**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra analytické chemie**

Studijní program: Analytická chemie

**Mgr. Jan Mika**

# VÝVOJ A POUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉHO PRŮTOKOVÉHO DETEKTORU S OBNOVITELNOU NÁPLNÍ

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL FLOW–THROUGH DETECTOR WITH RENEWABLE WORKING MATERIAL

Disertační práce

**Praha, 2019**

Školitel: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem 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 v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 5.9.2019 Mgr. Jan Mika

Podpis:

Tato disertační práce je založena na experimentech provedených na Univerzitě Karlově v Praze, Přírodovědecké fakultě, Katedře analytické chemie, UNESCO laboratoř environmentální elektrochemie v období od roku 2012 do roku 2017. Během tohoto období byla úspěšně absolvována zahraniční výzkumná stáž na National School of Public Health, FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhoes, 1480 – Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil, pod vedením prof. Josino Costa Moreira.

Tímto bych rád vyjádřil poděkování všem, kteří podpořili můj výzkum během této doby. Zejména bych chtěl poděkovat své vedoucí **RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D.** a mému školiteli **prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc.**, za veškerou pomoc a odborné vedení. Kromě nich bych rád jmenovitě poděkoval i jiným členům Katedry analytické chemie, a to **prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a RNDr. Karolíně Schwarzové, Ph.D.**, za odborné připomínky a cenné rady a postřehy, které obohatily tuto disertační práci. Dále bych chtěl rovněž poděkovat všem členům Katedry analytické chemie za pomoc a příjemné prostředí, které mi poskytovali v průběhu celého mého doktorského studia. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, přátelům, kolegům a zejména manželce MUDr. Janě Školové za veškerou podporu během celého mého studia.

Děkuji za finanční podporu mé práce následujícím organizacím a projektům: Brasil CAPEC (projekt BR 136/2012), GAUK (projekt 2013–84213), SVV a GAČR (projekty P206/12/G151, P242/15/02815S a 17-03868 S).

# ABSTRAKT

Tato disertační práce byla věnována vývoji a základnímu testování nového porézního elektrochemického detektoru pro průtoková uspořádání, zejména pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a kapalinovou chromatografii. Hlavní předností tohoto detektoru je snadná obnova pracovního materiálu, detektor je tak zejména vhodný pro stanovení silně pasivujících látek. Jako pracovní materiál byly v rámci této práce vyzkoušeny mikrokuličky skelného uhlíku a mikročástice mědi.

Nejprve byly otestovány základní elektrochemické vlastnosti detektoru na bázi skelného uhlíku při stanovení modelových látek hydrochinonu a hexakyanoželeznatanu draselného metodou FIA. Detektor pro obě modelové látky dosahoval vysokého stupně konverze okolo 100% a je ho tedy možné označit za coulometrický.

Práce dále představuje možné praktické aplikace detektoru na bázi uhlíku stanovením pěti elektrochemicky aktivních látek úzce spjatých s lidským lékařstvím a farmacií – thymolu, tyrosinu, sulfamethizolu a vanilmandlové kyseliny (VMA) simultánně s homovanilovou kyselinou (HVA). Instrumentální náročnost použitých metod byla postupně navyšována až k HPLC stanovení s gradientovým programem. Tím bylo prokázáno, že detektor je možné použít v praxi pro všechny běžné aplikace. Pro všechny sledované látky bylo dosaženo obdobných limitů detekce jako v případě běžně používaných metod stanovení. Detektor vykazoval lineární průběh všech kalibračních závislostí od 100 μmol $L^{-1}$ do limitu kvantifikace 0,97 μmol $L^{-1}$ pro thymol, 1,60 μmol $L^{-1}$ pro tyrosin, 0,04 μmol $L^{-1}$ pro sulfamethizol, 1,31 μmol $L^{-1}$ pro HVA a 0,65 μmol $L^{-1}$ pro VMA.

Výsledky stanovení tyrosinu byly v rámci této disertační práce dále použity pro porovnání detektoru na bázi mikrokuliček skelného uhlíku s detektorem plněným mikročásticemi mědi. Klasické elektrochemické stanovení bylo tedy porovnáno s detekcí založenou na komplexotvorné reakci. Na tomto porovnání bylo prokázáno, že detektor je kromě skelného uhlíku možné s výhodou plnit i kovovými mikročásticemi.

Výsledky měření tyrosinu na skelném uhlíku byly porovnány s výsledky stanovení alaninu a fenylalaninu na mědi. Kalibrační křivky vykazovaly lineární průběh v celém rozsahu pouze při jejich vyhodnocení z ploch píků. Lineární dynamický rozsah byl v tomto případě od 1000 μmol $L^{-1}$ do limitu kvantifikace – 13,5 μmol $L^{-1}$ pro alanin a 4,7 μmol $L^{-1}$ pro fenylalanin.

# ABSTRACT

The aim of this thesis was development and initial testing of new porous electrochemical detector for flow-through arrangements, especially for flow injection analysis (FIA) and liquid chromatography. One of the most advantageous properties of the detector is simple renewal of working material and thus its suitability for determination of strongly passivating substances. Glassy carbon microbeads and copper microparticles were tested as a working material within this study.

Initially, basic electrochemical properties of the glassy carbon-based detector were examined by FIA using hydroquinone and potassium ferrocyanide as model substances. For both model substances high degree of conversion was achieved (around 100 %), and thus it was concluded that glassy carbon-based detector can be considered as coulometric.

Hereafter, practical application of the carbon-based detector are presented on five electrochemically active substances closely related to the human medicine and pharmacy – thymol, tyrosine, sulfamethizole and vanillylmandelic acid (VMA) simultaneously determinined with homovanillic acid (HVA). Complexity of instrumental arrangement of flow-through methods had been increasing consecutively up to the HPLC determination with gradient programme. It was proved that the carbon-based detector is suitable for all common practical applications. For all above mentioned substances, achieved limits of quantification were in compliance with those usually obtained by commonly used methods of determination. Linearity of all calibration dependences was observed in whole examined concentration range, i.e. from 100 μmol $L^{-1}$ to individual limit of quantification: 0.97 μmol $L^{-1}$ for thymol, 1.60 μmol $L^{-1}$ for tyrosine, 0.04 μmol $L^{-1}$ for sulfamethizole, 1.31 μmol $L^{-1}$ for HVA and 0.65 μmol $L^{-1}$ for VMA.

Results of tyrosine determination were further used for the comparison of glassy carbon microbeads-based detector and detector filled with copper microparticles. Common electrochemical determination was thus compared to the detection based on complexing reaction. Possibility of advantageous use of metal microparticles as working material for developed electrochemical detector was confirmed.

Tyrosine results obtained by determination on glassy carbon-based detector were compared to results of alanine and phenylalanine determination using copper microparticles-based detector. Obtained calibration dependences were linear in whole tested range only in case of peak area evaluation. Linear dynamic range was in interval of 1000 μmol $L^{-1}$ to individual quantitation limit – 14.0 μmol $L^{-1}$ for alanine and 4.7 μmol $L^{-1}$ for phenylalanine.

## Klíčová slova:

Coulometrická detekce

Obnovitelný pracovní materiál

Porézní detektor

Skelný uhlík

Měděná elektroda

HPLC

Průtoková injekční analýza

## Key words:

Coulometric detection

Renewable working material

Porous detector

Glassy carbon

Copper electrode

HPLC

Flow injection analysis

# OBSAH

Seznam použitých zkratek ..... 7
Seznam použitých symbolů ..... 7
1. Úvod ..... 9
1.1. Výchozí stav studované problematiky ..... 9
1.2. Cíl práce ..... 11
2. Analyty se silným vlivem na historii elektrody ..... 13
3. Průtokové porézní detektory ..... 23
4. Detektory s obnovitelným pracovním materiálem ..... 31
5. Měď jako elektrodový materiál ..... 36
6. Výsledky a diskuze ..... 40
6.1. Detektor na bázi skelného uhlíku ..... 40
6.2. Aplikace detektoru na bázi mikročástic skelného uhlíku ..... 45
6.3. Porovnání detektoru na bázi uhlíku a mědi ..... 47
6.4. Výsledky stanovení aminokyselin ..... 49
7. Závěr ..... 52
8. Příloha I ..... 54
PRACOVNÍ ELEKTRODA, COULOMETRICKÝ DETEKTOR a ZPŮSOB VÝMĚNY PRACOVNÍHO MATERIÁLU ..... 54
9. Příloha II ..... 65
NEW FLOW–THROUGH COULOMETRIC DETECTOR WITH RENEWABLE WORKING EELECTRODE MATERIAL FOR FLOW INJECTION ANALYSIS AND HPLC ..... 65
10. Příloha III ..... 73
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HOMOVANILLIC AND VANILLYLMANDELICACID BY HPLC USINGDETECTOR WITH RENEWABLE CARBON WORKING MATERIAL ..... 73
11. Příloha IV ..... 80
PRACOVNÍ ELEKTRODA S OBNOVITELNOU NÁPLNÍ, ELEKTRODOVÝ SYSTÉM A AMPEROMETRICKÝ DETEKTOR JI OBSAHUJÍCÍ ..... 80
12. Příloha V ..... 89
COMPARISON OF GLASSY CARBON AND COPPER MICROPARTICLES AS A ELECTRODE MATERIAL FOR AMPEROMETRIC DETERMINATION OF AMINO ACIDS USING FLOW THROUGH DETECTOR ..... 89
13. Příloha VI ..... 96
14. Příloha VII ..... 97
A. Seznam publikací ..... 97
B. Seznam orálních prezentací ..... 98
C. Seznam posterových prezentací ..... 99
D. Seznam patentů a užitných vzorů ..... 99

# Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---|
| AK | aminokyselina |
| API | aktivní farmaceutická substance |
| CPE | uhlíková pastová elektroda |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| ED | elektrochemická detekce |
| FIA | průtoková injekční analýza |
| GC | plynová chromatografie |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HVA | homovanilová kyselina |
| LoQ | limit kvantifikace |
| MS | hmotnostní spektometrie |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |
| RVC | reticular vitreous carbon |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| VMA | vanilmandlová kyselina |

# Seznam použitých symbolů

| | |
|---|---|
| $A$ | povrch elektrody |
| $a$ | sklon logaritmické závislosti rozsahu limitního proudu |
| $B$ | konstanta ($B = jsLu_0^{-2/3}$) |
| $b$ | konstanta popisující detektor |
| $c_0$ | počáteční koncentrace analytu |
| $c_L$ | koncentrace elektroaktivní látky v roztoku při výstupu z porézní elektrody |
| $\overline{c^*}$ | bezdimensionální koncentrace nezreagovaného analytu opouštějícího porézní elektrodu |
| $D$ | difusní koeficient |
| $F$ | Faradayova konstanta |
| $f$ | radiální koordinát v trubici |
| $g$ | poloměr sférické nebo cylindrické částice |
| $I_{lim}$ | limitní proud |
| $J$ | difuzní rychlost přenosu hmoty |

| | |
|---|---|
| $j$ | konstanta difuzního toku přenosu hmoty |
| $J_c$ | difuzní rychlost přenosu hmoty pro cylindrické částice |
| $J_s$ | difuzní rychlost přenosu hmoty pro sférické částice |
| $k$ | konstanta, která je funkcí plochy průřezu elektrody, objemu pórů elektrody a zakřivení otevřeného prostoru elektrody |
| $\bar{k}$ | průměrný koeficient přenosu hmoty |
| $\bar{k}_c$ | průměrný koeficient přenosu hmoty pro cylindrické částice |
| $\bar{k}_l$ | lokální průměrný koeficient přenosu hmoty |
| $\bar{k}_s$ | průměrný koeficient přenosu hmoty pro sférické částice |
| $L$ | celková délka elektrody |
| $n$ | počet vyměněných elektronů |
| $p$ | vnitřní plocha porézní elektrody |
| $R$ | stupeň konverze |
| $r$ | poloměr trubice |
| $R_{eff}$ | specifická ohmická resistence |
| $s$ | specifická plocha povrchu |
| $u$ | průtoková rychlost |
| $u_0$ | průtoková rychlost uprostřed trubice |
| $v$ | objemová průtoková rychlost |
| $z$ | bezdimensionální koordinát |
| $\Delta\phi$ | rozdíl potenciálů |
| $\phi_E$ | potenciál pracovního materiálu elektrody |
| $\phi$ | potenciál roztoku |

# 1. Úvod

Tato disertační práce byla vypracována v rámci dlouhodobého výzkumu v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí v Praze s cílem vyvinout nový elektrochemický detektor s obnovitelnou pracovní náplní na bázi uhlíkových mikročástic a kovových prášků pro průtokové metody (zejména průtokovou injekční analýzu (FIA) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC)), vyvinout způsob výměny pracovního materiálu a popsat základní elektrochemické vlastnosti a možné aplikace tohoto nově vyvinutého detektoru.

Práce je založena na třech přikládaných vědeckých publikacích **[1-3]**, jednom patentu **[4]** a jednom užitném vzoru **[5]**, které tvoří součást práce jako přílohy I až V (kapitola 6–10). Publikace a další práce, které jsou součástí této disertační práce, jsou mezi citacemi zvýrazněny podtrženým a tučným formátem textu.

## 1.1. Výchozí stav studované problematiky

Stanovení obsahu a čistoty látek v proudu kapalin má celou řadu výhod oproti vsádkovému uspořádání. Zejména jde o možnost jejich snadné automatizace a možnost jejich použití v kontinuálních provozech. Dominantní postavení v mnoha průmyslových odvětvích má zejména HPLC technika, díky tomu jde také o jednu ze zásadních kapitol moderní analytické chemie [6]. Kromě HPLC našly průmyslové uplatnění i další průtokové techniky, jako je například FIA, která má poměrně nenáročnou instrumentaci a velmi rychlá stanovení [7].

Průtokové metody se používají v kombinaci s různými detekčními technikami [6]. Ty lze volit dle chemických vlastností stanovované látky nebo dle druhu matrice. Na druhou stranu jsou na použité detektory kladeny vysoké nároky. Klíčová je zejména citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy detektoru [6]. Kromě těchto základních analytických parametrů je dále nezbytné zohlednit i ekonomickou stránku věci, přesnost, rychlost odezvy a v případě stanovení analytu v komplikovaných matricích i selektivitu stanovení. Všechny výše zmíněné požadavky splňují velmi dobře elektrochemické detektory [8-11].

Elektrochemická účinnost (stupeň konverze) běžných detektorů je však poměrně nízká, méně než 30 %, zejména v případech amperometrických technik. Coulometrické detektory,

kterým je věnována tato disertační práce, dosahují výrazně vyšších hodnot blížících se 100%. To však ještě není zárukou vyšší citlivosti coulometrických detektorů v porovnání s amperometrickými. Coulometrické detektory totiž mnohdy trpí vyšším proudem pozadí. Odstranění tohoto nedostatku lze dosáhnout konstrukcí detekčních cel s nízkým vnitřním objemem a rozměry. V nich obsažená pracovní elektroda zároveň musí mít velkou aktivní plochu nezbytnou pro úplnou elektrochemickou přeměnu analytu v krátkém časovém úseku [12-17].

Tyto požadavky nejlépe splňují coulometrické detektory s pracovní elektrodou z porézních materiálů [18, 19]. Teoretické, a i praktické aspekty porézních elektrod jsou za více než 60 let jejich používání dobře prostudovány [6, 20-24] a je jim věnována třetí kapitola této disertační práce.

Na druhou stranu nejsou porézní materiály zcela vhodné pro stanovení silně pasivujících látek a vzorků s komplikovanou matricí. Reaktivace pasivovaného povrchu pracovní elektrody mechanickým čistěním je totiž nemožná a chemická nebo elektrochemická reaktivace je poměrně náročná a mívá jen nízkou účinnost [25, 26]. Problematika pasivace je blíže popsána v kapitole dva této disertační práce. Pokud již dojde k pasivaci porézní elektrody, je v mnoha případech jedinou možností úplná výměna pracovního materiálu. Ta bývá však poměrně časově a ekonomicky náročná. Jedním z možných řešení tohoto problému je tvorba pracovní elektrody z práškového materiálu, která je někdy označována jako technika obnovitelného povrchu (z anglického renewable surface techniques) [27]. Tato problematika je řešena ve čtvrté kapitole této disertační práce.

Porézní detektory jsou sice nejčastěji připravovány z materiálů na bázi uhlíku, je však možné je připravit i z kovových mikročástic, například z mědi. Měď je z elektrochemického hlediska velmi zajímavým materiálem. Její pomocí lze stanovovat některé látky, jejichž struktura neobsahuje elektrochemicky aktivní skupinu. Proudová odezva měděné pracovní elektrody je dána vznikem komplexu sledované látky s měďnatými ionty uvolňovanými rozpouštěním pracovního materiálu [6, 28]. Stanovení organických látek pomocí této techniky je podrobně rozebráno v kapitole pět této disertační práce.

### 1.2. Cíl práce

Cílem této disertační práce je vyvinout nový coulometrický průtokový detektor s porézní pracovní elektrodou na bázi skelného uhlíku s obnovitelným pracovním materiálem pro stanovení látek v průtokovém uspořádání, zejména pak pro HPLC. Základní konstrukce detektoru vychází z konceptu představeného v rámci mé diplomové práce [29], kde ale nebylo dosaženo uspokojivého stupně konverze a detektor nebylo možné označit za coulometrický.

Druhým cílem práce je úprava vyvinutého konceptu s cílem nahradit skelný uhlík, jakožto pracovní materiál, mědí. Modifikovaný detektor bude použit ke stanovení aminokyselin na základě jejich komplexační reakce. Popis obou konstrukcí a jejich základní elektrochemické parametry jsou v rámci této disertační práce diskutovány v kapitole šest.

**Literatura:**

**[1] J. Mika, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, New flow-through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC, Electrochimica Acta, 154 (2015) 397-403.**
**[2] J. Mika, J. Barek, J. Zima, J.C. Moreira, H. Dejmkova, Simultaneous Determination of Homovanillic and Vanillylmandelic Acid by HPLC Using a Coulometric Detector with Renewable Glassy Carbon Microbeads Based Working Electrode, Electroanalysis, 30 (2018) 1455-1460.**
**[3] J. Mika, J. Barek, J. Zima, E. Prokesova, H. Dejmkova, Comparison of Glassy Carbon and Copper Microparticles as a Renewable Working Electrode Material for Amperometric Determination of Amino Acids Using Flow Through Detector, Electroanalysis, 31 (2019) 357-362.**
**[4] H. Dejmkova, J. Mika, J. Zima, J. Barek, Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu, Úřad Průmyslového vlastnictví ČR, Patentová listina číslo CZ 304462 B6 (2013).**
**[5] J. Mika, H. Dejmkova, J. Zima, J. Barek, Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, elektrodový systém a amperometrický průtokový detektor ji obsahující, Úřad Průmyslového vlastnictví ČR, Užitný vzor číslo CZ 30 183 U1 (2016).**
[6] K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.
[7] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, Analytica Chimica Acta, 78 (1975) 145-157.
[8] M.I. Evgen'ev, G.K. Budnikov, Electrochemical detection in high-performance liquid chromatography of organic compounds, Journal of Analytical Chemistry, 55 (2000) 1085-1091.
[9] G.W. Schieffer, Electrochemical high-performance liquid chromatographic detection in aqueous and nonaqueous eluents without supporting electrolyte, Analytical Chemistry, 57 (1985) 2745-2748.
[10] K. Stulik, V. Pacakova, Electrochemical detection in high-performance liquid chromatography, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 14 (1984) 297-351.

[11] S.G. Weber, W.C. Purdy, Electrochemical detectors in liquid chromatography. A short review of detector design, Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development, 20 (1981) 593-598.
[12] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 343 (1992) 566-575.
[13] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, R.M. Smith, Electrochemical Detection in HPLC, RSC Chromatography Monographs, The Royal Society of Chemistry, 2005.
[14] K. Stulik, Electrochemical detection for flow analysis and liquid chromatography: present status and some roads to the future, Analytica Chimica Acta, 273 (1993) 435-441.
[15] Y. Takata, M. Taki, M. Ito, T. Murao, Low dead volume coulometric detector for liquid chromatography, Journal of Chromatography, 332 (1985) 117-125.
[16] Barek. J., Pecková. K., Vyskočil. V., Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii, Chemické listy, 103 (2009) 889-893.
[17] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Wiley, 2000.
[18] D.C. Johnson, J. Larochelle, Forced-flow liquid chromatography with a coulometric detector, Talanta, 20 (1973) 959-971.
[19] G.W. Schieffer, Dual coulometric-amperometric cells for increasing the selectivity of electrochemical detection in high-performance liquid chromatography, Analytical Chemistry, 52 (1980) 1994-1998.
[20] J.W. Dieker, W.E. Vanderlinden, Determination of iron(II) and iron(III) by flow injection and amperometric detection with a glassy carbon electrode, Analytica Chimica Acta, 114 (1980) 267-274.
[21] D.C. Johnson, S.G. Weber, A.M. Bond, R.M. Wightman, R.E. Shoup, I.S. Krull, Electroanalytical voltammetry in flowing solutions, Analytica Chimica Acta, 180 (1986) 187-250.
[22] R.E. Sioda, G.E. Batley, W. Lund, J. Wang, S.C. Leach, Electrolytic preconcentration in instrumental analysis, Talanta, 33 (1986) 421-428.
[23] K. Stulik, V. Pacakova, M. Podolak, Effect of various measuring techniques on the response of a polarographic high-performance liquid chromatographic detector, Journal of Chromatography, 262 (1983) 85-94.
[24] W.E. Vanderlinden, J.W. Dieker, Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry, Analytica Chimica Acta, 119 (1980) 1-24.
[25] D.C. Johnson, J.A. Polta, T.Z. Polta, G.G. Neuburger, J. Johnson, A.P.C. Tang, I.H. Yeo, J. Baur, Anodic detection in flow-through cells, Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I, 82 (1986) 1081-1098.
[26] T.Z. Polta, D.C. Johnson, Pulsed amperometric detection of sulfur compounds: Part I. Initial studies of platinum electrodes in alkaline solutions, Journal of Electroanalytical Chemistry, 209 (1986) 159-169.
[27] J. Ruzicka, Flow injection-renewable surface techniques, Analytica Chimica Acta, 308 (1995) 14-19.
[28] N.A. Hampson, K.I. Macdonal, J.B. Lee, Oxidations at copper electrodes: Part 41. The oxidation of α-amino acids, Journal of Electroanalytical Chemistry, 34 (1972) 91-99.
[29] J. Mika, Využití elektrod na bázi uhlíku pro elektrochemickou detekci v průtokových metodách, in: Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Karlova Univerzita v Praze, Praha, 2012.

# 2. Analyty se silným vlivem na historii elektrody

Jak bylo popsáno v úvodu této disertační práce, elektrochemické detektory mají celou řadu vlastností, které z nich dělají vhodné kandidáty pro použití v průtokovém uspořádání. Jde například o vysokou selektivitu stanovení. Ta je výhodná zejména při analýze vzorků s komplikovanou matricí, kde významně ulehčuje optimalizaci separace.

Selektivitu lze ale považovat i za určitý nedostatek elektrochemických detekčních technik, jelikož vzhledem k ní je nelze použít jako univerzální detektory. Dalším problémem elektrochemických detektorů je nutnost přizpůsobit volbu materiálu pracovní elektrody danému analytickému problému. Elektrodový materiál musí být kompatibilní s mobilní fází, musí mít dostatečně široké potenciálové okno, dlouhodobou stabilitu odezvy a odolnost proti stárnutí elektrody a pasivaci.

Po každé analýze dochází ke změně povrchu a obecně tedy lze říci, že každá další analýza na jakékoliv elektrodě je zatížena jejím předchozím použitím neboli její historií. Tento proces je někdy označován jako stárnutí elektrod [1-4]. Velký vliv zde hrají zejména produkty elektrodové reakce, které mohou zůstávat na povrchu pracovní elektrody, kde mohou tvořit film nebo polymerní struktury. Některé elektrodové materiály, jako například měď, mohou být při analýze dokonce rozpouštěny. Změna povrchu elektrody je tedy Achillovou patou všech tuhých elektrod a zejména pak elektrod porézních [5, 6].

Na povrch elektrody má vliv stanovení jakékoliv látky, existují ale skupiny látek, například aminy [7] a fenoly [8], jejichž vliv je výraznější a jejichž reakční produkty mnohdy zapříčiňují významný pokles signálu detektoru až k jeho úplné pasivaci.

Aminy a fenoly jsou látky běžně stanovované v průtokovém uspořádání, které je obecně více vhodné pro stanovení látek podléhajících oxidačním procesům. Redukce je v průtokovém uspořádání komplikována interferencí rozpuštěného kyslíku. Při průtokovém uspořádání jsou produkty elektrochemické reakce rychle odnášeny od povrchu elektrody, což má za následek snížení vlivu pasivace [9-11]. To ale, zejména v případě silně pasivujících látek, mnohdy není dostatečná ochrana proti poklesu signálu a nedochází ani k úplné eliminaci stárnutí elektrody. Toho je možné dosáhnout pouze úplnou výměnou pracovního materiálu.

Vzhledem k tomu, že tato disertace je věnována technikám obnovitelných pracovních materiálů, byly pro stanovení vybrány látky s významným vlivem na historii elektrod. Všechny stanovované látky dále spojuje jejich vztah k lidskému lékařství a zdraví, z čehož vyplývá i nepopíratelná důležitost jejich rychlého a ekonomického stanovení, ať jde o farmacii (sulfamethizol a thymol), diagnostiku nádorů (homovanilová kyselina (HVA) a vanilmandlová kyselina (VMA)) nebo základní biochemické stavební kameny organizmu (aminokyseliny (AK)).

Příloha číslo jedna této disertační práce je věnována stanovení aktivní farmaceutické ingredience (API) sulfamethizolu (amin) a pomocné léčebné látky thymolu (fenol) za použití průtokového porézního detektoru ze skelného uhlíku. Obě tyto látky, dle literatury, tento pracovní materiál silně pasivují [12, 13].

Sulfamethizol je bílý až nažloutlý krystalický prášek [14, 15]. Jde o sulfonamidové antibiotikum, tedy antibakteriální chemoterapeutikum používané proti bakteriálním infekcím. Sulfamethizol se používá v lidském i veterinárním lékařství [16-21]. V lidském lékařství se používá například v urologii při rychlé léčbě močových cest člověka proti *Escherichia coli* [22, 23]. Sulfamethizol je vylučován močí během prvních šesti hodin od podání, přičemž 10 % sulfamethizolu je vylučováno v acetylované formě [23]. Vzhledem k vysokému stupni použití se sleduje i jeho koncentrace v přírodním prostředí, kde se podílí na vzniku forem bakterií odolných vůči antibiotikům [24-26].

Pro stanovení sulfamethizolu v potravinách živočišného původu se nejčastěji používá HPLC s hmotnostní detekcí (MS) [20, 26-28], HPLC s elektrochemickou detekcí (ED) za použití pastové elektrody (CPE) [29] a HPLC s fluorescenční detekcí, kde je však nezbytná postkolonová derivatizace [17]. Dále se běžně používá kapilární zónová elektroforéza (CZE) [30]. Limity kvantifikace těchto metod jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Thymol je derivát monoterpenů a má antibakteriální a antiseptické účinky [31]. Vyskytuje se v mnoha bylinách, například v dobromyslu obecném (*Origanum vulgare*), v mateřídoušce obecné (*Thymus vulgaris)* atd [32, 33]. Ve farmacii se thymol používá jako pomocná látka v sirupech, kapkách, čajích a potravinových doplňcích [15]. Kromě vnitřního použití se používá i v zubním lékařství a zubní hygieně a k ošetření kůže, kde potlačuje růst bakterií a hub [34]. Thymol se používá i jako insekticid proti moskytům [35].

Thymol se běžně stanovuje celou řadou analytických metod, například HPLC–UV [36, 37], plynová chromatografie (GC) s detektorem MS [38], HPLC–ED [12, 39], GC s plamenným ionizačním detektorem (FID) [40] a diferenční pulsní voltametrií [41]. Limity kvantifikace těchto metod jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Třetí příloha této práce je věnována vývoji nové metody stanovení biomarkerů HVA a VMA v lidské moči. HVA a VMA samy o sobě nepasivují pracovní materiál ze skelného uhlíku, ale jejich stanovení probíhá v biologických vzorcích s komplikovanou matricí.

HVA a VMA jsou důležité biomarkery sledované v lidském lékařství. Jde o finální produkty metabolismu katecholaminů, HVA je hlavní metabolit epinefrinu a VMA dopaminu [42]. Katecholaminy jsou neurotransmitery a hormony. Jejich nadprodukce je spojena s některými závažnými metabolickými [43] a neurologickými [44-46] onemocněními. Příkladem může být Menkesova choroba [47, 48] nebo nádorová onemocnění [49].

Abnormální hladinu těchto kyselin je tedy z diagnostických důvodů monitorována v moči, krevní plazmě, v mozkové tkáni a cerebrospinální tekutině. Následná diagnostika na základě nestandardních hladin HVA a VMA má dle studií vysokou citlivost mezi 66 až 100 % a specificitu vetší než 99 % [50]. Vliv na hladinu má i fáze nádorového onemocnění, přičemž pacienti v pokročilejších fázích onemocnění jsou náchylnější k abnormálním hladinám sledovaných biomarkerů [51, 52].

Pro stanovení HVA a VMA se běžně používá HPLC–ED s porézním grafitem [53]. Dále se používají elektrody ze skelného uhlíku [54-57] a diamantová elektroda [58, 59]. Kromě elektrochemických metod se dále používá CZE [60-62], GC [50] a HPLC–MS [51, 52]. Limity kvantifikace těchto metod jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Příloha čtyři je věnována stanovení AK alaninu na porézním detektoru na bázi mikročástic mědi. V tomto případě nedochází k přímé elektrochemické přeměně stanovované látky. K tomu, aby byla látka elektrochemicky aktivní, nemusí tedy sama podléhat oxidaci nebo redukci, stačí, když se bude účastnit elektrodové reakce, kterou v tomto případě představuje vznik komplexu s centrálním atomem mědi a stanovovanou látkou ve formě ligandu [10]. Pracovní materiál je při vkládaném potenciálu postupně rozpouštěn, což lze považovat za stárnutí elektrody vyžadující periodickou obnovu, stejně jako pasivovaný skelný uhlík v předešlých kapitolách.

V páté příloze této disertační práce je stanovení na základě komplexotvorné reakce mědi dále rozvíjeno na příkladu AK fenylalaninu a tyrosinu. V této příloze je navíc uvedeno porovnání obou pracovních materiálů (mědi a skelného uhlíku). Na skelném uhlíku fenylalanin nelze stanovit, jelikož neobsahuje elektrochemicky aktivní skupinu. Za tímto účelem byla vyvinuta metoda stanovení tyrosinu, strukturně velmi podobné látky jako je fenylalanin. Ten je již nicméně v důsledku přítomnosti fenolické skupiny schopen přímé oxidace. Také v případě tyrosinu byla pozorována silná pasivace, a i zde se tedy osvědčila snadná obnovitelnost elektrodového materiálu.

AK obecně jsou nesmírně široká skupina látek. Existuje více než 200 druhů AK, z nichž je 25 součástí jednotlivých proteinů a základem bílkovin, takzvané proteinogenní AK [63-66]. AK jsou kromě funkce základních stavebních kamenů bílkovin nezastupitelné i při tvorbě enzymů a biologicky aktivních molekul neurotransmiterů [65].

Tyrosin a fenylalanin mají velmi podobnou strukturu, liší se pouze fenolickou skupinou na aromatickém jádře [67]. Tomu odpovídají i obdobné chemické vlastnosti a jejich výskyt. Tyrosin má díky fenolické skupině slabě kyselé vlastnosti [67] a běžně se vyskytuje v potravinách bohatých na bílkoviny, zejména pak v rybím a drůbežím mase, dále je obsažen v ořechách a také v avokádu. Používá se i v potravinových doplňcích.

Fenylalanin je esenciální AK, která opět obsahuje aromatické jádro. Má však na rozdíl od tyrosinu nepolární postranní řetězec. Vyskytuje se hojně v hovězím mase, ořechách, tofu a kvasnicích. Je součástí běžných potravinových doplňků [63].

Alanin na rozdíl od obou předchozích AK neobsahuje benzenové jádro; na jeho místě má methylovou skupinu, což z něj dělá jednu z nejjednodušších a nejobvyklejších AK. Alanin je významným meziproduktem mnoha metabolických drah a zprostředkovává alaninový cyklus [68]. Alanin je součástí všech bílkovinných pokrmů, jako jsou například vajíčka, mléko, maso a mořské plody. Vysoký obsah je opět v kvasnicích a ořechách. Dále ho lze najít v luštěninách, obilí a hnědé rýži. [69, 70].

Aminokyseliny příliš neabsorbují ultrafialové záření a v případě HPLC–UV je tedy nutná jejich derivatizace [71]. Bez derivatizace jsou některé z nich stanovovány metodou HPLC–MS [72-75], popřípadě elektrochemicky na základě jejich přímé oxidace na platinové elektrodě [76-80], elektrodě ze skelného uhlíku, diamantové elektrodě [81] a CPE. Nebo jsou stanovovány měděnými elektrodami na základě komplexotvorných reakcích [82-85]. Limity kvantifikace vybraných metod jsou shrnuty v tabulce 2.2.

Tabulka 2.1 Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením studovaných látek a jejich LoQ

| Stanovovaná látka | Technika stanovení | LoQ | Citace |
|---|---|---|---|
| sulfamethizol | HPLC–MS | 2,67 ng $g^{-1}$ | [28] |
| | HPLC–ED | 0,14 µmol $l^{-1}$ | [29] |
| | HPLC–MS | 20,00 ng $g^{-1}$ | [26] |
| | HPLC–fluorescenční | 1,00 ng $g^{-1}$ | [17] |
| | CZE | 10,39 ng $ml^{-1}$ | [30] |
| thymol | HPLC–UV | $5{,}00\times10^{2}$ ng $ml^{-1}$ | [37] |
| | HPLC–UV | $6{,}67\times10^{2}$ ng $ml^{-1}$ | [36] |
| | HPLC–ED | $4{,}67\times10^{1}$ ng $ml^{-1}$ | [39] |
| | HPLC–ED | 0,66 µmol $l^{-1}$ | [12] |
| | GC–FID | $6{,}23\times10^{6}$ ng $ml^{-1}$ | [40] |
| | Dif.pulsní voltametrie | $1{,}33\times10^{2}$ ng $ml^{-1}$ | [41] |
| HVA a VMA | HPLC–ED | $1\times10^{-5}$ a $1\times10^{-5}$ ng $ml^{-1}$ | [53] |
| HVA | HPLC–ED | $2{,}33\times10^{-3}$ µmol $l^{-1}$ | [57] |
| HVA | HPLC–ED | 1,33 µmol $l^{-1}$ | [59] |
| HVA | HPLC–MS | $6{,}23\times10^{-2}$ µmol $l^{-1}$ | [54] |
| HVA a VMA | CZE | $1{,}17\times10^{3}$ a $6{,}00\times10^{2}$ µmol $l^{-1}$ | [86] |

Tabulka 2.2 Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením studovaných AK a jejich LoQ

| Stanovovaná látka | Technika stanovení | Elektrodový materiál | LoQ | Citace |
|---|---|---|---|---|
| Tyrosin | HPLC–MS | – | 0,6 ng $ml^{-1}$ | [85] |
| | HPLC–ED | platina | $5{,}33\times10^{5}$ µmol | [76] |
| | Diferenční pulsní voltametrie | diamant | 1 µmol $l^{-1}$ | [81] |
| | HPLC–ED | měď | 16,3 ng | [85] |
| Fenylalanin | HPLC–MS | – | $3{,}33\times10^{2}$ µmol | [72] |
| | HPLC–ED | měď | 6,33 ng | [85] |
| | | | 1,1 µmol $l^{-1}$ | [83] |
| Alanin | HPLC–MS | – | $1{,}67\times10^{6}$ µmol | [72] |
| | HPLC–MS | – | 5 µmol $l^{-1}$ | [87] |
| | HPLC–UV | – | 21,9 µmol $l^{-1}$ | [71] |
| | HPLC–ED | měď | 30,0 ng | [85] |

**Literatura:**

[1] V.S. Bagotsky, Fundamentals of Electrochemistry, Wiley, 2005.
[2] J. Barek, E. Julakova, Možnosti inovace v elektroanalytické chemii, Pražské analytické centrum inovací - VŠCHT Praha, (2006).
[3] T.Z. Polta, D.C. Johnson, Pulsed amperometric detection of sulfur compounds: Part I. Initial studies of platinum electrodes in alkaline solutions, Journal of Electroanalytical Chemistry, 209 (1986) 159-169.
[4] S. Sebkova, University Pardubice, Pardubice, 2004.
[5] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 343 (1992) 566-575.
[6] M. Mayer, J. Ruzicka, Flow injection based renewable electrochemical sensor system, Analytical Chemistry, 68 (1996) 3808-3814.
[7] A.H. Anton, A simple, reliable and rapid method for increasing the responsiveness of the glassy carbon electrode (GCE) for the analysis of biogenic amines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC), Life Sciences, 35 (1984) 79-85.
[8] J. Zima, M. Cienciala, J. Barek, J.C. Moreira, Determination of thymol using HPLC-ED with glassy carbon paste electrode, Chemia Analityczna, 52 (2007) 1049-1057.
[9] D.C. Johnson, S.G. Weber, A.M. Bond, R.M. Wightman, R.E. Shoup, I.S. Krull, Electroanalytical voltammetry in flowing solutions, Analytica Chimica Acta, 180 (1986) 187-250.
[10] K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.
[11] K. Toth, K. Stulik, W. Kutner, Z. Feher, E. Lindner, Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: Characterization and classification - (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, 76 (2004) 1119-1138.
[12] J. Mužíková, Stanovení vybraných terpenoidů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Karlova Univerzita v Praze, Praha, 2012.
[13] M. Mikeš, Stanovení sulfamethiyolu pomocí uhlíkových pastových elektrod, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Karlova Univerzita v Praze, Praha, 2012.
[14] The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Wiley, 2006.
[15] Český lékopis 2017, Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2017.
[16] J. Abian, M.I. Churchwell, W.A. Korfmacher, High-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry of ten sulfonamide antibiotics. Analysis in milk at the ppb level, Journal of Chromatography, 629 (1993) 267-276.
[17] T.A. Gehring, B. Griffin, R. Williams, C. Geiseker, L.G. Rushing, P.H. Siitonen, Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 840 (2006) 132-138.
[18] M.B. Kerrn, N. Frimodt-Moller, F. Espersen, Effects of sulfamethizole and Amdinocillin against Escherichia coli strains (with various susceptibilities) in an ascending urinary tract infection mouse model, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47 (2003) 1002-1009.
[19] B. Melichar, Chemická léčiva – 3. přepracované vydání, AVICENUM zdravotnické nakladatelství Praha, 1987.
[20] R.J.B. Peters, Y.J.C. Bolck, P. Rutgers, A.A.M. Stolker, M.W.F. Nielen, Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 8206-8216.

