

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Edita Prokešová

STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ
COULOMETRICKÉHO DETEKTORU S VÝMĚNNOU NÁPLNÍ

Determination of amino acids using a coulometric detector with
replaceable filling

Diplomová práce

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

Praha 2016

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

Podpis

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu Grantové agentury ČR (Projekt P206/15/02815S).

Za odborné vedení a cenné rady bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, PhD a za drahocenné připomínky Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc.

Mgr. Janu Mikovi, PhD bych moc ráda poděkovala za trpělivost, rady a poskytnutou pomoc při výrobě detektorů.

A na závěr děkuji svým rodičům a manželovi za psychickou podporu a umožnění studia na vysoké škole.

Klíčová slova:

Tyrosin

Fenylalanin

Coulometrický detektor s výměnnou náplní

Průtoková injekční analýza

Key words

Tyrosine

Phenylalanine

Coulometric detector with replaceable filling

Flow injection analysis

Abstrakt

Tato diplomová práce rozvíjí dříve vyvinutou konstrukci coulometrického detektoru s výměnnou náplní s mikrokuličkami skelného uhlíku, modifikuje způsob jeho plnění a rozšiřuje možnosti náplně o mikročástice mědi. V případě plnění uhlíkovými mikročásticemi jde zejména o testování různého složení suspenze a urychlování plnění prostřednictvím dávkování vzduchových bublin, v případě mikročástic mědi byla modifikována i základní konstrukce detektoru a mimo postupu plnění byly testovány také vhodné způsoby aktivace povrchu měděných částic a čištění celého detektoru

Pomocí vícerozměrné statistické analýzy byla vyvinuta metoda stanovení tyrosinu technikou FIA s coulometrickou detekcí na detektoru z mikrokuliček skelného uhlíku. Optimálními podmínkami pro stanovení tyrosinu byly: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál 1,3 V, objem dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí B-R pufru o pH 4,5. Mez detekce byla stanovena na hodnotu $0,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $1,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Fenylalanin byl stanoven technikou FIA s detekcí pomocí coulometrického detektoru s výměnnou náplní mikrokuliček mědi. Jako optimální podmínky pro stanovení byly určeny tyto: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 6,8, potenciál 0,2 V a objem dávkovací smyčky $20 \text{ } \mu\text{l}$. Po naměření kalibračních křivek byly zjištěny mez detekce a stanovitelnosti fenylalaninu $1,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, respektive $4,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Abstract

This Master Thesis evolves the previously developed construction of coulometric detector with replaceable filling with microspheres of glassy carbon, modifies the filling proces and introduces copper microparticles as the electroactive material. In case of carbon microbeads, different composition of the filling suspension and rapid fillig replacement by means of air bubbles injecting is tested; in case of copper microbeads, also the general construction of the detector was modified and besides the filling process, suitable procedure for the activation of the copper surface and for the cleaning of the detector was seeked.

Multivariate statistical analysis was used for the development of method for the determiantion of tyrosine using FIA with electrochemical detection on the detector made of glassy carbon beads. The optimum conditions for the determination of tyrosine were: flow rate $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, the potential of 1.3 V, the volume ot the injection loop of 50 μl , in a B-R buffer pH 4.5. The limit of detection was determined to $0,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and the limit of quantification to $1,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Phenylalanine was determined by the FIA with the coulometric detection, using detector filled with copper microparticles. optimum conditions for the determination were as follows: flow rate $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ phosphate buffer pH 6.8, the potential of 0.2V and injection loop volume of 20 μl . After measuring the calibration curves, limit of detection and quantification of phenylalanine of $1,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and $4,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, respectively, were observed.

