

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Magda Zlámalová

**ELEKTROCHEMICKÝ SENZOR S ELEKTRODOU
MODIFIKOVANOU DERIVÁTEM FTALOCYANINU PRO
STANOVENÍ SIRNÝCH LÁTEK**

Electrochemical sensor with electrode modified by
phthalocyanine derivative used for determination of sulfur
compounds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Školitel-konzultant: Ing. Pavel Janda, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Klíčová slova: vysoce orientovaný pyrolytický grafit, porfyriziny, sulfan, cystein, nafion, cyklická voltametrie, mikroskopie atomárních sil

Keywords: highly oriented pyrolytic graphite, porphyrazines, hydrogen sulphide, cysteine, nafion, cyclic voltammetry, atomic force microscopy

Abstrakt

V diplomové práci jsou prezentovány výsledky studie tenkého filmu tvořeného N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinátem kobaltu, deponovaného elektrochemicky na povrchu vysoce orientovaného pyrolytického grafitu. Elektroda projevila elektrokatalytickou aktivitu k oxidaci sulfidových aniontů a a cysteinu. Byla studována možnost zvýšení stability imobilizovaného filmu nafionem. Tato elektroda byla použita pro analytické stanovení sulfidových aniontů a cysteinu.

Abstract

The diploma thesis presents the results of the studies of thin layer film composed of N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt. This film is deposited on the surface of highly oriented pyrolytic graphite. The modified electrode displayed electrocatalytic activity to oxidation of sulphide anions and cysteine. It has been studied the possibility of enhancement of stability of the immobilised film by the nafion. This electrode was used for the analytical determination of sulphide anions and cysteine.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne 23. srpna 2012

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především svým školitelům, Ing. Pavlu Jandovi, CSc. a RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady i připomínky, trpělivost a čas, který mi byli ochotni věnovat.

Děkuji svým kolegyním z laboratoře ÚFCH JH AV ČR RNDr. Haně Tarábkové, Ph.D., Mgr. Věře Hudské a Mgr. Monice Klusáčkové za jejich vstřícnost a ochotu mi s čímkoliv pomoci.

Mé poděkování patří také Yu-Hong Tse (Department of Chemistry, York University, Toronto) za poskytnutý materiál, bez kterého by tato práce nebyla možná.

Na závěr bych ráda poděkovala svým blízkým, kteří mi byli velkou oporou po celou dobu studia, především děkuji své mamince za finanční a psychickou podporu.

Obsah

1	Úvod, teoretická část	8
1.1	Cíl diplomové práce	8
1.2	Sulfan, sulfidové anionty	8
1.2.1	Vlastnosti sulfanu	8
1.2.2	Fyziologické a toxikologické účinky sulfanu	10
1.2.3	Výskyt sulfanu, životnost v atmosféře	13
1.2.4	Možné metody stanovení sulfidových anionů v roztoku	15
1.3	Cystein	17
1.3.1	Vlastnosti a fyziologické účinky cysteinu	17
1.3.2	Možné metody stanovení cysteinu	18
1.4	Vysoce uspořádaný pyrolytický grafit	20
1.5	Ftalocyaniny a porfyriziny	22
1.5.1	Obecné vlastnosti	22
1.5.2	<i>N,N',N'',N'''</i> -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinát kobaltu(II)	23
2	Experimentální část	26
2.1	Použité chemikálie	26
2.2	Použité metody měření	27
2.2.1	Cyklická voltametrie	27
2.2.2	Mikroskopie atomárních sil	27
2.3	Experimentální provedení	28
2.3.1	Čištění a udržování elektrod a komponent měrné cely	28
2.3.2	Elektrochemická depozice Co(Tmtppa) na HOPG	28
2.3.3	Nafion	28
2.4	Sběr a zpracování dat	29
3	Výsledky a diskuze	30
3.1	Modifikace bazální roviny HOPG	30
3.2	Cyklická voltametrie filmu Co(Tmtppa)	32
3.2.1	Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH 4,3	33
3.2.2	Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH 7,0	36
3.2.3	Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH 11,0	39
3.2.4	Vliv nafionové membrány na odezvu Co(Tmtppa)	42

3.3	Studium elektrokatalytické aktivity Co(Tmtppa) k sulfidické skupině.....	45
3.4	Stanovení sulfidových aniontů	49
3.5	Studium elektrokatalytické aktivity Co(Tmtppa) k cysteinu	52
3.6	Stanovení cysteinu.....	57
3.7	Nanomorfologie porfyrizinové elektrody	58
4	Závěr.....	60
	Literatura	62

Seznam zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil	
c	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
Co(Tmtppa)	<i>N,N',N'',N'''</i> -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinát kobaltu	
E	potenciál	[V]
E_p	potenciál píku	[V]
E_{pa}	potenciál anodického píku	[V]
E_{pk}	potenciál katodického píku	[V]
E_{pL}	potenciál píku porfyrizinátového ligandu	[V]
HOPG	vysoce orientovaný pyrolytický grafit	
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie	
I	proud	[A]
I_p	proud píku	[A]
I_{pa}	proud anodického píku	[A]
I_{pk}	proud katodického píku	[A]
K^+_{ATP}	ATP dependentní draselné kanály	
M	molární hmotnost	[g mol ⁻¹]
n	počet cyklů	
Q_{pa}	náboj vypočítaný z plochy anodického píku	[C]
Q_{pk}	náboj vypočítaný z plochy katodického píku	[C]
R	odpor	[Ω]
SCE	nasyčená kalomelová elektroda	
v	rychlost vkládání potenciálu na elektrodu	V s ⁻¹

1 ÚVOD, TEORETICKÁ ČÁST

1.1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na studium elektrokatalytické aktivity N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinátu kobaltu v reakci se sulfidovými anionty a thiolovou skupinou. Práce se věnuje zkoumání elektrochemických vlastností porfyrizinátem modifikované elektrody a vhodných reakčních podmínek s ohledem na její použití ke stanovení sulfidů a cysteinu ve vodných roztocích cyklickou voltametrií. Součástí práce je i mikroskopická studie nanomorfologie porfyrizinátového filmu.

Tato diplomová práce navazuje na předchozí studie elektrochemického chování N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinátu kobaltu [1,2].

1.2 SULFAN, SULFIDOVÉ ANIONTY

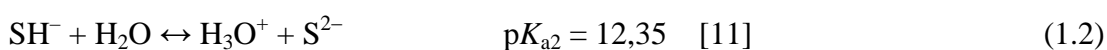
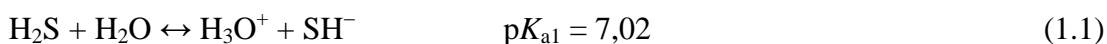
1.2.1 Vlastnosti sulfanu

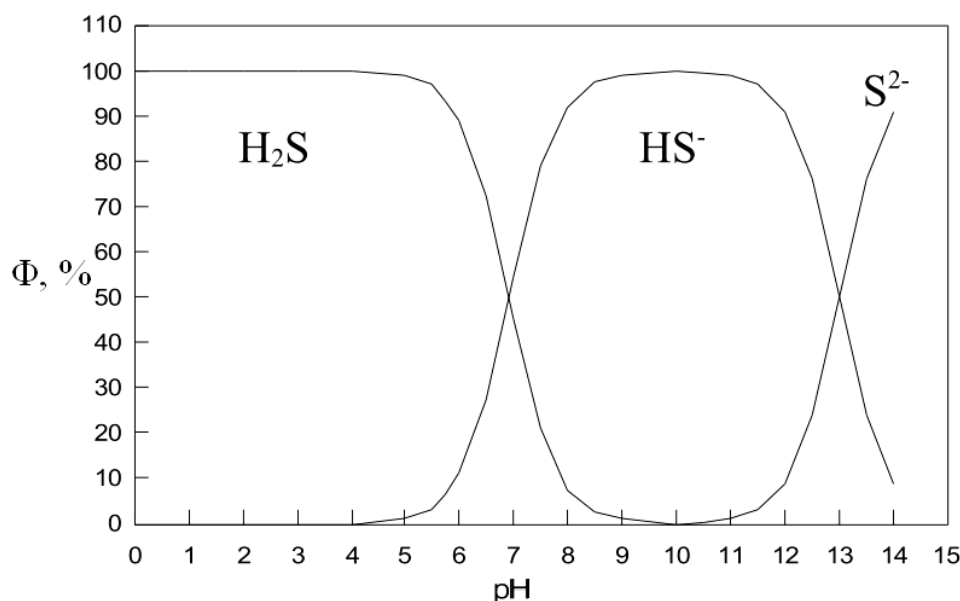
Sulfan (sirovodík, hydrogensulfid; CASN: 7783-06-4) je extrémně toxický, bezbarvý plyn, těžší než vzduch, nasládlé chuti a nepříjemného zápachu.

Jedná se o vysoce reaktivní plyn [3, 4], který způsobuje korozi kovů a má leptavé účinky na řadu materiálů [5, 6]. Hoří bledě modrým plamenem, teplota samovznícení je 260 °C. Tvoří výbušnou směs se vzduchem v širokém rozmezí koncentrace (4,3 – 46 % objemu ve vzduchu) [7].

Sulfan je rozpustný v řadě rozpouštědel – v kyselých i zásaditých vodných roztocích, alkoholech, acetonu, etheru, chloroformu, benzenu, aminech a dalších nevodných rozpouštědlech [5,8].

Je to slabá kyselina, která ve vodných roztocích disociuje ve dvou stupních [9,10] (obr. 1.1):



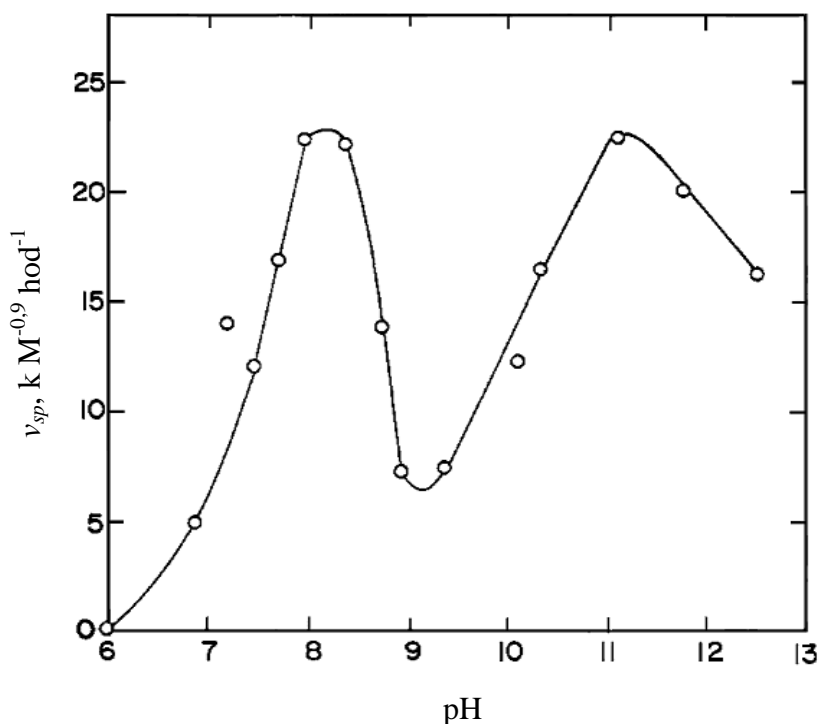


Obr. 1.1 Distribuce disociačních forem sulfanu Φ , % ve vodném roztoku v závislosti na pH (převzato z [12]).

Nasyčený vodný roztok sulfanu je kyselý, hodnota pH se pohybuje okolo 4, při 20 °C má koncentraci asi $0,11 \text{ mol dm}^{-3}$ při 0 °C je to $0,21 \text{ mol dm}^{-3}$ (cit. [8]).

Roztok sulfanu podléhá oxidaci vzdušným kyslíkem. V roztocích o $\text{pH} < 6$, v nichž je dominující formou H_2S , probíhá oxidace velice pomalu. Se vzrůstající hodnotou pH roste i koncentrace SH^- v roztoku, jež je rychle oxidována kyslíkem. Rychlost oxidace sulfanu roste přes dvě, hodnotou srovnatelná, maxima při $\text{pH} = 8,0$ a $11,0$. Tento zvláštní průběh (obr. 1.2) je vysvětlen působením produktů oxidace v roztoku [10]. Oxidací sulfanu vzniká síra, což vede k bledě žlutému či bílému zakalení roztoku. Hlavními produkty oxidace v roztoku o $\text{pH} > 8,5$ jsou thiosíran, dále vznikají tetrathionan, siřičitan a síran. Síra může dále reagovat s hydrogensulfidovými anionty za vzniku různých polysulfidů:





Obr. 1.2 Závislost sledované rychlosti oxidace sulfanu vzdušným kyslíkem na pH jeho vodného roztoku (převzato z [10]).

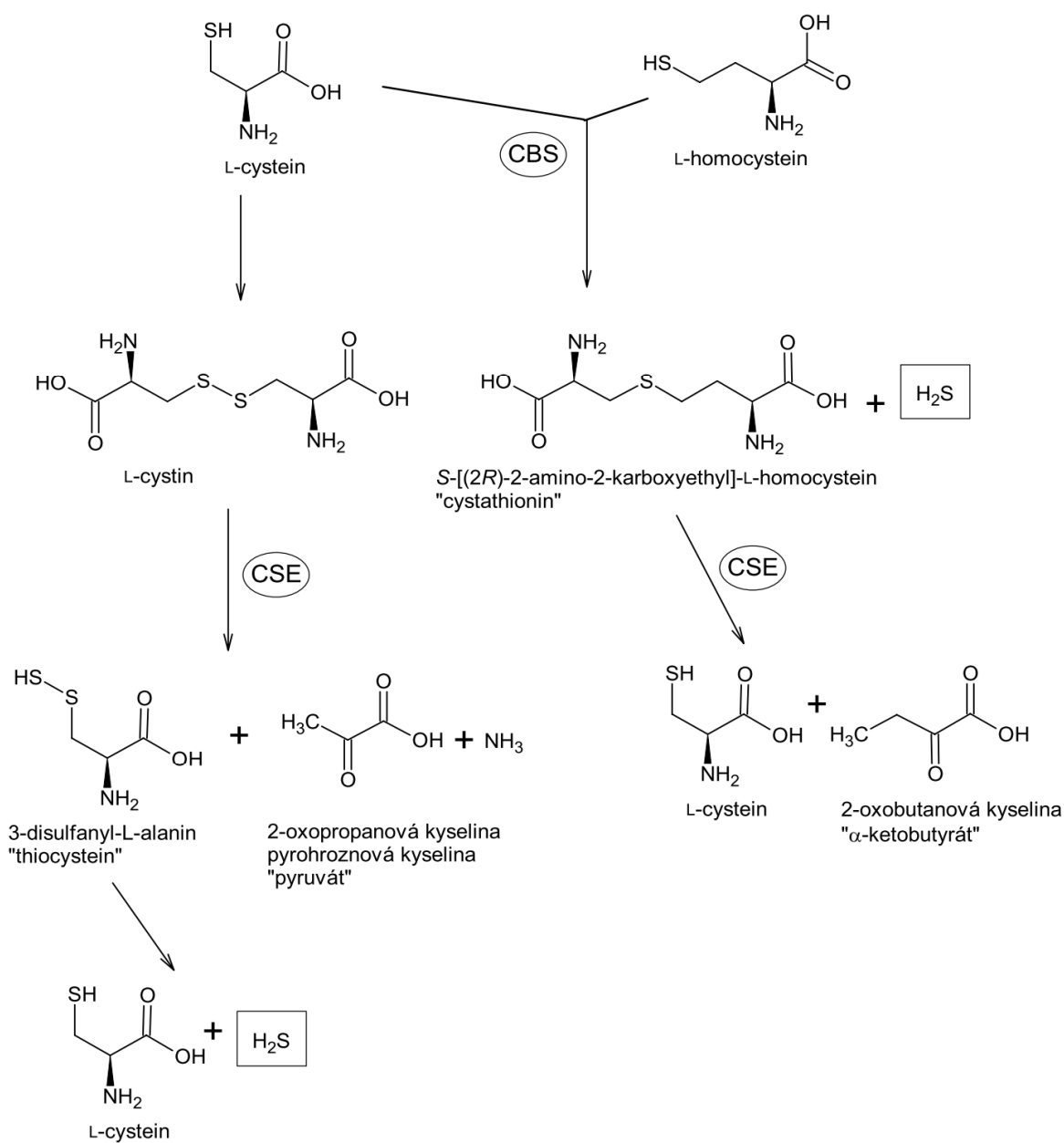
Nejodolnější proti oxidaci vzduchem jsou tedy kyselé roztoky, v nichž převažuje sulfan ve formě H_2S . Ovšem je třeba upozornit na fakt, že z kyselého roztoku sulfan mocně uniká ve formě plynu. Řešením je vytěsnění kyslíku z rozpouštědla bubláním dusíkem, heliem či argonem, popřípadě i další práce v atmosféře těchto plynů a to v zásaditých roztocích.

1.2.2 Fyziologické a toxikologické účinky sulfanu

Po staletí je sulfan dobře známý pro jeho toxické účinky, v posledních letech je ovšem notně zkoumán jako přirozená endogenní látka s možnými terapeutickými účinky. Fyziologická koncentrace sulfanu v lidské krvi se pohybuje v širším rozmezí $1\text{--}160 \mu\text{mol dm}^{-3}$ [13]. Rozdílné výsledky závisí na matici a použité metodě stanovení, poslední výzkumy ovšem poukazují na mnohem nižší koncentrace v desítkách nmol dm^{-3} [14].

Endogenní sulfan je produkován bakteriemi v intestinálním traktu a ústech (příčina zápachu z úst). Substrátem těchto bakterií jsou anorganické sírany a siřičitany a aminokyseliny obsahující ve své struktuře síru. Podstatná část endogenního sulfanu vzniká činností dvou pyridoxal-5-fosfát dependentních enzymů: cystathionin- β -synthasy a

cystathionin- γ -lyasy. Tyto dva enzymy mají společný substrát L-cystein, ovšem liší se cestou tvorby sulfanu (obr. 1.3) [15] i jejich tkáňovou distribucí. Zatímco cystathionin- β -synthasa převažuje v centrální nervové soustavě a zde tvořený endogenní sulfan je důležitým neuromodulátorem, cystathionin- γ -lyasa působí hlavně v kardiovaskulárním systému, tkáňově specifická je také exprese obou enzymů. Tyto enzymy byly detekovány také v buňkách jater, ledvin, střeva, slinivky, kůže a krevních lymfocytech. Zvýšená hladina endogenního sulfanu zpětně inhibuje aktivitu těchto enzymů.



Obr. 1.3 Schéma tvorby endogenního sulfanu činností cystathionin- β -synthasy (CBS) a cystathionin- γ -lyasy (CSE) (převzato z [15]).

Merksapropyruvátsulfotransferasa, třetí enzym, nejméně přispívající k endogenní tvorbě sulfanu, katalyzuje desulfuraci 3-merksapropyruvátu za vzniku sulfanu a pyruvátu. Tato reakce probíhá především v mitochondriích.

S oxidem dusnatým a oxidem uhelnatým patří sulfan do zvláštní skupiny signálních biologických molekul plynu endogenního původu – tzv. gasotransmiterů. Tyto molekuly díky svým malým rozměrům a lipofilitě pronikají snadno bez potřeby přenašeče přes buněčnou membránu a účastní se buněčné signalizace. Sulfan je v lipofilních rozpouštědlech asi pětikrát rozpustnější než ve vodě [7]. Ve srovnání s ostatními gasotransmitery ovšem prochází buněčnou membránou menší podíl, jelikož pouze asi třetina z celkového množství v organismu je ve formě nedisodiované molekuly.

Endogenní sulfan účinkuje v řadě fyziologických procesů [15–17]. V centrální nervové soustavě funguje jako přenašeč nervového signálu, také chrání neurony před oxidačním stresem aktivací K^+ ATP kanálů. Jeho hladina je při Alzheimerově chorobě poloviční, při Downově syndromu naopak trojnásobná.