[21] W.J. Xu, S.F. Su, P. Jiang, H.S. Wang, X.C. Dong, M. Zhang, Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 7198-7207.
[22] L. Bjerrum, B. Gahrn-Hansen, P. Grinsted, Pivmecillinam versus sulfamethizole for short-term treatment of uncomplicated acute cystitis in general practice: A randomized controlled trial, Scandinavian Journal of Primary Health Care, 27 (2009) 6-11.
[23] M.B. Kerrn, N. Frimodt-Moller, F. Espersen, Urinary concentrations and urine ex-vivo effect of mecillinam and sulphamethizole, Clinical Microbiology and Infection, 10 (2004) 54-61.
[24] P. Collignon, H.C. Wegener, P. Braam, C.D. Butler, The routine use of antibiotics to promote animal growth does little to benefit protein undernutrition in the developing world, Clinical Infectious Diseases, 41 (2005) 1007-1013.
[25] A. Fortt, F. Cabello, A. Buschmann, Residues of tetracycline and quinolones in wild fish living around a salmon aquaculture center in Chile, Revista Chilena De Infectologia, 24 (2007) 14-18.
[26] X. Pan, Z.M. Qiang, W.W. Ben, M.X. Chen, Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China, Chemosphere, 84 (2011) 695-700.
[27] J. Kang, S.J. Park, H.C. Park, M.A. Hossain, M.A. Kim, S.W. Son, C.M. Lim, T.W. Kim, B.H. Cho, Multiresidue Screening of Veterinary Drugs in Meat, Milk, Egg, and Fish Using Liquid Chromatography Coupled with Ion Trap Time-of-Flight Mass Spectrometry, Applied Biochemistry and Biotechnology, 182 (2017) 635-652.
[28] M. Villar-Pulido, B. Gilbert-Lopez, J.F. Garcia-Reyes, N.R. Martos, A. Molina-Diaz, Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, Talanta, 85 (2011) 1419-1427.
**[29] H. Dejmkova, J. Mika, J. Zima, J. Barek, Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu, Úřad Průmyslového vlastnictví ČR, Patentová listina číslo CZ 304462 B6 (2013).**
[30] T. Li, Z.G. Shi, M.M. Zheng, Y.Q. Feng, Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking, Journal of Chromatography A, 1205 (2008) 163-170.
[31] P. Lo Cantore, V. Shanmugaiah, N.S. Iacobellis, Antibacterial Activity of Essential Oil Components and Their Potential Use in Seed Disinfection, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (2009) 9454-9461.
[32] D. Fulmeková, Magická síla bylin, Slovart, 2014.
[33] A. Chevallier, The Encyclopedia of Medicinal Plants, DK Pub., 1996.
[34] U. Bühring, Léčivé rostliny - Obsahové látky, zpracování, základní recepty, Knižní klub, 2010.
[35] L.S. Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent activity of essential oils: A review, Bioresource Technology, 101 (2010) 372-378.
[36] J.E. Newbery, M.P.L. Dehaddad, K.A. Charlwood, High-performance liquid chromatography of terpenoid alcohols in essential oils, Analytica Chimica Acta, 147 (1983) 387-391.
[37] V. Solinas, C. Gessa, L.F. Delitala, High-performance liquid chromatographic analysis of carvacrol and thymol in the essential oil of Thymus capitatus, Journal of Chromatography, 219 (1981) 332-337.
[38] M. Hudaib, E. Speroni, A.M. Di Pietra, V. Cavrini, GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29 (2002) 691-700.

[39] J.E. Newbery, M.P.L. Dehaddad, Terpenoid analysis II. The separation of some monoterpene alcohols by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, Journal of Chromatography, 260 (1983) 173-176.
[40] V. Kiyanpour, A.R. Fakhari, R. Alizadeh, B. Asghari, M. Jalali-Heravi, Multivariate optimization of hydrodistillation-headspace solvent microextraction of thymol and carvacrol from Thymus transcaspicus, Talanta, 79 (2009) 695-699.
[41] A. Michelitsch, A. Rittmannsberger, A. Hufner, U. Ruckert, W. Likussar, Determination of isopropylmethylphenols in black seed oil by differential pulse voltammetry, Phytochemical Analysis, 15 (2004) 320-324.
[42] G. Eisenhofer, I.J. Kopin, D.S. Goldstein, Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine, Pharmacological Reviews, 56 (2004) 331-349.
[43] M. Matsuo, R. Tasaki, H. Kodama, Y. Hamasaki, Screening for Menkes disease using the urine HVA/VMA ratio, Journal of Inherited Metabolic Disease, 28 (2005) 89-93.
[44] J.L. Ater, K.L. Gardner, L.E. Foxhall, B.L. Therrell, W.A. Bleyer, Neuroblastoma screening in the United States - Results of the Texas Outreach Program for Neuroblastoma Screening, Cancer, 82 (1998) 1593-1602.
[45] S. Barco, I. Gennai, G. Reggiardo, B. Galleni, L. Barbagallo, A. Maffia, E. Viscardi, F. De Leonardis, V. Cecinati, S. Sorrentino, A. Garaventa, M. Conte, G. Cangemi, Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma, Clinical Biochemistry, 47 (2014) 848-852.
[46] J.W.M. Lenders, K. Pacak, M.M. Walther, W.M. Linehan, M. Mannelli, P. Friberg, H.R. Keiser, D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, Biochemical diagnosis of pheochromocytoma - Which test is best?, Journal of the American Medical Association, 287 (2002) 1427-1434.
[47] E.H. Labrosse, C. Comnougue, J.M. Zucker, E. Comoy, C. Bohuon, J. Lemerle, O. Schweisguth, Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid by 288 patients with neuroblastoma and related neural crest tumors, Cancer Research, 40 (1980) 1995-2001.
[48] M. Monsaingeon, Y. Perel, G. Simonnet, J.B. Corcuff, Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma, European Journal of Pediatrics, 162 (2003) 397-402.
[49] Q.A. Li, C. Batchelor-McAuley, R.G. Compton, Electrooxidative Decarboxylation of Vanillylmandelic Acid: Voltammetric Differentiation between the Structurally Related Compounds Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid, Journal of Physical Chemistry B, 114 (2010) 9713-9719.
[50] G. Fauler, H.J. Leis, E. Huber, C. Schellauf, R. Kerbl, C. Urban, H. Gleispach, Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in neuroblastoma screening by stable isotope dilution GC-MS, Journal of Mass Spectrometry, 32 (1997) 507-514.
[51] R.R. Gonzalez, R.F. Fernandez, J.L.M. Vidal, A.G. Frenich, M.L.G. Perez, Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples, Journal of Neuroscience Methods, 198 (2011) 187-194.
[52] P. Manini, R. Andreoli, S. Cavazzini, E. Bergamaschi, A. Mutti, W.N.A. Niessen, Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites, Journal of Chromatography B, 744 (2000) 423-431.
[53] N. Unceta, E. Rodriguez, Z.G. de Balugera, C. Sampedro, M.A. Goicolea, S. Barrondo, J. Salles, R.J. Barrio, Determination of catecholamines and their metabolites in human plasma using liquid chromatography with coulometric multi-electrode cell-design detection, Analytica Chimica Acta, 444 (2001) 211-221.

[54] S.A. Allen, S. Rednour, S. Shepard, B.B. Pond, A simple and sensitive high-performance liquid chromatography-electrochemical detection assay for the quantitative determination of monoamines and respective metabolites in six discrete brain regions of mice, Biomedical Chromatography, 31 (2017) e3998.
[55] D.F. Davidson, Simultaneous assay for urinary 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid by isocratic HPLC with electrochemical detection, Annals of Clinical Biochemistry, 26 (1989) 137-143.
[56] A. Vaarmann, A. Kask, U. Maeorg, Novel and sensitive high-performance liquid chromatographic method based on electrochemical coulometric array detection for simultaneous determination of catecholamines, kynurenine and indole derivatives of tryptophan, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 769 (2002) 145-153.
[57] Y.P. Zhou, H.L. Yan, Q.J. Xie, S.Y. Huang, J.L. Liu, Z. Li, M. Ma, S.Z. Yao, Simultaneous analysis of dopamine and homovanillic acid by high-performance liquid chromatography with wall-jet/thin-layer electrochemical detection, Analyst, 138 (2013) 7246-7253.
[58] L. Zhang, J.Q. Yang, Y. Luo, J.C. Shang, X.H. Jiang, Simultaneous determination of eleven compounds related to metabolism of bioamines in rat cortex and hippocampus by HPLC-ECD with boron-doped diamond working electrode, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 118 (2016) 41-51.
[59] L. Zhou, J.D. Glennon, J.H.T. Luong, Electrophoretic Analysis of Biomarkers using Capillary Modification with Gold Nanoparticles Embedded in a Polycation and Boron Doped Diamond Electrode, Analytical Chemistry, 82 (2010) 6895-6903.
[60] A. García, M. Heinänen, L.M. Jiménez, C. Barbas, Direct measurement of homovanillic, vanillylmandelic and 5-hydroxyindoleacetic acids in urine by capillary electrophoresis, Journal of Chromatography A, 871 (2000) 341-350.
[61] X.J. Li, W.R. Jin, Q.F. Weng, Separation and determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid by capillary electrophoresis with electrochemical detection, Analytica Chimica Acta, 461 (2002) 123-130.
[62] P. Senk, L. Kozak, F. Foret, Capillary electrophoresis and mass spectrometry for screening of metabolic disorders in newborns, Electrophoresis, 25 (2004) 1447-1456.
[63] R.A. Harvey, D.R. Ferrier, Biochemistry, Wolters Kluwer Health, 2010.
[64] H.D. Jakubke, N. Sewald, Peptides from A to Z: A Concise Encyclopedia, Wiley, 2008.
[65] R.K. Murray, Harper's Biochemistry, Appleton & Lange, 2000.
[66] I. Wagner, H. Musso, New Naturally Occurring Amino Acids, Angewandte Chemie-International Edition in English, 22 (1983) 816-828.
[67] P. Karlson, Základy biochemie, Academia, 1971.
[68] G.A. Petsko, G.A.P.D. Ringe, D. Ringe, Protein Structure and Function, New Science Press, 2004.
[69] H. Abe, N. Yoshikawa, M.G. Sarower, S. Okada, Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 28 (2005) 1571-1577.
[70] D.L. Nelson, A.L. Lehninger, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman, 2008.
[71] Q.Z. Li, Q.X. Huang, S.C. Li, M.Z. Yang, B. Rao, Simultaneous Determination of Glutamate, Glycine, and Alanine in Human Plasma Using Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate and High-Performance Liquid Chromatography, Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 16 (2012) 355-360.

[72] A.N. Fonteh, R.J. Harrington, M.G. Harrington, Quantification of free amino acids and dipeptides using isotope dilution liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry, Amino Acids, 32 (2007) 203-212.
[73] P.C. Holme, K.A. Woods, Measurement of plasma tyrosine by HPLC-UV or LC-MS-MS for assessing chemically induced tyrosinaemia, Chromatographia, 55 (2002) S193-S194.
[74] R.J.W. Meesters, R.R. Wolfe, N.E.P. Deutz, Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the analysis of stable isotope enrichments of phenylalanine and tyrosine, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 877 (2009) 43-49.
[75] E. Waraksa, K. Kowalski, R. Rola, E. Klodzinska, T. Bienkowski, J. Namiesnik, Determination of free tyrosine in equestrian supplements by LC-MS/MS and comparison of its quantity with total free amino acids content in view of doping control, Microchemical Journal, 146 (2019) 56-65.
[76] L. Agui, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, Continuous monitoring of amino acids and related compounds with poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fiber microelectrodes, Analytica Chimica Acta, 401 (1999) 145-154.
[77] F. Huerta, E. Morallon, J.L. Vazquez, A. Aldaz, Electrochemical behaviour of amino acids on Pt(hkl). A voltammetric and in situ FTIR study Part IV. Serine and alanine on Pt(100) and Pt(110), Journal of Electroanalytical Chemistry, 475 (1999) 38-45.
[78] S.M. MacDonald, S.G. Roscoe, Electrochemical oxidation reactions of tyrosine, tryptophan and related dipeptides, Electrochimica Acta, 42 (1997) 1189-1200.
[79] K. Ogura, M. Kobayashi, M. Nakayama, Y. Miho, In-situ FTIR studies on the electrochemical oxidation of histidine and tyrosine, Journal of Electroanalytical Chemistry, 463 (1999) 218-223.
[80] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, Spectrophotometric determination of pK(a) values based on a pH gradient flow-injection system, Analytica Chimica Acta, 408 (2000) 135-143.
[81] G.H. Zhao, Y. Qi, Y. Tian, Simultaneous and direct determination of tryptophan and tyrosine at boron-doped diamond electrode, Electroanalysis, 18 (2006) 830-834.
[82] T. Kitagawa, S. Tsushima, Simultaneous determination of tyrosine and dopa using rotating carbon paste disk electrode, Japan Analyst, 20 (1971) 1561-1565.
[83] W.T. Kok, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode, Journal of Chromatography, 256 (1983) 17-26.
[84] W.T. Kok, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, Selective amperometric detection in HPLC with anodic copper electrodes, Pharmaceutisch Weekblad-Scientific Edition, 5 (1983) 339-339.
[85] K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart, M. Podolak, Operational parameters of voltammetric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors, Journal of Chromatography, 367 (1986) 311-321.
[86] H.J. Issaq, K. Delviks, G.M. Janini, G.M. Muschik, Capillary Zone Electrophoretic Separation of Homovanillic and Vanillylmandelic Acids, Journal of Liquid Chromatography, 15 (1992) 3193-3201.
[87] S. Karakawa, K. Shimbo, N. Yamada, T. Mizukoshi, H. Miyano, M. Mita, W. Lindner, K. Hamase, Simultaneous analysis of D-alanine, D-aspartic acid, and D-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 115 (2015) 123-129.

# 3. Průtokové porézní detektory

Porézní detektory se používají již více než 60 let a za tuto dobu vznikla celá řada teoretických modelů popisujících jejich základní elektrochemické vlastnosti. Hlavní předností těchto detektorů je velký aktivní povrch, při zachování nízkého objemu pracovní cely. Velký aktivní povrch je zárukou úplné elektrochemické přeměny stanovované látky a nízký objem pracovní cely má zásadní dopad na základní elektrochemické vlastnosti, zejména na proud pozadí. To dělá tyto detektory vhodnými kandidáty pro měření v průtokovém uspořádání [1-4]. Ze začátku však tyto detektory bojovaly s nízkou účinností, která omezovala jejich praktické použití [5].

Porézní elektrody pro měření v průtokovém uspořádání byly poprvé představeny v roce 1957 [6], v následujících letech došlo k popisu jejich základních experimentálních a teoretických aspektů [7-10]. Hlavním motorem jejich rozvoje byla potenciální praktická aplikace v kontinuálních průmyslových procesech [11-15].

Až následně bylo navrženo použití porézních elektrod pro coulometrická stanovení v průtokovém uspořádání [16-19]. Pro přípravu porézních elektrod byla následně použita celá řada elektrochemických materiálu, zejména pak uhlík [7, 19-30], porézní kovy [31-33] a kovové částice [5, 34] jako platina [18] nebo stříbro [35]. Použití porézních elektrod přinášelo oproti dříve používaným elektrodám výrazné zkrácení doby analýzy a tím došlo k potlačení nežádoucích sekundárních elektrochemických reakcí [36, 37].

Celá řada autorů v čele s profesorem Siodou se pro tyto elektrody snažila odvodit matematický model popisující limitní proud, při kterém porézní elektrody pracují s nejvyšší elektrochemickou účinností [5, 38, 39]. Tyto práce vycházely z různých teoretických zjednodušení, a proto nejsou zcela přesné. Mnoho prací ověřuje teoretické vztahy porovnáním s výsledky experimentálních pozorování [40-43].

Většina prací se navzájem rozvíjí a doplňuje, ačkoliv v některých případech se podařilo poukázat i na předcházející omyly [3, 5, 8, 10, 42, 44-53]. Všichni tyto autoři však dohromady položili silný teoretický základ, který umožnil rozmach porézních elektrod v analytické chemii. Jedna z prvních rovnic popisujících limitní proud vycházela z hodnocení voltametrických křivek redukce hexakyanoželeznatanu, naměřených při různých průtokových rychlostech

nosného roztoku KCl. Sklon naměřené křivky odpovídal výměně jednoho elektronu difuzí řízeného procesu. V závislosti na narůstající průtokové rychlosti docházelo k snížení proudové odezvy:

$$I_{lim} \sim v^a, \tag{1}$$

kde $v$ je objemová průtoková rychlost roztoku a $a$ je sklon výše popsané logaritmické závislosti rozsahu limitního proudu na rychlosti průtoku. [5].

Tato rovnice je pro matematický popis porézních rovnic nedostačující, jelikož uvnitř pórů elektrody se vyskytuje potenciálový gradient, koncentrační gradient (analytu a produktu chemické rovnice) a gradient hustoty proudu. Elektrochemický proces je dále popsán lokálním rozdílem mezi potenciálem pracovního materiálu elektrody a potenciálem roztoku, který je charakterizován následujícím vztahem [5, 8]:

$$\Delta\varphi = \varphi_E - \varphi. \tag{2}$$

Z těchto základních úvah a rovnice (2) lze matematicky odvodit jednu z prvních přesnějších rovnici popisujících limitní proud [39]:

$$I_{lim} = nFc_0v\left[1 - exp^{(-ba^{(1-p)}v^{(p-1)}L)}\right], \tag{3}$$

kde $n$ je počet vyměněných elektronů, $F$ je Faradayova konstanta, $c_0$ je počáteční koncentrace analytu, $b$ je konstanta popisující detektor, $p$ je vnitřní plocha porézní elektrody a $L$ je celková délka elektrody.

Z předchozích základních rovnic lze při zahrnutí vlivu disperze [54] odvodit základní rovnici pro stupeň konverze [5, 55]:

$$R = \frac{I_{lim}}{nFc_0v}. \tag{4}$$

Na základě experimentálních pozorování bylo odvozeno, že pro dosažení vysoké účinnosti porézních elektrod (tedy dosažení vysokého stupně konverze) je nutné znát lokální distribuci potenciálu pracovního materiálu a distribuci potenciálu celé pracovní elektrody. Díky znalosti distribuce potenciálu lze zabránit vylučování nežádoucích iontů uvnitř elektrody [16]. Distribuci potenciálu je možné odvodit z rovnice (2) za předpokladu konstantního potenciálu pracovního materiálu elektrody s nízkým odporem [51]:

$$\Delta E = R_{eff}\frac{I_{lim}L}{p}\{1 - R^{-1} - [ln(1-R)]^{-1}\}, \tag{5}$$

kde $R_{eff}$ je specifická ohmická resistence.

Z rovnice (5) vyplývá, že hlavní vliv na pokles potenciálu v roztoku mezi oběma konci porézní elektrody má limitní proud a stupeň konverze.

Předcházející popis stupně konverze je vhodnější používat pro popis průtokové elektrolýzy. Pro coulometrická stanovení je přesnější vycházet ze stupně konverze definovaného následujícím vztahem [39]:

$$R = 1 - \frac{c_L}{c_0}, \tag{6}$$

kde $c_L$ je koncentrace elektroaktivní látky v roztoku při výstupu z porézní elektrody o délce $L$. Z této rovnice lze totiž odvozovat minimální délku pracovní elektrody nezbytnou pro plnou elektrochemickou přeměnu sledované látky. Nezbytná délka elektrody roste s průtokovou rychlostí. V praxi tedy lze použít vyšší průtokové rychlosti k potlačení nežádoucích sekundárních elektrochemických reakcí. Shrnutím závěrů vyplývajících z rovnice (6) je, že pro úplnou přeměnu sledované látky je nezbytné, aby byl čas difuze analytu kratší než jeho doba strávená v póru elektrody [33, 38].

Základní teoretický popis porézních elektrod byl zásadní pro zlepšení jejich účinnosti a přispěl tak k rozmachu jejich aplikačních možností. Dalšímu rozvoji použití těchto elektrod pomohlo roku 1979 představení nového elektrochemického materiálu– "reticulated vitreous carbon" (RVC) [23, 56] a nové analytické techniky – FIA [57].

Jejich představení se pozitivně promítlo i do dalšího rozvoje nových teoretických modelů věnovaných účinnosti porézních elektrod. Tyto práce budou rozebrány podrobněji, protože byly použity pro popis základních elektrochemických vlastností coulometrického detektoru vyvíjeného v rámci této disertační práce.

Teoretický model vychází z parabolické distribuce průtokové rychlosti. Tento model je zásadní, jelikož pomohl matematicky popsat některé konstanty, které byly v dřívějších pracích získávány výhradně experimentálně. V porézních elektrodách se uplatňuje vliv laminárního proudění. Pro porézní elektrody s velkým vnitřním objemem, jako například elektrody na bázi RVC, lze předpokládat jeho parabolický profil [3]. Porézních elektrodu můžeme tedy teoreticky rozdělit na jednotlivé separované úzké kanálky, z nichž každý je popsán vlastní průtokovou rychlostí na základě parabolické distribuce průtokové rychlosti v prázdné trubici dle základního vztahu:

$$u = u_0(1 - f^2/r^2), \tag{7}$$

kde $u_0$ je průtoková rychlost uprostřed trubice, $f$ je radiální koordináta v trubici a $r$ je poloměr trubice. Z této rovnice lze odvodit vztah pro průměrnou bezdimensionální koncentraci nezreagovaného analytu opouštějícího porézní elektrodu:

$$\overline{c^*} = 4\int_0^1 z(1 - z^2) exp^{\left[-B\left(1-z^2\right)^{-2/3}\right]} dz, \tag{8}$$

kde *z* je bezdimensionální koordinát a konstanta $B = jsLu_0^{-2/3}$, kde *s* je specifická plocha povrchu a *j* je konstanta difuzního toku přenosu hmoty.

Integrál z rovnice (8) nelze řešit analyticky. Je ale možné ho řešit matematicky pro různé hodnoty konstanty *B*. Tento model slouží k popisu elektrod s čistě laminárním prouděním. V porézních elektrodách je přítomno i radiální míchání roztoku. To je způsobeno samotnou elektrodou, difuzí a radiálním gradientem koncentrace hnaného samotnou elektrochemickou reakcí. Pro přesnější výpočty je nezbytné zahrnout novou konstantu *k*, která je funkcí plochy průřezu elektrody, objemu pórů elektrody a zakřivení otevřeného prostoru elektrody.

Na základě konstanty *k* lze odvodit:

$$B = B^* v^{-2/3} = 2^{-2/3} jsLk^{-2/3} v^{-2/3}. \quad (9)$$

Po dosazení takto popsaného parametru *B* do rovnice (8) je získán vztah závislosti $\overline{c^*}$ na průtokové rychlosti [3]:

$$\overline{c^*} = 4\int_0^1 z(1-z^2) exp^{\left[-B^* v^{-2/3}\left(1-z^2\right)^{-2/3}\right]} dz \quad (10)$$

a dále dosazením rovnice (10) za $\overline{c^*}$ do rovnice (6) získáváme vztah pro stupeň konverze při parabolické distribuci průtokové rychlosti:

$$1 - R = \frac{c_L}{c_0} = \overline{c^*}. \quad (10)$$

Stupeň konverze lze dále také velmi dobře odvodit na základě konstanty přenosu hmoty pro cylindrické a sférické částice. Difuze pro sférické a cylindrické částice v toku kapaliny je matematicky dobře popsána [42]. Porézní elektrody připravené na základě malých částic [33, 55] nebo mající malé póry [58] mají výrazně vyšší hodnoty přenosu hmoty, než bylo dříve teoreticky předpokládáno. Tento nárůst neodpovídá pouhému nárůstu aktivního povrchu pracovní elektrody. Z toho vyplývá, že v těchto případech musí mít na zvýšení přenosu hmoty vliv další faktor. Tato pozorování jsou podpořena závěry výzkumu mikroelektrod, které jsou charakterizované vysokými hodnotami specifického přenosu hmoty, které by mohlo být způsobeno vlivem disperze [59].

V porézních elektrodách je distribuce rychlosti toku závislá na objemu pórů, délce elektrody (ve směru toku) a na vkládaném průtoku. Skutečný profil toku bude tedy spíše někde mezi tokem parabolickým a tokem postupným (plug–flow). Pro základní výpočty je model založený na postupném toku zcela dostačující a celkový difuzní rychlost přenosu hmoty pro sférické a cylindrické částice je v tomto případě dán následujícími vztahy [42]:

$$J_S = 7{,}84 c_0 D^{2/3} u^{1/3} g^{4/3} \text{ a} \quad (11)$$

$$J_C = 4{,}585 c_0 D^{2/3} u^{1/3} g^{1/3} l, \quad (12)$$

kde $c_0$ je koncentrace sledované látky (mol cm$^{-3}$), $D$ je difusní koeficient a $g$ je poloměr sférické nebo cylindrické částice.

Pro použití rovnice (11) a (12) je nezbytné jejich převedení na výpočet koeficientu přenosu hmoty dle vztahu: $\bar{k} = J/c_0 A$, kde $A$ je povrch elektrody, který lze pro uvažované částice snadno vypočíst a následně použít k odvození vztahu:

$$\overline{k_S} = 0{,}624 D^{2/3} u^{1/3} a g^{-2/3} \text{ a} \quad (13)$$

$$\overline{k_C} = 0{,}730 D^{2/3} u^{1/3} g^{-2/3}. \quad (14)$$

Výsledný průměrný koeficient přenosu hmoty lze následně použít k výpočtu některých fyzikálních charakteristik pracovní elektrody z experimentálně zjištěného vztahu pro stupeň konverze:

$$R = 1 - exp^{(-\bar{k}_l s L/u)}, \quad (15)$$

kde $\bar{k}_l$ je lokální průměrný koeficient přenosu hmoty. Všechny v této kapitole popsané teoretické modely byly klíčem k vývoji nových a účinnější coulometrických detektorů. Na jejich základě stojí například nové konstrukce detektorů na bázi RVC [23, 60-62], popřípadě jiných materiálů [63]. V této disertační práci byly zejména pak poslední dva představené modely použity pro popis základních elektrochemických vlastností nově představeného detektoru, které jsou rozebrány v kapitole 6 této disertační práce (Příloha č.2).

**Literatura:**

[1] E.A. Ostrovidov, Electrochemical systems with porous flow-through electrodes in analztical control, Journal of Analytical Chemistry of the USSR, 37 (1982) 1323-1331.
[2] E.A. Ostrovidov, Theory of electroanalytical processes on flow-through electrodes, Journal of Analytical Chemistry of the USSR, 38 (1983) 1499-1502.
[3] R.E. Sioda, Parabolic flow velocity distribution in electrolysis with flow-through porous electrodes, Analyst, 113 (1988) 489-492.
[4] R.E. Sioda, D.J. Curran, Flow phenomena in fia and flow electrolysis, Journal of Electroanalytical Chemistry, 239 (1988) 1-7.
[5] R.E. Sioda, Electrolysis with flowing solution on porous and wire electrodes, Electrochimica Acta, 15 (1970) 783-785.
[6] R.M. Perskaya, I.A. Zaidenman, Liquid diffusion electrodes, Doklady Akademii Nauk SSSR, 115 (1957) 548-551.
[7] W.J. Blaedel, J.H. Strohl, Continuous Quantitative Electrolysis, Analytical Chemistry, 36 (1964) 1245-1251.
[8] I.G. Gurevich, V.S. Bagotzky, Porous electrodes with liquid reactants under steady-state operating conditions, Electrochimica Acta, 9 (1964) 1151-1176.
[9] D.K. Roe, Electrochemical Fractionation: Potentiostatic Chromatography and Elution Voltammetry, Analytical Chemistry, 36 (1964) 2371-2372.
[10] I.A. Zaidenman, R.M. Perskaya, Liquid diffusion electrodes - the initial slope of the polarization curves, Zhurnal Fizicheskoi Khimii, 33 (1959) 50-57.
[11] R.Y. Bek, A.P. Zamyatin, Mass transfer coefficient and the surface of flow fibrous carbon-graphite electrodes which is available for electrolysis, Soviet Electrochemistry, 14 (1978) 1034-1039.
[12] D.N. Bennion, J. Newman, Electrochemical removal of copper ions from very dilute solutions, Journal of Applied Electrochemistry, 2 (1972) 113-122.
[13] F. Coeuret, D. Hutin, A. Gaunand, Study of the effectiveness of fixed flow-through electrodes, Journal of Applied Electrochemistry, 6 (1976) 417-423.
[14] P.R. Singh, M.K. Totlani, Separation and recovery of copper using a flow-through packed-bed electrode, Indian Journal of Technology, 21 (1983) 74-77.
[15] R.S. Wenger, D.N. Bennion, Electrochemical concentrating and purifying from dilute copper solutions, Journal of Applied Electrochemistry, 6 (1976) 385-396.
[16] A. Gaunand, D. Hutin, F. Coeuret, Potential distribution in flow-through porous electrodes under limiting current conditions, Electrochimica Acta, 22 (1977) 93-97.
[17] J.A. Shropshire, Flow coulometry, Journal of Electroanalytical Chemistry, 9 (1965) 90-92.
[18] R.E. Sioda, Electrolysis with flowing solution, Electrochimica Acta, 13 (1968) 375-382.
[19] R.E. Sioda, Electrolysis with a flowing solution on graphite packing, Electrochimica Acta, 13 (1968) 1559-1562.
[20] R.L. Bamberger, J.H. Strohl, Quantitative analysis of p-nitrophenol, hydroquinone, and p-phenylenediamine using thin-layer chronopotentiometry, Analytical Chemistry, 41 (1969) 1450-1452.
[21] E. Beinrohr, Electrolytical microcell for on-line preconcentration of trace metals in flow systems, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 338 (1990) 735-737.
[22] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 343 (1992) 566-575.
[23] W.J. Blaedel, J. Wang, Flow electrolysis on a reticulated vitreous carbon electrode, Analytical Chemistry, 51 (1979) 799-802.

[24] M. Oyama, K. Nozaki, S. Okazaki, Pulse-electrolysis stopped-flow method for the electrospectroscopic analysis of short-lived intermediates generated in the electrooxidation of triphenylamine, Analytical Chemistry, 63 (1991) 1387-1392.
[25] G.W. Schieffer, Dual coulometric-amperometric cells for increasing the selectivity of electrochemical detection in high-performance liquid chromatography, Analytical Chemistry, 52 (1980) 1994-1998.
[26] G.W. Schieffer, Precolumn coulometric cell for high-performance liquid chromatography, Analytical Chemistry, 53 (1981) 126-127.
[27] J.H. Strohl, T.A. Polutano, A Packed Graphite Cell for Thin-Layer Electrochemistry, Analytical Letters, 2 (1969) 423-431.
[28] Y. Takata, K. Fujita, Application of a coulometric detector to rapid ion-exchange chromatography, Journal of Chromatography, 108 (1975) 255-263.
[29] Y. Takata, G. Muto, Flow coulometric detector for liquid chromatography, Analytical Chemistry, 45 (1973) 1864-1868.
[30] H.S. Wroblowa, Flow-through electrodes: I. Diagnostic mechanistic criteria, Journal of Electroanalytical Chemistry, 42 (1973) 321-327.
[31] H.B. Hanekamp, H.J. Vannieuwkerk, Theoretical considerations on the performance of electrochemical flow-through detectors, Analytica Chimica Acta, 121 (1980) 13-22.
[32] H.B. Hanekamp, W.H. Voogt, P. Bos, R.W. Frei, An electrochemical scrubber for the elimination of eluent background effects in polarographic flow-through detection, Analytica Chimica Acta, 118 (1980) 81-86.
[33] J.V. Kenkel, A.J. Bard, A dual working electrode coulometric flow cell, Journal of Electroanalytical Chemistry, 54 (1974) 47-54.
[34] L.I. Ilcheva, A.D. Dakashev, Coulometric detector cell for use with flow injection, Analyst, 115 (1990) 1247-1249.
[35] T. Fujinagat, S. Nagai, C. Okazaka, Nippon Kagaku Zasshi, 84 (1963) 941
[36] A.J. Bard, High Speed Controlled Potential Coulometry, Analytical Chemistry, 35 (1963) 1125-1128.
[37] E.L. Eckfeldt, Continuous Coulometric Analysis Using Working Electrode of Predetermined Potential, Analytical Chemistry, 31 (1959) 1453-1460.
[38] R.E. Sioda, Criterion of completeness of electrolysis at flow porous electrodes, Journal of Applied Electrochemistry, 8 (1978) 297-304.
[39] R.E. Sioda, T. Kambara, Flow coulometry on a porous electrode under condition of limiting current, Journal of Electroanalytical Chemistry, 38 (1972) 51-56.
[40] B.G. Ateya, Radial diffusion and entrance effects in porous flow-through electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry, 76 (1977) 183-190.
[41] B.G. Ateya, E.A.S. Arafat, S.A. Kafafi, Hydrodynamic effects on the efficiency of porous flow-through electrodes, Journal of Applied Electrochemistry, 7 (1977) 107-112.
[42] V.G. Levich, D.B. Spalding, Physicochemical hydrodynamics: V. G. Levich Festschrift, Advance Publications, 1977.
[43] J.A. Trainham, J. Newman, A Flow-Through Porous Electrode Model: Application to Metal-Ion Removal from Dilute Streams, Journal of the Electrochemical Society, 124 (1977) 1528-1540.
[44] R. Alkire, R. Gould, Analysis of Multiple Reaction Sequences in Flow-Through Porous Electrodes, Journal of the Electrochemical Society, 123 (1976) 1842-1849.
[45] R. Alkire, B. Gracon, Flow-Through Porous Electrodes, Journal of the Electrochemical Society, 122 (1975) 1594-1601.
[46] R.C. Alkire, Mathematical-modeling of Flow-Through Porous electrodes, Journal of the Electrochemical Society, 123 (1976) C237-C237.