Seznam použitých zkratek

B-R pufr	Britonův-Robinsonův pufr
c	Koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
CCD	Central composite design
CFA	Kontinuální průtoková analýza (continuous flow analysis)
CPE	Uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
Cys	Cystein
E	Potenciál [V]
FCCD	Face centered composite design
FFD	Fractional factorial design
FIA	Průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
I	Voltametrický proud [μA]
I_p	Proud pozadí píku [μA]
Leu	Leucin
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
OVAT	One Variable At A Time
Phe	Fenylalanin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Prošlý náboj [μA]
R^2	Koeficient determinace
RSD	Relativní směrodatná odchylka [%]
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
t	Čas [min]
Tyr	Tyrosin
Trp	Tryptofan
UV	Ultrafialová oblast
V	Objem [μl]

Obsah:

1.	Teoretická část	8
1.1	Cíle práce	8
1.2	Elektrochemická detekce v průtokových metodách.....	9
1.3	Konstrukce coulometrických detektorů	11
1.3.1	Coulometrický detektor s výměnnou náplní mikrokuliček skelného uhlíku .	12
1.4	Optimalizace pomocí vícerozměrné analýzy	13
1.4.1	Druhy experimentálních designů	14
1.5	Studované aminokyseliny	17
1.5.1	Způsoby stanovení tyrosinu a fenylalaninu	18
2.	Experimentální část.....	20
2.1	Použité chemikálie	20
2.2	Použité přístroje	21
2.3	Vícerozměrná analýza	22
2.4	Zpracování výsledků	22
3.	Výsledky a diskuze	23
3.1	Detektor s náplní z mikrokuliček uhlíku	23
3.1.1	Ověření optimalizace podmínek stanovení hexakynoželeznatanu draselného 23	
3.1.2	Optimalizace postupu plnění detektoru	30
3.1.3	Optimalizace stanovení tyrosinu	36
3.1.4	Stabilita odezvy tyrosinu	43
3.1.5	Kalibrační závislosti tyrosinu	46
3.2	Detektor s náplní z mikrokuliček mědi	49
3.2.1	Konstrukce coulometrického detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček mědi	49
3.2.2	Optimalizace postupu plnění detektoru	51
3.2.3	Mikroskopická studie povrchových změn mikrokuliček mědi	54
3.2.4	Čištění detektoru	56
3.2.5	Optimalizace podmínek stanovení fenylalaninu	58
3.2.6	Opakovatelnost podmínek stanovení fenylalaninu	62
3.2.7	Kalibrační závislost fenylalaninu.....	64
4.	Závěr	67
5.	Seznam použité literatury	68

1. Teoretická část

1.1 Cíle práce

Tato diplomová práce navazuje na testování průtokového coulometrického detektoru plněného mikrokuličkami skelného uhlíku^{15, 16}. Jejím cílem je jednak modifikace plnění detektoru a následně stanovení tyrosinu průtokovou injekční analýzou pomocí již dříve vyvinuté konstrukce detektoru s náplní z uhlíkových mikrokuliček, jednak přizpůsobení konstrukce a způsobu plnění coulometrického detektoru pro náplň z mikrokuliček mědi, a dále stanovení fenylalaninu průtokovou injekční analýzou pomocí coulometrického detektoru s náplní z mikrokuliček mědi.

1.2 Elektrochemická detekce v průtokových metodách

Měření v proudících kapalinách je jedno z nejrozšířenějších v moderní analytické chemii. Kontinuální měření jsou využívána převážně při kontrolách průmyslových procesů, sledování znečištění ovzduší a také ve farmacii. Díky kontinuálnímu proudu kapalin lze analyzovat velký počet vzorků a automatizovat je.

Průtokové metody lze rozdělit na kontinuální průtokovou analýzu – CFA (continuous flow analysis), průtokovou injekční analýzu – FIA (flow injection analysis) a chromatografické metody.

Mezi nejpoužívanější chromatografické metody patří HPLC ¹ a v poslední době je stále častější spojení HPLC s elektrochemickou detekcí, a to převážně díky její citlivosti a relativní selektivitě ².

Metodu CFA vymyslel pan Skeggs již roku 1957 a dále ji vypracovával a rozvinul do automatizovaných přístrojů ^{1, 3}. Metoda FIA je dobově mladší ⁴ a obě metody se liší jen v experimentálním provedení.

Při metodě CFA jsou vzorky nasávány jako široké zóny do proudící kapaliny segmentované vzduchovými bublinami, které potlačují rozšiřování zón. Systém dále obsahuje mísící spirálky, kde jsou smíchána reakční činidla se vzorkem, a probíhá reakce. Po ustálení prochází vzorek do detekční cely. Nevýhodou této metody jsou právě vzduchové bubliny, které je třeba pro mnoho detekčních technik odstranit ^{1, 3}.