Otevřením K^+ ATP kanálů buněk hladkého svalstva je omezen průchod draselných iontů, což má za následek relaxaci hladké svaloviny cév, střeva, dělohy. S aktivací K^+ ATP kanálů také souvisí významné snížení glukosou indukované sekrece insulinu. Inhibuje apoptózu a podporuje proliferaci a formování buněk, ovlivňuje tak buněčnou obnovu cév a celkové hojení. Plní regulační funkci při řízení krevního tlaku a v jistých případech má kardioprotektivní účinky (léčba ischemie myokardu). Je oboustranným regulátorem zánětlivých procesů, přičemž výsledný účinek závisí na dávce, rychlosti uvolňování H_2S do organismu a donorové látky. Obecně lze tvrdit, že při podání vhodné donorové látky, z níž je v organismu metabolizován sulfan ve velmi nízkých koncentracích, podporuje protizánětlivou reakci. Příliš vysoká koncentrace naopak inhibuje protizánětlivou reakci organismu.

Na základě mnoha prokázaných fyziologických a patofyziologických účinků se sulfan stává předmětem zájmu mnoha nových výzkumů. Ty předpokládají terapeutické účinky proti mnoha poruchám a nemocem jako jsou rakovina, srdeční selhání, transplantace orgánů, zánětlivá střevní onemocnění, Alzheimerova choroba, akutní infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, ateroskleróza, hypertenze, poruchy erekce, metabolický syndrom, diabetes či trombóza [19].

Ačkoliv charakteristický zápach po zkažených vejcích je pro člověka vnímatelný při velmi nízkých koncentracích [20] (0,5 ppb až 0,3 ppm), již kolem 100 ppm dochází k dočasnému otupění čichového nervu až úplné ztrátě čichu [21]. Tato koncentrace v okolní atmosféře už ovšem vyvolává toxické účinky na lidský organismus, sulfan se tak řadí mezi velmi nebezpečné plyny.

První zmínky o toxických účincích sulfanu, spojené s podrážděním a následným zánětem očí, se objevily již na počátku 17. století [22]. Postupně byl sulfan zkoumán dále pro jeho vysokou toxicitu [4, 20, 23, 24]. Svými toxickými účinky se podobá kyanidu, obě sloučeniny inhibují funkci enzymu cytochromoxidázy c – konečného akceptoru elektronů v procesu mitochondriálního dýchacího řetězce [25].

Nejčastějším a zároveň nejnebezpečnějším způsobem intoxikace je inhalace sulfanu. Nízké koncentrace (50–100 ppm) při chronické (dlouhodobé) expozici způsobují přetrvávající do značné míry subjektivní problémy v podobě méně závažných respiračních (kašel, dušnost, bolesti v krku) či neurologických obtíží (únava, bolesti hlavy, závratě, zvracení, poruchy koordinace, špatná paměť, trvalá ztráta čichu, poruchy osobnosti, halucinace).

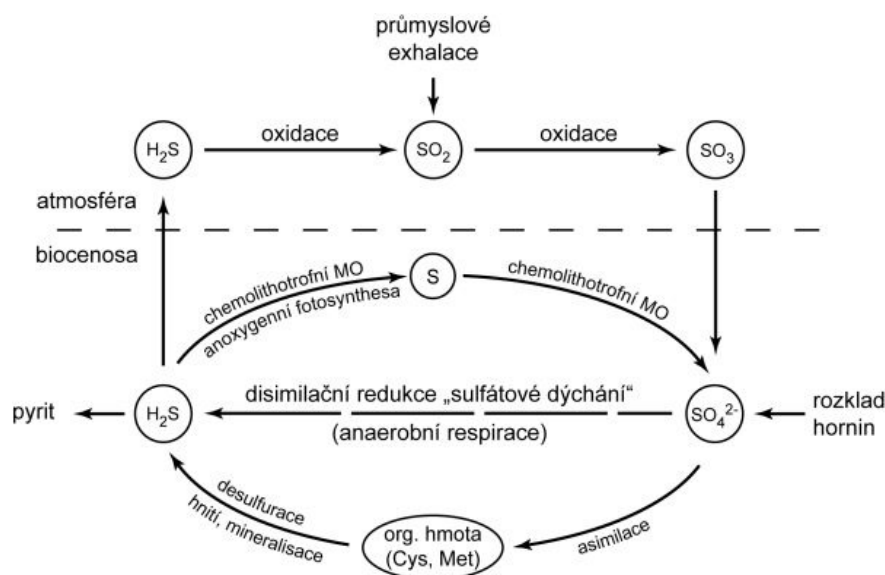
Naopak akutní expozice trvající sekundy až několik minut způsobuje akutní otravu, jež se projevuje především účinky na centrální nervovou soustavu v podobě bolestivých křečí a paralýzy respiračního centra. Ta vede k plicnímu edému, těžkému útlumu až zastavení dýchání. Následuje ztráta vědomí až smrt. Jelikož postižený není schopen spontánního obnovení dýchání, pro jeho záchranu je nutná umělé plicní ventilace až do snížení koncentrace sulfanu v krvi. Odbourání sulfanu z organismu probíhá především oxidačním metabolismem v mitochondriích na sulfát a thiosulfát, méně pak na methylmerkaptan a dimethylsulfát [15].

Nízké dávky sulfanu způsobují podráždění očí, zánět spojivek, slzení, poškození očí vedoucí až ke slepotě [26], lokální záněty epitelu nosu, hrdla, případně respiračního traktu.

1.2.3 Výskyt sulfanu, životnost v atmosféře

Průměrná koncentrace sulfanu v atmosféře se pohybuje kolem $0,3 \mu\text{g m}^{-3}$ (0,0002 ppm) [3].

Až 90 % sulfanu v životním prostředí je přírodního původu [27]. Sulfan je jednou z hlavních složek přírodního cyklu síry (Obr. 1.4.). Bakterie, houby a aktinomycey jej uvolňují během rozkladu organických sirných látek a přímé redukce síranů. V přírodě je součástí sirných pramenů, zemního plynu, ropy, vulkanických plynů. Ve zvýšené koncentraci se vyskytuje v oblastech s geotermální aktivitou. Činností bakterií vzniká ve stojatých nedostatečně prokysličených vodách jako jsou močály, bažiny, znečištěné stojaté vody a odpadní vody (stoky, kanály).



Obr.1.4 Schéma přírodního cyklu síry (převzato z [28]).

Antropogenní emise představuje 10 % z celkového množství uvolněného sulfanu. Je vedlejším produktem velkého množství průmyslových procesů, v ropných rafineriích, hutnictví, koželužství. Jeho významným zdrojem je proces čištění zemního plynu, ten může obsahovat až 90 % sulfanu [29]

Sulfan je v ovzduší postupně oxidován fotochemicky generovanými volnými radikály. Poločas rozkladu se pohybuje v rozmezí 12 až 37 hodin [27]. Tato doba je závislá na přítomnosti fotoaktivních polutantů, míře slunečního záření, teplotě a vlhkosti. S klesající teplotou a vlhkostí se délka životnosti molekuly prodlužuje. Hlavními produkty oxidace jsou oxid siřičitý a kyselina sírová.

1.2.4 Možné metody stanovení sulfidových anionů v roztoku

Ke stanovení sulfanu a sulfidových anionů je možné využít řady různých metod. Nejrozšířenější spektrofotometrická metoda stanovení sulfidů využívá reakce sulfidových aniontů s *N,N'*-dimethyl-*p*-fenylendiaminem v přítomnosti malého množství železitých iontů a kyseliny chlorovodíkové za vzniku methylenové modři [30, 31]. Modré zabarvení má absorpční maximum okolo 670 nm a jeho intenzita je přímo úměrná koncentraci sulfidových iontů. Ideální teplotou reakční směsi pro úplné vybarvení roztoku je 24 °C [32]. Jelikož reakce probíhá v kyselém prostředí, z roztoku během stanovení uniká sulfan, zároveň jsou rozloženy případné sulfidy kovů, což vede k nesprávným výsledkům. Tuto metodu není možné použít v zakalených či zabarvených vzorcích.

Méně rozšířená spektrometrická stanovení jsou založená na vzniku jiných chromogenních sloučenin jako je například molybdenová modř či Lauthova violet', ta poskytuje lepší zabarvení reakční směsi, s čímž souvisí i vyšší citlivost stanovení, příslušná reakce je navíc nezávislá na teplotě [31].

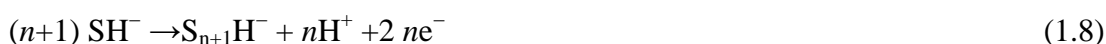
Fluorimetrické stanovení může být založeno na reakci s 2,2-pyridylbenzimidazolem [33]. Ten v nepřítomnosti sulfanu reaguje s rtuťnatými ionty obsaženými v reakční směsi, což vede ke zhášení fluorescence. Přítomnost sulfanu v roztoku se projeví zvýšením intenzity fluorescence. Častěji se využívá zhášení fluorescence komplexu fluoresceinu a octanu rtuťnatého vlivem reakce se sulfanem [34, 35].

U složitějších matric se využívají separační principy plynové chromatografie [36, 37], iontové chromatografie [38, 39], HPLC [40].

Ke stanovení hojně využívají elektrochemické metody stanovení založené na principech voltametrie [41,42] včetně polarografických technik [43–45], potenciometrie [46–48,52–54], amperometrie [55–62]. Nejčastěji využívané potenciometrické techniky jsou založeny na velmi nízké rozpustnosti sulfidu stříbrného, jehož disociace je ovlivněna přítomností sulfidových iontů v roztoku. Tohoto principu využívají Ag/Ag₂S elektroda, tedy stříbrná elektroda pokrytá sulfidem stříbrným [46]. Tato elektroda je vhodnou náhradou za komerčně dostupnou iontově selektivní elektrodu, její příprava je navíc dosti jednoduchá [47]. Pro potenciometrické stanovení sulfidových anionů byla vyvinuta řada iontově selektivních elektrod, jednou z možností je využití sulfidu stříbrného ve formě polykrystalické membrány.

Přímé stanovení je založeno na měření aktivity S^{2-} anionů, optimální pH se tak pohybuje nad hodnotou 12 [48]. Dalšími nevýhodami jsou dlouhá doba odezvy, odchylka od Nernstovské odezvy a možné poškození referenční elektrody sulfidovými ionty.

Pro testování optimálních podmínek stanovení sulfidů, pro zjištění oxidačních a redukčních mechanismů sulfidů se často využívá cyklické voltametrie. Nutno podotknout, že elektrochemické chování sulfidů bez přístupu kyslíku není dodnes naprosto objasněno. Je známo [11], že v alkalickém roztoku převažují hydrogensulfidové ionty, ty se oxidují na polysulfidy o různé délce řetězce:



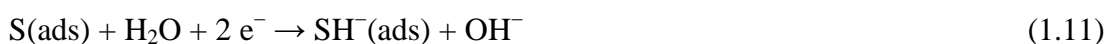
Hydrogensulfidové anionty mohou být adsorbované na povrch elektrody a oxidovat se na síru, jež tak zůstává při povrchu elektrody a postupně ji pasivuje:



Také polysulfidy se mohou oxidovat na síru:



Dále probíhají zpětné reakce produktů oxidace:



Zřejmě také dochází k disproportionaci vzniklých polysulfidů:

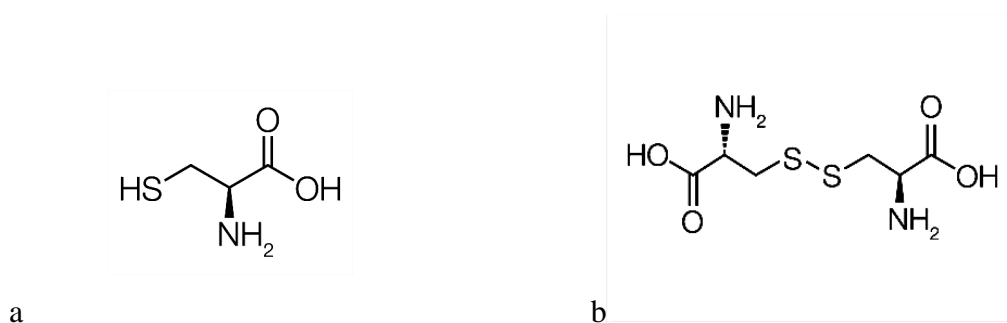


Zatímco nemodifikované elektrody mají několik omezení a nevýhod – nízkou citlivost, pomalý přenos elektronů, nutnost velkého přepětí na elektrodě, při níž k elektronovému transferu dochází, nízkou elektrokatalytickou aktivitu, oscilaci proudů

Tyto konjugáty jsou pak vylučovány ledvinami [65]. Nedostatek cysteinu a glutathionu způsobuje předčasnou arteriosklerózu, leukemii, rakovinu děložního čípku, cukrovku, poruchy jater, šedý zákal a jiné poruchy [66]. Naopak příliš vysoká hladina cysteinu a glutathionu byla zaznamenána u pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou nemocí a nemocných HIV [67].

Další důležitou látkou vznikající z cysteinu je methionin. Významným metabolitem cysteinu je sulfan (obr. 1.3).

Spojením dvou molekul cysteinu disulfidickým můstkem vzniká cystin (obr. 1.5b). V lidském organismu se relativně k cysteinu vyskytuje ve velmi malém množství. V případě potřeby je zpětně redukován na cystein. Běžně dochází v ledvinách k reabsorpci cysteinu i cystinu, v případě onemocnění zvaném cystinurie, je reabsorpce cystinu spolu s argininem, lysinem a ornithinem značně omezena. Tyto aminokyseliny se pak hromadí v moči a vzhledem ke své velmi nízké rozpustnosti cystin krystalizuje za vzniku ledvinových kamenů [65]. Jinou poruchou vstřebávání cystinu je cystinóza, při níž dochází k akumulaci cystinu v lyzozomech tkání ledvin, očí, jater, svalů, slinivky, mozku a v bílých krvinkách. Bez léčby dochází k úplnému selhání ledvin [68].



Obr. 1.5 Strukturální vzorce cysteinu (a) a cystinu (b).

1.3.2 Možné metody stanovení cysteinu

Ke stanovení cysteinu se využívá řady analytických metod založených na principech spektrofotometrie, elektrochemie a separačních technik.

Jelikož samotný cystein postrádá chromoforní skupinu, před spektrofotometrickým stanovením je nedíve nutná derivatizace chromogenním činidlem jako jsou například reakce s ninhydrinem [69], 4-vinylpyridinem [70], nitrilotriacetátem [71]. Také se používá spektrofotometrické stanovení založené na zhášení fluorescence komplexu 8-hydroxychinolin-5-sulfonové kyseliny s kadmiovými ionty [72] nebo například

na inhibici hemoglobinu, katalyzujícího reakci *o*-kresolu s peroxidem vodíku za vzniku fluorescenčního produktu [73].

Stanovení cysteinu ve složitějším vzorku umožňuje spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou [74, 75, 76] či elektrochemickou detekcí [77, 78]. Podobné výhody přináší i využití kapilární zónové elektroforézy [79]. Potřeba derivatizace, popřípadě i předchozí extrakce ovšem značně zvyšují jak dobu analýzy, tak i celkové náklady.

Nejčastěji používané elektrochemické techniky využívají rtuťových [44, 80] a amalgámových elektrod [81,82]. Stanovení jsou založená na adsorpci cysteinu na rtuť a jejich interakci za vzniku cysteinátů rtuti [83].

Přímá oxidace cysteinu na nemodifikovaných pevných elektrodách jako platina a zlato je pomalá a vyžaduje vysoké přepětí na elektrodě. S tím pak souvisí tvorba oxidů na povrchu elektrody, což vede k postupnému snižování odezvy elektrody. Tyto problémy řeší pulsní amperometrická detekce – konkrétně se jedná o sekvenci tří potenciálových schodů, první odpovídá anodické oxidaci cysteinu, po ní následuje oxidativní čištění anody a nakonec probíhá redukce oxidů na povrchu elektrody[84].

Odezva uhlíkových elektrod na přítomnost cysteinu je nízká. Především v posledních letech jsou uhlíkové elektrody modifikovány depozicí vhodných redoxních mediátorů a vznikají tak nové materiály s velmi dobrou katalytickou aktivitou vůči oxidaci cysteinu, odolné vůči pasivaci. Jedná se například o uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovanou hexakynoželezitanem kobaltnatým a měďnatým [85], salofenem kobaltnatým [86], kobaltnatými ftalocyaniny [87]; skelný uhlík modifikovaný nilskou modří [88], fullerenem C₆₀ [89], kobaltnatými ionty pod nafionovou membránou [90] nebo *N,N*-dimethylfenylen-1,4-diaminem [91]. Jako materiál s vysokou elektrokatalytickou aktivitou vůči cysteinu posloužil i skleněný uhlík modifikovaný uhlíkovými vlákny [92] či nanoporézním zlatem [93], nebo grafitová elektroda modifikovaná nanočásticemi zlata [94].

Tyto elektrody byly použity k analýzám, především pomocí cyklické voltametrie, méně již lineární voltametrie, diferenční pulsní voltametrie, amperometrie a potenciometrie.

K voltametrickému stanovení cysteinu byl také použit borem dopovaný diamant [95].

1.4 VYSOCE USPOŘÁDANÝ PYROLYTICKÝ GRAFIT

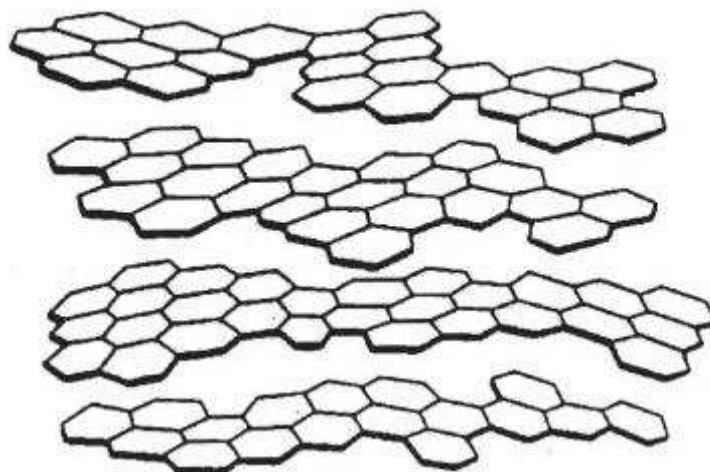
Vysoce uspořádaný pyrolytický grafit (highly oriented pyrolytic graphite, HOPG) je relativně inertní materiál na bázi uhlíku, který je intenzivně využíván pro své dobře definované strukturní vlastnosti v oblasti elektrochemických metod jako elektrodový materiál, matrice pro modifikátory či jako monochromátor ve spektrometrických metodách [96].

Vyrábí se vysokoteplotním rozkladem plynných uhlovodíků (acetylen, methan, propan) na zahřátém substrátu za vzniku pyrolytického grafitu. Ten se následným vystavením teplotě 2800–3000 °C a tlaku 30–50 MPa převede na orientovaný pyrolytický grafit a dalším anelováním při 3300–3600 °C a tlaku 1 MPa přemění na HOPG [97]. Tímto procesem dochází k eliminaci defektů ve struktuře pyrolytického grafitu, k nárůstu krystalů a trojrozměrného uspořádání rovin a ke snížení vzdáleností mezi jednotlivými rovinami.

Vzniká tak grafitový materiál s nejvíce uspořádanou trojrozměrnou krystalickou strukturou podobnou monokrystalu kovu. Je tvořen paralelními monovrstvami grafenu, v jednotlivých vrstvách jsou atomy uhlíku uspořádány do hexagonální krystalové soustavy s atomy uhlíku v sp^2 hybridizaci – každý atom je spojen se třemi dalšími atomy uhlíku silnou kovalentní σ -vazbou o délce 1,42 Å, což je vzdálenost velmi blízká vzdálenosti mezi uhlíky v benzenu. Jednotlivé vrstvy grafenu jsou od sebe vzdáleny 3,35 až 3,39 Å a mezi sebou jsou poutány slabými van der Walsovými silami [98].

HOPG bývá charakterizován dvěma rozměrovými parametry krystalu – velikostí v rovině krystalu a velikostí kolmo k rovině krystalu. Oba parametry přesahují 1 μm . Tyto parametry jsou zjišťovány pomocí rentgenové difrakce [96].

Zatímco bazální rovina – rovina hexagonální mřížky grafenu (osa a) – je vysoce uspořádaná, boční rovina (hrana) paralelní s osou c je nepravidelná, jelikož jednotlivé vrstvy grafenu jsou mezi sebou uspořádány turbostraticky – tedy značně nedokonale [99] (obr. 1.6).



Obr. 1.6 Hexagonální mřížka grafenových vrstev v HOPG v turbostratickém uspořádání [100].