[47] R.C. Alkire, R. Gould, Analysis of Multiple Reaction Sequences in Flow-Through Porous Electrodes, Journal of the Electrochemical Society, 123 (1976) C238-C238.
[48] R.C. Alkire, R.M. Gould, Multiple Reaction Sequences in Flow-Through Porous Electrodes, Journal of the Electrochemical Society, 126 (1979) C140-C140.
[49] J.M. Fenton, R.C. Alkire, Mass Transfer in Flow-Through Porous Electrodes with Two-Phase Liquid-Liquid Flow, Journal of the Electrochemical Society, 135 (1988) 2200-2209.
[50] R.A. Sioda, Current-potential dependence in the flow electrolysis on a porous electrode, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 34 (1972) 399-409.
[51] R.E. Sioda, Distribution of potential in a porous electrode under conditions of flow electrolysis, Electrochimica Acta, 16 (1971) 1569-1576.
[52] J.C. Sohm, Les electrodes a circulation de liquide, Electrochimica Acta, 7 (1962) 629-652.
[53] I.A. Zaidenman, The theory of liquid diffusion electrodes 2. Electrodes of the 2nd-type, Zhurnal Fizicheskoi Khimii, 33 (1959) 437-440.
[54] R.E. Sioda, Limiting current in flow electrolysis on porous electrode, Electrochimica Acta, 17 (1972) 1939-1941.
[55] R.E. Sioda, Limiting current on porous graphite electrodes under flow conditions, Journal of Applied Electrochemistry, 5 (1975) 221-228.
[56] W.J. Blaedel, J. Wang, Characteristics of a rotated porous flow-through electrode, Analytical Chemistry, 52 (1980) 1697-1700.
[57] J. Ruzicka, E.H. Hansen, The first decade of flow injection analysis: from serial assay to diagnostic tool, Analytica Chimica Acta, 179 (1986) 1-58.
[58] W.J. Blaedel, S.L. Boyer, Electrochemical characteristics of the gold micromesh electrode, Analytical Chemistry, 45 (1973) 258-263.
[59] S. Pons, M. Fleischmann, The behavior of microelectrodes, Analytical Chemistry, 59 (1987) A1391-A1399.
[60] A.N. Strohl, D.J. Curran, Reticulated vitreous carbon flow-through electrodes, Analytical Chemistry, 51 (1979) 353-357.
[61] A.N. Strohl, D.J. Curran, Flow injection analysis with reticulated vitreous carbon flow-through electrodes, Analytical Chemistry, 51 (1979) 1045-1049.
[62] J. Wang, H.D. Dewald, Deposition of Metals at a Flow-Through Reticulated Vitreous Carbon Electrode Coupled with On-Line Monitoring of the Effluent, Journal of the Electrochemical Society, 130 (1983) 1814-1818.
[63] H. Dejmkova, M. Baroch, M. Krejcova, J. Barek, J. Zima, Coulometric detector based on carbon felt, Applied Materials Today, 9 (2017) 482-486.

# 4. Detektory s obnovitelným pracovním materiálem

Kapitola 2 této disertační práce je částečně věnována problému pasivace a historie elektrod. Ty jsou považovány za jednu z hlavních slabin elektrochemických detektorů. V případě porézních detektorů jde o ještě palčivější problém a v průtokovém uspořádání jde o hlavní překážku automatizace. [1].

Pro boj proti historii a pasivaci elektrody je možné použít některé techniky a materiály, například rtuťovou kapkovou elektrodu, jejíž velký úspěch byl zapříčiněn právě periodickou a reprodukovatelnou obnovou pracovního materiálu [2, 3].

Snadnou obnovu povrchu přináší i CPE [4, 5], spojena se snahou na jejím základě připravit kapkovou elektrodu [6]. Diamantová elektroda vykazuje vyšší odolnost proti pasivaci, související s parafinickým charakterem jejího povrchu, na němž se polární látky hůře adsorbují [2, 7-12].

Klasické pevné elektrody z ušlechtilých kovů a uhlíkových materiálů je možné mechanicky čistit broušením a leštěním [13-15]. Tato technika obnovy povrchu však vyžaduje demontáž pracovní cely a mnohdy má nízkou reprodukovatelnost. Další možností je zapojení čistících elektrochemických cyklů (oxidačních nebo redukčních) [16, 17]. Čistící cykly však nejsou vždy zcela účinné [14]. Žádná z technik obnovy tuhých elektrod tedy zcela neřeší problém jejich historie.

V případě porézních elektrod je obnova povrchu ještě více limitována, jelikož mechanická obnova není z důvodu jejich konstrukce prakticky možná a elektrochemické čistící cykly mají jen velmi nízkou účinnost. Pasivovanou porézní elektrodu je pak mnohdy nezbytné zcela vyměnit, což je jednak finančně náročné a jednak opět vyžaduje komplikovanou manipulaci s detekční celou a tím znemožňuje automatizaci měření.

Automatizace je v dnešním průmyslu klíčová. Jediná technika obnovy pracovního materiálu představená v této kapitole, kterou lze snadno automatizovat, je rtuťová kapková elektroda, ale od jejího použití, jakožto toxického materiálu, se ustupuje. Proto jsou pro průmyslovou aplikaci zajímavé techniky, které umožňují snadnou a automatizovatelnou obnovu povrchu pracovního materiálu.

Možnost automatizovatelné a reprodukovatelné obnovy elektrody byla představena týmem profesora Růžičky [18, 19]. Jde o techniku obnovy povrchu založenou na tvorbě porézní elektrody z mikročástic pracovního materiálu. Pro tuto techniku byla připravena speciální průtoková cela nazvaná "jet–ring". Její konstrukce vychází z takzvané "fountain cell" [20] pro optická měření v proudící kapalině.

Jet–ring cela nebyla však hned použita jako elektrochemický detektor. Původně byla aplikována pro průtokovou injekční spektroskopii a mikroskopii suspenzí na obnovitelném povrchu při studiu buněk (erytrocytů a lymfocytů), které byly na obnovitelné mikročástice zachytávány [21]. Kromě toho byla představena pro celou řadu dalších aplikací [22-27], z nichž za zmínku stojí zejména koncept separace na obnovitelné mikro–koloně [28].

Až nakonec byla jet–ring cela použita přímo pro elektrochemická měření. Nejprve byla otestována jako amperometrický detektor řešící problém pasivace při práci v komplikovaných organických matricích jako například pivo a víno [29]. Později byla použita i pro elektrochemické stanovení glukosy technikou sekvenční injekční analýzy [30].

Všechny výše zmíněné techniky průtokových analýz na mikročásticích začaly být posléze označovány jako nová analytická technika nazvaná "bead injection" [28, 31].

Konstrukce jet–ring cely je poměrně jednoduchá. Tělo detektoru je tvořeno z PVC kapiláry s vnitřním průměrem 0,8 mm, která je usazena v těle z hliníku a nerezové oceli. Na výstupu kapiláry je kolmo umístěna pohyblivá záslepka s kontaktem pro pracovní materiál a pomocnou elektrodu. Kontakt na bázi nerezové ocelové trubičky o vnitřním průměru 0,76 mm je pružinou tlačen proti nashromážděnému pracovnímu materiálu uvnitř jet–ring cely. Pomocná elektroda vyrobená z nerezové oceli je opatřena na své špičce teflonovou trubičkou, která zabraňuje vzniku zkratu [29]. Záslepka dále slouží k zachycení částic pracovního materiálu uvnitř detektoru.

Mezi záslepkou a kapilárou je ponechán nepatrný prostor, jehož velikost může být dle potřeb měněna. Při plnění elektrody je tento otvor nastaven na 20–50 % průměru použitých mikročástic pracovního materiálu [26], díky tomu je kruhový prostor u ústí kapiláry postupně zaplňován mikročásticemi. Centrální oblast je zaplněna jako poslední. Cela je tedy založena na radiálním toku skrz úzkou skulinu ve tvaru prstence mezi přívodní kapilárou a na ni kolmou záslepkou.

Plnění detektoru je prováděno tokem nosného roztoku suspenzí obsahující přesně definované množství částic potřebných pro zaplnění celého prstencového prostoru pracovní cely.

V detektoru je vytvořena vrstva pracovního materiálu s výškou 0,75 mm, celková hmotnost materiálu je zhruba 0,5 mg. Použité vodivé částice tvoří třídimensionální porézní průtokovou elektrodu [29]. Množství pracovního materiálu může být změněno použitím jiného objemu suspenze při plnění detektoru. Pro plnění, v případě amperometrické detekce, byly použity sférické částice skelného uhlíku, které byly doplněny Tritonem X–100. Ten měl potlačovat shlukování částic uhlíku. Vzhledem k malému množství pracovního materiálu, používaného pro plnění detektoru, jde o velmi ekonomickou metodu i v případě, že by byl pracovní materiál měněn po každém nástřiku vzorku [29].

Pro dostatečnou opakovatelnost obnovy pracovního materiálu je klíčovým faktorem konstantnost složení plnící suspenze. Toho bylo dosaženo jemným mícháním suspenze umístěné ve čtvercové baňce rychlostí 30 rpm [26].

V literatuře jsou popsány dvě možnosti odstranění pasivovaného pracovního materiálu z jet–ring cely. Použité částice mohou být z detektoru vytlačovány pomocí peristaltické pumpy [26, 29] nebo po otočení toku odstraněny ze systému za použití vícecestného ventilu [19, 32, 33]. Oba způsoby lze teoreticky automatizovat. První způsob je rychlejší a velmi spolehlivý. Druhý způsob je elegantnější, jelikož k obsluze systému stačí jediná pumpa a umožňuje snadnější automatizaci. Obnova elektrodového materiálu trvá v obou případech méně než jednu minutu [29].

Odstranění částic z detektoru obráceným tokem je dále komplikováno dalším faktorem. Porézní pracovní elektroda vytvořená z mikročástic je stabilní při průtoku analytu, a i v případě zastavení toku technikou stop–flow. Odstranění veškerého pracovního materiálu otočením toku není ale vždy dostatečně efektivní. Obzvláště měkčí materiály mají tendenci shlukovat a spojovat se. V detektoru je při obráceném toku vzhledem k jeho konstrukci vytvářen symetrický tok, v jehož středu se vytváří zóna s nulovým průtokem. Všechny částice menší než tento nulový tok následně zůstávají v detektoru.

V případě amperometrické detekce byly před samotnou aplikací pro komplikované vzorky nejprve popsány základní elektrochemické vlastnosti detektoru pomocí hexakyanoželeznatanu draselného (při detekčním potenciálu +700 mV oproti platinové elektrodě). Proudová odezva oxidace hexakyanoželeznatanu rostla i nad detekční potenciál +600 mV, pravděpodobné vysvětlení je potenciálový pokles porézní elektrody popsaný již dříve [34-36]. Jet–ring cela měla při této charakterizaci jinak velmi dobré základní elektrochemické vlastnosti, zejména pak výbornou opakovatelnost měření (RSD 1,1 %), velmi širokou linearitu odezvy (více než 6 řádů) a nízký detekční limit stanovení 50 nmol $l^{-1}$ [29].

Jet–ring cela je velmi zajímavý a univerzální koncept, kdy je možné připravovat kompaktní vrstvu z mikročástic za použití různorodého pracovního materiálu. Nejde o zcela dokonalý systém, ale pro tuto disertační práci se stal základem při přípravě nového konstrukčního řešení.

**Literatura:**

[1] D.C. Johnson, S.G. Weber, A.M. Bond, R.M. Wightman, R.E. Shoup, I.S. Krull, Electroanalytical voltammetry in flowing solutions, Analytica Chimica Acta, 180 (1986) 187-250.
[2] M.H. Lefebvre, Progress on Drinking Water Research, Nova Science, 2008.
[3] V. Vyskocil, J. Barek, Mercury Electrodes-Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 39 (2009) 173-188.
[4] R.N. Adams, Carbon paste electrodes, Analytical Chemistry, 30 (1958) 1576-1576.
[5] R.C. Alkire, P.N. Bartlett, J. Lipkowski, Electrochemistry of Carbon Electrodes, Wiley, 2015.
[6] H. Tatsumia, M. Shiba, Polarography with a dropping carbon electrode, Electrochemistry Communications, 20 (2012) 160-162.
[7] J. Cvacka, G.M. Swain, J. Barek, J. Zima, Determination of Aminonaphthalenes and Aminobiphenyls by Liquid Chromatography with Amperometric Detection on Diamond-Film Electrode, Chemické listy, 96 (2002) 33-38.
[8] A. Fujishima, Y. Einaga, T. Narasinga Rao, D.A. Tryk, Diamond Electrochemistry - 1st Edition, Elsevier Science, 2005.
[9] J. Musilova, J. Barek, K. Peckova, The Use of Boron-Doped Diamond Film Electrodes for Detection of Organic Compounds, Chemické listy, 103 (2009) 469-478.
[10] K. Pecková, V. Mocko, F. Opekar, G.M. Swain, J. Zima, J. Barek, Miniaturized Amperometric Detectors for HPLC and Capillary Zone Electrophoresis, Chemické listy, 100 (2006) 124-132.
[11] K. Peckova, J. Musilova, J. Barek, Boron-Doped Diamond Film Electrodes-New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 39 (2009) 148-172.
[12] C.G. Zoski, Handbook of Electrochemistry, Elsevier Science, 2007.
[13] D.S. Bindra, G.S. Wilson, Pulsed amperometric detection of glucose in biological fluids at a surface-modified gold electrode, Analytical Chemistry, 61 (1989) 2566-2570.
[14] T.Z. Polta, D.C. Johnson, Pulsed amperometric detection of sulfur compounds: Part I. Initial studies of platinum electrodes in alkaline solutions, Journal of Electroanalytical Chemistry, 209 (1986) 159-169.
[15] A.J. Tudos, D.C. Johnson, Dissolution of Gold Electrodes in Alkaline Media Containing Cysteine, Analytical Chemistry, 67 (1995) 557-560.
[16] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition, Wiley Textbooks, 2000.
[17] D. Pletcher, A First Course in Electrode Processes, RSC Publshing 2009.
[18] O. Egorov, J. Ruzicka, Flow injection renewable fibre optic sensor system. Principle and validation on spectrophotometry of chromium(VI), Analyst, 120 (1995) 1959-1962.
[19] C.H. Pollema, J. Ruzicka, Flow injection renewable surface immunoassay: a new approach to immunoanalysis with fluorescence detection, Analytical Chemistry, 66 (1994) 1825-1831.

[20] K.M. Scudder, C.H. Pollema, J. Ruzicka, The fountain cell: a tool for flow-based spectroscopies, Analytical Chemistry, 64 (1992) 2657-2660.
[21] P.S. Hodder, J. Ruzicka, A flow injection renewable surface technique for cell-based drug discovery functional assays, Analytical Chemistry, 71 (1999) 1160-1166.
[22] B. Bas, K. Jedlinska, K. Wegiel, New electrochemical sensor with the renewable silver annular band working electrode: Fabrication and application for determination of selenium(IV) by cathodic stripping voltammetry, Electrochemistry Communications, 49 (2014) 79-82.
[23] B. Dockendorff, D.A. Holman, G.D. Christian, J. Ruzicka, Automated solid phase extraction of theophylline by sequential injection on renewable column, Analytical Communications, 35 (1998) 357-359.
[24] D.A. Holman, G.D. Christian, J. Ruzicka, Titration without mixing or dilution: Sequential injection of chemical sensing membranes, Analytical Chemistry, 69 (1997) 1763-1765.
[25] M. Miro, S.K. Hartwell, J. Jakmunee, K. Grudpan, E.H. Hansen, Recent developments in automatic solid-phase extraction with renewable surfaces exploiting flow-based approaches, Trends in Analytical Chemistry, 27 (2008) 749-761.
[26] J. Ruzicka, C.H. Pollema, K.M. Scudder, Jet ring cell: a tool for flow injection spectroscopy and microscopy on a renewable solid support, Analytical Chemistry, 65 (1993) 3566-3570.
[27] B. Willumsen, G.D. Christian, J. Ruzicka, Flow injection renewable surface immunoassay for real time monitoring of biospecific interactions, Analytical Chemistry, 69 (1997) 3482-3489.
[28] J. Ruzicka, L. Scampavia, From flow injection to bead injection, Analytical Chemistry, 71 (1999) 257A-263A.
[29] M. Mayer, J. Ruzicka, Flow injection based renewable electrochemical sensor system, Analytical Chemistry, 68 (1996) 3808-3814.
[30] T. Lindfors, I. Lahdesmaki, A. Ivaska, A jet ring cell with a renewable solid support for amperometric detection of glucose in a sequential injection analysis system, Analytical Letters, 29 (1996) 2257-2267.
[31] E. Verpoorte, Beads and chips: new recipes for analysis, Lab on a Chip, 3 (2003) 60N-68N.
[32] C.H. Pollema, A. Lernmark, J. Ruzicka, Flow injection fluorescence microscopy applied to a rapid cell surface immunoassay, Cytometry, 19 (1995) 70-76.
[33] J. Ruzicka, Flow injection-renewable surface techniques, Analytica Chimica Acta, 308 (1995) 14-19.
[34] A.J. Bard, Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances, Taylor & Francis, 1982.
[35] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 343 (1992) 566-575.
[36] R.E. Sioda, K.B. Keating, Flow electrolysis with extended-surface electrodes, Electroanalytical Chemistry, 12 (1982) 1-52.

# 5. Měď jako elektrodový materiál

První experimentální práce, využívající vzniku komplexů mědi k elektrochemickému stanovení koncentrace sledované látky, nepoužívaly měď přímo jako pracovní materiál elektrody. Namísto toho byly ionty mědi přidávány přímo do základního elektrolytu nebo nosného roztoku a byl měřen pokles jejich koncentrace potenciometricky. V případě HPLC uspořádání byly ionty přidávány do roztoku až za kolonou před detektorem. Tato technika má ale jeden zásadní nedostatek, rozšiřování píků [1]. Proto se pro stanovení začaly používat pracovní elektrody z mědi, které již tímto nedostatkem netrpí [2].

Komplexotvorná reakce se velmi dobře uplatňuje při stanovení AK, tvořících s mědnatými ionty velmi stabilní komplexy. Jejich zpětná reakce je díky tomu velmi pomalá [3, 4]. Kromě AK lze touto technikou stanovovat i polykarboxylové kyseliny, jako například kyselinu šťavelovou, maleinovou, citronovou, isocitronovou a vinnou [1, 2, 4-14].

Elektrochemický mechanismus komplexotvorné reakce využívá měďnaté ionty přítomné ve vrstvě oxidů, které vystupují jako centrální atomy. AK a polykarbonylové kyseliny představují v této reakci ligandy. Komplexotvorná reakce urychluje oxidaci povrchu měděné elektrody a reakce s ligandy má za následek nárůst anodického proudu, který je úměrný jejich koncentraci. Odezva je závislá na stabilitě vzniklého komplexu a kinetice komplexotvorné reakce. Jde tedy o selektivní metodu vhodnou pro ligandy schopné rychle tvořit stabilní komplexy s mědí [15].

Komplexotvorná reakce vyžaduje specifické podmínky. Elektrodová kinetika je velmi rychlá při použití fosfátového a uhličitanového pufru. Naopak při použití borátového pufru je elektrodová kinetika hlavní limitní faktor proudové odezvy, a proto se tento pufr v praxi nepoužívá [4].

Citlivost detekce dále roste se snižující se koncentrací použitého pufru a s nárůstem pH. V případě reakce s pomalou kinetikou je dále vhodné použití nižších průtokových rychlostí [12, 16]. Odezva detektoru v tomto případě klesá s narůstající průtokovou rychlostí. Pokles je dle experimentálních měření lineární pro glycin a exponenciální pro ostatní AK. Toto chování naznačuje, že odezva detektoru je řízena pouze kinetikou komplexotvorné reakce [16]. Na druhou stranu bylo experimentálně prokázáno, že pro AK s velmi rychlou kinetikou je proces alespoň částečně řízen konvektivní difuzí a odezva detektoru s rostoucí průtokovou rychlostí

stoupá [3]. Odezva detektoru tedy roste se stoupající průtokovou rychlostí, ale pouze v případech, kdy je komplexotvorná reakce AK opravdu velmi rychlá. V ostatních případech dochází k poklesu, a to bez přímé závislosti na geometrii pracovní cely.

Dalším zásadním faktorem je pH. Vhodné je použití pH v oblasti 6 až 11. Pokud je měděná elektroda anodizovaná ve slabě kyselém prostředí pufrů, dochází k rychlému pokrytí jejího povrchu vrstvou oxidů a hydroxidů, čímž je pracovní materiál pasivován. Při pH 3–4 dochází k tvorbě nerozpustné vrstvy oxidu měďného [17, 18]. Dále se v závislosti na složení použitých roztoků tvoří oxid měďnatý, hydroxid měďnatý a jiné měďnaté soli [19, 20]. Při nižších pH není elektroda aktivována a proudová odezva odpovídá přímé oxidaci Cu na $Cu^{2+}$ [14].

Pokud je elektroda kladně nabita v roztocích s vyšším pH (6–11) dochází nejprve k vytvoření měďné(I) vrstvy, která pokrývá povrch elektrody. Síla této vrstvy není závislá na vkládaném potenciálu. Měďnaté ionty se tvoří až při vložení kladnějších potenciálů a mají schopnost difundovat vrstvou mědi(I). Rozpustnost měďnatých iontů je však omezena a koncentraci iontů na povrchu elektrody lze tedy vkládaným potenciálem ovlivnit jen do určité maximální hodnoty. Při dalším zvyšování potenciálu již nedochází k navýšení koncentrace iontů na povrchu, ale k tvorbě oxidů a hydroxidů s měďnatými ionty. Koncentraci měďnatých iontů na povrchu elektrody lze odvodit z Nernst–Kirchoffovy rovnice.

V případě použití kolony na bázi silikagelu je navíc použitelná hodnota pH omezena i stabilitou kolony. V tomto případě musí být pH udržováno na hodnotě 6,5–7,0, což je pH vhodné pro elektrochemickou detekci i samotnou kolonu. Navíc byla v reverzní fázi pozorována tvorba dvojpíků při vyšších použitých pH. První pík je důsledkem formování dimerních nebo polymerních komplexů [21]. Tyto limity byly však díky rozvoji a použití nových materiálů v HPLC odstraněny.

V nosném roztoku dále není vhodné použití vyšší koncentrace organických rozpouštědel (běžně se používá do 10 %). Organická rozpouštědla snižují rychlost komplexotvorné reakce a snižují tak citlivost stanovení. Tento efekt je způsoben snížením relativní permitivity, což snižuje konstantu rychlosti iontové reakce [22, 23].

Pro stanovení AK se tedy nejčastěji používá nosný roztok nebo mobilní fáze z fosfátového pufru o koncentraci 0,25M a o pH 6,8. Volí se průtokové rychlosti nižší než 1 ml $min^{-1}$ a detekční potenciály +0,1 až +0,15 V [16, 24]. Možnosti optimalizace separačních podmínek jsou tedy významně omezeny.

Experimentálně bylo prokázáno, že odezva není příliš závislá na geometrii pracovní cely, což potvrzuje teorii, že hlavní úlohu zde má kinetika komplexotvorné reakce [16]. Velikost proudu měděné elektrody závisí dále ještě na několika faktorech, a to zejména na

termodynamice (stabilitě vznikajícího komplexu). Další faktory již však nemají takový vliv [14].

Analytické detekční techniky využívající komplexotvorné reakce s mědí lze rozdělit na amperometrické a potenciometrické. Potenciometrická detekce měří změny potenciálu elektrody v závislosti na vzniku měděných komplexů ve vrstvě oxidů. Tato technika má však nelineární průběh kalibračních křivek a omezenou citlivost. Aby bylo dosaženo lineární odezvy elektrody, musel by být v roztoku dostatečně velký nadbytek měďnatých iontů, což by naopak vedlo k nízké změně potenciálu elektrody [4].

Vhodnější technikou je proto amperometrické stanovení využívající usnadněného rozpouštění hydratovaných oxidů na povrchu mědi, které je citlivější a má univerzálnější použití (netrpí nelineárností kalibračních závislostí) [4].

Pro stanovení AK byly použity různé designy pracovních elektrod, jako například rotační disková elektroda [4], tubulární elektroda [3, 5], detektor na bázi měděného drátku [2, 4, 6-12, 25] a mikrocylindrická elektroda [24].

Podobné elektrochemické a komplexační vlastnosti jako měď mají i jiné kovy, zejména rtuť, kobalt a nikl. Ty však již nejsou vhodnými elektrodovými materiály. Nikl a kobalt mají mnohem složitější a pomalejší elektrodovou reakci a v případě rtuti dochází k rychlému transportu elektrochemicky generovaných volných iontů od elektrody [15, 16].

**Literatura:**

[1] C.R. Loscombe, G.B. Cox, J.A.W. Dalziel, Application of a copper electrode as a detector for high-peformance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 166 (1978) 403-410.
[2] P.R. Haddad, P.W. Alexander, M. Trojanowicz, High-performance liquid chromatography of organic acids with potentiometric detection using a metallic copper electrode, Journal of Chromatography, 315 (1984) 261-270.
[3] W.T. Kok, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode, Journal of Chromatography, 256 (1983) 17-26.
[4] W.T. Kok, H.B. Hanekamp, P. Bos, R.W. Frei, Amperometric detection of amino acids with a passivated copper electrode, Analytica Chimica Acta, 142 (1982) 31-45.
[5] P.W. Alexander, P.R. Haddad, G.K.C. Low, C. Maitra, Application of a copper tubular electrode as a potentiometric detector in the determination of amino acids by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 209 (1981) 29-39.
[6] P.W. Alexander, P.R. Haddad, M. Trojanowicz, Potentiometric flow-injection determination of copper-complexing inorganic anions with a copper-wire indicator electrode, Analytical Chemistry, 56 (1984) 2417-2422.
[7] P.W. Alexander, P.R. Haddad, M. Trojanowicz, Potentiometric flow-injection determination of copper-complexing inorganic anions with a copper-wire indicator electrode, Analytica Chimica Acta, 171 (1985) 151-163.

[8] P.W. Alexander, C. Maitra, Continuous-flow potentiometric monitoring of alpha-amino acids with copper wire and tubular electrodes, Analytical Chemistry, 53 (1981) 1590-1594.
[9] P.W. Alexander, M. Trojanowicz, P.R. Haddad, Indirect Potentiometric Determination of Metal Ions by Flow-Injection Analysis with a Copper Electrode, Analytical Letters Part a-Chemical Analysis, 17 (1984) 309-320.
[10] P.R. Haddad, P.W. Alexander, M. Trojanowicz, Application of indirect potentiometric detection with a metallic copper electrode to ion chromatography of transition metal ions, Journal of Chromatography, 324 (1985) 319-332.
[11] P.R. Haddad, P.W. Alexander, M. Trojanowicz, Ion chromatography of inorganic anions with potentiometric detection using a metallic copper electrode, Journal of Chromatography, 321 (1985) 363-374.
[12] W.T. Kok, G. Groenendijk, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, Determination of oxalic acid in biological matrices by liquid chromatography with amperometric detection, Journal of Chromatography, 315 (1984) 271-278.
[13] W.J. Mayer, M.S. Greenberg, A comparison of differential pulse and d.c. amperometric detection modes for the liquid chromatographic determination of oxalic acid, Journal of Chromatographic Science, 17 (1979) 614-616.
[14] K. Stulik, V. Pacakova, K. Le, B. Hennissen, Amperometric flow detection with a copper working electrode-response mechanism and application to various compounds, Talanta, 35 (1988) 455-460.
[15] K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.
[16] K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart, M. Podolak, Operational parameters of voltammetric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors, Journal of Chromatography, 367 (1986) 311-321.
[17] Y.A. Eltantawy, F.M. Alkharafi, A. Katrib, Nature and mechanism of anodic film formation on Cu in alkaline phosphate media, Journal of Electroanalytical Chemistry, 125 (1981) 321-331.
[18] H.H. Strehblow, B. Titze, The investigation of the passive behaviour of copper in weakly acid and alkaline solutions and the examination of the passive film by esca and ISS, Electrochimica Acta, 25 (1980) 839-850.
[19] A.J. Bard, H. Lund, Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements, Dekker, 1978.
[20] G. Bianchi, P. Longhi, Copper in sea-water, potential-pH diagrams, Corrosion Science, 13 (1973) 853-864.
[21] K. Stulik, V. Pacakova, G. Jokuszies, Analysis of dipeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography without derivatization using amperometric detection on a copper electrode, Journal of Chromatography, 436 (1988) 334-337.
[22] D.D. Perrin, I.G. Sayce, V.S. Sharma, Mixed ligand complex formation by copper(II) ion, Journal of the Chemical Society A -Inorganic Physical Theoretical, (1967) 1755-1759.
[23] D.D. Perrin, V.S. Sharma, Histidine complexes with some bivalent cations, Journal of the Chemical Society A -Inorganic Physical Theoretical, (1967) 724-728.
[24] K. Pecková, V. Mocko, F. Opekar, G.M. Swain, J. Zima, J. Barek, Miniaturized Amperometric Detectors for HPLC and Capillary Zone Electrophoresis, Chemické listy, 100 (2006) 124-132.
[25] J.N. Ye, R.P. Baldwin, Determination of Amino Acids and Peptides by Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection at a Copper Electrode, Analytical Chemistry, 66 (1994) 2669-2674.

# 6. Výsledky a diskuze

## 6.1. Detektor na bázi skelného uhlíku

Konstrukce coulometrického detektoru popsaná v rámci této disertační práce navazuje na koncept představený již v mé diplomové práci [1] a dále jej rozvíjí. Obě tyto konstrukce mají stejný základ, ale liší se zejména v těle detektoru, což je nejlépe patrné z nákresu obou detektorů uvedených na obrázku 6.1.

Základem obou detektorů je teflonová kapilára (PTFE, 1/16“ × 0,50 mm ID, VICI, USA) s vnitřním průměrem 0,5 mm, která je u svého ústí tepelně zploštěna a roztažena. Vnitřní profil kapiláry u ústí není vzhledem k tepelnému zploštění zcela válcovitý, ale částečně kónický s vnitřním průměrem u ústí až 0,7 mm. Do stěny kapiláry je 3 mm nad jejím ústím jehlou zhotoven kruhový otvor, který slouží pro zavedení kontaktu pracovního materiálu v podobě platinového drátku o průměru 0,4 mm. Všechny podstatné rozměry detektoru jsou znázorněny na obrázku 6.2. Zavedený kontakt je fixován a zpevněn vrstvou polystyrenu a dvou vrstev tepelně smršťovací bužírky. Takto upravená kapilára je zavedena do šroubu (PEEK Fingertight Nuts for Flanged ¼–28 Connections, VICI, USA). K ústí kapiláry je přiložen flitr z filtračního papíru. Filtr je u ústí kapiláry držen tělem detektoru, který, jak již bylo zmíněno, se pro obě konstrukce liší. Přesný popis konstrukce společně s popisem výměny pracovního materiálu a detailním popisem základních elektrochemických vlastností detektoru jsou uvedeny v příloze 1 a 2 této disertační práce.

Z obrázku 6.1 je patrné, že původní koncept měl komplikovanější konstrukci. Původně byl totiž filtr držen u ústí kapiláry dvěma opačně orientovanými šrouby fixovanými proti sobě spojkou. Na kapiláru s pracovním materiálem doléhala druhá tepelně roztažená kapilára, jejíž délka byla 5 mm a vnitřní průměr 1 mm [1].

Protichůdný šroub se spojkou byl v rámci této disertační práce nahrazen záslepkou. Komerčně dostupná záslepka (Tefzel EFTE Cap for ¼–28 Nut, IDEX Health & Science, USA) byla upravena tak, že do ní byl ve spodní části vyvrtán kruhový otvor o průměru 1,2 mm. Spodní část spojky byla zbroušena tak, aby spodní stěna měla šířku pouhé 2 mm. Vyvrtaný otvor byl ještě zbroušen a částečně i skosen, takže se od ústí kapiláry průměr vyvrtaného otvoru zvětšoval

až k 1,6 mm. Větší průměr vyvrtaného otvoru vedl již jen k nestabilitě filtru u ústí kapiláry, který se při průtoku kapaliny protrhával.

Hlavní slabinou původní konstrukce není její větší komplikovanost, ale zejména nedostačující vodivé spojení mezi pracovním materiálem a pomocnou a referenční elektrodou. Toto spojení představuje pouze úzký kanálek charakterizovaný vnitřním průměrem teflonové kapiláry, což nepříznivě ovlivňuje efektivní vzdálenost a elektrický odpor mezi elektrodami [2]. To má negativní vliv na základní elektrochemické vlastnosti detektoru. Konstrukční úpravy popsané v této disertační práci tento nedostatek odstraňují.

Pro testování základních elektrochemických vlastností obou konstrukcí byly použity dvě stejné modelové látky, hydrochinon a hexakyanoželeznatan draselný. Díky tomu lze obě konstrukce a jejich vlastnosti snadno porovnat. Diskutovány budou stupně konverze, průběh hydrodynamických volatamogramů (včetně detekčního potenciálu) a průběh kalibračních křivek.

Původní detektor dosahoval vysokých hodnot stupně konverze, přesněji pracoval s účinností 90,1 % pro hexakyanoželeznatan draselný a 81,7 % pro hydrochinon [1]. Jde o vyšší hodnoty, než běžně dosahují amperometrické detektory, ale nedocházelo k úplným přeměnám stanovovaných látek. Konstrukční úpravy představené v předcházejících odstavcích měly za následek nárůst stupně konverze až ke 100 % (přesněji bylo dosaženo stupně konverze 99,8 % pro hexakyanoželeznatan draselný a 109,1 % pro hydrochinon). Detektor vyvinutý v této disertační práci tak může být označený jako coulometrický dle definice uvedené v kapitole 1.1.

Rozdílné elektrochemické vlastnosti se projevují i v případě tvaru hydrodynamických voltamogramů. Hlavní rozdíl není ve strmosti naměřených křivek, ale v jejich vývoji po dosažení maxima. V případě hexakyanoželeznatanu draselného a původního detektoru bylo dosaženo maxima při vložení potenciálu +0,5 V [1], dále však s narůstajícím potenciálem docházelo k poklesu proudové odezvy, což neodpovídá teoretickému popisu reverzibilního děje. V tomto případě se nejspíše projevil vliv velké efektivní vzdálenosti mezi pracovní a referenční elektrodou. Upravený detektor má maximum hydrodynamického voltamogramu při +0,6 V. Následné zvyšování vkládaného potenciálu již nemá zásadní vliv na odezvu detektoru, dochází pouze k nárůstu proudu pozadí. Proud pozadí navíc dosahuje po úpravě konstrukce čtyřikrát nižších hodnot (viz obr 6.3) než v případě původního detektoru. Obdobné změny jsou pozorovatelné i v případě hydrochinonu, ačkoliv pro tuto látku již nejsou tak markantní. U hydrochinonu také nedošlo k zásadní změně optimálního detekčního potenciálu, pouze z +1,2 V [1] na +1,1 V. Jak je patrné, detekční potenciály se pro obě konstrukce významně neliší. Všechny naměřené hodnoty detekčních potenciálů jsou však vyšší než teoretické hodnoty pro

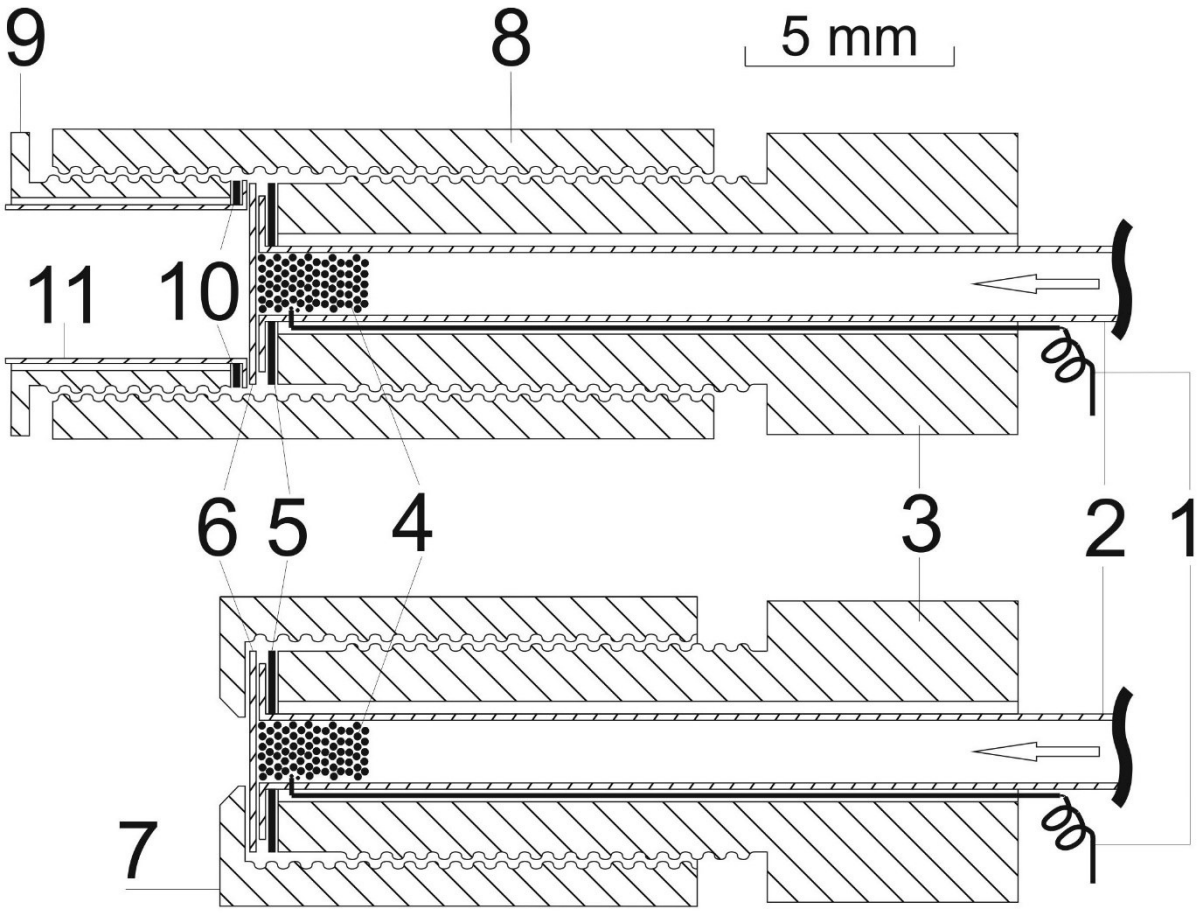
skelný uhlík, což je pravděpodobně způsobeno špatným rozložením potenciálu na pracovní elektrodě, pozorovaným u porézních detektorů již dříve, nebo špatnou kompenzací iR spádu [2].

