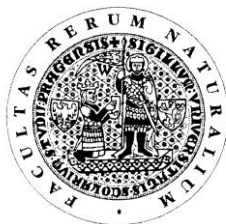


**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Fährichová

Stanovení floretinu na uhlíkové pastové elektrodě
Determination of phloretin using carbon paste electrode

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha, 2011

Tento výzkum byl podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy Česká republika (projekt LC 06035, MSM 0021620857, RP 14/63 a KONTAK(AMVIS) projekt ME10004(NEMVAD)), projekt SVV2011-263204 a Technologickou agenturou Česká republika (projekt TA01020565).

Prohlášení:

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

V Praze, 9. dubna 2011

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za odborné vedení a Mgr. Lence Němcové za pomoc při vypracování mé bakalářské práce a ostatním členům katedry analytické chemie za pomoc a ochotu pomáhat. Současně bych chtěla poděkovat rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za jejich podporu během celého studia.

Název práce: Stanovení floretinu na uhlíkové pastové elektrodě

Anotace: Tato práce se zabývá stanovením floretinu pomocí DPV a DCV.

Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda. Byly stanoveny optimální podmínky pro stanovení floretinu pomocí DPV a DCV. Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a stanoveny limity detekce. Limit detekce metodou DPV byl $7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu, metodou DCV byl $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu. Dalšího snížení limitu detekce bylo dosaženo použitím adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie, pomocí které byl limit detekce snížen na $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

Klíčová slova: floretin, uhlíková pastová elektroda, diferenční pulzní voltametrie, stacionární (DC) voltametrie

Title: Determination of phloretin using carbon paste electrode

Annotation: The aim of this work is the determination of phloretin using differential pulse voltammetry (DPV) and DC voltammetry (DCV).

As a working electrode carbon paste electrode was used. Optimal pH conditions for determination using DPV and DCV were found. Under these conditions calibration dependences were measured and limits of detection were calculated. The limit of detection for DPV method was $7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ phloretin, for DCV method was $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ phloretin. Further decrease in limit of detection was achieved by adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdS DPV). The calculated limit of detection was $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ phloretin using AdS DPV.

Key words: phloretin, carbon paste electrode, differential pulse voltammetry, DC (direct current) voltammetry

Obsah

1. Teoretická část	7
1.1 Cíl práce	7
1.2 Volné radikály a antioxidanty	7
1.3 Flavonoidy a vlastnosti floretinu	8
1.4 Uhlíková pastová elektroda	10
2. Experimentální část	12
2.1 Studovaná látka	12
2.2 Použité chemikálie	13
2.3 Použitá aparatura	13
2.4 Pracovní postupy	14
2.5 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku floretinu	14
3. Výsledky a diskuze	16
3.1 Cyklická voltametrie	16
3.1.1 Vliv rychlosti polarizace	16
3.2 DC voltametrie	19
3.2.1 Vliv pH na voltametrické chování floretinu	19
3.2.2 Kalibrační závislost	21
3.3 DP voltametrie	25
3.3.1 Vliv pH na voltametrické chování floretinu	25
3.3.2 Kalibrační závislost	28
3.4 Adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie	32
4. Závěr	36
5. Literatura	38

Seznam použitých zkratek a symbolů

A	absorbance
AU	jednotky absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
CAS	Chemical Abstracts Service
CPE	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
CV	cyklická voltametrie
DCV	stacionární DC voltametrie (direct current)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_p	potenciál píku
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál
E_{AKU}	potenciál akumulace
I_p	proud píku
λ	vlnová délka
L_D	limit detekce
M_r	relativní molekulová hmotnost
R	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
t	čas
t_{AKU}	doba akumulace
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem voltametrického chování floretinu s využitím metod diferenční pulzní voltametrie (DPV) a stacionární (DC) voltametrie (DCV) na uhlíkové pastové elektrodě.

Cílem této práce bylo prozkoumání a nalezení optimálních podmínek pro stanovení studované látky na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a dosažení co nejnižšího limitu detekce.

1.2 Volné radikály a antioxidanty

Volné radikály jsou definovány jako molekuly či molekulární fragmenty s jedním nebo více nepárovými elektrony ve vnějším molekulovém orbitalu, které jsou schopny nezávislé existence. V nízké koncentraci jsou volné radikály součástí běžných fyziologických dějů¹ zahrnujících cytotoxicitu, kontrolu cévního tonu a přenos nervových vzruchů². Nadměrná produkce volných radikálů či pokles hladiny antioxidantů vede k oxidačnímu stresu. Oxidační stres je škodlivý proces způsobující poškození buněčných struktur, jako jsou lipidy, proteiny, RNA a DNA¹. Volné radikály způsobují celou řadu lidských onemocnění jako je rakovina, Alzheimerova choroba, reperfuční srdeční abnormality, onemocnění ledvin, fibrózy atd². Vystavení volným radikálům z různých zdrojů vede organismus k vytvoření celé řady obranných mechanismů. Mezi obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu vyvolaného volnými radikály patří preventivní a opravné mechanismy, fyzikální obrana a antioxidační obrana³. Na enzymatických antioxidačních mechanismech se podílejí superoxid dismutasy, glutation peroxidasy a katalasy. Neenzymatické antioxidanty jsou reprezentovány kyselinou askorbovou (vitamín C), α -tokoferolem (vitamín E), glutationem, karotenoidy, flavonoidy³, některými důležitými sloučeninami prvků jako například selenu a zinku¹ a dalšími antioxidanty³. Antioxidanty jsou látky schopné potlačit oxidaci a působit proti jejímu škodlivému vlivu na buňky. Tělo si neumí tyto látky samo vytvořit, a proto musí být přijímané ve stravě. Vhodný antioxidant musí být

účinný v nízké koncentraci, musí být přiměřeně rozpustný v oxidovatelných produktech, musí být netoxický a nedráždivý v efektivní koncentraci i po delším skladování. Musí být bez zápachu, bez chuti a nesmí předávat barvu výslednému produktu. Jejich důležitou vlastností je též stabilita a efektivita i v širokém rozmezí pH². Nejbohatšími zdroji přírodních antioxidantů jsou ovoce, zelenina a léčivé byliny¹.

1.3 Flavonoidy a vlastnosti floretinu

Flavonoidy jsou přírodní látky odvozené od 2- fenylochromen-4-onu (flavon)⁴. Je to skupina více jak 5000 odlišných přírodních látek⁵. Flavonoidy jsou klasifikovány do různých kategorií takto: antokyanidiny, flavony, flavanony, flavonoly, isoflavony a další menší skupiny flavonoidů jako například dihydrochalkony. Hlavními zástupci posledně zmíněné skupiny jsou floretin a jeho glykosid floridzin⁶. Flavonoidy jsou hojně přítomny v zelenině, ovoci, olivovém a sojovém oleji, červeném víně, čokoládě, čaji, atp., kde plní mnoho funkcí⁵. Jsou zodpovědné například za žlutou či červenomodrou pigmentaci rostlin a chrání je před mikroby a hmyzem. Jejich protialergická, protizánětlivá, bakteriostatická a antikarcinogenní aktivita přitahuje pozornost jak výrobců potravin, tak jejich spotřebitelů⁴.

Floretin je flavonoid známý především díky svým antioxidačním účinkům. Je přítomný výhradně v jablkách, v kůře jabloní a v jablečných produktech, kde je přítomný buď volný nebo ve své glykosidické formě jako floridzin (floretin- 2'-O-glukosa). Bylo prokázáno, že floridzin může být hydrolyzován na floretin pomocí laktasa-floridzin hydrolasou v tenkém střevě⁷. Floretin patří do skupiny dihydrochalkonů. Tato skupina flavonoidů vykazuje široké spektrum bioaktivních účinků, jako je protinádorový, antimykotický, antibakteriální, antivirový a protizánětlivý účinek. Floretin též vykazuje silnou antioxidační aktivitu v inhibici peroxidace lipidů⁵ vyvolané volnými radikály, což je jeden z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu⁸. Oxidace lipidů je také hlavním původcem žluklé chuti potravin, která ale může být kontrolována užitím antioxidantů, které pohotově stabilizují volné radikály dodáním elektronu či atomu vodíku, a tak peroxidaci lipidů předcházejí⁹. Floretin je jedním z přirozeně působících nesteroidních estrogenů. Doposud byl znám především jako kosmetická přísada. Kromě své antioxidační schopnosti slouží také jako protizánětlivý, imunosupresivní, protinádorový,

antimutagenní a antikarcinogenní činitel¹⁰. Novější studie prokazují, že floretin přítomný v moči může být využíván jako orientační biomarker konzumace jablek⁷.

Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku v živých tkáních je zapojena do řady lidských nemocí včetně rakoviny, kardiovaskulárních, plicních a neurologických nemocí. Z toho důvodu jsou částice schopné chránit organismus proti těmto reaktivním formám užitečné při léčbě těchto onemocnění. V souladu s touto hypotézou je obecně přijímán názor přisuzující pozitivní zdravotní účinek flavonoidů jejich antioxidačním schopnostem⁵.

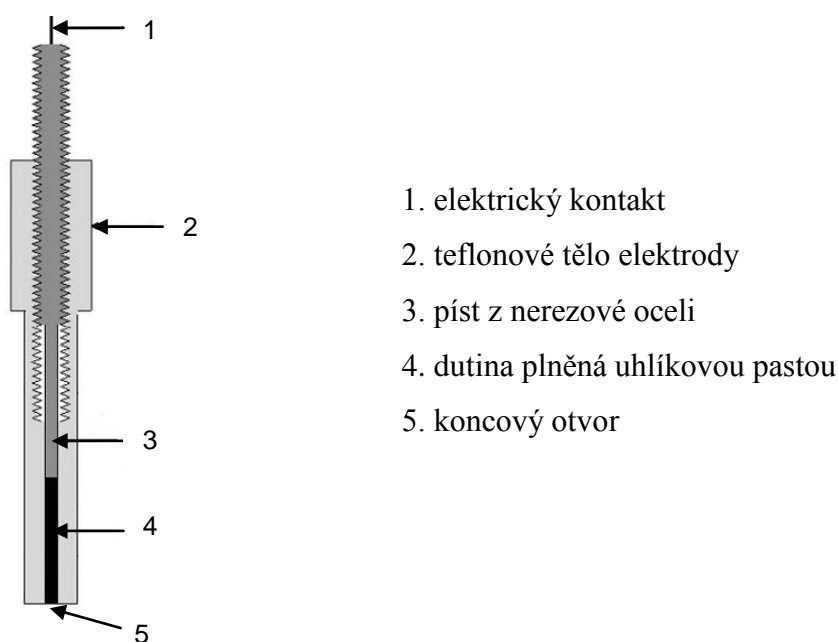
Nejčastěji používanou metodou stanovení floretinu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) s UV detekcí¹¹, či s detekcí diodovým polem (Diode Array Detection- DAD)¹². Další metodou je například kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS)¹³, či samotná hmotnostní spektrometrie (MS)¹⁴.

1.4 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (Carbon paste electrodes, CPEs) byly objeveny R. N. Adamsem v roce 1958¹⁵. Objevení uhlíkové pastové elektrody je úzce spjato se snahou vyvinout „kapající uhlíkovou elektrodu“, která by byla použitelná pro anodické oxidace organických sloučenin, kde tehdy běžně používaná rtuťová kapková elektroda nemůže být použita. Kapající uhlíková elektroda se ovšem neosvědčila. Tyto experimenty vedly k vývoji nového elektrodového materiálu, složeného z hustší směsi práškového uhlíku s organickou kapalinou (tzv. uhlíková pasta)¹⁶. Uhlíková pasta může být modifikována různými chemickými či biologickými látkami a ve srovnání s úpravou pevných elektrod je její modifikace mnohem jednodušší¹⁷. Modifikace jsou prováděny za účelem změny lokálního náboje povrchu, usnadnění či umožnění selektivní adsorpce analytů o určité velikosti molekuly či náboje, umožnění extrakce analytu do pasty a s tím související zvýšení měřeného signálu, popřípadě i využití katalytických efektů pro pomalé reakce¹⁸.