Rozdíly v míře uspořádání a vazebných vlastnostech bazální a boční roviny a přítomnost systému π -vazeb způsobuje anizotropii fyzikálních, chemických a elektronových vlastností HOPG [101]. Mechanická odolnost materiálu závisí na směru zatížení – ve směru kolmém k rovinám grafenových vrstev je velmi nízká, ve směru rovnoběžném naopak velmi vysoká. Z tohoto důvodu je HOPG křehkým materiálem, který se velmi lehce loupe po vrstvách – toho se využívá při čištění elektrody a její přípravě před měřením, běžně se několik vrchních vrstev sloupne pomocí adhezivní pásky, popřípadě se opatrně mechanicky oddělí nožem a pinzetou.

Obdobná anizotropie se projevuje i u tepelné a elektrické vodivosti; zatímco v kolmém směru na roviny grafenu je považována za tepelný izolant, ve směru rovnoběžném s rovinou je to dobrý tepelný vodič. HOPG je polokov, který díky vodivostním π -elektronům vykazuje v bazální rovině relativně vysokou vodivost odpovídající vodivosti kovu; elektrický odpor naměřený ve směru paralelním s bazální rovinou dosahuje hodnot $\sim 10^{-5} \Omega \text{ cm}$, zatímco ve směru kolmém na bazální roviny $0,2 \Omega \text{ cm}$ [102].

U bočních rovin je hustota elektronových stavů vysoká, hrany jsou tak mnohem vodivější. S rostoucí hodnotou hustoty elektronových stavů také roste rychlost přenosu náboje a kapacitance. Na hranách HOPG je ve srovnání s bazální rovinou vyšší reaktivita v důsledku vysoké koncentrace poruch a existence volných vazeb. To se projevuje i zvýšenou kapacitancí. Adsorpce na bazální rovinu je v důsledku absence permanentních dipólů či elektrostatických nábojů velmi slabá, naopak v oblasti defektů je poměrně silná. Bazální rovina je ovšem ve skutečnosti dokonale uspořádaná pouze v rámci několika

desítek nanometrů, v oblastech v řádech mikrometrů se již objevují defekty ve formě schodků, pórů či trhlin. Jejich množství závisí na historii a přípravě dané HOPG. Výskyt defektů tak vede ke zvýšení rychlosti přenosu náboje, kapacitance, reaktivity a adsorpce molekul na povrch.

Z výše zmíněných skutečností je tedy jasné, že elektrochemické vlastnosti jsou závislé na struktuře povrchu elektrody. Pro charakterizaci povrchu, především pro určení poměru boční/bazální roviny, se využívá Ramanovy spektroskopie [99].

HOPG je mimo jiné využíván jako elektrodový materiál s výhodou snadné obnovitelnosti povrchu odlupováním vrstev bazálních rovin adhesivní páskou. Tento způsob obnovy povrchu umožňuje pracovat s velmi dobře definovaným reprodukovatelným povrchem bez nebezpečí kontaminace např. brusným nebo leštícím médiem. V důsledku relativně vysoké inertnosti lze bazální roviny HOPG s výhodou využít ke studiu mediátorů urychlujících elektrodové děje [103] bez nebezpečí ovlivnění vlastními katalytickými vlastnostmi elektrody.

1.5 FTALOCYANINY A PORFYRAZINY

1.5.1 Obecné vlastnosti

Ftalocyaniny a porfyriziny patří do skupiny tetrapyrolových makrocyclů – planárních cyklických sloučenin, které se vyznačují systémem osmnácti vysoce konjugovaných π elektronů. V důsledku delokalizace těchto elektronů jsou tetrapyrolové kruhy aromatického charakteru.

Významnou skupinou tetrapyrolů jsou přírodní porfyriny odvozené od porfinu. Porfin je tvořen čtyřmi pyrolovými jádry, jež jsou spojena methinovými můstky. Od porfinu jsou odvozeny například hemy a chlorofyly.

Náhradou čtyř methinových můstků v porfinovém cyklu za aza skupiny vzniká tetraazaporfyrin, tedy porfyrizin. Ten tvoří základní strukturu všech porfyrizinů a ftalocyaninů (tetrabenzoporfyrizinů).

Chemická struktura ftalocyaninů může být modifikována náhradou dvou volných vodíků v centru molekuly atomem kovu, ten je pak v molekule vázán kovalentní vazbou mezi dvěma protilehlými dusíkovými atomy a dále koordinačně kovalentní vazbou díky volným elektronovým párům zbývajících dvou atomů dusíku v centru makrocyclu.

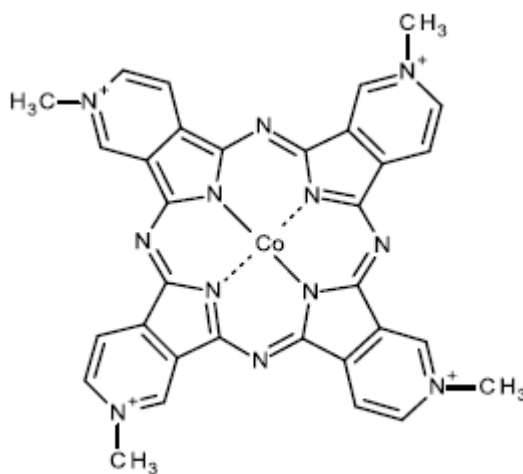
Náhradou až šestnácti volných atomů vodíku přítomných na vnějších benzenových kruzích ftalocyaninu za různé substituenty může vznikat velká řada ftalocyanových derivátů.

Na vnějších benzenových kruzích ftalocyaninu je přítomno šestnáct volných atomů vodíku, jejich náhradou z různé substituenty vzniká řada ftalocyanových derivátů. Ftalocyanový kruh může být také modifikován substitucí celých benzenových jader jinými aromatickými či heterocyklickými kruhy.

Z dokonalé konjugace násobných vazeb a koordinace centrálního kovu vyplývá výjimečná teplotní i chemická stabilita a zanedbatelná toxicita garantující minimální dopad na životní prostředí.

1.5.2 *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinát kobaltu(II)

N,N',N'',N'''-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinát kobaltu(II) , Co(Tmtppa), je kobaltem metalizovaný ftalocyaninový kruh, jehož benzenová jádra jsou substituovaná pyridinovými heterocykly s methylovanými dusíkovými atomy (obr. 1.7).



Obr. 1.7 Struktura *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinátu kobaltu(II)

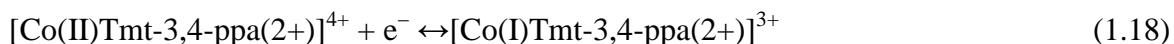
Příprava *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrizinátu kobaltu(II) spočívá v zahřívání směsi 3,4-pyridindikarboxylové kyseliny, močoviny a chloridu kobaltnatého v nitrobenzenu po čtyři hodiny pod zpětným chladičem použití molybdenanu amonného jako katalyzátoru. Vzniklý produkt je pak promyt vodou a ethanolem a dále čištěn rekrystalizací z koncentrované kyseliny chlorovodíkové a extrakcí z vody a acetonu. Vzniklý tetra-3,4-pyridinoporfyrizinát kobaltu je v druhém kroku syntézy methylován dimethylsulfátem v prostředí dimethylformamidu.

Konečný produkt syntézy $\text{Co}^{\text{II}}(\text{Tmt-3,4-ppa})(\text{CH}_3\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je přečištěn dvojnásobnou rekrystalizací z vody a acetonu [104].

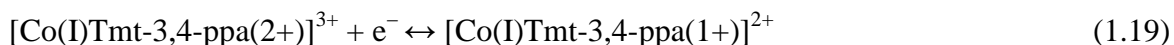
Díky čtyřem kladným nábojům na aza skupinách, nesoucích methylové substituenty, je $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ oproti většině ftalocyaninů rozpustný ve vodě, aniž by v roztoku tvořil agregáty [105]. Stabilita $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ je na pH závislá, v kyselých roztocích je tato látka stabilní a má modrou barvu, v zásaditém roztoku ale dochází k jeho dekompozici provázenou změnou barvy roztoku.

Studie elektrochemického chování $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ [106] imobilizovaného na povrchu elektrody ukázaly, že v kyselém prostředí podléhá několikanásobným redoxním procesům. Cyklickou voltametrií byly zjištěny reverzibilní redoxní píky jednoelektronové výměny, běžně označované jako I, II a III a dvouelektronové redoxní výměny IV a V. Zatímco přeměny I a II probíhají na centrálním atomu kobaltu, redoxní výměna III a IV probíhá na porfyrizinátovém ligandu. Kromě píku II jsou potenciály těchto píků závislé na pH prostředí v němž cyklická voltametrie probíhá, tato závislost je zpracována do Pourbaixova diagramu [106].

$\text{Co}(\text{Tmtppa})$ snadno podléhá redukci a je těžké jej oxidovat, jeho potenciál oxidace je tady vyšší než u většiny ftalocyaninů. Zatímco jeho oxidovaná forma je ve vodných roztocích rozpustná, jeho redukovaná forma se stává nerozpustnou [106]:



Této skutečnosti se využívá při depozici $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ na povrchy elektrod prostřednictvím elektrochemické depozice. Pík této redoxní přeměny je nízký a je překrýván jiným píkem. Proto se pro sledování a charakterizaci porfyrizinátového filmu běžně používá výraznější a dobře definovaný pík jednoelektronové přeměny ligandu porfyrizinu, v literatuře běžně označovaný jako pík IV:



V předchozích studiích byl zkoumán vliv konstantního vkládaného potenciálu na průběh depozice porfyrizinátu [1]. Bylo zjištěno, že v prostředí dihydrogenfosforečnanu sodného o $\text{pH} = 4,3$ probíhá elektrochemická depozice porfyrizinu nejrychleji při potenciálu 0 V.

Při potenciálu $-0,8$ V a nižším již dochází k vývoji vodíku, který mechanicky shazuje již vytvořený porfyrinátový film z elektrody při potenciálech nad $0,2$ V dochází k oxidaci a rozpouštění deponovaného filmu zpět do roztoku.

Studovaná reakce píku IV byla vyhodnocena jako povrchová reverzibilní reakce a za optimální rychlost vkládání potenciálu na elektrodu bylo stanoveno rozmezí $0,05$ až $0,30$ V s⁻¹ při vyšších rychlostech se začal uplatňovat nárůst IR spádu v porfyrinátovém filmu, což vedlo k vyšším hodnotám proudu sledovaných píků.

V literatuře byla popsána elektrokatalytická aktivita Co(Tmtppa) vůči kyslíku, sulfanu [46], hydrazinu a hydroxylaminu [107], dusitanům [105] či kyselině askorbové [108] a oxidu uhličitému [109].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Ve vodě rozpustná sůl komplexu $\text{Co(II)Tmtppa}(\text{CH}_3\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, dále uvedená jako Co(Tmtppa) , byla syntetizována a přečištěna na York University v Torontu. Zásobní roztok Co(Tmtppa) byl připraven rozpuštěním jeho odváženého množství ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 4,3$.

Jako prostředí pro elektrodepozici Co(Tmtppa) byl použit vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného (Merck, Německo, čistota p.a.) o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 4,3$ připravený rozpuštěním naváženého množství v deionizované vodě, pH bylo následně upraveno pomocí roztoků kyseliny fosforečné (Lachema, ČR, čistota p.a.) hydroxidu sodného (Lachema, ČR, čistota p.a.) o koncentracích $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

Studovanými látkami byly sulfid sodný (Sigma Aldrich, Německo, bezvodý) a L-cystein hydrochlorid (Lachema, ČR, čistý).

K cyklické voltametii sulfidů byl použit Kolthoffův–Vleeschhouwerův fosfátový pufr o $\text{pH} = 11,0$. Byl připraven vždy smícháním $8,26 \text{ ml}$ hydroxidu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a 50 ml hydrogenfosforečnanu sodného (Lachema, ČR, čistota p.a.) o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou a bylo upraveno pH na výslednou hodnotu $11,0$.

Jako prostředí pro studium cysteinu byl připraven Sørensenův fosfátový pufr o $\text{pH} = 7,0$ smícháním roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ s roztokem hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ v poměru $3 : 7$ a bylo upraveno pH na výslednou hodnotu $7,0$.

Pro přípravu vodných roztoků byla použita destilovaná voda (MiliQ, MiliPore). K vytěsnění kyslíku z roztoků byl používán argon (Messer, ČR, čistota 99,99 %).

Pro ochranu porfyrinátového filmu byl použit roztok nafionu připravený z 5% roztoku směsi nafionu s nižšími alkoholy a vodou (Aldrich, Německo).

2.2 POUŽITÉ METODY MĚŘENÍ

2.2.1 Cyklická voltametrie

Voltametrická měření byla provedena na potenciostatu/galvanostatu Wenking POS 2 (Bank Elektronik, Německo) v tříelektrodevém uspořádání. Pro všechna měření byl jako pracovní elektroda byl použit HOPG (HOPG ZYB Grade, Structure Probe, USA) s porfyrázínátovým (a nafionovým) filmem, jako referentní elektroda sloužila nasycená kalomelová elektroda (SCE) a jako pomocná elektroda byl použit platinový drátek zatavený ve skleněné kapiláře, obě vlastní výroby.

Měrná cela byla uspořádána z mosazného svěráku, na jehož dno se vkládala pracovní elektroda. Ta byla překryta pryžovým těsněním Viton s otvorem o průměru 4 mm. Nasazenou skleněnou trubičku o vnitřním průměru 7 mm a výšce 34 mm uzavíralo teflonové víčko se třemi otvory pro referentní a pomocnou elektodu a přívod argonu. (HOPG ZYB Grade, Structure Probe, USA).

Míchání a zároveň vytěsnění kyslíku z roztoku zajišťoval přívod argonu přímo do roztoku, během měření pak byl argon hnán nad roztok a byla tak zajištěna argonová atmosféra.

2.2.2 Mikroskopie atomárních sil

Topografie povrchu HOPG modifikované filmem porfyrázínu byla zjišťována pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) na mikroskopu typu Multimode Nanoscope IIIa (Bruker, USA) v semikontaktním (tapping) režimu s křemíkovým hrotem (typ Otespa, Bruker). Sběr dat a jejich vyhodnocení byly zajištěny programem Nanoscope.

2.3 EXPERIMENTÁLNÍ PROVEDENÍ

2.3.1 Čištění a udržování elektrod a komponent měrné cely

Pracovní elektroda byla před každým měřením očištěna opatrným sloupnutím několika horních vrstev pomocí adhezivní pásky (Scotch). Pomocná platinová elektroda, vitonové těsnění, skleněná trubička i teflonové víčko byly vždy omyty vodou, acetonem a destilovanou vodou. Vzhledem k tomu, že by aceton poškodil nasycenou kalomelovou elektrodu, byla vždy omyta pouze destilovanou vodou.

Před experimenty na čisté HOPG byly těsnění, skleněná trubička a teflonové víčko na hodinu ponořeny do směsi peroxidu vodíku se 0,1 mol dm⁻³ kyselinou sírovou v poměru 1:1, platinová elektroda protažena redukční částí plamene a byla použita čistá nasycená kalomelová elektroda. Tímto bylo zajištěno měření bez stop porfyrázinu.

2.3.2 Elektrochemická depozice Co(Tmtppa) na HOPG

Do argonem naplněné sestavené cely bylo napipetováno 450 μl 0,1 mol dm⁻³ dihydrogenfosforečnanu sodného o pH = 4,3 nasyceného argonem. Do roztoku bylo napipetováno 50 μl 10⁻⁴ mol dm⁻³ Co(Tmtppa) a pod argonovou atmosférou probíhala 30 minut cyklická voltametrie v rozsahu potenciálů -0,8 V až -0,1 V rychlostí skenu 0,1 V s⁻¹.

2.3.3 Nafion

Nafion je sulfonovaný tetrafluorovaný polymer vykazující vysokou stabilitu a mechanickou odolnost. Pokrytím nafionem se tak elektroda stává mechanicky odolnější a navíc nafionová vrstva molekuly porfyrázinu při povrchu elektrody a činí tak porfyrázinátový film odolnější vůči jeho rozpouštění do roztoku.

Pro vytvoření nafionového filmu o vhodné síle vrstvy byl 5% roztok nafionu v nižších alkoholech a vodě zředěn padesátkrát ethanolem. Na HOPG s filmem Co(Tmtppa) byl metodou „spin-coating“ nanášena nafionová vrstva – 30 μl roztoku nafionu bylo aplikováno do středu elektrody připevněné na rotační disk, přebytek roztoku byl odstředivou silou odstraněn z povrchu elektrody a vytvořil se souvislý film nafionu.

Po jedné hodině odpařování rozpoštědla za běžné teploty a tlaku a jedné hodině ve vakuu byla elektroda opět sestavena do měrné cely, a překryta roztokem dihydrogenfosforečnanu sodného, z něhož byl nejdříve argonem vytěsněn kyslík. Pro dosažení dobré vodivosti filmu byla elektroda ponechána pod roztokem do druhého dne.

2.4 SBĚR A ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Cyklickou voltametrií naměřená data byla průběžně sbírána a zpracována programem CPC–DA 4.1 (Bank Elektronik, Německo).

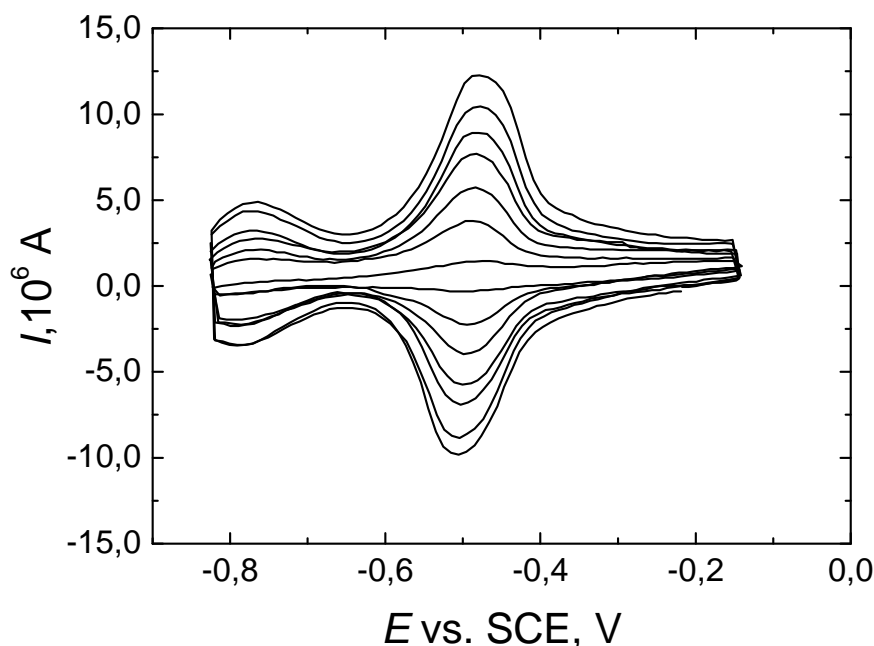
Hodnoty nábojů, proudů a potenciálů byly vyhodnocena pomocí programů Origin 6.1, případně bylo využíváno i programu Microsoft Office Excel 2003.

Soubory výsledků dovolující statistické zpracování byly testovány na odlehlost výsledků a v práci jsou prezentovány jako mediány.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 MODIFIKACE BAZÁLNÍ ROVINY HOPG

Na obrázku 3.1 je uveden cyklický voltamogram elektrochemické depozice N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrinátu kobaltu(II) z jeho vodného roztoku o koncentraci 10^{-5} mol dm^{-3} a $0,1$ mol dm^{-3} dihydrogenfosforečnanu sodného $\text{pH} = 4,3$. Elektrodepozice probíhala v rozsahu potenciálu $-0,8$ V až $-0,1$ V rychlostí $0,1$ V s^{-1} , což při třicetiminutové depozici odpovídá řádově 100 cyklů. Z obrázku 3.1 je zřejmé, že s počtem cyklů roste proud píku ligandu odpovídající jednoelektronové redukci při potenciálu $E_{\text{PL}} = -0,472$ V, indikující tvorbu vodivého filmu $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ na bazální rovině HOPG.



Obr. 3.1 Cyklický voltamogram průběhu elektrodepozice $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ na povrch HOPG –křivky zaznamenaný v 0., 5., 10., 15., 20., 25. a 30. minutě depozice v 10^{-5} mol dm^{-3} vodném roztoku $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ a $0,1$ mol dm^{-3} dihydrogenfosforečnanu sodného, $\text{pH} = 4,3$. Měřeno v potenciálovém rozmezí $-0,8$ V až $-0,1$ V; $v = 0,1$ V s^{-1} , Ar

Z hodnot uvedených v tabulce 3.1 lze odvodit několik skutečností. Pro reverzibilní povrchové elektrodové děje platí, že poměr nábojů anodického a katodického píku $Q_{\text{pa}}/Q_{\text{pk}} = 1$ a zároveň rozdíl potenciálů anodického a katodického píku $E_{\text{pa}} - E_{\text{pk}} = 0$.