Dále měla úprava konstrukce detektoru zásadní vliv i na tvar kalibračních křivek. Pro obě modelové látky byl v původní konstrukci představené v rámci diplomové práce patrný velký záporný úsek a kalibrační křivky vyhodnocené z ploch píků měly lineární průběh jen pro koncentrace vyšší než 20 μmol $l^{-1}$ [1]. Úpravou konstrukce došlo k zásadnímu vylepšení záporného úseku kalibrační křivky a bylo dosaženo lineárního rozsahu až do limitů detekce pro obě modelové látky (viz tabulka 6.1). Záporný úsek však nebyl zcela odstraněn.

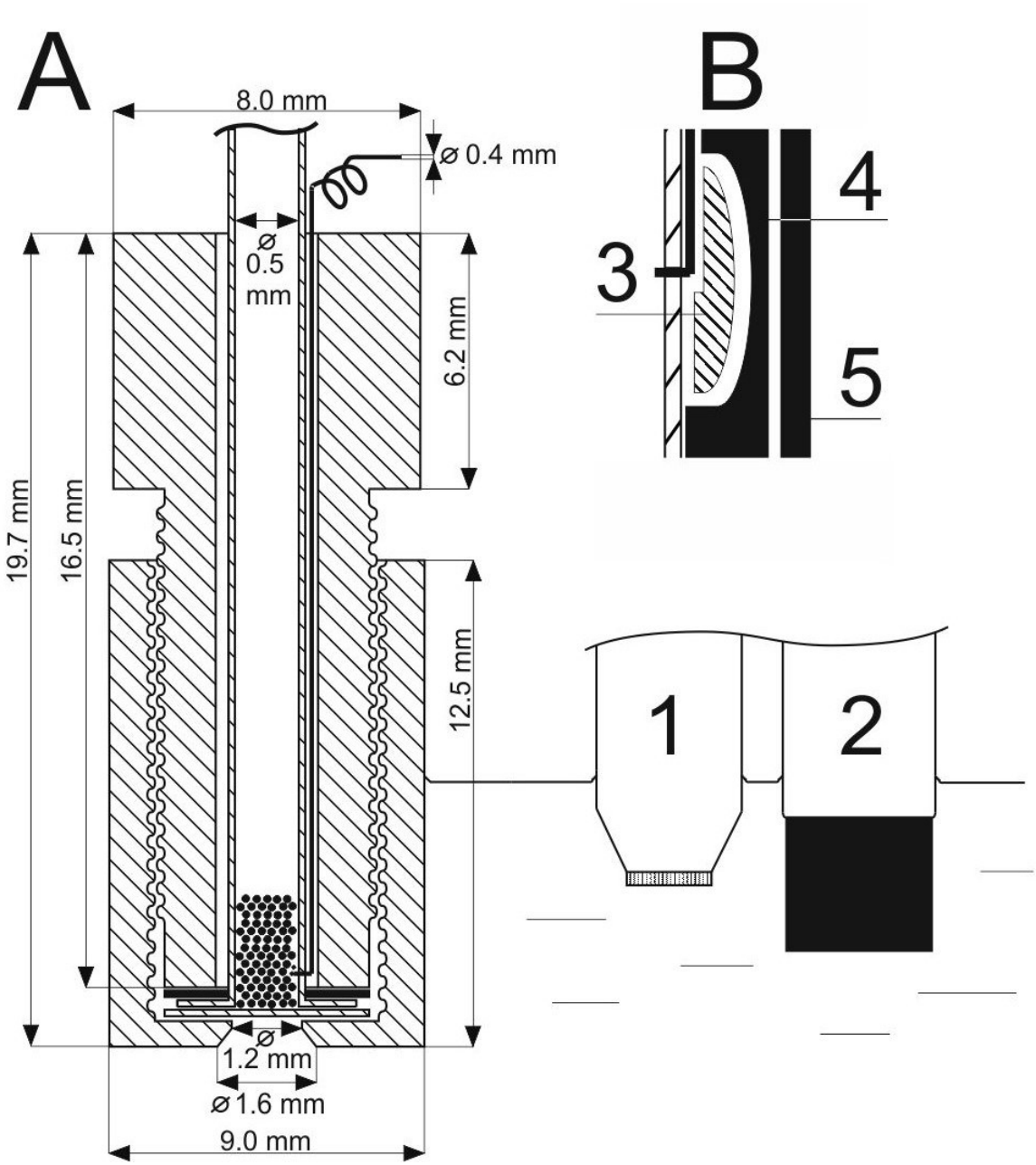
Díky úpravám detektoru, které jsou popsané v této kapitole, byly významně vylepšeny všechny jeho hlavní elektrochemické vlastnosti, zejména pak došlo k nárůstu dynamického lineárního rozsahu kalibračních křivek a stupně konverze. Náš koncept navíc oproti jet–ring elektrodě představené v kapitole 4 pracuje s úplnou přeměnou sledovaných látek a netrpí nulovým tokem při výměně materiálu technikou obráceného toku.

Tabulka 6.1 Porovnání kalibračních křivek vyhodnocených z plochy píků pro původní konstrukci představenou v diplomové práci [1] a pro upravenou konstrukci představenou v této disertační práci

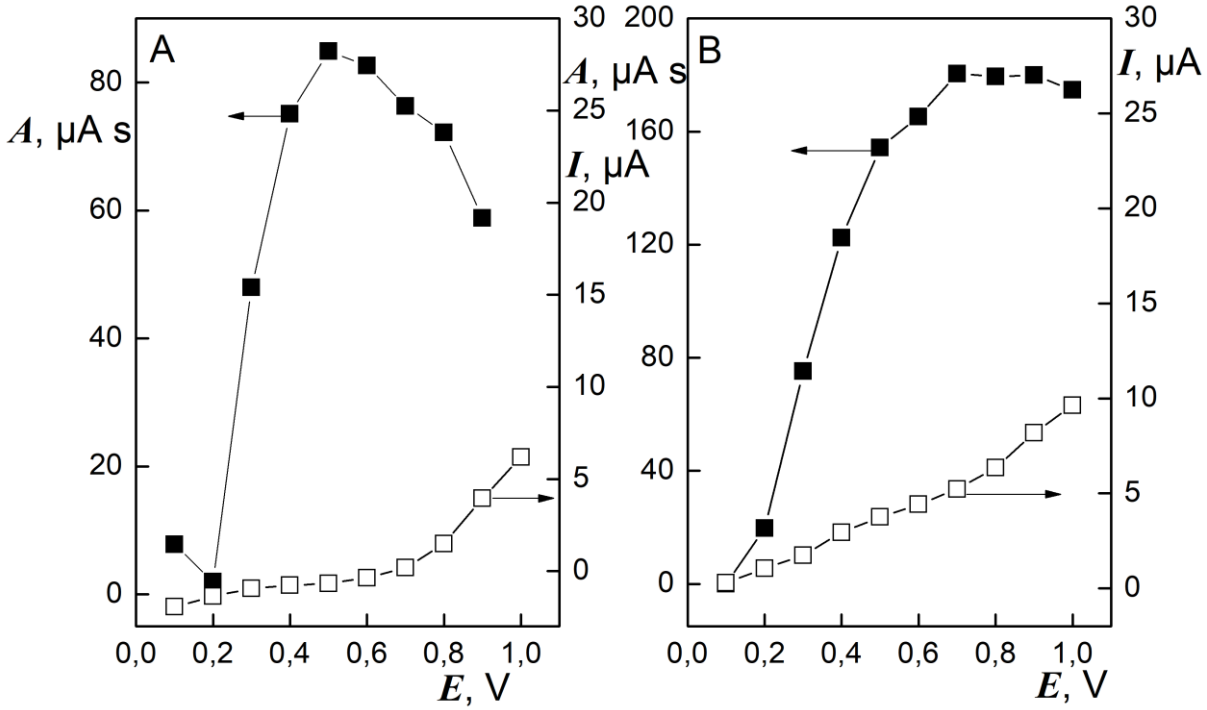
| analyt | konstrukce | dynamický lineární rozsah (μmol $L^{-1}$) | úsek (μA s) | korelační koeficient |
|---|---|---|---|---|
| hexakyanoželeznatan draselný | původní | 20–100 | –68,3 | 0,9984 |
| | upravená | 8–100 | –40,8 | 0,9981 |
| hydrochinon | původní | 20–100 | –148,2 | 0,9951 |
| | upravená | 6–100 | –82,2 | 0,9997 |




Obrázek 6.1 Porovnání konstrukcí elektrochemických detektorů na bázi uhlíku složeného z kontaktu (1), přívodní kapiláry (2), šroubu (3), pracovního materiálu z mikrokuliček uhlíku (4), železných podložek (5 a 10), filtru (6), záslepky (7), spojky (8), protichůdného šroubu (9) a odvodní kapiláry (11).




Obrázek 6.2 Rozměry coulometrického detektoru se znázorněním rozložení pracovní, referenční (1) a pomocné (2) elektrody (A) a znázornění izolace kontaktu zavedeného skrz stěnu přívodní teflonové kapiláry (B) vrstvou polystyrenu (3) a dvěma vrstvami tepelně smršťovací bužírky (4 a 5).




Obrázek 6.3 Hydrodynamické voltamogramy z ploch píků hexakyanoželeznatanu draselného ($1\times10^{-4}$ mol $l^{-1}$) naměřeného původní konstrukcí představenou v diplomové práci [1] (A) a upravenou konstrukci představenou v této disertační práci (B) za optimálních podmínek s objemem dávkovací smyčky 100 μl a průtokovou rychlostí 0,5 ml $min^{-1}$ (A), respektive 0,6 ml $min^{-1}$ (B).

### 6.2. Aplikace detektoru na bázi mikročástic skelného uhlíku

V předcházející kapitole byl představen nový coulometrický detektor na bázi mikročástic skelného uhlíku a byly diskutovány některé jeho základní elektrochemické vlastnosti. Tato kapitola bude věnována ukázkám aplikací tohoto detektoru při stanovení látek používaných ve farmacii a lidském lékařství (jejich vlastnosti jsou rozebrány v kapitole 2).

Byly vyvinuty celkem čtyři nové analytické metody, přičemž postupně docházelo k použití detektoru v kombinaci s náročnější experimentální instrumentací. Nejprve byla vyvinuta metoda stanovení thymolu a AK tyrosinu technikou FIA. Na ní navazuje stanovení sulfamethizolu technikou HPLC s izokratickou elucí. Ve všech těchto případech byla použita lineární pumpa, jejíž stabilní průtoková rychlost omezuje kolísání proudu pozadí. Vývoj těchto

metod je detailně popsán v přílohách 2 (thymol a sulfamethizol) a 5 (tyrosin) této disertační práce.

Nakonec byla vyvinuta metoda simultánního stanovení HVA a VMA v lidské moči technikou HPLC s gradientovou elucí (příloha číslo 3 této disertační práce). Jde o první aplikaci detektoru ve spojitosti s gradientovou pumpou. Ta je v moderních HPLC systémech používaná mnohem častěji než pumpa lineární, ale generuje tlakové pulzy, které v kombinaci s velkým aktivním povrchem pracovní elektrody mohou vést k nestabilnímu proudu pozadí.

Thymol, sulfamethizol a tyrosin silně pasivovaly pracovní materiál. Odezva detektoru byla stabilní pouze pro 6 nástřiků v případě thymolu a 3 nástřiky pro sulfamethizol a tyrosin. V případě HVA a VMA nebyla pasivace takový problém, prvních 10 nástřiků mělo stabilní odezvu. Problematické bylo ale stanovení jejich koncentrace v reálných vzorcích moči. V této komplikované biologické matrici opět docházelo k silné pasivaci. Jak bylo uvedeno v kapitole 4, v případě porézních detektorů je pasivace zásadní problém a nejčastěji vyžaduje výměnu celého pracovního materiálu. Snadná výměna pracovního materiálu je jedna z hlavních výhod vyvinutého detektoru. Aby byl ale detektor použitelný pro praktické aplikace a zejména pak ve spojení s HPLC, musí být tato výměna dostatečně reprodukovatelná.

Pro všechny tyto látky byla určena relativní směrodatná odchylka (RSD) odezvy detektoru po opakované výměně pracovního materiálu tak, jak je tento proces popsán v příloze 1 a 2. Všechna měření probíhala za optimálních podmínek. V případě FIA stanovení thymolu a tyrosinu byla pracovní náplň vyměněna pětkrát s výsledným RSD 4,2 % pro thymol a 5,0 % pro tyrosin. Pět výměn pracovního materiálu bylo otestováno i v případě HPLC stanovení sulfamethizolu, kde RSD dosáhl 6,3 %. V případě HPLC stanovení HVA a VMA bylo otestováno sedm výměn pracovního materiálu s výsledným RSD 3,7 % pro HVA a 3,8 % pro VMA.

Všechny získané hodnoty jsou v dobré shodě a jsou srovnatelné s ostatními elektrochemickými technikami. Například v případě HPLC měření s wall–jet uspořádáním CPE bylo RSD pro 10 obnov povrchu 4,8 % pro thymol [3] a 4,9 % pro sulfamethizol [4], což jsou běžné hodnoty pro CPE [5, 6].

Dalšími pro detektory v průtokovém uspořádání zásadními parametry jsou citlivost a lineární dynamický rozsah, tyto parametry jsou pro všechny látky shrnuty v tabulce 6.2 společně s dalšími parametry kalibračních křivek. Dosažené LoQ jsou v dobré shodě s ostatními metodami stanovení sledovaných látek, které jsou uvedené v kapitole 2. Lineární dynamický rozsah pokrývá ve všech případech alespoň dva koncentrační řády. Základní vlastnosti detektoru jsou tedy srovnatelné s ostatními běžně používanými detekčními technikami.

Tabulka 6.2 Charakteristika kalibračních křivek a LoQ látek stanovených na coulometrickém detektoru za optimálních podmínek; vyhodnoceno z ploch píků.

| Látka | Technika stanovení | Lineární dynamický rozsah (μmol $L^{-1}$) | Směrnice (μAs $\mu mol^{-1}$ L) | Úsek (μAs) | Korelační koeficient | LoQ (μmol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Thymol | FIA | 2–100 | 7,65 | –18,3 | 0,999 | 0,97 |
| Tyrosin | FIA | 1–100 | 10,7 | 5,37 | 0,995 | 1,60 |
| Sulfamethizol | HPLC izokratická | 0,1–100 | 3,59 | –1,1 | 0,999 | 0,04 |
| HVA | HPLC gradient | 1–100 | 1,094 | –3,435 | 0,996 | 1,31 |
| VMA | HPLC gradient | 1–100 | 4,007 | –2,274 | 0,998 | 0,65 |

### 6.3. Porovnání detektoru na bázi uhlíku a mědi

Coulometrický detektor představený v předcházejících dvou kapitolách přináší zajímavou možnost snadné výměny druhu pracovního materiálu. Teoreticky je možné detektor plnit libovolným materiálem, pokud jsou dostupné jeho mikročástice. Prakticky je s tím však spojeno několik problémů, které budou blíže rozebrány v této kapitole, kde bude představena možnost plnit detektor mikročásticemi mědi. Jak bylo vysvětleno v kapitole 5, měď je z elektrochemického hlediska velmi zajímavý materiál.

Hlavní překážkou pro snadné nahrazení uhlíku jiným pracovním materiálem mohou být fyzikální vlastnosti tohoto materiálu. Skelný uhlík má poměrně nízkou hustotu [7], a je tak možné připravit jeho stabilní dávkovací suspenzi. Kovy mají hustotu mnohem větší a jejich suspenze tak byla stabilní jen několik sekund, což komplikovalo způsob plnění detektoru. Jednak dávkovaný objem suspenze neobsahoval vždy reprodukovatelné množství měděných mikročástic a jednak se částice mědi velmi rychle usazovaly v plnícím systému a plnění detektoru tak bylo velmi zdlouhavé.

Nejprve bylo tedy nutné upravit původní způsob plnění detektoru, který byl používán pro skelný uhlík a je přesněji popsán v příloze 1 a 2. Byl zvýšen průtok nosného roztoku v plnícím systému z původního 1 na 2 ml $min^{-1}$. Dávkovací suspenze byla připravena s dvojnásobným množstvím mikročástic pracovního materiálu, tedy s 60 mg mědi na 9 ml rozpouštědla.

Vzhledem k nízké stabilitě suspenze však tyto úpravy nevedly k reprodukovatelnému plnění, proto byl vyzkoušen způsob ukončení plnění detektoru při dosažení přesně definovaného tlaku.

Ve chvíli, kdy došlo k nárůstu tlaku na definovanou hodnotu, byl přerušen tok nosného roztoku. V plnícím systému zůstával přebytek mědi, který byl použit při následující výměně pracovního materiálu. Detektor tedy již nebyl plněn přesně definovaným objemem 500 µl, ale na tlak 2 MPa. Změnu výšky sloupce pracovního materiálu tedy nelze ovlivnit změnou objemu plnící cívky (popřípadě změnou složení plnící suspenze). V tomto případě je výška sloupce měněna konečnou hodnotou tlaku plnícího systému. To by mohlo mít výhodu pro potencionální automatizaci plnění. Moderní systémy dokážou přerušit tok při dosažení požadovaného tlaku s velkou přesností. Rychlost plnění detektoru je obdobná pro oba postupy a pracovní materiál je v detektoru vyměněn do 1 minuty. Mírnou nevýhodou je větší spotřeba nosného roztoku, ale vzhledem k rychlosti výměny pracovního materiálu nejde o nikterak zásadní množství.

Srovnatelná je i výška sloupce pracovního materiálu v detektoru. Výška uhlíkového sloupce v detektoru je 4±0,6 mm a výška měděného sloupce je 4,5±0,2 mm. Z hodnot vypočtených směrodatných odchylek lze vypozorovat i zlepšení opakovatelnosti plnění detektoru při plnění na přesně definovaný tlak.

Suspenze se dále liší v použitém rozpouštědle. Měděné mikročástice musely být před použitím aktivovány, protože jejich povrch byl pokryt vrstvou měděnky vzniklé dlouhodobým působením vzduchu. Suspenze je tedy připravována ve vodném roztoku kyseliny dusičné, přesný postup je uveden v příloze číslo 5. Mikročástice mědi jsou tak v suspenzi vystaveny stálému působení kyseliny, reakce je sice zpomalena přidáním destilované vody po ukončení aktivace povrchu mikročástic, ale i tak dochází k zásadnímu snížení životnosti plnící suspenze. Suspenze na bázi mědi má životnost jeden týden. Suspenze na bázi mikročástic uhlíku je stabilní minimálně po dobu jednoho měsíce.

Nakonec byla částečně upravena i konstrukce detektoru, přesněji byl změněn způsob zavedení kontaktu. Původní konstrukce byla pro měření dostačující, ale životnost detektoru byla omezena, stejně jako v případě uhlíkového detektoru, postupným zanášením platinového kontaktu. V případě pasivace kontaktu je detektor nezbytné rozebrat a kontakt mechanicky obnovit. V případě měděného pracovního materiálu byl povrch platiny zřejmě zanášen vzniklými sloučeninami mědi.

Plocha kontaktu je v původní konstrukci co nejmenší, aby nedocházelo k elektrochemické reakci přímo na platině. V případě měděného detektoru je však vkládaný potenciál velmi nízký. Mimoto většina AK ani nepodléhá elektrochemické přeměně. Oba tyto faktory byly vysvětleny v kapitole 5 této disertační práce. Platinový kontakt v tomto případě tedy nemá vliv na odezvu detektoru a jeho plocha není nikterak limitována.

Kontakt byl tedy do kapiláry zaveden stejně jako v případě platinového tubulárního průtokového detektoru [8]. Namísto malého otvoru ve stěně kapiláry byla kapilára rozříznuta napříč na dvě části. Obě části byly postupně zlehka zahřáty, aby se teflon stal měkčím, a do jejich vnitřního prostoru byla zavedena platinová trubička s vnitřním průměrem 5 mm a vnějším průměrem 6 mm. Vnitřní průměr platinové trubičky tedy odpovídá průměru teflonové kapiláry. Kontakt by tedy neměl mít výrazný vliv na vnitřní tvar detektoru a hydrodynamické vlastnosti by měly být srovnatelné s původní konstrukcí detektoru na bázi mikročástic uhlíku. Porovnání obou konstrukcí je uvedeno v příloze 5 této disertační práce.

Takto připravený detektor vykazoval delší životnost, díky významně větší ploše kontaktu. Jeho příprava je snadnější. Navíc nedocházelo při jeho přípravě k výrobě nefunkčních kusů, jako v případě původní konstrukce. Zhruba jeden ze tří nově připravených detektorů dle původní konstrukce neposkytoval signál, nejspíš kvůli špatnému zavedení kontaktu, a dva z pěti vykazovaly netěsnost zavedeného kontaktu.

Na druhou stranu vyžaduje konstrukce na bázi platinové trubičky náročnější údržbu. Detektor musí být uchováván v methanolu, aby nedošlo k vyschnutí povrchu kontaktu, a před analýzou je nezbytné kontakt elektrochemicky aktivovat dle postupu uvedeného v příloze číslo 5 této disertační práce.

### 6.4. Výsledky stanovení aminokyselin

Pomocí nově vyvinutého detektoru byly stanoveny celkem tři aminokyseliny, z toho alanin a fenylalanin na měděném pracovním materiálu a tyrosin na pracovní elektrodě ze skelného uhlíku. Výsledky získané při stanovení tyrosinu byly již částečně diskutovány v kapitole 6.2. V této kapitole tyrosin slouží zejména pro porovnání obou použitých pracovních materiálů, jelikož jde o látku s podobnou strukturou, jako má fenylalanin. Výsledky tohoto porovnání jsou podrobně rozebrány v příloze číslo 5. Příloha číslo 4 této disertační práce je pak věnovaná stanovení alaninu.

Pro fenylalanin a alanin byly určeny optimální hodnoty detekčního potenciálu a průtokové rychlosti. Ostatní podmínky analýzy byly přebrány z literatury a jsou uvedeny v kapitole 5. Oba stanovované parametry vyšly pro AK stejně. To potvrzuje, že optimální podmínky jsou limitovány samotnou komplexotvornou reakcí, nikoliv přímo stanovovanou aminokyselinou.

Optimální detekční potenciál stanovení AK je +0,2 V. V literatuře se běžně vyskytují hodnoty detekčního potenciálu od +0,1 do +0,15 V [9-11]. Detektor tedy pracuje s nepatrně vyšším detekčním potenciálem. To je pravděpodobně dáno efektivní vzdáleností, která

způsobuje potenciálový pokles na pracovní elektrodě. Optimální průtoková rychlost je 0,6 ml $min^{-1}$. Pro optimalizační proceduru tyrosinu byla použita vícedimensionální statistická metoda. Následně byl ještě pro potvrzení optimálního detekčního potenciálu naměřen hydrodynamický voltamogram, ze kterého byla určena hodnota +1,3 V. Ostatní optimální podmínky stanovení jsou uvedeny v příloze číslo 5. Za optimálních podmínek byly následně měřeny kalibrační závislosti, určen LoQ a posouzena opakovatelnost plnění pro oba pracovní materiály.

Detektor na bázi mědi poskytoval lepší hodnoty RSD pro opakovatelnost plnění detektoru, přesněji 2,9 % oproti 5,0 % pro uhlíkovou pracovní elektrodu (hodnoceno na základě tří různých plnění). Tyto výsledky dobře korelují i s opakovatelností výšky sloupce v detektoru, kde směrodatná odchylka pro uhlík je 0,6 mm a pro měď 0,2 mm. Na druhou stranu je detektor plněn větším množstvím materiálu, než je dle teoretických výpočtů uvedených v příloze 2 nezbytné a přebytek pracovního materiálu se již nepodílí na elektrochemické reakci. Oba výsledky opakovatelnosti plnění tak lze považovat za srovnatelné.

V případě limitů kvantifikace (tabulka 6.3) lze konstatovat, že pro obě AK stanovené na měděné pracovní elektrodě došlo k dosažení obdobných hodnot LoQ, a že citlivější je stanovení AK na mikročásticích skelného uhlíku. Odezvy na měděných mikročásticích jsou obecně řádově nižší než na uhlíkových. Tento rozdíl je dán samotnou podstatou obou použitých elektrochemických dějů. Na druhou stranu má měděný pracovní materiál i výrazně nižší proud pozadí. Pro všechny stanovované látky bylo dosaženo hodnot kvantifikačních limitů dostačujících pro většinu běžných aplikací. Lineární dynamické rozsahy pro oba pracovní materiály pokrývají dva řády (v případě stanovení z plochy píků).

Ze všech porovnávaných kritérií tedy nevyplývá, že by jeden z pracovních materiálů byl z analytického pohledu výrazně vhodnější pro praktická stanovení AK. Obě metody lze hodnotit jako vyrovnané. Volba pracovního materiálu tedy spíše záleží na stanovované AK a matrici vzorku. Většina AK není elektrochemicky aktivní a na pracovní elektrodě ze skelného uhlíku je nelze stanovit. Na měděné elektrodě lze stanovit všechny AK a jde o velmi selektivní metodu. Na druhou stranu vyžaduje komplexotvorná reakce poměrně striktní analytické podmínky, což může komplikovat optimalizaci separačních podmínek.

Tab. 6.3 – Porovnání kalibračních křivek a limitů kvantifikace stanovených AK

| Vyhodnoceno z | AK | Pracovní materiál | Lineární dynamický rozsah (μmol $L^{-1}$) | Korelační koeficient | LoQ (μmol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Plocha píku | Tyrosin | uhlík | 2–100 | 0,995 | 1,6 |
| | Alanin | měď | 20–1000 | 0,996 | 13,5 |
| | Fenylalanin | měď | 2–1000 | 0,985 | 4,7 |
| Výška píku | Tyrosin | uhlík | 2–60 | 0,992 | 1,7 |
| | Alanin | měď | 20–1000 | 0,998 | 17,1 |
| | Fenylalanine | měď | 2–600 | 0,986 | 3,9 |

**Literatura:**

[1] J. Mika, Využití elektrod na bázi uhlíku pro elektrochemickou detekci v průtokových metodách, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Karlova Univerzita v Praze, Praha, 2012.
[2] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 343 (1992) 566-575.
[3] J. Mužíková, Stanovení vybraných terpenoidů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie Karlova Univerzita v Praze, Praha, 2012.
[4] H. Dejmkova, J. Mika, J. Zima, J. Barek, Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu, Úřad Průmyslového vlastnictví ČR, Patentová listina číslo CZ 304462 B6 (2013).
[5] H. Dejmkova, V. Vokalova, J. Zima, J. Barek, Determination of Benzocaine Using HPLC and FIA with Amperometric Detection on a Carbon Paste Electrode, Electroanalysis, 23 (2011) 662-666.
[6] J. Zima, H. Dejmkova, J. Barek, HPLC determination of naphthalene amino derivatives using electrochemical detection at carbon paste electrodes, Electroanalysis, 19 (2007) 185-190.
[7] S. Yamada, H. Sato, Some Physical Properties of Glassy Carbon, Nature, 193 (1962) 261-262.
[8] J. Cvacka, F. Opekar, J. Barek, J. Zima, An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography, Electroanalysis, 12 (2000) 39-43.
[9] K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G. Swain, J. Zima, J. Barek, Miniaturized Amperometric Detectors for HPLC and Capillary Zone Electrophoresis, Chemické listy, 100 (2006) 124-132.
[10] K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.
[11] K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart, M. Podolak, Operational parameters of voltammetric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors, Journal of Chromatography, 367 (1986) 311-321.

# 7. Závěr

V rámci této disertační práce byl představen nově vyvinutý průtokový detektor s konceptem snadné obnovy pracovního materiálu. Detektor byl navržen jako ekonomicky příznivé řešení boje s historií a pasivací porézních elektrod. Hlavní výhodou je jeho snadná konstrukce při zachování dobrých elektrochemických vlastností, které byly otestovány na modelových látkách – hexakyanoželeznatanu draselném a hydrochinonu. Detektor dosahuje vysokého stupně konverze pohybujícího se okolo 100 % a lze ho tedy označit za coulometrický.

Způsob plnění detektoru navíc umožňuje použití různých pracovních materiálů pro přípravu jeho pracovní elektrody. S úspěchem byly otestovány mikrokuličky skelného uhlíku a mikročástice mědi, v obou případech o průměru 10–20 μm. Lze ale očekávat, že pro plnění detektoru by mohly být snadno použity i další mikročástice různých kovů a jiné formy uhlíku, popřípadě by mohly být otestovány i jiné tvary a velikosti mikročástic.

Manipulace s detektorem při výměně pracovního materiálu je velmi snadná a pracovní materiál je možné vyměnit za 60 sekund. Konstrukce detektoru a způsob výměny pracovního materiálu je navíc velmi dobrým příslibem pro případnou automatizaci celého systému. Pracovní materiál může být měněn otočením průtoku nosného roztoku za použití vícecestného ventilu. V tomto případě by k obsluze teoreticky stačila pouze jedna pumpa.

Detektor byl otestován ve spojení s instrumentálním uspořádáním FIA a HPLC, tedy s nejčastěji v praxi používanými průtokovými metodami, a bylo prokázáno, že ho lze použít i v kombinaci s moderní instrumentální aparaturou, zejména pak s gradientovou pumpou vysokotlakých systémů.

Pro detektor na bázi mikrokuliček skelného uhlíku byly vyvinuty celkem čtyři metody stanovení látek s uplatněním v lidském lékařství. Přesněji byly vyvinuty metody stanovení tyrosinu, thymolu, sulfamethizolu a metoda pro simultánní stanovení HVA a VMA. V případě thymolu a sulfamethizolu byly vyvinuté metody použity ke stanovení jejich obsahu v komerčně dostupných léčivých přípravcích. Výsledky analýzy byly v dobré shodě s obsahem uváděným výrobcem a výsledky stanovení s běžně používanou UV detekcí. Pro HVA a VMA byla úspěšně vyvinuta metoda jejich stanovení v lidské moči a byla otestována na reálných vzorcích zdravých dárců.

Na příkladu všech těchto zmíněných prací bylo prokázáno, že koncept poskytuje spolehlivé výsledky s vysokou opakovatelností a citlivostí stanovení. Detektor je tedy vhodným kandidátem pro detekci v průtokových metodách. Jeho použití je zejména vhodné v situacích, kde dochází k silné pasivaci pracovního materiálu. V těchto případech by mohl nahradit ostatní běžně používané elektrochemické detektory.

Nakonec byla vyvinuta i druhá alternativa konstrukce detektoru s velkou plochou kontaktu pracovního materiálu. Tato varianta je ale vhodná pouze pro komplexotvorné reakce na mědi jako pracovním materiálu. V případě použití jiných mikročástic je vhodnější původní konstrukce s kontaktem z platinového drátku. Plocha platiny je v tomto případě natolik malá, že její vliv na elektrochemickou přeměnu stanovované látky je zanedbatelný.

Modifikovaný detektor na bázi měděných mikročástic byl použit pro stanovení dvou AK, alaninu a fenylalaninu. Mimo to byla stanovena třetí AK na elektrodě ze skelného uhlíku, tyrosin. Ten byl stanoven jednak pro ověření použitelnosti detektoru na bázi skelného uhlíku a jednak byly výsledky z této práce použity i pro porovnání obou technik stanovení komplexotvorné reakce na mědi a elektrochemické reakce na skelném uhlíku. Tyrosin a fenylalanin jsou totiž strukturně velmi podobné látky.

Detekce na skelném uhlíku je mírně citlivější, ostatní základní parametry metod jsou ale takřka ekvivalentní. Komplexotvorná reakce na mědi je na druhou stranu mnohem selektivnější a lze s ní stanovit všechny AK. Tato technika také nevyžaduje zdlouhavou optimalizaci pro jednotlivé AK, protože optimální podmínky se vztahují na samotnou komplexotvornou reakci. Volba pracovního materiálu tedy záleží zejména na studovaném analytickém problému.

# 8. Příloha I

## PRACOVNÍ ELEKTRODA, COULOMETRICKÝ DETEKTOR a ZPŮSOB VÝMĚNY PRACOVNÍHO MATERIÁLU

Hana Dejmková, **Jan Mika,** Jiří Zima a Jiří Barek

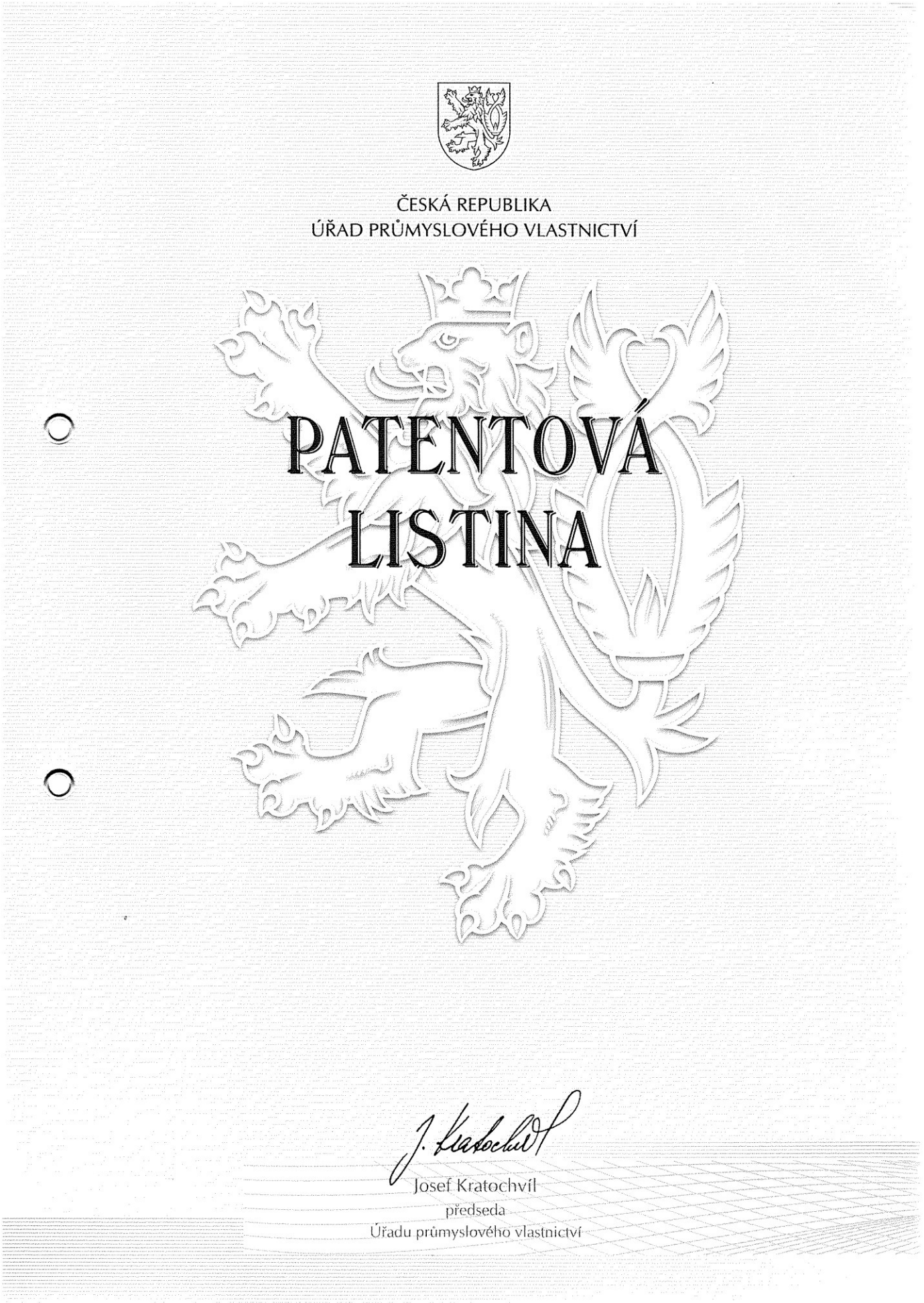
*Úřad průmyslového vlastnictví*

Patentová listina

Patent číslo: CZ 304462 B6

---

Procentuální účast Mgr. Jana Miky v této práci odpovídá 55 %.



ČESKÁ REPUBLIKA
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

# PATENTOVÁ LISTINA

Josef Kratochvíl
předseda
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví

udělil podle § 34 odst. 3 zákona č. 527/1990 Sb., v platném znění,

# PATENT

číslo

# 304462

na vynález uvedený v přiloženém popisu.