Metoda FIA využívá úzkých zón vzorků, které jsou vstřikovány do proudu proudící kapaliny, která může být smíchána i z více činidel. K detekci tímto způsobem můžou doputovat látky, které jsou v neustáleném stavu. Jelikož se v metodě nepoužívá segmentace pomocí vzduchu, je instrumentálně jednodušší a zhruba dvojnásobně rychlejší než CFA ^{1, 4}. FIA je vhodná pro stanovení jednodušších látek vzhledem k nepřítomnosti separačního kroku ¹.

Pro plné využití možností průtokových metod je důležitá detekce, která musí splňovat určité podmínky. Detektory musí být citlivé, selektivní a musí udržet reprodukovatelný a stabilní signál. Mezi detektory splňující tyto podmínky patří elektrolytické detektory, které jsou jednoduché, mají nízké pořizovací náklady, jsou přesné, mají rychlou odezvu, ale hlavně je možné je miniaturizovat. Miniaturizace je vhodná zejména při použití systémů s průtokem v kapilárách, které mohou být i součástí elektrolytického detektoru¹. Výhodou

miniaturizace může být i fakt, že zmenšením plochy detektoru se nesnižují detekční meze, také poskytují přímou informaci o koncentraci stanovovaných látek v jednoduše upravitelných elektrických signálech a tím se vyloučí přepočítávání, které se provádí například u světelného toku⁵.

Mezi nevýhody elektrolytické detekce patří malé množství elektrochemicky aktivních látek, které lze stanovit, avšak tento bod může být brán i jako výhoda, jelikož je tím dána větší selektivita elektrolytických detektorů.

Metody elektrolytické detekce je možné rozdělit dle řízeného parametru. Při rovnovážné potenciometrii je řízený parametr – celkový proud – nastaven na nulu. U ostatních elektrolytických metod má proud nenulovou hodnotu a řízenými parametry jsou proud či potenciál; tyto metody se liší převážně experimentálními podmínkami a jsou jimi například amperometrie, coulometrie a voltametrie. Při amperometrii je proudová odezva funkcí celkové koncentrace analytu, přičemž elektrochemická konverze je nízká, jelikož se přemění jen minimum z celkového množství stanovované látky. Při coulometrii se přemění většina stanovované látky, a proto se stupeň konverze blíží 100 %. Coulometrii lze také využít pro elektrochemickou derivatizaci látek v proudících kapalinách vhodnou oxidací či redukcí na elektrodě, přičemž je vygenerován produkt, který již pak lze bez problémů stanovit.

Pokud jsou při coulometrii nalezeny vhodné podmínky, je získána 100% proudová účinnost. V tomto případě není nutná kalibrace, jelikož se jedná o absolutní metodu. V případě, že nelze nalézt tyto podmínky, což se stává v mnoha případech, je nutná kalibrace.

Mezi největší výhody coulometrických detektorů se řadí velká citlivost, přesnost a rychlá odezva. Mezi nevýhody coulometrické detekce patří pasivace a potřeba vodivého nosného roztoku. Při elektrochemických detekcích je předpokládáno, že je pasivace nižší než při vsádkovém uspořádání. Je to z toho důvodu, že detektorem neustále proudí kapalina a pasivující látka je vymývána nosným roztokem¹.

1.3 Konstrukce coulometrických detektorů

Při coulometrické detekci musí být stanovovaná látka v kontaktu s detektorem po dobu nezbytnou k proběhnutí elektrochemické reakce, což vyžaduje velkou plochu detektoru a může to také omezovat použitelnou průtokovou rychlost. Splnění těchto podmínek je nutné k dosažení úplné konverze, z odezvy detektoru je možné pomocí Faradayových zákonů zjistit náboj, který odpovídá počtu elektronů vyměněných při elektrodové reakci. HPLC s coulometrickou detekcí se nyní hojně využívá a to převážně při použití mikronáplňových a kapilárních kolon¹. Příkladem může být stanovení peptidů metodou HPLC s kapilární kolonou pomocí elektrochemické detekce, která je tvořena elektrodou s uhlíkovými vlákny⁶.