Z hodnot $Q_{pa}/Q_{pk} \approx 1$ a rozdílu $E_{pa} - E_{pk}$, který roste v rozpětí 0,004 V až 0,037 V lze tedy usoudit, že se jedná o reverzibilní elektrodový děj. Dále z tabulky plyne, že v průběhu depozice dochází k postupnému posunu potenciálů píků E_{pa} ke kladnějším potenciálům a v případě E_{pk} k zápornějším potenciálům. Tato skutečnost souvisí s nárůstem tloušťky porfyrizinového filmu, s níž roste i ohmický odpor (R) filmu a zvyšuje se tak napěťový (IR) spád. Svou roli může hrát i zpomalení reakční kinetiky v důsledku zpomalení difúze kompenzujících proti-iontů z roztoku do rostoucí vrstvy porfyrizinátu a tím i klesající rychlost výměny elektronů.

Tab 3.1 Parametry křivek cyklické voltametrie při elektrochemické depozici Co(Tmtppa)

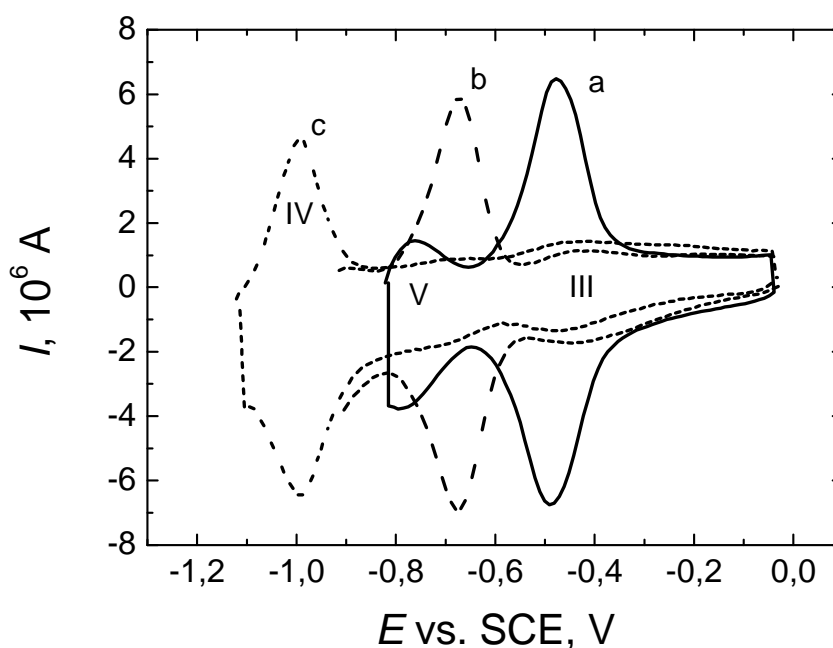
($c = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Potenciál anodického píku E_{pa} , potenciál katodického píku E_{pk} , proud anodického píku I_{pa} , proud katodického píku I_{pk} , náboj anodického píku Q_{pa} , náboj katodického píku Q_{pk} .

Čas skenu min	E_{pa} V	E_{pk} V	$E_{pa} - E_{pk}$ V	I_{pa}/I_{pk}	Q_{pa}/Q_{pk}
5	-0,484	-0,488	0,004	0,90	1,02
10	-0,482	-0,493	0,011	1,02	0,99
15	-0,481	-0,498	0,017	0,98	1,02
20	-0,478	-0,501	0,023	1,03	1,01
25	-0,474	-0,504	0,030	0,99	0,98
30	-0,470	-0,507	0,037	1,05	0,99

3.2 CYKLIČKÁ VOLTAMETRIE FILMU Co(Tmtppa)

Byly srovnány cyklické voltamogramy HOPG s deponovaným filmem CoTmtppa v prostředí dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 4,3 a dále v Sörensenově fosfátovém pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 7,0 a Kolthofově–Vleeschhouwerově fosfátovém pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 11,0 (obr. 3.2).

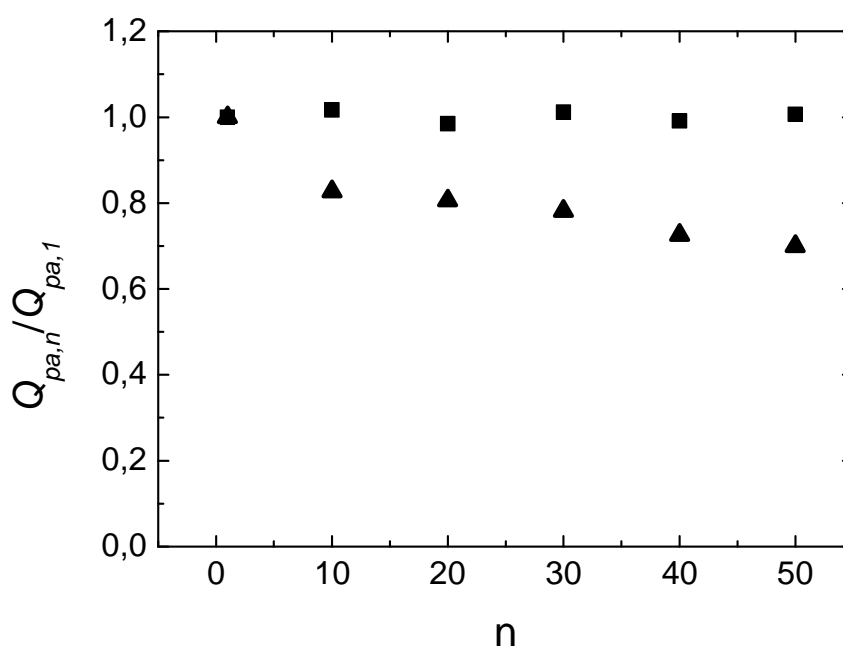
Se změnou pH docházelo k posunu potenciálů píků IV o $0,073 \text{ V}$ na jednotku pH dle Pourbaixova diagramu [97], což bylo v dobré shodě s literaturou [46]. Hodnota naměřených potenciálů píků $E_{pa} = -0,472 \text{ V}$ pro pH = 4,3 a $E_{pa} = -0,669 \text{ V}$ pro pH = 7,0 je s touto hodnotou v dobré shodě, zatímco $E_{pa} = -0,991 \text{ V}$ při pH = 11,0, vykazovala nižší odchylku od teoreticky vypočítané hodnoty $-0,951 \text{ V}$.



Obr. 3.2 Cyklický voltamogram HOPG elektrody s deponovaným filmem Co(Tmtppa) (30 min depozice z roztoku o $c = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; prostředí dihydrogenfosforečnanu sodného o $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 4,3); ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 4,3 (a); fosfátového pufru, $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,0 (b) a fosfátového pufru $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 11,0 (c).

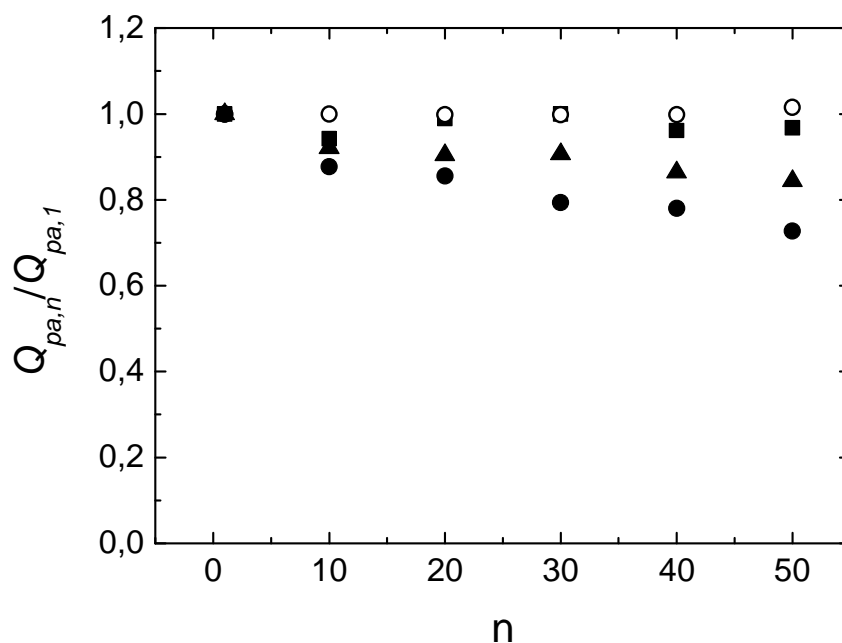
3.2.1 Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH = 4,3

Stabilita filmu Co(Tmtppa) na HOPG byla hodnocena v závislosti na použitém potenciálovém rozsahu, v průběhu 50 voltametrických cyklů, z prvního a každého desátého cyklu. Negativní potenciál $-0,9$ V byl nalezen jako mezní, protože při něm už docházelo k výraznějšímu poklesu náboje vyhodnoceného z píku IV a to o téměř 30 % (obr. 3.3), v důsledku úbytku porfyrasinu způsobeném pravděpodobně vývojem plynu (vodíku), který bude diskutován dále v kapitole 3.5.



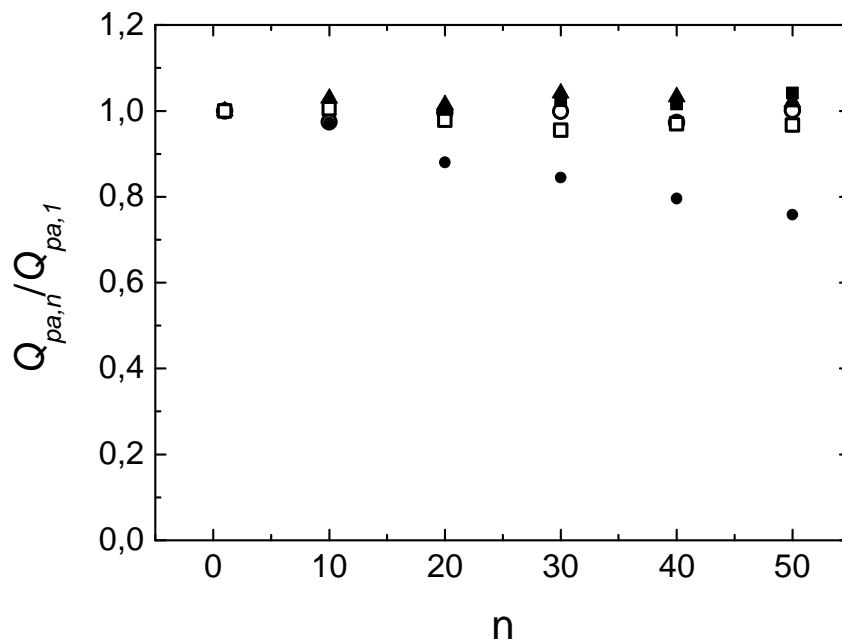
Obr. 3.3 Úbytek náboje anodického píku porfyrasinátového ligandu v 1. – 50. voltametrickém cyklu při potenciálovém rozsahu $-0,8$ V až 0 (■) a $-0,9$ V až 0 V (▲) v prostředí vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 4,3.

Další testování stability deponovaného filmu posouváním anodické hranice potenciálu vždy o 0,1 V ukázalo stabilitu filmu v rozmezí $-0,8$ V až $0,2$. V případě potenciálů mimo uvedený rozsah došlo ke snížení hodnoty náboje o více než 15 % (obr. 3.4).



Obr. 3.4 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku porfyrizinátového ligandu v 1. – 50. voltametričtém cyklu při potenciálovém rozsahu $-0,8$ V až $0,1$ V (■); $-0,8$ V až $0,2$ V (○); $-0,8$ V až $0,3$ V (▲) a $-0,8$ V až $0,4$ V (●) v prostředí vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 4,3$.

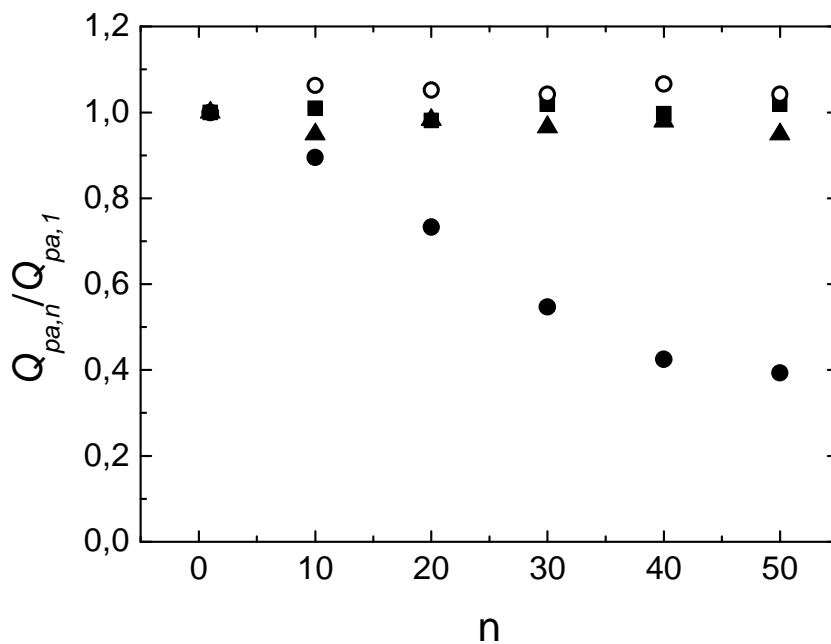
Pro zvýšení stability deponovaného filmu byla na elektrodu aplikována ochranná vrstva nafionu, překrývající porfyrizinový film. Elektroda pokrytá nafionem byla stabilní v celém rozsahu potenciálů, tj. od $-0,8$ V až do $0,8$ V (obr. 3.5).



Obr. 3.5 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku porfyrizinátového ligandu na HOPG elektrodě s deponovaným porfyrizinovým filmem překrytém nafionem v 1. – 50. voltametrickém cyklu při potenciálovém rozsahu $-0,8$ V až $0,2$ V (■); $-0,8$ V až $0,4$ V (○); $-0,8$ V až $0,6$ V (▲); $-0,8$ V až $0,8$ V (□) a $-0,8$ V až $0,9$ V (●) v prostředí vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 4,3$.

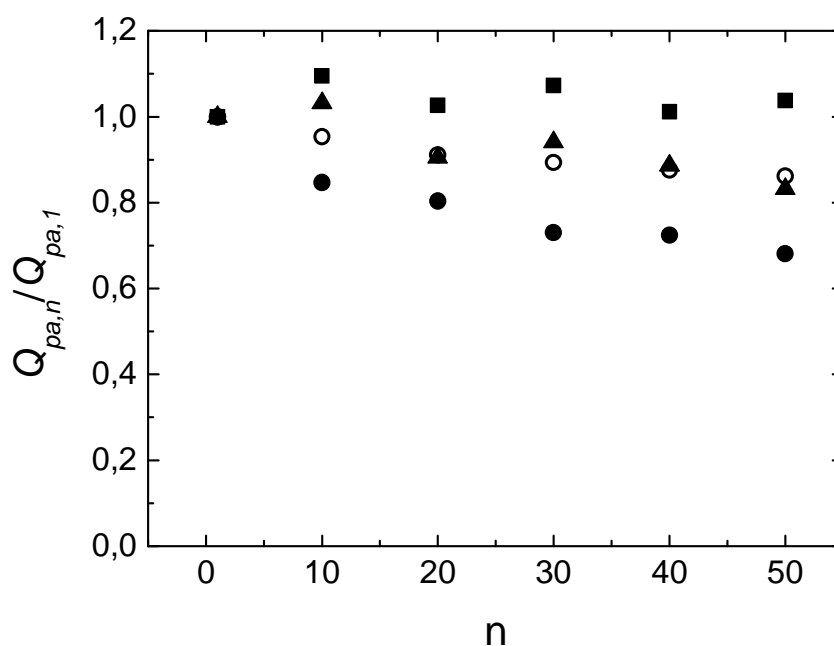
3.2.2 Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH = 7,0

Z hodnot nábojů anodického píku (obr. 3.6) je vidět, že v případě postupného rozšiřování potenciálového rozmezí do negativnějších hodnot potenciálů je vrstva Co(Tmtppa) stabilní až do -1 V. Při $-1,1$ V již dochází k rychlému snižování náboje indikujícímu úbytek porfyrazinu.



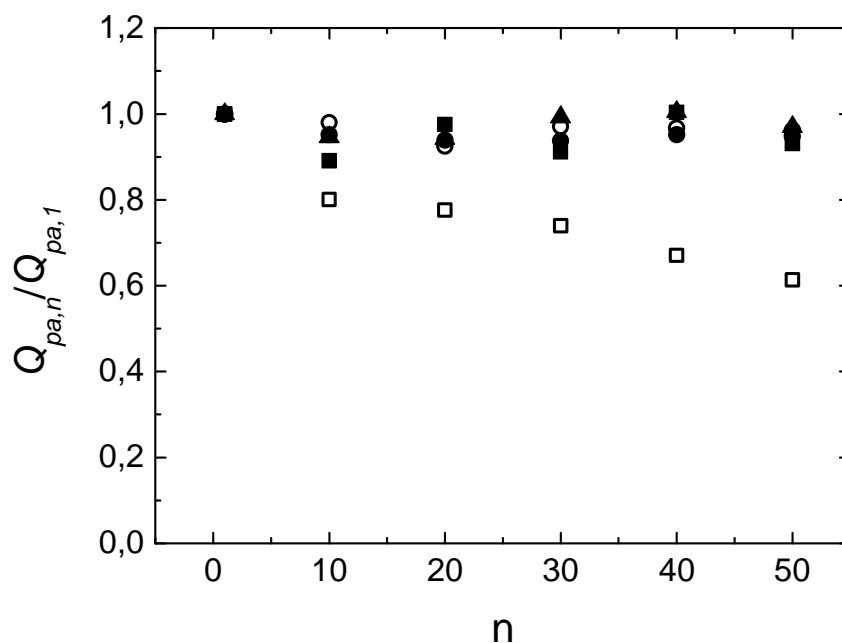
Obr. 3.6 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku Q_a porfyrazinátového ligandu v 1. – 50. voltametrickém při potenciálovém rozsahu $-0,8$ V až 0 V (■); $-0,9$ V až 0 V (○); $-1,0$ V až 0 V (▲) a $-1,1$ V až 0 V (●) v prostředí vodného roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 7,0.

Ačkoliv elektroda byla stabilní již od $-1,0$ V, pro studium $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ postačoval počáteční potenciál $-0,9$ V. Pro nalezení celého rozsahu stability elektrody byl potenciálový rozsah rozšiřován i do kladnějších hodnot potenciálů. Při potenciálu $0,2$ V docházelo již k postupnému snižování náboje (obr. 3.7) a po padesáti cyklech klesly hodnoty náboje o více než 10 %. Uspokojivá stabilita filmu $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ byla nalezena v rozsahu $-1,0$ V až $0,1$ V.



Obr. 3.7 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku Q_a porfyrinátového ligandu v 1. – 50. voltametričtém cyklu v potenciálovém rozsahu $-0,9$ V až $0,1$ V (■); $-0,9$ V až $0,2$ V (○); $-0,9$ V až $0,3$ V (▲) a $-0,9$ V až $0,4$ V (●) v prostředí vodného roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 7,0$.

Z diagramu uvedeného na obrázku 3.8 je patrné, že pokrytí deponované vrstvy porfyrázinu nafionovým filmem mělo opět pozitivní dopad na stabilitu porfyrázinátového filmu. Stablní potenciálový rozsah porfyrázinové elektrody pokryté nafionovým filmem v prostředí vodného roztoku fosfátového pufru o pH 7 byl stanoven na $-0,9$ V až $0,8$ V.

