.....	65
4.2	Modifikace rozměrů cely	66
4.2.1	Chromatogramy	67
4.2.2	Hydrodynamické voltamogramy	69
4.2.3	Kalibrační závislosti	72
5	Závěr.....	74
5.1	Modifikace elektrody z uhlíkové plsti.....	74
5.2	Modifikace rozměrů cely	75
6	Seznam použité literatury	76

1 Úvod

1.1 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo modifikování povrchu elektrody z uhlíkové plsti pomocí mědi ať už ve formě kovového povlaku vylučovaného za konstantního potenciálu nebo komerčně dostupných mikročástic nanášených na různé části plsti, aby bylo možné na takové elektrodě detekovat i ty aminokyseliny, které jsou na běžných uhlíkových elektrodách elektrochemicky neaktivní, v tomto případě konkrétně fenylalanin. Samozřejmostí bylo ověření funkčnosti mědí modifikované elektrody na kalibračních závislostech a analýze reálného vzorku.

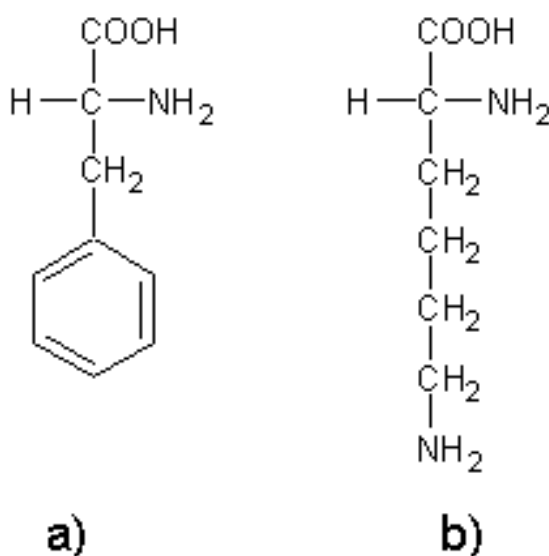
Sekundárním cílem bylo vytvoření takové konstrukce detektoru, která bude co možná nejvíce uživatelsky přívětivá a zároveň bude mít malý vnitřní objem. Nejslibnější metodou pro tento krok bylo, vzhledem k operativnosti úprav, vytištění cely pomocí 3D tiskárny. Chování takto upraveného systému bylo porovnáváno pomocí čtyř syntetických antioxidantů – butylhydroxyanisolu, butylhydroxytoluenu, terciárního butylhydrochinonu a propylgalátu, u kterých je již známé elektrochemické chování v komerční velkoobjemové přepadové cele.

2 Teoretická část

2.1 Aminokyseliny

Stanovení aminokyselin hraje důležitou úlohu téměř ve všech odvětvích lidské činnosti, jelikož se vyskytují ve všech živých organismech, kde se účastní různých biochemických procesů od genové exprese přes homeostázi až po procesy spojené s onemocněními a imunitou [1]. Z tohoto důvodu se stanovení aminokyselin stává důležitou součástí chemických analýz v potravinářství, medicíně a biotechnologii.

Ze strukturního hlediska jsou aminokyseliny látky, které ve své struktuře obsahují amino- a karboxylovou skupinu. V závislosti na pH roztoku a disociačních konstantách těchto skupin jsou pak protonizovány, resp. deprotonovány. Celkem existuje 20 základních proteinogenních aminokyselin. S výjimkou glycinu mají všechny aminokyseliny asymetrický uhlík a na něm navázaný postranní řetězec, který velmi ovlivňuje jejich chemické, biochemické a fyzikální vlastnosti. Z tohoto hlediska lze tedy aminokyseliny rozdělit na 5 základních skupin. Nepochárné s alifatickým řetězcem, kam patří glycin, alanin, prolin, valin, leucin a isoleucin; polárné s nenabitým postranním řetězcem, mezi které se řadí serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin; aminokyseliny s pozitivně nabitým postranním řetězcem, kam spadá lysin, histidin a arginin, a aminokyseliny s negativně nabitým postranním řetězcem, kde se nachází aspartát a glutamát. Poslední skupinou jsou aminokyseliny s aromatickým řetězcem, kde můžeme nalézt fenylalanin, tyrosin a tryptofan [2].



Obr. 2.1.1.: Strukturní vzorec fenylalaninu (a) a lysinu (b)

Pro účely této práce byly jako modelové aminokyseliny vybrány fenylalanin a lysin jejichž struktura je zobrazena na obr. 2.1.1. a základní chemické a fyzikální parametry jsou shrnuty v tabulce 2.1.I.

Jak již bylo řečeno, fenylalanin patří mezi aminokyseliny s aromatickým postranním řetězcem. Z tohoto důvodu je možné jej zařadit také mezi nepolární aminokyseliny. Je využíván jako prekurzor pro syntézu tyrosinu a jiných látek obsahujících aromatický kruh, jako je např. dopamin, epinefrin nebo melanin. Průmyslově se fenylalanin vyrábí mikrobiologickou cestou za pomoci bakterií *Escherichia coli*. V přírodě se běžně vyskytuje v mléce savců. Jeho přebytek v organismu, způsobený nedostatkem enzymu fenylalaninhydroxylázy, který za normálních podmínek katalyzuje přeměnu fenylalaninu na tyrosin, se označuje jako fenylketonurie. Z tohoto důvodu se u novorozenců provádí test právě na hladinu fenylalaninu, jelikož nezachycení této nemoci může vést k poškození mozkové tkáně. Dále je také tato aminokyselina využívána v potravinářství k přípravě umělých sladidel známých pod názvem Aspartam (dipeptid L-fenylalaninu a L-asparagové kyseliny). [3]

Druhým analytem byl lysin, který se řadí mezi bazické aminokyseliny. Tuto aminokyselinu si lidské tělo neumí syntetizovat, proto musí být přijímána v potravě. Mezi organismy, které si tuto aminokyselinu umí syntetizovat samy patří bakterie, houby, některá protista a rostliny. U těchto organismů byly objeveny dvě cesty pro jeho syntézu, tzv. α -aminoadipátová a diaminopimelátová, které vycházejí z L-aspartátu, respektive α -ketoglutarátu. V lidském těle hraje lysin několik důležitých rolí, ze kterých lze jmenovat proteinogenezi, zesíťování kolagenu a vznik karnitinu, který hraje klíčovou roli v metabolismu mastných kyselin. Z těchto důvodů může nedostatek lysinu vést např. k poruchám vzniku pojivových tkání nebo anémii. Na druhé straně přebytek této aminokyseliny, nejčastěji způsobený jejím nedostatečným katabolismem, může vést k neurologickým problémům. [4]

Tabulka 2.1.I.: Chemické a fyzikální parametry fenylalaninu a lysinu

	M_r	pK_1 (COOH) cit. [2]	pK_2 (NH ₃ ⁺) cit. [2]	pK_R (NH ₃ ⁺) cit. [2]	Rozpustnost v 1000 g vody (20 °C)
Lysin	146,19	2,18	8,95	10,53	10 ³ g cit [5]
Fenylalanin	165,19	1,83	9,13	-	13,07 g cit. [6]

2.2 Detekce aminokyselin

V současné době se pro detekci a stanovení aminokyselin elektrochemické metody na uhlíkových elektrodách používají poměrně zřídka, jelikož většina aminokyselin není na tomto materiálu elektrochemicky aktivní, protože nemají ve své struktuře redukovatelnou, případně oxidovatelnou skupinu, a je tedy nutné nějakým způsobem derivatizovat buď analyt nebo elektrodu. Proto se většinou využívají metody jako je UV nebo fluorescenční spektrometrická detekce, vodivostní detekce, měření indexu lomu, ELS detekce nebo hmotnostní spektrometrie, kde není potřeba provádět derivatizace aminokyselin a tím se sníží i možnost vnesení chyby [7]. Principy vybraných detekcí jsou podrobněji rozebrány dále.

2.2.1 Princip detekce aminokyselin neelektrochemickými metodami

2.2.1.1 Detekce pomocí komplexů s kovy

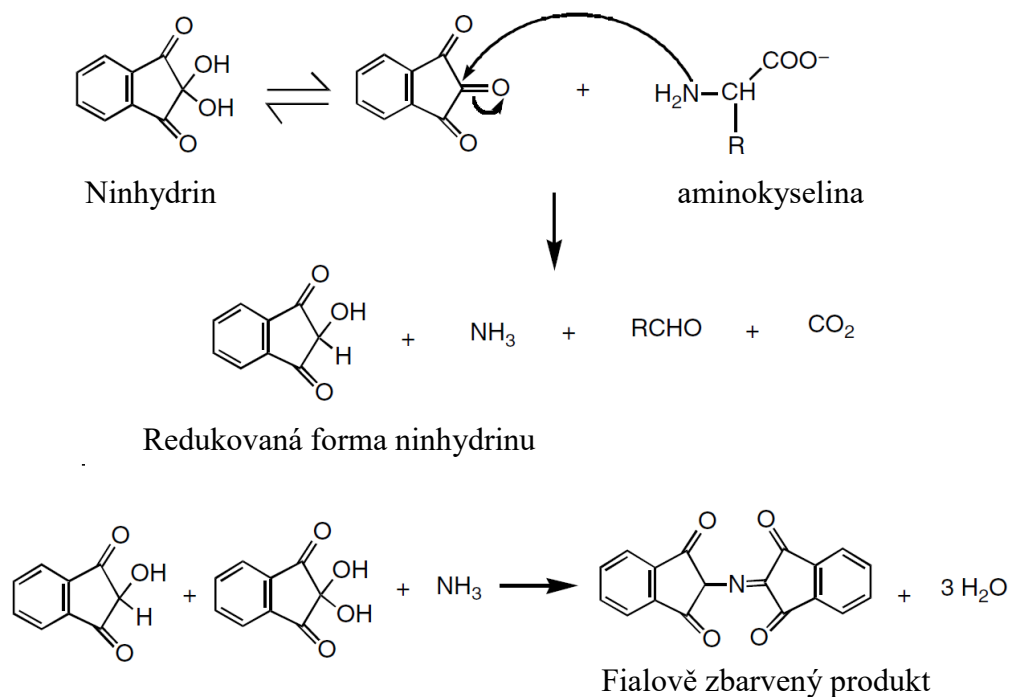
Měď a přechodné kovy obecně jsou ve své iontové formě, díky částečně zaplněnému d-orbitalu, schopné tvořit s aminokyselinami donor-akceptorové vazby. Tato vlastnost je klíčová zejména v různých biologických procesech [8], ale lze ji využít také pro detekci aminokyselin, jelikož tyto komplexy absorbují ve viditelné oblasti spektra v rozsahu 230–250 nm. Výhodou této metody je úplné vynechání časově náročné derivatizace analytů a díky rychlosti reakce vzniku komplexů lze tuto techniku zařadit např. za separační krok a provést tak online detekci. Takový postup již byl ověřen pro detekci alaninu, valinu, leucinu [9] a také všech 20 proteinogenních aminokyselin [10] v HPLC s postkolonovou derivatizací.

2.2.1.2 Detekce aminokyselin ninhydrinovou reakcí

Principem detekce je proběhnutí reakce mezi ninhydrinem a aminokyselinou, která dává fialově zbarvený produkt. Nevýhodou této detekce je velká škála analytů, která s ninhydrinem reaguje. Jako příklad lze uvést primární aminy, sekundární aminy, aminoalkoholy, iminokyseliny nebo amoniak [11].

Ninhydrin z α -aminokyseliny, která zde slouží pro ilustraci mechanismu reakce, odebere dva vodíkové atomy za vzniku α -iminokyseliny a redukované formy ninhydrinu. Tento produkt podléhá následně hydrolýze a vzniká α -ketokyselina a molekula amoniaku. Vzniklá α -ketokyselina poté podléhá dekarboxylaci za vzniku aldehydu a oxidu uhličitého. Redukovaná forma ninhydrinu následně reaguje s uvolněnou molekulou amoniaku a

druhou molekulou ninhydrinu za konečného vzniku fialově zbarvené sloučeniny [12]. Celý proces je schematicky znázorněn na obr. 2.2.1.



Obr. 2.2.1: Schematické znázornění reakce aminokyseliny a ninhydrinu. Převzato a upraveno z cit. [12]

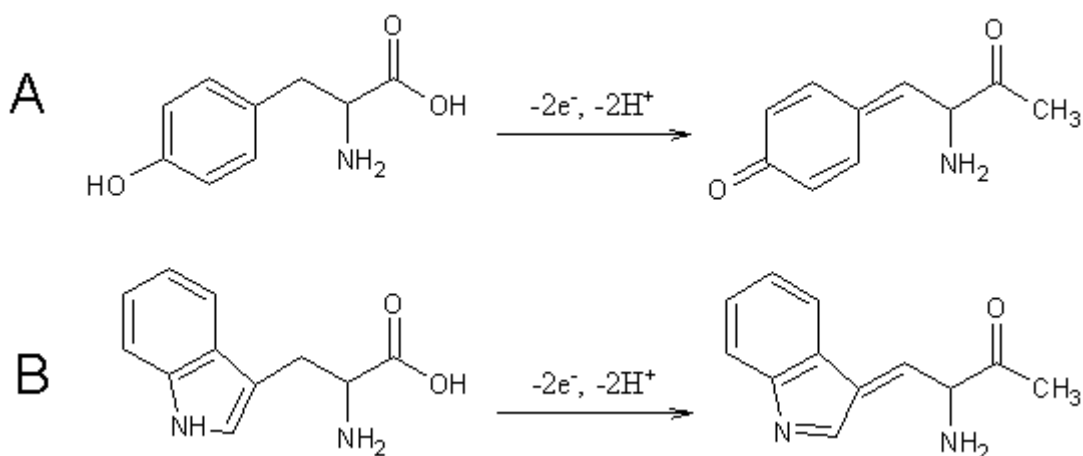
2.2.2 Princip detekce aminokyselin elektrochemickými metodami

Elektrochemická detekce je oproti ostatním jmenovaným méně instrumentačně náročná a vysoce selektivní. Dalšími elektrochemickými metodami pro detekci aminokyselin, které lze využít, jsou různé voltametrické, potenciometrické techniky nebo elektroimpedanční spektroskopie (EIS) [13].

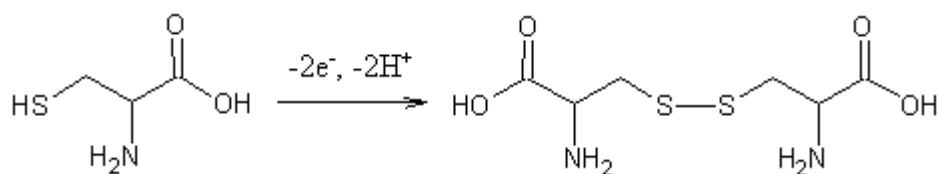
Pro detekci aminokyselin elektrochemickými technikami se nejčastěji využívají kovové elektrody, které jsou často finančně náročné, jelikož se jedná o kovy jako je platina [14], zlato [15] nebo stříbro [16]. Z finančně příznivějších materiálů pak lze využít měď, kobalt nebo nikl [16-18]. Také lze využít různé slitiny těchto kovů – nikl s titanem [19], měď s manganem [20] nebo měď s niklem [7]. Nevýhodou všech pracovních elektrod zhotovených z těchto materiálů je změna jejich geometrie v průběhu měření jelikož dochází k oxidacím povrchu, a s tím související změnou velikosti odezvy [21]. Řešením problému se změnami geometrie elektrody je nanesení tenké vrstvy kovu na uhlíkové materiály jako je skelný uhlík (GC) [22], uhlíkové nanotrubičky [23], uhlíková pasta [17] nebo, v případě této práce, uhlíková plst. Takováto úprava omezí zoxidování jen na tenkou

nanesenou vrstvou, často o tloušťce několika desetin až jednotek mikrometrů a tím se prakticky odstraní problémy se změnami geometrie pracovní elektrody.

Reakce aminokyselin na povrchu elektrod se odvíjí od materiálu elektrod, ze kterého je zhotovena a také od potenciálu na ni vloženém. V principu je možných několik mechanismů, které elektrochemickou detekci aminokyselin umožňují. Jedním z nich je adsorpce aminokyseliny na povrch elektrody a následná přeměna jejího postranního řetězce. Tento způsob detekce je možný jen u tyrosinu, tryptofanu a cysteinu. Tato adsorpce probíhá nejčastěji pomocí karbonylové skupiny. Přeměna postranního řetězce pak probíhá většinou za poskytnutí dvou elektronů, což lze znázornit na mechanismech elektrochemických oxidací tyrosinu (obr. 2.2.2.1A) a tryptofanu (obr. 2.2.2.1B) nebo cysteinu, který elektrochemickou přeměnou přechází na cystin (obr. 2.2.2.2) [24, 25].

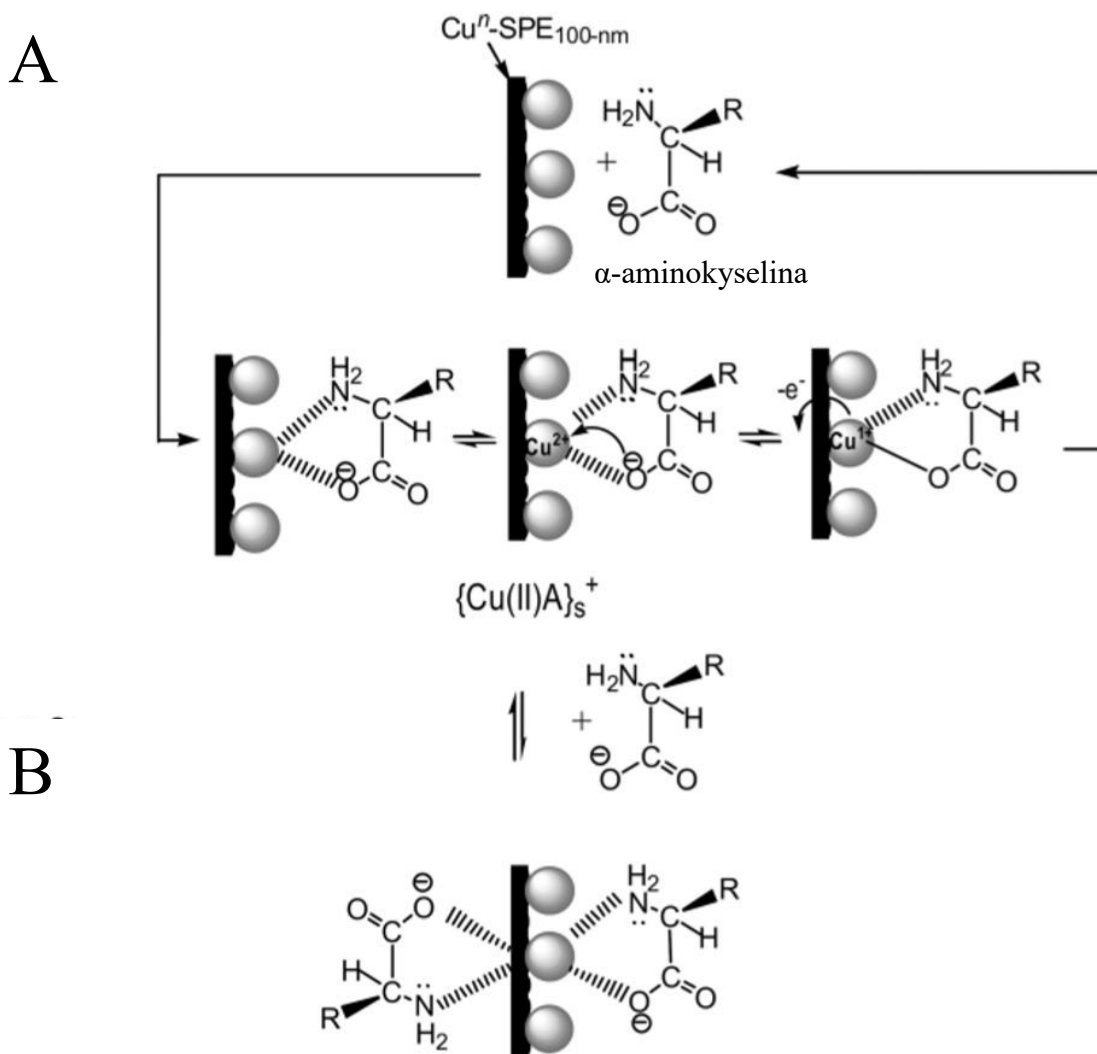


Obr. 2.2.2.1.: Schéma elektrochemické oxidace tyrosinu (A) a tryptofanu (B). Převzato a upraveno z ref. [24].



Obr. 1.2.2.2.: Schéma elektrochemické přeměny cysteinu na cystin. Převzato a upraveno z ref. [25].

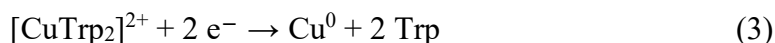
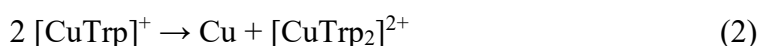
Druhou možností je komplexační reakce aminokyseliny s kovem na povrchu elektrody [13, 18]. Tato reakce může probíhat až do druhého stupně, ale elektrochemicky využitelná je pouze reakce do stupně prvního, kde následně dochází k redukci měďnatých iontů na měďné, jak je vidět na obr. 2.2.2.3.



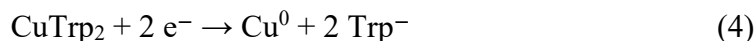
Obr. 2.2.2.2: Schéma komplexačního mechanismu do prvního (A) a do druhého stupně (B) aminokyseliny na povrchu uhlíkové sítotiskové elektrody modifikované mědi. Převzato a upraveno z ref. [26].

V prvním kroku jsou na povrchu elektrody z kovové mědi elektrochemicky generovány měďnaté ionty, které podléhají komplexační reakci v bazickém prostředí s jednou molekulou aniontu aminokyseliny. Dále vzniká, za přenosu záporného náboje mezi karboxylovým kyslíkem aminokyseliny a měďnatým iontem, kovalentní vazba a zároveň je měďnatý iont redukován na měďný. Vzniklý měďný iont je nakonec elektrochemicky regenerován na měďnatý, dojde k uvolnění aminokyseliny a celý proces detekce se opakuje (obr. 2.2.2.3A). V případě, že koncentrace aminokyseliny ve vzorku je vyšší než koncentrace mědi na povrchu elektrody, dochází ke komplexaci druhé aminokyseliny do komplexu $[\text{CuA}]^+$ za vzniku komplexu $[\text{CuA}_2]$ (obr. 2.2.2.3B). V tomto případě již nedochází k elektrochemické redukci mědi aminokyselinou a ta tedy není detekována [26].

Obdobně jako v předchozím případě je popsán vznik komplexu tryptofanu s ionty kovu v roztoku. Nevýhodou tohoto způsobu jsou odlišnosti v reaktivitě v kyselém a v zásaditém prostředí. Principem detekce například tryptofanu pomocí iontů mědi v kyselém prostředí je vznik komplexu jednomocné mědi s tryptofanem dle rovnice (1), který se v roztoku vyskytuje ve formě $[\text{CuTrp}]^+$. Tento komplex samovolně přechází podle rovnice (2) na komplex tryptofanu s dvojmocnou mědí. Nakonec dojde k nepřímé detekci aminokyseliny díky elektrochemické redukci dvojmocné mědi na její kovovou formu, viz rovnice (3) [27].

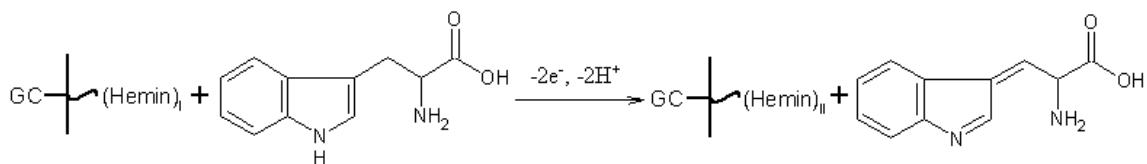


V bazickém prostředí je principem detekce oxidace tryptofanu dle rovnice (4), které předchází vznik komplexu CuTrp_2 .



Třetím možným principem detekce aminokyseliny pomocí iontů kovů je urychlení tvorby měďnatých iontů na povrchu elektrody v případě, že dojde k zakomplexování již vytvořených měďnatých iontů s aminokyselinou, tak, aby byla stále udržována rovnováha mezi atomární a iontovou formou kovu [28].

V poslední variantě může reagovat kov vázaný v organické sloučenině [29]. Takovým případem je například využití heminu, v jehož struktuře se nachází ion železa, který lze využít jako redoxní mediátor. V případě, že se k povrchu takto modifikované elektrody přiblíží aminokyselina, dojde k redukci trojmocného iontu železa na jeho dvojmocnou formu a zároveň k oxidaci aminokyseliny, v tomto případě tryptofanu (obr. 2.2.2.4).



Obr. 2.2.2.4: Mechanismus detekce tryptofanu na heminem modifikované uhlíkové elektrodě. Převzato a upraveno z ref. [29].