CPEs patří do speciální skupiny heterogenních uhlíkových elektrod¹⁹. Elektroda je tvořena elektrodovým pouzdem¹⁶, vyráběným převážně z teflonu s vnitřním otvorem o průměru 1 až 5 mm¹⁸, které je naplněno uhlíkovou pastou skládající se z uhlíkového prášku a pojiva. Požadovanými vlastnosti uhlíkového prášku je stejná velikost částic, vysoká chemická čistota a nízká adsorpční schopnost. Jako pojiva (pastovací kapaliny) se nejčastěji používají minerální či silikonový olej, které jsou elektrochemicky inaktivní. Příprava uhlíkové pasty je velmi jednoduchá. Pastu připravíme smícháním 1 g uhlíkového prášku a většinou kolem 0,4 ml pastovací kapaliny¹⁶, přičemž u modifikovaných elektrod může množství modifikátoru tvořit 10 až 30 %¹⁸. Chování připravených past, především těch, které obsahují parafinový či silikonový olej, se ustálí až po určité době (obvykle po 24 hodinách). Je experimentálně ověřeno, že čerstvá pasta vykazuje nestabilní chování. Naplněnou elektrodu není vhodné uchovávat dlouhou dobu na vzduchu, neboť by mohlo dojít k jejímu pozvolnému vysychání, proto se elektrody uchovávají ponořené koncovým otvorem v nádobě s destilovanou vodou. Tímto způsobem je možné pastu uchovávat týdny až měsíce. Před každým měřením je nutné obnovit povrch elektrody vytlačáním malého množství pasty pomocí pístu. Vytlačená pasta se otírá např. do navlhčeného filtračního papíru¹⁶.

Vzhledem k četným výhodným vlastnostem a charakteristikám jsou tyto elektrody využívány především pro voltametrická měření. Nicméně senzory založené na uhlíkové pastě jsou použitelné také v amperometrii, coulometrii a potenciometrii¹⁹. Uhlíkové pastové elektrody mají poměrně široké použití. Využívají se jak v analýze anorganických látek, především ke stanovení iontů těžkých kovů, tak v analýze organických látek, nejčastěji ve farmaceutické analýze a též k analýze polutantů životního prostředí¹⁶. Velkou předností uhlíkových pastových elektrod je také to, že uhlíkové pasty jsou snadno dostupné za minimální náklady¹⁹.

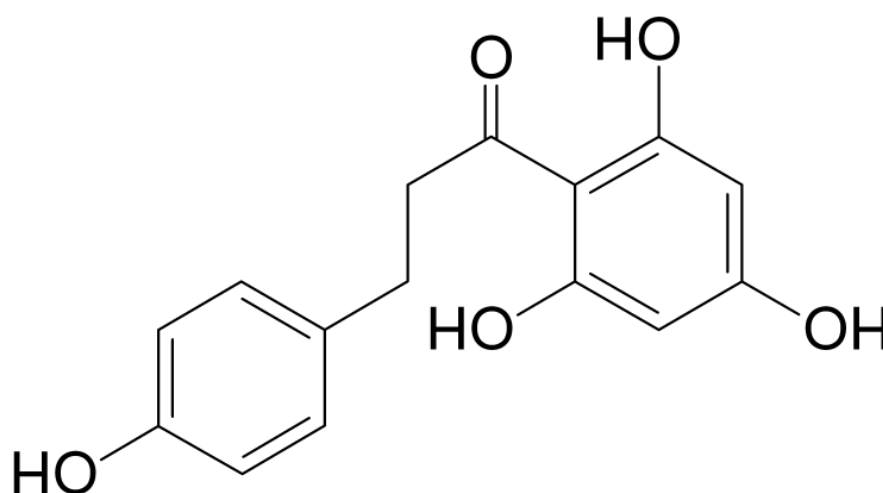


Obr. 1.1 Uhlíková pastová elektroda²⁰

2. Experimentální část

2.1 Studovaná látka

Floretin^{21, 22}



IUPAC name: 3-(4-hydroxyfenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyfenyl)propan-1-on

C.A.S. Registry number: 60-82-2

Sumární vzorec: C₁₅H₁₄O₅

$M_r = 247,27$

$t_f = 260 - 262^\circ\text{C}$

$\text{pK}_a = 7,4$

2.2 Použité chemikálie

Zásobní roztok floretinu (Sigma Aldrich, $\geq 99\%$) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (Merck). Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (Lach-Ner) o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s vodným roztokem obsahujícím kyselinu boritou o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Lachema), kyselinu fosforečnou o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (84-87 %, Lach-Ner) a kyselinu octovou též o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (99,8 %, Lach-Ner).

K přípravě vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, USA).

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg uhlíkových kuliček o průměru $0,4 - 12 \text{ } \mu\text{m}$ (Alfa Aesar, USA) a $90 \text{ } \mu\text{l}$ minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko).

2.3 Použitá aparatura

Měření byla prováděna na sestavě Eko-Tribo Polarograf s programem Polar Pro verze 5.1 (Polaro-Sensors, ČR). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda, jako referentní elektroda byla použita argentschloridová elektroda s $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl (ETP CZ R-008-05, Monokrystaly, ČR), pomocnou elektrodou byla platinová drátková elektroda.

Stálost zásobního roztoku byla proměřována na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, USA) v 1 mm křemenných kyvetách proti methanolu.

Hodnoty pH byly měřeny na digitálním pH-metru (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (PCH 2411).

2.4 Pracovní postupy

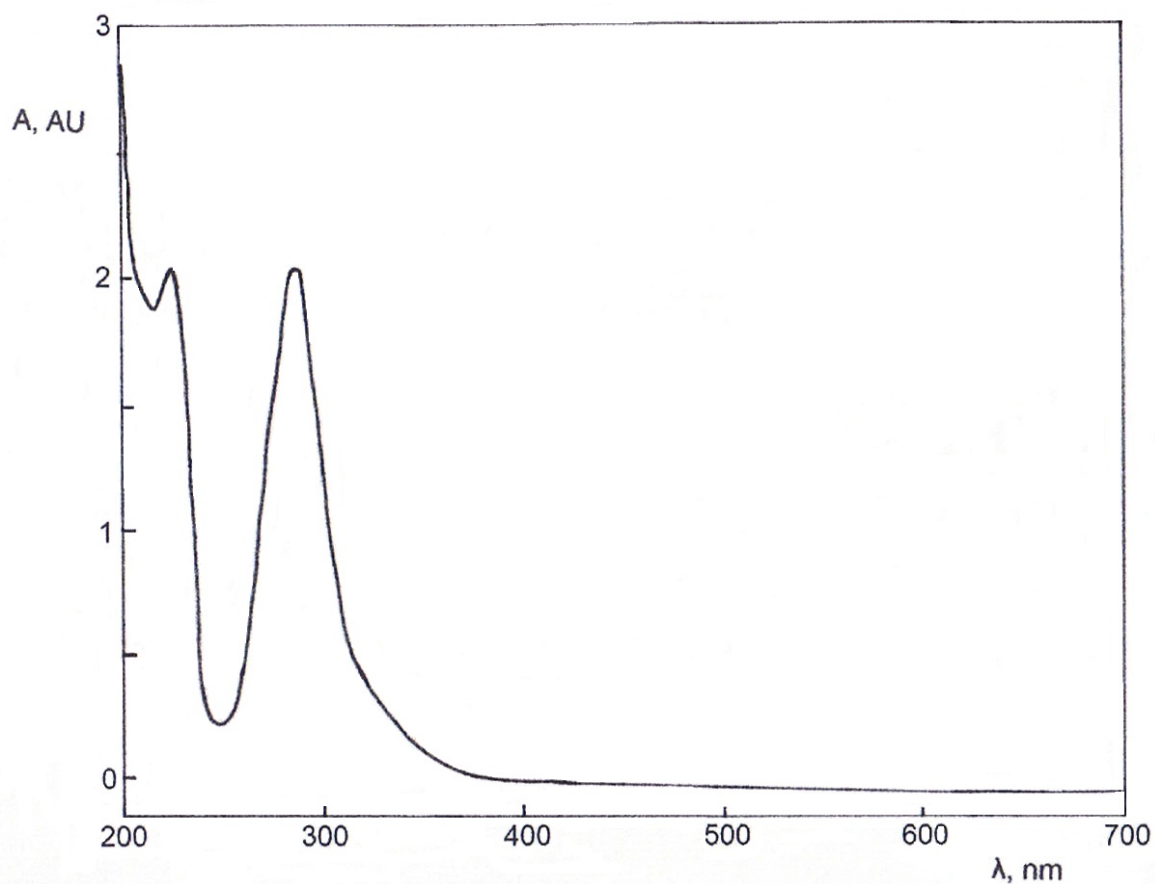
Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Při měřeních se pracovalo s objemem vzorku 5 ml. Vzorek byl připravován vždy odpipetováním přesného množství roztoku stanovované látky v methanolu, 2,5 ml methanolu, 2,5 ml Brittonova-Robinsonova (BR) pufru o příslušném pH a doplněním na 5 ml roztokem methanolu a BR pufru v poměru (1:1). Roztok byl vždy důkladně promíchán a převeden do voltametrické nádoby. Povrch elektrody byl před každým novým měřením obnoven mechanickým očištěním do navlhčeného filtračního papíru. Všechna měření byla prováděna třikrát. Jako hodnota proudu píku byla brána průměrná hodnota ze třech následujících měření. Získané kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Limit detekce byl vypočítán z rovnice regrese jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky z hodnot naměřených pro nejnižší koncentraci.

2.5 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku floretinu

Stálost zásobního roztoku floretinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum floretinu bylo proměřováno v 1mm křemenných kyvetách proti methanolu v rozmezí vlnových délek 200 – 700 nm. Změřené spektrum je uvedené na Obr. 2.1. Naměřené hodnoty absorpce jsou uvedeny v Tab. 2.1. Z uvedených výsledků vyplývá, že zásobní roztok byl stálý minimálně po dobu 20 dnů a byl proto použit pro všechna měření.

Tab. 2.1Stálost zásobního roztoku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu v methanolu.

t (dny)	$\lambda=224 \text{ nm}$		$\lambda=286 \text{ nm}$	
	A	%	A	%
0	2,030	100	2,040	100
1	2,022	99,6	2,028	99,4
4	2,005	98,8	2,012	98,7
12	2,041	100,6	2,041	100,1
20	2,023	99,7	2,027	99,4

**Obr. 2.1**UV- VIS spektrum $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu v methanolu (měřeno v kyvetě o tloušťce 1 mm proti methanolu).