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ 23

V Praze dne 9.5.2014

Za správnost:

Ing. Jan Mrva
vedoucí oddělení rejstříků

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**304 462**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

| | |
|---|---|
| ***G01N 27/42*** | (2006.01) |
| ***G01N 27/30*** | (2006.01) |
| ***G01N 27/44*** | (2006.01) |
| ***G01N 27/28*** | (2006.01) |
| ***G01N 27/00*** | (2006.01) |
| ***G01N 31/16*** | (2006.01) |

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-302**
(22) Přihlášeno: **22.04.2013**
(40) Zveřejněno: **14.05.2014**
**(Věstník č. 20/2014)**
(47) Uděleno: **02.04.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **14.05.2014**
**(Věstník č. 20/2014)**

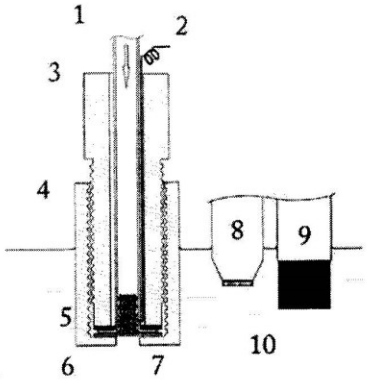
(56) Relevantní dokumenty:

JP 01172744 A,; 71524; 71525; 71526; 71527; 71528.

(73) Majitel patentu:
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2, CZ

(72) Původce:
Mgr. Hana Dejmková, Roztoky, CZ
Mgr. Jan Mika, Mělník, CZ
prof. RNDr. Jiří Zima, CSc., Praha 4, CZ
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., Praha 9, CZ

(74) Zástupce:
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5




(54) Název vynálezu:
**Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu**

(57) Anotace:
Řešení popisuje pracovní elektrodu coulometrického detektoru, která obsahuje kapiláru (1) se zavedeným elektrickým kontaktem (2), přičemž v kapiláře (1) jsou umístěny částice pracovního materiálu (7), které jsou v kapiláře (1) zadržovány filtrem (6) propouštějícím kapalinu, který je u ústí kapiláry (1) fixován. Dále je popsán coulometrický detektor obsahující pracovní elektrodu a referentní (8) a pomocnou elektrodu (9), a rovněž vhodný způsob výměny pracovního materiálu v pracovní elektrodě.

CZ 304462 B6

CZ **304462** B6

# Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu

## Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká coulometrického detektoru s obnovitelnou náplní, využitelného pro detekci elektrochemicky aktivních látek v průtokových metodách, zejména pro metodu průtokovou injekční analýzu a HPLC. Rovněž se týká způsobu výroby takovéhoto coulometrického detektoru.

## Dosavadní stav techniky

V moderní analytické chemii se běžně setkáváme se stanovováním analytů v proudu kapalin; tento typ měření se uplatňuje například v průmyslu, při analýze složek životního prostředí atd. Důležitou částí průtokových systémů jsou detektory, na jejichž parametry, jako jsou cena jednotlivých stanovení, citlivost, linearita odezvy a reprodukovatelnost, jsou proto kladeny velké nároky. Všechny tyto nároky dobře splňují elektrochemické metody, které se navíc vyznačují přesností, rychlostí, jednoduchosti a díky menšímu množství elektrochemicky aktivních látek i značnou selektivitou [K. Toth, K. Stulik, W. Kutner, Z. Feher, E. Lindner, Pure and Applied Chemistry 76:1119 (2004)].

Nejčastěji používanými detekčními technikami jsou amperometrie a coulometrie. Coulometrie na rozdíl od amperometrie pracuje s vysokým stupněm konverze stanovované látky, blížícímu se až 100 %. Měří se náboj potřebný na elektrochemickou reakci při konstantním potenciálu a z něj se určuje celkový obsah látky podle Faradayových zákonů [K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.]. K dosažení vysokého stupně konverze je zapotřebí velký aktivní povrch elektrodového materiálu a dostatečně dlouhá doba pro kontakt analytu s pracovní elektrodou. Dostatečně velkého povrchu lze dosáhnout pomocí velkoplošných rovinných nebo tubulárních detektorů [J. Lankelma, H. Poppe, Journal of Chromatography 125:375 (1976)], ty však vzhledem k velkému vnitřnímu objemu detektoru nejsou vhodné pro detekci v HPLC. Proto se nejčastěji používají porézní nebo granulované materiály, které zaručují dostatečně velký pracovní povrch elektrody při zachování malého vnitřního objemu detektoru. Nejčastěji se používají porézní kovy, porézní skelný uhlík (RVC) a uhlíkové nebo kovové částice [W. J. Blaedel, J. H. Strohl, Analytical Chemistry 36:1245 (1964); E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Fresenius Journal of Analytical Chemistry 343:566 (1992); J. Wang, H. D. Dewald, Journal of the Electrochemical Society 130:1814 (1983); L. I. Ilcheva, A. D. Dakashev, Analyst 115:1247 (1990); J. V. Kenkel, A. J. Bard, Journal of Electroanalytical Chemistry 54:47 (1974)].

Nevýhodou porézních elektrod je však problém pasivace pracovního materiálu coulometrického detektoru, která nepříznivě ovlivňuje jeho odezvu. Elektrody v průtokovém uspořádání vykazují určitou odolnost proti tomuto jevu, díky odvádění produktů elektrochemické reakce od pracovní elektrody proudem kapaliny a případně také vzhledem k rezervě ve velikosti povrchu pracovního materiálu. To však pasivaci zejména v prostředích komplikovaných matric reálných vzorků nezabrání úplně a následně je nutná periodická a reprodukovatelná obnova povrchu elektrody. Pro porézní materiály je mechanické čištění takřka neproveditelné [Schieffer, G. W., Analytical Chemistry 52: 1994 (1980)] a čištění oxidačně–redukčními mechanizmy komplikuje práci s detektorem a ne vždy zaručuje dostatečně reprodukovatelnou obnovu pracovního povrchu. Nejčastěji je tedy nutná výměna pracovního materiálu, která však bývá časově i finančně náročná a často vyžaduje rozebrání celého detektoru.

Za účelem zjednodušení a zrychlení výměny náplně detektoru se již dříve objevila takzvaná „jet–ring" elektroda [C. H. Pollema, J. Ruzicka, Analytical Chemistry 66:1825 (1994); J. Ruzicka, Analytica Chimica Acta 308:14 (1995)]. Elektroda se skládá z trubičky, jejíž ústí je přiblíženo

k nepropustné přepážce do vzdálenosti, která umožňuje průtok kapaliny, ale ne již průchod částic náplně. Do přepážky je zabudována referentní a pomocná elektroda. Náplň je vyměňována oddálením přepážky. Tato elektroda s náplní z grafitového prášku nebo skelného uhlíku o velikosti částic 80 až 200 μm byla následně použita jako amperometrický detektor v injekční analýze; zvýšení stupně konverze bylo dosaženo pouze za použití metody stop–flow a ani v amperometrickém módu nebyl použit pro detekci v HPLC. [M. Mayer, J. Ruzicka, Analytical Chemistry 68:3808 (1996)].

Cílem předkládaného vynálezu je navrhnout coulometrický detektor se snadnou výměnou pracovního materiálu, který by zaručoval její rychlost, jednoduchost, možnost volby materiálu a nízkou cenu.

## Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je pracovní elektroda coulometrického detektoru, která obsahuje kapiláru se zavedeným elektrickým kontaktem. V kapiláře jsou umístěny částice pracovního materiálu. Částice jsou v kapiláře zadržovány filtrem propouštějícím kapalinu, který je u ústí kapiláry fixován. S výhodou může být fixace filtru zajištěna pomocí šroubu a koncovky. Proudění kapaliny filtrem zajišťuje spojení s referenční a pomocnou elektrodou.

Jako filtr lze použít jakýkoliv dostatečně hustý vláknitý materiál odolný vůči použitým organickým rozpouštědlům v nosném roztoku; pro svou dostupnost je zejména vhodný filtrační papír. S výhodou je kapilára opatřena obrubou, což usnadňuje fixaci filtru.

Pracovním materiálem je s výhodou kovový nebo uhlíkový prášek. Volbou velikostí částic lze ovlivnit rozložení pórů a hydrodynamický odpor pracovního materiálu. S výhodou lze použít sférické mikročástice skelného uhlíku.

S výhodou je elektrickým kontaktem platinový drát.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále coulometrický detektor, obsahující pracovní elektrodu podle vynálezu a referentní a pomocnou elektrodu, a přepadovou nádobku, uvnitř které jsou všechny tři elektrody umístěny.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob plnění a výměny pracovního materiálu v pracovní elektrodě. Náplň použitého pracovního materiálu se z kapiláry vymyje pomocí pumpy tokem kapaliny při odstraněném filtru nebo zpětným tokem, což lze provést bez nutnosti manipulace s detektorem. Pracovní materiál se smíchá s rozpouštědlem a pomocí pumpy s dávkovacím ventilem se následně naplní tokem kapaliny mísitelné s rozpouštědlem i pracovním prostředím, tedy mobilní fází u HPLC nebo proudem kapaliny u průtokové injekční analýzy do kapiláry. Po naplnění lze ihned pokračovat v měření.

Rozpouštědlem je s výhodou nitromethan a pracovním materiálem jsou s výhodou sférické mikročástice skelného uhlíku.

Vynález je dále osvětlen s použitím následujících obrázků a příkladů, které však nijak neomezují rozsah ochrany.

## Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje schéma coulometrického detektoru s obnovitelnou náplní podle příkladu 1.

Obr. 2 ukazuje záznam coulometrické detekce – měření závislosti odezvy detektoru na změně průtokové rychlosti (0,3 (1), 0,5 (2), 0,7 (3) a 1,2 (4) ml $min^{-1}$) technikou průtokové injekční analýzy při stanovení hydrochinonu o koncentraci 100 $\mu mol^{-1}$ na detektoru podle příkladu 1. Podmínky měření: nosný roztok Brittonův–Robinsonův pufr o pH 2, objem dávkovací cívky 100 µl a detekční potenciál +1,1 V.

Obr. 3 ukazuje závislost plochy píku na koncentraci hydrochinonu; měření technikou průtokové injekční analýzy. Podmínky měření: nosný roztok Brittonův–Robinsonův pufr o pH 2, průtoková rychlost 0,7 ml $min^{-1}$, detekční potenciál +1,1 V a objem dávkovací cívky 100 µl.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Coulometrický detektor s obnovitelnou náplní

Coulometrický detektor s obnovitelnou náplní je znázorněn na obr. 1.

Základem coulometrického detektoru s obnovitelnou náplní je teflonová kapilára 1 (vnitřní průměr 0,5 mm). Do kapiláry 1 je jehlou zhotoven otvor, do kterého je zaveden kontakt pomocí platinového drátku 2. Kontakt 2 je následně utěsněn vrstvou polymeru a po jeho zaschnutí je platinový drát odizolován smršťovací bužírkou. Kapilára 1 je ukončena obrubou, tedy teplotně roztažena a zploštěna a spolu s kontaktem 2 je umístěna do šroubu 3. Koncovkou 4 je u ústí kapiláry 1 podložené ocelovou podložkou 5 zafixován filtr (filtrační papír) 6. Elektrochemickou reakci zprostředkovává práškový pracovní materiál 7. Ten sestává z 1,25 mg sférických mikročástic skelného uhlíku o průměru 10 až 20 µm, které v kapiláře 1 dosahují výšky zhruba 3 mm. Pracovní elektroda coulometrického detektoru je umístěna v přebytku mobilní fáze 10 v přepadové skleněné nádobce (nezobrazena) společně s referentní elektrodou 8 a pomocnou elektrodou 9 – všechny elektrody jsou umístěny v nezávisle stojícím stojánku (nezobrazen).

Při vnášení náplně 7 do coulometrického detektoru byl detektor připojen na pumpu s dávkovacím ventilem s externí 500 µl výměnou smyčkou. Smyčka byla naplněna suspenzí, vytvořenou smícháním 10 ml nitromethanu a 4 mg uhlíkového prášku a tokem 1 ml $min^{-1}$ methanolu byl plněn detektor.

Příklad 2: Stanovení hydrochinonu pomocí coulometrického detektoru s obnovitelnou náplní

Coulometrický detektor s obnovitelnou náplní podle příkladu 1 byl použit ke stanovení hydrochinonu metodou průtokové injekční analýzy. Jeho náplň byla měněna, aby bylo zabráněno případnému snížení analytického signálu, pro proměření 20 až 30 vzorků. Všechna měření byla prováděna v nosném roztoku Brittonova–Robinsonova pufru o pH 2.

V prvním kroku byly optimalizovány parametry stanovení, a to průtoková rychlost, vkládaný potenciál a objem dávkovací cívky. Během optimalizace byl použit roztok hydrochinonu o koncentraci 100 µmol $l^{-1}$ připravený v Brittonově–Robinsonově pufru o pH 2. Závislost odezvy detektoru na průtokové rychlosti byla naměřena od 0,4 do 1,4 ml $min^{-1}$. Do 0,8 ml $min^{-1}$ byla plocha získaná detekcí takřka konstantní, při dalším zvyšování průtokové rychlosti docházelo k jejímu snižování. V celém naměřeném intervalu docházelo k nárůstu výšky píků. Optimální hodnota 0,7 ml $min^{-1}$ byla zvolena jako kombinace mezi dostatečnou účinností detektoru a krátkou dobou trvání analýzy. Následně byla proměřena závislost odezvy detektoru na vkládaném potenciálu. Z naměřeného intervalu od +0,3 V do +1,5 V byla největší plocha a výška píku při +1,1 V, proto byla tato hodnota zvolena pro další měření. Posledním optimalizovaným parametrem byl objem dávkovací cívky. Jako optimální byla určena hodnota 100 µl; při dalším zvětšení

objemu dávkovací smyčky již nedocházelo k výraznému nárůstu výšky píku, pouze k jeho rozšiřování.

Za zjištěných optimálních podmínek byly změřeny základní parametry stanovení hydrochinonu, jako je opakovatelnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, a lineární dynamický rozsah. Stálost odezvy detektoru byla určena z výšky 30 po sobě jdoucích nástřiků vzorku o koncentraci 100 μmol $l^{-1}$ v případě, že náplň detektoru nebyla měněna a pro 5 náplní pořízených v různé době při práci s coulometrickým detektorem za optimálních podmínek. Koncentrační závislost je lineární v rozsahu 4 až 100 μmol $l^{-1}$ a mez detekce a stanovitelnosti byla získána jako troj–, respektive desetinásobek směrodatné odchylky měření nejnižší sledované koncentrace. Získané hodnoty jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Vybrané parametry stanovení hydrochinonu coulometrickým detektorem s obnovitelnou náplní

| | |
|---|---|
| Mez detekce (μmol $l^{-1}$) | 0,44 |
| Mez stanovitelnosti (μmol $l^{-1}$) | 1,46 |
| Korelační koeficient | 0,9997 |
| Opakovatelnost na jedné náplni (RSD, %) | 1,39 |
| Opakovatelnost při výměně náplně (RSD, %) | 1,86 |

Průmyslová využitelnost

Coulometrickou detekci lze využít pro stanovení elektrochemicky aktivních organických i anorganických látek průtokovými metodami, zejména průtokovou injekční analýzou a HPLC.

## PATENTOVÉ NÁROKY

**1.** Pracovní elektroda coulometrického detektoru, **vyznačená tím**, že obsahuje kapiláru (1) se zavedeným elektrickým kontaktem (2), přičemž v kapiláře (1) jsou umístěny částice pracovního materiálu (7), které jsou v kapiláře (1) zadržovány filtrem (6) propouštějícím kapalinu, který je u ústí kapiláry (1) fixován.

**2.** Pracovní elektroda podle nároku 1, **vyznačená tím**, že fixace filtru (6) je zajištěna prostřednictvím šroubu (3) a koncovky (4).

**3.** Pracovní elektroda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že kapilára (1) je opatřena obrubou.

**4.** Pracovní elektroda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že materiálem filtru (6) je filtrační papír.

**5.** Pracovní elektroda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že pracovním materiálem (7) je kovový nebo uhlíkový prášek, s výhodou jsou pracovním materiálem (7) sférické mikročástice skelného uhlíku.

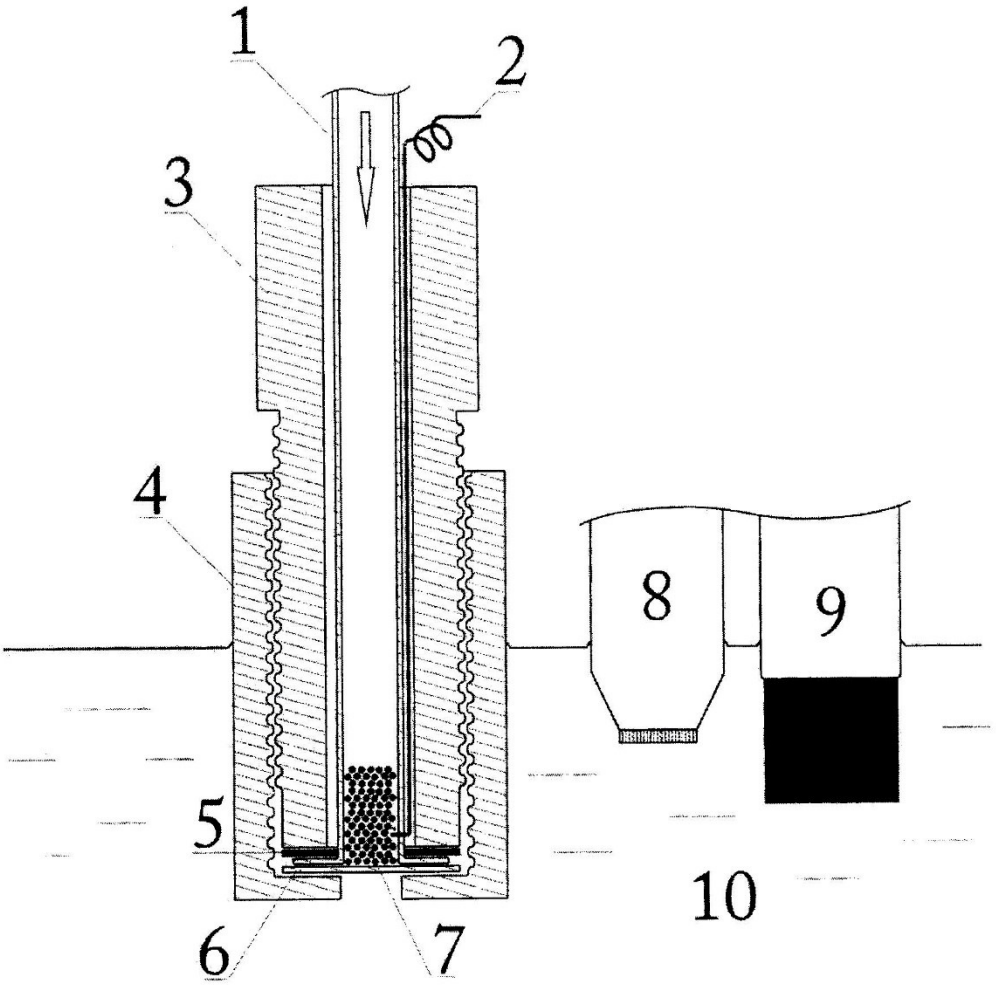
**6.** Pracovní elektroda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že elektrickým kontaktem (2) je platinový drát.

**7.** Coulometrický detektor, obsahující pracovní elektrodu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že obsahuje referentní (8) a pomocnou elektrodu (9), a přepadovou nádobku, uvnitř které jsou všechny tři elektrody umístěny.

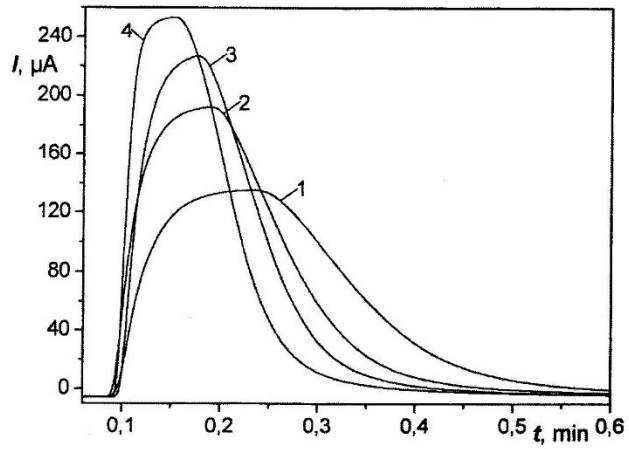
**8.** Způsob výměny pracovního materiálu v pracovní elektrodě podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačený tím**, že použitý pracovní materiál (7) se z kapiláry (1) vymyje pomocí pumpy tokem kapaliny při odstraněném filtru (6) nebo zpětným tokem, nový pracovní materiál (7) se následně smíchá s rozpouštědlem a pomocí pumpy s dávkovacím ventilem se pak naplní tokem kapaliny do kapiláry (1).

**9.** Způsob podle nároku 8, **vyznačený tím**, že rozpouštědlem je nitromethan a pracovním materiálem (7) jsou sférické mikročástice skelného uhlíku.

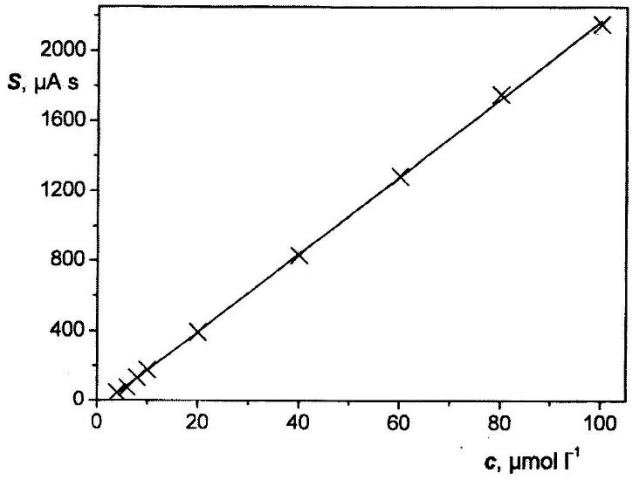
2 výkresy




Obr. 1




Obr. 2




Obr. 3

Konec dokumentu

# 9. Příloha II

## NEW FLOW–THROUGH COULOMETRIC DETECTOR WITH RENEWABLE WORKING EELECTRODE MATERIAL FOR FLOW INJECTION ANALYSIS AND HPLC

**Jan Mika**, Jiří Barek, Jiří Zima a Hana Dejmková

*Electrochimica Acta*

Volume 154, Pages 397–403, Year 2015

---

Procentuální účast Mgr. Jana Miky v této práci odpovídá 75 %.

Electrochimica Acta 154 (2015) 397–403

Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

# New flow-through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC

Jan Mika, Jiri Barek, Jiri Zima, Hana Dejmkova *

*Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ–12843 Prague 2, Czech Republic*

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 21 October 2014
Received in revised form 15 December 2014
Accepted 16 December 2014
Available online 17 December 2014

*Keywords:*
Coulometric detection
HPLC
Pharmaceutical preparations
Renewable working electrode material
Glassy carbon microbeads

ABSTRACT

Newly developed flow-through coulometric detector with renewable working material of glassy carbon microbeads was fabricated and its basic electrochemical parameters were studied by flow injection analysis using potassium ferrocyanide and hydroquinone as probes. Main advantage of the detector is its simple construction while maintaining good electrochemical parameters and high conversion degree. Practical application of the detector was proved by the development of new HPLC and FIA method of thymol and sulfamethizole determination in pharmaceutical preparations. Optimal determination conditions were found and calibration dependences were measured. A value of quantification limit 0.97 μmol $L^{-1}$ for thymol and 0.040 μmol $L^{-1}$ for sulfamethizole were obtained. Newly developed methods were used for determination of the studied compounds in pharmaceutical preparations. HPLC with spectrophotometric detection was used as a comparative method; results from both methods were in good agreement.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Measurements in flow arrangement, such as flow injection analysis (FIA) and particularly HPLC, belong nowadays to the most common analytical methods [1]. In recent decades, there is an ever increasing demand on selectivity, sensitivity, speed, and price of an individual analytical determination. Electrochemical detectors meet very well many of these demands and thus they are suitable candidates for detection in flowing systems [2].

Amperometry and coulometry are the most common electrochemical detection techniques used in flow arrangement. These systems differ mainly in the degree of electrochemical conversion of the analyte – amperometry has low conversion degree of up to several percent while coulometry is based on complete conversion of all electrochemically active substances [3]. High mass transfer rate of electro active compounds to the surface of working electrode is necessary for exhausting electrolysis which can be facilitated by high surface area of working electrode [4]. Large surface planar or tubular electrodes [5] have problems with large volume and inappropriate geometry of detection cell, which decreases efficiency of HPLC separation. The way, how to achieve both the large surface and low volume of detection cell, is utilization of porous working materials, such as porous metals [6] and reticular vitreous carbon [7,8], or packed carbon particles [9] and particles of metal [10].

One of the limitations of electrochemical detection in flow arrangement is passivation of the electrode material. In spite of the ability of the flow systems to carry away products of electrochemical reaction from the working electrode surface, fouling can disable further measurement particularly during the detection of some types of compounds. In the case of porous working material, passivation is even more serious problem, as the working material cannot be mechanically cleaned. Chemical and electrochemical cleaning remains the only possibility, but this procedure has low efficiency, particularly for some products of electrochemical reactions. Passivated working electrode usually has to be replaced, which is often time consuming and expensive.

One way how to fix this problem was introduced by Ruzicka et al. They prepared amperometric detector called "jet-ring", which was based on microparticles of crushed reticular vitreous carbon held inside the detector by a movable bulkhead containing reference electrode and contact for working electrode. Working material was washed out after manipulation with the bulkhead and refilled by the injection of carbon suspension [11–13]. In our case, this strategy was replaced by porous filter, which held the working material based on carbon spherical microparticles. Auxiliary and reference electrode were placed together with the

* Corresponding author. Tel.: +420221951223.
*E-mail addresses:* mikaja@natur.cuni.cz (J. Mika), barek@natur.cuni.cz (J. Barek), zima@natur.cuni.cz (J. Zima), dejmkova@natur.cuni.cz (H. Dejmkova).

http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.12.091
0013-4686/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

capillary with working electrode in the overflow cell filled with carrier solution or mobile phase. This system was constructed with emphasis on simplicity of detector construction and manipulation.

This paper describes fabrication and testing the electrochemical properties of this newly developed coulometric detector with renewable working electrode material using hydroquinone and potassium ferrocyanide as probes. The practical applicability of the detector is demonstrated on the determination of two pharmaceuticals; thymol and sulfamethizole, both strongly passivating glassy carbon working material. Determination of thymol was performed by FIA and determination of sulfamethizole by HPLC. Thymol has antibacterial and antiseptic properties [14], it is component of many herbs and suppressors of growth of bacteria, viruses and fungi. Thymol is therefore used for therapy of diseases of respiratory tract [15] and as an antisepticum in stomatology. It is also used as an insecticide against mosquitoes [16]. Sulfamethizole is a sulfamide antibiotic used mainly against gram-positive and gram-negative bacteria. It is commonly used for fast therapy of urinary tract especially against *Escherichia coli* [17,18].

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and samples

Stock solutions of potassium ferrocyanide and hydroquinone (Fig. 1A) (both Lachema, Brno, Czech Republic, $1 \times 10^{-3}$ mol $L^{-1}$) were prepared by dissolving the proper amount of the respective compound in deionized water. Thymol (Fig. 1B, Thymolum, Tamda, Czech Republic) and sulfamethizole (Fig. 1C, 99% Sigma-Aldrich, USA) were dissolved in methanol (≥ 99.9%, Merck, Germany) in the concentrations $1 \times 10^{-2}$ mol $L^{-1}$ and $1 \times 10^{-3}$ mol $L^{-1}$, respectively. Solutions of lower concentrations were obtained by serial dilution of stock solutions by carrier solution or by the mobile phase.

Sodium sulphate (Lachema, Czech Republic, 0.1 mol $L^{-1}$) was used as carrier solution for the measurements with potassium ferrocyanide.

Britton–Robinson (B–R) buffers were used for preparation of carrier solutions and mobile phases. Alkaline component of B–R buffer was prepared from sodium hydroxide (98%, Lach-Ner, Czech Republic) and acidic component from phosphoric acid (85%, Lach-Ner, Czech Republic), boric acid (99.5%, Lach-Ner Czech Republic), and acetic acid (99%, Lach-Ner Czech Republic). B–R buffer of pH 2 [19] was used for the measurements with hydroquinone. For the determination of sulfamethizole, acidic and alkaline components were ten times diluted by water and then mixed together to obtain proper pH. Mobile phase for sulfamethizole determination was prepared by diluted B–R buffer of requested pH with methanol. Values of pH given in this paper represent pH of aqueous buffer before mixing with methanol.

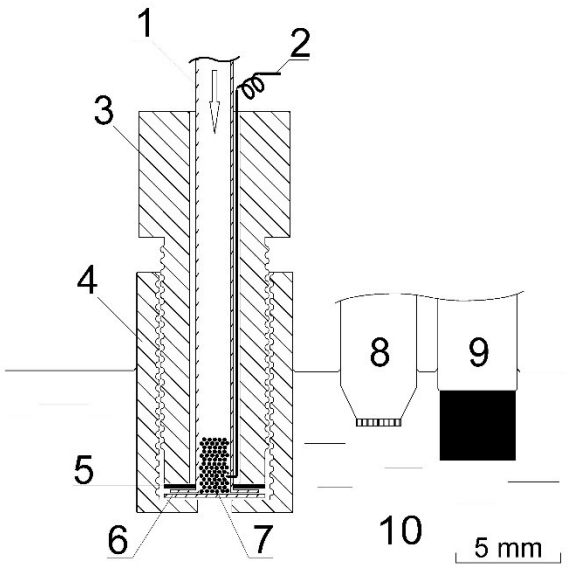



**Fig. 2.** Schematic representation of coulometric detector; Teflon capillary (diameter 0.5 mm) (1), platinum wire (2), screw (3), cap (4), iron ring (5), filtration paper (6), working material (glassy carbon microbeads) (7), reference (8) and auxiliary (9) electrode in mobile phase or carrier solution (10).

Content of thymol and sulfamethizole in tablets Septolete D (Krka, Slovenia) and Micturol® Sedante Fuerte (Laboratorio Farmaceutico S.I.T. Srl Italy) was determined by FIA-ED and HPLC-ED, respectively. Their content in both preparations was also determined by HPLC with spectrophotometric detection as the standard method.

Millipore Q-plus System (Millipore, USA) was used for the preparation of deionized water for all aqueous solutions.

### 2.2. Coulometric detector construction and handling

Coulometric detector is based on thermally flanged Teflon capillary (inner diameter 0.5 mm). Near the flanged end, platinum wire serving as the electrical contact was introduced through the capillary wall and isolated by a polymer (polystyrene) and heat-shrink tubing. A screw and a cap with a hole are used for holding a filter made of filtration paper on the outlet of the capillary (Fig. 2). This arrangement allows easy introduction and renewal of the working electrode material in the detector (Fig. 3).

As the working electrode material, commercially available glassy carbon spherical microparticles of diameter 10–20 μm (Alfa

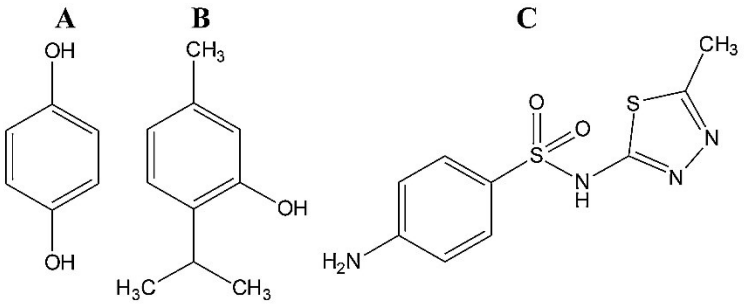



**Fig. 1.** Chemical structure of hydroquinone (A), thymol (B), and sulfamethizole (C).

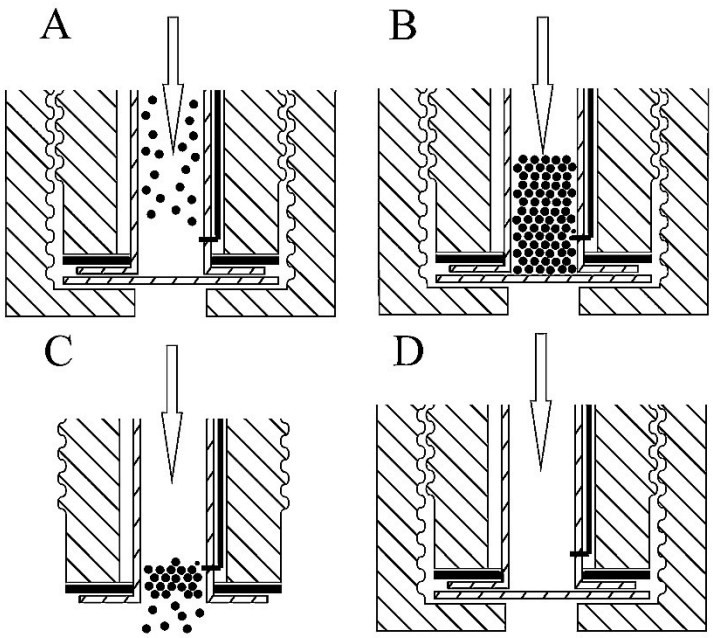



**Fig. 3.** Refilling of coulometric detector; beads are introduced into the detector by flow of methanol (A), beads are captured inside of the detector and samples can be injected (B), filter is removed and working material is washed out by flow of methanol (C), filter and cap are back on their places and detector is ready for refilling (D).

Aesar, Germany) were used. For the introduction of the working material, suspension of these carbon particles in nitromethane (POCH, Gliwice, Poland) in proportion of 10 mg/3 mL was prepared. 500 μL of this suspension was injected by 6-port injection valve equipped with loop of 0.75 mm inner diameter (Rheodyne, USA). Nitromethane has similar density to glassy carbon, which prevents the decantation of the suspension. After washing nitromethane away by flow of methanol (Fig. 3A), the detector was ready for the measurement. High pressure pump HPP 4001 (Laboratorni pristroje Praha, Czech Republic) and 6-port injection valve with Teflon capillaries of 0.75 mm inner diameter (Rheodyne, USA) was used for the filling. This procedure results in the deposition of column of carbon microparticles with the height about 4 mm (Fig. 3B). Height of the carbon layer can be modified by using different volume of the suspension or by changing the proportion of carbon beads in suspension. Nevertheless, the range of the carbon layer height is limited; low amount of carbon causes the loss of the electrical contact, while high amount increases the working pressure, threatening to damage the detector.

After filling, coulometric detector was connected to FIA or HPLC system. Working material was changed according to the requirement of the determination, usually due to passivation, by dismounting the filter and washing out the spent working material by methanol (Fig. 3C). Filling procedure consumes between three and five minutes; this time can be further decreased by automatization of the procedure.

### 2.3. Apparatus

FIA apparatus consisted of high pressure pump HPP 5001, ADLC2 detector (both Laboratorni pristroje Praha, Czech Republic) and 6-port injection valve (Rheodyne, USA). Working coulometric electrode was set in 3-electrode arrangement with platinum sheet auxiliary electrode and Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode (both Monokrystaly Turnov, Czech Republic). Unless stated otherwise, following determination conditions were used: flow rate 0.6 mL $min^{-1}$, injected volume 100 μL, and detection potential +0.7 V for determination of potassium ferrocyanide ($1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$) and flow rate 0.7 mL $min^{-1}$, detection potential +1.1 V and injected volume 100 μL for the determination of hydroquinone ($1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$), respectively.

HPLC system for sulfamethizole determination consisted of the same pump, detector, and injection valve as in the case of FIA. Column Lichrospher® RP-18, 100 (5 μm), 125 × 4 mm (LichroCART, Merck, Germany) was used for the separation. In this case, injected volume was 20 μL.

Spectrophotometric detector Sapphire (ECOM, Czech Republic) was set on 275 nm for determination of thymol at 277 nm for the determination of sulfamethizole.

### 2.4. Procedures

Concentration dependences were evaluated by least squares linear regression method. Limits of quantification were calculated as ten times the standard derivation ($\alpha = 0.05$), calculated from ten repeated measurements of the lowest concentration of the determined analyte, divided by the slope of calibration dependence [20]. All the measurements were made in triplicate, unless stated otherwise.

Content of thymol and sulfamethizole in pharmaceuticals was determined by newly developed detector and by standard method (HPLC with spectrophotometric detection). Student's t-test ($\alpha = 0.05$) was used for the evaluation of the difference between these methods [21].

Prior to the determination, one tablet of Septolete D was dissolved in 50 mL of methanol and 1 mL of this solution was diluted by B–R buffer of pH 10 to obtain the total volume 10 mL. The thymol content was determined by standard addition method (two 20 μL additions of the $1 \times 10^{-2}$ mol $L^{-1}$ stock solution). In the case of Micturol® Sedante Fuerte, one tablet was dissolved in 100 mL of methanol and 50 μL of this solution was diluted by the mobile phase to total volume of 10 mL. Dissolved tablets were filtered to

protect HPLC column from tablet additives. Two 250 μL additions of the $1 \times 10^{-3}$ mol $L^{-1}$ stock solution were used for determination of sulfamethizole by standard addition method. The same procedures were repeated three times for three different tablets of one batch.