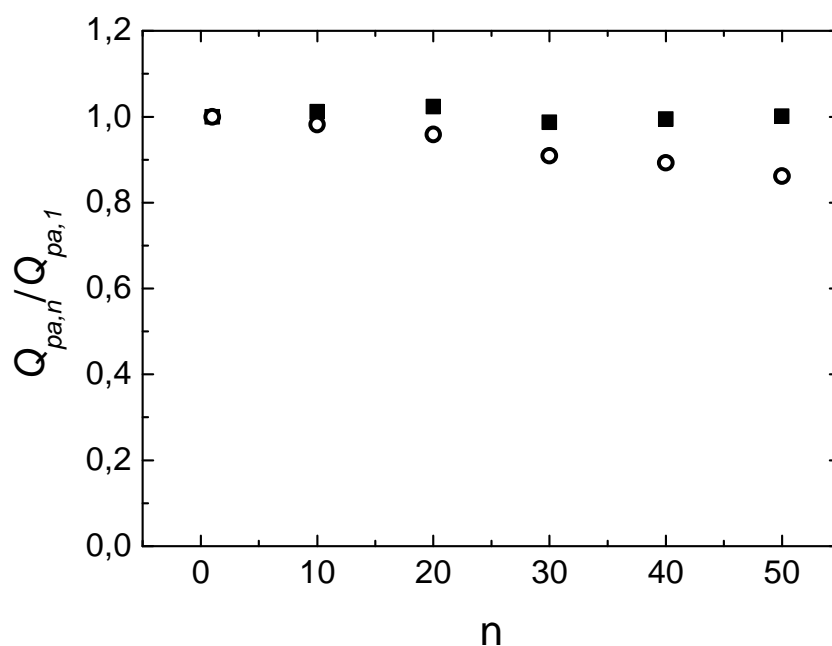


Obr. 3.8 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku porfyrázinátového ligandu v 1. – 50. voltametrickém cyklu na HOPG elektrodě s deponovaným filmem porfyrázinu a překryté nafionem. Skeny v potenciálovém rozsahu $-0,9$ V až $0,2$ V (■); $-0,9$ V až $0,4$ V (○); $-0,9$ V až $0,6$ V (▲); $-0,9$ V až $0,9$ V (□) a $-0,9$ V až $0,9$ V (●) v roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 7,0.

3.2.3 Studium stability filmu Co(Tmtppa) v pH = 11,0

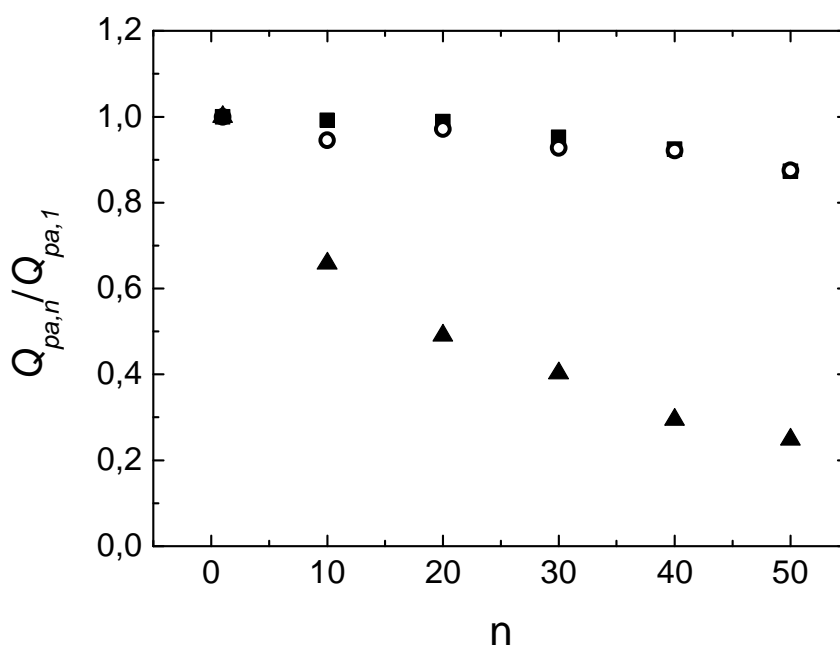
Vzhledem k posunu potenciálu píku páru IV k hodnotě blížíci se $-1,0$ V bylo možné sledovat stabilitu deponovaného filmu až od potenciálu $-1,1$ V a negativněji.

Zatímco v potenciálovém rozsahu $-1,1$ V až 0 V byla odezva elektrody stabilní, při cyklické voltametii s počátečním potenciálem $-1,2$ V docházelo k poklesu hodnot nábojů o téměř 15 % (obr. 3.9).



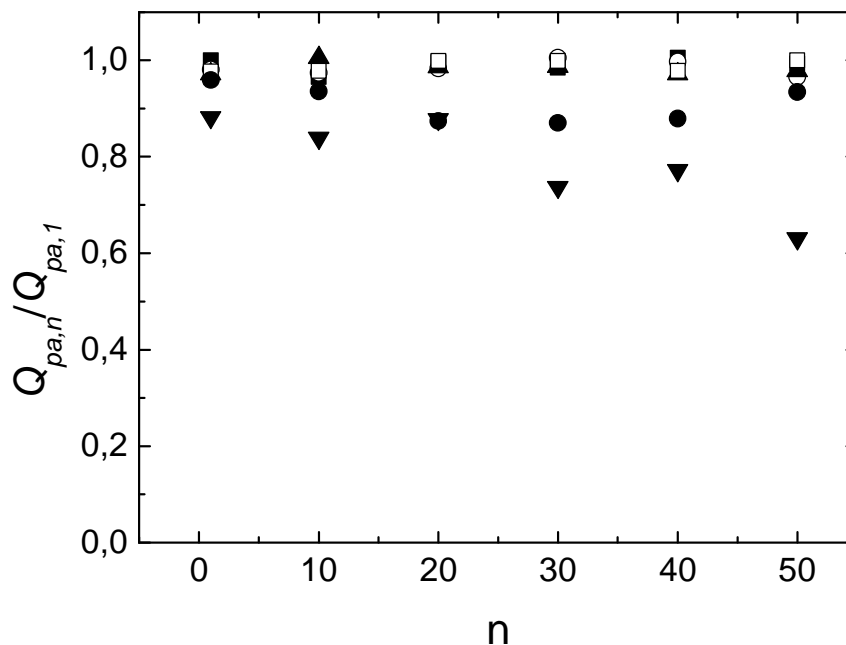
Obr. 3.9 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku Q_a porfyrinátového ligandu při 1. – 50. voltametričném cyklu v potenciálovém rozsahu $-1,1$ V až 0 V (■); $-1,2$ V až 0 V (○) v prostředí vodného roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH = 11,0.

Cyklická voltametrie zasahující do kladných potenciálů vedla v tomto případě k postupnému rozpouštění deponované vrstvy. Pokles o 25 % byl zaznamenán při sérii cyklů od $-1,1$ V do $0,3$ V. Stejně tak tomu bylo i v rozmezí potenciálů $-1,1$ V až $0,2$ V. Při cyklické voltametii s konečným potenciálem $0,1$ V docházelo k úbytku o 13 % z počáteční hodnoty náboje (obr. 3.10). Porfyrizinátový film byl tedy ve fosfátovém pufru o $\text{pH} = 11,0$ stabilní pouze v rozmezí $-1,1$ V až 0 V (obr. 3.10).



Obr. 3.10 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku Q_a porfyrizinátového ligandu při 1. - 50. voltametričtém cyklu v potenciálovém rozsahu $-1,1$ V až $0,1$ V (■); $-1,1$ V až $0,2$ V (○) a $-1,1$ V až $0,3$ V (▲) v prostředí vodného roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,0$.

Pokrytí elektrody nafionem opět zvýšilo stabilitu deponovaného filmu (obr. 3.11) a to na potenciálový rozsah $-1,1$ V až $0,5$ V. Po proběhnutí 50 cyklů v potenciálovém rozsahu $-1,1$ V až $0,5$ V došlo k úbytku asi 30 % z původní hodnoty náboje píku.

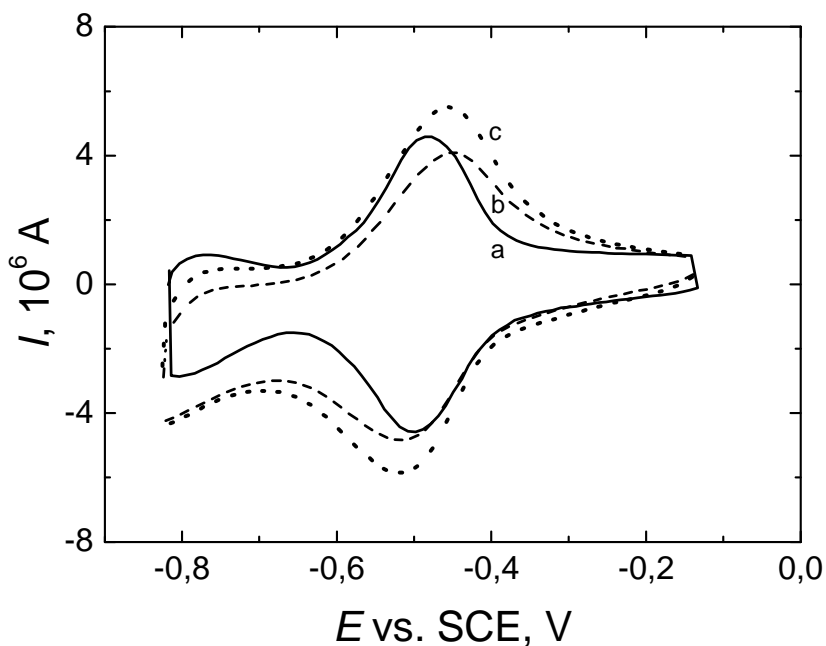


Obr. 3.11 Diagram znázorňující úbytek náboje anodického píku porfyrizinátového ligandu v 1. - 50. voltametrickém cyklu v potenciálovém rozsahu na HOPG modifikované filmem porfyrizinu a pokryté nafionovou membránou. Skeny v potenciálovém $-1,1$ V až $0,1$ V (■); $-1,1$ V až $0,2$ V (○); $-1,1$ V až $0,3$ V (▲); $-1,1$ V až $0,4$ V (□); $-1,1$ V až $0,5$ V (●) a $-1,1$ V až $0,6$ V (▼) vodného roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,0$.

3.2.4 Vliv nafionové membrány na odezvu Co(Tmtppa)

Kromě rozšíření potenciálových pracovních rozsahů elektrody modifikované Co(Tmtppa) byly pozorovány další změny v jejím elektrochemickém chování způsobené pokrytím elektrody nafionovým filmem.

Na obrázku 3.12 jsou cyklické voltamogramy porfyrizinové elektrody v prostředí vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o $\text{pH} = 4,3$ před nanesením nafionu (a), s nafionovým filmem, po 10 hodinách (b) a po 20 hodinách (c), během nichž byla elektroda máčena ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného o $\text{pH} = 4,3$ z něhož byl argonem vytěsněn kyslík.



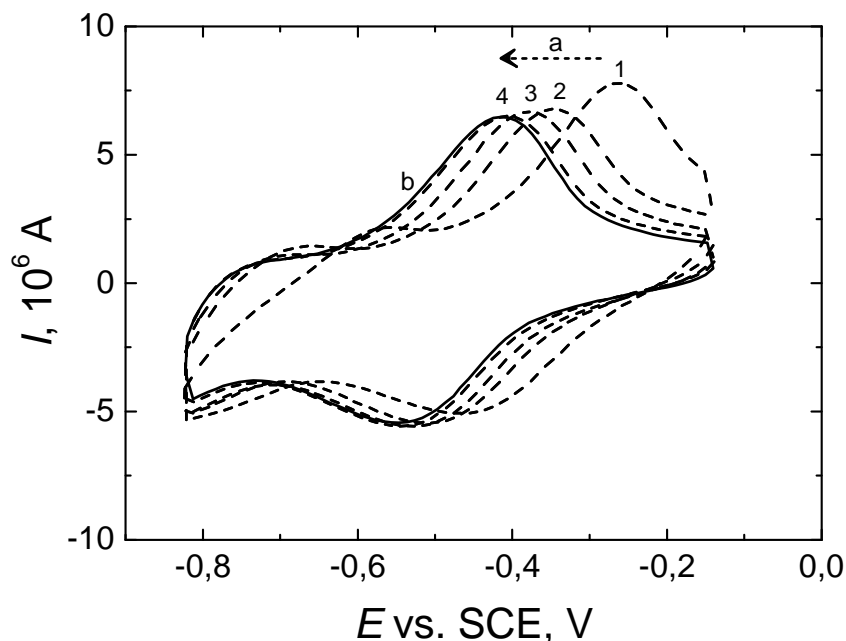
Obr. 3.12 Cyklické voltamogramy HOPG modifikované Co(Tmtppa) bez nafionového filmu (a), s nafionem po 10 (b) a 20 (c) hodinách máčení ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 4,3$). (Ar , $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálový rozsah $-0,8 \text{ V}$ až $-0,1 \text{ V}$)

Z cyklických voltamogramů (tab. 3.2, obr. 3.12) je vidět, že po nanesení nafionové vrstvy nedošlo k výrazné změně nábojové reverzibility. Posun a zvětšení potenciálového rozdílu anodického a katodického píku lze vysvětlit změnou zbytkových proudů a vnitřního odporu v důsledku nanesení nafionové vrstvy.

Tab. 3.2 Vyhodnocené parametry záznamu cyklické voltametrie HOPG modifikované Co(Tmtppa) bez nafionu (a), s nafionovým filmem po 10 (b) a 20 (c) hodinách máčení ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 4,3$). Potenciál anodického píku E_{pa} , potenciál katodického píku E_{pk} , pík proudu anodického píku I_{pa} , pík proudu katodického píku I_{pk}

	E_{pa} V	E_{pk} V	$E_{pa}-E_{pk}$ V	I_{pa} 10^6 A	I_{pk} 10^6 A	I_{pa}/I_{pk}
a	-0,479	-0,498	0,019	4,80	4,52	1,06
b	-0,456	-0,456	0,050	4,26	3,59	1,19
c	-0,458	-0,458	0,049	5,49	4,65	1,18

Vliv dlouhé doby (70 hodin) máčení elektrody způsobuje změny cyklického voltamogramu, zejména v symetrii a posunu píků. Tyto změny v tomto případě indikují pravděpodobně restrukturalizaci porfyrizinového filmu, která může zahrnovat i přechod do tenkovrstvé (pod nafionovým filmem) roztokové formy (vzniklé po oxidaci vzdušným kyslíkem během máčení) Co(II)(Tmtppa), ze které se po cyklické redukci na negativních potenciálech regeneruje pevný porfyrizinový film.



Obr. 3.13 Cyklické voltamogramy HOPG modifikované Co(Tmtppa) s nafionovým filmem po 70 hod máčení ve fosfátovém pufru znázorňují posun prvních cyklických voltamogramů (a1 - a4) až k dále neměnným hodnotám (b). Měření ve vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 4,3$), (Ar , $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálový rozsah $-0,8 \text{ V}$ až $-0,1 \text{ V}$)

Tab. 3.3 Hodnoty potenciálů píků IV E_{pa} a E_{pk} získané ze záznamu cyklické voltametrie HOPG modifikované Co(Tmtppa) s nafionovým filmem po 70 hod máčení ve vodném roztoku fosfátového pufru znázorňují posun prvních cyklických voltamogramů (a1 - a4) až k dále neměnným hodnotám (b).

skan	E_{pa} V	E_{pk} V	$E_{pa} - E_{pk}$ V
a1	-0,262	-0,438	0,176
a2	-0,346	-0,489	0,143
a3	-0,379	-0,506	0,127
a4	-0,406	-0,523	0,117
b	-0,412	-0,524	0,112

3.3 STUDIUM ELEKTROKATALYTICKÉ AKTIVITY Co(Tmtppa) K SULFIDICKÉ SKUPINĚ

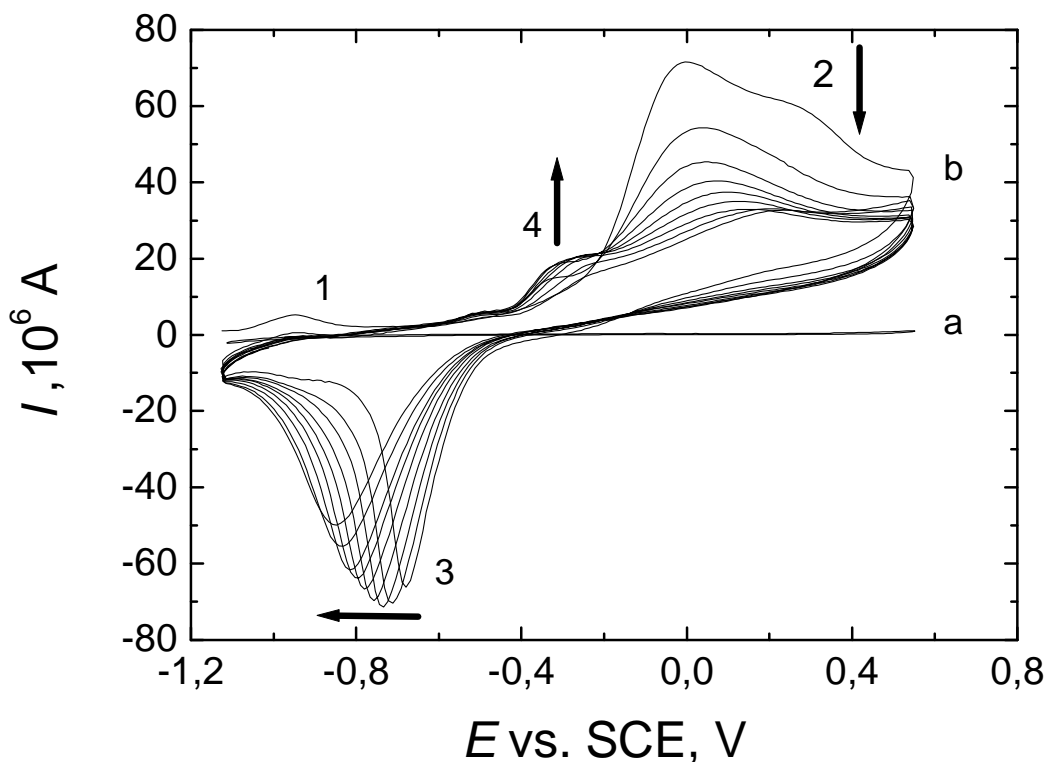
Elektrokatalytická aktivita HOPG modifikovaného Co(Tmtppa) filmem byla popsána již dříve v literatuře [53, 106], nicméně voltametrická studie reakce sulfidů ani stanovení sulfidových aniontů pomocí cyklické voltametrie na filmu Co(Tmtppa) doposud publikováno nebylo.

Bylo zjištěno, že z roztoku sulfidu sodného rozpuštěného ve fosfátovém pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 8,0$ docházelo k uvolňování plynného sulfanu při vybublávání roztoku argonem. Jako prostředí vhodné pro cyklickou voltametrii sulfidů byl tedy zvolen fosfátový pufr o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,0$.

Přítomnost kyslíku v roztoku vede k oxidaci sulfidových iontů převážně na sirné oxidy (rov. (1.3) až (1.5)) a snižuje tak koncentraci sulfidu ve studovaném roztoku, navíc stopy kyslíku v roztoku mohou deformovat voltametrickou křivku díky vysoké elektrokatalytické aktivitě Co(Tmtppa) k redukci kyslíku. Z toho důvodu byl před naplněním cely kyslík z roztoků vytěsněn argonem, prázdná cela byla před naplněním elektrolytem rovněž zaplněna argonem a celé měření probíhalo pod argonovou atmosférou.

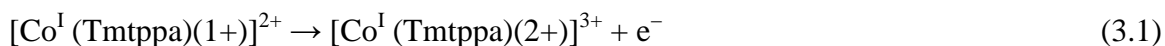
Na obrázku 3.15 je porovnána cyklická voltametrie roztoku sulfidu sodného o koncentraci $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na čistém HOPG a na HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa) v prostředí fosfátového pufru o $\text{pH} = 11,0$.

Zatímco cyklická voltametrie v rozsahu potenciálů $-1,1 \text{ V}$ až $0,6 \text{ V}$ na čisté HOPG nevykázala žádnou reakci sulfidů, v případě modifikované elektrody byla zaznamenána významná elektrokatalytická aktivita vůči sulfidu.



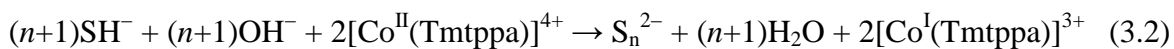
Obr. 3.15 Cyklické voltamogramy sulfidu sodného o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ve vodném roztoku fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,0$ na čistém HOPG (a) a na HOPG modifikovaném filmem Co(Tmtppa) (b). Pík 1 oxidace Co(Tmtppa), předpokládané reakce: pík 2 oxidace sulfidů, 3 redukce polysulfidů, 4 oxidace polysulfidů. Měření ve vodném roztoku fosfátového pufru dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$, Ar, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$).