3. Výsledky a diskuze

3.1 Cyklická voltametrie

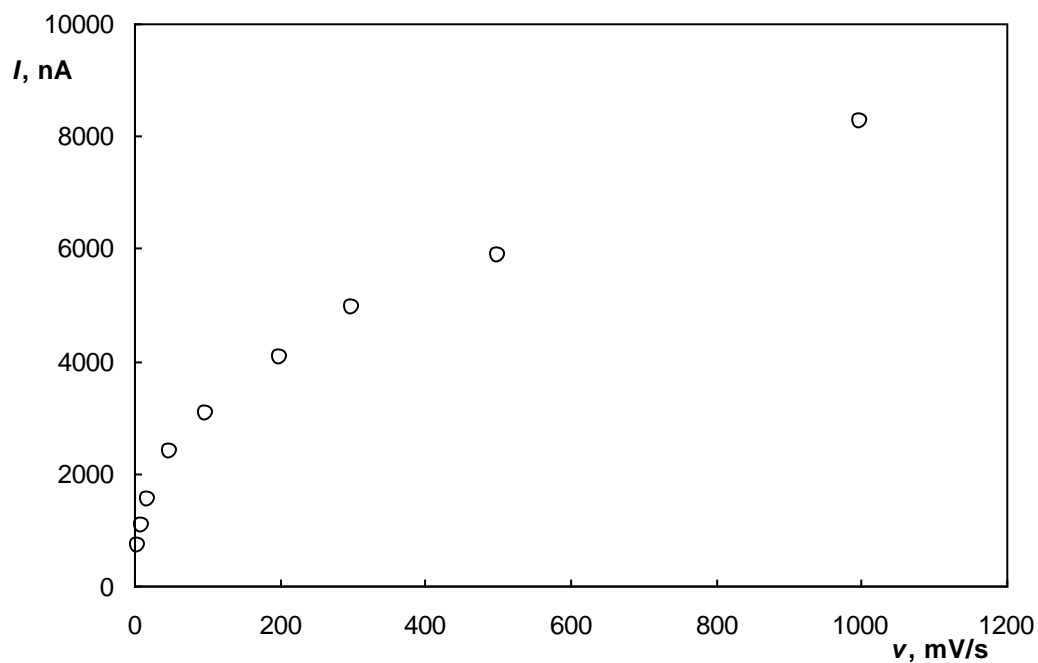
3.1.1 Vliv rychlosti polarizace

Cyklická voltametrie má hlavní význam při studiu elektrodoových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek je možno usuzovat na mechanismus elektrodové reakce, jako například posuzovat její reverzibilitu²³. Reakce byly sledovány v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1. Koncentrace floretinu byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V Tab. 3.1 jsou uvedeny parametry přímek pro závislosti proudu vln (I) na rychlosti polarizace (v) a na odmocnině z rychlosti polarizace (\sqrt{v}). Během měření byla sledována výška vln v závislosti na měnící se polarizační rychlosti (Obr. 3.1). Na Obr. 3.2 je znázorněna závislost proudu vln (I) na odmocnině z rychlosti polarizace. Z výsledků vyplývá, že za daných experimentálních podmínek je reakce ireverzibilní. Nebyla pozorována přímá úměra proudu vln (I) na rychlosti polarizace (v), ani na odmocnině z rychlosti polarizace (\sqrt{v}), z čehož vyplývá, že sledovaný děj byl kontrolován současně difúzí i adsorpcí. Chování při záznamu 5 následných cyklů v jednom měření zachycuje Obr. 3.3. Z obrázku vyplývá, že během měření dochází k pasivaci elektrody.

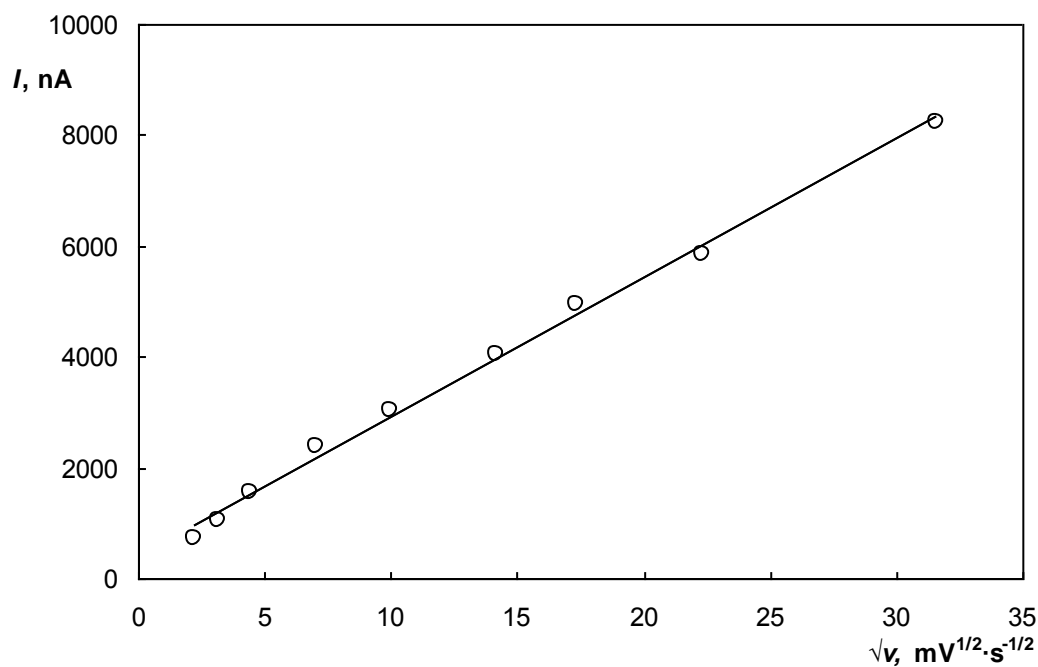
Tab 3.1

Parametry přímek pro závislosti proudu vln (I) na rychlosti polarizace (v) a na odmocnině z rychlosti polarizace (\sqrt{v}), měřeno metodou CV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, koncentrace floretinu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

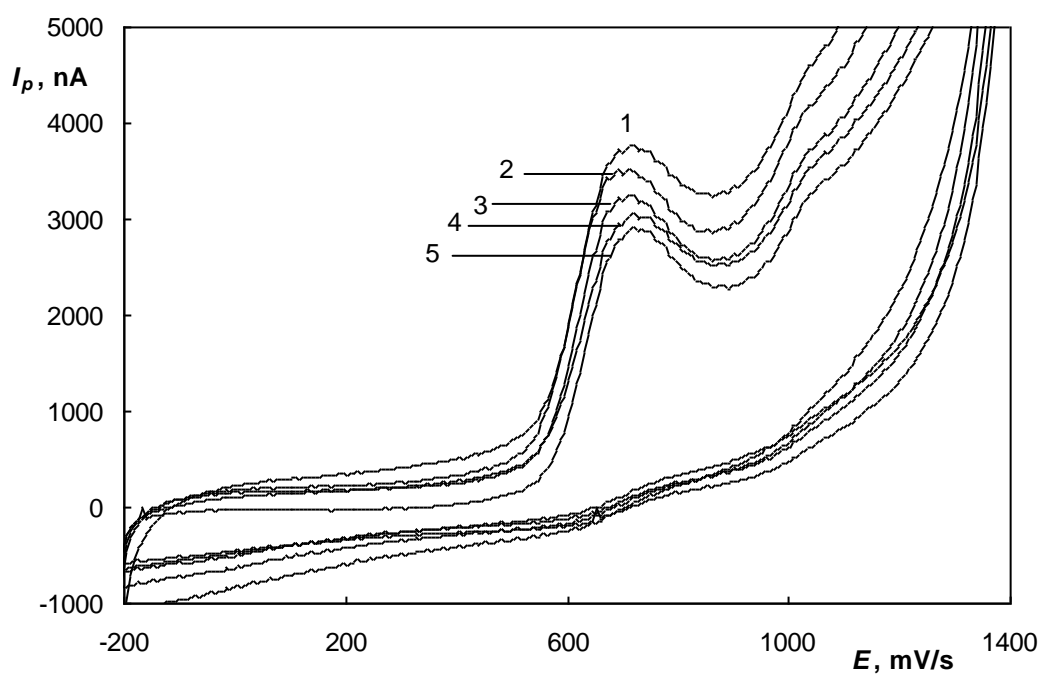
Závislost I na	směrnice $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2
v	7,2	1792,6	0,9030
Závislost I na	směrnice $\text{mA} \cdot (\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2})$	úsek nA	R^2
\sqrt{v}	25,1	405,3	0,9957

**Obr. 3.1**

Závislost proudu vln (I) na rychlosti polarizace, měřeno metodou CV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, koncentrace floretinu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

**Obr. 3.2**

Závislost proudu vln (I) na odmocnině z rychlosti polarizace, měřeno metodou CV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, koncentrace floretinu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

**Obr. 3.3**

Cyklické voltamogramy floretinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na CPE, 5 po sobě jdoucích cyklů (1-5), měřeno v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2 DC voltametrie

V další části práce bylo voltametrické chování floretinu sledováno metodou DC voltametrie na CPE. I v těchto měřeních byl povrch elektrody po každém měření mechanicky obnovován otřením uhlíkové pasty, jelikož byla pozorována pasivace povrchu CPE.

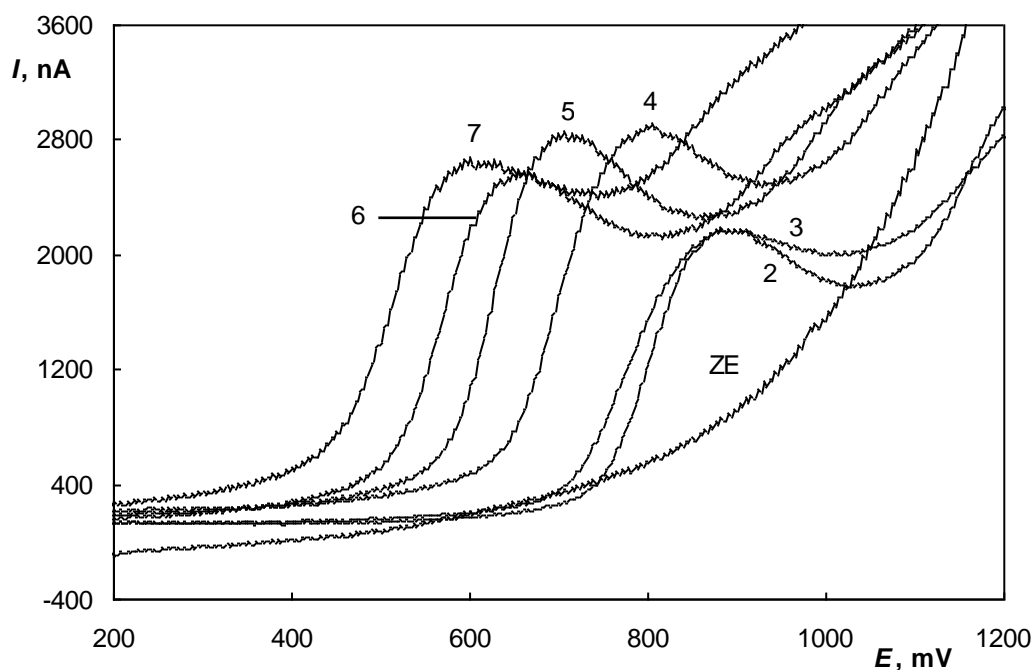
3.2.1 Vliv pH na voltametrické chování floretinu

Vliv pH na voltametrické chování floretinu při DC voltametrii byl sledován ve směsi BR pufru v rozsahu pH 2 až 12 a methanolu v poměru 1:1. Koncentrace floretinu byla vždy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Studovaná látka poskytovala v celém rozsahu pH jednu dobře vyhodnotitelnou vlnu a protáhlé rameno při pozitivnějších potenciálech. Hodnoty pH BR pufru, proudů vln (I) a potenciálů vln ($E_{1/2}$) uvádí Tab. 3.2. Získané voltamogramy pro DC voltametrii jsou uvedeny na Obr. 3.4 a Obr. 3.5. Jako optimální pH pro měření koncentračních závislostí bylo zvoleno pH 5, při kterém byla vlna nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelná.