2.3 Modifikace uhlíkových elektrod

Aby bylo možné elektrochemicky detekovat i ty aminokyseliny, které nejsou elektrochemicky aktivní nebo je za potřeby pro jejich detekci velmi vysokých nebo naopak nízkých potenciálů (např. fenylalanin), je nutné upravit povrch elektrody tak, aby se umožnila výměna elektronů mezi modifikátorem naneseným na původním materiálu elektrody a analytem a aby tuto výměnu bylo možno pozorovat a kvalitativně a kvantitativně ji využít. Nejjednodušší metodou, jak elektrody upravit, je nanesení částic kovů přímo na jejich povrch klasickými galvanostatickými nebo potenciostatickými metodami z roztoků těchto kovů. Tyto metody byly použity k modifikování elektrod ze skelného uhlíku, na které byly, po vyleštění elektrody aluminou, při konstantním potenciálu $-0,20\text{ V}$ vylučovány nanočástice zlata z $2,0 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$ roztoku kyseliny chlorozlatité [30]. Obdobnou modifikací elektrody je prvotní nanesení uhlíkových nanotrubiček na vyleštěný povrch elektrody ze skelného uhlíku následované potenciostatickým vyloučením nanočástic zlata z roztoku kyseliny chlorozlatité o koncentraci $0,2\text{ g dm}^{-3}$ [15]. Obě takto připravené elektrody byly použity ke stanovení tryptofanu. Vzhledem k poměrně finanční náročnosti příprav elektrod modifikovaných zlatými nanočásticemi jsou častými použitými kovy nikl, jehož nanočástice jsou na povrch uhlíkových nanotrubiček nanášeny za konstantního potenciálu $-1,5\text{ V}$ z roztoku síranů o koncentraci $4,0 \times 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ [18]. Další možností je použití $0,1\text{ mol l}^{-1}$ roztoku chloridu kobaltnatého pro nanesení nanočástic oxidu kobaltnato-kobaltnatého na povrch vyleštěné elektrody ze skelného uhlíku ošetřené vrstvou grafénu. Tyto nanočástice byly na povrch vylučovány za použití potenciálu v rozsahu $-0,8$ až $1,2\text{ V}$ [31]. Posledním vybraným kovem je měď, jejíž nanočástice se využívají zejména pro modifikaci elektrod určených k detekci a stanovování sacharidů [32, 33], ale své uplatnění našla i ve spojení s aminokyselinami. Příkladem může být elektroda z uhlíkového filmu potažená vrstvou kovové mědi získané její potenciostatickou depozicí při potenciálu $-0,4\text{ V}$ z $3,0 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ roztoku síranu měďnatého v prostředí kyseliny sírové [27] nebo uhlíková síťotisková elektroda s nanoklastry mědi, které se připravují za konstantního potenciálu $-1,0\text{ V}$ ze směsného roztoku síranu měďnatého a síranu sodného [23].

Další možností je nanést nejdříve polymerní nebo kopolymerní film a následně na něj nanést kov ve formě nanočástic nebo oxidů. Tento způsob umožňuje snadnější kontrolu míry povrchové úpravy a tím zvyšuje reprodukovatelnost mezi jednotlivě připravenými

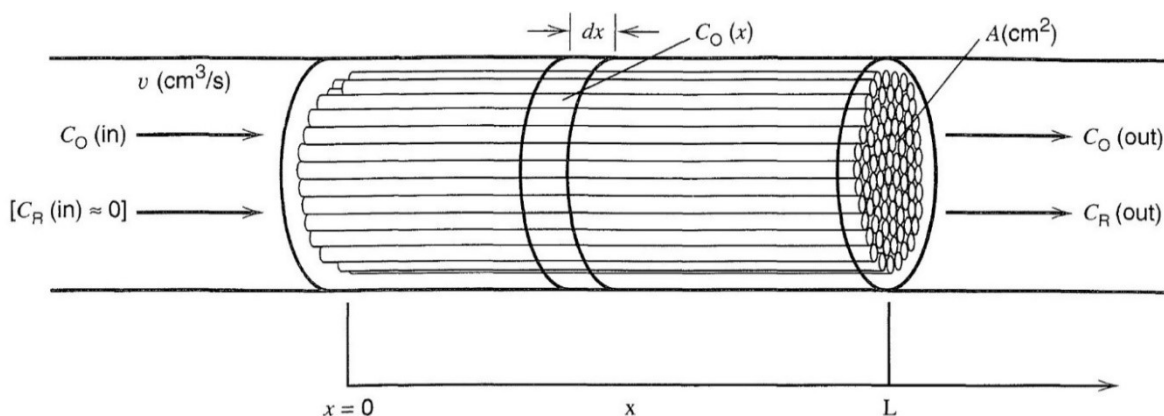
elektrodami. Příkladem takového postupu je vytvoření vrstvy poly-terthiofenkarboxylové (poly-TTCA) kyseliny na elektrodě ze skelného uhlíku z roztoku jejího monomeru za použití cyklické voltametrie v rozsahu 0,0 V až 1,6 V. Potřebné kovové ionty, v tomto případě měděné, jsou nanášeny z roztoku využitím komplexační reakce mezi poly-TTCA a síranem měďnatým [34]. Obdobným způsobem přípravy modifikované elektrody je elektrochemické nanášení vrstvy polyanilinu na elektrodu ze skelného uhlíku aplikováním cyklické voltametrie v rozsahu -0,1 V až 1,1 V na roztok anilinu. Polymerní film je následně vystaven působení roztoku chloridu měďnatého, ze kterého jsou do filmu zakomplexovány měďnaté ionty a ty se poté při konstantním potenciálu -0,3 V převedou na kovovou měď [35]. Dalšími polymery, které lze využít v kombinaci s kovy, jsou například polymethylvioleť s platinou [36] nebo polypyrrol s mědí, niklem nebo kobaltem [37].

Poslední možností je použití filmu pouze z nanášených organických molekul, které slouží jako zprostředkovatel redoxní reakce. Tento film může být tvořen například 4-aminobenzoovou kyselinou, která se na povrch elektrody ze skelného uhlíku, po jejím předchozím vyleštění a aktivování v kyselině sírové, nanáší pomocí cyklické voltametrie v rozpětí potenciálů -1,5 V až +2,5 V [38]. Další možností je nanášení iontově výměnné membrány, která má za účel zvýšit selektivitu a citlivost elektrody vůči analytu. V takovém případě lze použít například Nafion[®], který se na elektrodu ze skelného uhlíku nanese pouhým omytím v jeho roztoku a odpařením rozpouštědla na vzduchu. Takto připravená elektroda poskytuje dobrou selektivitu pro tryptofan v kyselém prostředí s melatoninem a dopaminem [39].

V případě uhlíkových pastových elektrod není potřeba provádět depozici kovu na povrch elektrody, ale stačí kov, případně jeho oxid, vmíchat do připravované pasty. Příkladem může být příprava uhlíkové pastové elektrody se zakomponovanými oxidy mědi, niklu, kobaltu, olova nebo stříbra pro detekci argininu, histidinu, glycinu, lysinu, cysteinu a cystinu v kapilární elektroforéze [17].

2.4 Matematický popis průlinčitých elektrod [28, 40]

Pro zjištění, jak se s velikostí uhlíkové plsti vyvíjí limitní proud, jaká je minimální potřebná velikost uhlíkové plsti, aby elektrochemická detekce probíhala, pokud možno se stoprocentní účinností a zároveň jak je velikost proudu tekoucího elektrodou závislý na průtoku kapaliny, je potřeba si tento systém popsat matematicky. Za tímto účelem se průlinčité elektrody, kam se řadí i elektroda z uhlíkové plsti, zjednodušují na systém rovnoběžných válcovitých kanálků o stejném průměru a délce, kterými právě protéká analyt, viz. Obr. 2.5.1.



Obr. 2.5.1.: Schématické znázornění uhlíkové plsti pro potřeby jejího matematického popisu. Převzato a upraveno z ref. [40]

Pro matematické popsání tohoto systému je potřeba zavést několik předpokladů, které popis značně zjednodušují. Prvním z nich je předpoklad, že elektrochemická přeměna analytu je řízena pouze transportem hmoty. Dalším je předpoklad zanedbatelného ohmického poklesu napětí v roztoku a v pórech elektrody. Třetím je předpoklad průběhu reakce za limitního proudu a posledním je předpoklad průběhu pouze jedné reakce na elektrodě [28].

Základní úvahou je představa plstěné elektrody jako válce o válcovité ploše průřezu s plochou A (cm^2), jejíž délkou L (cm), protéká proud kapaliny objemovou rychlostí v ($\text{cm}^3 \text{ s}^{-1}$). Námí potřebný lineární průtok U (cm s^{-1}) lze z těchto hodnot zjistit pomocí vztahu

$$U = \frac{v}{A}$$

Pokud budeme tedy předpokládat, že reakce $Ox + ne^- \rightarrow Red$ na elektrodě probíhá se stoprocentní proudovou účinností, bude koncentrace látky ve svém oxidované formě na vstupu do elektrody rovna $c_{Ox}(in)$ a koncentrace v redukované formě na výstupu bude rovna $c_{Red}(out)$. Na základě tohoto lze definovat stupeň přeměny R jako poměr oxidované formy na vstupu a redukované formy na výstupu

$$R = \frac{c_{Red}(out)}{c_{Ox}(in)}$$

Jednoduchou matematickou úvahou lze vyjádřit koncentrace redukované a oxidované formy na výstupu jako

$$c_{Red}(out) = c_{Ox}(in) \cdot R$$

$$c_{Ox}(out) = c_{Ox}(in) \cdot (1 - R)$$

Za opětovného využití předpokladu stoprocentní proudové účinnosti a za vzniku celkového limitního proudu I_{lim} , lze celkovou přeměnu látky vyjádřit pomocí

$$c_{Ox}(in) \cdot R = \frac{I_{lim}}{nF}$$

nebo za využití objemového průtoku kapaliny jako

$$c_{Ox}(in) \cdot R = \frac{I_{lim}}{nFv}$$

což lze upravit a získat vztah pro stupeň konverze ve tvaru

$$R = \frac{I_{lim}}{nFvc_{Ox}(in)}$$

Dále je potřeba definovat měrnou plochu elektrody s (cm^{-1}), kdy se vychází z vnitřního povrchu elektrody a (cm^2), celkového objemu elektrody V (cm^3) a za použití vztahu pro výpočet objemu válce z obsahu plochy podstavy A a jeho délky L (cm), se získá vztah

$$s = \frac{a}{A \cdot L}$$

Další úvahou je kontinuální pokles koncentrace oxidované formy látky s rostoucí uraženou vzdáleností od vstupu do elektrody (kde $x = 0$), z čehož lze usoudit, že limitní proudová hustota v daném místě $i_{lim}(x)$ se bude odvíjet od hodnoty x . Pro výpočet $i_{lim}(x)$ platí

$$i_{lim}(x) = nFm_{Ox}c_{Ox}(x)$$

kde m_{Ox} je koeficient převodu hmoty.

Změna koncentrace látky ve vzdálenosti x od vstupu do elektrody je dána vztahem

$$-dc_{Ox}(x) = \frac{i_{lim}(x) sA dx}{nFv}$$

Kombinací těchto dvou rovnic, lze získat vztah

$$-\frac{dc_{\text{Ox}}(x)}{dx} = \frac{m_{\text{Ox}}c_{\text{Ox}}(x) sA}{v}$$

A následnou integrací této rovnice od vstupu látky do elektrody po vzdálenost x získáme

$$\int_{c_{\text{Ox}}(\text{in})}^{c_{\text{Ox}}(x)} \frac{dc_{\text{Ox}}(x)}{c_{\text{Ox}}(x)} = \frac{-m_{\text{Ox}} sA}{v} \int_0^x dx$$

$$c_{\text{Ox}}(x) = c_{\text{Ox}}(\text{in}) \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sA}{v} x\right)$$

Kombinací této rovnice a rovnice pro limitní proudovou hustotu v daném místě lze získat vztah pro výpočet limitní proudové hustoty ve vzdálenosti x od vstupu do elektrody ve znění

$$i_{\text{lim}}(x) = nFm_{\text{Ox}}c_{\text{Ox}}(\text{in}) \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sA}{v} x\right)$$

Pro výpočet celkového limitního proudu, tekoucího elektrodou je potřeba integrovat rovnici pro lokální limitní proud přes celou délku elektrody, čímž se získá vztah

$$I_{\text{lim}} = \int_0^L i_{\text{lim}}(x) sA dx = nFm_{\text{Ox}}c_{\text{Ox}}(\text{in}) sA \int_0^L \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sA}{v} x\right) dx$$

$$I_{\text{lim}} = nFc_{\text{Ox}}(\text{in}) v \left[1 - \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sAL}{v}\right)\right]$$

Kombinací této rovnice s rovnicí $R = \frac{I_{\text{lim}}}{nFvc_{\text{Ox}}(\text{in})}$ se získá vztah

$$R = 1 - \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sAL}{v}\right)$$

Dále se dosazením vztahu $m_{\text{Ox}} = bU^\alpha$, který popisuje závislost koeficientu převodu hmoty na velikosti lineárního proudění a koeficientu α definujícího, jestli je proudění laminární nebo turbulentní, získá vztah

$$R = 1 - \exp(-bU^{\alpha-1}sL)$$

Na základě tohoto vztahu lze určit, že stupeň konverze exponenciálně vzrůstá s klesající rychlostí proudění kapaliny a zároveň vzrůstá do určitého bodu i s rostoucí velikostí elektrody.

Ze vztahu $R = 1 - \exp\left(\frac{-m_{\text{Ox}} sAL}{v}\right)$ lze vyjádřit L a získat tak vztah potřebný ke zjištění potřebné délky elektrody k zajištění, pokud možno, stoprocentnímu nebo této hodnotě se blížícímu stupni konverze.

$$L = -\frac{v}{m_{\text{Ox}}sA} \ln(1 - R)$$

2.5 Konstrukce průtokových amperometrických detektorů

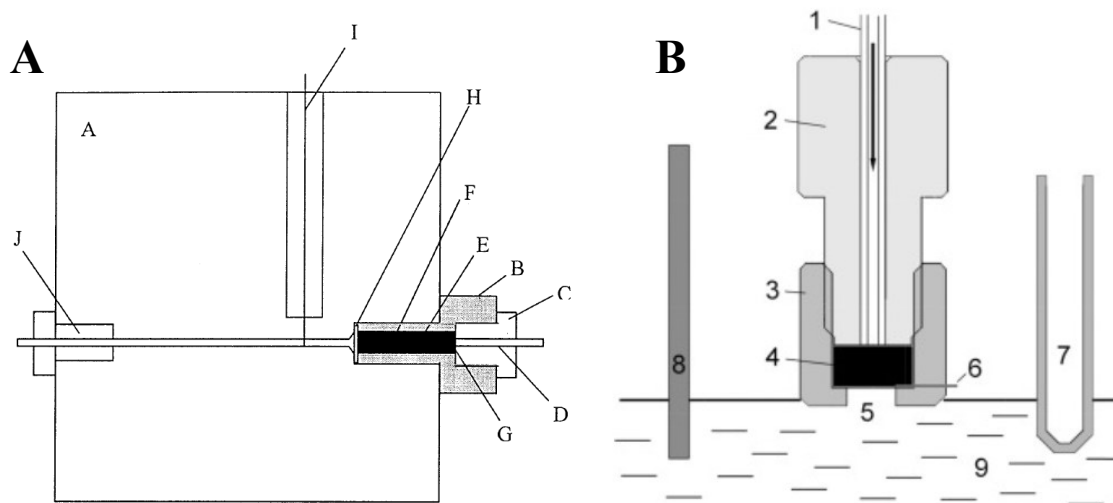
V průtokových metodách lze využít několik možností zapojení pracovní elektrody vůči kapiláře, ve které proudí elektrolyt a vůči ostatním elektrodám, tj. pomocné a referenční. Jako příklad lze jmenovat wall-jet zapojení, tubulární elektrody, cylindrické elektrody, nebo v našem případě průlinčité zapojení elektrody. Každé z těchto zapojení má své výhody a zároveň své limity. Ať se již jedná o limity fyzické, kam se řadí možnost úpravy elektrod do požadovaných tvarů a velikostí, nebo o limity parametrické, ze kterých lze jmenovat poměr signál/šum nebo rozmývání zón, které v detekci v průtokových metodách často tvoří poměrně velké problémy. Průtokové zapojení elektrod má ale oproti vsádkovému zapojení také nesčetné výhody například v podobě neustálého odmyvání produktů elektrochemické reakce z pracovní elektrody a tím dochází částečně k jejímu čištění. Dále také rychlejší odezva na analyt, jelikož je k povrchu elektrody dopravován také konvekcí, a ne pouze difuzí, což umožňuje dosáhnout nižších limitů detekce [41].

Jak již bylo naznačeno, jedním z hlavních problémů elektrochemické detekce, a všech detekcí obecně, v průtokových metodách je rozmývání zón. Tomuto jevu lze zabránit, nebo ho alespoň omezit, zmenšením objemu detektoru. Obecně platí, aby rozmytí zóny analytu vlivem průchodu detektorem bylo menší než 2 %, musí být vnitřní objem detektoru menší než 10 % z celkového objemu píku [42]. Možnost zmenšení detektoru je v elektrochemii poměrně limitována možnostmi elektrod, které se musí do měrné cely vejít. Zároveň musí být splněna podmínka homogenního elektrického pole mezi pracovní a referenční elektrodou, čehož se dosáhne umístěním těchto elektrod co možná nejbliže sobě. Obdobná podmínka platí pro umístění pomocné elektrody co nejbliže pracovní, aby se omezil potenciálový a napěťový spád mezi nimi [43]. Na druhou stranu mohou produkty vzniklé na pomocné elektrodě ovlivnit odezvu pracovní elektrody, proto by v ideálním případě měly tyto elektrody být od sebe oddělené polopropustnou membránou, která by měla tomuto jevu zabránit [43]. Tento fakt jde ovšem proti potřebám miniaturizace detektoru, jelikož umístění membrány mezi elektrody vyžaduje určitý prostor. Případně lze tedy pomocnou a referenční elektrodu umístit po proudu kapaliny od pracovní elektrody, takže případné vedlejší produkty vzniklé na pomocné elektrodě, nebo únik roztoku z referenční elektrody neovlivní detekci [42]. V neposlední řadě je při konstrukci elektrochemického detektoru potřeba myslet na uživatelskou nenáročnost, tj. jednoduché čištění, výměnu a zapojení [44]. Často je proto potřeba volit kompromis mezi nároky na elektrochemický detektor, rozmytí zón analytů a uživatelskou přívětivostí.

2.6 Geometrie detektorů a elektrod na bázi uhlíkové plsti

V posledních pár letech se uhlíková plst jako elektrodový materiál těší velké oblibě, zejména v analytické chemii, elektro-energetických technologiích nebo elektro-syntézách [45-52]. Každá aplikace uhlíkové plsti využívá odlišné uspořádání elektrochemické cely. Mezi nejčastěji používaná uspořádání v průtokových metodách patří průlinčité (flow-through) [46-48], obtokové (flow-by) [48, 49] a bezmembránové (membrane free) [50], dále jsou také možná využití ve vsádkových zapojeních [51, 52]. V následujících řádcích jsou jednotlivá zapojení popsána podrobněji.

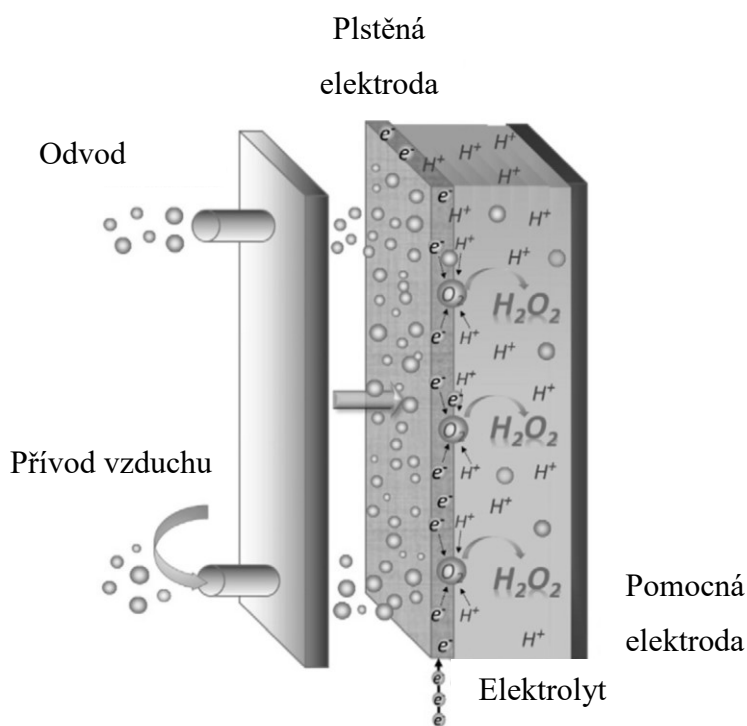
Průlinčité uspořádání využívá plochu celé plsti, jelikož elektrolyt proudí celým jejím objemem, jak je vidět na obr. 2.7.1, kdy v obou znázorněných případech je přívodní kapilára přivedena k jednomu konci elektrody tak, aby nedošlo ke kontaminaci pracovní elektrody produkty vedlejších elektrodových reakcí a zároveň se minimalizovalo rozmytí zón. Toto zapojení se využívá zejména pro analytická měření v amperometrickém, resp. coulometrickém zapojení, kdy právě kontakt s velkou plochou elektrody umožňuje vysoká procenta konverze.



Obr. 2.7.1.: Schematická znázornění průlinčitých zapojení uhlíkové plsti ve dvojelektrodovém (A) (převzato z cit. [46]) a tříelektrodovém uspořádání (B) (převzato z cit. [47])

A – Perspexový blok, B – nerezové šroubení, C – šroubení se vstupní kapilárou, D – elektrický kontakt k pracovní elektrodě, E – uhlíková plst, F – membránový filtr millipore, G – gumová podložka, H – nylonová síťka, I – platinová referenční elektroda, J – šroubení s výstupní kapilárou; 1 – Vstupní kapilára, 2 – šroub s plochou ferulí, 3 – čepička, 4 – uhlíková plst, 5 – výstupní otvor, 6 – platinový elektrický kontakt, 7 – referenční elektroda, 8 – pomocná elektroda, 9 – elektrolyt

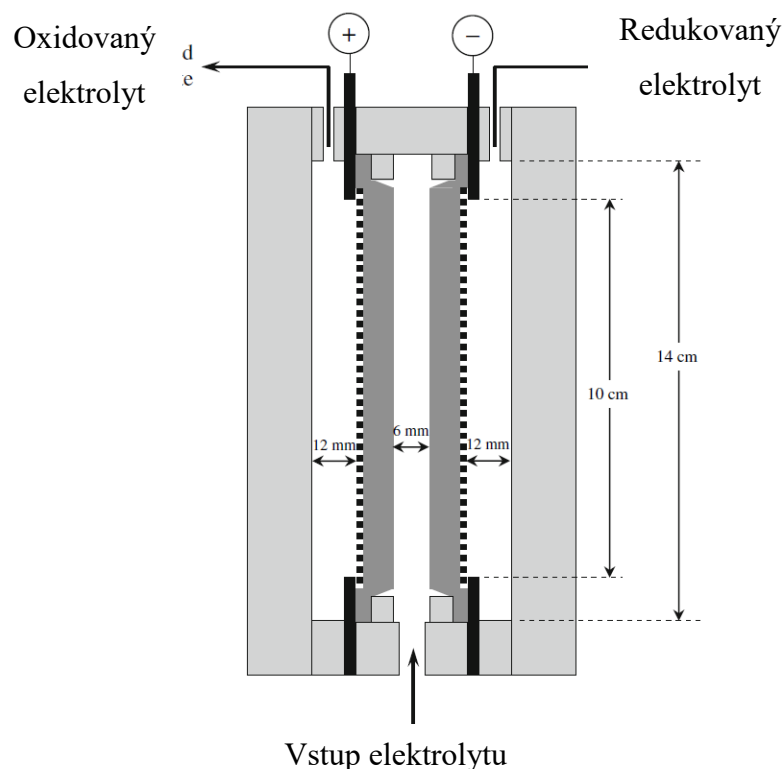
Principem obtokového (flow-by) uspořádání je pouze kontakt elektrolytu a pracovní elektrody. Většinou se takové uspořádání používá v případech, kdy je nutné sytit elektrolyt v kontaktu s pracovní elektrodou plynem, aby mohla následná reakce probíhat s co možná největší účinností. Příkladem může být řízená degradace organických polutantů pomocí elektrochemické Fentonové reakce [48], nebo in-situ generování peroxidu vodíku [49]. Uspořádání takové elektrochemické cely je znázorněno na obr. 2.7.2., kde je vidět přívod a odvod vzduchu, kterým se sytí roztok v těsném okolí elektrody, na stranu uhlíkové plsti odvrácenou od roztoku.



Obr. 2.7.2.: Zobrazení elektrochemické cely s uhlíkovou plstí v obtokovém zapojení.

Převzato a upraveno z cit. [49].