Při výběru materiálu se hledí na využitelný potenciálový rozsah, poměr signál/šum a stabilitu v čase, mimoto také na jednoduchost přípravy. Reakce probíhající na detektoru by měla být rychlá, bez vedlejších reakcí¹. Jedny z nejpoužívanějších materiálů jsou zlato¹, platina^{5, 7} a uhlík⁸. Při použití méně ušlechtilých kovů vznikají vedlejší reakce¹. Ovšem v některých případech je vhodné využít vlastností méně ušlechtilých kovů, například mědi^{5, 9}, kterou lze využít pro její komplexotvorné vlastnosti¹⁰ či kontrolovanému anodickému rozpouštění¹.

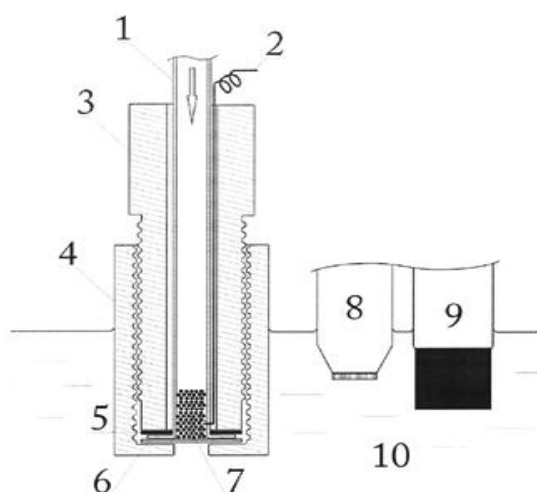
Uspořádání měrné cely ovlivňuje citlivost a reprodukovatelnost měření a tak se i dle měřících technik liší konstrukce. Při použití tuhých a stacionárních elektrod je možné užití rovinných či tubulárních geometrií¹. Pro splnění podmínky velké plochy detektoru, ale malého objemu měřící cely, se využívají porézní materiály, především porézní kovy¹¹, pórovitý skelný uhlík¹² a kovové částice^{13, 14}. Nevýhodou těchto materiálů je složitější výměna pasivovaného materiálu nebo elektrochemické čištění¹⁵.

1.3.1 Coulometrický detektor s výměnnou náplní mikrokuliček skelného uhlíku

Coulometrický detektor s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku byl převzat z dřívějších prací prováděných v naší laboratoři^{15, 16}. Detektor lze zařadit mezi porézní detektory; tyto detektory mají vyšší odezvu než většina elektrochemických detektorů při průtokových analýzách, což je způsobeno velkým aktivním povrchem při zachování malého objemu cely¹⁴. Tento detektor lze sestavit relativně snadno a rychle a při nízkých pořizovacích nákladech^{15, 16}.

Na obrázku č. 1.3.1 je vyobrazeno schéma tohoto coulometrického detektoru, který je ponořen v měřicí cele s pomocnou a referenční elektrodou. Coulometrický detektor tvoří přívodní kapilára, která je naplněna částicemi skelného uhlíku a je ukončena obrubou a spojena pomocí šroubů a spojky, přičemž mezi nimi je ukotven vhodný filtr. Vedení elektrického proudu je zajištěno platinovým drátkem, který je skrz stěnu kapiláry zaveden do vnitřního prostoru kapiláry. Kontakt je utěsněn pomocí polystyrenu.

Výměna uhlíkového sloupce je reprodukovatelně a jednoduše proveditelná. Detektor se jednoduše otevře, náplň se vymyje a po uzavření se nahradí nástríkem suspenze mikrokuliček elektrodového materiálu. Vložený filtr umožňuje průtok tekutiny detektorem a přitom neprůchodnost náplně mikrokuliček.



Obr. 1.3.1: Schéma detektoru v měrné cele: 1. PTFE kapilára (1/16'' x 0,5 mm ID), 2. Platinový drátek (průměr 0,5 mm), 3. Šroub, 4. Spojka, 5. Ocelová podložka, 6. Filtrační papír, 7. Sloupec mikrokuliček skelného uhlíku, 8. Referenční argenchloridová elektroda, 9. Pomocná platinová elektroda, 10. Elektrolyt.

1.4 Optimalizace pomocí vícerozměrné analýzy

Aby bylo dosaženo nejlepší odezvy systému, je nutné nalézt podmínky, při kterých je tato odezva možná. Tento postup je nazýván optimalizace¹⁷. Při optimalizaci jsou testovány jak parametry kvantitativní (čas, teplota, koncentrace činidla), tak kvalitativní (druh rozpouštědla, typ aparatury). Odezvou systému je naměřený výsledek, kterým mohou být: výška či plocha píku, absorbance i elektrický signál^{18, 19}.