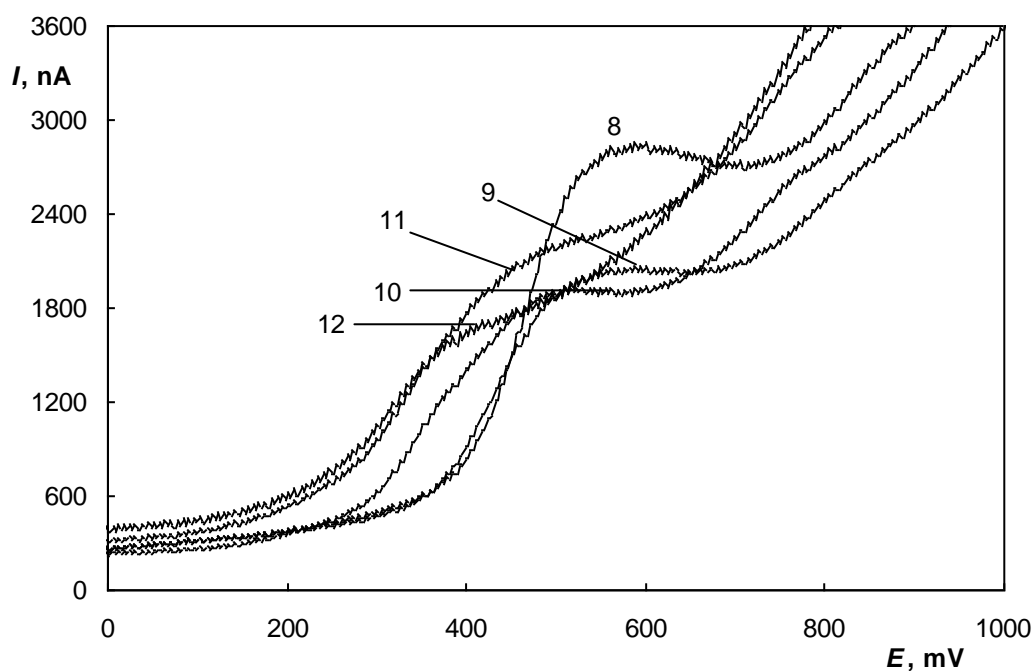
Tab. 3.2

Závislost proudu vln (I) a potenciálu vln ($E_{1/2}$) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu na pH BR pufru s methanolem v poměru 1:1. Měřeno metodou DCV na CPE.

pH	I nA	$E_{1/2}$ mV
2	2182	882
3	2193	882
4	2867	804
5	2917	705
6	2582	654
7	2659	615
8	2784	549
9	2069	588
10	1934	522
11	2007	438
12	1643	393

**Obr. 3.4**

Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

**Obr. 3.5**

Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.2 Kalibrační závislost

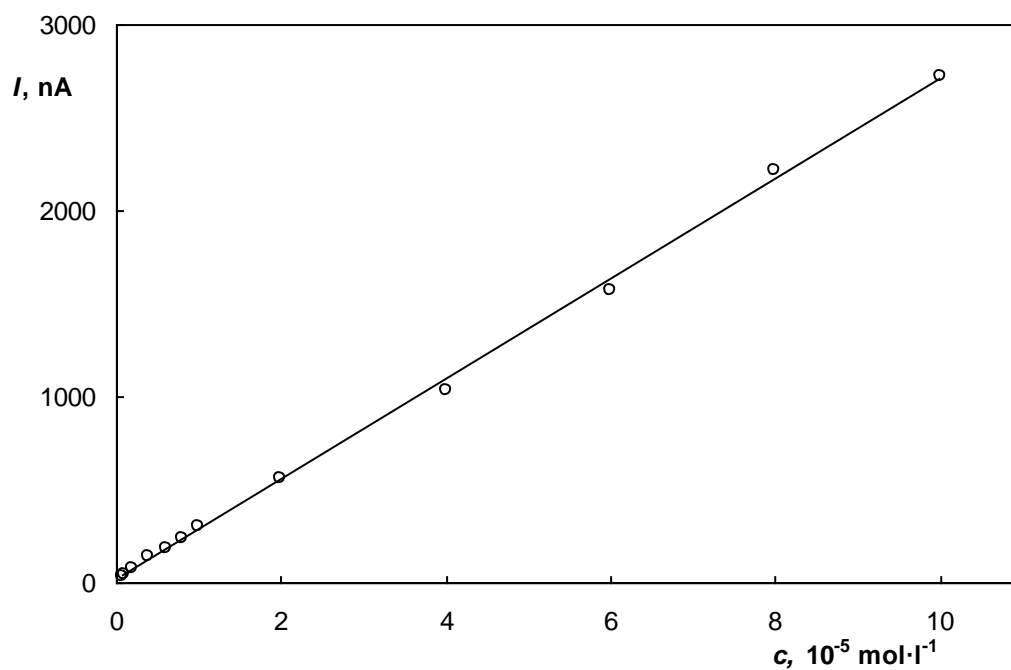
Kalibrační závislost floretinu byla proměřena metodou DC voltametrie v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1 v rozsahu koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Získané závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů vln byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v Tab. 3.3. Parametry kalibrační křivky floretinu v logaritmické formě (uvedeny pod Tab. 3.3) potvrzují linearitu závislosti (směrnice je blízká hodnotě 1). Závislost proudu vln (I) na koncentraci floretinu v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je uvedena na Obr. 3.6, závislost v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je uvedena na Obr. 3.7. Na Obr. 3.8 je uvedena závislost proudu vln (I) na koncentraci floretinu v logaritmické formě v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Voltamogramy floretinu na CPE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou znázorněny na Obr. 3.9, voltamogramy pro rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou na Obr. 3.10. Limit detekce byl vypočítán z rovnice regrese jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky z hodnot naměřených pro nejnižší koncentraci, tedy pro koncentraci $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu. Limit detekce byl stanoven na $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

Tab. 3.3

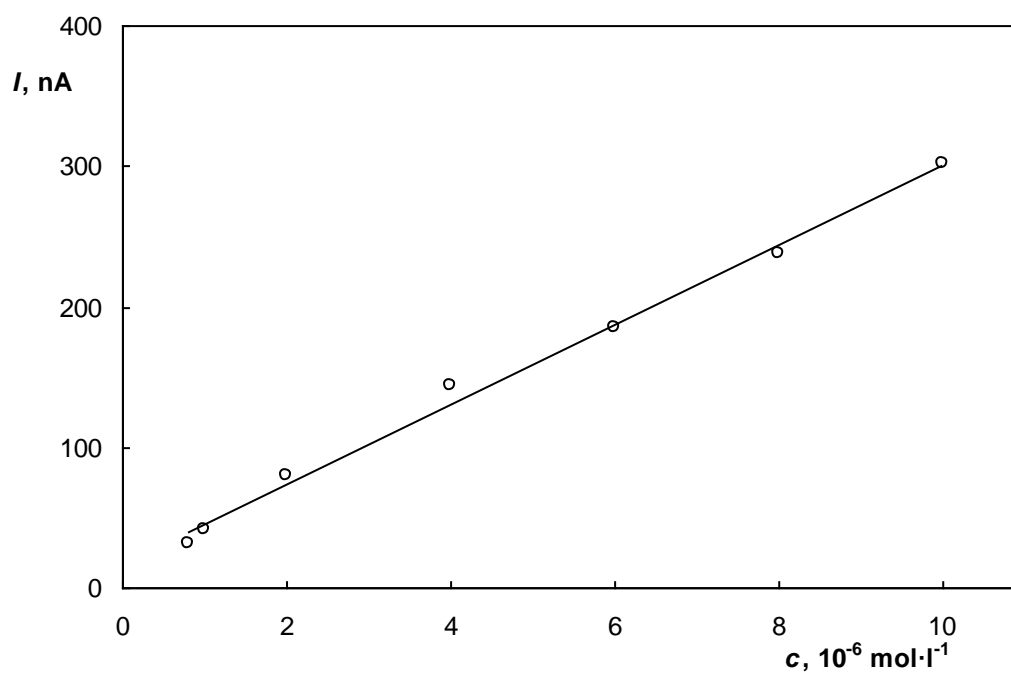
Parametry kalibračních křivek floretinu, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	27,5	- 31,1	0,9975	—
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	28,4	17,1	0,9945	—
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	26,9	17,0	0,9989	$1,0 \cdot 10^{-6}$

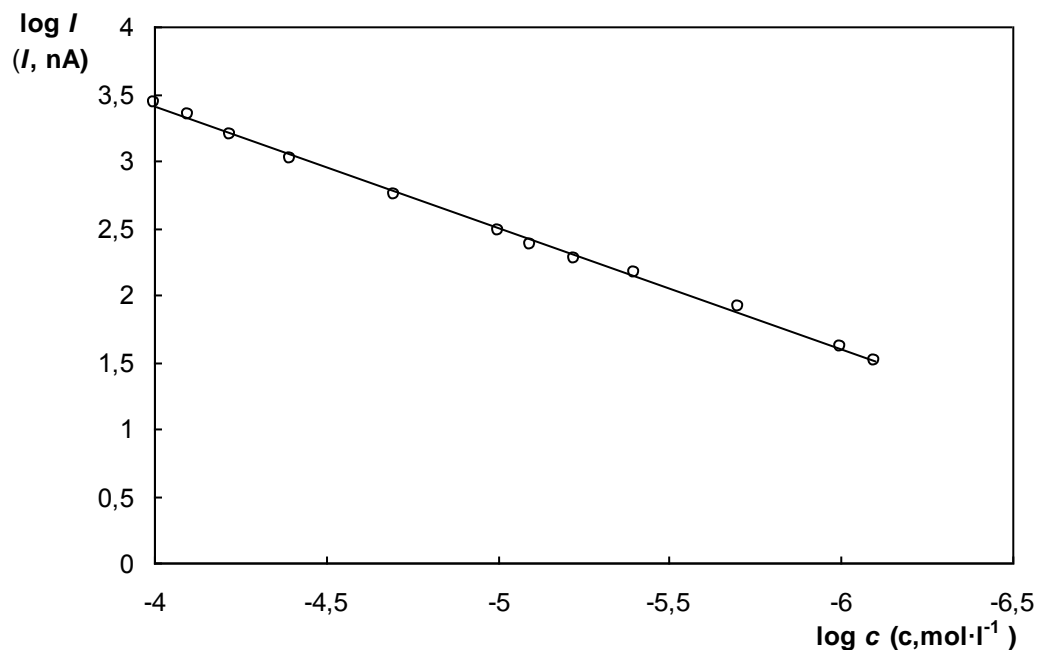
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 0,90$; $b = 7,01$; $R^2 = 0,9983$.