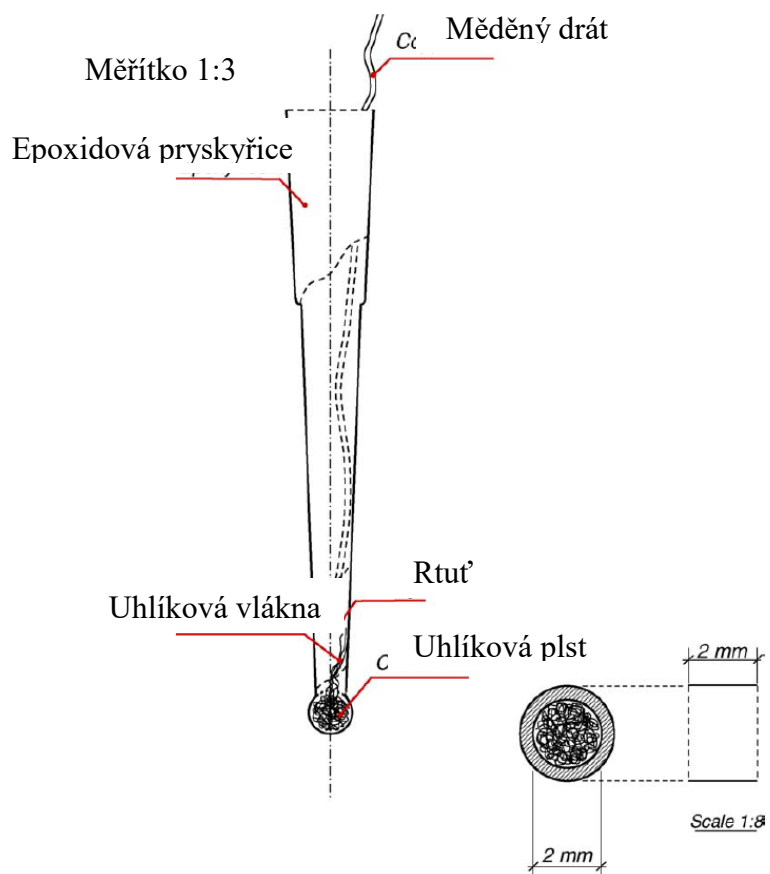
Posledním zmíněným zapojením uhlíkové plsti v průtokových metodách je takzvané bezmembránové (membrane free) zapojení. Tento typ cely je velmi podobný průlinčitému uspořádání, jelikož i zde je elektrolyt protlačován skrz pracovní elektrodu. Rozdílem zde je, že uhlíková plst je zapojena jako anoda i katoda. Toto zapojení se využívá k elektrochemické přípravě a separaci látek v jednom kroku. Jak je znázorněno na obr. 2.7.3., do spodní části prostoru mezi plstěnými elektrodami je vháněn směsný roztok elektrolytů, který je protlačován elektrodami, kde probíhá konverze a následně jsou produkty ihned odčerpávány [50].



Obr. 2.7.3.: Schematické znázornění bezmembránového zapojení elektrod z uhlíkové plsti.

Převzato a upraveno z cit. [50]

Jak již bylo zmíněno, lze nalézt několik prací, kdy je uhlíková plst využívána jako elektrodový materiál pro elektrody ve vsádkovém uspořádání. V takových případech lze jako tělo elektrody použít pipetovací špičku, viz obr. 2.7.4., kdy je k užšímu konci špičky přichycena uhlíková plst a elektrický kontakt je k ní přiveden pomocí rtuti. Takto připravená elektroda je v širším konci špičky následně uzavřena epoxidovou pryskyřicí. Tento koncept elektrody byl otestován na voltametričném stanovení fenolických endokrinních disruptorů [51]. Nejjednodušším zapojením uhlíkové plsti pro vsádkové metody je její prosté zavěšení na háček z platinového drátku, který zároveň slouží jako elektrický kontakt. Toto zapojení bylo využito pro analýzu stříbra pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie [52].



Obr.: 2.7.4.: Schematické znázornění pletěné elektrody v pipetovací špičce pro voltametrická měření. Převzato a upraveno z cit. [51]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Příprava fosfátového pufru

Kyselá složka pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odvážením potřebného množství dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema, Česká republika) a jeho rozpuštěním v deionizované vodě.

Alkalická složka pufru také o koncentraci $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odpipetováním potřebného množství roztoku hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytical, Německo)

a doplněním deionizovanou vodou na potřebný objem.

Výsledný pufr byl připraven titrováním kyselé složky pufru složkou zásaditou na potřebné pH.

3.1.2 Příprava acetátového pufru

Kyselá složka pufru o koncentraci $4,0 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odpipetováním potřebného kyseliny octové (99 %, p.a., Lachner, Česká republika) a jeho rozpuštěním v deionizované vodě.

Alkalická složka pufru také o koncentraci $4,0 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odpipetováním potřebného množství roztoku hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytical, Německo) a doplněním deionizovanou vodou na potřebný objem.

Výsledný pufr byl připraven titrováním kyselé složky pufru složkou zásaditou na $\text{pH} = 5,5$.

3.1.3 Příprava roztoků pro elektrochemické nanášení mědi

Směsný roztok síranu měďnatého o koncentraci 10 mmol dm^{-3} a síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven navážením potřebného množství pevného pentahydrátu síranu měďnatého (p.a., Lach-Ner, Česká republika) a síranu sodného (p.a., Lach-Ner, Česká republika) a jejich rozpuštěním v deionizované vodě.

Roztok síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven navážením potřebného množství pevného síranu sodného (p.a., Lach-Ner, Česká republika) a jeho rozpuštěním v deionizované vodě.

3.1.4 Příprava roztoků aminokyselin

Zásobní roztok fenylalaninu o koncentraci $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven odvážením jeho potřebného množství a následným rozpuštěním v potřebném objemu kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$. Zásobní roztok lysinu byl připraven odvážením jeho potřebného množství a rozpuštěním v deionizované vodě.

Roztoky aminokyselin používané k měření byly připraveny naředěním zásobních roztoků na požadovanou koncentraci fosfátovým pufrem o $\text{pH} = 6,80$ [53].

3.1.5 Příprava suspenze mikročástic mědi

Příprava suspenze mikročástic byla převzata a lehce upravena pro potřeby této práce z cit. [54]. Potřebná navážka mikročástic mědi (99 %, sférický prach, průměr částic 14-25 μm , Sigma-Aldrich, USA) byla po dobu 45 vteřin aktivována v roztoku kyseliny dusičné (65 %, čistá, Lach-Ner, Česká republika) o koncentraci $0,08 \text{ mol dm}^{-3}$. Například na navážku 0,90 g mikročástic mědi bylo použito 3,5 ml ředěné kyseliny dusičné. Po uplynutí této doby byla takto připravená suspenze naředěna deionizovanou vodou, aby došlo k zastavení reakce mezi mikročásticemi mědi, respektive oxidy na jejich povrchu, a kyselinou dusičnou. Objem přidané deionizované vody byl takový, aby poměr mikročástic mědi ku celkovému objemu suspenze byl 1 ku 10.

3.1.6 Příprava ninhydrinového činidla

Ninhydrinové činidlo bylo připraveno dle již dříve popsaného postupu [55]. Pro potřeby této práce bylo upraveno pouze množství připraveného činidla.

Bylo naváženo 1,50 g ninhydrinu (Lachema, Česká republika) a 19 mg chloridu cínatého (BDH Chemicals, Velká Británie). Obě tyto látky byly rozpuštěné v 50 ml směsného rozpouštědla sestávajícího z dimethylsulfoxidu (Lachema, Česká republika), deionizované vody a acetátového pufru o $\text{pH} = 5,5$ a koncentraci 4 mol dm^{-3} v objemovém poměru 2:1:1. Takto připravený roztok ninhydrinu byl uchováván v tmavé skleněné lahvi se zábrusovou zátkou a použit v den přípravy.

3.1.7 Příprava roztoků antioxidantů

Zásobní roztoky antioxidantů o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ byly připraveny navážením potřebného množství propylgallátu (Sigma-Aldrich), terciárního butylhydrochinonu (97 %, Sigma-Aldrich), butylhroxyanisolu ($\geq 98,5 \%$, Sigma-Aldrich) a butylhydroxytoluenu

(≥ 99 %, Sigma-Aldrich) na analytických vahách a následným převedením navážky do odměrné baňky a jejím rozpuštěním v methanolu. Takto připravené roztoky byly uchovávány v chladničce.

Roztoky používané k měření a sestrojení kalibračních křivek byly připravovány odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku a doplněním po rysku směsí methanol:deionizovaná voda (1:1, v/v).

3.1.8 Příprava acetátovo-fosfátového pufru

Kyselá složka pufru byla připravena odpipetováním potřebného množství kyseliny octové (99 %, p.a., $\rho = 1,05 \text{ g cm}^{-3}$, Lach-Ner, Česká republika) a kyseliny o-fosforečné (85 %, p.a., $\rho = 1,70 \text{ g cm}^{-3}$, Lach-Ner, Česká republika) pro požadovanou koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem.

Alkalická složka pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odměřením potřebného množství roztoku hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytica, Německo) a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem.

Výsledný pufr byl připraven titrováním kyselé složky složkou zásaditou na $\text{pH} = 4,5$.

3.2 Použitá aparatura a přístroje

3.2.1 Stanovení aminokyselin na mědi modifikované elektrodě z uhlíkové plsti

Pro průtoková měření byla použita sestava skládající se z degasseru DG 4014 (Ecom, Česká republika), lineární pumpy HPP 5001 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) a šesticestného dávkovacího ventilu (Rheodyne, USA) se smyčkou o objemu 20 μ l.

Jako detektor byl použit ADLC 1 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) pracující v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla mědi modifikovaná elektroda z uhlíkové plsti, referenční elektrodou byla argentchloridová elektroda (3M KCl) a pomocnou byla platinová elektroda (obě Monokrystaly Trutnov, Česká republika).

3.2.2 Měření na miniaturizované cele

Pro měření na miniaturizované cele ve spojení s HPLC separací byla použita sestava skládající se z degasseru DG 4014 (Ecom, Česká republika), gradientové pumpy Beta (Ecom, Česká republika) a šesticestného dávkovacího ventilu (Rheodyne, USA) se smyčkou o objemu 20 μ l. Jako kolona zajišťující separační krok byla použita Lichrospher® RP-18 (125 \times 4 mm, 5 μ m).

Jako detektory byly použity UV/VIS detektor Sapphire (Ecom, Česká republika) a ADLC 1 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) pracující v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla elektroda z uhlíkové plsti, referenční elektrodou byla argentchloridová elektroda (3M KCl) a pomocnou byla platinová elektroda (obě Monokrystaly Trutnov, Česká republika).

3.3 Další použité vybavení

Spektrofotometr: Specord 210 plus (AnalytikJena, Německo)

pH metr: digitální měřící přístroj Conductivity and pH meter 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK)

Magnetická míchačka: Magnetic stirrer MS 3000 (Biosan, Litva)

Ultrazvuková lázeň: PS 02000A (Powersonic, USA)

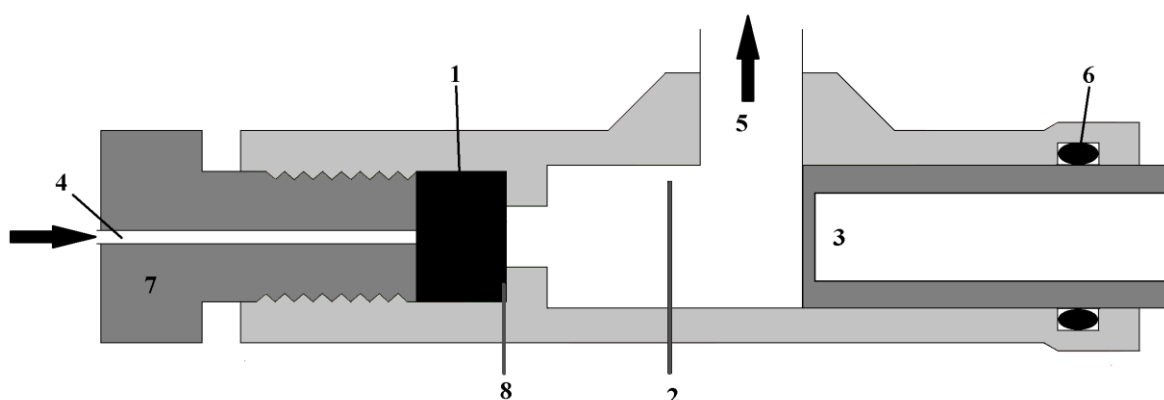
Analytické váhy: Nimbus (Adam Equipment, USA)

Předvážky: EW600-2M (Kern, Německo)

Přístroj na úpravu vody: Millipore system Symplica UV (Millipore, USA)

3.4 Konstrukce miniaturizované cely

Tělo detektoru bylo vytištěno z kyseliny polymléčné pomocí 3D tiskárny. Otvory pro uhlíkovou plst a referenční argentschloridovou elektrodu byly vytvořeny již při tvorbě cely. Pro platinové drátky, sloužící jeden jako pomocná elektroda a druhý jako elektrický kontakt pro uhlíkovou plst, bylo nutné vytvořit otvory dodatečně. Uhlíková plst byla v těle detektoru uzavřena pomocí ploché ferule s přívodní kapilárou. Pro zamezení úniků elektrolytu kolem referenční elektrody bylo do předpřipravených záhybů vloženo kroužkové těsnění. Celkové průřezové schéma sestaveného detektoru je zobrazeno na obr. 3.3.1.



Obr. 3.3.1.: Schéma tištěné miniaturizované elektrochemické cely (měřítko 2,7:1)

1 – uhlíková plst, 2 – pomocná platinová elektroda, 3 – referenční argentschloridová elektroda, 4 – přívodní kapilára, 5 – odtokový otvor, 6 – těsnění, 7 – plochá ferule, 8 – platinový kontakt k pracovní elektrodě (pozn.: šipky naznačují směr toku kapaliny)

3.5 Modifikace pracovních elektrod

Vzhledem k nízké smáčivosti uhlíkové plsti, která zapříčiňuje zachytávání vzduchových bublin v její struktuře, bylo nutné, před jakýmkoliv způsobem nanášení mědi, uhlíkovou plst ošetřit vložením do ultrazvukové lázně s methanolem po dobu 5 minut. Tento krok měl za účel právě odstranění těchto bublin. Jednotlivé postupy přípravy mědi modifikovaných elektrod jsou uvedeny níže.

3.5.1 Modifikace elektrochemickým nanášením mědi

Měď byla z roztoku síranu měďnatého na uhlíkovou plst nanášena v několika uspořádáních. V průtokovém uspořádání, kdy byl elektrolyt prošlý uhlíkovou plstí znovu nasán pumpou a opětovně dopraven na uhlíkovou plst. Toto uspořádání bylo zkoušeno

v normálním toku, kdy byl elektrolyt pumpou tlačěn na uhlíkovou plst a zpětném směru toku, kdy byl elektrolyt pumpou nasáván.

Dále byla měď nanášena pomocí zón, kdy v měrné nádobce byl roztok síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a nanášecí roztok směsi síranu měďnatého o koncentraci 10 mmol dm^{-3} a síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ byl dopravován na plst až v průběhu elektrolyckého vylučování.

Dalším postupem bylo vsádkové uspořádání, při kterém byla plst uchycena na platinovém háčku a ponořena do roztoku směsi síranu měďnatého o koncentraci 10 mmol dm^{-3} a síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

Posledním způsobem bylo tzv. stopped-flow, kdy byla plst vložena do těla elektrody a přiložena na povrch roztoku síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ v měrné nádobce a zároveň byl na plst kapán roztok směsi síranu měďnatého o koncentraci 10 mmol dm^{-3} a síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$, dokud nebylo na výstupu z těla elektrody pozorováno modré zbarvení roztoku.

Všechna výše zmíněná nanášení mědi probíhala za potenciálu $-0,40 \text{ V}$ vloženého na pracovní elektrodu.

3.5.2 Míchání plsti v suspenzi mikrokuliček mědi

Při tomto způsobu nanášení byla uhlíková plst, upravená do potřebných rozměrů a zbavena vzduchu, vložena do lahvičky se suspenzí z měděných mikročástic. Celá lahvička byla umístěna na magnetickou míchačku, kde, vlivem míchání po potřebnou dobu, došlo k nanesení mědi na povrch uhlíkové plsti.

3.5.3 Kapání suspenze mědi na povrch elektrod

Suspenze mikročástic byla kapána do různých částí elektrody. Konkrétně na stranu přilehlou ke kapiláře (proximální strana), dovnitř mezi dvě poloviny rozřízlé plsti (sandwich) a na stranu přilehlou k elektrolytu v měrné nádobce (distální strana). Při těchto postupech bylo potřebné množství suspenze připravováno přímo navážením odpovídajícího množství měděných mikročástic a posléze jejich aktivací v odpovídajícím množství ředěné kyseliny dusičné.

3.6 Spektrometrické stanovení L-lysinu v reálném vzorku

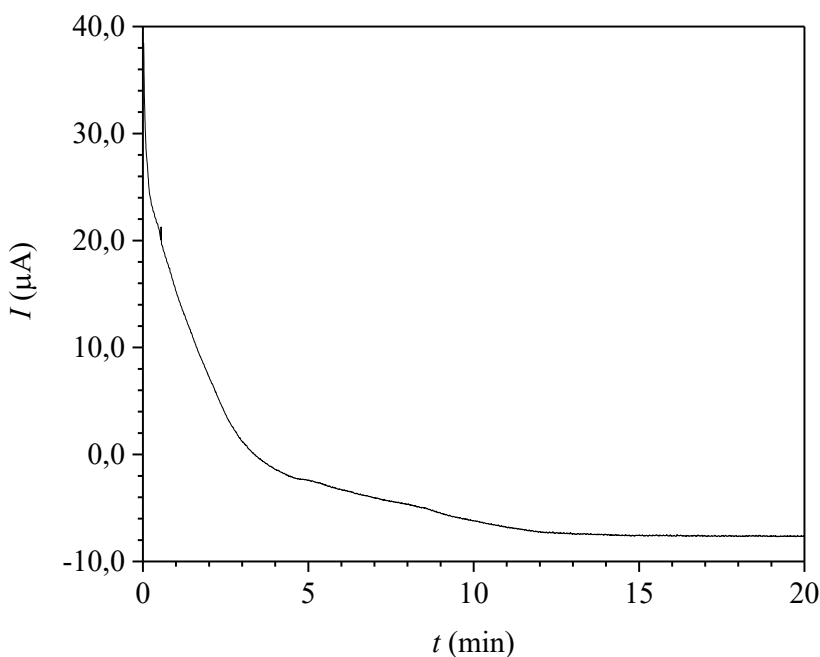
Do suchých lahvíček bylo pipetováno 1,00 ml vzorku, případně vzorku s přídavkem standardu lysinu. Dále bylo ke vzorku pipetováno 0,50 ml ninhydrinového činidla a 3,50 ml rozpouštědla sestávajícího z dimethylsulfoxidu a deionizované vody v objemovém poměru 4:1. Slepý pokus byl připraven obdobným způsobem, jen místo 1,00 ml vzorku bylo pipetováno 1,00 ml deionizované vody. Takto připravené roztoky byly umístěny na 30 minut do vroucí vodní lázně. Po uplynutí této doby byly vzorky ochlazeny pod tekoucí studenou vodou na laboratorní teplotu a následně měřena absorbance spektrometricky při vlnové délce 580 nm.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Modifikace uhlíkové plsti pomocí mědi a její využití

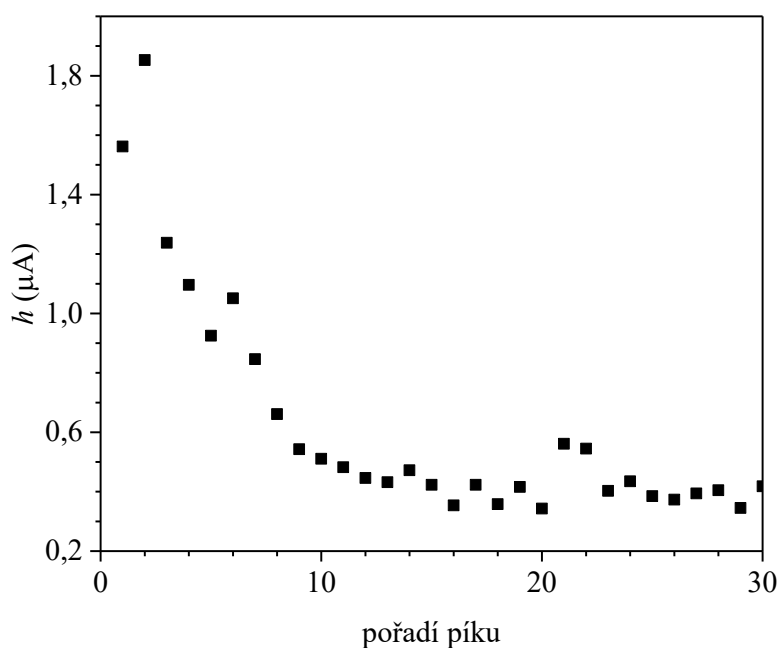
4.1.1 Modifikace elektrochemickým nanášením mědi

První volbou pro modifikaci uhlíkové plsti pomocí mědi bylo potenciostatické vylučování kovové mědi z roztoku měďnatých iontů, konkrétně síranu měďnatého ve směsném roztoku se síranem sodným, který zde sloužil jako základní elektrolyt pro zvýšení vodivosti roztoku. Bylo zkoušeno několik postupů, resp. uspořádání nanášení mědi z nichž lze jmenovat nanášení v průtoku, ať již normálním nebo zpětným, nanášení pomocí stopped-flow, nebo vsádkové nanášení, kdy byla uhlíková plst ponořena do nanášecího roztoku (viz kap. 3.5.1). Všechny takto modifikované elektrody byly zkoumány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, kde bylo pozorováno množství nanesené mědi. Zde se ukázalo, že největší množství mědi, bylo nanášeno na stranu plsti přilehlou k elektrolytu v měrné nádobce a do vnitřní struktury bylo nanášeno pouze minimální množství. Zároveň na základě fotografií z elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že nanášení mědi je téměř nezávislé na technice nanášení roztoku měďnatých iontů, s výjimkou nanášení ve vsádkovém uspořádání, kde byl pokryt celý povrch plsti, jelikož celá elektroda, zavěšená na platinovém háčku, byla ponořena v nanášecím roztoku. Pro další měření bylo jako nejvhodnější a časově nejúspornější nanášení vybráno nanášení mědi pomocí zón.



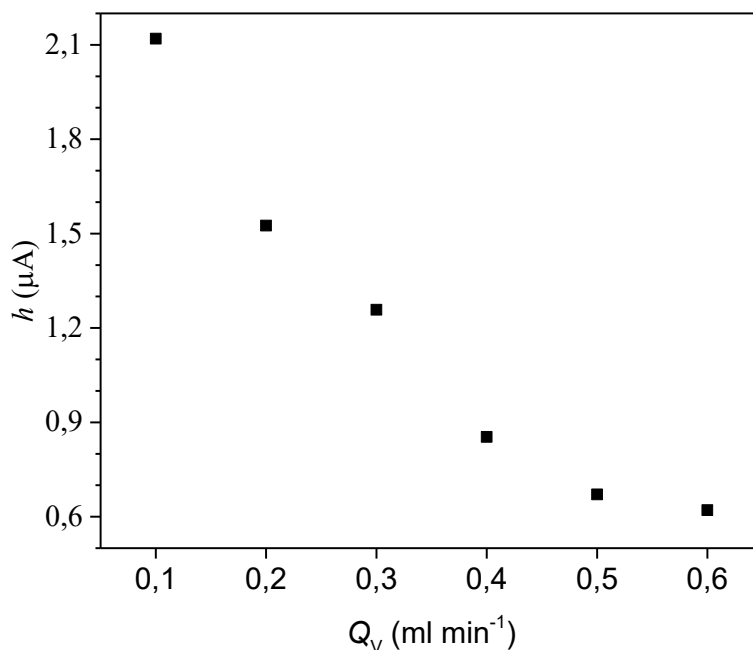
Obr. 4.1.1.3.: Ustabilování signálu základní linie po vložení detekčních podmínek ($E_{det.} = 0,20$ V, $Q_V = 0,6$ ml min^{-1} , fosfátový pufr 25 mmol dm^{-3} o $\text{pH} = 6,80$)

V dalším kroku bylo přistoupeno k měření odezvy fenylalaninu na elektrodě pomocí průtokové injekční analýzy. Při změně roztoku protékajícího skrz plst a roztoku v měrné cele na fosfátový pufr o koncentraci 25 mmol dm^{-3} a pH 6,80 a změně potenciálu na +0,20 V, kdy dochází k detekci aminokyselin pomocí komplexační reakce, byl ze začátku pozorován prudký pokles signálu, proto byl před samotnou detekcí aminokyselin vložen krok, při kterém bylo čekáno na ustálení základní linie, jak je patrné na obrázku 4.1.1.1. Po ustálení základní linie bylo dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku fenylalaninu o koncentraci $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, ale tento roztok i přes relativně vysokou koncentraci poskytoval velmi nízký signál, který se v průběhu několika prvních měření nadále snižoval viz obr. 4.1.1.2.



Obr. 4.1.1.2.: Měření opakovatelnosti stanovení fenylalaninu ($E_{det.} = 0,20 \text{ V}$, $Q_V = 0,6 \text{ ml min}^{-1}$, fosfátový pufr 25 mmol dm^{-3} o pH = 6,80, $c_{Phe} = 1,0 \text{ mM}$)

Dalším krokem, pro zvýšení signálu bylo testování různých objemových průtoků elektrolytu a tím poskytnutí většího času analytu pro komplexační reakci s ionty mědi tvořenými na povrchu elektrody. Tato závislost byla sledována v rozmezí objemových průtoků $0,1 \text{ ml min}^{-1}$ až $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, viz obr. 4.1.1.3. Jako nejlepší se zde jevil průtok $0,1 \text{ ml min}^{-1}$, jelikož poskytoval největší signál, co se výšky i plochy píku týče. Nevýhodou tohoto průtoku byla velmi dlouhá eluční doba – přibližně 5 minut.