Na obrázku 3.15 jsou viditelné píky čtyř elektrochemických dějů. Pík 1 označuje jednoelektronovou oxidaci ligandu porfyrzinu probíhající dle rovnice:



V oblasti kladných potenciálů blízkých nule se objevuje maximum anodického píku 2, jedná se o oxidaci sulfidů, v níž Co(Tmtppa) figuruje jako redoxní mediátor – nejprve oxiduje sulfidy chemickou reakcí a poté se sám elektrochemicky zpětně oxiduje na elektrodě. Pík 2 je evidentně konvolucí minimálně dvou oxidačních reakcí; lze uvažovat např. přítomnost povrchové a roztokové reakce.

Při elektrochemické oxidaci sulfidů za těchto mírných podmínek v argonové atmosféře lze očekávat vznik polysulfidů různé délky řetězce podle rovnice:



Při cyklické voltametii v nemíchaném roztoku pík oxidace sulfidů postupně klesá s tím, jak jsou sulfidové anionty elektrochemickou oxidací odčerpávány z blízkosti povrchu elektrody. Katodický pík 3 pak představuje odpovídá zpětné redukci vzniklých polysulfidů (v jiných prostředích bylo sledováno i více píků zpětné elektrochemické redukce polysulfidů odpovídající různým délkám polysulfidového řetězce[110]):

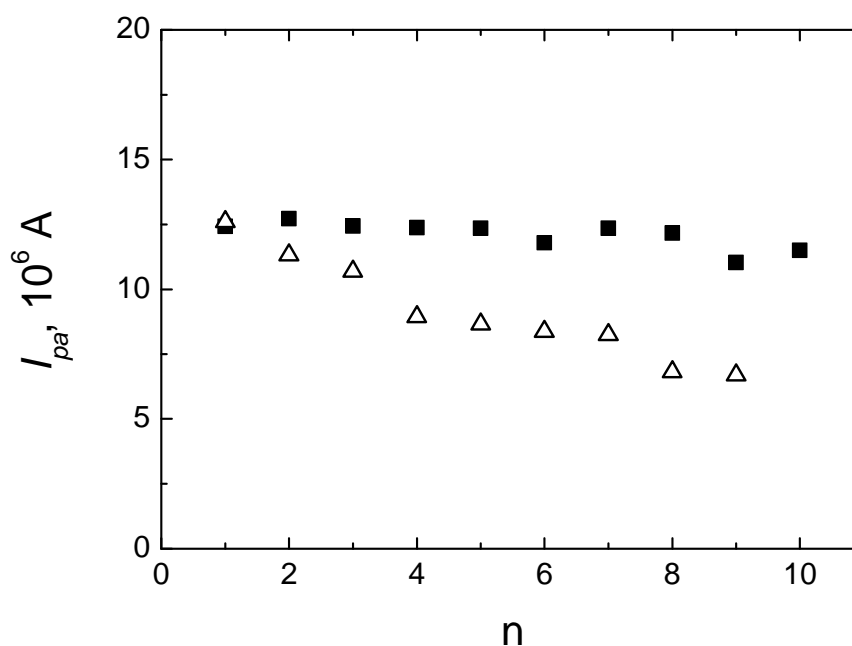


Část polysulfidů se může adsorbovat na povrchu elektrody a oxidovat postupně dále až na síru. Tato reakce je za uvedených podmínek snadnější než přímá oxidace sulfidů [111] a probíhá tedy při potenciálech negativnějších, čemuž odpovídá pík 4 (obr. 3.15):



Vzniklá síra se může také adsorbovat na povrchu elektrody a postupně ji pasivovat, což je problém především relativně inertních pevných elektrod jako HOPG, u kterých lze kvantitativní oxidaci sulfidů pozorovat až při vyšších hodnotách potenciálu. Na elektrodě modifikované porfyrinátovým filmem lze očekávat průběh oxidace přes relativně rozpustné meziprodukty oligosulfidů, který brání její rychlé pasivaci. Rovněž je známo [111], že elementární síra vznikající právě oxidací polysulfidů podléhá snadno zpětné hydrolyze na SH^- a nemá tedy tendenci blokovat elektrodu. Cyklické přeměny oxidované a redukované formy $CoI(Tmtppa)/CoII(Tmtppa)$ navíc vedou k opakované restrukturalizaci povrchu elektrody - v anodické oblasti vzniká i rozpustnější forma $CoII(Tmtppa)$ - a tím k jeho průběžnému obnovování. Elektrochemickou oxidaci sulfidů může ovšem doprovázet řada dalších chemických reakcí produktů a meziproduktů. Tato problematika byla shrnuta v kapitole 1.1.5.

Porovnáním hodnot proudů píků oxidace sulfidu z deseti po sobě jdoucích voltametrických křivek byla testována stabilita voltametrické odezvy elektrody na konstantní koncentraci sulfidů v roztoku. Aby byla vyloučena možnost postupného vyčerpávání sulfidů, byl roztok v nádobce mezi jednotlivými experimenty vyměněn za nový. Byla srovnána stabilita odezvy elektrody pokryté pouze porfyrinem a elektrody chráněné nafionovým filmem. Zjištěné hodnoty proudů píků oxidace sulfidů jsou graficky zpracovány na obrázku 3.16.

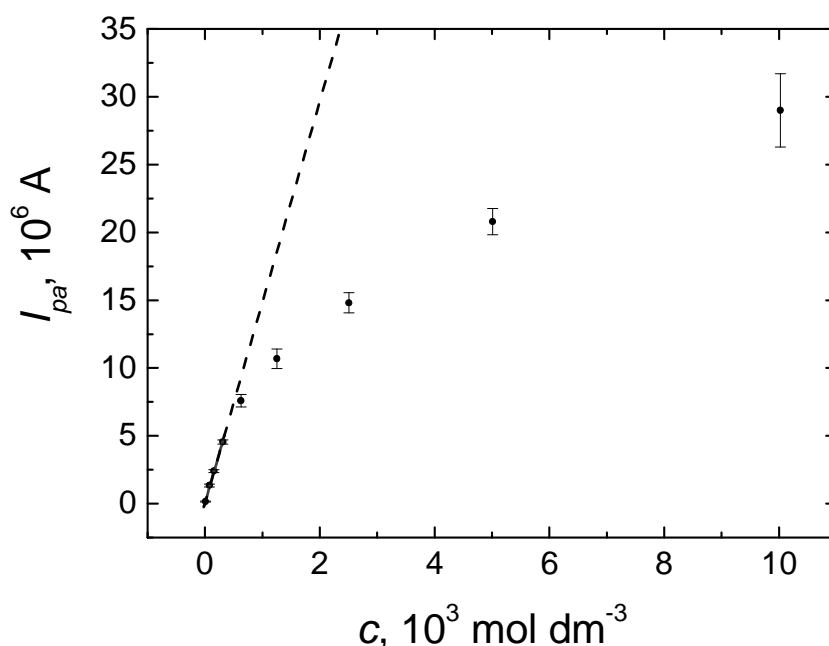


Obr. 3.16 Porovnání stability odezvy po n voltametrických cyklech v potenciálovém rozsahu $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$ u elektrody HOPG s deponovaným $\text{Co}(\text{Tmtppa})$ bez nafionového filmu (\square) a s nafionovým filmem (\blacksquare). Měření ve vodném roztoku fosfátového ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11$), Ar , $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, ref. elektroda: SCE, pomocná elektroda: Pt.

Potenciálový rozsah $-1,1 \text{ V}$ do $0,5 \text{ V}$ umožňující průběh zpětných reakcí zcela vyhovoval z hlediska stability (obr. 3.16) u elektrody chráněné nafionovým filmem, zatímco u elektrody bez nafionového filmu se potvrdila očekávaná postupná ztráta její aktivity.

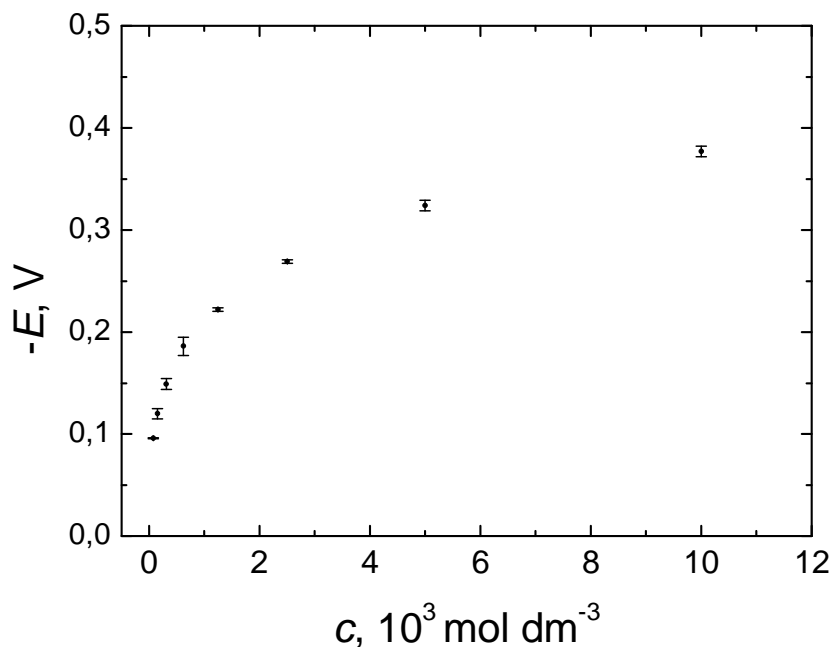
3.4 STANOVENÍ SULFIDOVÝCH ANIONTŮ

Metodou cyklické voltametrie byly měřeny hodnoty proudové odezvy HOPG elektrody modifikované depozicí Co(Tmtppa) pokryté nafionovým filmem na různé koncentrace sulfidů (obr. 3.17). Získaný graf závislosti proudu píku oxidace sulfidů na jejich koncentraci v roztoku byl lineární pouze v oblasti nízkých koncentrací $c < 3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; poté se hodnoty přírůstků I_{pa} postupně snižovaly.



Obr. 3.17 Graf závislosti proudové odezvy HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa) a nafionu na koncentraci sulfidů v roztoku. Cyklická voltametrie ve fosfátovém pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$), Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky vypočítané ze souboru pěti opakovaných měření. Prodloužení proložení přímky mimo naměřené hodnoty naznačuje předpokládané chování elektrody při zanedbatelném úbytku napětí ve vrstvě mediátoru dosaženém např. nižší tloušťkou deponovaného filmu porfyrazinu a nafionu.

Protože byl současně pozorován posun potenciálů oxidačních píků s rostoucí koncentrací sulfidů (obr. 3.18) lze usuzovat, že toto chování bylo pravděpodobně způsobeno rostoucím úbytkem napětí (IR) ve vrstvě porfyrizinátu a nafionu.

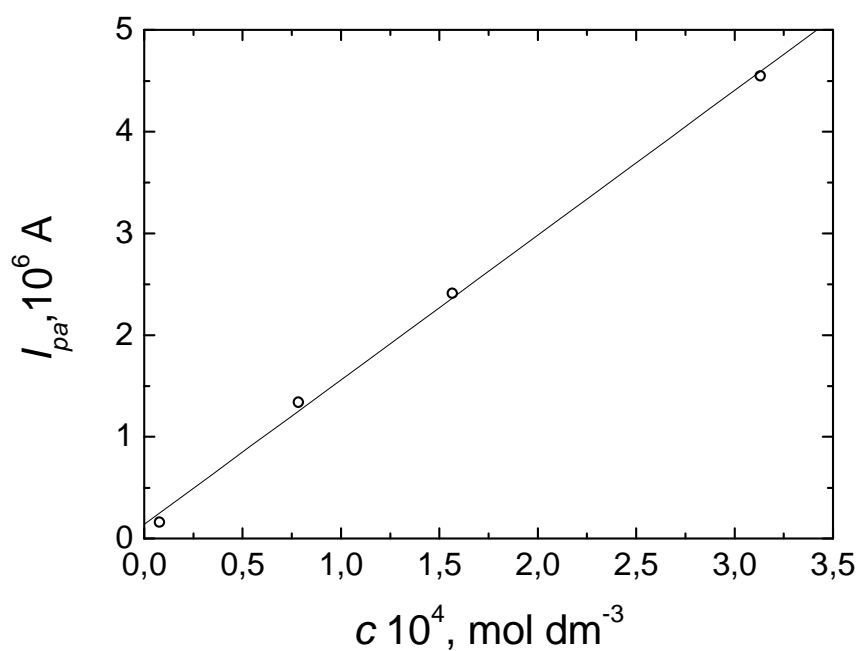


Obr. 3.18 Graf závislosti potenciálů píku oxidace sulfidů na jejich koncentraci. Měřeno na HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa) a nafionem. Cyklická voltametrie ve fosfátovém pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$), Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky vypočítané ze souboru pěti opakovaných měření.

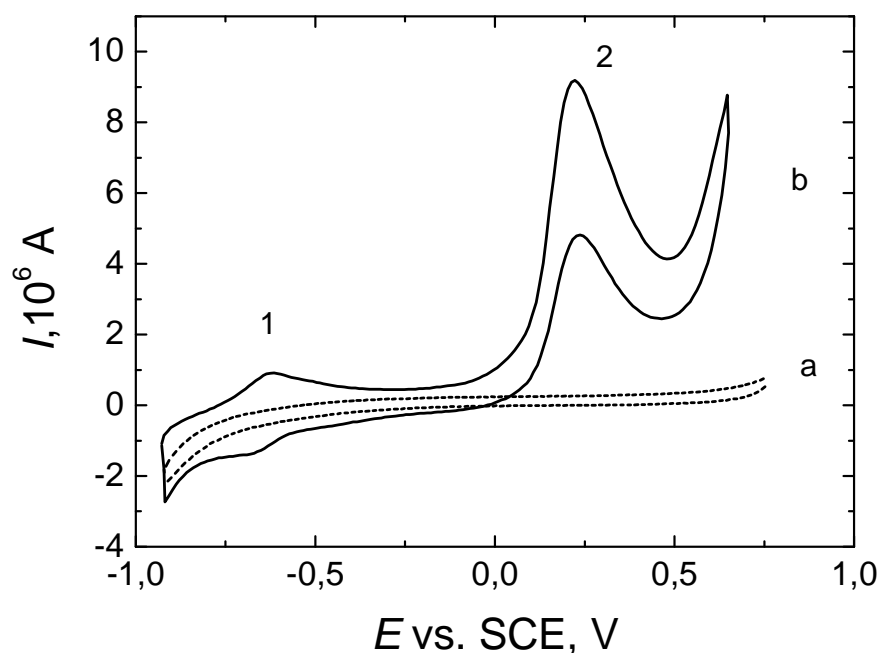
Soubor výsledků z pěti opakovaných měření byl statisticky zpracován a z vyhovujících hodnot byla metodou lineární regrese odvozena kalibrační přímka (obr. 3.19) vyjádřená rovnicí:

$$I [\text{A}] = 1,42 \cdot 10^{-2} c [\text{mol dm}^{-3}] + 1,39 \cdot 10^{-7} \quad (3.3)$$

$$\text{LOQ} = 7,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

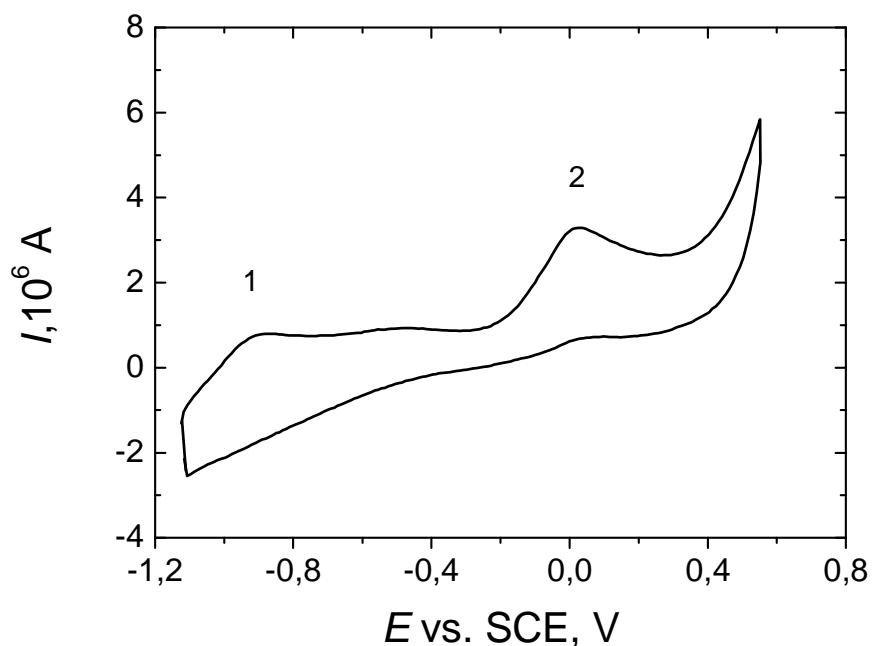


Obr. 3.19 Kalibrační přímka pro stanovení sulfidů na HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa) a nafionovou vrstvou. Cyklická voltametrie ve fosfátovém pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$), Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, SCE, Pt, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$.

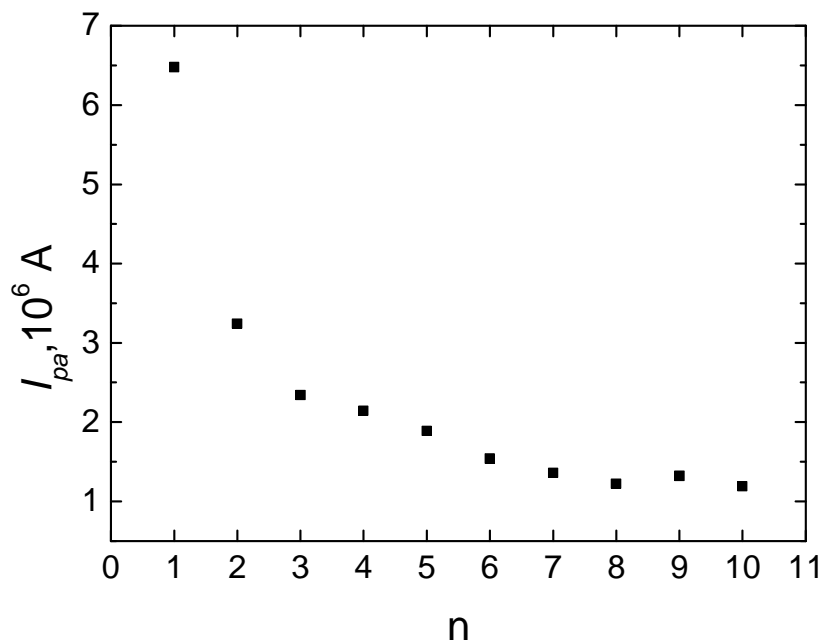


Obr. 3.20 Cyklická voltametrie cysteinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ve fosfátovém pufru o $\text{pH} = 7,0$. Měřeno na čistém HOPG Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,8 \text{ V}$ (a) a na HOPG s deponovaným filmem $\text{Co}(\text{Tmtppa})$, Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,7 \text{ V}$. Píky 1 jsou redoxní píky ligandu $\text{Co}(\text{Tmtppa})$, píky 2 je oxidace cysteinu.

Elektrochemickou oxidací cysteinu v zásaditém prostředí může vedle cystinu vznikat více různých produktů, ovšem všechny produkty a mechanismy jejich vzniku nejsou dosud zcela známy. V prostředí fosfátového pufru o $\text{pH} = 11,0$ je už cystein zcela disociovaný na elektrochemicky aktivní formu podle rovnice (1. 17). Z cyklické voltametrie cysteinu ve fosfátovém pufru o $\text{pH} = 11,0$ by se dalo soudit, že k adsorpci inaktivního produktu nedochází (obr. 3.21). Nicméně testování stability odezvy elektrody (obr. 3.22) v potenciálovém rozmezí od $-1,1 \text{ V}$ do $0,5 \text{ V}$ při konstantní koncentraci cysteinu, zabezpečené výměnou roztoku po každém skenu ukázalo, že proudová odezva po prvních cyklech prudce klesá, po proběhnutí více cyklů se ustaluje na nižší hodnotě, tj. elektroda ztrácí svou citlivost. Je tedy možné, že se cystein, resp. některý meziprodukt reakce v jisté míře na elektrodě adsorbují, ale nedochází již k tak výrazné desorpci.