Optimalizaci lze provádět buďto metodou OVAT (One-Variable-At-A-Time) anebo multifaktorovou neboli vícerozměrnou statistickou metodou. Při metodě OVAT je sledována vždy jen závislost odpovědi na jeden parametr a ostatní parametry jsou udržovány konstantní. Při této metodě je nutné provést velký počet experimentů pro nalezení optimálních podmínek stanovení, tím rostou i náklady na stanovení a čas provedení. Další nevýhodou je, že tato metoda nezahrnuje vliv interakcí mezi jednotlivými parametry. Druhá metoda, multifaktorová, je v dnešní době stále více používána k eliminování nevýhod metody OVAT¹⁷. U vícerozměrných technik hraje velkou roli jednoduchost experimentálního designu, za pomoci statistických nástrojů pro analýzu dat lze z několika experimentů získat vysoký počet informací o zkoumaném systému¹⁸. Vícerozměrné techniky využívají statistické a matematické metody, jejichž spojením je sestavena polynomická rovnice, která vystihuje chování daného systému při experimentálních podmínkách¹⁷. Postup při odvození rovnice lze rozdělit na několik kroků²⁰.

Nejprve jsou vybrány nezávislé parametry, které mají vliv na testovaný systém¹⁷. Těmto parametrům jsou dále přiřazeny intervaly oblasti experimentu a zvolí se druh sledované odezvy. Dle vymezených intervalů a počtu parametrů se volí druh experimentálního designu, který určí následující plán měření. Druh designu se vybírá také dle finančních a časových možností^{17, 21}.

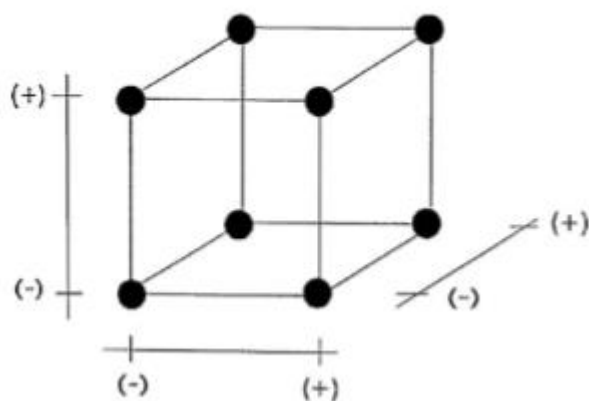
Z naměřených dat za určených podmínek jsou pomocí matematicko – statistických metod vyhodnoceny vlivy jednotlivých parametrů a jejich vzájemné interakce. Polynomická rovnice je získána z parametrů, které mají statisticky významný vliv na studovaný systém, a popisuje chování tohoto systému. Pro ostatní parametry, které nemají vliv, lze poté použít nejjednodušší nastavení snižující náklady²².

Posledním krokem je posouzení vhodnosti modelu a získání optimálních hodnot, popřípadě posunutí experimentální oblasti a z nových poznatků jsou získány optimální hodnoty pro náš studovaný parametr¹⁷.

1.4.1 Druhy experimentálních designů

Jedny z nejpoužívanějších designů jsou designy faktorové, přičemž nejjednodušší z nich je dvouúrovňový faktorový design, který tvoří základ pro všechny ostatní faktorové designy.

Dvouúrovňový faktorový design je ilustrován jako krychle představující zkoumanou oblast a vrcholy prezentují úrovně parametrů (Obr. 1.4.1). Tato krychle je využívána i u ostatních modelů, přidávají se jen další body do krychle^{18, 19}.