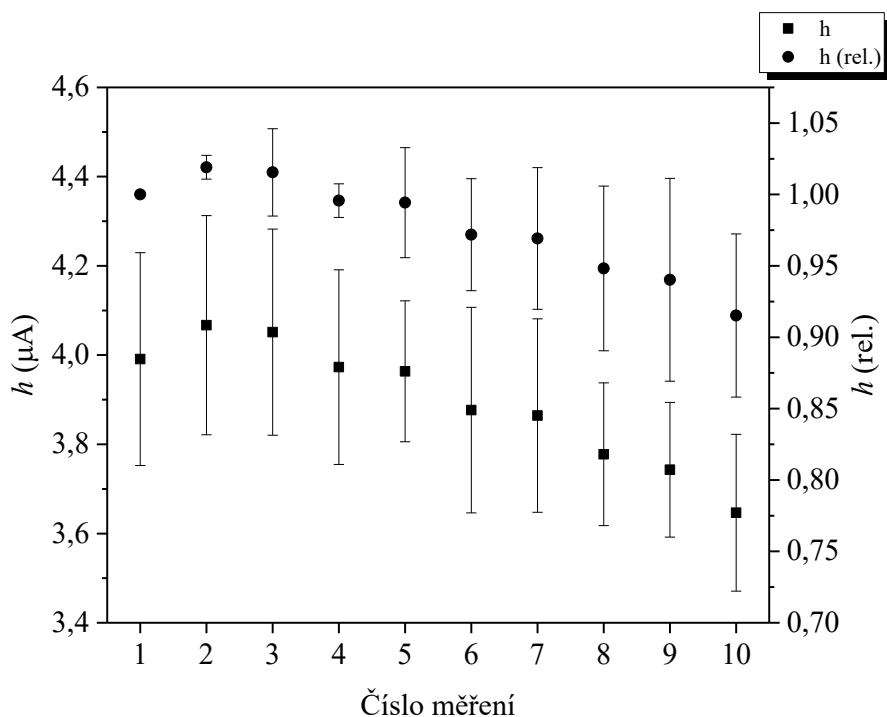


Obr. 4.1.1.3.: *Závislost výšky píku na objemovém průtoku pufru*
 ($E_{det.} = 0,20$ V, fosfátový pufr 25 mmol dm⁻³ o $pH = 6,80$, $c_{Phe} = 1,0$ mM)

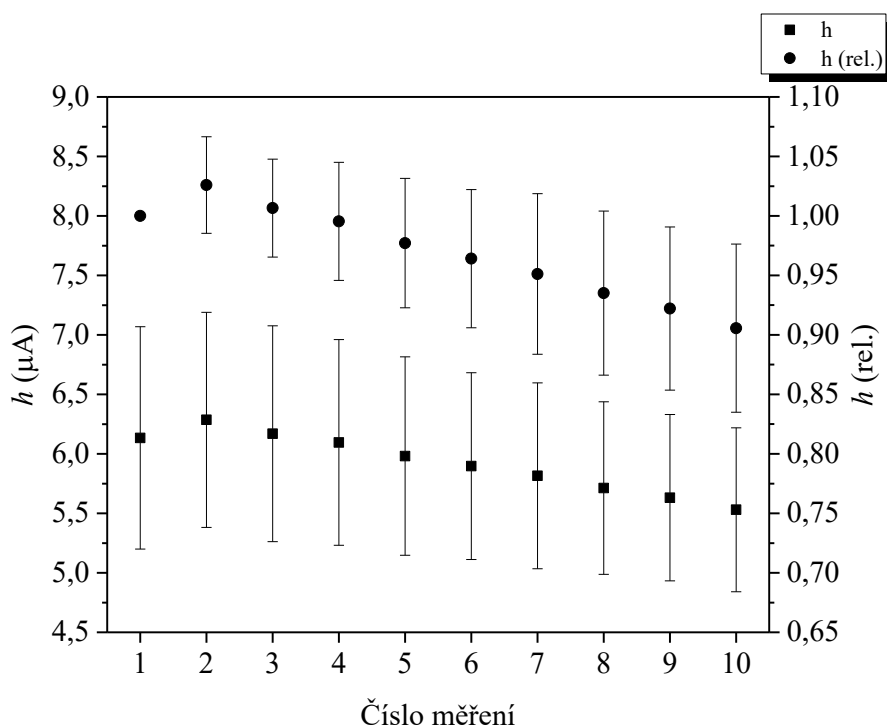
Jelikož se ani snížením objemového průtoku nosného elektrolytu nepodařilo dosáhnout zásadně vyšších hodnot odezvy za přijatelně krátké doby analýzy, bylo nanášení mědi pomocí potenciostatických metod opuštěno a bylo přistoupeno k nanášení mědi ve formě jejích mikročástic na uhlíkovou plst.

4.1.2 Kapání suspenze měděných mikročástic – proximální strana

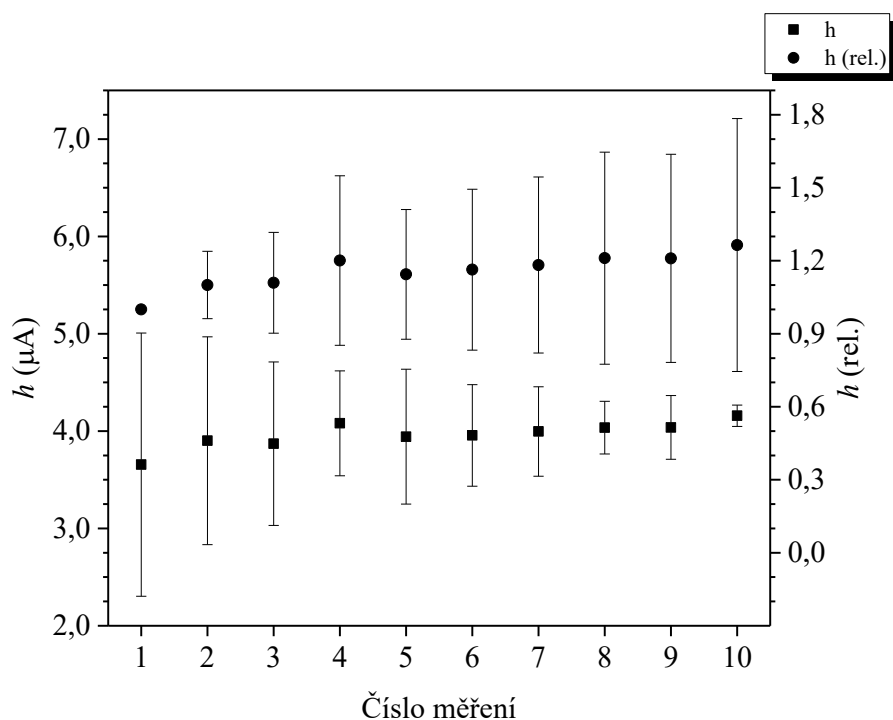
Nanášení suspenze měděných mikročástic na proximální stranu uhlíkové plsti, neboli na stranu přilehlou k vyústění kapiláry, bylo prováděno v několika hmotnostních hladinách mědi, konkrétně 60, 90, 120, 150 a 180 mg. Bohužel žádný z těchto postupů neposkytl stabilní elektrodovou odezvu na analyt, jak je patrné na obrázcích 4.1.2.1 až 4.1.2.5. Příčinou tohoto problému může být právě poloha mědi vůči kapiláře vystupující z pumpy, potažmo dávkovacího ventilu. Při zašroubování ploché ferule s kapilárou do těla elektrody docházelo k vytlačení měděných mikročástic do stran těla elektrody a tím mimo vyústění kapiláry a pro komplexační reakci mezi aminokyselinou a ionty mědi, která je principem tohoto způsobu detekce, nemohla proběhnout kvantitativně, nebo alespoň v reprodukovatelné míře.



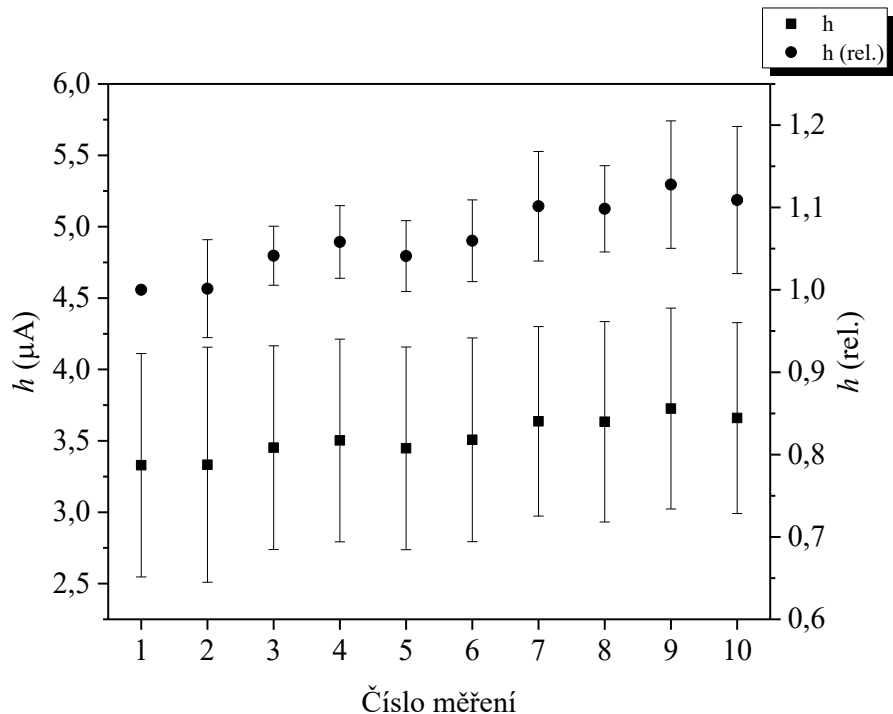
Obr. 4.1.2.1.: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v proximálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 60 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



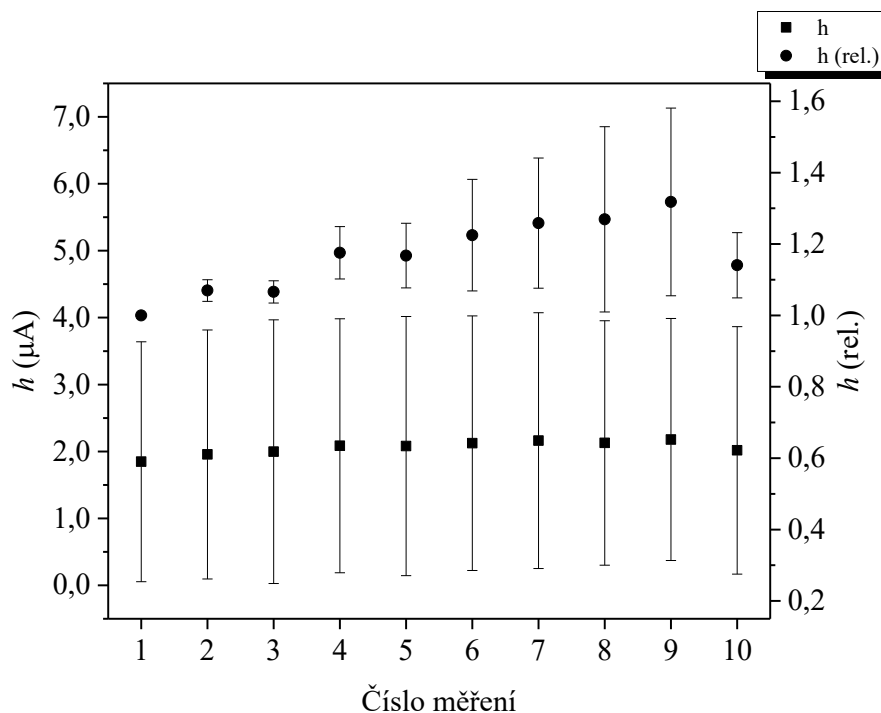
Obr. 4.1.2.2.: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v proximálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 90 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.2.3.: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v proximálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 120 \text{ mg}$; $E_{det} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.2.4.: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v proximálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 150 \text{ mg}$; $E_{det} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



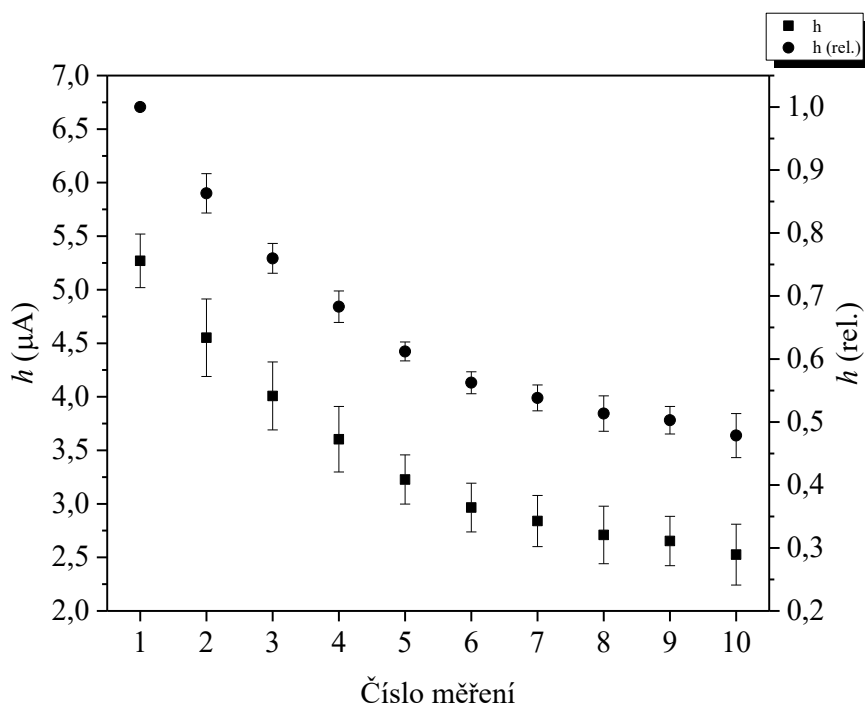
Obr. 4.1.2.5.: *Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v proximálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 180 \text{ mg}$; $E_{det} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)*

Právě z výše uvedených důvodů, tj. nízké odezvy při vyšších nanášených množstvích měděných mikročastic, nízké stabilitě odezvy a velmi nízké reprodukovatelnosti přípravy elektrod, bylo přistoupeno k modifikaci elektrody pomocí míchání plsti v suspenzi měděných mikročastic, který měl poskytnout rovnoměrnější a reprodukovatelné nanesení měděných mikročastic na povrch uhlíkové plsti.

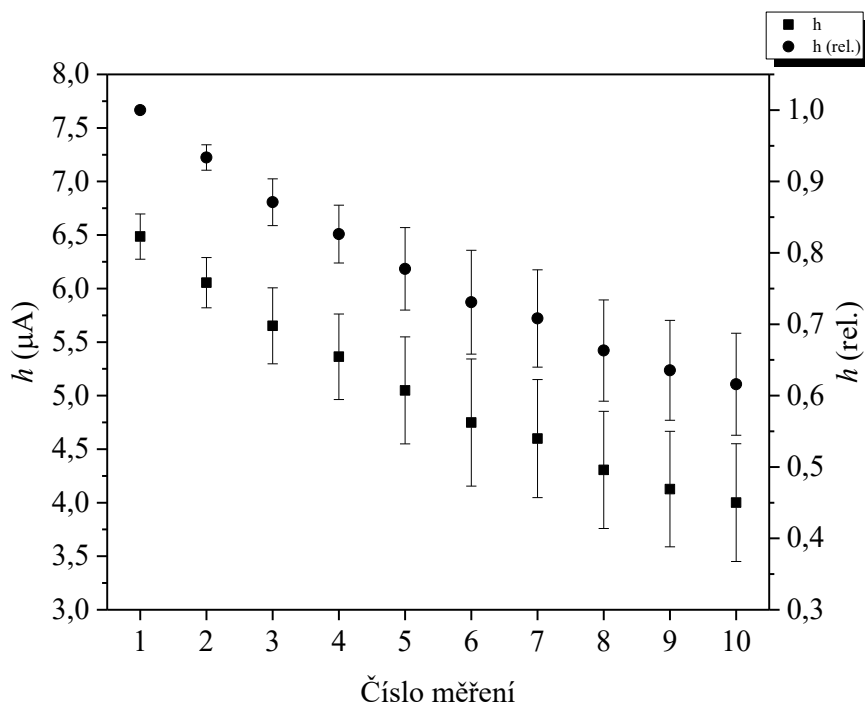
4.1.3 Míchání plsti v suspenzi mikrokuliček mědi

Při tomto postupu byla uhlíková plst míchána v suspenzi měděných mikročástic po časové úseky 10, 20, 30 a 40 minut. Všechny doby nanášení měli za následek rovnoměrné nanesení mědi na celý vnější povrch uhlíkové plsti, nevýhodou bylo nanesení pouze velmi malého množství do její vnitřní struktury.

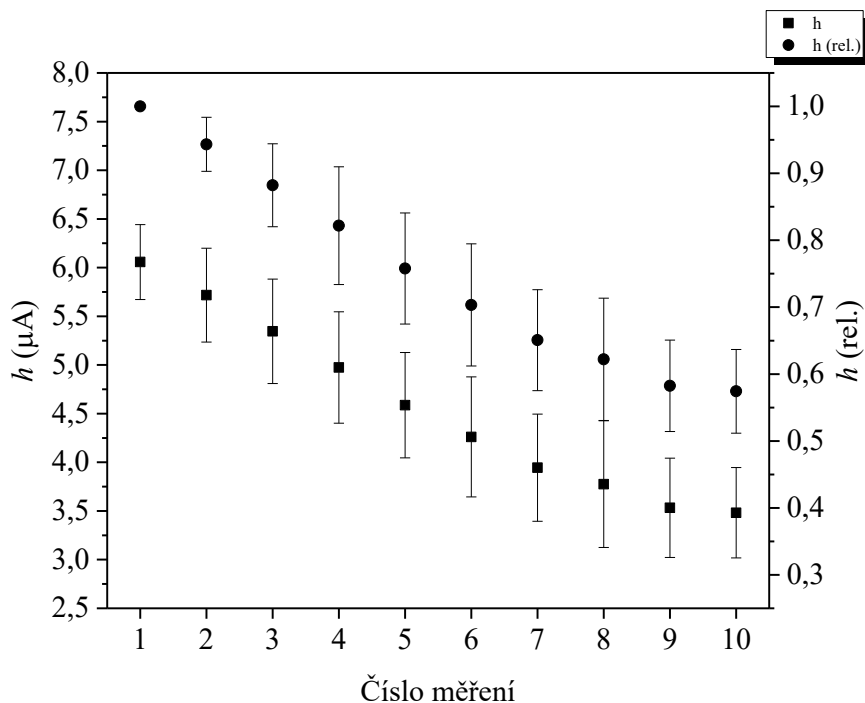
Jak je patrné na obrázcích 4.1.3.1 až 4.1.3.4, docházelo nezávisle na době nanášení k výraznému poklesu signálu, přibližně o 50 % během.... Při převedení proudových odezvy na jejich relativní hodnotu, poměrem signálu jednotlivých měření oproti prvnímu měření na každé elektrodě, si lze povšimnout pravidelného, téměř exponenciálního poklesu.



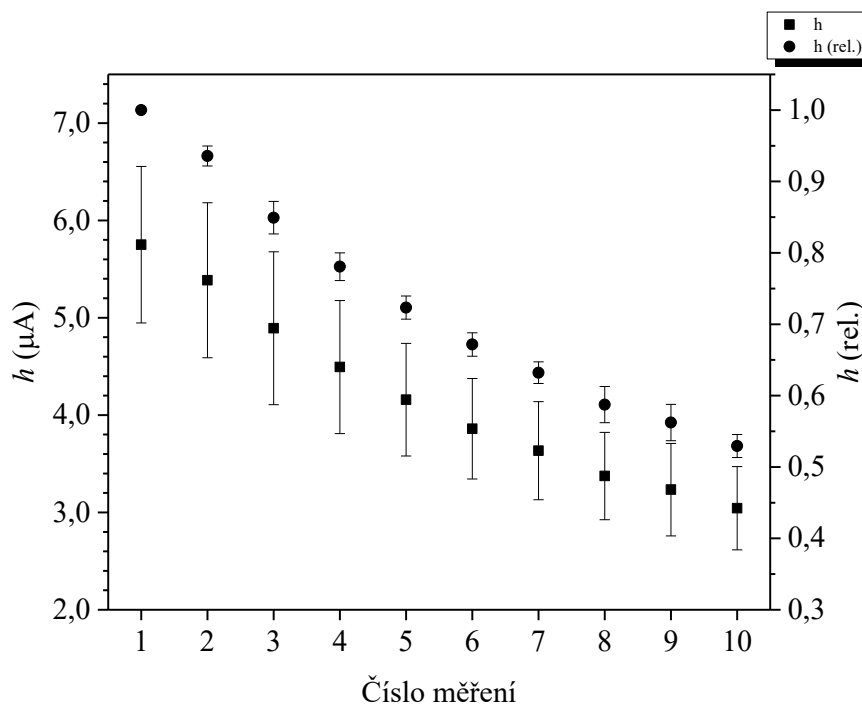
Obr. 4.1.3.1: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 10 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.3.2: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 20 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

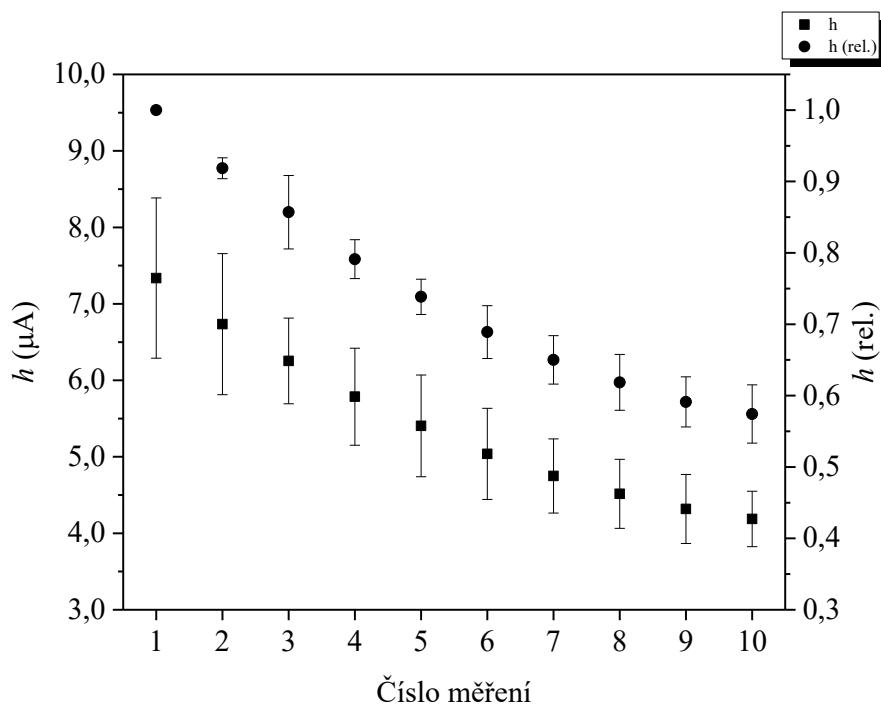


Obr. 4.1.3.3: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

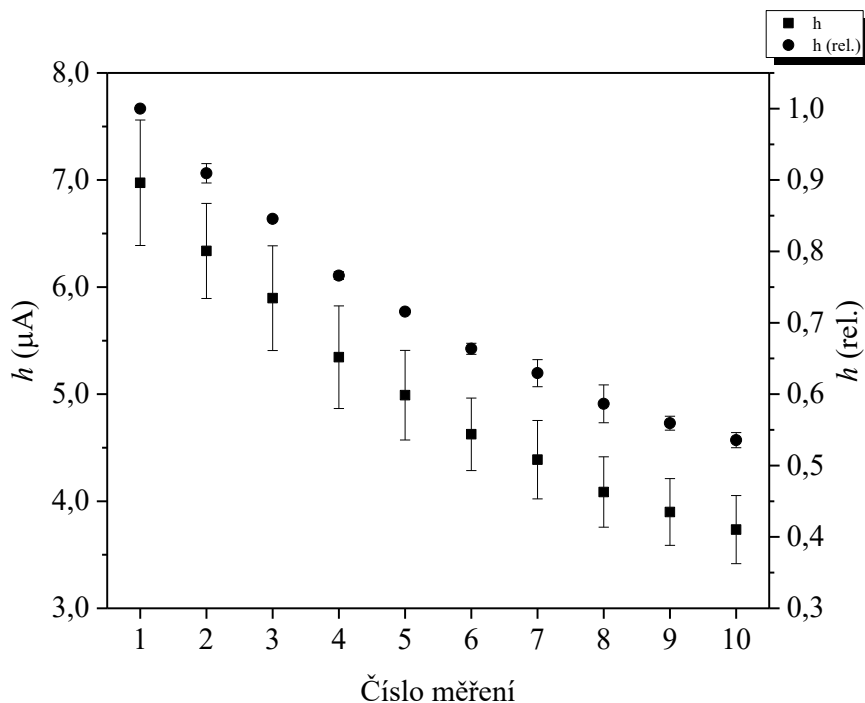


Obr. 4.1.3.4: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 40 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

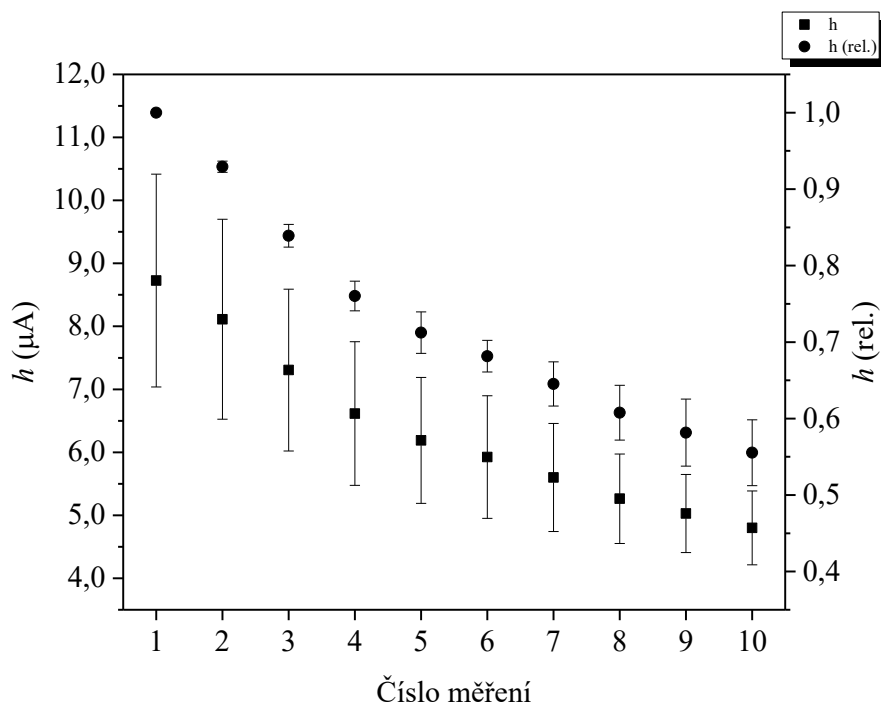
Během vložení modifikované plsti do těla elektrody a následného vložení a zašroubování ploché ferule docházelo ke ztrátám části suspenze odtokovým otvorem v těle, který primárně sloužil k vytvoření kontaktu mezi pracovní a zbylými elektrodami. Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno vložení části filtračního papíru pod modifikovanou uhlíkovou plst tak, aby došlo k zakrytí pouze odtokového otvoru, a nikoliv platinového drátku, který tvořil vodivé spojení pro pracovní elektrodu. Tento postup měl za následek mírné zvýšení odezvy elektrody na analyt, jak je patrné z obr. 4.1.3.5 až 4.1.3.8. Nicméně nedošlo k zastavení poklesu odezvy elektrody v průběhu deseti měření.