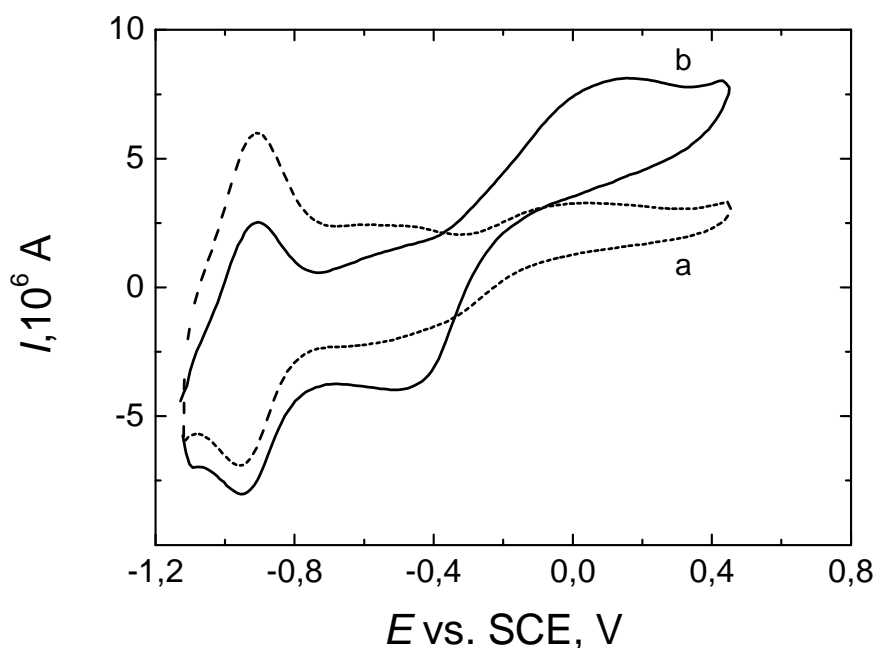


Obr. 3.21 Cyklická voltametrie cysteinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ve vodném roztoku fosfátového pufru o $\text{pH} = 11,0$. Měřeno na na HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa) , Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$. Píky 1 jsou redoxní píky ligandu Co(Tmtppa) , píky 2 je oxidace cysteinu.



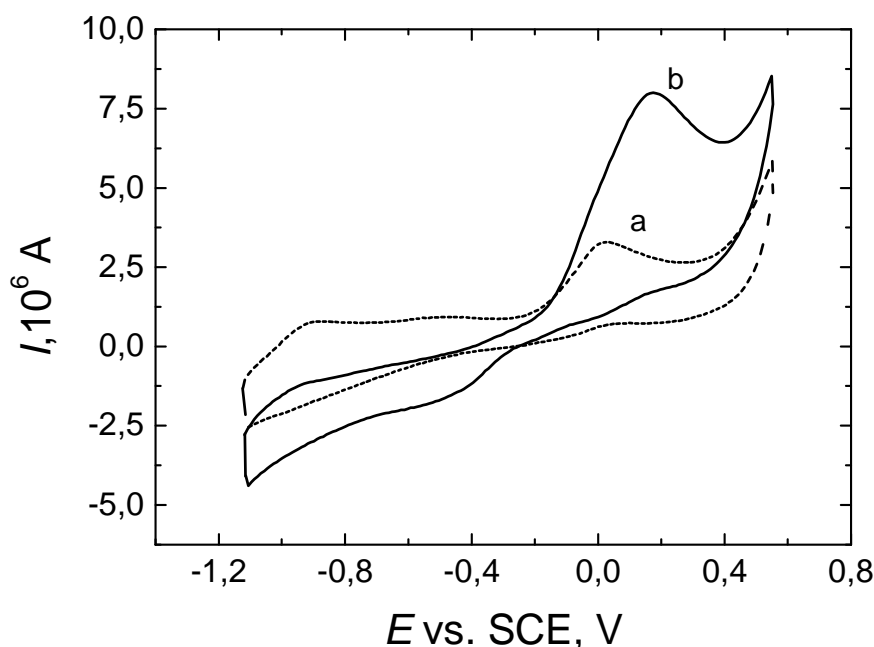
Obr. 3.22 Stabilita odezvy HOPG elektrody s deponovaným Co(Tmtppa) na cystein o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v potenciálovém rozsahu $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$ ve vodném roztoku fosfátového pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$), akumulace meziproductů v roztoku byla vyloučena výměnou roztoku po každém n -tém voltametrickém cyklu Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Byla studována také proudová odezva elektrody HOPG modifikované s porfyrizinátovým a nafionovým filmem. Pík oxidace cysteinu byl znatelně nižší než na nafionem nepokryté elektrodě (obr.3.23a) zjevně v důsledku omezení přístupu cysteinu k elektrodě nafionovým filmem, jehož póry na relativně objemné cysteinové molekuly působí jako molekulární síto. Existence nízkého, ale nenulového proudu oxidace cysteinu ukazuje na nedostatečnou homogenitu pokrytí elektrody nafionovým filmem. Tyto experimenty nicméně naznačují možnost zvýšení selektivity stanovení sulfidů vedle cysteinu zpracováním proudového signálu použitím dvou porfyrizinových elektrod, z nichž pouze jedna by byla pokryta nafionovým filmem. Proudová odezva této elektrody by odpovídala pouze koncentraci sulfidů, zatímco signál elektrody bez nafionu by představoval – v ideálním případě – součet obou složek, tj. sulfidu a cysteinu. Rozdílový signál obou elektrod by pak mohl poskytovat informaci o koncentraci samotného cysteinu.



Obr. 3.23 Cyklická voltametrie na HOPG elektrodě s deponovaným filmem Co(tmtppa) a nafionu ve vodném roztoku fosfátového pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$) obsahujícím cystein ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (a), sulfid ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (b). Voltamogram (b) naměřen na totožné elektrodě jako (a) pouze po výměně roztoku cysteinu za roztok sulfidu. Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, Pt, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$.

Skutečnost, že se cystein adsorbuje na povrchu elektrody podporuje cyklická voltametrie sulfidového roztoku o $\text{pH} = 11,0$, jež byla provedena na porfyrázinátové elektrodě pokryté nafionovým filmem (obr. 3.23) použité nejprve v roztoku cysteinu. Zatímco oxidace cysteinu byla do značné míry blokována nafionem, oxidace sulfidů proběhla, včetně zpětné redukce polysulfidů. Na elektrodě bez nafionového pokrytí (obr. 3.24) probíhá oxidace cysteinu při $\text{pH} = 11,0$ bez viditelné inhibice produktem, avšak po výměně roztoku cysteinu za roztok sulfidu proběhla oxidace sulfidů na téže elektrodě s minimální zpětnou redukcí polysulfidů. Tuto skutečnost lze vysvětlit přítomností adsorbovaného cysteinu, který blokuje adsorpci polysulfidů na elektrodě.



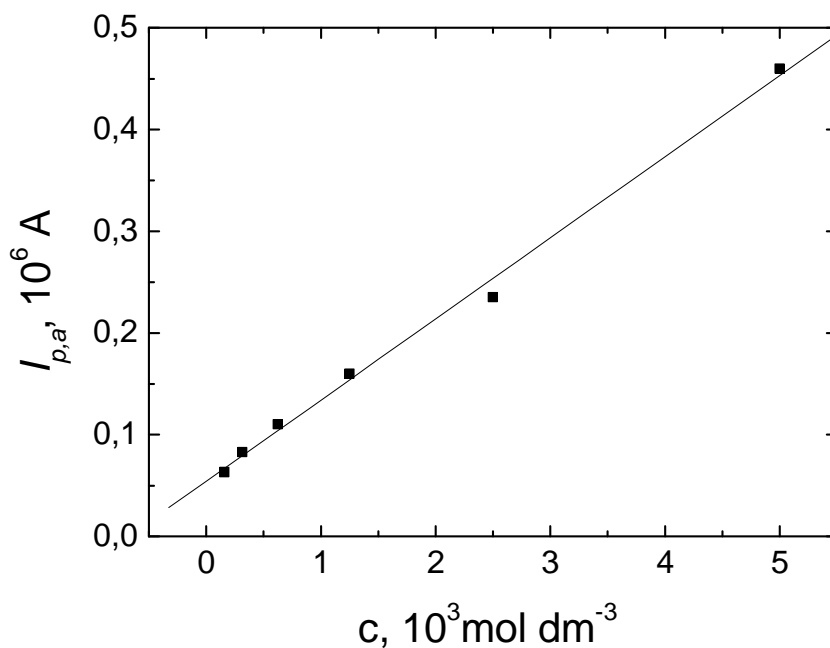
Obr. 3.24 Cyklická voltametrie HOPG elektrody modifikované porfyrázinem ve roztoku fosfátového pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$) obsahujícím cystein ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (a) a sulfid ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (b). Voltamogram (b) byl naměřen na totožné elektrodě jako (a) pouze po výměně roztoku cysteinu za roztok sulfidu. Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, Pt, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$.

3.6 STANOVENÍ CYSTEINU

Metodou cyklické voltametrie byly měřeny hodnoty proudové odezvy HOPG elektrody modifikované třicetiminutovou depozicí Co(Tmtppa) na různé koncentrace cysteinu. Soubor výsledků z pěti opakovaných měření byl statisticky zpracován a z vyhovujících hodnot byla metodou lineární regrese odvozena kalibrační přímka (obr. 3.24) vyjádřená rovnicí:

$$I [\text{A}] = 7,97 \cdot 10^{-5} c [\text{mol dm}^{-3}] + 5,41 \cdot 10^{-8} \quad (3.3)$$

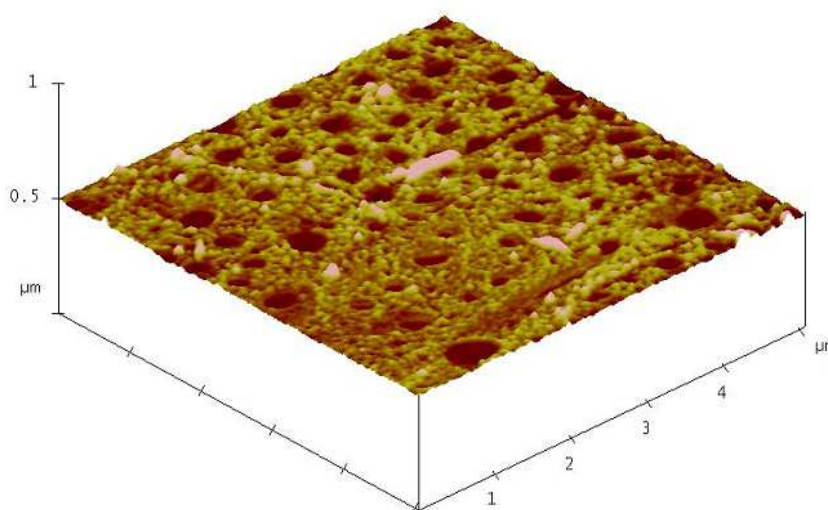
$$\text{LOQ} = 7,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$



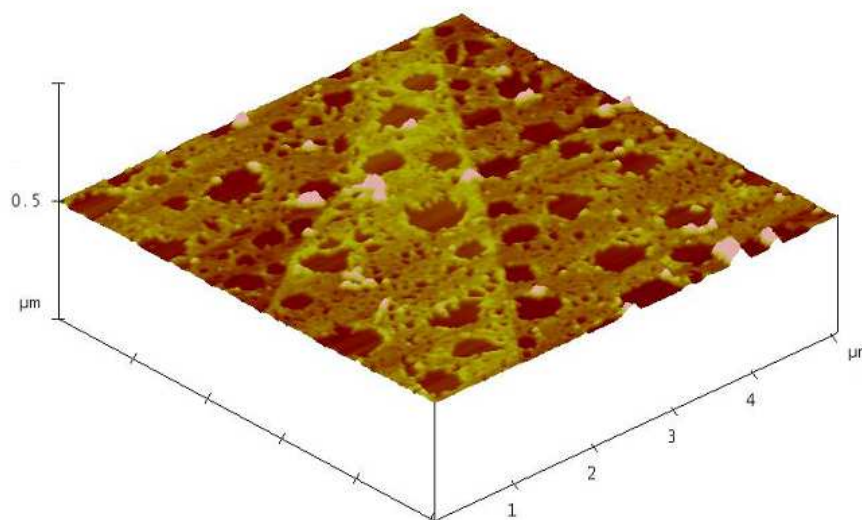
Obr. 3.24 Kalibrační přímka pro stanovení cysteinu na HOPG s deponovaným filmem Co(Tmtppa). Cyklická voltametrie ve fosfátovém pufru ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 11,0$), Ar, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, SCE, Pt, potenciálové rozmezí $-1,1 \text{ V}$ až $0,5 \text{ V}$.

3.7 NANOMORFOLOGIE PORFYRAZINOVÉ ELEKTRODY

Mikroskopií atomárních sil byla zobrazena nanomorfologie povrchu HOPG s čerstvě deponovaným filmem Co(Tmtppa) (obr. 3.25) a téže elektrody po cyklické voltametii v roztoku obsahujícím sulfidové anionty (obr. 3.26). Sledovaný film byl deponován na elektrodu třicetiminutovou cyklickou voltametii v rozsahu potenciálů od $-0,8$ V do $-0,1$ V v roztoku Co(Tmtppa) o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} .



Obr. 3.25 Semikontaktní AFM topografie HOPG s porfyrazinátovým filmem (třicetiminutová elektrochemická depozice cyklickou voltametii v rozsahu potenciálů od $-0,8$ V do $-0,1$ V v roztoku Co(Tmtppa) o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} v prostředí dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,1$ mol dm^{-3} a $\text{pH} = 4,3$.



Obr. 3.26 Semikontaktní AFM topografie HOPG s porfyrazinátovým filmem po cyklické voltametrii sulfidů ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) v rozsahu potenciálů od $-0,8 \text{ V}$ do $-0,1 \text{ V}$ v prostředí fosfátového pufru o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 11,0$.

Na obou obrázcích je patrný film $\text{Co}(\text{Tmtppa})$, tvořený globulárními agregáty $\text{Co}(\text{Tmtppa})$. Příčinou kruhových nano-otvorů ve filmu porfyrazinu jsou zřejmě nanobublinky plynu, které mohly vzniknout na povrchu elektrody v průběhu deponování. Jejich maximální velikost $\sim 10^2 \text{ nm}$ je vzhledem k tloušťce Nernstovy difusní vrstvy ($\sim 100 \text{ μm}$) zanedbatelná a nelze očekávat, že by tato nanostruktura významně ovlivňovala kinetiku reakcí.

Profilová analýza nano-otvorů v deponovaném filmu ukazuje na tloušťku porfyrazinu $\sim 13 \pm 2 \text{ nm}$. Bylo zjištěno, že po cyklické voltametrii sulfidů (proběhlo 10 cyklů) mírně vzrostlo množství i průměr otvorů ve filmu porfyrazinátu a profilová analýza otvorů ukázala menší tloušťku filmu $\sim 7 \pm 2 \text{ nm}$. Důvodem je pravděpodobně mechanické narušení filmu nanobublinami vodíku vznikajícího jako vedlejší produkt při cyklické voltametrii na negativních potenciálech. Zobrazení AFM ale ukázalo, že na povrchu HOPG zůstává dostatečné množství porfyrazinu k zachování elektrokatalytických vlastností elektrody.

Mikroskopie atomárních sil rovněž neprokázala nárůst nebo významné změny v morfologii filmu, jež by naznačovaly depozici produktu oxidace sulfidů.

4 ZÁVĚR

Metodou cyklické voltametrie bylo studováno elektrochemické chování vysoce orientovaného pyrolytického grafitu modifikovaného imobilizovaným N,N',N'',N''' -tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporfyrazinátém kobaltu. Porovnáním nábojové charakteristiky anodických píků porfyrazinátového ligandu byly zjištěny a porovnány stability porfyrazinátového filmu v kyselém, neutrálním i zásaditém pH měřeného prostředí v závislosti na měněném potenciálovém rozsahu měření. Stabilita porfyrazinátového filmu byla v negativních potenciálech pravděpodobně omezena elektrochemickým vývojem vodíku, který postupně mechanicky odstraňoval porfyrazinátovou vrstvu. V oblasti kladných potenciálů bylo limitujícím faktorem postupné rozpuštění porfyrazinátového filmu zpět do roztoku. Pro zvýšení stability filmu Co(Tmtppa) byl na porfyrazinátém modifikovanou elektrodu nanesen nafionový film. Stabilní anodická odezva porfyrazinátového ligandu pak byla pozorována v téměř dvojnásobném potenciálovém rozsahu než u porfyrazinátového filmu bez nafionového pokrytí.

Kromě rozšíření potenciálových pracovních rozsahů elektrody byly po pokrytí nafionem pozorovány další změny v jejím elektrochemickém chování. Vlivem dlouhého máčení elektrody docházelo ke změnám na cyklickém voltamogramu, které indikovaly možnou restrukturalizaci porfyrazinátového filmu.

Elektrokatalytická aktivita HOPG modifikovaného Co(Tmtppa) filmem byla již popsána v literatuře, nicméně voltametrická studie elektrochemického chování sulfidů, ani stanovení sulfidových aniontů na filmu Co(Tmtppa) doposud publikovány nebyly. Rovněž elektrochemické chování sulfidových aniontů v roztoku v nepřítomnosti kyslíku dodnes není zcela objasněno. Zatímco cyklická voltametrie na čisté HOPG nevykázala žádnou reakci na sulfidy, v případě modifikované elektrody byla zaznamenána významná elektrokatalytická aktivita vůči sulfidu. Na základě cyklické voltametrie byla diskutována teorie elektrochemických přeměn během cyklické voltametrie sulfidů. Byla naměřena kalibrační přímka stanovení sulfidů.

Dále byla studována elektrokatalytická aktivita Co(Tmtppa) k cysteinu. Ukázalo se, že v neutrálním pH dochází v každém cyklu k blokování elektrody elektrochemicky neaktivním produktem, který se během zpětného skenu desorbuje, a dochází ke znovuobjevení oxidačního píku. V zásaditém prostředí je veškerý cystein zcela disociovaný na elektrochemicky aktivní formu, nicméně testování stability proudové odezvy elektrody v přítomnosti cysteinu ukázalo, že proudová odezva během prvních cyklů prudce klesá a po více cyklech se ustaluje na nižší hodnotě. Elektroda tedy není zcela blokována, ale ztrácí svou původní citlivost.

Bylo zjištěno, že nafionový film působí na cystein jako molekulární síto. Oxidace cysteinu je značně blokována nafionovým filmem, ovšem oxidace sulfidů probíhá včetně zpětné redukce polysulfidů. Nafion tak chrání porfyrizinový film před adsorpcí cysteinu, která jinak probíhá na porfyrizinátovém filmu bez nafionového pokrytí, kde indikuje absenci redukčního píku polysulfidů. Byla naměřena kalibrační přímka cysteinu.

Mikroskopii atomárních sil bylo zjištěno, že během cyklické voltametrie sulfidů byl porfyrizinový film mechanicky narušen nanobublinami vodíku. Topografie povrchu ovšem prokázala, že na HOPG zůstává dostatečné množství porfyrizinu k zachování katalytické aktivity elektrody. Mikroskopie neprokázala významné změny v morfologii filmu, jež by poukazovaly na adsorpci produktů oxidace na povrch elektrody.