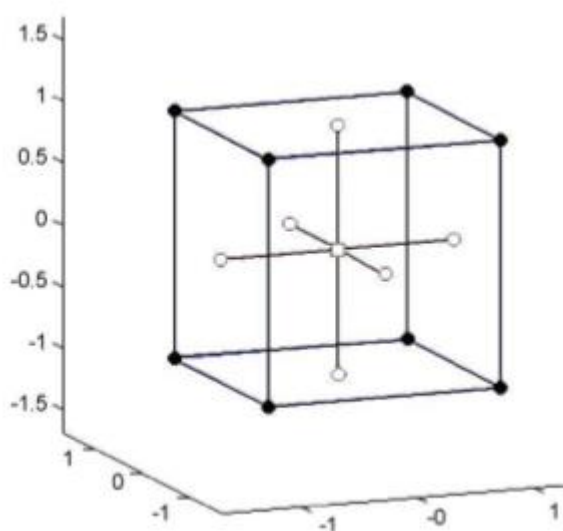
Obr. 1.4.1: Schéma pro dvouúrovňový test pro 3 parametry²³.

Faktorové designy lze dále rozdělit na plné a frakční. Při použití plných faktorových designů roste s počtem parametrů i počet měření dle vzorce 2^k (k je počet parametrů). Z tohoto důvodu jsou spíše využívány frakční faktorové designy (fractional factorial design, FFD), při kterých jsou vybrány pouze některé experimenty z plného faktorového designu^{22, 23}.

Box-Behnken design vyžaduje, aby všechny parametry měly tři rovnoměrně rozmístěné stupně (-1, 0, 1), kterými charakterizuje vliv parametrů a jejich interakcí na odezvu systému. Od aplikace tohoto designu se ustupuje a je nahrazován central composite designem (CCD)¹⁷.

Central composite design se skládá ze tří kroků a propojuje části různých designů. Nejprve jsou tvořeny experimenty na základě frakčního faktorového designu. Dalším krokem jsou experimenty využívající hodnoty axiální $-\alpha$ a $+\alpha$ a centrální bod 0. Při posledních experimentech jsou nastavené hodnoty parametrů na centrálních bodech. CCD je jednou z nejvíce používaných metod pro optimalizaci chromatografických systémů¹⁷.

Face centered composite design (FCCD) je obdobou CCD, rozdíl je v prvním kroku experimentu v použití plného faktorového designu na rozdíl od CCD, kde je užíván frakční. Další body jsou již obdobné. Již název designu vysvětluje umístění bodů ve středu stěn krychle (viz. Obr. 1.4.2, kde vyplněná černá kolečka označují body faktorového designu, prázdná kolečka označují axiální hodnoty a čtverec uprostřed je centrální bod)²³.



Obr. 1.4.2: Schéma Face centred designu pro 3 parametry²³.

Posledním typem frakčních faktorových designů je Doehlertův design, který je využíván stále častěji. V porovnání s ostatními faktorovými designy využívá méně experimentálních bodů na základě rozdílného počtu hladin pro každý parametr a tím pádem je účinnější a praktičtější^{17, 23}.

Dalšími druhy designu jsou směšové návrhy, vhodné pro zjištění optimálního zastoupení složek směsi, které ovlivňují odezvu systému^{22, 24}. Nejčastěji jsou tyto designy využívány pro zjištění optimálního poměru rozpouštědel v mobilních fázích u HPLC²⁴. Posledním druhem jsou designy nazvané optimální, které jsou využívány v případě

značného množství informací, kde však nelze provést všechny experimenty například z časových důvodů ²².

1.5 Studované aminokyseliny

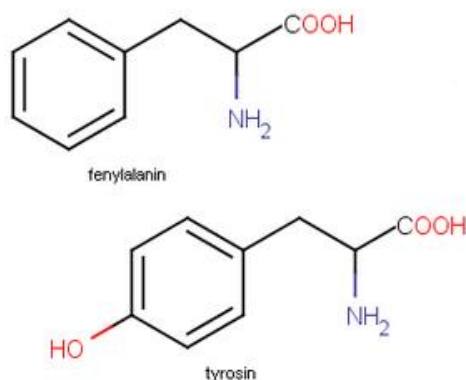
Existuje více jak 200 druhů aminokyselin, avšak pouze 25 z nich je součástí jednoduchých proteinů a také základem složitějších bílkovin. Mezi tyto aminokyseliny patří stanovované aminokyseliny tyrosin a fenylalanin (Obr. 1.5.1) ²⁵. Aminokyseliny se účastní mnoha katalyzujících procesů ve formě enzymů, také je z aminokyselin syntetizováno mnoho biologicky aktivních molekul neurotransmiterů ²⁶.