**Obr. 3.6**

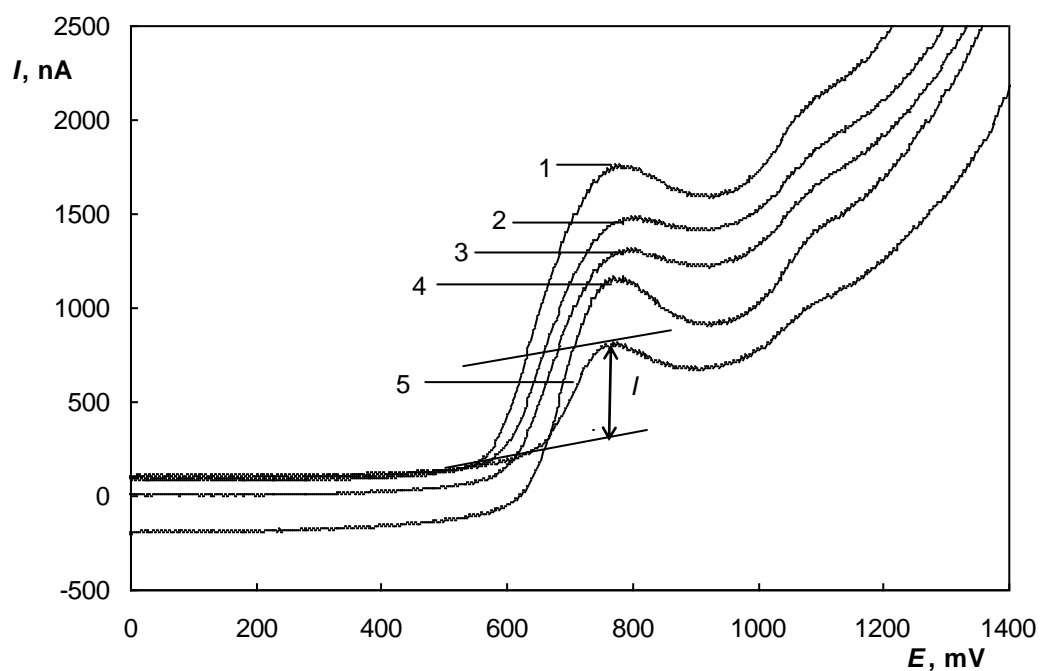
Závislost výšky vlny (I) na koncentraci floretinu v rozmezí $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

**Obr. 3.7**

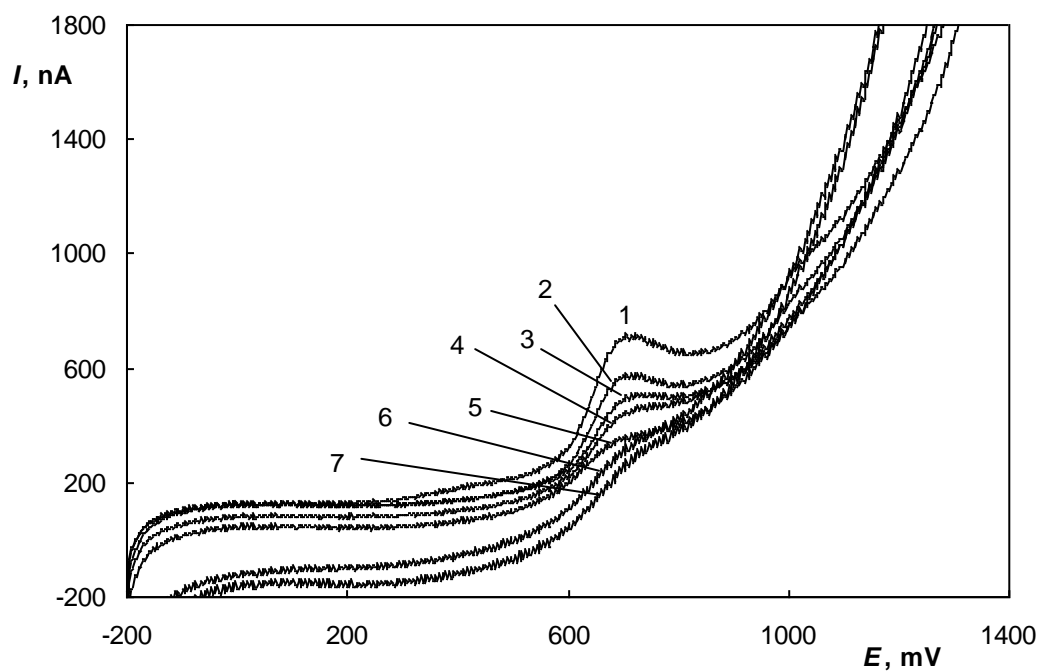
Závislost proudu vln (I) na koncentraci floretinu v rozmezí $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

**Obr. 3.8**

Závislost proudu vln (I) na koncentraci flocetinu v logaritmické formě v rozmezí $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

**Obr. 3.9**

Voltamogramy flocetinu, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.
Koncentrace flocetinu: $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

**Obr. 3.10**

Voltamogramy floretinu, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

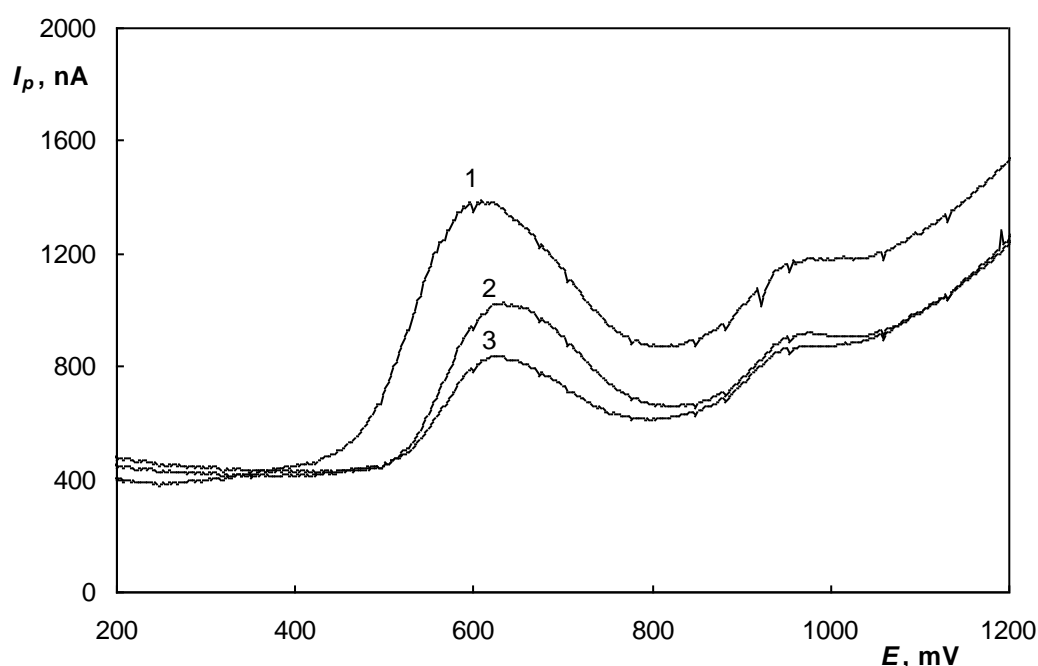
Koncentrace floretinu: $1\cdot 10^{-5}$ (1), $8\cdot 10^{-6}$ (2), $6\cdot 10^{-6}$ (3), $4\cdot 10^{-6}$ (4), $2\cdot 10^{-6}$ (5), $1\cdot 10^{-6}$ (6), $8\cdot 10^{-7}$ (7) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.3 DP voltametrie

3.3.1 Vliv pH na voltametrické chování floretinu

Při studiu voltametrického chování roztoku floretinu na CPE, bylo zjištěno, že při opakovaných měřeních dochází k pasivaci elektrody (Obr. 3.11), proto byl její povrch před každým měřením mechanicky obnovován otřením uhlíkové pasty do filtračního papíru navlhčeného destilovanou vodou.

Vliv pH na voltametrické (DPV) chování floretinu byl sledován ve směsi BR pufru v rozsahu pH 2 až 12 a methanolu v poměru 1:1. Koncentrace floretinu byla vždy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Studovaná látka poskytovala v celém rozsahu pH dva píky. Hodnoty pH BR pufru, proudů píků (I_p) a potenciálů píků (E_p) uvádí Tab. 3.4. Získané voltamogramy pro DPV jsou uvedeny na Obr. 3.12 a Obr. 3.13. Jako optimální pH pro měření koncentračních závislostí bylo zvoleno pH 5, při kterém byl první pík nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný.



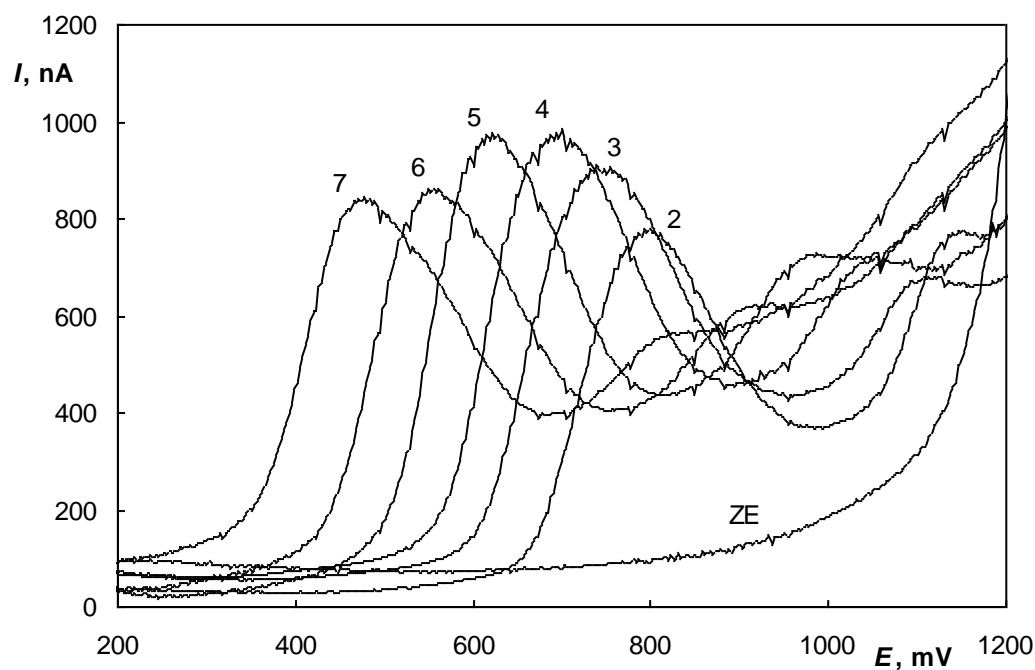
Obr. 3.11

Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu: povrch po mechanickém obnovení (1), opakovaná měření bez obnovy povrchu elektrody (2, 3). Měřeno v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1 metodou DPV na CPE, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

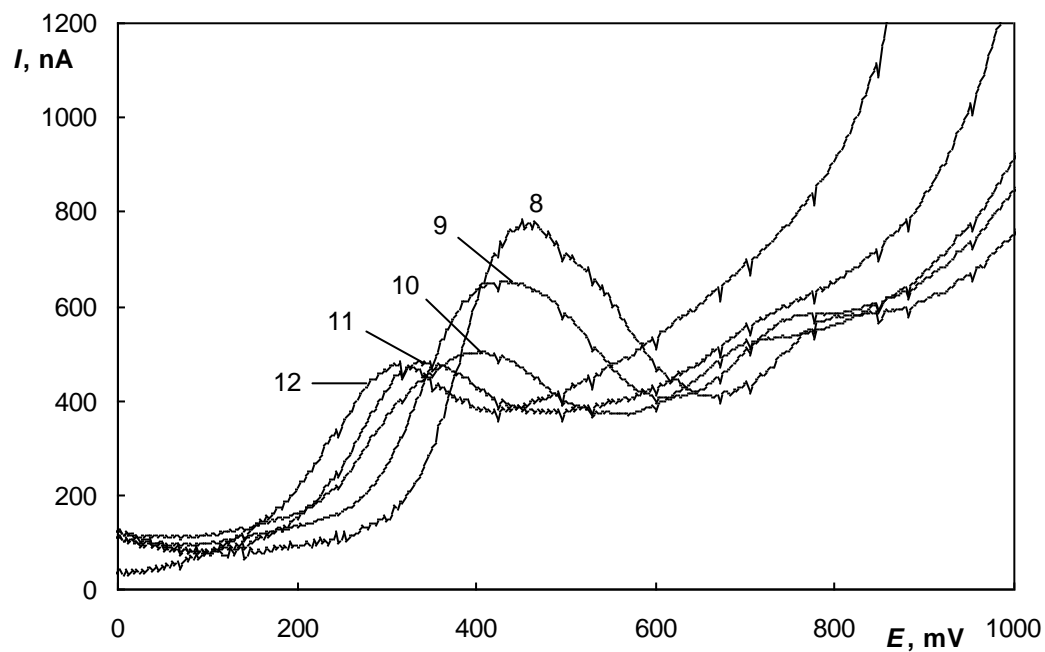
Tab. 3.4

Závislost proudů píků (I_p) a potenciálů píků (E_p) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu na pH BR pufru s methanolem v poměru 1:1. Měřeno metodou DPV na CPE.