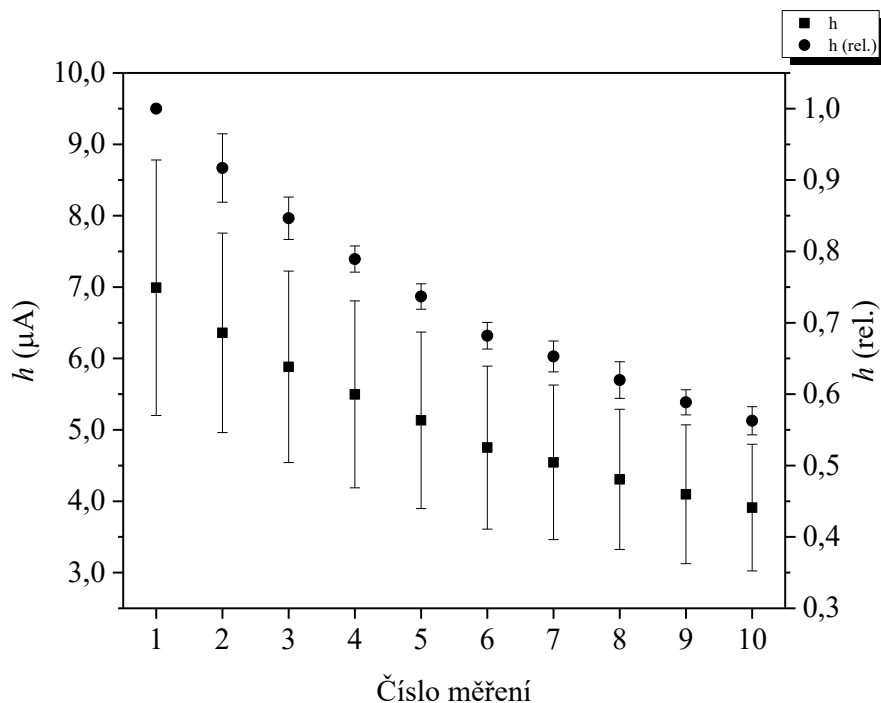
Obr. 4.1.3.5: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 10 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.3.6: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 20 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.3.7: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

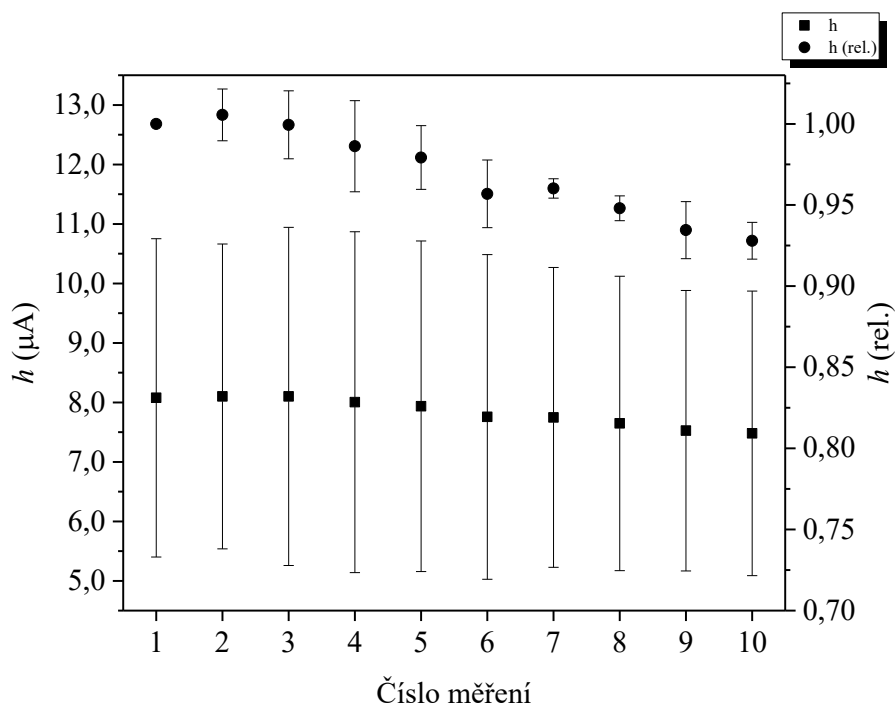


Obr. 4.1.3.8: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 40 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

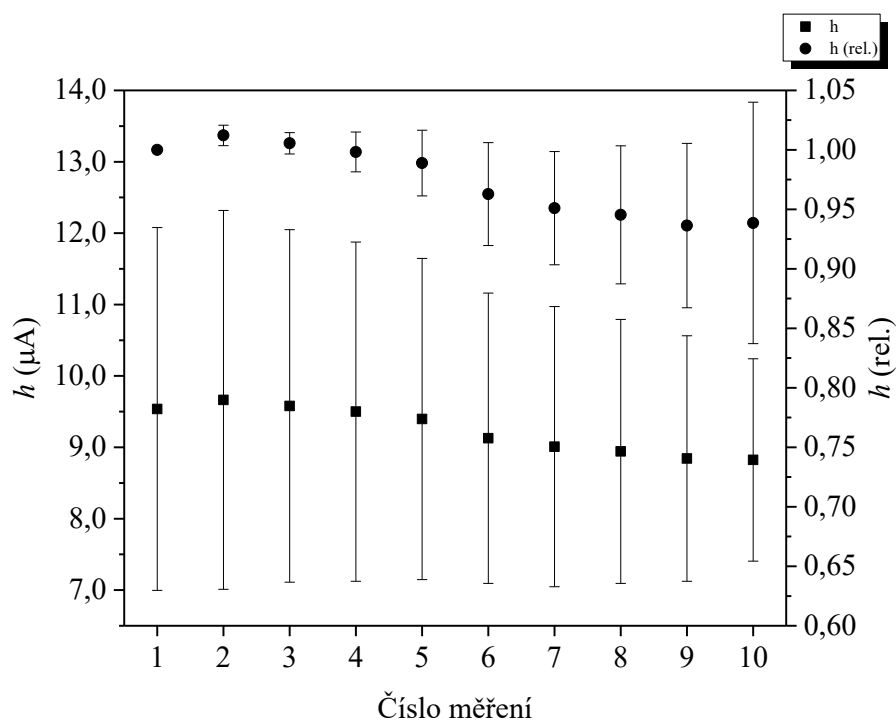
Na základě závislostí mezi množstvím nanesené mědi na uhlíkovou plst a odezvou elektrody byla jako nejvhodnější vybrána 30minutová doba nanášení, jelikož zde byla odezva elektrody nejvyšší.

Dalším krokem bylo proměření závislosti velikosti signálu na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu. Tyto závislosti byly proměřovány v rozpětí potenciálů 200 mV až 500 mV. Jak je vidět na obr. 4.1.3.7 až 4.1.3.11, ani při jednom z měřených potenciálů nebylo dosaženo dostatečné stability signálu, aby bylo elektrodu možné využít v dalších pokusech.

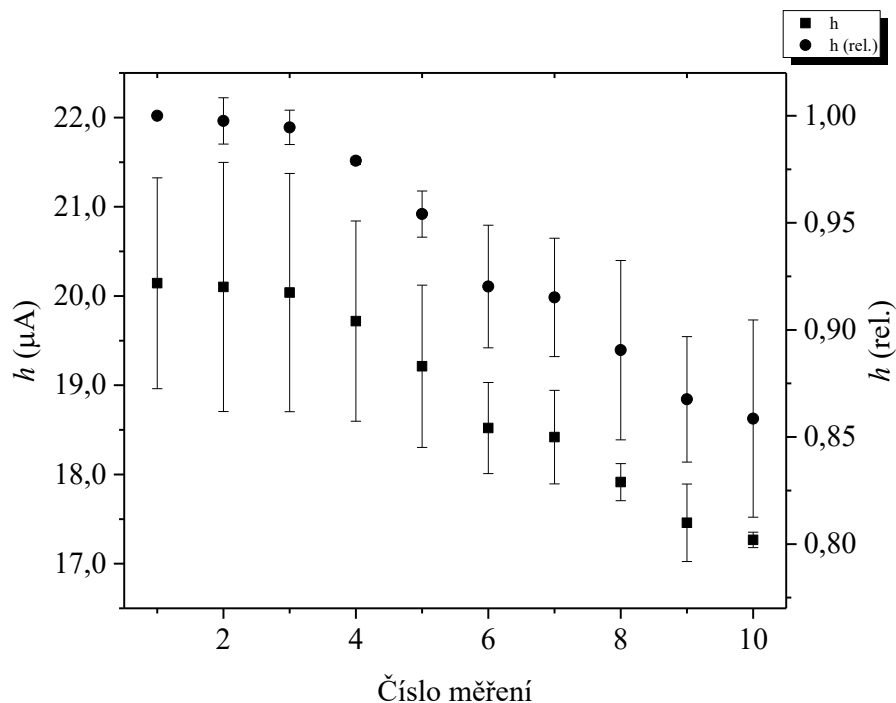
Nárůst signálu při vložení potenciálu 500 mV (obr. 4.1.3.11.), je nejspíše způsoben začínajícím vlivem změny v mechanismu reakce probíhající na pracovní elektrodě. Tento jev byl již popsán v literatuře [20], kdy k detekci za pomoci komplexační reakce dochází v rozsahu potenciálů do přibližně 400 mV a při vyšších potenciálech již může docházet k tzv. elektrokatalytické reakci.



Obr. 4.1.3.9: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 300 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

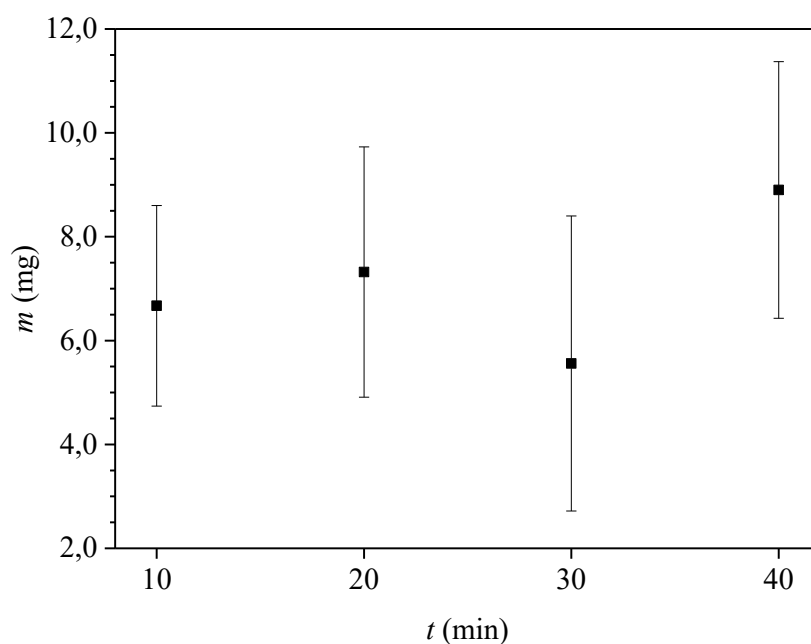


Obr. 4.1.3.10: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 400 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.3.11: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované mícháním s vloženým filtračním papírem v průběhu deseti měření ($t_{\text{mix}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{det}} = 500 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Z důvodu poklesu signálu během deseti prováděných měření a nízké reprodukovatelnosti přípravy modifikovaných elektrod, čemuž nebylo zamezeno ani zvýšením potenciálu vloženého na pracovní elektrodu, byla provedena analýza naneseného množství mědi v závislosti na jednotlivých časech nanášení pomocí míchání plsti v měděné suspenzi. Na základě tohoto pokusu, kdy byla zvážena uhlíková plst před modifikováním, po modifikování a následně z rozdílu těchto hmotností bylo zjištěno, že množství nanesené mědi se mezi jednotlivými časy jen velmi málo liší, zároveň se zde vyskytuje výrazná směrodatná odchylka v naneseném množství za jeden časový úsek. Zároveň je z obr. 4.1.3.12 patrné, že množství nanesené mědi se pohybuje pouze v řádu jednotek miligramů, což je na základě získaných poznatků, tj. prudkého poklesu odezvy elektrody na analyt, nedostatečné množství mědi. Z tohoto důvodu byla práce zpět směřována na modifikování plsti pomocí nanášení mědi kapáním, kdy se nanáší mnohem větší množství.



Obr. 4.1.3.12: Množství nanesené mědi pomocí míchání plsti v suspenzi mikročástic

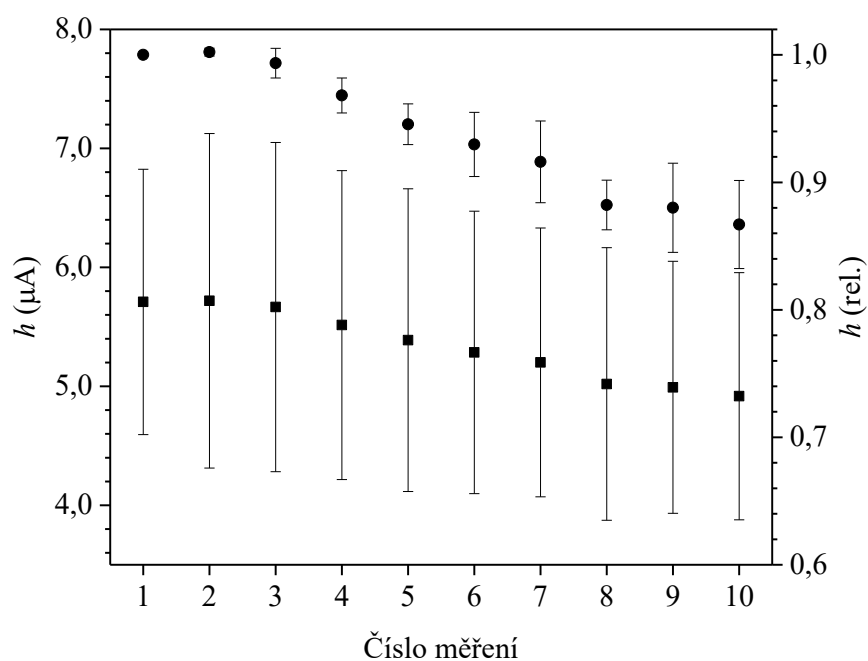
4.1.4 Kapání suspenze - “sandwich”

Při této modifikaci byla suspenze mědi kapána mezi dvě části plsti, vzniklé rozříznutím jednoho výřezu. Hmotnost mědi v připravovaných suspenzích se pohybovala v rozpětí 10 mg až 50 mg. Jednotlivé závislosti velikosti a stability signálu na množství nanesené mědi jsou znázorněny na obr. 4.1.4.1 až 4.1.4.5. Na nich jsou také patrné poklesy signálu během prováděných deseti měření, které jsou ale o mnoho menší, pouze jednotky procent než v případech nanášení mědi pomocí míchání, kde se pokles signálu pohyboval kolem 40 % až 50 %. Nevýhodou tohoto postupu jsou velké směrodatné odchylky v proudových odezvách mezi jednotlivými připravenými elektrodami.

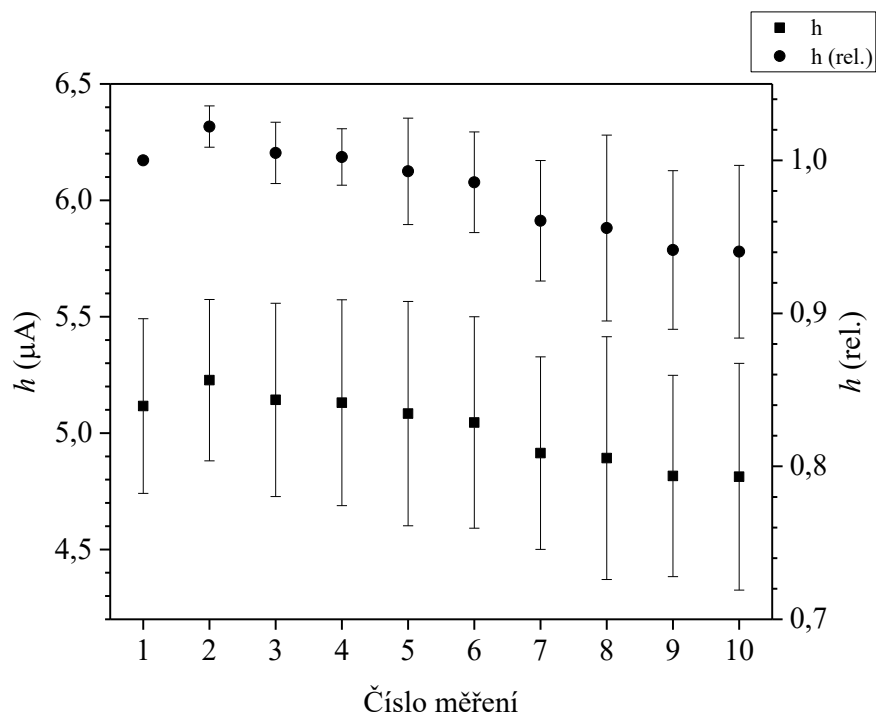
Jako nejvhodnější množství nanášené mědi bylo zvoleno 50 mg. Jak je vidět na obr. 4.1.4.5, je zde pokles signálu pouze o přibližně 4 %, zároveň jsou zde nejmenší směrodatné odchylky mezi relativními i proudovými hodnotami signálů, což značí, v tomto souboru výsledků, nejlepší reprodukovatelnost přípravy modifikované elektrody.

Dalším krokem bylo změření závislosti velikosti a stability signálu na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu. Tato závislost byla měřena v rozpětí potenciálů 100 mV až 500 mV. Pokles signálu byl téměř zastaven při potenciálech 300 mV, 400 mV a 500 mV, jak je patrné z grafů na obr. 4.1.4.8 až 4.1.4.10.

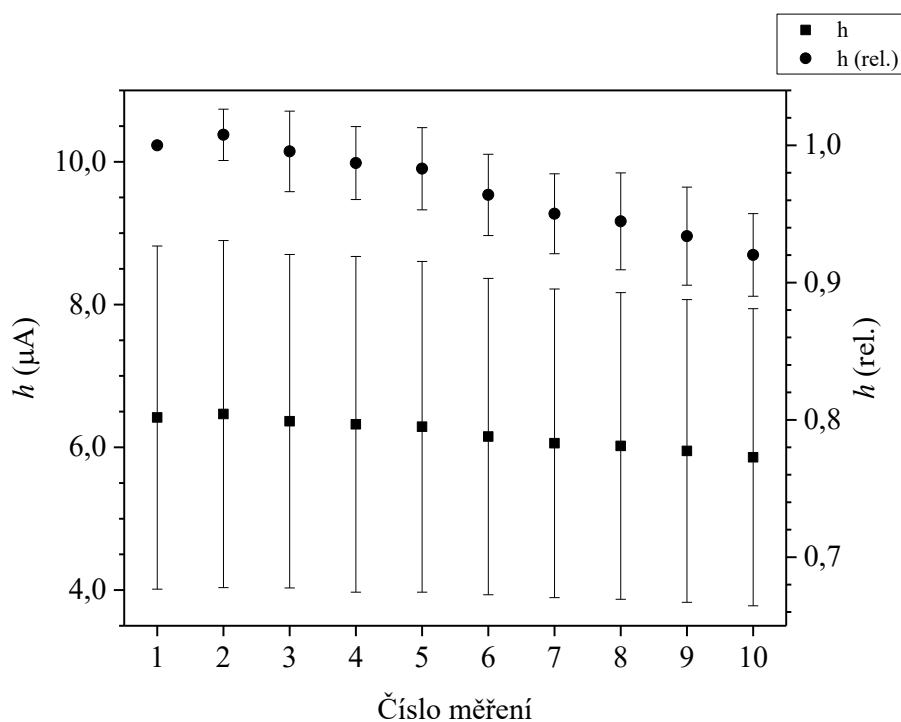
Po výběru nejvhodnějšího detekčního potenciálu 300 mV, při kterém byla odezva elektrody na fenylalanin nejstabilnější, byla proměřena závislost velikosti signálu na objemovém průtoku nosného elektrolytu. Jak je vidět na obr. 4.1.4.11, velikost signálu (výšky píku) klesá s klesajícím objemovým průtokem elektrolytu. Z důvodu odchylky signálů při třech nejvyšších zvolených průtocích, byly pokusy při těchto hodnotách opakovány. Na základě tohoto opakování, kdy byly signály téměř identické, byl jako optimální hodnota průtoku zvolen $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Zároveň si lze opět všimnout velkého rozdílu v proudových odezvách na různých připravených elektrodách.