## 3. Results and discussions:

### 3.1. Electrochemical parameters of the detector

One-electron oxidation of potassium ferrocyanide and two-electron oxidation of hydroquinone were electrode reactions used for evaluation of basic electrochemical properties of the newly developed detector.

#### 3.1.1. Conversion degree and robustness of the detector

Conversion degree $R_{conv}$ was determined as the ratio of experimentally determined charge (area under the amperometric curve) versus theoretical charge calculated from Faraday laws. The conversion degree depends on flow rate, specific electrode surface and length of the column of working electrode material. The newly developed detector has high conversion degree for flow rates lower than 0.8 ml $min^{-1}$ (Table 1). Maximum obtained values of conversion degree were 99.8% for potassium ferrocyanide and 109% for hydroquinone. The values of conversion degree suggest a complete electrochemical conversion; in the case of hydroquinone, the value of 100% was exceeded probably due to side reactions.

Thirty repeated injections of potassium ferrocyanide and hydroquinone were performed without renewing of working material. The relative standard deviation (RSD) of their peak heights was about 2% (namely 2.1% for ferrocyanide and 1.4% for hydroquinone), showing that the detector provides stable response with tested compounds. The stability of signal after the renewal of working material was also tested. The working material was changed five times in five different working days and RSD were for both compounds under 5% (namely 4.1% for ferrocyanide and 2.3% for hydroquinone). The response of the detector is robust enough for its utilization for coulometric detection.

#### 3.1.2. Active length of electrode material column

Potential on the working electrode is decreasing with increasing distance from the reference electrode [22]. Therefore, it might happen that only part of the working material of the detector has the potential sufficient for electrode reaction. This effect was already observed for example in the case of tubular detector [23]. To verify this assumption, the length of electrode material participating in the electrochemical reaction was calculated from expression of conversion degree [22]:

$$R_{conv} = 1 - \exp(-m_0 \cdot s \cdot a \cdot L/v_f), \quad (1)$$

**Table 1**
Influence of flow rate on conversion degree of potassium ferrocyanide and hydroquinone.

| flow rate (mL $min^{-1}$) | conversion degree (%) | |
|---|---|---|
| | potassium ferrocyanide | hydroquinone |
| 0.5 | 99.5 | 107 |
| 0.6 | 99.8 | 108 |
| 0.7 | 99.2 | 109 |
| 0.8 | 97.1 | 107 |
| 1.0 | 90.3 | 103 |
| 1.2 | 84.1 | 95.6 |
| 1.4 | -[a] | 89.9 |

[a] value not measured.

where $s$ is specific surface area [$cm^{-1}$], $a$ is open area of pores [$cm^2$], $L$ is electrode length [cm] and $v_f$ is volumetric flow rate [mL $min^{-1}$]. Mass-transfer coefficient $m_0$ for small spherical particle with a radius of $r$ can be expressed as [24]:

$$m_0 = 0.730 \cdot D^{2/3} \cdot u^{1/2} \cdot r^{-2/3}, \quad (2)$$

where $u$ is superficial flow rate [cm $s^{-1}$], $r$ is radius of spherical microparticles [cm] and $D$ is diffusion coefficient [$cm^2$ $s^{-1}$].

Using experimentally obtained conversion degree, mean value of carbon microparticles radius and value of $1.18 \times 10^{-5}$ $cm^2$ $s^{-1}$ for diffusion coefficient [25], active electrode length of 2.2 mm was obtained. The calculation is only approximate due to the distribution of the carbon particle radius (in the range from 10 to 20 μm) and possible deformation of the inner shape of the detector by thermal flatting. Considering this, the result is in good agreement with experimentally determined electrode length, varying around 4 mm. Therefore, it can be expected, that most of the carbon material in the detector is participating in electrode reaction.

#### 3.1.3. Hydrodynamic voltammograms

Hydrodynamic voltammograms were measured to obtain optimum detection potentials for both model compounds (Fig. 4). For a reversible oxidation, the hydrodynamic voltammogram can be described as [26]:

$$E = E_{1/2} + (RT/zF) \cdot \ln[i/(i_{lim} - i)], \quad (3)$$

where $E$ is potential [V], $E_{1/2}$ is half-wave potential [V], R is universal gas constant, F is Faraday constant, z is number of transferred electrons, $T$ is temperature [K], $i_{lim}$ is the limiting current [A], and $i$ is current [A]. The slopes of rising part of ferrocyanide hydrodynamic voltammogram were lower than theoretically expected, but for hydroquinone, the slope was in good agreement with theory.

#### 3.1.4. Linearity of response

Concentration dependences for both model substances were measured to verify the linearity of the detector response. The dependence was linear from 8 μmol $L^{-1}$ to 100 μmol $L^{-1}$ for potassium ferrocyanide and from 6 μmol $L^{-1}$ to 100 μmol $L^{-1}$ for hydroquinone (Table 2) with regression coefficients 0.9981 and 0.9997 for ferrocyanide and hydroquinone, respectively. Strong negative signal of the blank caused negative intercept of calibration dependences and it also deformed peaks of samples with lower concentration.

### 3.2. Application of the detector for determination of thymol and sulfamethizole

The results obtained by determination of standard model compounds were satisfactory. Therefore, the detector was used for determination of common analytes, which could be the representatives of expected samples determined by the detector in FIA and HPLC arrangement. For this purpose, we have selected two organic oxidisable compounds, which have strong passivating properties on glassy carbon working material, namely thymol and sulfamethizole.

#### 3.2.1. FIA determination of thymol

Optimal conditions for determination of thymol, namely pH of B–R buffer, flow rate, detection potential and injected volume were found. At first, influence of pH on the detector response was investigated. Hydrodynamic voltammograms in B–R buffer of pH in the range from 2 to 12 were measured. The peak height and area increased with increasing pH of carrier solution up to pH 10; above

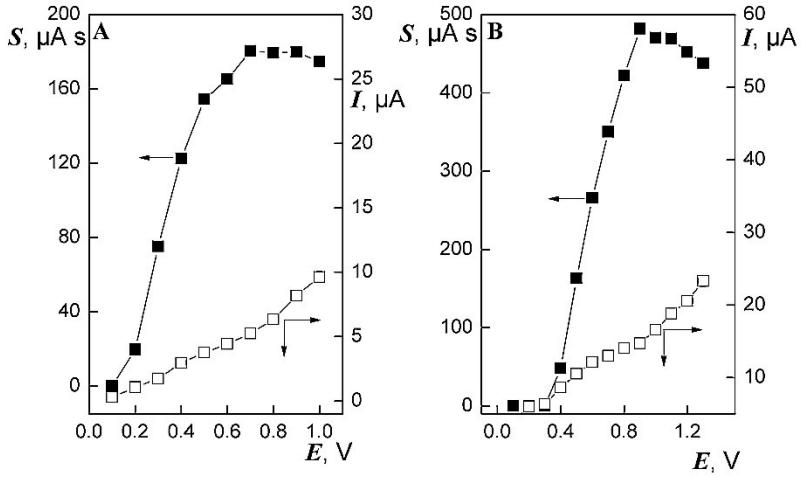



**Fig. 4.** Hydrodynamic voltammogram of potassium ferrocyanide ($1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$, A) and hydroquinone ($1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$, B) (full squares) and background current (empty squares); flow rate 0.6 mL $min^{-1}$, injected volume 100 μL for ferrocyanide and flow rate 0.7 mL $min^{-1}$, injected volume 20 μL for hydroquinone.

**Table 2**
Parameters of calibration dependence and value of quantification limits (LOQ). Values of slope and intercept are shown together with their standard deviation.

| method | analyte | linear dynamic range (μmol $L^{-1}$) | slope (μA s μmol $^{-1}$ L) | intercept (μA s) | correlation coefficient | LOQ (μmol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FIA-ED | ferrocyanide | 8 – 100 | 6.79 ± 0.11 | −40.8 ± 5.8 | 0.9981 | 1.25 |
| FIA-ED | hydroquinone | 6 –100 | 22.18 ± 0.13 | −82.2 ± 6.6 | 0.9997 | 1.64 |
| FIA-ED | thymol | 2 – 100 | 7.65 ± 0.09 | −18.3 ± 4.2 | 0.9991 | 0.97 |
| HPLC-ED | sulfamethizole | 0.1 – 100 | 3.59 ⊥ 0.41 | −1.1 ⊥ 1.8 | 0.9987 | 0.04 |

this pH the signal of the detector slightly dropped. Therefore, pH 10 was selected as optimal (Fig. 5, optimal value corresponds to bold curve). Optimal detection potential of +1.1 V corresponding to the maximum peak height was chosen. Under these conditions, different values of flow rate were tested in the range from 0.4 to 1.4 mL $min^{-1}$. The peak height grew with increasing flow rate in this range. Area of peak was stable only for flow rates lower than 0.6 mL $min^{-1}$. Therefore, the value of 0.6 mL $min^{-1}$ was selected as optimal flow rate. Afterwards, injected volume was optimized. The highest signal was observed at injected volume of 50 μL, which was therefore selected as optimal. Further increase of injected volume led only to the widening of the peaks.

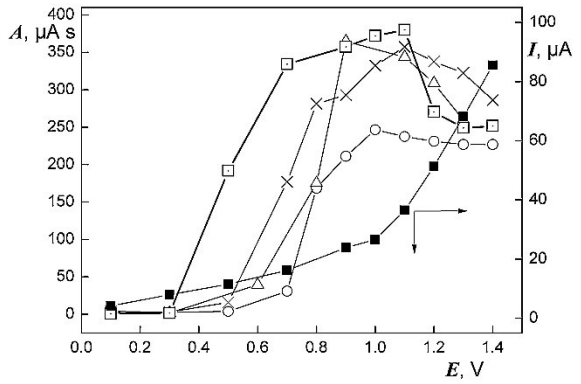



**Fig. 5.** Hydrodynamic voltammograms of thymol (injected 20 μL of 100 μmol $L^{-1}$ solution) in B–R buffer pH 4 (○), 6 (×), 8 (△) and 10 (□) and background current of pH 10 (■); flow rate 0.5 mL $min^{-1}$.

Gradual passivation of working electrode material during measurements was observed. The signal of first six injections was stable with RSD 1.6%, but 35% drop of the peak area was observed during next four measurements. Therefore, working material was changed after six sample injections. Response of the detector for five different fillings was measured and RSD of the peak heights was calculated as 4.2%. It is similar value as in the case of model compounds (Section 3.1.1). Calibration dependence of thymol was measured under the optimal conditions and its parameters are presented in Table 2. Calibration dependence is linear in the range from quantification limit, i.e. 0.97 μmol $L^{-1}$, to 100 μmol $L^{-1}$. The applicable concentration range is limited by the deformation of peaks of lower concentration by blank signal, which is general problem of FIA; if the measurement contained separation step, lower quantification limit could be expected. Typical FIA records and calibration dependence are shown in Fig. 6A.

Thymol concentration in pharmaceutical preparation Septolete D was determined by standard addition method using the above found optimal conditions (Fig. 6B) and results from these measurements were compared with values determined by HPLC with spectrophotometric detection. The results of electrochemical detection were in good agreement with standard method according to *t*-test (Table 3).

### *3.2.2. HPLC determination of sulfamethizole*

The possibility of application of the newly developed coulometric detector in HPLC was tested on sulfamethizole determination. The electrochemical reaction of sulfamethizole (Fig. 1C) follows the general electrochemical anodic reaction of the aromatic amino group. Product of this electrochemical reaction is cation radical. During its stabilization, further oxidation and deprotonation can occur and final products include dimers and

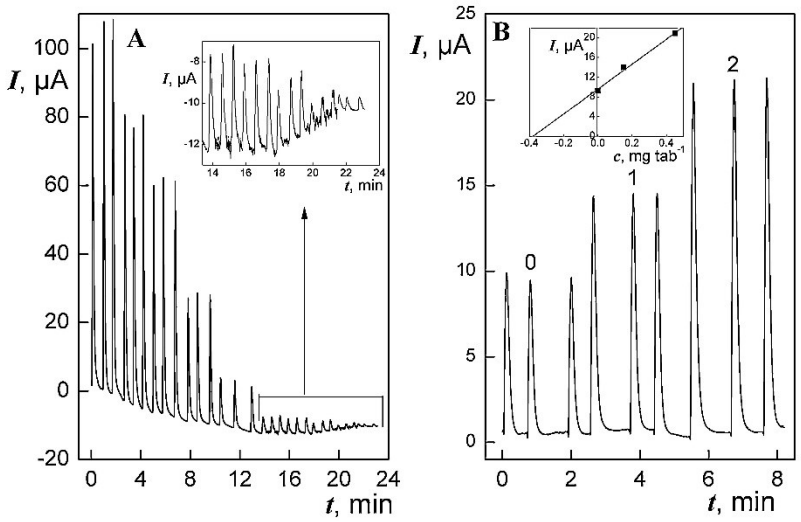



**Fig. 6.** FIA records of thymol. (A) concentration dependence, concentrations 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6 and 4 μmol L $^{-1}$); (B) determination of thymol in tablet Septolete D, standard additions of 0 (0), 20 (1) and 40 (2) μL of thymol stock solution (inset shows corresponding concentration dependence). Carrier solution B–R buffer pH 10, $E_{det}$ = +1.1 V, flow rate 0.6 mL min $^{-1}$ and injected volume 50 μL

**Table 3**
Content of thymol and sulfamethizole in tablets determined by the newly developed methods, manufacturer declared values and values determined by HPLC-UV; uncertainty presented by confidence limit (α = 0.05, n = 3).

| sample | method of determination | found quantity value (mg tab $^{-1}$) | declared value (mg tab $^{-1}$) | HPLC-UV reference method value (mg tab $^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Septolete D | FIA-ED | 0.40 ⊥ 0.04 | –[a] | 0.39 ⊥ 0.04 |
| Micturol® Sedante | HPLC-ED | 252.6 ⊥ 18.6 | 250 | 249.9 ⊥ 8.1 |

[a] thymol content is not declared by the manufacturer.

polymers. The substitution of aromatic ring and the reaction settings affect preferred products [27]. The oxidation is characterised by two-electron exchange.

As in the case of thymol, optimal conditions were determined to obtain maximum signal of the detector. Mobile phase composition was adopted from [28]; mobile phase consisted of methanol and ten times diluted B–R buffer of pH 3 (70:30, v/v).

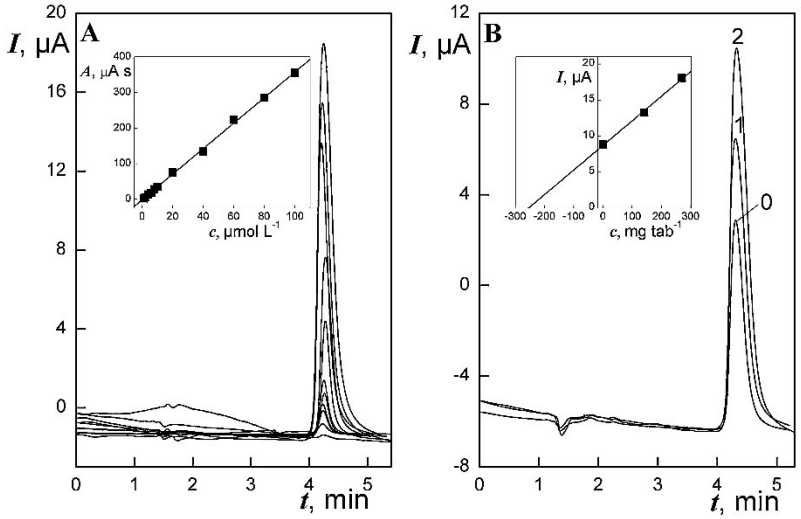



**Fig. 7.** HPLC-ED chromatograms of (A) sulfamethizole standards 100, 80, 60, 20, 10, 8, 6, 4, 2, and 1 μmol L$^{-1}$, and (B) chromatograms corresponding to determination of sulfamethizole in Micturol, standard additions of 0 (0), 20 (1) and 40 (2) μL of stock solution; insets: corresponding concentration dependences. Mobile phase methanol and diluted B–R buffer pH 3, column Lichrospher® RP-18, 100 (5 μm), $E_{det}$ = +1.6 V and flow rate 0.8 mL min $^{-1}$.

Optimum detection potential was found from hydrodynamic voltammograms as +1.6 V. Maximum peak area was obtained for this potential, while background current was still relatively low. Flow rates in the range from 0.4 to 1.2 mL $min^{-1}$ were tested. The trend of the dependences was similar as in the case of thymol (Section 3.2.1) and optimal flow rate of 0.8 mL $min^{-1}$ was selected. Under the optimal conditions, the number of exchanged electrons was calculated as 1.9 (see Section 3.1.1). This value is in good agreement with theory, and therefore, the complete electrochemical oxidation of sulfamethizole under the optimal conditions can be assumed.

Sulfamethizole strongly passivated working glassy carbon material. The signal of only three injections of sulfamethizole was stable without the need of working material renewal. Fast decrease of signal was observed after these three injections; the drop of peak area was about 30% for five sample injections. Therefore, working material was renewed periodically after each three injections of sulfamethizole. With the renewal (five consecutive fillings), the repeatability reaches 6.3%; this is again similar value as in the case of model compounds and thymol (Sections 3.1.1 and 3.2.1).

Linear dynamic range and quantification limit were determined by measuring the calibration dependence under the optimal conditions. Measured dependence was linear in the range from its quantification limit, i.e. 0.04 μmol $L^{-1}$ to 100 μmol $L^{-1}$. Selected HPLC records and calibration dependence are shown in Fig. 7A and its parameters are summarized in Table 2.

Newly developed coulometric method was used for determination of sulfamethizole concentration in pharmaceutical preparation Micturol® Sedante Fuerte by standard addition method under the optimal conditions. Characteristic peaks of electrochemical detection are shown in Fig. 7B. As in the case of thymol, HPLC with spectrophotometric detection was used as comparative method; the results are shown in Table 3 and their mutual agreement was tested by *t*-test.

## 4. Conclusion

New coulometric detector was developed and its basic electrochemical properties investigated. Main advantages of the detector are its easy construction and possibility of simple renewal of passivated working material; the automatization of the described procedure is straightforward. New electrochemical detector is simple, rapid and robust, and its practical applicability was verified on the determination of thymol and sulfamethizole.

Thymol was determined by FIA in B–R buffer pH 10, while sulfamethizole was determined by HPLC-ED in diluted B–R buffer pH 3 and methanol (70:30, v/v). Both substances showed strong passivating properties requiring periodical renewal of working electrode material. Optimal conditions of thymol determination were: flow rate 0.6 mL $min^{-1}$, detection potential +1.1 V, and injected volume 50 μL. In the case of sulfamethizole, values of 0.8 mL $min^{-1}$ for flow rate and +1.6 V for detection potential were used as optimal. Calibration dependences were linear from quantification limits to 100 μmol $L^{-1}$ and limits of quantification were 0.97 μmol $L^{-1}$ for thymol and 0.04 μmol $L^{-1}$ for sulfamethizole. Peaks of lower concentration determined by FIA were deformed by blank signal, which limits the application of the detector for FIA determination of lower concentrations.

Pharmaceutical preparations were determined under optimal conditions and all results were consistent with HPLC with spectrophotometric detection. HPLC-UV determination of sulfamethizole had lower uncertainty than HPLC-ED, probably due to deviation resulting from necessity for periodical renewal of working material.

## Acknowledgements

This work was performed in the framework of Specific university research (SVV). Financial support from the Grant Agency of Charles University (project no. 84213/2013) and from Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/12/G151) is gratefully acknowledged.

## References

[1] A.M. Bond, 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on-stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques, Analytica Chimica Acta 400 (1999) 333–379.
[2] K. Toth, K. Stulik, W. Kutner, Z. Feher, E. Lindner, Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: Characterization and classification - (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry 76 (2004) 1119–1138.
[3] K. Stulik, V. Pacakova, Electroanalytical measurements in flowing liquids, E. Horwood, 1987.
[4] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons, RSC, 2005.
[5] J. Lankelma, H. Poppe, Design and Characterization of a Coulometric Detector with a Glassy Carbon Electrode for High-Performance Liquid-Chromatography, Journal of Chromatography 125 (1976) 375–388.
[6] J.V. Kenkel, A.J. Bard, Dual Working Electrode Coulometric Flow Cell, Journal of Electroanalytical Chemistry 54 (1974) 47–54.
[7] E. Beinrohr, M. Nemeth, P. Tschopel, G. Tolg, Design and Characterization of Flow-through Coulometric Cells with Porous Working Electrodes Made of Crushed Vitreous Carbon, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 343 (1992) 566–575.
[8] J. Wang, H.D. Dewald, Deposition of Metals at a Flow-through Reticulated Vitreous Carbon Electrode Coupled with Online Monitoring of the Effluent, Journal of The Electrochemical Society 130 (1983) 1814–1818.
[9] W.J. Blaedel, J.H. Strohl, Continuous Quantitative Electrolysis, Analytical Chemistry 36 (1964) 1245–1251.
[10] L.I. Ilcheva, A.D. Dakashev, Coulometric Detector Cell for Use with Flow-Injection, Analyst 115 (1990) 1247–1249.
[11] C.H. Pollema, J. Ruzicka, Flow-Injection Renewable Surface Immunoassay - a New Approach to Immunoanalysis with Fluorescence Detection, Analytical Chemistry 66 (1994) 1825–1831.
[12] J. Ruzicka, Discovering Flow-Injection - Journey from Sample to a Live Cell and from Solution to Suspension, Analyst 119 (1994) 1925–1934.
[13] J. Ruzicka, Flow Injection-Renewable Surface Techniques, Analytica Chimica Acta 308 (1995) 14–19.
[14] P. Lo Cantore, V. Shanmugaiah, N.S. Iacobellis, Antibacterial Activity of Essential Oil Components and Their Potential Use in Seed Disinfection, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (2009) 9454–9461.
[15] A. Chevallier, The encyclopedia of medicinal plants, DK Pub., 1996.
[16] L.S. Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent activity of essential oils: A review, Bioresource Technology 101 (2010) 372–378.
[17] M.B. Kerrn, N. Frimodt-Moller, F. Espersen, Effects of sulfamethizole and Amdinocillin against Escherichia coli strains (with various susceptibilities) in an ascending urinary tract infection mouse model, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47 (2003) 1002–1009.
[18] M.B. Kerrn, N. Frimodt-Moller, F. Espersen, Urinary concentrations and urine ex-vivo effect of mecillinam and sulphamethizole, Clinical Microbiology and Infection 10 (2004) 54–61.
[19] W. Sun, Q. Jiang, M.X. Yang, K. Jiao, Electrochemical behaviors of hydroquinone on a carbon paste electrode with ionic liquid as binder, Bulletin of the Korean Chemical Society 29 (2008) 915–920.
[20] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, I.U.o. Pure, A. Chemistry, Compendium of Analytical Nonmenclature: Definitive Rules 1997, Blackwell Science1998.
[21] M.J. Schervish, Theory of Statistics, Springer, 1995.
[22] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods: fundamentals and applications, Wiley, 1980.
[23] J. Zavazalova, H. Dejmkova, J. Barek, K. Peckova, Tubular and Microcylindrical Platinum Electrodes for Amperometric Detection of Aminobiphenyls and Aminonaphthalenes in HPLC, Electroanalysis 26 (2014) 687–696.
[24] R.E. Sioda, Theoretical Mass-Transfer Coefficients for Circular-Cylinders and Spheres in Cross Flow, Analytica Chimica Acta 215 (1988) 295–299.
[25] R.C. Weast, CRC Handbook of Chemistry and Physics 61st Ed 1980–1981, Chemical Rubber, 1981.
[26] R.E. Sioda, Current-Potential Dependence in Flow Electrolysis on a Porous Electrode, Journal of Electroanalytical Chemistry 34 (1972) 399–409.
[27] O. Hammerich, H. Lund, Organic Electrochemistry, Fourth Edition, Taylor & Francis, 2000.
[28] H. Dejmkova, M. Mikes, J. Barek, J. Zima, Determination of Sulfamethizole Using Voltammetry and Amperometry on Carbon Paste Electrode, Electroanalysis 25 (2013) 189–194.

# 10. Příloha III

## SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HOMOVANILLIC AND VANILLYLMANDELICACID BY HPLC USINGDETECTOR WITH RENEWABLE CARBON WORKING MATERIAL

**Jan Mika**, Jiří Barek, Jiří Zima, Josino Costa Moreira a Hana Dejmková

*Electroanalysis*

Volume 30, Pages 1455-1460, Year 2018

---

Procentuální účast Mgr. Jana Miky v této práci odpovídá 75 %.

**Full Paper** Wiley Online Library ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201800041

# Simultaneous Determination of Homovanillic and Vanillylmandelic Acid by HPLC Using a Coulometric Detector with Renewable Glassy Carbon Microbeads Based Working Electrode

Jan Mika,[a] Jiří Barek,[a] Jiří Zima,[a] Josino Costa Moreira,[b] and Hana Dejmková*[a]

*Dedicated to Prof. Joseph Wang, DSc. Dr.h.c. multiple on the occasion of his 70th birthday.*

**Abstract:** Homovanilic (HVA) and vanillylmandelic (VMA) acid are catecholamines metabolites commonly used as cancer biomarkers. New method for simultaneous determination of both these metabolites is presented, using recently developed flow-through coulometric detector based on glassy carbon microbeads. This application presents the potential opportunities of the above mentioned coulometric detector for the simultaneous determination of mixture of substances in complicated matrix in combination with gradient chromatography. Optimum conditions were set as follows: mobile phase consisting of acetonitrile (eluent A) and ten time diluted B-R buffer pH 3 (eluent B) with gradient program 5% A (2 min), 5% A to 25% A (8 min), 25% A (4 min), 25% A to 95% A (1 min), and 95% A (4 min); flow rate of mobile phase 0.7 mL min $^{-1}$, detection potential +1.3 V, and injection volume 20 µL. Calibration dependences of both metabolites were linear from concentration 100 µmol L $^{-1}$ to their quantitation limits (i.e. 0.6 µmol L $^{-1}$ for HVA and 1.3 µmol L $^{-1}$ for VMA, respectively). Standard addition method was applied for the determination of these analytes in human urine. Obtained results are in agreement with results of HPLC method with UV detector.

**Keywords:** HPLC · Coulometric detection · Tumor markers · Glassy carbon microbeads

## 1 Introduction

Homovanillic acid (HVA) and vanillylmandelic acid (VMA) are structurally similar final products of catecholamine metabolism. HVA is the main metabolite product of epinephrine and norepinephrine and VMA is the metabolic product of dopamine [1]. Catecholamines serve as neuron transmitters or hormones and their production becomes anomalous during some metabolic [2] or neurological [3] diseases, such as neuroblastoma (neoplastic disease of early childhood, the third most common cancer of children [4]) or Menkes disease [5]. Therefore, HVA and VMA can be used as biomarkers of such diseases with advantage. Their abnormal levels and their ratio are monitored in urine, blood plasma, brain tissue or cerebrospinal fluid. Studies demonstrated that diagnosis based on HVA and VMA have very high sensitivity (66–100%) and specificity (>99%) [6]. The rate of neuroblastoma patients with positive VMA and/or HVA diagnostic tests varies with the stage of the disease and patients with high stage tumors are more likely to have abnormal levels of those biomarkers [7]. Reference levels are generally age-dependent, varying between approximately 35 mg/g of creatinine in the first year of life to 8 mg/g of creatinine in adulthood in case of HVA and between 25 mg/g of creatinine in the first year of life to 7 mg/g of creatinine in adulthood in case of VMA. [8]

The demand for the routine determination of HVA and VMA is increasing for diagnosis and for monitoring of the response to the therapy, and low-cost, simple, and rapid methods are needed for their determination. Electrochemical methods meets all these requirements and HPLC with electrochemical detection is the most frequent technique for HVA and VMA determination, especially with coulometric and amperometric detection. Coulometric detection employs mainly porous graphite [9] and coulometric carbon electrode arrays [10]. Glassy carbon in a wall-jet or thin-layer arrangement [11] or boron doped diamond electrode [12] are commonly used for amperometric detection. Electrophoresis [13], gas chromatography [14], voltammetry [15], and HPLC with mass spectro-

[a] J. Mika, J. Barek, J. Zima, H. Dejmková
Charles University, Faculty of Science, University Research Centre UNCE „Supramolecular Chemistry“, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-12843 Prague 2, Czech Republic
E-mail: dejmkova@natur.cuni.cz
[b] J. C. Moreira
National School of Public Health, FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhoes, 1480-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

Supporting information for this article is available on the WWW under https://doi.org/10.1002/elan.201800041

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

metric [16], chemiluminiscence [17], or fluorescence detection [18] are also commonly used. Electrochemical detection must, however, deal with the problem of passivation of the working electrode, particularly when determination of phenolic compounds is performed in a complex matrix (urine, plasma, etc.) as in the case of HVA and VMA determination. Activation or cleaning of passivated working electrode is always a demanding process and in many cases, its complete replacement is the only way to ensure the reproducibility of results, particularly in the case of porous materials, where the surface cannot be cleaned mechanically. Therefore, we have decided to use this determination for the testing application of recently introduced flow-through coulometric detector with renewable working material based on glassy carbon microbeads [19]. The main advantage of this detector is its simple construction and handling while maintaining good electrochemical parameters and high conversion degree. Working material, carbon microbeads, is injected in the form of suspension and it is held by filter inside the capillary. Displacement of the filter leads to emptying the detector and enables injection of the new, intact, and fresh electrode material [19]. The aim of the paper is the application of the recently developed coulometric detector with renewable working material for the determination of HVA and VMA in human urine samples.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and Samples

Stock solutions of homovanillic acid (HVA, CAS No. 306-08-1, Figure 1A, 97%; Sigma Aldrich, USA) and vanillylmandelic acid (VMA, CAS No. 55-10-7, Figure 1B, 98%; Sigma Aldrich, USA) of the concentration $1\times10^{-3}$ mol L$^{-1}$ were prepared by dissolving the proper amount of the respective compound in acetonitrile (HPLC grade, Carlo Erba Reagents, Italy). Diluted solutions were prepared daily and their acetonitrile content corresponded to the composition of the mobile phase in the moment of injection.

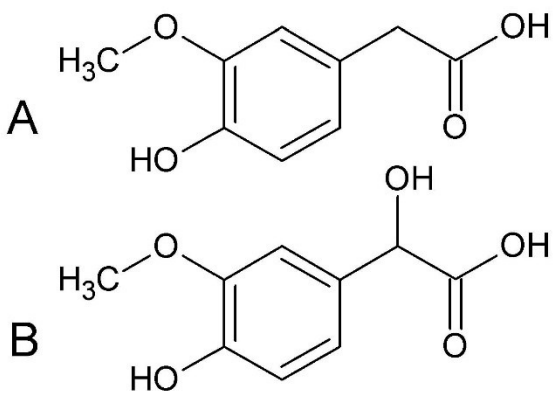



Fig. 1. Structural formula of HVA (A) and VMA (B).

Britton-Robinson (B-R) buffer was used as the aqueous part of mobile phases. Alkaline component of B-R buffer was 0.2 mol L$^{-1}$ sodium hydroxide (p.a. 99%, Vetec, Brazil) and acidic component was the mixture of acetic acid (p.a., 99,8%,Merck, Germany), boric acid (99.5%, Merck, Germany), and phosphoric acid (85%, Merck, Germany), each of the concentration of 0.04 mol L$^{-1}$. As the organic part, methanol (HPLC grade, Avantor Performance Materials S.A. de C.V., Mexico) or acetonitrile (HPLC grade, Carlo Erba Reagents, Italy) was added to mobile phase. Millipore system Symplica UV (Millipore, USA) was used for the preparation of deionised water for all aqueous solutions.

### 2.2 Apparatus

HPLC system consisted of LC-10AS HPLC pump, SPD-6A UV spectrophotometric detector, CBM-10A communications bus module (all Shimadzu, Japan), PalmSens Electrochemical Sensor Interface for electrochemical detection (PalmSens, Netherlands), column Kromasil® Eternity-5-PhenylHexyl 4,6×150 mm (Akzo Nobel, Netherlands) and 6-port injection valve with 20 µL loop (Rheodyne, USA). The detection wavelength was set on 279 nm [20]. Electrochemical detection was performed in 3-electrode arrangement; flow-through electrode with renewable porous working material based on microbeads of glassy carbon [19] was used as the working electrode and supplemented with Ag/AgCl (3M KCl) reference electrode and platinum sheet auxiliary electrode (both Monokrystaly Turnov, Czech Republic).

### 2.3 Procedures

Acidic and alkaline B-R buffer components were diluted by distilled water ten times and mixed together to obtain required pH.

Working material was introduced to the detector by 500 µL of suspension consisting of 10 mg glassy carbon spherical microbeads of diameter 10–20 µm (Alfa Aesar, Germany) and 3 mL of nitromethane (Sigma Aldrich, USA) that was transported to the detector by methanol flow using HPLC pump [19].

Concentration dependence parameters were obtained by the least squares linear regression method. Limit of quantification (*LOQ*) and limit of detection (*LOD*) were calculated by dividing the standard deviation ($\alpha=0.05$) of ten repeated measurements of the lowest concentration level for the particular analyte by the slope of calibration dependence and multiplication by ten or three for *LOQ* or *LOD*, respectively [22]. All the measurements were made in triplicate and using the mixture of both analytes, unless stated otherwise.

Urine for model samples was collected from healthy co-worker. Prior injection, it was filtered through the PTFE syringe filter (0.45 µm, Fischer Scientific) and

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

Table 1. Retention parameters of HVA and VMA obtained by HPLC at Kromasil Eternity-5-PhenylHexyl 4,6×150 mm column.

| Organic modifier | Modifier/buffer ratio | pH of B-R buffer | $t_R$ HVA (min) | $t_R$ VMA (min) | Resolution |
|---|---|---|---|---|---|
| MeOH | 3:7 | 3 | 13.78 | 4.76 | 20.5 |
| ACN | 3:7 | 3 | 5.36 | 3.61 | 5.3 |
| ACN | 2:8 | 3 | 8.99 | 4.01 | 13.6 |
| ACN | 1:3 | 3 | 6.87 | 3.87 | 9.0 |
| ACN | 1:3 | 4 | 6.01 | 3.66 | 6.6 |
| ACN | 1:3 | 5 | 3.88 | 3.09 | 2.7 |
| ACN | 1:3 | 6 | 3.01 | 2.76 | 0.8 |

diluted ten times by distilled water. Amounts of HVA and VMA were determined by standard addition method by HPLC with ED and UV detection. UV detection was selected for the sake of comparison. Student's t-test ($\alpha = 0.05$) was used to evaluate the difference between the two methods of detection [22].

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Method Optimization

Both electrochemical and chromatographic behavior of the analytes was investigated in the dependence on the composition of mobile phase, pH of B-R buffer, flow rate, and detection potential.

At first, the influence of the organic component of mobile phase on chromatographic behavior of the two biomarkers was evaluated using B-R buffer of pH 3 as an aqueous component and acetonitrile and methanol (20–30%) as organic modifiers. Based on the combination of sufficient resolution and analysis time (Table 1), mobile phase consisting of acetonitrile and B-R buffer pH 3 (1:3, *v/v*) was used for further measurements.

To investigate the influence of detection potential and buffer pH, hydrodynamic voltammograms of HVA and VMA were measured point-by-point in mobile phase consisting of 25% acetonitrile and 75% of B-R buffer with pH in the range from 3 to 6 (Figure 2). From chromatographic point of view, we can notice that while retention of VMA changes only slightly, retention of HVA decreases rapidly particularly between pH 4 and 5. It corresponds with the HVA dissociation constant of 4.4, while VMA dissociation (pKa 3.4 [23]) seems to be outside of the observed range. In the same way, electrochemical response is similar in all tested pH for VMA; for HVA, the response is slightly higher for pH values below pH 4. The position of the wave in hydrodynamic voltammogram moves to lower potentials with increasing pH as usual. Selection of pH for the further determination was based on the retention characteristics and pH 3 was used for further measurements. The detection potential was set as +1.3 V; under this potential, maximum peak height was obtained, while keeping the background current low.

As the last step of optimization, influence of flow rate was observed. Under previously optimized conditions, values of flow rate from 0.6 to 1.0 mL min$^{-1}$ were tested.

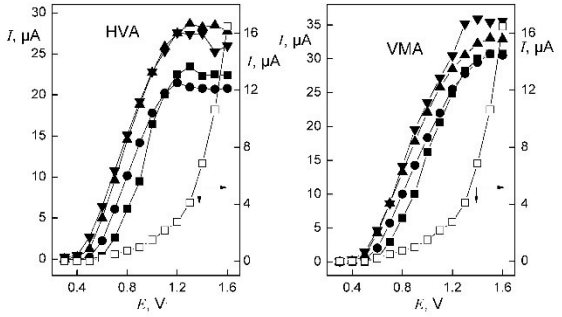



Fig. 2. Hydrodynamic voltammograms of HVA and VMA ($1\times10^{-4}$ mol L$^{-1}$) in acetonitrile and ten times diluted B-R buffer (25:75, v/v) of pH 3 (■),4 (●), 5 (▲), and 6 (▼) and background currents of pH 3 (□); flow rate 0.7 mL min$^{-1}$, injected volume 20 μL and column Kromasil® Eternity-5-PhenylHexyl 4,6×150 mm.