LITERATURA

- [1] Klusáčková, M.: Charakterizace elektrody modifikované pyridinoporfyrinátovým filmem a její využití v elektrochemickém senzoru. *Diplomová práce*. Praha, UK PČF 2011.
- [2] Merhoutová, J.: Porfyrinový film pro použití v elektrochemickém senzoru. *Diplomová práce*. Praha, UK PČF 2010
- [3] World Health Organisation (WHO): *Hydrogen Sulfide*. Geneva, 1981. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc019.htm#SectionNumber:3.1>> (cit. 26. 6. 2012)
- [4] Patnaik, P.: *A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substance*, 3. ed. New Jersey, Wiley, 2007, 407
- [5] Renpu, W.: *Advanced Well Completion Engineering*. 3. ed. Elsevier 2011, p. 630,673
- [6] National Institute of Standards and Technology (NIST): *Corrosion Survey Database*. NACE International, The Corrosion Society 2002
- [7] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. O'Neil, M. J. (edit.). 14. ed. New Jersey, Merck 2006
- [8] Hughes, M. N.; Centelles, M. N.; Moore, K. P: Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free radical Biology and Medicine* **47**, 1346–1353 (2009)
- [9] Housecroft, C. E.; Sharpe, A.G.: *Inorganic Chemistry*, 2.ed. Harlow, Pearson Education Limited 2005, 446
- [10] Chen, K. Y.; Morris, J.C.: Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environmental Science and Technology* **6**, 529–537 (1972)
- [11] Meyer, B.; Ward, K.; Koshlap, K.; Peter, L.: Second dissociation constant of hydrogen sulfide. *Inorganic Chemistry* **22**, 2345–2346 (1983)
- [12] Amperometric H₂S microsensor. Determination of H₂S and total sulfide in aqueous solutions. Dostupné z URL: <<http://www.amt-gmbh.com>> . (cit. 25.6.2012)
- [13] Mancardi, D.; Pwnna, C.; Melino, A.; Del Soldato, P.; Winka, D. A.; Pagliaro, P.: Physiological and pharmaceutical features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**, 864–872 (2009)
- [14] Furne, J.; Saeed, A.; Levitt, M. D.: Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology-Regulatory and Comparative Physiology* **295**, R1479–R1485 (2008)
- [15] Stárka, L.: Sulfan – další plynný hormon? *Chemické Listy* **103**, 28–31 (2009)
- [16] Eng, A. D.; Ramasam, T.; Bhatia, M.: Hydrogen sulfide. Dostupné z URL: <<http://www.pancreapedia.org>> (cit. 15.7.2012)
- [17] Wang, R.: Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1792–1798 (2002).
- [18] Gadalla, M. M.; Snyder, S. H.: Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of Neurochemistry* **113(1)**, 14–26 (2010)

- [19] Predmore, B. J.; Lefer, D. J.; Gojon, G.: Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**, 119–140 (2012)
- [20] Agency for Toxic Substance and Disease Registry: *Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide*. Dostupné z URL: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp114.pdf>> (cit. 26. 7. 2012)
- [21] U.S. Department of Health and Human Services: *Occupational Health Guideline for Hydrogen Sulfide*. Dostupné z URL: <<http://www.cdc.gov/niosh/docs/81-123/pdfs/0337.pdf>> (cit. 26.6.2012)
- [22] Smith, R. P.: A short history of hydrogen sulfide. *The American Scientist* **98**, 6 (2010)
- [23] Reiffenstein, R. J.; Hulbert, W. C.; Roth, S. H.: Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**, 109–134 (1992)
- [24] Chaturvedi, A. K., Smith, D. R.; Canfield, D. V.: A fatality caused by accidental production of hydrogen sulfide. *Forensic Science International* **123**, 211-214 (2001)
- [25] Cooper, C. E.; Brown, G. C.: The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **40**, 533–539 (2008)
- [26] Lambert, T. W.; Goodwin, V. M.; Stefani, D.; Strosher, L.: Hydrogen sulfide (H₂S) and sour gas effects on the eye. A historical perspective. *Science of the Total Environment* **367**, 1–22 (2006)
- [27] Ammann, H. M.: *Health Assessment Document for Hydrogen Sulfide*, Washington, U.S. Environmental Protection Agency 1993
- [28] Kodíček; M.: *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Praha, VŠCHT 2007. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm> (cit. 12.8.1012)
- [29] *Geochemistry of Sulfur in Fossil Fuels*. Orr, W. L.; White, C. M. (Eds). Washington, American Chemical Society 1990, p. 16
- [30] Reese, K.B.; Finnerman D. W.; Mills, H. J.; Zhu, M.-X.; Mose, J. W.: Examination and refinement of the determination of aqueous hydrogen sulfide by the methylene blue method. *Aquatic Geochemistry* **17**, 567–582 (2011)
- [31] Cline, J. D.: Spectrofotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* **14**, 454–458 (1969)
- [32] Fogo, J. K.; Popowsky, M.: Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Analytical Chemistry* **21**, 732–734, (1949)
- [33] Rodriguez-Fernandez, J.; Costa, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.: Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurements of hydrogen sulphide in mouth air. *Analytica Chimica Acta* **398**, 23–31 (1999)
- [34] Toda, K.; Dasgupta, P. K.; Li, J.; Tarver, G. A.: Measurement of atmospheric hydrogen sulfide by continuous flow fluorometry. *Analytical Sciences* **17**, 407–410 (2001)
- [35] Cardoso, A. A.; Liu, H.; Dasgupta, P. K.: Fluorometric fiber optic drop sensor for atmospheric hydrogen sulphide. *Talanta* **44**, 1099–1106 (1997)
- [36] Cutter, G.A.; Oatts, T. J.: Determination of dissolved sulfide and sedimentary sulfur speciation using gas chromatography – photoionization detection. *Analytical Chemistry* **59**, 717–721 (1987)

- [37] Wardencki, W.: Problems with the determination of environmental sulphur compounds by gas chromatography. *Journal of Chromatography* **739**, 1–19 (1998)
- [38] Richardson, C. J., Magee, E. A. M.; Cummings, J. H.: A new method for the determination of sulfide in gastrointestinal contents and whole blood by microdistillation and ion chromatography. *Clinica Chimica Acta* **239**, 115–125 (2000)
- [39] Ubuka, T.; Abe, T.; Kajikawa, R.; Morino, K.: Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography. *Journal of Chromatography B* **757**, 31–37 (2001)
- [40] Shen, X.; Edwards, R. L.; Cheng, H.; Dorale, J. A.; Thomas, R. B. Moran; Weinstein, S. E.; Edmonds, H. N.: Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Methods in Free Radical Biology and Medicine* **50**, 1021–1031 (2011)
- [41] Schimizu, K.; Osteryoung, R. A.: Determination of sulfide by cathodic stripping voltametry of silver sulfide films at rotating silver disc electrode. *Analytical Chemistry* **53**, 584–588 (1981)
- [42] Lawrence, N. S.; Deo, R. P.; Wang, J.: Electrochemical determination of hydrogen sulfide at carbon nanotube modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* **517**, 131–137 (2004)
- [43] Youssefi, M.; Birke, R. L.: Determination of sulfide and thiols in the presence of vitamin B12a by pulse polarography. *Analytical Chemistry* **49**, 1380–1385 (1977)
- [44] Umiker, K. J.; Morra, M. J.; Cheng, I. F.: Aqueous sulfur species determination using differential pulse polarography. *Microchemical Journal* **73**, 287–297 (2002)
- [45] Redinha, J. S.; Paliteiro, C.; Pereira, J. L. C.: Determination of sulfide by square-wave polarography. *Analytica Chimica Acta* **351**, 115–125 (1997)
- [46] Schmidt, E.; Marton, A.; Hlavay, J.: Determination of the total dissolved sulphide in the pH range 3–11,4 with sulphide selective ISE and Ag/Ag₂S electrodes. *Talanta* **41**, 1219–1224 (1994)
- [47] Dobcnik, D.; Gross, I.; Kolar, M.: A silver/silver sulfide selective electrode prepared by means of chemical treatment of silver wire. *Acta Chimica Slovenica* **45**, 209–216 (1998).
- [48] *Ion-Selective Electrodes*. Durst, R. A. (Edit). Washington, National Bureau of Standards 1969
- [49] Miller, B.; Chen, A.: Oscillatory instabilities during the electrochemical oxidation of sulfide on a Pt electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **588**, 314–323 (2006)
- [50] Feng, J.; Gao, Q.; Xu, L.; Wang, J.: Nonlinear phenomena in the electrochemical oxidation of sulfide. *Electrochemistry Communications* **7**, 1471–1476 (2005).
- [51] Kharafi, F. M.: Electrochemical oxidation of sulfide ions on platinum electrodes. *Modern Applied Science* **4**, 2–11 (2010)
- [52] Ma, Y. L.; Galal, A.; Zimmer, H.; Mark, H. B.; Huang, Z. H.; bishop, P. L.: Potentiometric selective determination of hydrogen sulfide by an electropolymerized membrane electrode based on binaphthyl-20-crown-6. *Analytica Chimica Acta* **289**, 21–26 (1994)
- [53] Tse, Y.H.; Janda, P.; Lever, A.B.P.: Electrode with electrochemically deposited *N, N', N'', N'''*-tetramethyltetra-pyridinoporphyrazinocobalt(I) for detection of sulfide ion. *Analytical Chemistry* **66**, 384–390 (1994)
- [54] Tse, Y.H.; Janda P.; Lam, H.; Lever, A.B.P.: Electrode with electropolymerized tetraaminophthalocyanatocobalt(II) for detection sulfide. *Analytical Chemistry* **67**, 981–985 (1995)

- [55] Khudaish, E. A.; Al-Hinai, A.: The catalytic activity of vanadium pentoxide film modified on the electrochemical oxidation of hydrogen sulfide in solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **587**, 108–114 (2006)
- [56] Thomson, M.; Lawrence, N. S.; Davis, J.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G.: A reagentless renewable *N, N'*-diphenyl-phenylenediamine loaded sensor for hydrogen sulfide. *Sensors and Actuators B* **87**, 33–40 (2002)
- [57] Dilgin, Y.; Kizilkaya, B. Ertek, B.; Isik, F.; Dilgin, D. G.: Electrocatalytic oxidation of sulfide using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin. *Sensors and Actuators B* **171–172**, 223–229 (2012)
- [58] Dilgin, Y.; Kizilkaya, B. Ertek, B.; Eren, N.; Dilgin, D. G.: Amperometric determination of sulfide based on its electrocatalytic oxidation at pencil graphite electrode modified with quercetin. *Talanta* **89**, 490–495 (2012)
- [59] Jeroschewski, P.; Steuckart, C.; Kühl, M.: An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Analytical Chemistry* **68**, 4351–4357 (1996)
- [60] Paim, L.L.; Stradiotto, N. R.: Electrooxidation of sulfide by cobalt pentacyanonitrosylferrate film on glassy carbon electrode by cyclic voltametry. *Electrochimica Acta* **55**, 4144–4147 (2012)
- [61] Florou, A.B.; Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.: Electrocatalysis of sulphide with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol. Application to sewage using a fully automated flow injection manifold. *Talanta* **52**, 465–472 (2000)
- [62] Giovanelli, D.; Lawrence, N. S.; Jiang, L.; Jones, T. M. J.; Compton, R. G.: Electrochemical determination of sulphide at nickel electrodes in alkaline media: A new electrochemical sensor. *Sensors and Actuators B* **88**, 320–328 (2003)
- [63] Lewis, R. J.: *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. 14. ed. New York, Wiley 2002
- [64] Matthews, H. R.; Freedland, R. A.; Miesfeld, R. L.: *Biochemistry : A Short Course*. New York, Wiley-Liss, 1997, p. 246–247
- [65] *Comprehensive Toxicology* 2.ed. McQueen, C. A. (edit.). Kidlington, Elsevier 2010, p. 146,303
- [66] Lang, C. A.; Mills, B. J.; Mastropaolo, W.; Liu, M. C.: Blood glutathione decreases in chronic diseases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **135**, 402–405 (2000)
- [67] Kleinman, W. A.; Richie, J. P.: Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochemical Pharmacology* **60**, 19–29 (2000)
- [68] *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* 2. ed. Cammack, R. (edit.). Oxford 2006, p. 160
- [69] Gaitonde, M. K.: A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal* **104**, 627–633 (1967)
- [70] Cavins, J. F.; Krull, L. H.; Friedman, M.; Gibbs, D. E.; Inglett, G. E.: Spectrophotometric cysteine analysis. *Agricultural and Food Chemistry* **20**, 1124–1126 (1972)
- [71] Bydalek, T. J.; Podolski, J. E.: Spectrophotometric determination of cysteine. *Analytical Chemistry* **40**, 1878–1782 (1968)

- [72] Wang, H.; Wang, W.-S.; Zhang, H.-S.: Spectrofluorimetric determination of cysteine based on the fluorescence inhibition of Cd(II)-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid complex by cysteine. *Talanta* **53**, 1015–1019 (2001)
- [73] Yahong, C.; Ruxiu, C.: Highly sensitive spectrofluorimetric determination of L-cysteine based on inhibition of hemoglobin. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 3357–3362 (2003)
- [74] Pfeiffer, C.M.; Huff, D. L.; Gunter, E. W.: Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in clinical laboratory setting. *Clinical Chemistry* **45**, 291–293 (1999).
- [75] Russell, J.; McKeown, J. A.; Hensman, C.; Smith, W. E.; Reglinski, J.: HPLC determination of biologically active thiols using pre-column derivatisation with 5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoic acid). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15**, 1757–1763 (1997)
- [76] Winters, R. A.; Zukowski, J.; Ercal, N.; Matthews, R. H.; Spitz, D. R.: Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by *N*-(1-pyrenyl)maleimide. *Analytical Biochemistry* **227**, 14–21 (1995)
- [77] Potesil, D.; Petrlova, J.; Adam, V.; Vacek, J.; Klejdus, B.; Zehnalek, J.; Trnkova, L.; Havel, L.; Kizek, R.: Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione and phytochelatin in maize (*Zea mays L.*) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* **1084**, 134–144 (2005).
- [78] Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I.; Hine, R. J.; James, S. J.: A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection. *Journal of Nutritional Biochemistry* **10**, 490–497 (1999)
- [79] Jin, W.; Wang, Y.: Determination of cysteine by capillary zone electrophoresis with end-column amperometric detection at a gold/mercury amalgam microelectrode without deoxygenation. *Journal of Chromatography A* **769**, 307–314 (1997)
- [80] Kolthoff, I. M.; Barnum, C.: The anodic reaction and waves of cysteine at the dropping mercury electrode and at the platinum micro wire electrode. *Journal of American Chemical Society* **62**, 3061–3065 (1940)
- [81] Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Cathodic stripping voltametry of cysteine using silver and copper solid amalgam electrodes. *Talanta* **56**, 971–976 (2002)
- [82] Heyrovský, M.; Vavříčka, S.: Adsorption effects of electroactive species in d.c. polarography demonstrated in the case of the anodic waves of cysteine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **423**, 125–130 (1997)
- [83] Heyrovský, M.; Mader, P.; Vavříčka, S.; Veselá, V.; Fedurco, M.: The anodic reactions at mercury electrodes due to cysteine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **430**, 103–117 (1997)
- [84] Jöhl, M.E.; Williams, D. G.; Johnson, C. J.: Activated pulsed amperometric detection of cysteine at platinum electrodes in acidic media. *Electroanalysis* **9**, 1397–1402 (1997)
- [85] Abbaspour, A.; Ghaffarinejad, A.: Electrocatalytic oxidation of L-cysteine with a stable copper-cobalt hexacyanoferrate electrochemically modified carbon paste electrode. *Electrochimica Acta* **53**, 6643–6650 (2008)

- [86] Amini, K. M.; Khorasani, J.H.; Shokooh, K. S.; Tangestaninejad, S.: Cobalt(II) salophen-modified carbon-paste electrode for potentiometric and voltametric determination of cysteine. *Analytical Biochemistry* **320**, 32–38 (2003).
- [87] Halbert, M. K.; Baldwin, R. P.: Electrocatalytic and analytical response of cobalt phthalocyanine containing carbon paste electrodes toward sulfhydryl compounds. *Analytical Chemistry* **57**, 591–595 (1985)
- [88] Ensafi, A. A.; Behyan, S.: Sensing of L-cysteine at glassy carbon electrode using Nile blue A as a mediator. *Sensors and Actuators B* **122**, 282–288 (2007).
- [89] Tan, W. T.; Bond, A. M.; Ngooi, S. W.; Lim, E. B.; Goh, J. K.: Electrochemical oxidation of L-cysteine mediated by a fullerene–C₆₀–modified carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* **490**, 181–191 (2003).
- [90] Sugawara, K.; Hoshi, S.; Akatsuka, K.; Shimazu, K.: Electrochemical behavior of cysteine at a Nafion®|cobalt(II) modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **414**, 253–256 (1996)
- [91] Lawrence, N. S.; Davis, J.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Davis, S. N.; Compton, R. G.: Selective determination of thiols: a novel electroanalytical approach. *Analyst* **125**, 661–663 (2000)
- [92] Chen, X.; Yang, Y.; Mingyu, D.: Electrocatalytic oxidation and sensitive detection of cysteine at layer-by-layer assembled carbon nanotube-modified electrode. *Analytica Chimica Acta* **557**, 52–56 (2006)
- [93] Liu, Z.; Zhang, H.; Hou, S.; Ma, H.: Highly sensitive and selective electrochemical detection of L-cysteine using nanoporous gold. *Microchimica Acta* **177**, 427–433 (2012)
- [94] Perevezentseva, D. O.; Gorchakov, E. V.: Voltametric determination of cysteine at a graphite electrode modified with gold nanoparticles. *Journal of Solid State Electrochemistry* **16**, 2405–2410 (2012)
- [95] Nekrassova, O.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G.: Selective electroanalytical assay for cysteine at a boron doped diamond electrode. *Electroanalysis* **16**, 1285–1291 (2004)
- [96] Antonov, A.; Grigorieva, G. Kanngießer, B.; Arkadiev, V.; Beckhoff, B.: HOPG-based Optics in *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Beckhoff, B. et al. (Edits.). Heidelberg, Springer 2006, p.143–157
- [97] Inakagi, M.; Feiyu, K.: *Carbon Materials Science and Engineering: From Fundamentals to Applications*. Tsinghua University Press 2006, p. 312–316
- [98] McCreery, R. L.: Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews* **108**, 2646–2687 (2008)
- [99] *Handbook of Electrochemistry*. Zoski, C. Z. (Edit.). Oxford, Elsevier 2007
- [100] Kravchik, A. E.; Kukushkina, J. A.; Sokolov, V. V.; Tereshchenko, G. F.: Structure of nanoporous carbon produced from boron carbide. *Carbon* **44**, 3263–3268 (2006)
- [101] McCreery, R.; McDermott, M. T.: Comment on electrochemical kinetic at ordered graphite electrodes. *Analytical Chemistry* **84**, 2602–2605 (2012)
- [102] Barenjee, S.; Sardar, M.; Gayathri, N. Tyagi, A.K.; Raj, B.: Conductivity landscape of highly oriented pyrolytic graphite surfaces containing ribbons and edges. *Physical Review B* **72**, 075418 (2005)

- [103] Edwards, M. A.; Bertoncello, P.; Unwin, P. R.: Slow diffusion reveals the intrinsic electrochemical activity of basal plane highly oriented pyrolytic graphite electrodes.
The Journal of Physical Chemistry C **113**, 9218–9223 (2009)
- [104] US Pat 5,342,490. Lever, A. B. P., Tse, Y. H., Janda, P.:
Electrolytic detection of sulphur. 30.8.1994
- [105] Thamae, M.; Nykong, N.: Cobalt(II) porphyrazine catalysed reduction of nitrite.
Journal of Electrochemistry **470**, 126–135 (1999)
- [106] Chen, J.; Zhang, J.; Tse, Y.-H., Janda, P.; Christendat, D.; Lever, A.B.P.: Surface electrochemistry of *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt(II). *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **10**, 1238–1248 (2006).
- [107] Zhang, J.; Tse, Y.-H.; Pietro, W. J.; Lever, A.B.C.: Electrocatalytic activity of *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt(II) adsorbed on a graphite electrode towards the oxidation of hydrzine and hydroxylamine.
Journal of Electroanalytical Chemistry **406**, 203–2011 (1996).
- [108] Janda, P., Weber, J., Dunsch, L., Lever, A. B. P.: Detection of ascorbic acid using a carbon fiber microelectrode coated with cobalt tetramethylpyridoporphyrazine.
Analytical Chemistry **68**, 960-965 (1996).
- [109] Zhang, J., Pietro, W. J., Lever, A.B.P.: Rotating ring-disk electrode analysis of CO₂ reduction electrocatalyzed by a cobalt tetramethylpyridoporphyrazine on the disk and detected as CO on a platinum ring. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **403**, 293–100 (1996).
- [110] Manan, N. S. A.; Aldous, L.; Alias, Y.; Murray, Yellowlees, L. J.; Lagunas, M. C.; Hardacre, C.: Electrochemistry of Sulfur and Polysulfides in Ionic Liquids.
Journal of Physical Chemistry B **115**, 13873–13879 (2011)
- [111] Kleinjan, W. E. ; de Keizer, A.; Janssen, A. J.: Kinetics of the chemical oxidation of polysulfide anions in aqueous solution. *Water Resesearch* **17**, 4093-100 (2005)
- [112] Spataru, N; Sarada, B. V.; Popa, E. Tryk, D.; Fujishima, A.: Voltametric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes. *Analytical Chemistry* **73**, 514–519 (2001)
- [113] Ralph, T. R.; Hitchman, M. L.; Millington, J. P.; Walsh, F.C.: The electrochemistry of L-cysteine and L-cysteine. Part 1: Thermodynamic and kinetic studies.
Journal of Electroanalytical Chemistry **375**, 1–15 (1994)