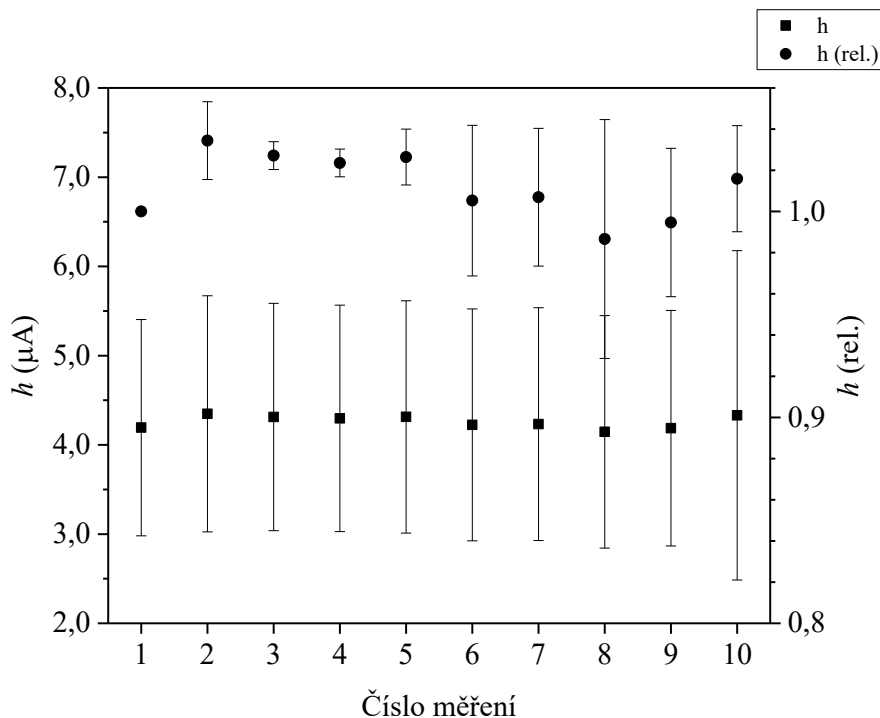
Obr. 4.1.4.1: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 10 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



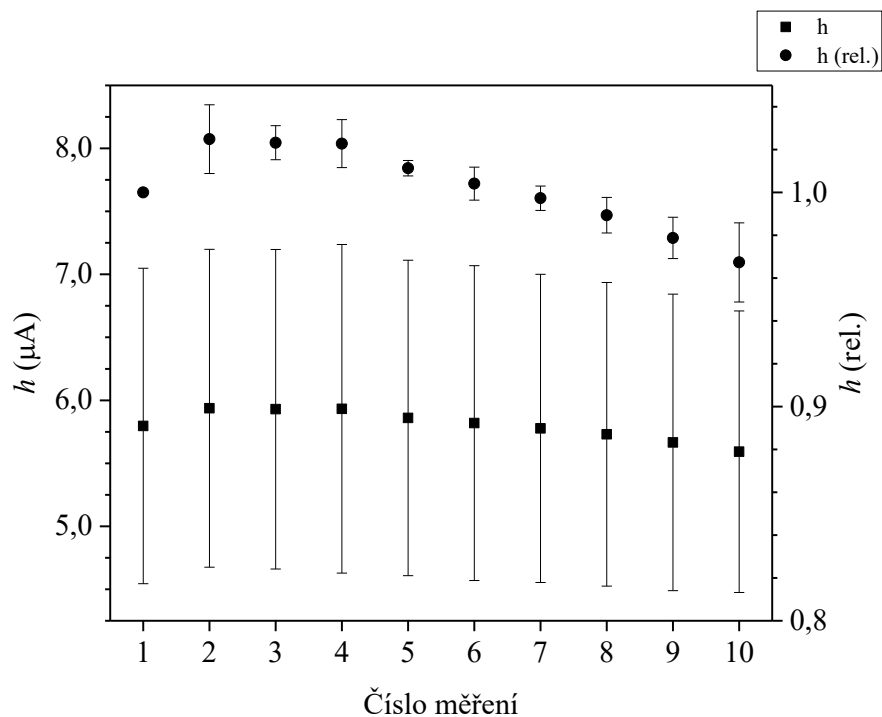
Obr. 4.1.4.2: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 20 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



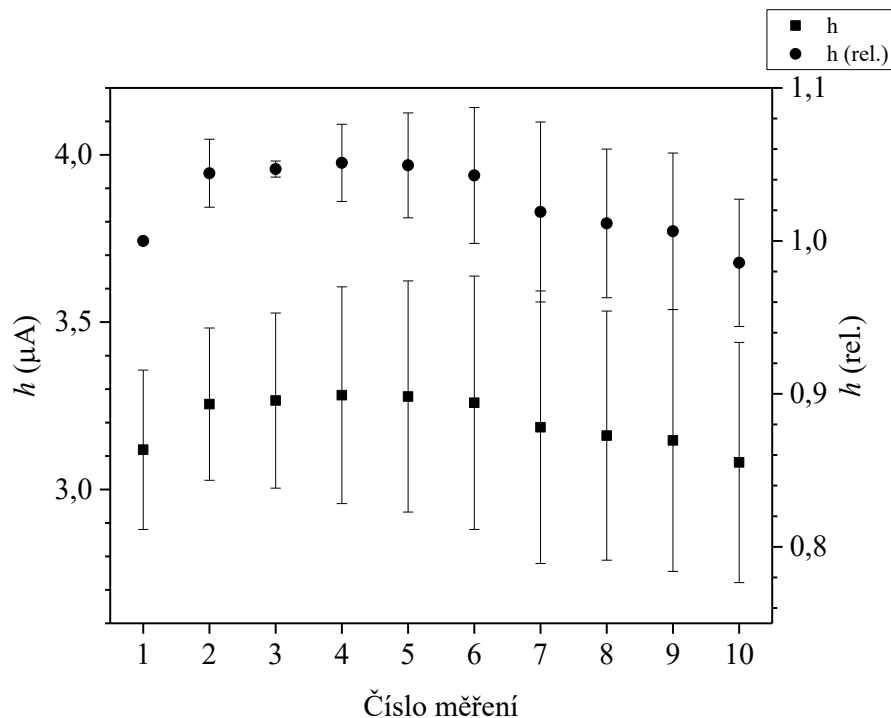
Obr. 4.1.4.3: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 30 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



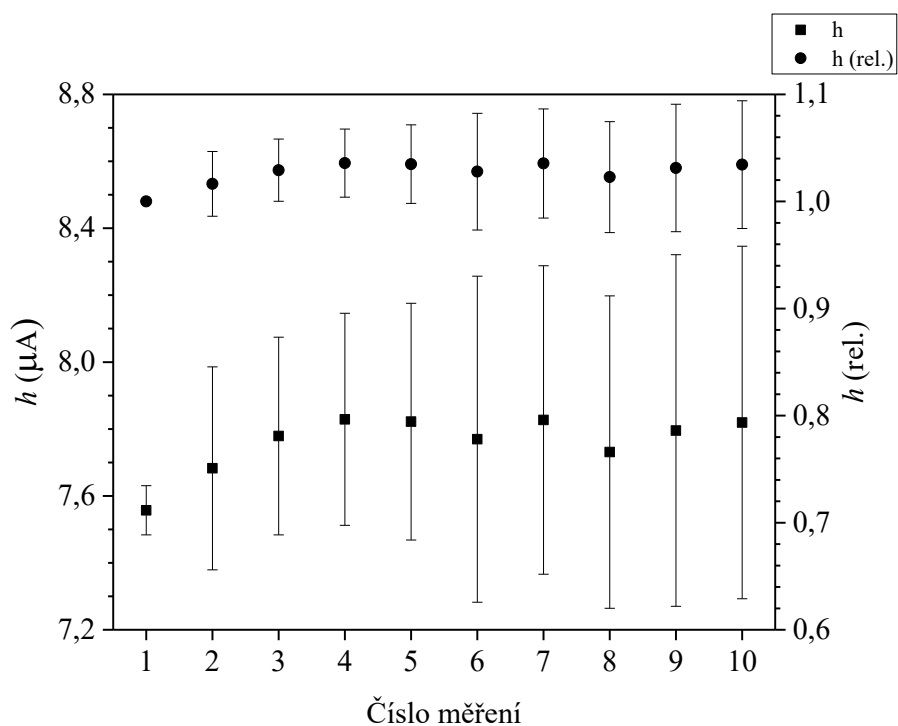
Obr. 4.1.4.4: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 40 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



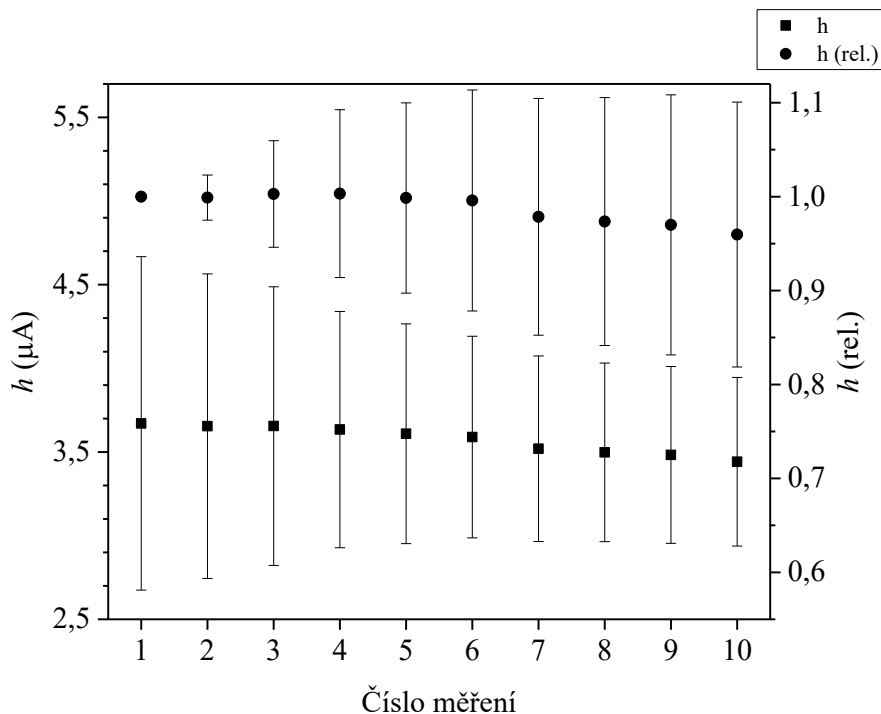
Obr. 4.1.4.5: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



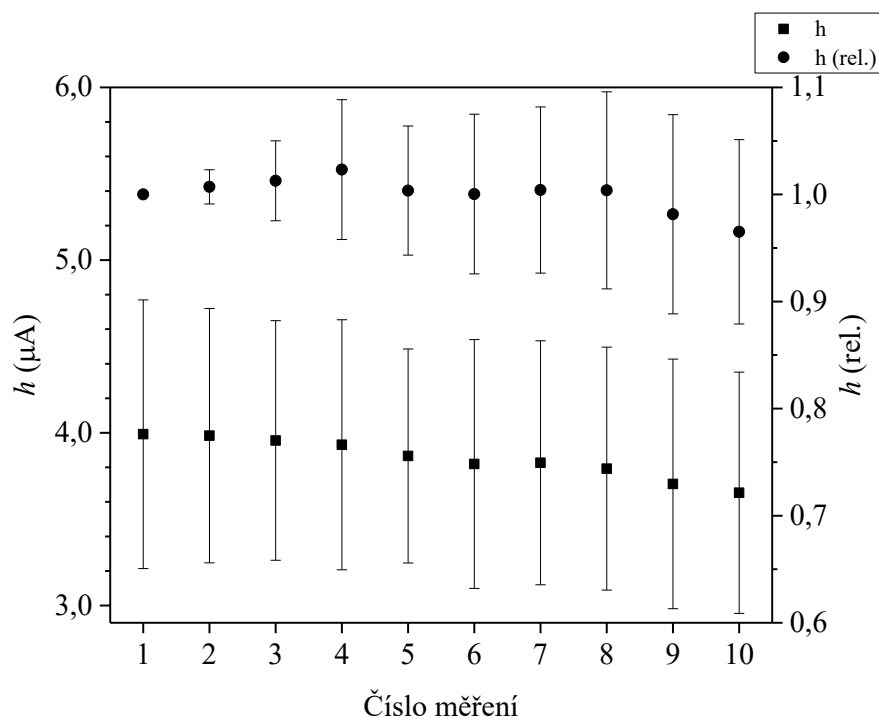
Obr. 4.1.4.6: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 100 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



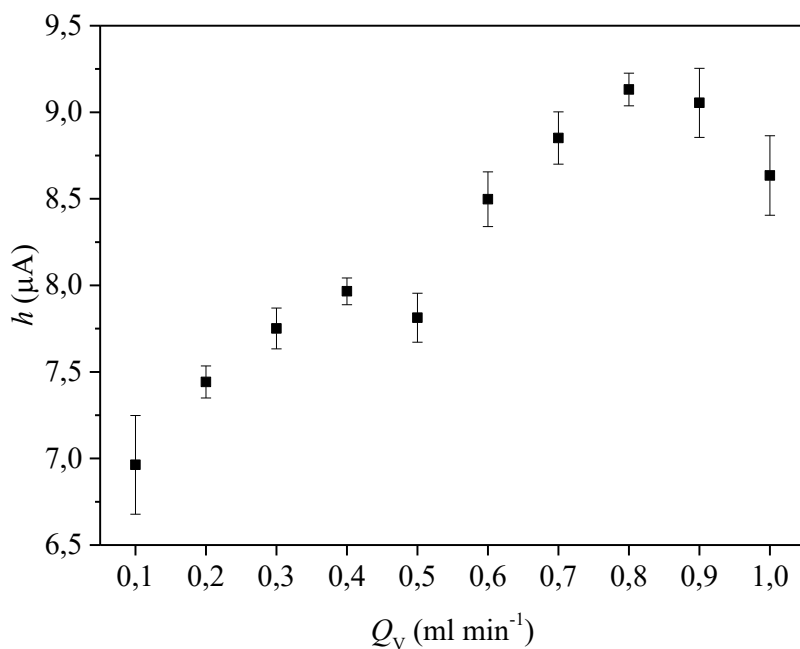
Obr. 4.1.4.8: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 300 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.4.9: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 400 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



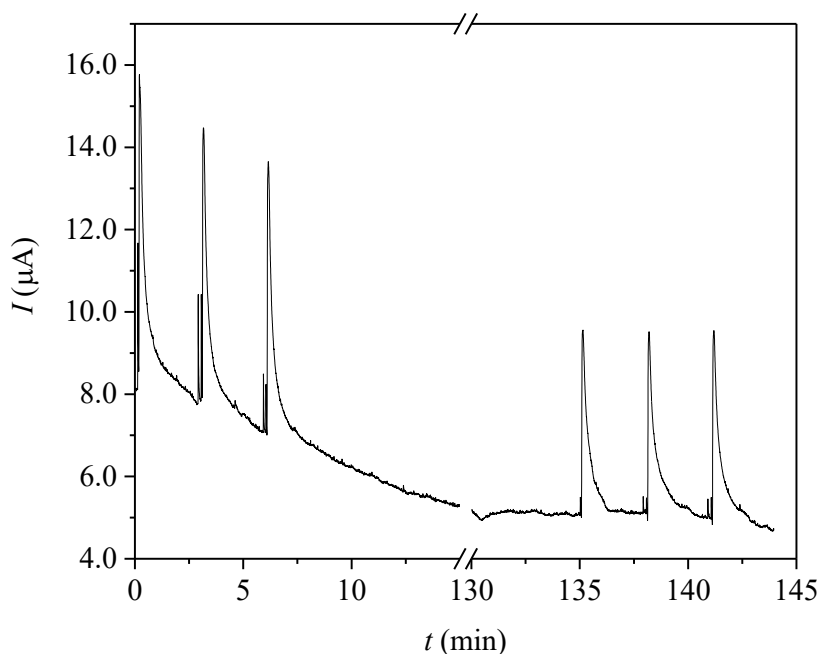
Obr. 4.1.4.10: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody v sandwichovém uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 500 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.4.11: Závislost velikosti signálu elektrody modifikované v sandwichovém uspořádání na průtoku nosného elektrolytu ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 300 \text{ mV}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Dále bylo za potřebí zjistit stabilitu elektrodové odezvy v závislosti na čase. Jak si lze všimnout na obr. 4.1.4.12 a v tabulce 4.1.4.I, došlo v průběhu přibližně dvou hodin k poklesu signálu o přibližně 30 % a zároveň ke zmenšení driftu, základní linie a zmenšení relativní směrodatné odchylky mezi měřeními. Z důvodu eliminace možné chyby vnesené do měření tímto jevem bylo nutné měřit vzorky v rychlém sledu, jelikož čekání na ustálení základní linie by bylo velmi časově náročné.

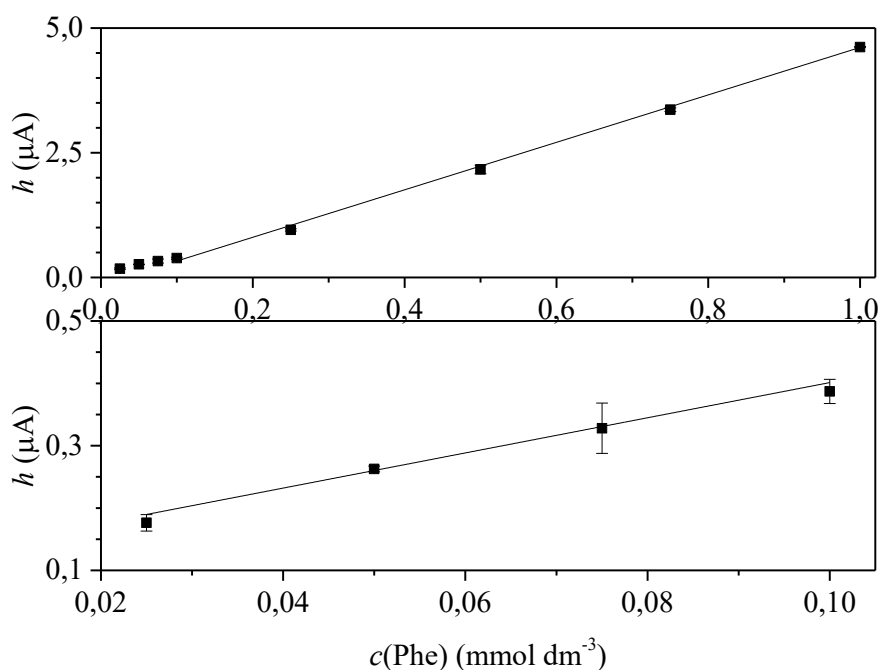
Jedním z posledních kroků bylo změření kalibrační závislosti fenylalaninu za účelem zjištění použitelnosti modifikované elektrody na reálné vzorky. Tato závislost byla měřena v rozmezí koncentrací od $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $25,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Jak je patrné z obr. 4.1.4.13, je nutné tuto závislost proložit dvěma lineárními částmi. Jednu v rozsahu od $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ a druhou v rozsahu od $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $25,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Tento jev může být s největší pravděpodobností způsoben chybou při ředění vzorků automatickou pipetou, jelikož se zlom nachází na rozhraní koncentračních řádů. V tabulce 4.1.4.1 jsou vypsány parametry jednotlivých lineárních částí kalibračních závislostí. Limit detekce, který je zde $0,06 \text{ mmol dm}^{-3}$, platí pouze pro tuto konkrétní elektrodu, jelikož reprodukovatelnost přípravy elektrody je poměrně nízká a každá elektroda poskytovala odlišné proudové odezvy.



Obr. 4.1.4.12: Dlouhodobá stabilita odezvy elektrody modifikované v sandwichovém uspořádání ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 300 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Tabulka 4.1.4.I.: Pokles odezvy elektrody na fenylalanin v průběhu dvou hodin.

	Výška (μA)	s_r (%)	Drift základní linie ($\mu\text{A min}^{-1}$)
1. – 3. pík	6,72 (100 %)	2,7	0,19
4. – 6. pík	4,61 (68,6 %)	2,0	0,04



Obr. 4.1.4.13: Kalibrační závislost fenylalaninu získaná na elektrodě modifikované v sandwichovém uspořádání ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 300 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$)

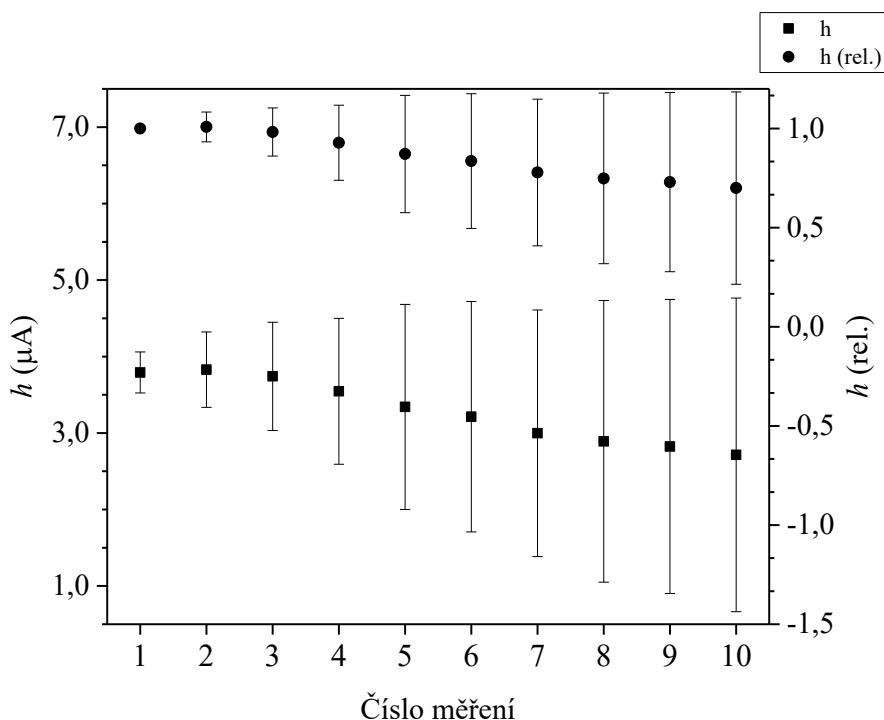
Tabulka 4.1.4.II.: Parametry kalibrační závislost fenylalaninu získané na elektrodě modifikované v sandwichovém uspořádání.

Rozsah	Směrnice	Úsek	R	LOD	LOQ
$1,0 \text{ mmol dm}^{-3} - 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$	$4,76 \pm 0,06$	$-0,15 \pm 0,05$	0,999	---	---
$0,1 \text{ mmol dm}^{-3} - 25,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$2,82 \pm 0,29$	$0,12 \pm 0,02$	0,968	$0,06 \text{ mmol dm}^{-3}$	$0,21 \text{ mmol dm}^{-3}$

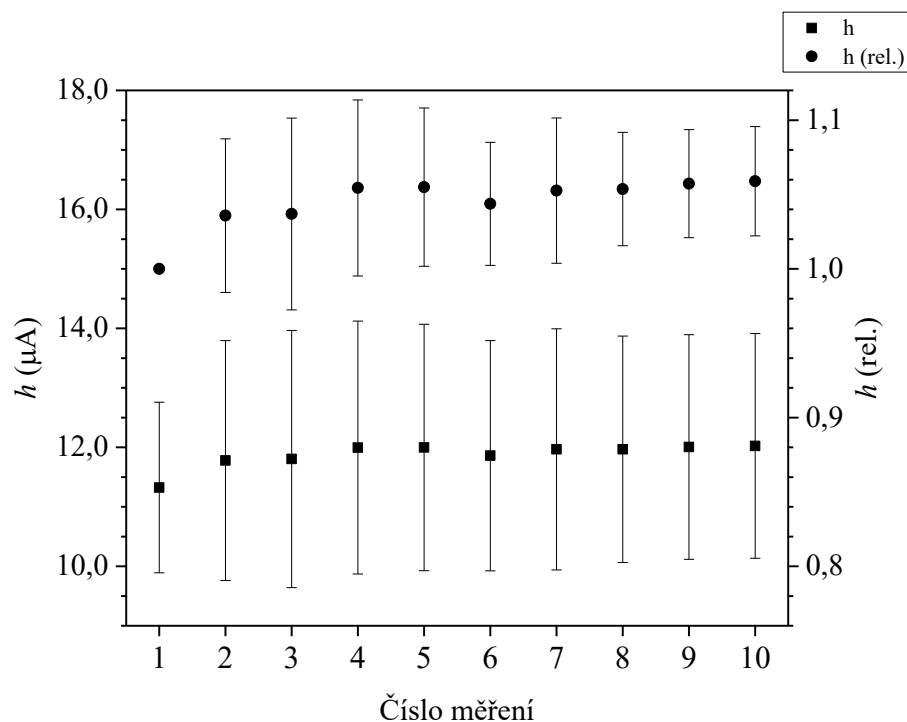
4.1.5 Kapání suspenze – distální strana

Na základě zkušeností z předchozích modifikací kapáním suspenze mědi a teoretického modelu průlinčitých elektrod, kdy proudová hustota roste se zmenšující se vzdáleností od přivedeného kontaktu a roste tedy i proudová odezva elektrody na analyt, bylo vyzkoušeno nanesení suspenze měděných mikročastic na distální stranu plsti, respektive na filtrační papír uzavírající odtokový otvor s následným přiložením plsti.

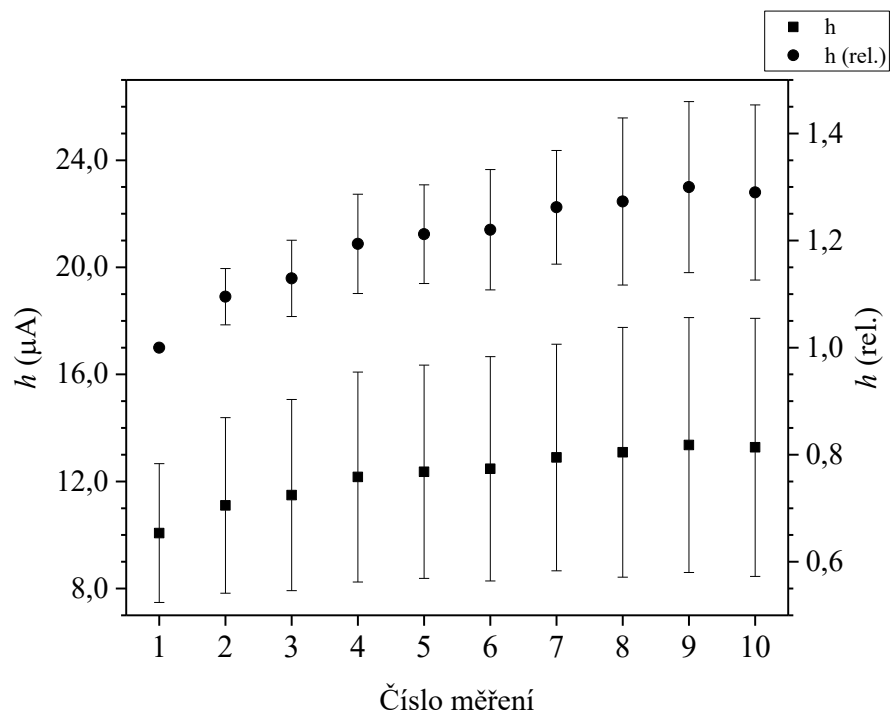
Při tomto postupu již nebylo optimalizované množství nanášené mědi a bylo ve všech měřeních používáno suspenze tvořené z 50 mg měděných mikročastic, což je množství optimalizované při modifikování v sandwichovém uspořádání. Jedním z optimalizovaných parametrů v distálním uspořádání byl potenciál vkládaný na pracovní elektrodu. Závislost velikosti a stability signálu byla na tomto parametru sledována v rozmezí od 100 mV do 500 mV. Stability signálu bylo dosaženo při použití potenciálu 200 mV, jak je vidět na obr. 4.1.5.2. V případě použití nižšího potenciálu, tj. 100 mV, docházelo k poklesu signálu, obr. 4.1.5.1 a naopak, při aplikování potenciálů 300 mV a vyšších, docházelo k postupnému růstu signálu během měření, jak si lze všimnout na obrázcích 4.1.5.3 až 4.1.5.5.