Lower flow rates would increase the analysis time excessively and higher flow rates could damage the detector due to the high hydrodynamic pressure. The peak heights of HVA and VMA grew with increasing flow rate in the observed range. Both peak areas of were stable only for flow rates lower than 0.7 mL min$^{-1}$, suggesting the complete oxidation of the analytes. Therefore, optimal flow rate was set on 0.7 mL min$^{-1}$.

Using Faraday law, the number of exchanged electrons was calculated. Both compounds were exchanging approximately two electrons under the optimal conditions ($1.81\pm0.63$ for HVA and $1.95\pm0.19$ for VMA, respectively). According to the voltammetric measurements, HVA should exchange two electrons and VMA four electrons in two two-electron waves [24]; this behavior was also observed during amperometric determination on glassy carbon paste electrode [20]. In comparison with study [20], the shift of the wave potentials can be also observed in hydrodynamic voltammograms; it might suggest that in the observed potential range, the second VMA wave is not yet developed.

### 3.2 Repeatability of Filling and Stability of Signal

Stability of the detector response was tested by 15 repeated injections of HVA and VMA mixture (both concentrations $1\times10^{-4}$ mol L$^{-1}$) under the optimal condi-

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

tions. Very slow decrease of peak area was observed after eight injections and rapid decrease of the signal was observed for both compounds between 10th and 15th injection. The relative standard deviation of the first 10 injections was 3.21% for HVA and 3.32% for VMA, respectively. Therefore, working material was renewed after each 10 injections of sample.

Response after the renewal of the working material provided RSD of 3.81% for VMA and of 3.66% for HVA (7 renewals of working material, determined during different days); therefore, variability of electrode preparation is within the variability of repeated injection.

### 3.3 Calibration Dependences

Determination of the analytes in human urine requires more complex separation procedure, including gradient elution program. Based on the previous knowledge of the chromatographic behavior of analytes, following gradient program was selected: 2 minutes of isocratic elution with 5% of acetonitrile, followed by increasing its content to 25% in 10th minute, next four minutes again in isocratic mode with 25% of acetonitrile and finally, washing step, consisting of increasing acetonitrile content to 95% in one minute and keeping it on this value for four minutes. After the analysis, composition of mobile phase returned to starting conditions during 1 minute and another 5 minutes were needed for baseline stabilization. The total time for one determination was thus 25 minutes.

Calibration dependences of both tested compounds were measured in the concentration range from 100 to 1 μmol L$^{-1}$ (Figure 3). Both calibration dependences were linear in the whole observed concentration range and had negligible intercept; markedly higher retention caused the lower sensitivity of HVA determination and higher LOQ in comparison with VMA. Figures of merits of calibration dependences are summarized in Table 2.

### 3.4 Determination of HVA and HMA in Urine

Newly developed method was applied for the determination of HVA and VMA in samples of human urine collected from volunteers from our laboratory.

Linearity of response for both tested compounds was verified in the range from 1 to 50 μmol L$^{-1}$. Based on chromatograms measured in this range (Figure 4), calibration dependences were calculated. Both curves were linear in the whole range with correlation coefficient

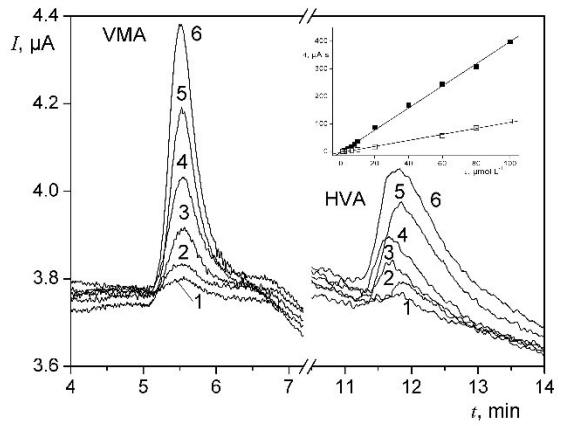



Fig. 3. HPLC-ED chromatograms of HVA and VMA standards 10 (6), 8 (5), 6 (4), 4 (3), 2 (2), and 1 (1) μmol L$^{-1}$, mobile phase acetonitrile (A) and ten times diluted B-R buffer pH 3 (B), gradient program 5% A (2 min), 5% A to 25% A (8 min), 25% A (4 min), 25% A to 95% A (1 min), and 95% A (4 min); $E_{det}$ = +1.3 V, flow rate 0.7 mL min$^{-1}$ and column Kromasil® Eternity-5-PhenylHexyl 4,6×150 mm; inset contains calibration curves for both compounds (VMA (■) and HVA (□)) in the range from 1 to 100 μmol L$^{-1}$.

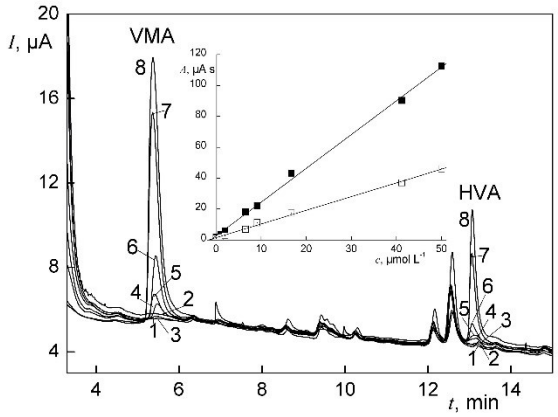



Fig. 4. HPLC-ED chromatograms of HVA and VMA in human urine, standard additions of 0 (1), 1.0 (2), 2.0 (3), 6.5 (4), 9.1 (5), 17 (6), 41 (7), and 50 (8) μmol L$^{-1}$ of HVA and VMA (inset shows corresponding concentration dependence of VMA (■) and HVA (□)). Mobile phase acetonitrile (A) and ten times diluted B-R buffer pH 3 (B), gradient program 5% A (2 min), 5% A to 25% A (8 min), 25% A (4 min), 25 % A to 95% A (1 min) and 95% A (4 min), $E_{det}$ = +1.3 V, flow rate 0.7 mL min$^{-1}$, injected volume 20 μL and column Kromasil® Eternity-5-PhenylHexyl 4,6×150 mm.

Table 2. Figures of merits of HPLC-ED determination of HVA and VMA using the above described optimized conditions.

| Analyte | slope (μA s μmol$^{-1}$ L) | intercept (μA s) | correlation coefficient | *LOQ* (μmol L$^{-1}$) | *LOD* (μmol L$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| HVA | 1.094 ± 0.062 | −3.435 ± 0.027 | 0.9958 | 1.31 | 0.39 |
| VMA | 4.007 ± 0.059 | −2.274 ± 0.024 | 0.9979 | 0.65 | 0.20 |

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

Table 3. Content of HVA and VMA in real human urine sample in μmol $L^{-1}$ found by the newly developed HPLC-ED method and the comparative HPLC-UV method, expressed as (average ± standard deviation).

| Analyte | Found by HPLC-ED (μmol $L^{-1}$) | Common value in human urine [25] (μmol $L^{-1}$) | Found by HPLC-UV reference method (μmol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| HVA | 12.09 ± 0.91 | 8.2–41 | 10.38 ± 0.45 |
| VMA | 17.01 ± 1.12 | 11.6–28.7 | 19.71 ± 0.84 |

0.9972 for HVA and 0.9968 for VMA, respectively. Decrease of the slope of VMA dependence is connected with the increase of *LOQ* in urine matrix to 2.9 μmol $L^{-1}$ and 2.6 μmol $L^{-1}$ for HVA and VMA, respectively.

The last step of the new method development was determination of both analytes in the urine sample by standard addition method. Concentrations of both compounds in urine sample were determined by both HPLC-ED and HPLC with spectrophotometric detection (detection wavelength 279 nm). HPLC-UV was used as a comparative method. Obtained results are given in Table 3. Results from electrochemical methods are within normal human values and they are coincident on significance level $\alpha = 0.05$ with the results of comparative method.

## 4 Conclusion

The application of recently introduced coulometric porous detector based on glassy carbon beads for simultaneous determination of HVA and VMA is described. Influence of the basic determination parameters, such as mobile phase composition, detection potential, and flow rate was investigated. We have found that the second expected voltammetric wave of VMA is not observed under these conditions, in contrast to the previous results of both voltammetric and amperometric [20] measurements. This difference might be caused by the uneven potential distribution throughout the electrode material, which manifests as the shift of the second wave out of the potential window and can be also responsible for the relatively high detection potentials [19]. Due to the complex matrix, gradient elution was applied; baseline drift caused by the change of the mobile phase composition is apparent in the response of the detector, but its extent does not markedly influence the determination. The repeatability of the signal is better than 4 % for both tested compounds on the concentration level of 100 μmol $L^{-1}$. Calibration dependences are linear in the range from 100 μmol $L^{-1}$ to quantification limits, with *LOQ* below 3 μmol $L^{-1}$. This concentration range is suitable for the determination of the analytes in urine; expected content of analytes in molar concentration is in the order of tens μmol $L^{-1}$. It can be concluded that the recently developed coulometric detector based on glassy carbon beads is suitable candidate for application in complex matrix in combination with HPLC with gradient program.

The suitability of detector can be also demonstrated on comparison of newly developed method with one previously developed – HPLC-ED with GCPE [20], the same stationary phase and mobile phase with similar gradient program was applied. Glassy carbon microparticles were used for construction of both detectors. Comparable detection limits and dynamic range of calibration curves were obtained. Coulometric detector provides higher signal than GCPE; however, the signal is accompanied with higher baseline drift caused by detector sensitivity for mobile phase changes.

## Acknowledgements

This work was performed under the framework of specific university research (SVV) with the financial support of the Czech Science Foundation (Project P242/15/02815S). JCM, JM and JZ thank to CAPES (project BR 136/2012) for financial support.

## References

[1] G. Eisenhofer, I. J. Kopin, D. S. Goldstein, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 331–349.
[2] M. Matsuo, R. Tasaki, H. Kodama, Y. Hamasaki, *J. Inherited Metab. Dis.* **2005**, *28*, 89–93.
[3] a) S. Barco, I. Gennai, G. Reggiardo, B. Galleni, L. Barbagallo, A. Maffia, E. Viscardi, F. De Leonardis, V. Cecinati, S. Sorrentino, A. Garaventa, M. Conte, G. Cangemi, *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 848-852; b) J. W. M. Lenders, K. Pacak, M. M. Walther, W. M. Linehan, M. Mannelli, P. Friberg, H. R. Keiser, D. S. Goldstein, G. Eisenhofer, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 1427–1434.
[4] J. L. Ater, K. L. Gardner, L. E. Foxhall, B. L. Therrell, W. A. Bleyer, *Cancer* **1998**, *82*, 1593–1602.
[5] Q. Li, C. Batchelor-McAuley, R. G. Compton, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9713–9719.
[6] a) E. H. Labrosse, C. Comnougue, J. M. Zucker, E. Comoy, C. Bohuon, J. Lemerle, O. Schweisguth, *Cancer Res.* **1980**, *40*, 1995–2001; b) M. Monsaingeon, Y. Perel, G. Simonnet, J. B. Corcuff, *Eur. J. Pediatr.* **2003**, *162*, 397–402.
[7] V. Strenger, R. Kerbl, H. J. Dornbusch, R. Ladenstein, P. F. Ambros, I. M. Ambros, C. Urban, *Pediatr. Blood Cancer* **2007**, *48*, 504–509.
[8] a) M. Tuchman, C. L. Morris, M. L. Ramnaraine, L. D. Bowers, and W. Krivit, *Pediatrics* **1985**, *75*, 324–328; b) Mayo Clinic, https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9254, downloaded 8.3.2018.
[9] N. Unceta, E. Rodriguez, Z. G. de Balugera, C. Sampedro, M. A. Goicolea, S. Barrondo, J. Sallés, R. J. Barrio, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *444*, 211–221.

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

[10] a) A. Vaarmann, A. Kask, U. Mäeorg, *J. Chromatogr. B* **2002**, *769*, 145–153; b) S. A. Allen, S. Rednour, S. Shepard, B. B. Pond, *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, e3998.
[11] a) D. F. Davidson, *Ann. Clin. Biochem.* **1989**, *26*, 137–143; b) Y. Zhou, H. Yan, Q. Xie, S. Huang, J. Liu, Z. Li, M. Ma, S. Yao, *Analyst* **2013**, *138*, 7246–7253.
[12] a) L. Zhou, J. D. Glennon, J. H. T. Luong, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6895–6903; b) L. Zhang, J. Yang, Y. Luo, J. Shang, X. Jiang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 41–51.
[13] a) A. García, M. Heinänen, L. M. Jiménez, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* **2000**, *871*, 341–350; b) X. Li, W. Jin, Q. Weng, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *461*, 123–130; c) P. Šenk, L. Kozák, F. Foret, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1447–1456.
[14] G. Fauler, H. Leis, E. Huber, C. Schellauf, R. Kerbl, C. Urban, H. Gleispach, *J. Mass Spectrom.* **1997** *32*, 507–514.
[15] A. Makrlikova, E. Ktena, A. Economou, J. Fischer, T. Navratil, J. Barek, V. Vyskocil, *Electroanalysis* **2017**, *29*, 146–153.
[16] a) R. González, R. Fernández, J. Vidal, A. Frenich, M. Pérez, *J. Neurosci. Methods* **2011** *198*, 187–194; b) P. Manini, R. Andreoli, S. Cavazzini, E. Bergamaschi, A. Mutti, W. M. A. Niessen, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **2000**, *744*, 423–431.
[17] L. Fang, Y. Lv, X. Sheng, S. Yao, *J. Chromatogr. Sci.* **2012**, *50*, 450–456.
[18] a) L. Mercolini, G. Gerra, M. Consorti, L. Somaini, M. A. Raggi, *Talanta* **2009**, *78*, 150–155; b) K. Uchikura, *Anal. Sci.* **1990**, *6*, 351–354.
[19] J. Mika, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, *Electrochim. Acta* **2015**, *154*, 397–403.
[20] H. Dejmkova, H. Adamkova, J. Barek, J. Zima, *Monatsh. Chem.* **2017**, *148*, 511–515.
[21] J. Inczédy, T. Lengyel, A. M. Ure, *Compendium of Analytical Nonmenclature: Definitive Rules 1997*, Blackwell Science **1998**.
[22] M. J. Schervish, *Theory of Statistics*, Springer **1995**.
[23] F. Mack, H. Bonisch, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1979**, *310*, 1–9.
[24] a) Q. Li, C. Batchelor-McAuley, R. G. Compton, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9713–9719; b) S. B. Revin, S. A. John, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 348–352.
[25] J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves, A. Falcão, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *768*, 12–34.

Received: January 19, 2018
Accepted: March 20, 2018
Published online on April 6, 2018

 © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

# 11. Příloha IV

## PRACOVNÍ ELEKTRODA S OBNOVITELNOU NÁPLNÍ, ELEKTRODOVÝ SYSTÉM A AMPEROMETRICKÝ DETEKTOR JI OBSAHUJÍCÍ

**Jan Mika,** Hana Dejmková, Jiří Zima a Jiří Barek

*Úřad průmyslového vlastnictví*

Užitný vzor číslo: 30 183

---

Procentuální účast Mgr. Jana Miky v této práci odpovídá 75 %.

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:
**30 183**
(13) Druh dokumentu: **U1**
(51) Int. Cl.:
***G01N 27/406*** (2006.01)
***G01N 27/417*** (2006.01)
***G01N 27/30*** (2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33015**
(22) Přihlášeno: **04.11.2016**
(47) Zapsáno: **20.12.2016**

(73) Majitel:
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha 2, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jan Mika, Mělník, CZ
RNDr. Hana Dejmková, Ph.D., Roztoky, CZ
prof. RNDr. Jiří Zima, CSc., Praha 4, CZ
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., Praha 9, CZ

(74) Zástupce:
RNDr. Kateřina Hartvichová, INVENTIA s.r.o., Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název užitného vzoru:
**Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, elektrodový systém a amperometrický průtokový detektor ji obsahující**

CZ 30183 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

**Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, elektrodový systém a amperometrický průtokový detektor ji obsahující**

Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká pracovní elektrody s obnovitelnou náplní měděných mikročástic, s výhodou sférických, vhodné pro stanovení organických látek tvořících s mědí komplexní sloučeniny, zejména pro elektrochemickou detekci (ED) aminokyselin ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) a průtokové injekční analýze (FIA).

Dosavadní stav techniky

Vzhledem k důležitosti a častému výskytu aminokyselin je jejich detekce velmi žádaná. Je však komplikována faktem, že většinou nedostatečně absorbují v UV oblasti při běžných vlnových délkách. Aminokyseliny je tedy v mnoha případech nutné předběžně derivatizovat a teprve poté detekovat metodou UV/VIS spektrofotometrií nebo fluorescenční detekcí (W. T. Kok. U. A. T. Brinkman and R. W. Frei, *Journal of Chromatography* 1983, 2, 56, 17-26.). Přímá detekce je možná jen při použití UV detekce s vlnovou délkou 200 nm (I. Molnar and C. Horvath, *Journal of Chromatography* 1977, 142, 623-640) a za použití elektrochemických metod.

Přímá elektrochemická oxidace je však možná jen v případě několika aromatických aminokyselin, například tyrosinu, tryptofanu a jejich derivátů. V případě ostatních aminokyselin je nutné využít pro elektrochemickou detekci elektrody z mědi. S tímto pracovním materiálem se pojí dvě hlavní elektrochemické metody, a to potenciometrie a amperometrie.

Potenciometrie využívá komplexotvorné reakce ve vrstvě oxidů na povrchu elektrody, která vede ke změně potenciálu měděné indikační elektrody (K. Štulík and V. Pacáková, *Electroanalytical measurements in flowing liquids*, Ellis Horwood, 1987). Druhou možností je amperometrické uspořádání, které je citlivější a na rozdíl od potenciometrie netrpí nelinearitou kalibračních závislostí. Amperometrie využívá usnadněného rozpouštění hydratovaných oxidů na povrchu mědi v přítomnosti analytu tvořícího komplexy s ionty mědi, které vede k nárůstu proudové odezvy detektoru. Nevýhodou amperometrické detekce je omezení v oblasti pracovních podmínek. Sledovaná reakce probíhá jen v zásaditých a neutrálních prostředích (W. T. Kok, H. B. Hanekamp, P. Bos and R. W. Frei, Analytica Chimica Acta 1982, 142, 31-45) za použití fosfátových a uhličitanových pufrů. Pro tyto účely není vhodný boritanový pufr, který snižuje rychlost elektrodové reakce. Citlivost stanovení roste se snižující se koncentrací použitého pufru (W. T. Kok, G. Groenendijk, U. A. T. Brinkman and R. W. Frei, *Journal of Chromatography* 1994, 315, 271-278). Zpravidla jsou používány nižší průtokové rychlosti, které poskytují dostatečný čas pro proběhnutí sledované reakce. Dalším významným nedostatkem je pokles signálu při delší práci s měděnou elektrodou způsobený elektrochemickým rozpouštěním mědi a tím i zmenšením jejího pracovního povrchu (K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G. M. Swain, J. Zima and J. Barek, *Chemicke Listy* 2006, 100, 124-132).

Pro elektrochemická měření aminokyselin byla vyvinuta celá řada typů měděných pracovních elektrod. Pro FIA a HPLC měření (W. T. Kok, U. A. T. Brinkman and R. W. Frei, *Journal of Chromatography* 1983, 2, 56, 17-26) byla použita měděná disková elektroda. Další detekční systémy používaly elektrodu na bázi měděného drátu, tubulární (K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart and M. Podolak, *Journal of Chromatography* 1986, 367,3 11-321) a mikrocylindrické měděné pracovní elektrody (K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G. M. Swain, J. Zima and J. Barek, *Chemicke Listy* 2006, 100, 124-132). Jejich společnou nevýhodou jsou problémy související s pasivací pracovní elektrody a s poklesem signálu souvisejícím s rozpouštěním mědi, jejíž povrch lze jen obtížně obnovit. Proto bylo hledáno řešení umožňující snadnou obnovu povrchu pracovní měděné elektrody. Další nevýhodou předešlých řešení je pokles odezvy detektoru v čase, který je způsobený rozpouštěním mědi při elektrochemické reakci. Reaktivace výše uvedených detektorů je velice obtížná a ve většině případů vyžaduje výměnu celého pracovního materiálu (disku, drátu, trubičky či mikrocylindru), což může být časově zdlouhavé.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky stavu techniky odstraňuje předkládaný vynález, týkající se pracovní elektrody s obnovitelnou náplní, umožňující rychlou a jednoduchou obnovu pracovní náplně a tím zamezení pasivace elektrody či poklesu signálu související s rozpouštěním mědi při elektrochemické reakci, což výrazně zvyšuje životnost i kvalitu elektrody a s tím související měření.

Předmětem technického řešení je pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, která obsahuje kapiláru se zavedeným elektrickým kontaktem a mikročásticemi mědi, s výhodou sférickými, které jsou umístěny uvnitř kapiláry, a na konci kapiláry, obsahující mikročástice mědi, je uspořádán filtr, fixovaný u ústí kapiláry prostřednictvím šroubu a koncovky. Filtr slouží k zadržování mikročástic mědi uvnitř kapiláry a současně je propustný pro kapalinu protékající elektrodou. Změnou velikosti mikročástic mědi lze modifikovat rozložení pórů v pracovní elektrodě a hydrodynamický tlak. Velikost mikročástic mědi je v rozmezí od 1 μm do 1000 μm, s výhodou od 5 μm do 100 μm. Nejvýhodnější je velikost mikročástic mědi od 10 do 20 μm, při použití menších částic neúměrně roste tlakový spad na elektrodě, při použití větších částic klesá stupeň konverze.

Ve výhodném provedení je kapilára opatřena obrubou. Materiálem kapiláry je s výhodou teflon, popřípadě jiný teplotně tvarovatelný polymer nerozpustný v používaných rozpouštědlech. Na kapiláru může být případně nasazena podložka, která zajišťuje vhodné dotvarování zploštěné části kapiláry, bez něhož by šroub přitiskával jen okraje zploštěné části kapiláry a ne celou plochu. Podložka obsahuje otvor pro provlečení kapiláry podložkou a je s výhodou vyrobena z kovu.

Materiálem filtru je s výhodou filtrační papír, který je dostatečně odolný vůči organickým složkám mobilních fází, je snadno dostupný a odolný i vůči tlaku, který je generován na měděných mikročásticích pracovní elektrody.

V jednom provedení je elektrickým kontaktem platinový, nerezový nebo měděný drát a/nebo trubička vložená do kapiláry. S výhodou je elektrickým kontaktem platinová trubička zavedená dovnitř kapiláry, spojená s platinovým drátkem, protože tvoří lepší kontakt s náplní elektrody, tvořenou mikročásticemi mědi, než samotný platinový, nerezový nebo měděný drát.

Předmětem předkládaného technického řešení je dále elektrodový systém, který obsahuje pracovní elektrodu podle předkládaného technického řešení, referentní elektrodu a pomocnou elektrodu. Ve výhodném provedení je referentní elektroda vybraná ze skupiny zahrnující kalomelovou, merkurosulfátovou či argentchloridovou elektrodu a pomocná elektroda vybraná ze skupiny zahrnující platinovou či uhlíkovou elektrodu nebo elektrodu z nerez oceli.

Předmětem předkládaného technického řešení je rovněž amperometrický průtokový detektor, který obsahuje elektrodový systém podle předkládaného technického řešení a přepadovou měrnou celu, uvnitř které jsou všechny tři elektrody umístěny. Ve výhodném provedení jsou všechny tři elektrody umístěny ve společném stojánku.

Pracovní elektroda předkládaného technického řešení umožňuje snadné plnění a výměnu náplně, tedy sférických mikročástic mědi, které může být dosaženo obrácením toku nebo odstraněním filtru. K urychlení plnění pracovní elektrody lze použít i vzduchové bubliny zaváděné do toku nosného roztoku. Detektor je s výhodou plněn suspenzí složenou ze sférických měděných mikročástic a nosné kapaliny, suspenze je do detektoru zaváděna tokem nosné kapaliny přes dávkovací cívku ventilu. Před naplněním je potřeba povrch měděných částic aktivovat.

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje schéma průtokového detektoru s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi podle Příkladu 1.

Obr. 2 ukazuje hydrodynamický voltamogram - měření závislosti odezvy detektoru s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi podle Příkladu 1 na potenciálu pracovní elektrody při HPLC-ED alaninu ($c = 6.10^{-4}$ $mol.l^{-1}$). Podmínky měření: mobilní fáze složená z fosfátového pufru o pH 6,8 a methanolu (90/10, v/v), objem dávkovací cívky 20 μl a průtoková rychlost mobilní fáze 0,6 $ml.min^{-1}$.

Obr. 3 ukazuje HPLC-ED záznamy s použitím detektoru s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi podle Příkladu 1 pořízené při měření kalibrační závislosti alaninu. Prezentovány jsou jen HPLC-ED záznamy kalibračních roztoků v rozmezí od $1.10^{-4}$ do $1.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$, jmenovitě $1.10^{-4}$ mol.l$^{-1}$ (1), $8.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (2), $6.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (3), $4.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (4), $2.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (5) a $1.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (6) (A) a závislost výšky píků na koncentraci alaninu v celém naměřeném rozmezí kalibrační přímky, tedy od $1.10^{-3}$ do $1.10^{-5}$ mol.l$^{-1}$ (B). Podmínky měření: mobilní fáze složená z fosfátového pufru o pH 6,8 a methanolu (90/10, v/v), objem dávkovací cívky 20 µl, průtoková rychlost mobilní fáze 0,6 ml.min$^{-1}$ a detekční potenciál +0,2 V.

Příklady uskutečnění technického řešení

Technické řešení je dále osvětleno s použitím následujících obrázků a příkladů, které však nijak neomezují rozsah ochrany.

Příklad 1: *Elektrodový systém s pracovní elektrodou s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi*

Elektrodový systém s pracovní elektrodou s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi je znázorněn na Obr. 1.

Základem elektrodového systému s pracovní elektrodou s náplní sférických mikročástic mědi je teflonová kapilára 1 s vnitřním průměrem 0,5 mm. Kapilára 1 je ukončena obrubou (je tedy teplotně roztažena a zploštěna a opatřena kovovou podložkou 5, která zajišťuje vhodné dotvarování zploštělé části kapiláry). Kapilára 1 je v blízkosti obruby přerušena a je do ní zavedena platinová trubička 8 o délce 25 mm, vnějším průměru 0,6 mm a vnitřním průměru 0,5 mm. Mezi oběma částmi kapiláry je k trubičce připojen platinový drátek, který je od vnějšího prostředí oddělen izolační vrstvou 9, tvořenou polystyrénem 12 naneseným odpařením jeho roztoku v dichloromethanu, a dvěma vrstvami smršťovací bužírky 13 a 14. Odizolovaná kapilára 1 s kontaktem 2 je opatřena šroubem 3, který společně s koncovkou 4 šroubu slouží k zafixování filtru 6 u ústí kapiláry 1. Pracovní materiál elektrody je plněn dovnitř kapiláry a sestává ze sférických mikročástic mědi o velikosti okolo 20 µm. Pracovní elektroda je plněna tak, aby zpětný tlak detektoru dosahoval hodnoty 2 MPa, což je dosaženo výškou náplně sférických mikročástic mědi uvnitř pracovní kapiláry okolo 4 mm.

Elektrodový systém [pracovní elektroda společně s referentní elektrodou 10 (s výhodou kalomelovou, argentchloridovou či merkurosulfátovou) a pomocnou elektrodou 11 (s výhodou platinovou, uhlíkovou či z nerez oceli)] je umístěn v roztoku mobilní fáze 15 v přepadové skleněné nádobce (na Obr. 1 nezobrazena) - všechny elektrody jsou umístěny ve stabilním stojánku (na Obr. 1 nezobrazen).

Při vnášení náplně 7 do pracovní elektrody je pracovní elektroda připojena na pumpu s dvěma dávkovacími ventily. Pumpa generuje tok nosného roztoku (s výhodou methanolu) o průtokové rychlosti 1 ml.min$^{-1}$. První ventil slouží k zavedení dvou vzduchových bublin o objemu 100 µl do toku nosného roztoku, čímž je dosaženo zkrácení doby plnění detektoru. Druhý ventil s externí 500 µl výměnou smyčkou je naplněn suspenzí připravenou a aktivovanou následujícím způsobem: 0,9 g sférických mikročástic mědi se rozmíchá v 3,5 ml 0,08 M roztoku kyseliny dusičné a nechá reagovat 45 s; po uplynutí této doby je reakce přerušena přidáním 5,5 ml vody. (Dávkuje se tedy 500 µl této suspenze pomocí ventilu s externí 500 µl výměnou smyčkou).

Příklad 2: *Stanovení alaninu pomocí amperometrického průtokového detektoru s pracovní elektrodou s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi.*

Amperometrický průtokový detektor s pracovní elektrodou s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi podle Příkladu 1 byl použit ke stanovení alaninu metodou HPLC. Složení mobilní fáze a elektrochemický proces aktivace mědi byl převzat z literatury (K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart and M. Podolak, *Journal of Chromatography* 1986, 367, 311-321) a po celou dobu práce bylo používáno následující složení mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol.l$^{-1}$ $NaH_2PO_4$, pH upraveno 0,025 mol.l$^{-1}$ NaOH na hodnotu 6,8) s methanolem (90/10, v/v). Za těchto podmínek byly optimalizovány další parametry elektrochemické detekce, jmenovitě průtoková rychlost

a vkládaný potenciál. Pro všechna optimalizační měření byl použit roztok alaninu o koncentraci $6.10^{-4}$ mol.l$^{-1}$ připravený naředěním zásobního roztoku (c = $1.10^{-3}$ mol.l$^{-1}$ v 0,1 mol.l$^{-1}$ HCl) mobilní fází. Detekční potenciál byl testován z rozmezí -0,2 V až +0,4 V proti argentchloridové referentní elektrodě s použitím platinové plíškové elektrody jako pomocné. Za optimální byl zvolen potenciál +0,2 V, kde byla maximální odezva detektoru. Optimální hodnota průtokové rychlosti byla zvolena 0,6 ml.min$^{-1}$, z testovaného intervalu 0,3 až 1,0 ml.min$^{-1}$. Hodnota ploch i výšek píků byla v celém měřeném intervalu obdobná. Průtoková rychlost 0,6 ml.min$^{-1}$ byla tedy zvolena zejména s ohledem na dobu trvání jednotlivé analýzy a pracovní tlak v detektoru.

Za získaných optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost a určen dynamický lineární rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti, které byly počítány jako troj-, respektive desetinásobek směrodatné odchylky stanovení nejnižší sledované koncentrace. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1.

Na Obr. 2 je zobrazena závislost odezvy pracovní elektrody s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi na detekčním potenciálu při HPLC-ED alaninu (c = $6.10^{-4}$ mol.l$^{-1}$).

Obr. 3 ukazuje HPLC-ED záznamy s použitím elektrody s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi pořízené při měření kalibrační závislosti alaninu.

Tabulka 1. Vybrané parametry stanovení alaninu pomocí HPLC-ED s amperometrickým průtokovým detektorem s pracovní elektrodou s obnovitelnou náplní sférických mikročástic mědi

| | |
|---|---|
| Mez detekce (mol·l$^{-1}$) | $4{,}05 \cdot 10^{-6}$ |
| Mez stanovitelnosti (mol·l$^{-1}$) | $1{,}35 \cdot 10^{-5}$ |
| Korelační koeficient | 0,998 |

Příklad 3: *Postup aktivace povrchu měděných mikročástic*

0,9 g sférických mikročástic mědi se rozmíchá v 3,5 ml 0,08 M roztoku kyseliny dusičné a nechá reagovat 45 s; po uplynutí této doby je reakce přerušena přidáním 5,5 ml vody. Aktivovaná směs je stabilní minimálně po dobu 24 hodin. Výsledná suspenze, vhodná pro plnění detektoru má tedy složení 10 mg mědi na 1 ml vodného roztoku zředěné kyseliny dusičné. Takto připravenou suspenzi lze s výhodou plnit do detektoru pomocí dávkovací cívky o objemu 500 µl, ze které je do pracovní elektrody vymývána vhodným nosným roztokem. Jako nosný roztok pro toto plnění lze s výhodou použít methanol o průtokové rychlosti 1 ml.min$^{-1}$. Plnění lze dále zrychlit zavedením dvou vzduchových bublin o objemu 100 µl do toku methanolu. Toho lze dosáhnou předřazením druhého dávkovacího ventilu do systému těsně před ventil sloužící k plnění suspenze sférických mikročástic mědi.

Průmyslová využitelnost

Elektrochemickou detekci pomocí amperometrického průtokového detektoru s náplní sférických mikročástic mědi lze využít pro stanovení organických látek, které jsou schopné vytvářet komplexní sloučeniny s mědí, zejména pak aminokyselin, průtokovými metodami, zejména HPLC a FIA.

## NÁROKY NA OCHRANU

**1.** Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, **vyznačená tím**, že obsahuje kapiláru (1) se zavedeným elektrickým kontaktem (2) a s mikročásticemi (7) mědi, s výhodou sférickými, které jsou umístěny uvnitř kapiláry (1), a na konci kapiláry (1), obsahující mikročástice (7) mědi, je uspořádán filtr (6), fixovaný u ústí kapiláry (1) prostřednictvím šroubu (3) a koncovky (4).

**2.** Pracovní elektroda podle nároku 1, **vyznačená tím**, že kapilára (1) je opatřena obrubou.

**3.** Pracovní elektroda podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím**, že materiálem filtru (6) je filtrační papír.

**4.** Pracovní elektroda podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačená tím**, že elektrickým kontaktem (2) je platinový, nerezový nebo měděný drát a/nebo trubička, vložené do kapiláry.

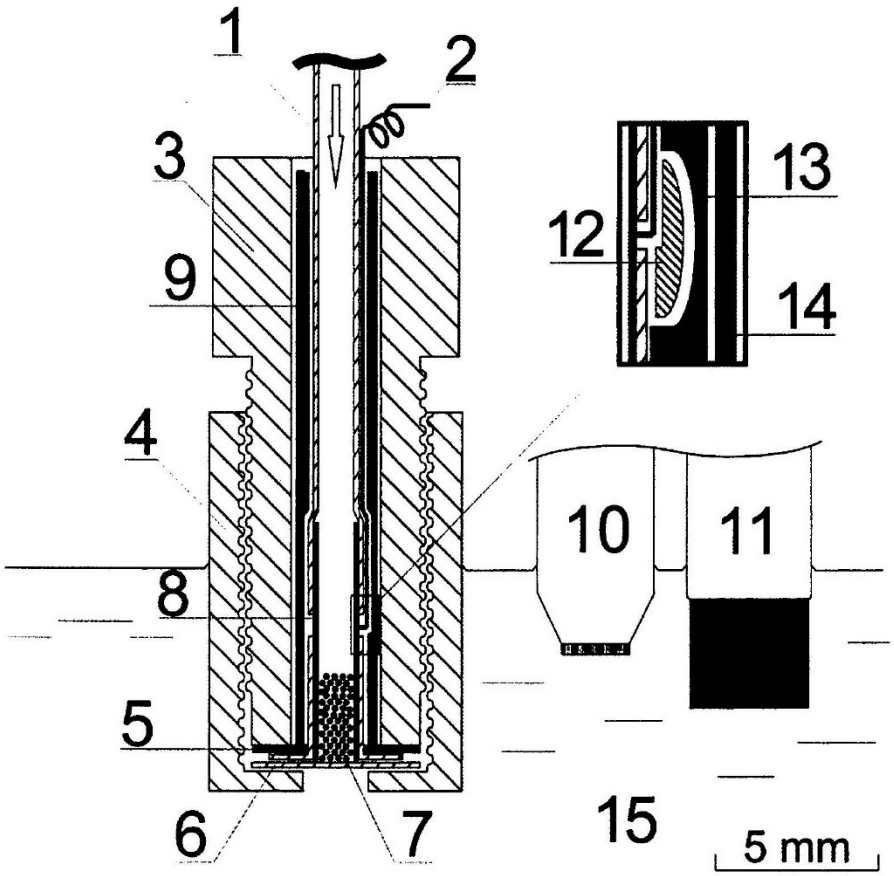
**5.** Elektrodový systém, **vyznačený tím**, že obsahuje pracovní elektrodu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, referentní elektrodu (10) a pomocnou elektrodu (11).

**6.** Elektrodový systém podle nároku 5, **vyznačený tím**, že referentní elektroda (10) je vybraná ze skupiny zahrnující kalomelovou, merkurosulfátovou a argentchloridovou elektrodu.