pH	I_p nA	E_p mV
2	780	798
3	911	738
4	977	699
5	986	621
6	862	555
7	846	477
8	778	465
9	652	432
10	503	402
11	485	348
12	481	315

**Obr. 3.12**

Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE-základní elektrolyt BR pufr o pH 2) a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

**Obr. 3.13**

Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE-základní elektrolyt BR pufr o pH 2) a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.3.2 Kalibrační závislost

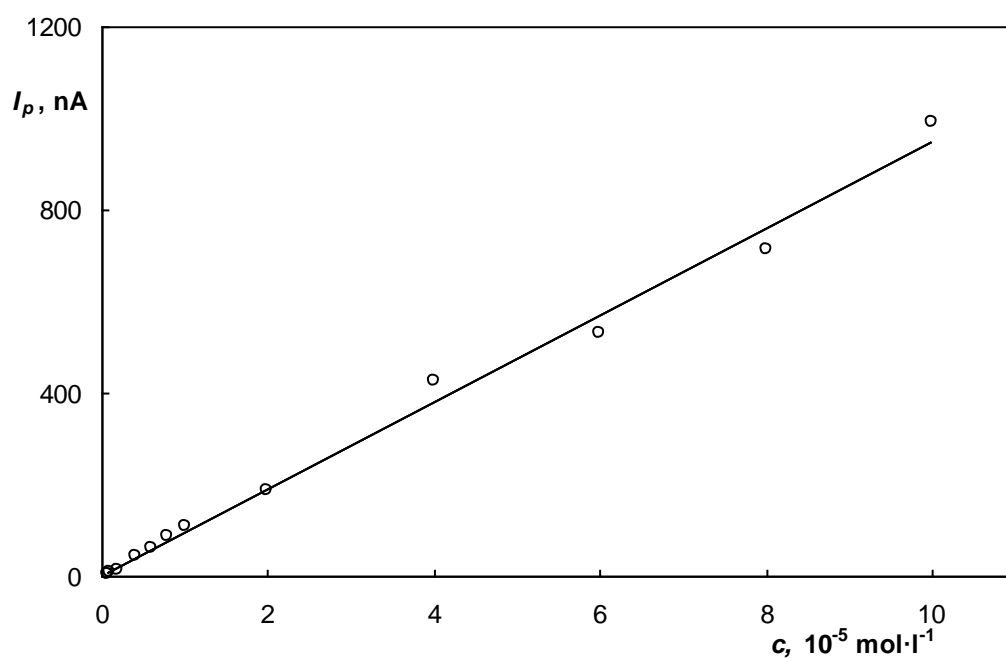
Kalibrační závislost floretinu byla proměřena metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1 v rozsahu koncentrací $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Získané závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů píků byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Parametry kalibračních křivek floretinu jsou uvedeny v Tab. 3.5. Parametry kalibrační křivky floretinu v logaritmické formě (uvedeny pod Tab. 3.5) potvrzují linearitu závislosti (směrnice je blízká hodnotě 1). Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v rozmezí koncentrací $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je uvedena na Obr. 3.14, závislost v nejnižším koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je uvedena na Obr. 3.15. Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v logaritmické formě v rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je uvedena na Obr. 3.16. DP voltamogramy floretinu na CPE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou znázorněny na Obr. 3.17, DP voltamogramy pro rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu jsou na obrázku 3.18. Limit detekce byl vypočítán z rovnice regrese jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky z hodnot naměřených pro nejnižší koncentraci, tedy pro koncentraci $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu. Limit detekce byl stanoven na $7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

Tab. 3.5

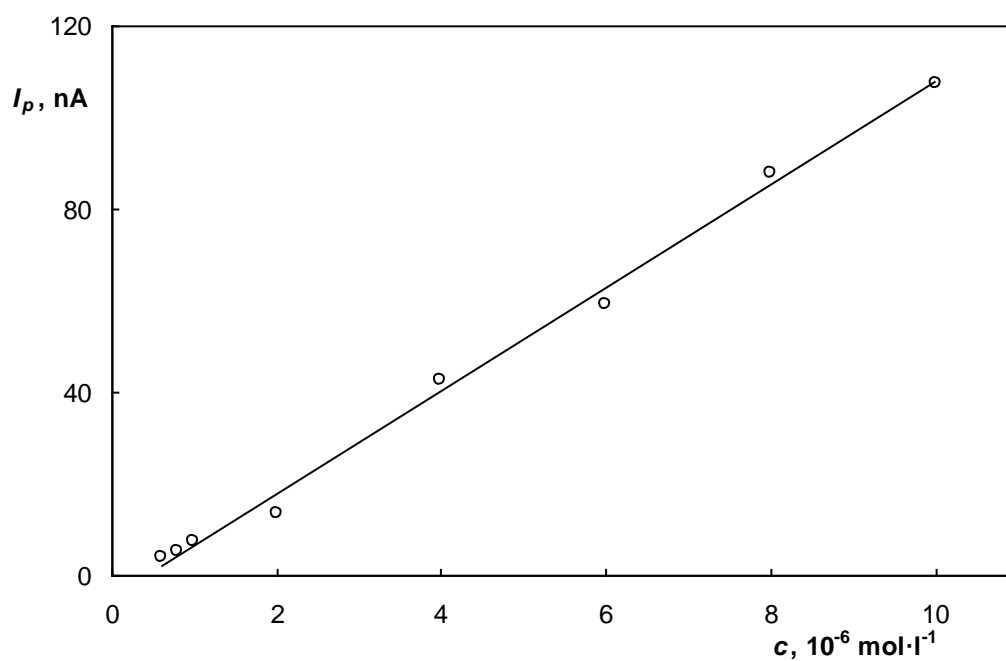
Parametry kalibračních křivek floretinu, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	9,5	0,6	0,9789	—
$1 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-7}$	11,2	-4,6	0,9956	—
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	9,5	2,0	0,9935	$7,3 \cdot 10^{-7}$

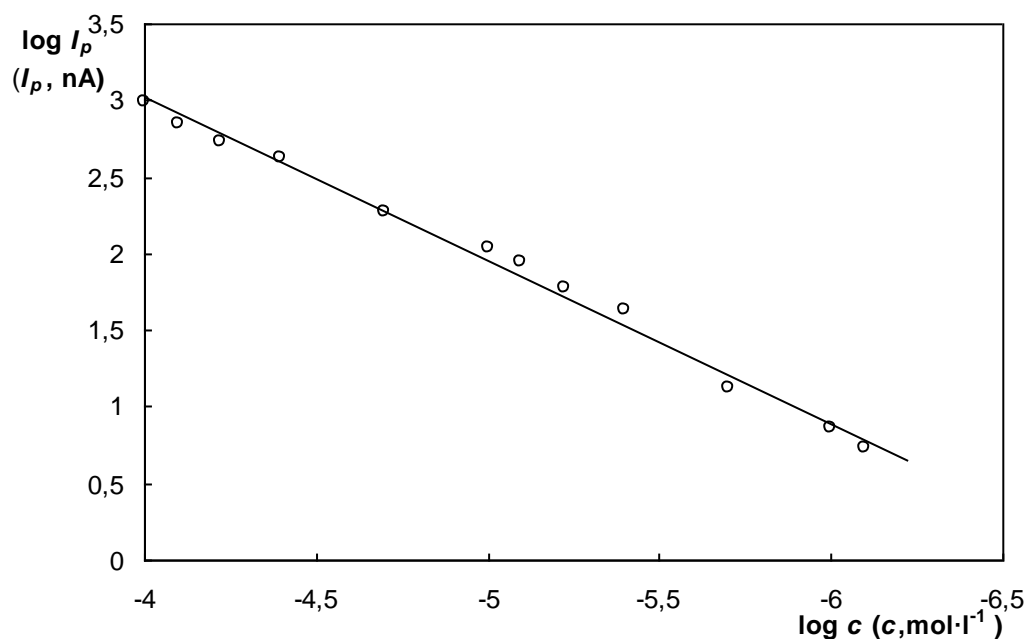
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 1,06$; $b = 7,27$; $R^2 = 0,9928$.

**Obr. 3.14**

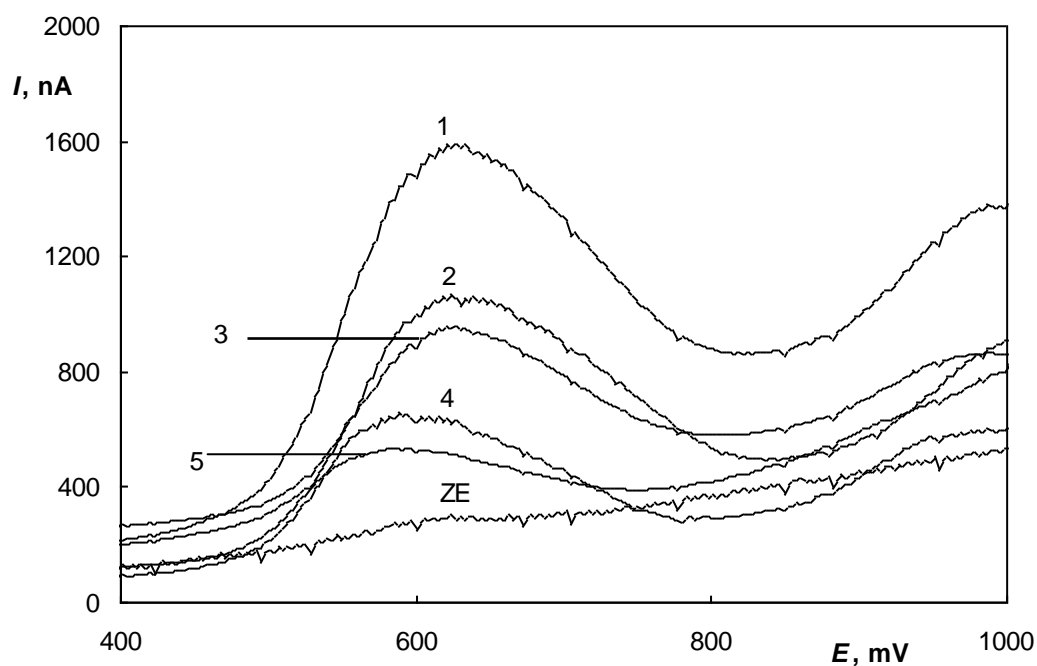
Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v rozmezí $6\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

**Obr. 3.15**

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v rozmezí $6\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