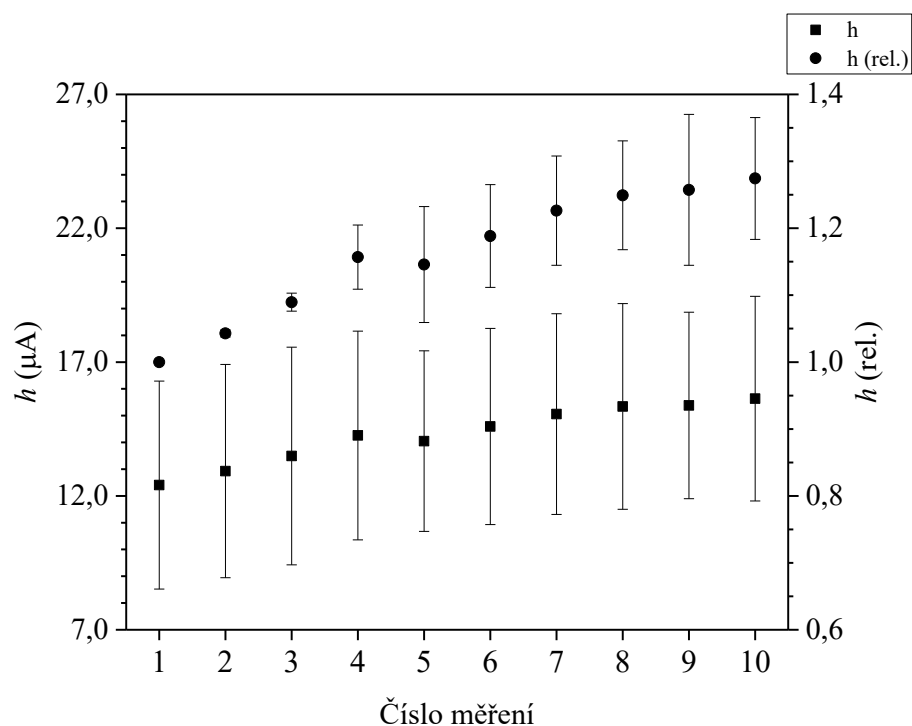
Obr. 4.1.5.1: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované v distálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 100 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$; $c_{\text{Phe}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



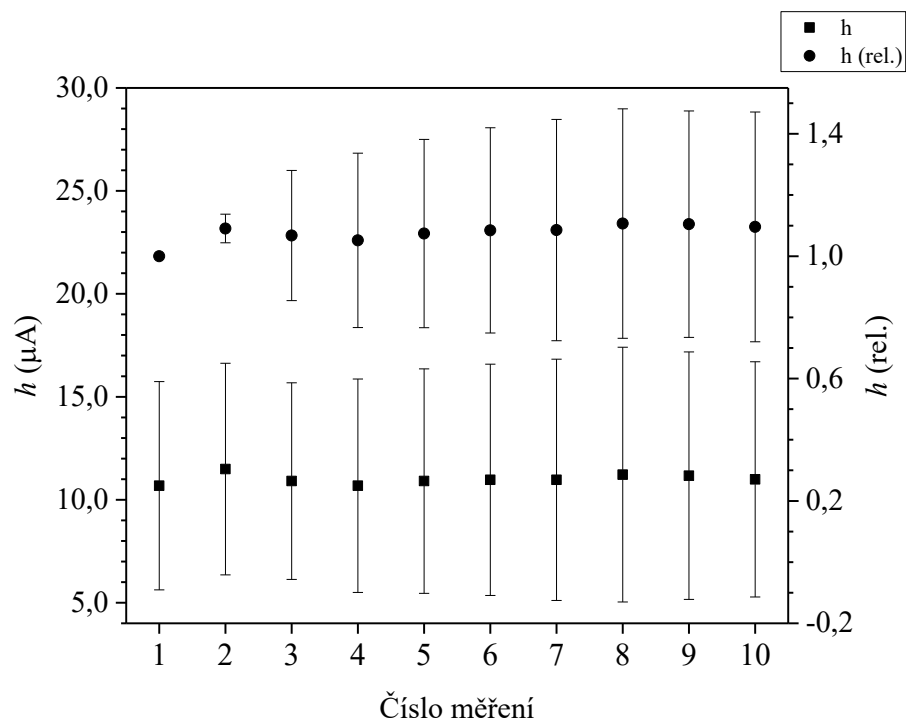
Obr. 4.1.5.2: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované v distálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.5.3: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované v distálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 300 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

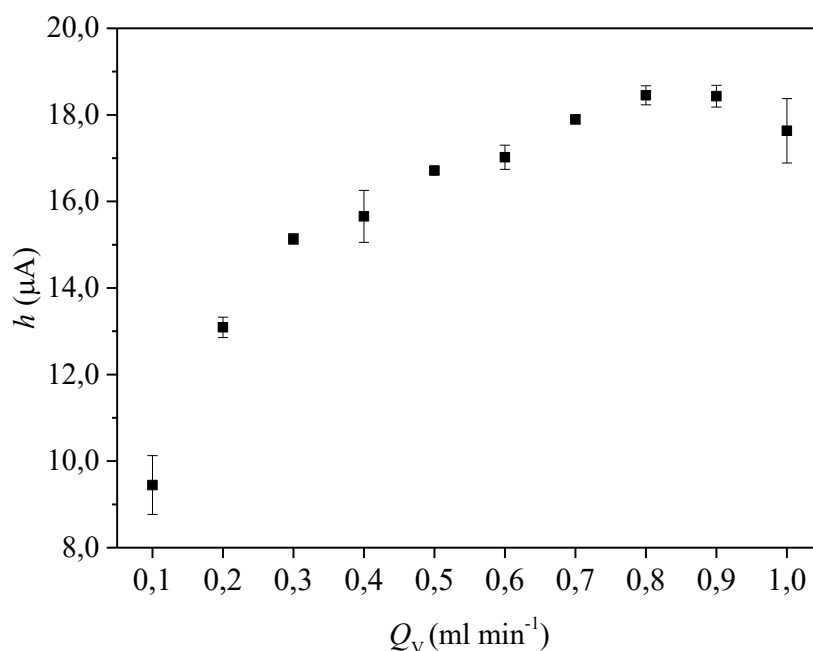


Obr. 4.1.5.4: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované v distálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 400 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Obr. 4.1.5.5: Závislost velikosti a poklesu odezvy elektrody modifikované v distálním uspořádání na fenylalanin v průběhu deseti měření ($m_{Cu} = 50 \text{ mg}$; $E_{det} = 500 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $pH = 6,80$; $c_{Phe} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Druhým optimalizovaným parametrem byla závislost velikosti signálu na objemovém průtoku nosného elektrolytu, viz obr. 4.1.5.6. Ta byla měřena v rozmezí od 0,1 ml min⁻¹ do 1,0 ml min⁻¹. Jako nejvhodnější byla použita hodnota 1,0 ml min⁻¹, byť zde nebyla hodnota nejvyšší. Tento bod byl zvolen na základě statistického porovnání mezi tímto a o jednu desetinu mililitru za minutu menším průtokem, které se mezi sebou významně statisticky nelišily. Také byl v úvahu vzat poznatek z měření závislosti na objemovém průtoku na elektrodě modifikované v sandwichovém uspořádání. Zároveň je možné, že při nejvyšším objemovém průtoku, který byl měřený jako první, nebyla elektroda v dostatečně stabilním stavu, což by naznačovala právě vyšší směrodatná odchylka než u ostatních bodů závislosti.



Obr. 4.1.5.6: *Závislost velikosti signálu elektrody modifikované v distálním uspořádání na průtoku nosného elektrolytu ($m_{Cu} = 50$ mg; $E_{det} = 200$ mV; 25 mmol dm⁻³ fosfátový pufr o pH = 6,80; $c_{Phe} = 1,0$ mmol dm⁻³)*

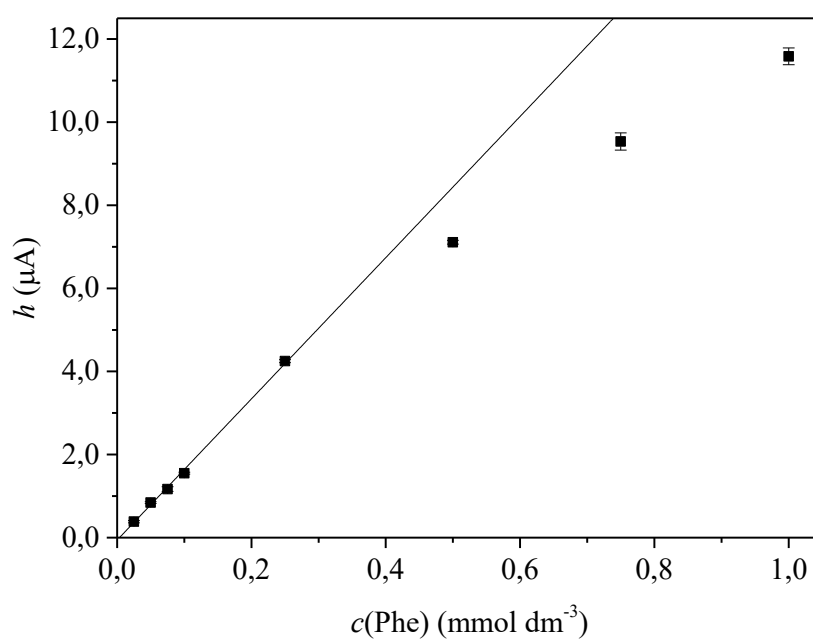
Posledním krokem bylo opět změření kalibrační závislosti fenylalaninu na této elektrodě. Tato závislost byla měřena v rozsahu koncentrací od 25,0 µmol dm⁻³ do 1,0 mmol dm⁻³. Jak lze vidět v grafu kalibrační závislosti na obr. 4.1.5.7., tato kalibrační závislost je lineární pouze v nízkých koncentracích. Při vyšších koncentracích dochází k výraznému odchýlení od linearity.

Výhodou modifikování elektrody v distálním uspořádání byl téměř pětkrát nižší

dosažený limit detekce, než tomu bylo u elektrody modifikované v sandwichovém uspořádání.

Tabulka 4.1.5.I.: Parametry kalibrační závislosti fenylalaninu získané na elektrodě modifikované v distálním uspořádání.

Směrnice	Úsek	R	LOD	LOQ
$16,99 \pm 0,54$	$-0,06 \pm 0,06$	0,998	$14,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$47,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$



Obr. 4.1.5.7: Kalibrační závislost fenylalaninu získaná na elektrodě modifikované v distálním uspořádání ($m_{\text{Cu}} = 50 \text{ mg}$; $E_{\text{det}} = 200 \text{ mV}$; $Q_V = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$; 25 mmol dm^{-3} fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,80$)

4.1.6 Stanovení lysinu v reálném vzorku

Pro ověření funkčnosti a použitelnosti připravených elektrod pro analýzu reálných vzorků byl vybrán komerčně dostupný léčivý přípravek HerpeNormTM s výrobcem deklarovaným obsahem lysinu 475 mg v jedné tabletě o celkové hmotnosti 0,6 g. Obsah lysinu ve vzorku byl stanovován metodou přidavku standardu. Jako pracovní elektroda byla vybrána elektroda v „sandwichovém“ uspořádání a elektroda v distálním uspořádání. Jako referenční metoda, pro ověření správnosti elektrochemického stanovení, byla vybrána spektrometrie ve viditelné oblasti za použití předřazené ninhydrinové reakce, kdy ninhydrin v přítomnosti aminokyselin poskytuje barevný produkt.

Jak je vidět v tabulce 4.1.6.I, za pomoci elektrochemického stanovení bylo dosahováno vyšší přesnosti stanovení s relativní směrodatnou odchylkou 1,2 % pro elektrodu v sandwichovém uspořádání, případně 2,5 % pro elektrodu v uspořádání distálním. Zároveň obsah stanovený pomocí elektrody v sandwichovém uspořádání se pohyboval blíže k výrobcem deklarované hodnotě než za použití distálně modifikované elektrody. Stanovení obsahu pomocí ninhydrinové metody bylo zatíženo největší relativní směrodatnou odchylkou, konkrétně 9,4 %. To bylo nejspíše způsobeno nerovnoměrným proběhnutím reakce lysinu s ninhydrinem nebo možným vnesením jiné chyby při provádění reakce. Zároveň tato metoda poskytovala hodnoty obsahu lysinu v přípravku nejbliže výrobcem deklarované hodnotě.

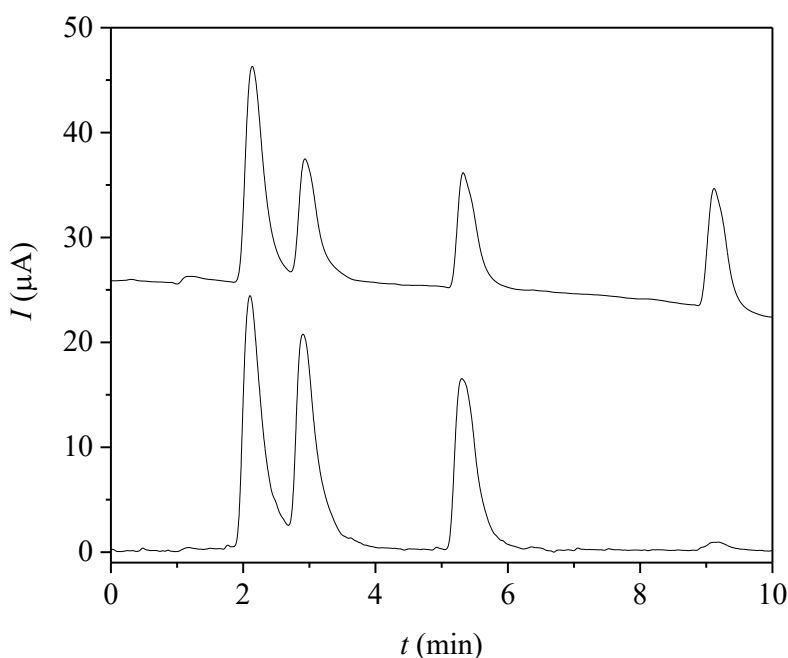
Tabulka 4.1.6.I: Obsah L-lysínu v přípravku HerpeNormTM stanovený jednotlivými metodami

	Stanovený obsah lysinu (mg)	Rozptyl (mg)	s_r	Relativní obsah lysinu
Sandwichové uspořádání	494,2	5,7	1,2 %	104,0 %
Distální uspořádání	442,0	10,9	2,5 %	93,1 %
Ninhydrinová metoda	482,8	45,3	9,4 %	101,6 %

Pozn.: Výrobcem deklarovaný obsah lysinu v tabletě byl 475 mg.

4.2 Modifikace rozměrů cely

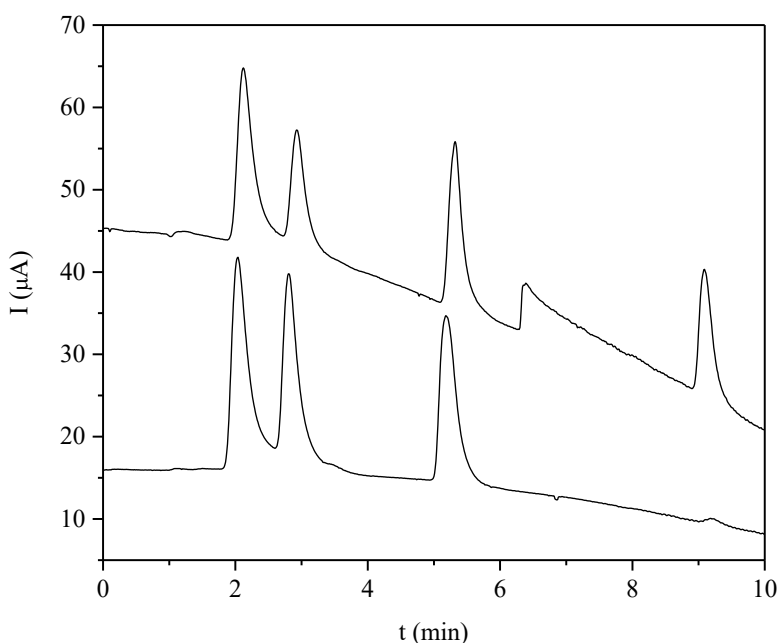
V této části práce jsou porovnávány výsledky získané na cele vytvořené metodou 3D tisku oproti těm naměřených na skleněné přepadové cele. K porovnání byly použity hydrodynamické voltamogramy a kalibrační závislosti antioxidantů propylgallátu, terciárního butylhydrochinonu, butylhydroxyanisolu a butylhydroxytoluenu, naměřené za podmínek optimalizovaných v předchozí práci [56]. Konkrétně šlo o gradientovou eluci s použitím methanolu, jehož obsah byl během osmi minut zvyšován z původních 55 % na konečných 95 % a následně byl tento obsah 2 minuty udržován. Zbylou část mobilní fáze tvořil acetátovo-fosfátový pufr o koncentraci 50 mmol dm^{-3} a $\text{pH} = 4,5$.



Obr. 4.2.2.1: Chromatogramy antioxidantů při potenciálech 0,80 V (dole) a 1,40 V (nahore) získaných na tištěné miniaturizované cele. (HPLC, kolona Lichrosper® RP-18, $125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; průtok MF $1,0 \text{ ml min}^{-1}$; gradientová eluce: Během osmi minut zvyšování obsahu methanolu z 55 % na 95 % a následně 2 minuty udržování 95% obsahu methanolu, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm^{-3} o $\text{pH} = 4,5$).

4.2.1 Chromatogramy

Na chromatogramech získaných na tištěné cele (obr. 4.2.2.1.) je možné pozorovat mnohem menší pokles základní linie vlivem změny poměru methanolu ku acetátovo-fosfátovému pufru v mobilní fázi, než tomu bylo na skleněné cele. Zároveň na tištěné cele nebyly pozorovány nepravidelnosti základní linie při použití detekčního potenciálu 1,40 V, z nichž jednu lze pozorovat při měření s komerční skleněnou celou přibližně v šesté až sedmé minutě chromatogramu (obr. 4.2.2.2.).



Obr. 4.2.2.2: Chromatogramy antioxidantů při potenciálech 0,80 V (dole) a 1,40 V (nahore) získaných na běžné skleněné přepadové cele. Převzato a upraveno z cit. [56]

Rozšíření píků, které je možné pozorovat při porovnání chromatogramů získaných na tištěné cele oproti těm získaným na cele skleněné, je zřejmě způsobeno separačním krokem, nikoliv detekčním. Při porovnání šířek píků v polovině jejich výšek bylo zjištěno, že tato hodnota získaná při UV detekci, která byla předřazena elektrochemické, pro antioxidanty byla při dřívějších měřeních 0,21 min pro PG a tBHQ, 0,22 min pro BHA a 0,20 min pro BHT. Hodnoty získané během nynějších měření byly 0,22 min pro PG, 0,25 min pro tBHQ a 0,27 min pro BHA a BHT. Současně s rozšířením píků došlo k mírnému poklesu jejich výšek. Z těchto důvodů nelze přesně určit, jak velký podíl změn na elektrochemické detekci je způsoben právě separačním krokem a jaký samotnou změnou geometrie detektoru.

V tabulce 4.2.1.I je porovnán vliv jednotlivých detekčních cel na rozšíření píků analytů. Jak lze z tabulky zjistit, při použití skleněné cely je rozšíření píku mnohem větší než u cely tištěné. Příkladem může být pík propylgallátu (PG), kdy při detekci ve skleněné cele došlo k rozšíření píku o 63 %, zatím co při použití tištěné cely došlo k rozšíření píku pouze o 23 %.

Tabulka 4.2.1.I: Relativní rozšíření píků na skleněné a tištěné cele

Skleněná cely				Tištěná cely			
PG	tBHQ	BHA	BHT	PG	tBHQ	BHA	BHT
1,63	1,29	1,43	1,33	1,23	0,96	1,06	1,06

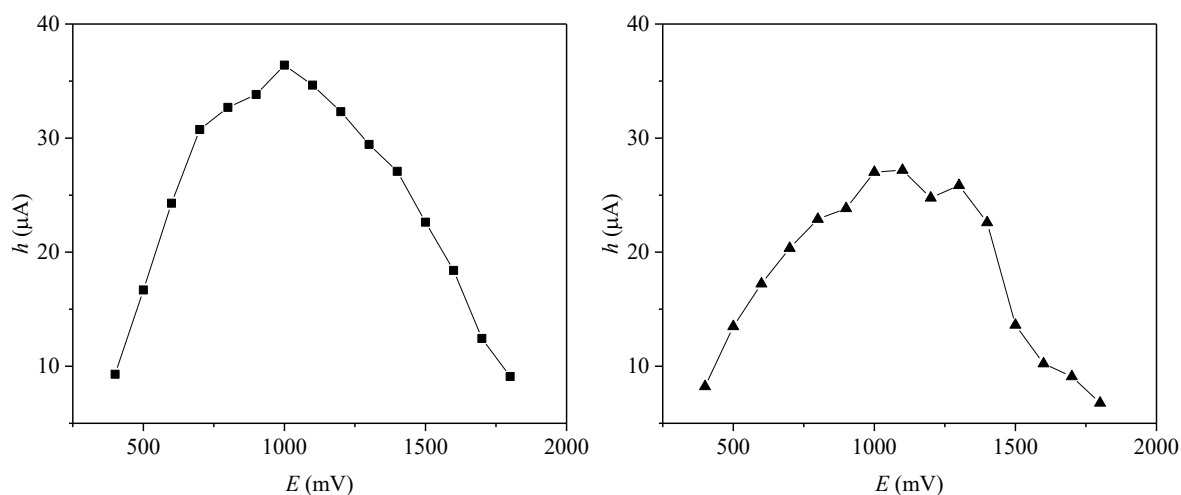
Pozn.: Poměry počítány jako $W_{0,5}(EC) / W_{0,5}(UV)$

4.2.2 Hydrodynamické voltamogramy

Pro zjištění možných změn závislosti velikosti odezvy na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy. Závislost byla sledována pouze při hodnotě pH 4,5, jakožto známé optimální hodnotě.

Na základě porovnání hydrodynamických voltamogramů získaných na skleněné cele a cele tištěné lze usoudit, že se změnou geometrie cely nedošlo k výrazným změnám v elektrochemickém chování analytů, jelikož maximální odezvy jednotlivých analytů se pohybují v přibližně stejných hodnotách vložených potenciálů na pracovní elektrodu.

Hydrodynamické voltamogramy PG (obr. 4.2.1.1.) mají obdobný průběh na tištěné cele v porovnání se skleněnou, liší se pouze proudovými hodnotami, což může být opět přisouzeno separačnímu kroku.



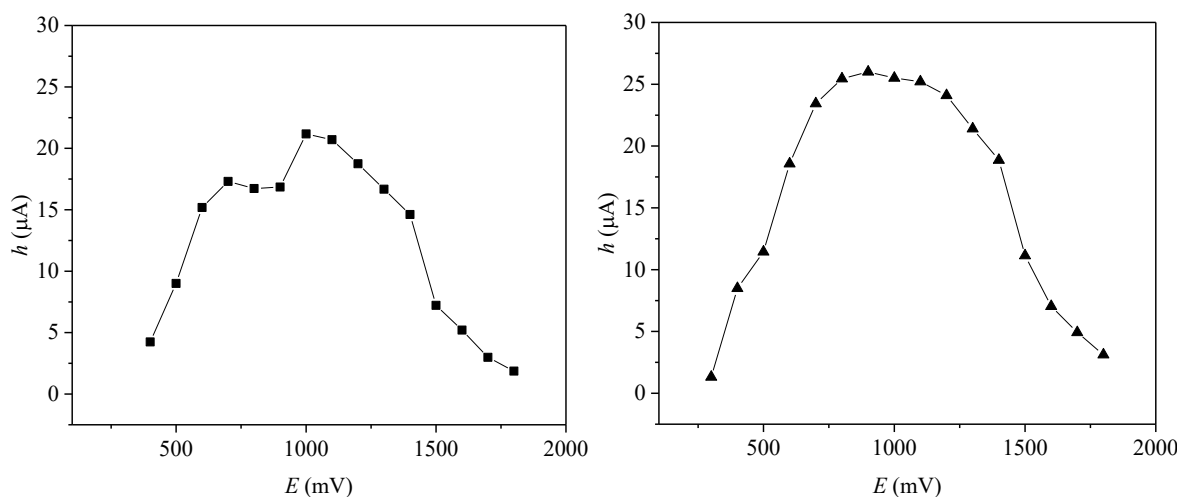
Obr. 4.2.1.1: Srovnání hydrodynamických voltamogramů PG získaných na tištěné cele (trojúhelníky) a komerční skleněné cele (čtverce, převzato a upraveno z [56]).

(HPLC, kolona Lichrosper® RP-18, 125 × 4 mm, 5 µm; průtok MF 1,0 ml min⁻¹; gradientová eluce byla následující: Během osmi minut zvyšování obsahu methanolu z 55 % na 95 % a následně 2 minuty udržování 95% obsahu methanolu, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm⁻³ o pH = 4,5).

K výraznější změně došlo pouze v případě tBHQ (obr. 4.2.1.2.), kde je možné si všimnout širší plató části hydrodynamického voltamogramu z tištěné cely v rozsahu potenciálů od 800 mV do 1100 mV, která při použití skleněné cely nebyla přítomna. Zároveň u tohoto analytu, jako jediného bylo pozorováno zvýšení odezvy na tištěné cele, což může být částečně přisuzováno separačnímu kroku, jak již bylo uvedeno výše.