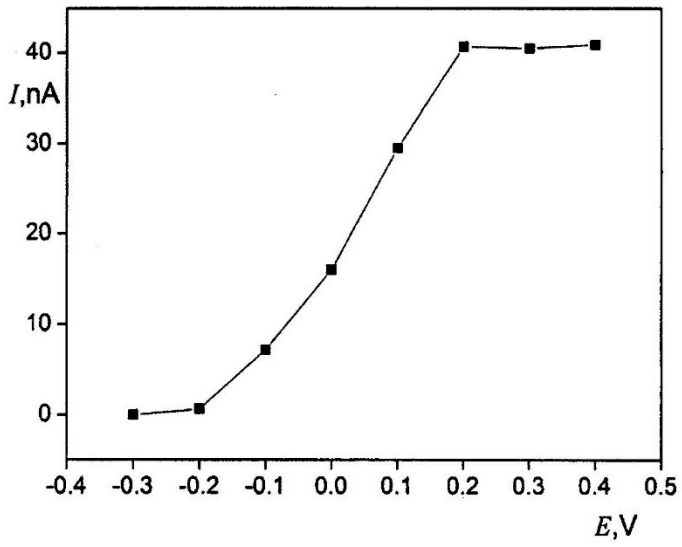
**7.** Elektrodový systém podle nároku 5 nebo 6, **vyznačený tím**, že pomocná elektroda (11) je vybraná ze skupiny zahrnující platinovou, nerezovou a uhlíkovou elektrodu.

**8.** Amperometrický průtokový detektor, **vyznačený tím**, že obsahuje elektrodový systém podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7 a přepadovou měrnou celu, uvnitř které jsou všechny tři elektrody umístěny.

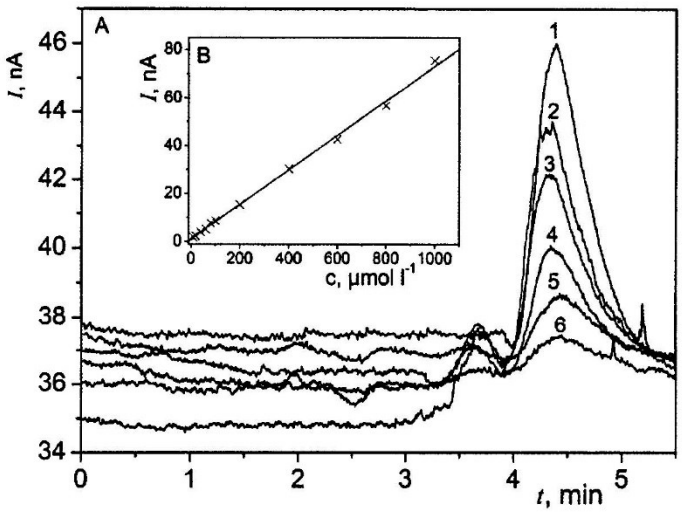
2 výkresy




Obr. 1




Obr. 2




Obr. 3

Konec dokumentu

# 12. Příloha V

## COMPARISON OF GLASSY CARBON AND COPPER MICROPARTICLES AS A ELECTRODE MATERIAL FOR AMPEROMETRIC DETERMINATION OF AMINO ACIDS USING FLOW THROUGH DETECTOR

**Jan Mika**, Jiří Barek, Jiří Zima, Edita Prokešová a Hana Dejmková

*Electroanalysis*

Volume 31, Pages 357 – 362, Year 2019

---

Procentuální účast Mgr. Jana Miky v této práci odpovídá 55 %.

**Full Paper** Wiley Online Library ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201800650

# Comparison of Glassy Carbon and Copper Microparticles as a Renewable Working Electrode Material for Amperometric Determination of Amino Acids Using Flow Through Detector

Jan Mika,[a] Jiří Barek,[a] Jiří Zima,[a] Edita Prokešová,[a] and Hana Dejmkova*[a]

**Abstract:** Flow-through detector with renewable working material based on glassy carbon or copper microparticles was used for flow injection determination of tyrosine by direct oxidation and phenylalanine via the complexation reaction with copper ions, respectively. Copper-based detector allows the determination of electrochemically inactive amino acid, but the detection conditions are limited and fabrication and handling of the detector are more demanding. Low working potential, applied for the detection on copper microparticles, makes the determination very selective. Moreover, low baseline noise compensates lower sensitivity of copper-based detector, enabling to reach quantification limit $4.7\times10^{-6}$ mol L$^{-1}$, in comparison with quantification limit $1.6\times10^{-6}$ mol L$^{-1}$ obtained for tyrosine on carbon-based detector.

**Keywords:** Flow injection analysis · copper microparticles · glassy carbon microparticles · renewable electrode material

## 1 Introduction

Primary amino acids are organic compounds containing amino and carboxy functional groups. About 500 amino acids have been described [1]; 25 of them are part of simple proteins and form the basis of more complicated proteins – they are called proteinogenic amino acids. They also participate in many other processes, such as neurotransmitters transport [2–4].

Due to their importance, there is high demand for reliable methods of their detection. Physico-chemical properties of most amino acids limit the range of common detection techniques to UV detection in the range from 200 to 210 nm [5,6] or MS detection [7]. Direct electrochemical detection can be applied only to amino acids containing electrochemically active moieties (e.g. –SH or phenolic group) in their structure or after derivatization. However, electrodes based on copper can be used for general detection of amino acids without this requirement. This technique is based on dissolution of hydrated oxides on copper surface connected with the formation of amino acids complexes with copper ions, resulting in increasing detector response [8,9]. This procedure requires the restriction of working conditions. Reaction can be performed only in neutral or alkaline solution (pH range 6–11) [10,11] using phosphonate or carbonate buffers. Borate buffers are not suitable due to their negative influence on electrode reaction rate. It has been shown that the sensitivity increases with increasing pH and decreasing ionic strength [10,12]. Flow rates under 1 mL min$^{-1}$ are usually applied [11] and available pH range for the detection in HPLC can be further influenced by the stability of chromatographic column. Reaction details depend on the conditions; more detailed description of this topic can be found particularly in [10].

Arrangement of copper electrodes can vary. Copper disc electrode (proline determination) [13], tubular copper electrode (20 amino acids determined including phenylalanine) [11] and microcylindric copper electrode (determination of valine, tryptophan and phenylalanine) [14] were described. Common problem of all mentioned electrochemical methods is decrease of signal caused by working electrode passivation or dissolution. This problem could be eliminated by using an electrode with renewable working material [15,16]. This detector, originally filled with glassy carbon microbeads, was developed for determination of compounds causing strong passivation of a working electrode. Working material is injected in the form of suspension into the capillary, where it forms a porous working electrode. Displacement of the filter at the end of capillary is used to flush off spent microbeads when needed and it is followed by injection of the new, intact, and fresh electrode material. Main advantages of this type of renewable porous electrode are easy construction, possibility of simple working material renewal and good electrochemical properties [15,17]. In this paper, replacement of glassy carbon by copper as the working material is tested. For the comparison, two structurally

[a] J. Mika, J. Barek, J. Zima, E. Prokešová, H. Dejmkova
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic
E-mail: dejmkova@natur.cuni.cz

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

similar essential aromatic amino acids, tyrosine and phenylalanine, were studied. Tyrosine in contrast with phenylalanine has a phenolic group in para position (Figure 1) [2]. Due to its presence, tyrosine absorbs ultraviolet radiation and it is electrochemically oxidizable. In this work, glassy carbon microparticles were used for its determination. During the electrochemical oxidation, tyrosine exchanges one electron and one proton [18]. Methods for tyrosine determination based on oxidation on platinum electrode [19–23], glassy carbon electrode, boron-doped diamond electrode [24], and carbon paste electrode [25] were described. For phenylalanine determination, complexation reaction with copper ions was utilized, with copper microparticles serving as the working electrode material. The aim of this work is to compare these two working electrode materials for electrochemical detection of amino acids.

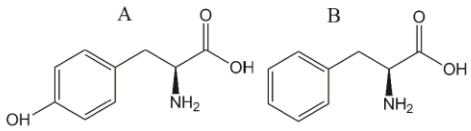



Fig. 1. Chemical structure of tyrosine (A) and phenylalanine (B)

## 2 Material and Methods

### 2.1 Reagents

Stock solutions of tyrosine ($1\times10^{-3}$ mol L$^{-1}$; Figure 1 A) and phenylalanine ($1\times10^{-2}$ mol L$^{-1}$; Figure 1B;) were prepared by dissolving solid amino acids (both 98%, Alfa Aesar, Germany) in 0.01 mol L$^{-1}$ hydrochloric acid (p.a.,Lach-Ner, Czech Republic). Solutions of lower concentration were prepared daily by mixing with carrier solution. All stock solutions were stored in dark at temperature 10 °C.

The Britton-Robinson (B-R) buffer used as carrier for tyrosine determination was prepared by mixing 0.20 M sodium hydroxide with acidic solution consisting of 0.040 M boric acid, 0.040 M phosphoric acid, and 0.040 M acetic acid. Phosphate buffer used as carrier for phenylalanine determination consisted of 0.025 M sodium hydroxide and 0.025 M monosodium phosphate. All compounds used for the buffer preparation were of p.a. purity and obtained from Lach-Ner, Czech Republic.

Millipore system Symplica UV (Millipore, USA) was used for the preparation of deionized water for all aqueous solutions. Experiments were performed at room temperature.

### 2.2 Apparatus

System for flow injection analysis (FIA) consisted of HPLC pump HPP 5001, amperometric detector ADLC 2 (both Laboratorní přístroje Praha, Czech Republic) and 6-port injection valve (Rheodyne, USA).

HPLC pump HPP 4001 (Laboratorní přístroje Praha, Czech Republic) with 6-port injection valve (Rheodyne, USA) was used for detector filling; in this case, capillaries of inner diameter 0.75 mm were used to connect the injection valve and detector in order to facilitate the suspension injection. In the case of phenylalanine determination, 6-port injection valve (Rheodyne, USA) was added to the filling system for air bubbles introduction.

Flanging of capillaries for the detector preparation was done by Cheminert flanging tool 220 Vac (VICI Valco Instruments, USA).

pH of buffers was measured with pH-meter 3510 (Jenway, UK) with combined glass electrode.

Scanning electron microscope JEOL 6380 LV (Jeol, Japan) was applied for microscopic imaging of microparticles. SEM images were obtained under following microscope setting: Acc.voltage 23 kV, spot size 32.

### 2.3 Electrochemical Detector Construction

In this work, two similar flow-through detector constructions were applied for amino acids determination. Detector based on glassy carbon working material for tyrosine determination was described in detail in our previous paper [15]. Basically, it is made of Teflon capillary (inner diameter 0.5 mm) with electrical contact (platinum wire) introduced through the capillary wall. The capillary is filled with the working material, which is held in place by the filter at the end of the capillary; nitromethane (POCH, Gliwice, Poland) suspension of glassy carbon spherical microparticles of diameter 10–20 μm (Alfa Aesar, Germany) was injected. This setting, immersed in the overflow vessel, serves as a working electrode in 3-electrode arrangement together with platinum sheet auxiliary electrode (area 72 mm$^2$) and Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode (both Monokrystaly Turnov, Czech Republic).

Detector based on copper microparticles construction differs by the introduction of electrical contact. Platinum wire was replaced by the platinum tube (30 mm length, 0.5 mm inner diameter, 0.6 mm outer diameter, 0.05 mm wall thickness). Activation procedure was as follows: platinum tube was filled by 0.1 M sulfuric acid solution and potential program was applied, consisting of switching potential 10 times between values −0.6 V and +1.7 V; each value was kept for 10 s. When not in use, the detector was stored filled with methanol. Commercially available copper microparticles of diameter 10–20 μm (Alfa Aesar, Germany), used as the working material, were activated by nitric acid solution in order to remove the thick insulating layer of oxides on their surface. 60 mg of the microbeads were treated with 3 mL of $2\times10^{-4}$ M nitric acid (p.a., Lach-Ner, Czech Republic) for 45 seconds; during that time, the color of the suspended particles changed from dark brown to reddish brown of metalic copper. Afterwards, the reaction was stopped by addition of water to a total volume 9 mL. For the introduction to the detector, methanol with flow rate 2 mL min$^{-1}$ was

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

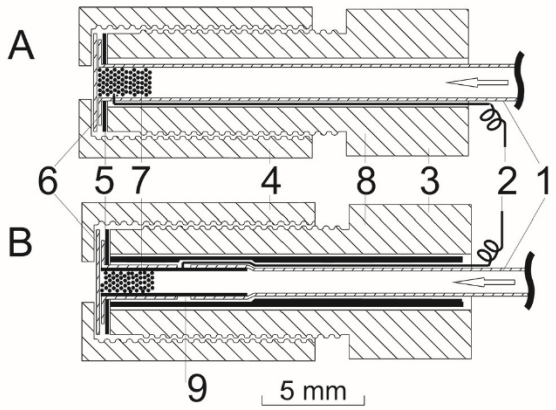



Fig. 2. The schematic representation of the original (A) and modified (B) version of the flow-through detector; Teflon capillary (diameter 0.5 mm) (1), the platinum wire (2), screw (3), cap (4), iron ring (5), filtration paper (6), working material (7), isolating layer (8) and platinum tube(9).

used. Schemes of the original and modified working detector are shown in Figure 2.

### 2.4 Procedures

For phenylalanine determination, multidimensional statistical method was applied [26–28]. According to the number of monitored parameters and selected levels, face centered composite design (FCCD, two-level test for three monitored parameters) was chosen. Experimental plan was prepared using software Minitab 16. Results were statistically processed using analysis of variance (ANOVA).

Baseline noise was computed from the blank chromatograms in the time range of one minute. Concentration dependences were evaluated by the least squares linear regression method. Limits of quantitation were calculated as ten times the standard derivation ($\alpha = 0.05$), calculated from ten repeated measurements of the lowest concentration of the determined analyte, divided by the slope of calibration dependence [29]. All the measurements were made in triplicate, unless stated otherwise.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Comparison of Electrochemical Detectors Construction

Copper and carbon microparticles (Figure 3) differ by many parameters – the main ones that influence their application as the detector working material are their chemical stability and density.

Oxide layer formed on the surface of copper is non-conductive. Its removal from the microparticles by nitric acid (procedure described in Section 2.3) is necessary to ensure the electrical contact between particles; on the other hand, it limits the stability of the microparticle suspension to one week, in comparison with long-term stable suspension of carbon microparticles. The same effect is probably the cause of passivation of the platinum contact. Platinum wire introduced through the capillary wall is sufficient for carbon-based detector, but in case of copper filling, inactivity of the contact was observed after few days of measurement, in spite of the attempts of electrochemical cleaning. Increasing the contact surface by the introduction of platinum tube in combination with electrochemical cleaning, as described in Section 2.3, increased the lifetime of the detector to at least one month.

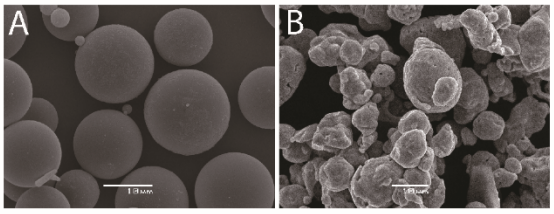



Fig. 3. The SEM pictures of carbon microbeads (A) and copper microparticles (B)

Carbon density is comparable with the density of some solvents. As a result, sedimentation of carbon suspension is slow and allows the filling by the defined volume of suspension. Some sedimentation is observed during the transport from injector to detector. In this phase, the process can be speeded up by introduction of air bubbles. This procedure results in the carbon column of height $4.0 \pm 0.6$ mm. High density of copper causes fast sedimentation of the suspension both prior and during the injection. For that reason, we have doubled the volume of the injected suspension and we have stopped the filling after reaching 2 MPa backpressure in the detector. The height of the resulting column of copper microparticles was $4.5 \pm 0.2$ mm. Surface of the electrodes can be estimated to approximately 4 $cm^2$.

### 3.2 Optimization Procedures

#### *3.2.1 Optimization of Tyrosine Determination*

To find optimal condition of tyrosine determination, multidimensional statistical method was applied (see chapter 2.4. Procedures) and following optimizing parameters were investigated: flow rate, pH of carrier solution, detection potential, and injection volume. Following optimal conditions were obtained: flow rate 0.6 mL $min^{-1}$, injection volume 50 µL, and pH of B-R buffer 4.5.

Further optimization was performed for detection potential, because particularly for this crucial parameter, wave shape of the current-potential dependence is difficult to describe by the polynomial equations used by the evaluation software. Hydrodynamic voltammogram was measured in the range from +0.5 V to +1.6 V

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

(Figure 4 A). It was observed that peak height increased significantly from +0.9 V until the potential +1.3 V, whereas background current changed in the range from +0.5 to +1.3 V only slightly. From the potential +1.3 V, background current increased rapidly. Therefore, potential +1.3 V was selected as optimal.

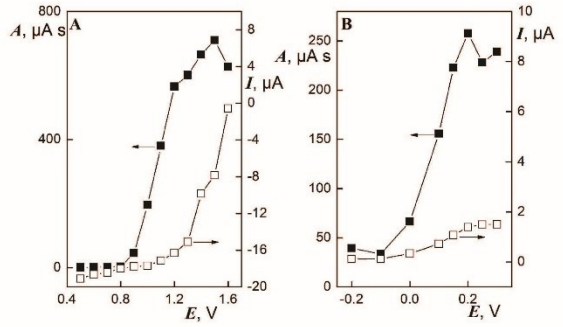



Fig. 4. Hydrodynamic voltammograms of tyrosine ($1\times10^{-4}$ mol L$^{-1}$; A) and phenylalanine ($1\times10^{-3}$ mol L$^{-1}$; B) determined from peak area (■) with background current (□). Tyrosine determination: glassy carbon microbeads, carrier solution B-R buffer pH 4.5, flow rate 0.6 mL min$^{-1}$, injection volume 50 μL; phenylalanine determination: copper microbeads, carrier solution phosphate buffer (0.025 mol L$^{-1}$) pH 6.8, flow rate 0.6 mL min$^{-1}$, injection volume 50 μL.

*3.2.2 Optimization of Phenylalanine Determination*

In the case of phenylalanine determination using copper microbeads, optimal conditions are mostly known from the literature [9,11,13]. For amino acids determination, carrier solution consisting of phosphate buffer pH 6.8 is commonly used (see Introduction). Flow rate 0.6 mL min$^{-1}$ and injection volume 50 μL were set to the same values as for tyrosine determination. Under these conditions, optimal value of detection potential was determined from hydrodynamic voltammogram of phenylalanine (Figure 4B) measured in the range from −0.2 V to +0.3 V. The optimal value of the detection potential was set on +0.2 V. At this value, peak height of phenylalanine was at maximum; background current was stable in the whole tested range. To sum up, optimal conditions of amino acids determination on copper microparticles were set as follows: flow rate 0.6 mL min$^{-1}$, injection volume 50 μL, detection potential +0.2 V and pH of phosphate buffer 6.8.

### 3.3 Detector Signal Repeatability and Stability

Construction of the refillable coulometric detector is designed to deal with the passivation of the electrode surface. Tyrosine, as well as many phenolic compounds, also causes the passivation due to the deposition of reaction products on the carbon microbeads surface. After 10 injection of tyrosine ($c=1\times10^{-4}$ mol L$^{-1}$), peak area dropped by 23.3 %. Detector signal was stable during first three injections with peak area relative standard deviation (RSD) 6.0 %. Repeatability of the detector filling was tested by five repeated fillings, with three injections of the sample measured for each filling. Obtained repeatability of tyrosine peak area expressed as RSD was 5.0 %, which is similar to previously reported results with carbon microparticles.

In the case of copper microbeads based electrodes, complexing reaction causes working electrode dissolution, which is also connected with the decrease of the electrode signal. While the first three injections of phenylalanine solution ($c=1\times10^{-3}$ mol L$^{-1}$) provided stable signal with peak area RSD 6.8 %, peak area dropped after ten injections by 44.6 %. This behavior is similar to that of tyrosine determination on carbon filling. Renewal of the working material (again five repeated fillings, with three injections of the sample for each filling) showed that the repeatability of peak area expressed as RSD was 2.9 %. Twice better repeatability was obtained when filling copper microbeads working material in comparison with carbon microparticles, probably due to different filling procedure controlled by working pressure instead of volume of filling suspension.

### 3.4 Calibration Dependences

Linear dynamic range and quantitation limits were determined for both studied amino acids from their concentration dependences, which were evaluated both from peak area and peak height. Representative FIA records of tyrosine and phenylalanine and their corresponding calibration dependences are shown in Figure 5 and 6, respectively. All parameters are summarized in Table 1.

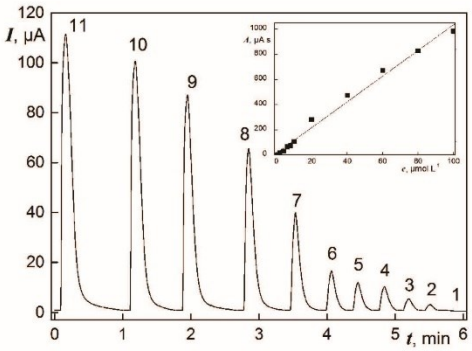



Fig. 5. FIA-ED recordings of tyrosine standards 100 (11), 80 (10), 60 (9), 40 (8), 20 (7), 10 (6), 8 (5), 6 (4), 4 (3), 2 (1) μmol L$^{-1}$ and carrier solution (1); inset: corresponding concentration dependence. Carrier solution B-R buffer pH 4.5, flow rate 0.6 ml min$^{-1}$, injection volume 50 μl, and detection potential +1.3 V.

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

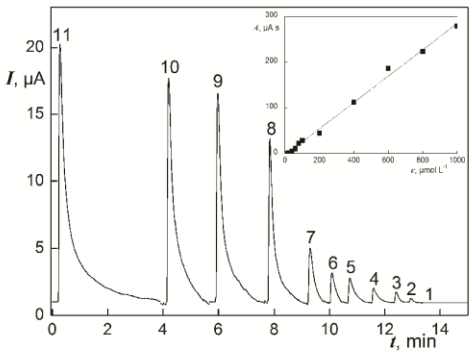



Fig. 6. FIA-ED recordings of phenylalanine standards 1000 (11), 800 (10), 600 (9), 400 (8), 200 (7), 100 (6), 80 (5), 60 (4), 40 (3), 20 (1) μmol $L^{-1}$ and carrier solution (1); inset: corresponding concentration dependence. Carrier solution phosphate buffer pH 6.8, flow rate 0.6 ml $min^{-1}$, injection volume 50 μl, and detection potential +0.2 V.

In the case of tyrosine, concentration dependence was measured in the range from $1\times10^{-4}$ to $2\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$. When evaluated from peak area, concentration dependence was linear in whole examined range, i.e. down to quantitation limit $1.6\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$. In the case of peak height, linearity was proven for lower concentrations from $6\times10^{-5}$ to $2\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$. With higher concentrations of tyrosine the height of peak remains almost constant. Such results were already observed in previous studies and it is assumed that constant peak height is caused by peak deformation due to electrode potential gradient within the tube and related reaction inconsistency at higher concentrations. Peak area and degree of conversion are not influenced [14].

Phenylalanine concentration dependence was measured in the range from $1\times10^{-3}$ to $2\times10^{-5}$ mol $L^{-1}$, with obtained quantitation limit $4.7\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$. Similarly to tyrosine, calibration dependence evaluated from peak heights was linear only for lower concentrations from $6\times10^{-5}$ mol $L^{-1}$ to $2\times10^{-5}$ mol $L^{-1}$, whereas calibration dependence evaluated from peak area was linear in whole tested range.

Detection limit for the copper based detector is higher than that for carbon based detector. It can be explained by lower sensitivity of the indirect detection based on copper dissolution. On the other hand, lower sensitivity is partly compensated by lower baseline noise (3.16±0.70 nA for phenylalanine compared to 15.50±3.87 nA for tyrosine). Correlation coefficients obtained for both detection techniques are similar.

Both working materials differ not just in sensitivity (peak height and area), but phenylalanine peaks are also significantly wider. Peak tailing, observed in the case of copper working material, is probably caused by lower speed of complexing reaction.

## 4 Conclusion

In this paper, two working electrode materials (glassy carbon and copper microbeads) were used for the determination of structurally similar amino acids using flow-through detector with renewable working material. The original construction of the detector and the filling procedure, which were developed for the glassy carbon working material, were slightly modified for the application of copper microparticles. Due to the high density and irregular particle surface of copper, handling of copper-based detector is more difficult and time consuming. On the other hand, modified method of the detector filling is more reproducible with RSD of five repeated fillings 2.9% (RSD for the original procedure is 5.0%).

Determination conditions of copper based electrode are limited by the needs of complexing reaction. Low applied potential suggests higher selectivity of the copper based detector, which can be advantage for determination of samples with complex matrix, and it causes low baseline noise. On the other hand, it has significantly lower sensitivity in comparison with direct electrochemical reaction on carbon based detector. Therefore, the difference in quantitation limits $1.6\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$ for tyrosine on carbon-based detector and $4.7\times10^{-6}$ mol $L^{-1}$ for phenylalanine on copper-based detector is small. Moreover, these values are sufficient for the most applications.

## Acknowledgement

This research was financially supported by the Czech Science Foundation (project GACR 17-03868 S) and performed within the framework of specific university research (SVV).

Table 1. Figures of merits for FIA determination of tyrosine using carbon microbeads and of phenylalanine using copper microbeads.

| Evaluated from | Amino acid | Linear dynamic range (mol $L^{-1}$) | Slope (μA s mol$^{-1}$) | Intercept (μA s) | Correlation coefficient | LOQ (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Peak area | Tyrosine | $1\times10^{-4}$–$2\times10^{-6}$ | $1.07\times10^{-5}$ | 5.37 | 0.995 | $1.6\times10^{-6}$ |
| | Phenylalanine | $1\times10^{-3}$–$2\times10^{-5}$ | $2.99\times10^{-7}$ (μA mol$^{-1}$) | −3.51 (μA) | 0.985 | $4.7\times10^{-6}$ |
| Peak height | Tyrosine | $6\times10^{-5}$–$2\times10^{-6}$ | $1.34\times10^{-6}$ | 1.16 | 0.992 | $1.7\times10^{-6}$ |
| | Phenylalanine | $6\times10^{-4}$–$2\times10^{-5}$ | $2.50\times10^{-8}$ | −0.19 | 0.986 | $3.9\times10^{-6}$ |

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

## References


[1] I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, *22*, 816.
[2] D. R. Ferrier, *Biochemistry*, Wolters Kluwer Health, **2013**.
[3] H. D. Jakubke, N. Sewald, *Peptides from A to Z: A Concise Encyclopedia*, Wiley, **2008**.
[4] R. K. Murray, *Harper's Biochemistry*, McGraw-Hill, **2000**.
[5] I. Molnar, C. Horvath, *J. Chromatogr. A* **1977**, *142*, 623.
[6] G. Neurauter, S. Scholl-Bürgi, A. Haara, S. Geisler, P. Mayersbach, H. Schennach, D. Fuchs, *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 1848.
[7] H. Orhan, N. P. E. Vermeulen, C. Tump, H. Zappey, J. H. N. Meerman, *J. Chromatogr. B* **2004**, *799*, 245.
[8] N. A. Hampson, J. B. Lee, K. I. Macdonald, *J. Electroanal. Chem.* **1972**, *34*, 91.
[9] K. Stulik, V. Pacakova, *Electroanalytical measurements in flowing liquids*, Ellis Horwood, **1987**.
[10] W. T. Kok, H. B. Hanekamp, P. Bos, R. W. Frei, *Anal. Chim. Acta* **1982**, *142*, 31.
[11] K. Stulik, V. Pacakova, M. Weingart, M. Podolak, *J. Chromatogr. A* **1986**, *367*, 311.
[12] W. Kok, G. Groenendijk, U. Brinkman, R. W. Frei, *J. Chromatogr. A* **1984**, *315*, 271.
[13] W. T. Kok, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei, *J. Chromatogr. A* **1983**, *256*, 17.
[14] K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G. Swain, J. Zima, J. Barek, *Chem. Listy* **2006**, *100*, 124.
[15] J. Mika, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, *Electrochim. Acta* **2015**, *154*, 397.
[16] J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 14.
[17] J. Mika, J. Barek, J. Zima, J. Costa Moreira, H. Dejmková, *Electroanalysis* **2018**, *30*, 1455.
[18] G. P. Jin, X. Q. Lin, *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 454.
[19] L. Agui, A. Gonzalez, P. Yanez-Sedeno, J. Pingarron, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *401*, 145.
[20] F. Huerta, E. Morallon, J. L. Vazquez, A. Aldaz, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *475*, 38.
[21] S. M. MacDonald, S. G. Roscoe, *Electrochim. Acta* **1997**, *42*, 1189.
[22] K. Ogura, M. Kobayashi, M. Nakayama, Y. Miho, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *463*, 218.
[23] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, E. Fabregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *405*, 153.
[24] G. Zhao, Y. Qi, Y. Tian, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 830.
[25] T. Kitagawa, S. Tsushima, *Bunseki Kagaku* **1971**, *20*, 1561.
[26] T. Alizadeh, M. Zarejousheghani, *Anal. Bioanal. Electrochem.* **2009**, *1*, 169.
[27] M. Bezerra, R. Santelli, E. Oliveira, L. Silveira Villar, L. Amelia Escaleira, *Talanta* **2008**, *76*, 965.
[28] H. Tye, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 485.
[29] J. Inczedy, T. Lengyel, A. M. Ure, *Compendium of Analytical Nomenclature: Definitive Rules 1997*, Blackwell Science, **1998**.


Received: September 15, 2018
Accepted: December 6, 2018
Published online on January 10, 2019

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 

# 13. Příloha VI

## POTVRZENÍ ÚČASTI

1. H. Dejmková, **J. Mika**, J. Zima a J. Barek, Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu, Úřad průmyslového vlastnictví, Patent č. CZ: 304462 B6, 2014.
   Procentuální účast Mgr. Jana Miky ~ 55 %.

2. **J. Mika**, J. Barek, J. Zima a H. Dejmková, New flow–through coulometric detectore with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC, *Electrochimica Acta* 154 (2015), 397–403.
   5–year Impact Factor: **4.94**, Procentuální účast Mgr. Jana Miky ~ 75 %.

3. **J. Mika**, J. Barek, J. Zima, J.C. Moreira a H. Dejmková, Simultaneous determination of homovanillic and vanillylmandelic acid by HPLC using detector with renewable carbon working material, *Electroanalysis* 30 (2018), 1455-1560.
   5–year Impact Factor: **2.60**, Procentuální účast Mgr. Jana Miky ~ 75 %

4. **J. Mika**, H. Dejmková, J. Zima a J. Barek, Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, elektrodový systém a amperometrický detektor ji obsahující, Úřad průmyslového vlastnictví, Užitný vzor č. CZ 304462 U1, 2016.
   Procentuální účast Mgr. Jana Miky ~ 75 %.

5. **J. Mika**, J. Barek, J. Zima, E. Prokešová a H. Dejmková, Comparison of glassy carbon and copper microparticles as a renewable working electrode material for amperometric determination of amino acids using flow through detector, *Electroanalysis* 31 (2019), 357-362.
   5–year Impact Factor: **2.60**, Procentuální účast Mgr. Jana Miky ~ 55 %

---

Potvrzuji, že procentuální účast Mgr. Jana Miky u výše zmíněných publikací odpovídá uvedeným hodnotám.

V Praze, 9.9.2019 RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

# 14. Příloha VII

## SEZNAM PUBLIKACÍ, ORÁLNÍCH A POSTEROVÝCH PREZENTACÍ

### A. Seznam publikací

1.Z. Kolska, D. Dvorakova, **J. Mika**, T. Boublik, Volumetric behavior of the binary systems benzene–cyclohexane and benzene–2,2,4–trimethyl–pentane at temperatures, Fluid Phase Equilibria, 303 (2011) 157–161.

2. H. Dejmkova, J. Zima, J. Barek, **J. Mika**, Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in Flowing Methanolic Solutions, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1766–1770.

3.**J. Mika**, J.C. Moreira, A. Nemeckova, J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, Determination of bromhexine at a glassy carbon paste electrode using differential pulse voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection, *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly*, 146 (2015) 1211–1215.

4.**J. Mika**, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, New flow–through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC, *Electrochimica Acta*, 154 (2015) 397–403.

5. **J.Mika**, J.Barek, J.Zima, J.C.Moreira a H.Dejmková, Simultaneous determination of homovanillic and vanillylmandelic acid by HPLC using detector with renewable carbon working material, *Electroanalysis,* 30 (2018) 1455–1460.

6. **J. Mika**, J. Barek, J. Zima, E. Prokešová a H. Dejmková, Comparison of glassy carbon and copper microparticles as a renewable working electrode material for amperometric determination of amino acids using flow through detector, *Electroanalysis* 31 (2019) 357–362.

## B. Seznam orálních prezentací

1.**J. Mika**, J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku v methanolickém roztoku, Proc. 15. ročník soutěže "O cenu firmy Merck 2012, Česká společnost chemická – Chemické listy 106, Praha, Czech Republic, 2012, pp. 67–71.

2.**J. Mika**, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, Determination of Thymol Using Flow Injection Analysis on New Coulometric Detector with Renewable Working Material Based on Glassy Carbon Microparticles, Proc. XXXIII. Modern Electrochemical Methods, Collection of Conference Proceedings International Conference, Jetřichovice, Czech Republic, 20.–24. May. 2013, pp. 110–113.

3.**J. Mika**, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, Utilization of high conversion degree detector with renewable working material for HPLC determination of sulfamethizole, Proc. XXXIV. Modern Electrochemical Methods, Collection of Conference Proceedings International Conference, Jetřichovice, Czech Republic, 19.–23. May. 2014, pp. 90–94.

4. **J. Mika**, J. Barek, J. Zima, J.C. Moreira, H. Dejmkova, Application of flow–throuhg coulometric detector with renewable working material based on carbon spherical microparticles, 12th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry", Press release in *Chemické Listy* 110 (2016) 735 (conference issue of *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly*), Prague 2016, pp. 189.

5. J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, **J. Mika**, E. Prokesova, New electrode materials and arrangements for amperometric detection in flow measurement, IX. Vserossijskaja konferencia po elektrochimičeskim metodam analiza – EMA 2016, Služba operativnoj poligrafii, Ekaterinburg 2016, pp. 30.

6. J. Zima, H. Dejmkova, D. Bavol, **J. Mika**, M. Baroch, New materials and measuring protocols for electrochemical detection of biologically active compounds in flow systems, The Seventeenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry & The Third International Meeting on Electrogenerated Chemiluminescence 2019, Changchun, China 2019.

## C. Seznam posterových prezentací

1. H. Dejmkova, **J. Mika**, J. Barek, J. Zima, Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in HPLC with Amperometric Detection, in: HPLC 2011 – 36th International Symposium on High–Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest, Hungary, 2011, pp. P1–G–258–TU.

2.**J. Mika**, A. Nemeckova, J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, Determination of Bromhexine on Carbon Paste Electrode Using Differential Pulse Voltammetry and FIA with Amperometric Detection, in: 4th EuChemMS Chemistry Congress, Česká společnost chemická – Chemické listy 106, Prague, Czech republic, 2012, pp. 1139.

3. **J. Mika**, M. Svecova, A. Nemeckova, J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, Determination of ambroxol and bromhexine at glassy carbon paste electrode using differential pulse voltammetry and flow injection analysis, in: 15. Austrian Chemistry Days, Graz, Austria, 2013. pp. PO–9.

4. **J. Mika**, P. Mala, E. Vranova, J. Barek, J. Zima, H. Dejmkova, Determination of triclosan at carbon paste electrode using differential pulse voltammetry in: 65. Zjazd chemikov, Vysoke Tatry, Tatranske Matliare, Slovakia, 2013, pp. 149.

5. **J. Mika**, A. Nemeckova, J. Zima, J. Barek, H. Dejmkova, New coulometric detector with renewable working material for flow injection analysis and HPLC, in: ESEAC – 15th International Conference on Electroanalysis, Malmö, Sweden, 2014, pp. 178.

6.**J. Mika**, J. Barek, J. Zima, J. Moreira, H. Dejmkova, Simultenous determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid by HPLC using coulometric detector with renewable porous electrode based on glassy carbon beads, in: Euroanalysis – 18th European conference on analytical chemistry, Bordeaux, France, 2015, pp. 209.

## D. Seznam patentů a užitných vzorů

1. H.Dejmková, **J.Mika**, J.Zima a J.Barek, *Úřad Průmyslového vlastnictví ČR* – Patentová listina číslo CZ 304462 B6, Pracovní elektroda, coulometrický detektor a způsob výměny pracovního materiálu, 22.4.2013.

2. H.Dejmková, **J.Mika**, J.Zima a J.Barek, *Úřad Průmyslového vlastnictví ČR* – Užitný vzor číslo CZ 25 798 U1, Pracovní elektroda a coulometrický detektor, 22.4.2013.

3. **J.Mika**, H.Dejmková, J.Zima a J.Barek, *Úřad Průmyslového vlastnictví ČR* – Užitný vzor číslo CZ 30 183 U1, Pracovní elektroda s obnovitelnou náplní, elektrodový systém a amperometrický průtokový detektor ji obsahující, 4.11.2016.