**Obr. 3.16**

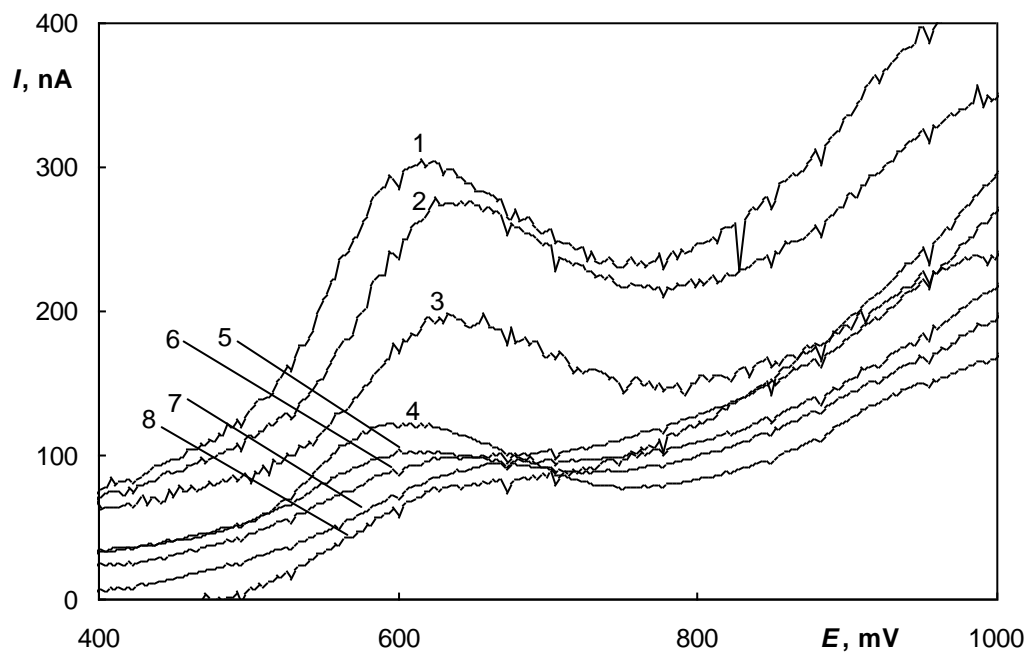
Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci flocetinu v logaritmické formě v rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

**Obr. 3.17**

Voltamogramy flocetinu, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Koncentrace flocetinu: $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Křivka ZE- základní elektrolyt BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1.

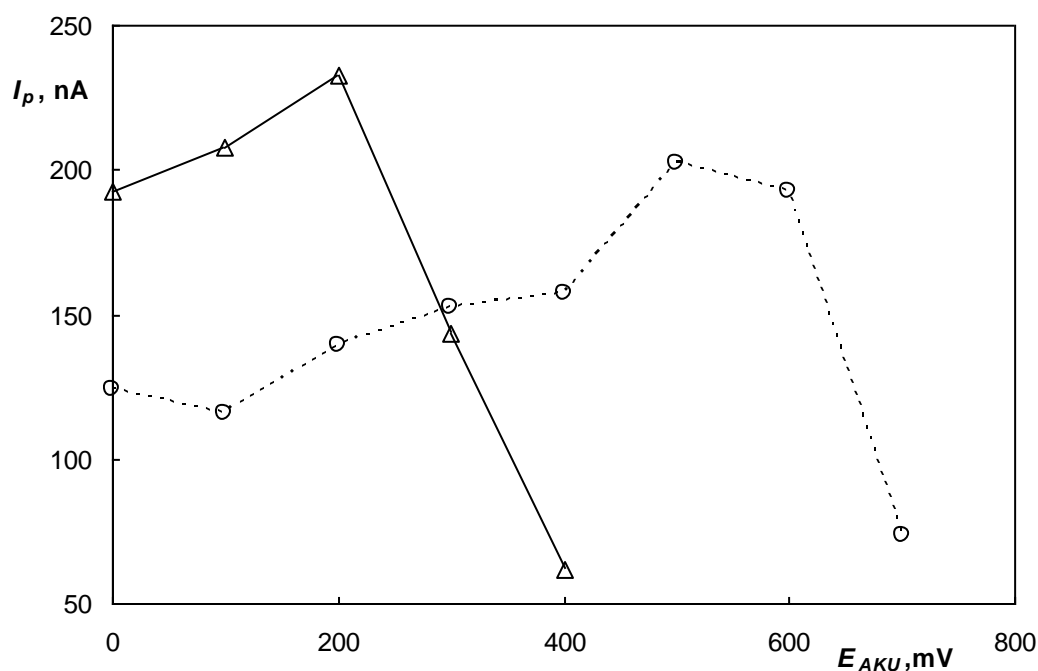
**Obr. 3.18**

Voltamogramy floretinu, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 1:1, rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Koncentrace floretinu: $1\cdot 10^{-5}$ (1), $8\cdot 10^{-6}$ (2), $6\cdot 10^{-6}$ (3), $4\cdot 10^{-6}$ (4), $2\cdot 10^{-6}$ (5), $1\cdot 10^{-6}$ (6), $8\cdot 10^{-7}$ (7), $6\cdot 10^{-7}$ (8) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

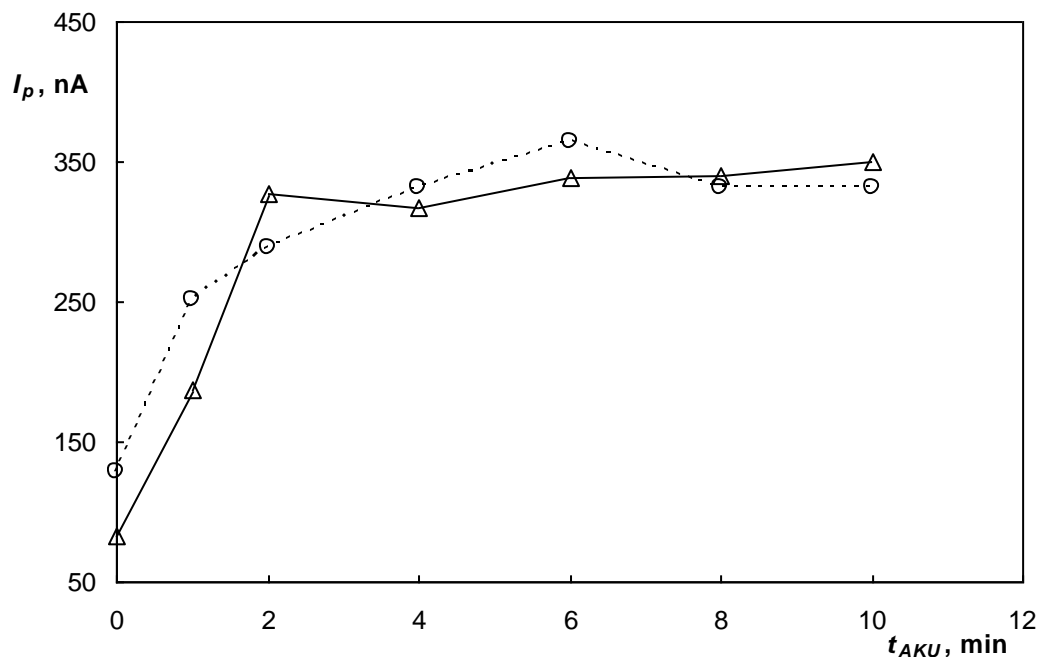
3.4 Adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie

Akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody byla studována za účelem snížení limitu detekce floretinu při DPV na CPE. Akumulace studované látky na povrchu pracovní elektrody vede ke zvýšení citlivosti analytické metody. Možnost akumulace floretinu byla zkoumána v BR pufru o pH 5 a 9 s methanolem v poměru 95:5. Akumulace analytu na CPE byla studována v míchaném roztoku o koncentraci $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu metodou DPV. Sledovány byly výšky píků při změně potenciálu akumulace, čas akumulace byl vždy 1 minuta. Závislosti pro pH 5 a 9 jsou uvedeny na Obr. 3.19. Z tohoto měření byly jako nejvhodnější zvoleny potenciály akumulace 500 mV pro pH 5 a 200 mV pro pH 9, při kterých byla dále studována závislost proudu píků na čase akumulace (Obr. 3.20).



Obr. 3.19

Závislost proudu píků (I_p) na potenciálu akumulace, měřeno metodou AdS DPV na CPE v roztoku $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu v prostředí BR pufru o pH 5 (\circ) a pH 9 (Δ) a methanolu v poměru 95:5, čas akumulace 1 min, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

**Obr. 3.20**

Závislost proudu píků (I_p) na čase akumulace, měřeno metodou AdS DPV na CPE v roztoku $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu v prostředí BR pufru o pH 5 (○) a pH 9 (△) a methanolu v poměru 95:5, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$: pH 5, $E_{AKU} = 500 \text{ mV}$, pH 9, $E_{AKU} = 200 \text{ mV}$.

Kalibrační křivka akumulací (Obr. 3.21) byla proměřena v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 95:5 v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu při čase akumulace 6 minut a při potenciálu 500 mV. Na Obr. 3.22 je uvedena závislost proudu píků (I_p) na koncentraci floretinu v logaritmické formě v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Získané závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry kalibrační křivky jsou uvedeny v Tab. 3.6. Parametry kalibrační křivky v logaritmické formě jsou uvedeny pod tabulkou. DP voltamogramy floretinu v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou uvedeny na Obr. 3.23. Limit detekce byl vypočítán z rovnice regrese jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky z hodnot naměřených pro nejnižší koncentraci, tedy pro koncentraci $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

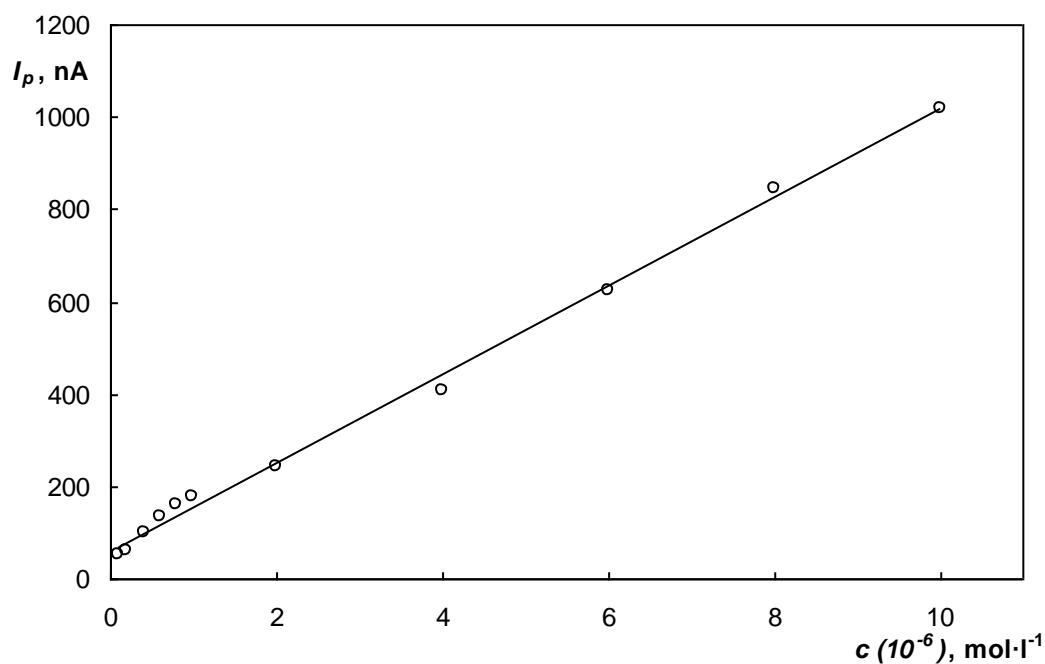
Bylo prokázáno, že studovaná látka se nejlépe akumuluje při potenciálu 500 mV a čase akumulace 6 minut. Při daných podmínkách bylo dosaženo nižšího limitu detekce než při stanovení bez akumulace. Nicméně z porovnání směrnice a limitu detekce je jasné, že akumulace není příliš výrazná. S využitím akumulace byla stanovena hodnota limitu detekce na $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