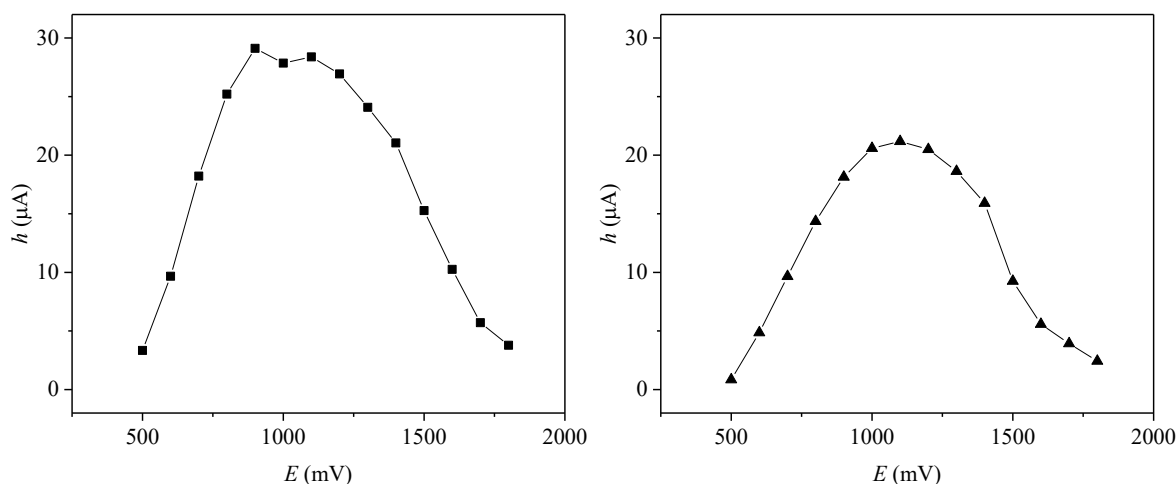
Hydrodynamický voltamogram BHA (obr. 4.2.1.3.) je mírně posunutý k vyšším detekčním potenciálům za současného snížení proudových odezev.

Hydrodynamické voltamogramy BHT (obr. 4.2.1.4.) jsou téměř identické jak pro skleněnou, tak tištěnou celu. Pouze u tohoto analytu došlo k posunu maximální odezvy z původních 1400mV na 1500 mV, což je nejspíše způsobeno samotným vysokým potenciálem vloženým na elektrodu.

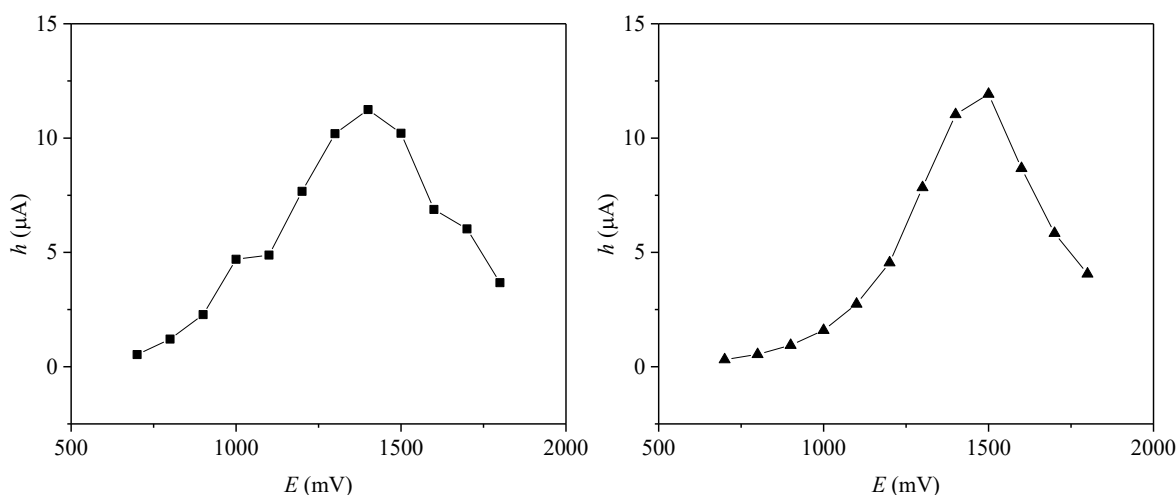


Obr. 4.2.1.2: Srovnání hydrodynamických voltamogramů tBHQ získaných na tištěné cele (trojúhelníky) a komerční skleněné cele (čtverce, převzato a upraveno z [56]).

(HPLC, kolona Lichrosper® RP-18, 125 × 4 mm, 5 μm; průtok MF 1,0 ml min⁻¹; gradientová eluce byla následující: Během osmi minut zvyšování obsahu methanolu z 55 % na 95 % a následně 2 minuty udržování 95% obsahu methanolu, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm⁻³ o pH = 4,5).



Obr. 4.2.1.3: Srovnání hydrodynamických voltamogramů BHA získaných na tištěné cele (trojúhelníky) a komerční skleněné cele (čtverce, převzato a upraveno z [56]). (HPLC, kolona Lichrosper® RP-18, 125 × 4 mm, 5 µm; průtok MF 1,0 ml min⁻¹; gradientová eluce byla následující: Během osmi minut zvyšování obsahu methanolu z 55 % na 95 % a následně 2 minuty udržování 95% obsahu methanolu, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm⁻³ o pH = 4,5).



Obr. 4.2.1.4: Srovnání hydrodynamických voltamogramů BHT získaných na tištěné cele (trojúhelníky) a komerční skleněné cele (čtverce, převzato a upraveno z [56]). (HPLC, kolona Lichrosper® RP-18, 125 × 4 mm, 5 µm; průtok MF 1,0 ml min⁻¹; gradientová eluce byla následující: Během osmi minut zvyšování obsahu methanolu z 55 % na 95 % a následně 2 minuty udržování 95% obsahu methanolu, zbylý objem tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm⁻³ o pH = 4,5).

4.2.3 Kalibrační závislosti

Dalším bodem pro porovnání dvou konstrukčně odlišných elektrochemických cel bylo porovnání kalibračních závislostí na těchto celách získaných.

Porovnáním směrnic kalibračních závislostí mezi skleněnou a tištěnou celou si lze povšimnout nižší citlivosti závislostí pro PG, tBHQ a BHA získaných na tištěné cele. Pokles hodnoty směrnice je nejvíce patrný u BHA, naopak u BHT došlo k mírnému zvýšení citlivosti. Porovnájí-li se hodnoty korelačních koeficientů, lze si všimnout vyšší přesnosti závislostí získaných na tištěné cele, zejména u BHT a BHA.

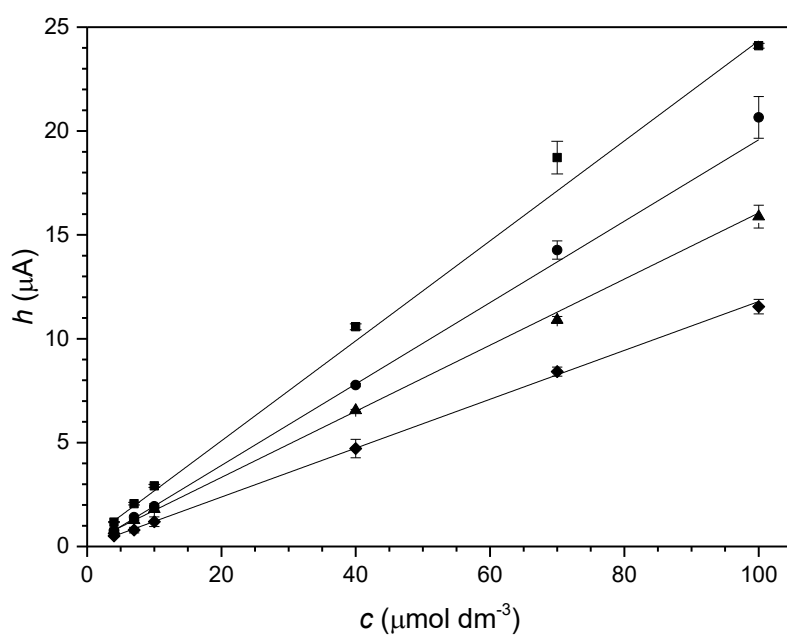
Dalším porovnávaným parametrem jsou limity detekcí a stanovení jednotlivých analytů. Všechny tyto hodnoty byly počítány jako hodnota šumu základní linie vynásobená třemi pro limit detekce, respektive deseti pro limit stanovení, a vydělená směrnicí kalibrační závislosti příslušící danému analytu. V této části došlo, kromě PG, k velmi malému poklesu všech hodnot, které byly ovlivněny změnou směrnic kalibračních závislostí, jelikož šum základní linie byl srovnatelný na obou celách. K největší změně došlo opět u BHT, který je detekován za odlišného potenciálu oproti zbylým analytům.

Tab 4.2.3.I: Parametry kalibračních závislostí antioxidantů získaných na tištěné miniaturizované cele

	E (V)	Směrnice ($\mu\text{A dm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (μA)	R	LOD ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	LOQ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)
PG		0,244	0,517	0,995	0,98	3,27
BHA	0,80	0,156	0,189	1,000	1,35	4,50
tBHQ		0,207	-0,151	1,000	1,16	3,87
BHT	1,40	0,117	0,040	0,999	1,79	5,97

Tab 4.2.3.II: Parametry kalibračních závislostí antioxidantů získaných na skleněné přepadové cele. Převzato a upraveno z cit. [56]

	E (V)	Směrnice ($\mu\text{A dm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (μA)	R	LOD ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	LOQ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)
PG		0,297	0,100	0,999	0,88	2,93
BHA	0,80	0,233	0,140	0,992	1,44	4,81
tBHQ		0,237	-0,110	0,999	1,21	4,04
BHT	1,40	0,108	-0,210	0,989	4,63	15,4



Obr. 4.2.3.1: Závislosti výšek pík antioxidantů na jejich koncentracích. Měřeno na miniaturizované cele. ($E_{det} = 0,80 \text{ V}$; kolona Lichrosper® RP-18, $125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; průtok MF $1,0 \text{ ml min}^{-1}$; gradientová eluce: Během 8 minut růst obsahu methanolu z 55 % na 95 %, následně 2 minuty udržování 95% obsahu, zbytek tvořil acetátovo-fosfátový pufr 50 mmol dm^{-3} o $\text{pH} = 4,5$).

Čtverce – PG, kolečka – tBHQ, trojúhelníky – BHA, kosočtverce – BHT

5 Závěr

5.1 Modifikace elektrody z uhlíkové plsti

Cílem modifikací uhlíkové plsti pomocí mědi bylo vytvoření elektrochemického detektoru vhodného pro detekci elektrochemicky neaktivních aminokyselin. Jako první technika bylo použito potenciostatické vylučování kovové mědi z roztoku síranu měďnatého a síranu sodného. U všech variant uspořádání došlo k pokovení zejména části plsti v přímém kontaktu s elektrolytem v měrné nádobce, zatímco vnitřní struktura byla pokovena minimálně, případně vůbec, a celková hmotnost nanesené mědi dosahovala pouze jednotek miligramů. Při použití takto modifikovaných elektrod pro detekci fenylalaninu bylo dosahováno velmi nízkých odezev, pravděpodobně v souvislosti s nedostatečným množstvím mědi pro tento způsob detekce.

Dále bylo proto přistoupeno k nanášení měděných mikročástic na uhlíkovou plst pouze mechanicky. Před použitím bylo třeba měděné mikročástečky aktivovat kyselinou dusičnou o koncentraci 80 mmol dm^{-3} , pro odstranění povrchové vrstvy oxidů. Elektroda modifikovaná nanášením pomocí míchání plsti v suspenzi mikročástic mědi neposkytovala dostatečně stabilní odezvu elektrody na fenylalanin, kdy během deseti měření došlo k poklesu signálu o přibližně 50 %, zřejmě kvůli nedostatečnému množství mědi na plsti, zároveň zde byla nízká reprodukovatelnost v jejím nanášení. U elektrody modifikované v distálním uspořádání lze problémy s nízkou reprodukovatelností vysvětlit vytlačení částí mědi plochou ferulí mimo kontakt s elektrolytem. Elektrody modifikované v distálním a v sandwichovém uspořádání poskytovaly mnohem větší stabilitu, kdy za optimálních podmínek na ně bylo nanášeno 50 mg měděných mikročástic. Zajímavostí je rozdíl v detekčních potenciálech vkládaných na tyto elektrody, kdy na elektrodu modifikovanou v distálním uspořádání byl vkládán potenciál o 100 mV menší než na elektrodu modifikovanou v sandwichovém uspořádání. To lze nejspíše vysvětlit rostoucí vzdáleností mědi od platinového kontaktu v těle elektrody a tím i rostoucím odporem.

Poslední jmenované elektrody byly použity k analýze reálného vzorku HerpeNormTM s obsahem lysinu 475 mg v tabletě. Jako referenční metoda byla vybrána spektrofotometrie ve viditelné oblasti za použití předcházející ninhydrinové reakce. Všechny tyto metody poskytly výsledky velmi se blížíci výrobcem deklarované hodnotě. Zároveň u elektrochemických stanovení byly nejmenší směrodatné odchylky, a to zřejmě díky odstranění vlivu derivatizační reakce, ve které se u spektrometrické detekce mohly vyskytovat chyby způsobené nerovnoměrným proběhnutím reakce nebo pipetováním.

5.2 Modifikace rozměrů cely

Cílem této části práce bylo porovnání skleněné a tištěné elektrochemické cely. Jako modelový systém sloužila detekce syntetických antioxidantů zpracovávaných již v bakalářské práci [56], odkud byly převzaty i optimální separační podmínky.

Jedním z parametrů pro porovnání byly hydrodynamické voltamogramy. Zde nebyly patrné významné změny. Rozdíly v podobě drobných změn ve výškách a šířkách píků a směrnicích kalibračních závislostí lze připsat změnám v chromatografické části stanovení.

K významným změnám došlo při porovnání vlivu elektrochemické detekce na rozšíření píků analytů vůči šířkám získaných pomocí UV detekce, kdy na tištěné cele byl vliv na rozšíření píků minimální oproti skleněné cele, kde docházelo k rozšíření píku i o 60 % jeho původní hodnoty.

Dalším benefitem tištěné cely bylo vymizení nepravidelnosti základní linie v podobě neznámého píku, snížení šumu základní linie a zároveň téměř k vymizení jejího driftu, a to zejména při vyšším potenciálu, v důsledku toho u BHT došlo ke snížení limitu detekce z původních $15,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na $5,97 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Výše uvedené změny lze přičíst nejspíše kratším vzdálenostem mezi všemi elektrodami a tím snížení překonávaného odporu.

Na základě těchto poznatků lze říci, že tištěná cela poskytuje dostatečné benefity oproti skleněné cele a úpravy elektrochemických cel pomocí metody 3D tisku jsou více než vhodné pro jejich využití v laboratoři.

6 Seznam použité literatury

1. Wu G., *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition*. Amino Acids, 2009. **37**(1): p. 1-17.
2. Nelson D. L. a Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6 ed. 2013, New York.
3. Graff M., *Phenylalanine Dietary Sources, Functions and Health Effects*, in *Chemistry Research and Applications*, D. Williamson, Editor. 2015, Nova Science Publishers, Inc.: New York. p. 1-25.
4. Hall C. J. a da Costa T. P. S., *Lysine: biosynthesis, catabolism and roles*. WikiJournal of Science, 2018. **1**(1): p. 1.
5. Dostupné z: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (21.2.2019)
6. Dalton J. B. a Schmidt C. L., *The solubilities of certain amino acids in water, the densities of their solutions at twenty-five degrees, and the calculated heats of solution and partial molal volumes*. Journal of Biological Chemistry, 1933. **103**(2): p. 549-578.
7. Pappa-Louisi A., Agrafiotou P. a Sotiropoulos S., *Advances in Liquid Chromatographic and Voltammetric Analysis of Underivatized Amino Acids*. Current Organic Chemistry, 2010. **14**(19): p. 2235-2246.
8. Malmström B. G. a Leckner J., *The chemical biology of copper*. Current Opinion in Chemical Biology, 1998. **2**(2): p. 286-292.
9. Polanuer B. M. a Ivanov S. V., *High-performance liquid chromatography of amino acids in copper (II) complex form: application to valine fermentation samples*. Journal of Chromatography A, 1996. **722**(1-2): p. 311-315.
10. Kubičková A., Kubiček V. a Coufal P., *UV–VIS detection of amino acids in liquid chromatography: Online post-column solid-state derivatization with Cu (II) ions*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(22): p. 3131-3135.
11. Barrett G., *Chemistry and biochemistry of the amino acids*. 2012: Springer Science & Business Media.
12. Ahmed H., *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*. 2005: CRC press New York:.
13. Herzog G. g. a Arrigan D. W. M., *Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides and proteins*. Analyst, 2007. **132**(7): p. 615.
14. Köhler C., Bleck L., Frei M., Zengerle R. a Kerzenmacher S., *Poisoning of highly porous platinum electrodes by amino acids and tissue fluid constituents*. ChemElectroChem, 2015. **2**(11): p. 1785-1793.
15. Guo Y., Guo S., Fang Y. a Dong S., *Gold nanoparticle/carbon nanotube hybrids as an enhanced material for sensitive amperometric determination of tryptophan*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(12): p. 3927-3931.

16. Luo P., Zhang F. a Baldwin R. P., *Comparison of metallic electrodes for constant-potential amperometric detection of carbohydrates, amino acids and related compounds in flow systems*. *Analytica Chimica Acta*, 1991. **244**: p. 169-178.
17. Labuda J., Meister A., Gläser P. a Werner G., *Metal oxide-modified carbon paste electrodes and microelectrodes for the detection of amino acids and their application to capillary electrophoresis*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998. **360**(6): p. 654-658.
18. Li L. a Lafdi K., *Nickel modification of carbon nanotubes grown on graphite for electrochemical sensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. **132**(1): p. 202-208.
19. Sato K., Jin J.-Y., Takeuchi T., Miwa T., Takekoshi Y., Kanno S. a Kawase S., *Nickel–titanium alloy electrodes for stable amperometric detection of underivatized amino acids in anion-exchange chromatography*. *Talanta*, 2001. **53**(5): p. 1037-1044.
20. Mho S.-I. a Johnson D. C., *Electrocatalytic response of amino acids at Cu□ Mn alloy electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001. **495**(2): p. 152-159.
21. Welch L. E., LaCourse W. R., Mead D. A., Johnson D. C. a Hu T., *Comparison of pulsed coulometric detection and potential-sweep-pulsed coulometric detection for underivatized amino acids in liquid chromatography*. *Analytical Chemistry*, 2002. **61**(6): p. 555-559.
22. Hasanzadeh M., Karim-Nezhad G., Shadjou N., Hajjizadeh M., Khalilzadeh B., Saghatforoush L., Abnosi M. H., Babaei A. a Ershad S., *Cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode as a biosensor for electrooxidation and determination of some amino acids*. *Analytical Biochemistry*, 2009. **389**(2): p. 130-137.
23. Carvalho R. C., Mandil A., Prathish K. P., Amine A. a Brett C. M. A., *Carbon Nanotube, Carbon Black and Copper Nanoparticle Modified Screen Printed Electrodes for Amino Acid Determination*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(4): p. 903-913.
24. Paleček E., Tkáč J., Bartošík M., Bertók T., Ostatná V. a Paleček J., *Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics*. *Chemical Reviews*, 2015. **115**(5): p. 2045-2108.
25. Salimi A. a Hallaj R., *Catalytic oxidation of thiols at preheated glassy carbon electrode modified with abrasive immobilization of multiwall carbon nanotubes: applications to amperometric detection of thiocytosine, -cysteine and glutathione*. *Talanta*, 2005. **66**(4): p. 967-975.
26. Zen J.-M., Hsu C.-T., Senthil Kumar A., Lyuu H.-J. a Lin K.-Y., *Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes*. *Analyst*, 2004. **129**(9): p. 841.
27. Pauliukaite R., Pinto E. M., Amine A. a Brett C. M. A., *Voltammetric Sensing of Amino Acids in the Presence of Cu(II) in Acidic and Alkaline Solutions*. *Electroanalysis*, 2012. **24**(5): p. 1047-1055.

28. Štulík K. a Pacáková V., *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. 1989: SNTL-Nakladatelství technické literatury.
29. Nan C. G., Feng Z. Z., Li W. X., Ping D. J. a Qin C. H., *Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin*. *Analytica Chimica Acta*, 2002. **452**(2): p. 245-254.
30. Li C., Ya Y. a Zhan G., *Electrochemical investigation of tryptophan at gold nanoparticles modified electrode in the presence of sodium dodecylbenzene sulfonate*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010. **76**(1): p. 340-345.
31. Ye D., Luo L., Ding Y., Liu B. a Liu X., *Fabrication of Co₃O₄ nanoparticles-decorated graphene composite for determination of l-tryptophan*. *Analyst*, 2012. **137**(12): p. 2840.
32. Luo J., Jiang S., Zhang H., Jiang J. a Liu X., *A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **709**: p. 47-53.
33. Ding H.-Y., Zhou Y., Zhang S.-J., Yin X.-B., Li Y.-J. a He X.-W., *Preparation of Nano-Copper Modified Glassy Carbon Electrode and Its Catalytic Oxidation to Glucose*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008. **36**(6): p. 839-842.
34. Boopathi M., Won M.-S. a Shim Y.-B., *A sensor for acetaminophen in a blood medium using a Cu(II)-conducting polymer complex modified electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **512**(2): p. 191-197.
35. Casella I. G., Cataldi T. R. I., Guerrieri A. a Desimoni E., *Copper dispersed into polyaniline films as an amperometric sensor in alkaline solutions of amino acids and polyhydric compounds*. *Analytica Chimica Acta*, 1996. **335**(3): p. 217-225.
36. Xu H., Zhang W., Zhu W., Wang D., Ye J., Yamamoto K. a Jin L., *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine and methionine in hypothyroid patients' plasma by liquid chromatography using platinum/poly(methyl violet) modified electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **545**(2): p. 182-188.
37. Zouaoui A., Stéphan O., Carrier M. a Moutet J.-C., *Electrodeposition of copper into functionalized polypyrrole films*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999. **474**(2): p. 113-122.
38. Huang K.-J., Xu C.-X., Xie W.-Z. a Wang W., *Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009. **74**(1): p. 167-171.
39. Frith K. A. a Limson J. L., *pH tuning of Nafion® for selective detection of tryptophan*. *Electrochimica Acta*, 2009. **54**(13): p. 3600-3605.
40. Bard A. J., Faulkner L. R., Leddy J. a Zoski C. G., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Vol. 2. 1980: Wiley New York.

41. Tóth K., Stulík K., Kutner W., Fehér Z. a Lindner E., *Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: Characterization and classification (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2004. **76**(6): p. 1119-1138.
42. Fleet B. a Little C., *Design and evaluation of electrochemical detectors for HPLC*. Journal of Chromatographic Science, 1974. **12**(12): p. 747-752.
43. Cvačka J., Opekar F., Barek J. a Zima J., *An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography*. Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 2000. **12**(1): p. 39-43.
44. Wang J., *Analytical electrochemistry*. 2006: John Wiley & Sons.
45. Castañeda L. F., Walsh F. C., Nava J. L. a de Leon C. P., *Graphite felt as a versatile electrode material: Properties, reaction environment, performance and applications*. Electrochimica Acta, 2017. **258**: p. 1115-1139.
46. Chen G. N., Liu J. S., Duan J. P. a Chen H. Q., *Coulometric detector based on porous carbon felt working electrode for flow injection analysis*. Talanta, 2000. **53**(3): p. 651-660.
47. Dejmková H., Baroch M., Krejčová M., Barek J. a Zima J., *Coulometric detector based on carbon felt*. Applied Materials Today, 2017. **9**: p. 482-486.
48. Ma L., Zhou M., Ren G., Yang W. a Liang L., *A highly energy-efficient flow-through electro-Fenton process for organic pollutants degradation*. Electrochimica Acta, 2016. **200**: p. 222-230.
49. Pérez J., Llanos J., Sáez C., López C., Cañizares P. a Rodrigo M., *Electrochemical jet-cell for the in-situ generation of hydrogen peroxide*. Electrochemistry Communications, 2016. **71**: p. 65-68.
50. Bae C., Chakrabarti H. a Roberts E., *A membrane free electrochemical cell using porous flow-through graphite felt electrodes*. Journal of Applied Electrochemistry, 2008. **38**(5): p. 637-644.
51. Agüí L., Yáñez-Sedeno P. a Pingarrón J., *Preparation and characterization of a new design of carbon-felt electrode for phenolic endocrine disruptors*. Electrochimica Acta, 2006. **51**(12): p. 2565-2571.
52. Davies T. J., *Anodic stripping voltammetry with graphite felt electrodes for the trace analysis of silver*. Analyst, 2016. **141**(15): p. 4742-4748.
53. Vránová E., *Stanovení aminokyselin pomocí coulometrického detektoru s výměnnou náplní*. 2016, Univerzita Karlova: Praha.
54. Mika J., Barek J., Zima J., Prokešová E. a Dejmková H., *Comparison of Glassy Carbon and Copper Microparticles As a Renewable Working Electrode Material for Amperometric Determination of Amino Acids Using Flow Through Detector*. Electroanalysis.

55. Beckwith A. C., Paulis J. W. a Wall J. S., *Direct estimation of lysine in corn meals by the ninhydrin color reaction*. Journal of agricultural and food chemistry, 1975. **23**(2): p. 194-196.
56. Baroch M., *Stanovení syntetických antioxidantů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na detektoru z uhlíkové plsti*. 2017, Univerzita Karlova: Praha.