Tab. 3.6

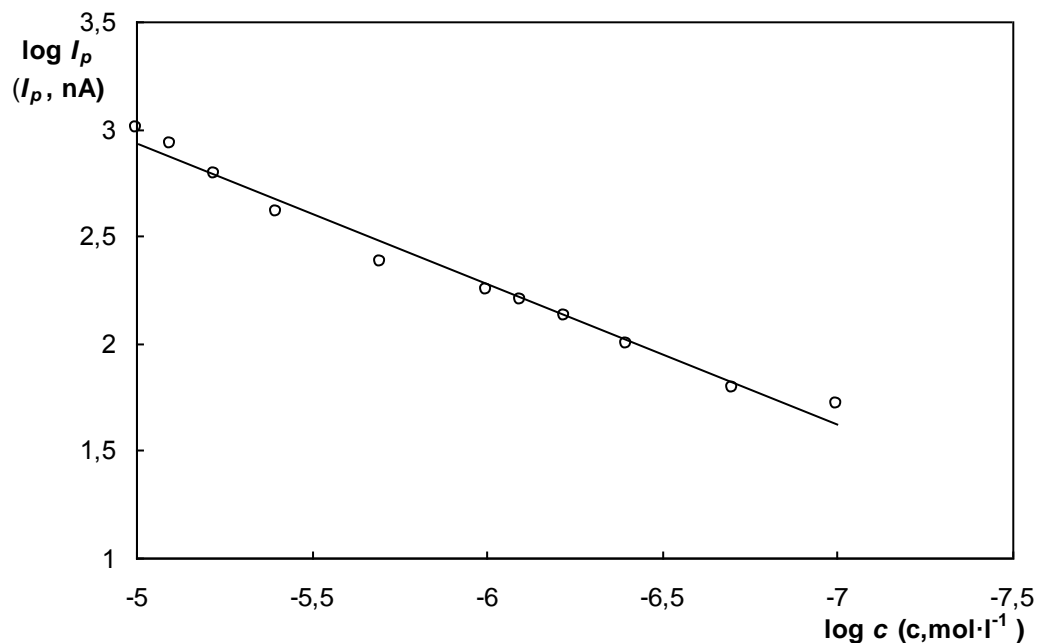
Parametry kalibrační křivky a kalibrační křivky v logaritmické formě akumulace floretinu, měřeno metodou AdS DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 95:5, čas akumulace 6 minut, potenciál akumulace 500 mV.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-5}$	95,9	58,9	0,9968	$4,4\cdot 10^{-7}$

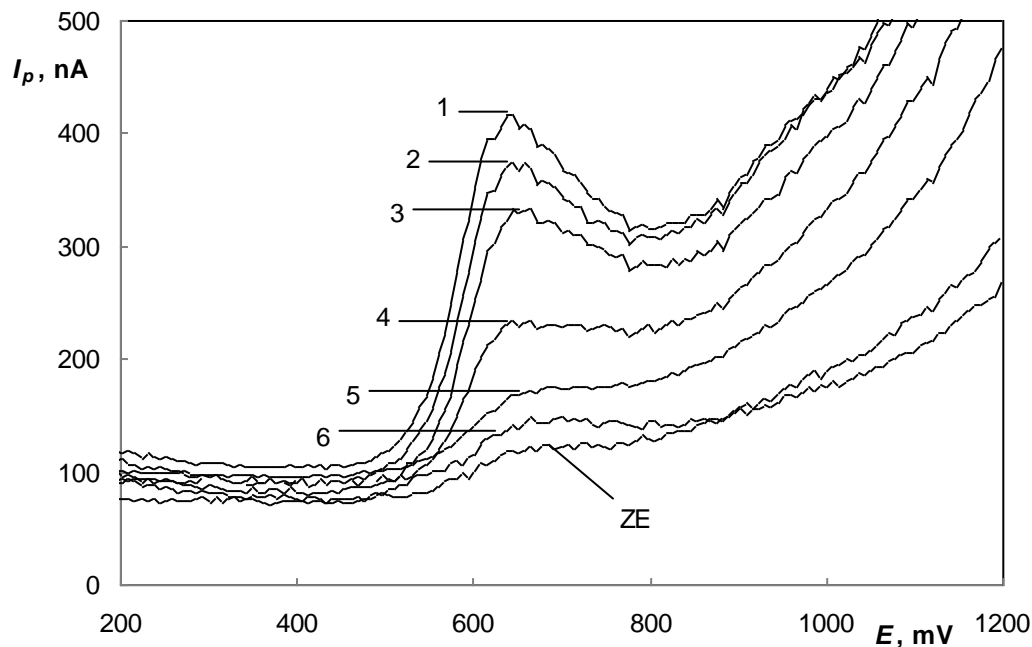
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 0,66$; $b = 6,21$; $R^2 = 0,9835$.

**Obr. 3.21**

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v rozmezí $1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, měřeno metodou AdS DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 95:5, čas akumulace 6 minut při potenciálu 500 mV.

**Obr. 3.22**

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci floretinu v logaritmické formě v rozmezí $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou AdS DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 95:5, čas akumulace 6 minut při potenciálu 500 mV.

**Obr. 3.23**

Voltamogramy floretinu, měřeno metodou AdS DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 5 a methanolu v poměru 95:5, čas akumulace 6 minut při potenciálu 500 mV. Koncentrace floretinu: $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4), $2 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-7}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Křivka ZE-základní elektrolyt BR pufr o pH 5.

4. Závěr

Byla ověřena stálost zásobního roztoku floretinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu, a to minimálně po dobu měření tj. 20 dní. Roztok byl po celou dobu uchováván v temnu v chladničce.

Bylo prostudováno voltametrické chování floretinu na uhlíkové pastové elektrodě metodou DPV a DCV. Závislost proudu (I_p) a potenciálu píku (E_p) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu na pH vodné složky základního elektrolytu byla sledována v rozmezí pH 2 – 12. Jako optimální pH BR pufru pro obě metody bylo zvoleno pH 5 vždy s methanolem v poměru (1:1), kdy byl pík nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný.

Dále byly proměřeny kalibrační závislosti v rozmezí koncentrací $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro DPV a v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu metodou DCV. Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny metodou lineární regrese. Z kalibračních křivek byly vypočteny limity detekce. Získané limity detekce jsou uvedeny v Tab. 4.1.

Tab. 4.1

Limity detekce floretinu pro voltametrické metody stanovení

Metoda stanovení floretinu (prostředí BR pufru o pH 5 s methanolem 1:1)	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Diferenčně pulzní voltametrie (DPV)	$7,3 \cdot 10^{-7}$
DC voltametrie (DCV)	$1,0 \cdot 10^{-6}$

Byla studována akumulace floretinu na CPE metodou DPV z důvodu snížení limitu detekce. Akumulace byla studována v roztoku floretinu o koncentraci $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 5 a 9 a methanolu v poměru 95:5. Jako optimální potenciál akumulace byl zvolen potenciál 500 mV pro pH 5 a 200 mV pro pH 9, při kterých byla studována závislost proudu píků na čase akumulace. Jako optimální podmínky akumulace byly zvoleny: BR pufr o pH 5 s methanolem v poměru 95:5, potenciál akumulace 500 mV a doba akumulace 6 minut. Kalibrační křivka proměřena při stanovených optimálních podmínkách v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

V důsledku akumulace analytu došlo ke snížení limitu detekce na $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ floretinu.

Metodou CV byla dále zjišťována reverzibilita studované reakce. Z výsledků vyplývá, že reakce floretinu probíhá při měřených podmínkách ireverzibilně. Nebyla prokázána přímá úměra výšky píku na rychlosti polarizace ani na odmocnině z rychlosti polarizace, z čehož vyplývá, že děj je řízen současně difúzí i adsorpcí.

Ze studia záznamu 5 po sobě jdoucích cyklech v jednom měření je zřejmé, že během měření dochází k pasivaci elektrody.

5. Literatura

- 1 Sen, S.; Chakraborty, R.; Sridhar, C.; Reddy, Y. S. R.; De, B.: Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **3**, 91–100 (2010).
- 2 Das Sarma, A.; Mallick, A. R.; Ghosh, A. K.: Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research* **1**, 185–192 (2010).
- 3 Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin; M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44-84 (2007).
- 4 Gómez-Zavaglia A.: Quantum chemical calculations in the structural analysis of phloretin. *Journal of Molecular Structure* **930**, 187–194 (2009).
- 5 Rezk, B.M.; Haenen, G.R.M.M.; van der Vijgh, W.J.F; Bast, A.: The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**, 9-13 (2002).
- 6 Crespy, V.; Aprikian, O.; Morand, Ch.; Besson, C.; Manach, C., Demigné, Ch.; Rémésy, Ch.: Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. *Journal of Nutrition* **131**, 3227-3230 (2001).
- 7 Shao, X.; Bai, N.; He, K.; Ho, Ch.-T.; Yang, Ch. S.; Sang, S.: Apple Polyphenols, Phloretin and Phloridzin: New Trapping Agents of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 2042-2050 (2008).
- 8 Paulová, H.; Bochořáková, H.; Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy* **98**, 174-179 (2004).
- 9 Rupasinghe, H.P.V.; Yasmin, A.: Inhibition of oxidation of aqueous emulsion of omega-3 fatty acids and fis oil by phloretin and phloridzin. *Molecules* **15**, 251-257 (2010).
- 10 Xü, K.; Lü, H.; Qü, B.; Hu Shan, H.; Song, J. :High-speed counter-current chromatography preparative separation and purification of phloretin from apple tree bark. *Separation and Purification Technology* **72**, 406-409 (2010).

- 11 Mari, A.; Tedesco, I.; Nappo, A.; Russo, G.L.; Malorni, A.; Carbone, V.: Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. *Food Chemistry* **123**, 157-164 (2010).
- 12 Escarpa, A.; González, M.C.: High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A* **823**, 331-337 (1988).
- 13 Remsberg, C.M.; Good, R.L.; Davies, N.M.: Ingredient Consistency of Commercially Available Polyphenol and Tocopherol Nutraceuticals. *Pharmaceutics* **2**, 50-60 (2010).
- 14 Prasain, J.K.; Wang, CH.-CH.; Barnes, S.: Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine* **37**, 1324-1350 (2004).
- 15 Adams, R.N.: Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576-1576 (1958).
- 16 Švancara, I.; Vytřas, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J.: Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis* **21**, 7-28 (2009).
- 17 Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301-305 (2002).
- 18 Zima, J.: Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek, v knize: Klinická a toxikologická analýza (Štulík, K., Zima, T., ed.), kap. 18, str. 124-130, Praha 2008 (ISBN: 978-80-86238-51-7).
- 19 Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490-499 (1999).
- 20 Zima, J.; Švancara, I.; Barek, J.; Vytřas, K.: Recent Advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204-227 (2009).
- 21 www.sigmaaldrich.com (staženo 8. 3. 2010).
- 22 www.cosmobio.co.jp (staženo 8. 3. 2010).

- 23 Barek J.; Opekar F.; Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha (2005).