Tyrosin patří do skupiny aromatických aminokyselin a také do skupiny aminokyselin, které obsahují v postranním řetězci neionizovanou polárně působící skupinu. V případě tyrosinu jde o fenolickou skupinu, která projevuje slabě kyselé vlastnosti ²⁷ a má za následek i hodnotu izoelektrického bodu tyrosinu 5,7 ²⁵.

Tyrosin se vyskytuje v potravinách, jako jsou ořechy, kuřecí a krůtí maso, ryby, avokádo a další. Také lze doplnit tyrosin do těla umělými doplňky ve formě tablet ²⁸.

Fenylalanin je aminokyselina s aromatickým jádrem obsahující uhlovodíkový nepolární postranní řetězec. Hodnota izoelektrického bodu fenylalaninu je podobná hodnotě izoelektrického bodu tyrosinu, 5,5. Fenylalanin patří do skupiny esenciálních aminokyselin, což znamená, že si jej tělo nedokáže samo vyrobit a je nutné jej čerpat z potravy ²⁵. Ve stravě lze najít fenylalanin podobně jako tyrosin v potravinách bohatých na bílkoviny, tedy mléčných produktech, ořechách, hovězím masu, ale nevhodnější z hlediska jeho obsahu jsou například v kvasnici a tofu. Také je součástí umělého sladidla Aspartamu a lze jej pořídit jako potravinové doplňky v různých formách ²⁹.

Fenylalanin je úzce spjat s tyrosinem, který obsahuje navíc fenolickou skupinu, rozdíl ve struktuře je patrný na obrázku 1 ²⁷.



Obr. 1.5.1: Strukturní vzorce tyrosinu a fenylalaninu.

1.5.1 Způsoby stanovení tyrosinu a fenylalaninu

Obečně aminokyseliny jsou jedny z nejvíce stanovovaných biochemických analytů, přičemž jednou z častějších metod stanovení je HPLC převážně se spektrometrickou detekcí. Avšak většina aminokyselin absorbuje jen málo či vůbec v UV oblasti a z tohoto důvodu jsou nutné derivatizační reakce¹. Také detekce aminokyselin fluorescenční emisní spektrometrií je možná, bez derivatizace je ale možné stanovit pouze tyrosin, fenylalanin a tryptofan, jelikož obsahují přirozené fluorofory³⁰.

Aminokyseliny lze stanovit i elektrochemicky, většinou je však rovněž nutné zařazení derivatizační reakce, jelikož aminokyselin se strukturou, kterou lze přímo oxidovat, je jen malé množství, například jsou jimi tyrosin, tryptofan a jejich deriváty¹, v menší míře lze takto stanovit i methionin s cysteinem³¹. Konkrétně tyrosin je možné stanovit elektrochemicky oxidací fenolické skupiny připojené na aromatickém jádře¹. Tyto aromatické aminokyseliny lze také stanovit přímou detekcí v UV oblasti při 200 nm³².

Namísto předřazené derivatizační reakce lze také použít reakce komplexotvorné přímo na elektrodě, například s měďnatými ionty^{1, 33}, nebo lze použít měďnaté ionty při elektrokalatytické reakci s aminokyselinami, což je možné například v silném zásaditém prostředí. Podmínky byly vyzkoušeny v kombinaci s kapilární elektroforézou³⁴ anebo v průtoku metodou FIA³⁵. Těchto poznatků lze využít i při coulometrické detekci aminokyselin, za použití měděné elektrody v neutrálním či slabě alkalickém prostředí například ve fosfátovém nebo uhličitanovém pufru^{1, 9}.

Podobné vlastnosti jako má měď mají i další materiály, ovšem mají své nevýhody pro tvorbu elektrod či detektorů. Nikl s kobaltem mají složitější elektrodové reakce a rtuťové ionty jsou příliš velké a tak jsou rychle transportovány od elektrodového povrchu¹.

Příklady stanovení tyrosinu a fenylalaninu jsou uvedeny v tabulce 1.5.1. Jak již bylo zmíněno, spektrometrická detekce v UV oblasti a fluorescenční detekce je u těchto dvou aminokyselin možná díky jejich aromatickým jádrům. Elektrochemická detekce je možná u fenylalaninu jen s vybranými elektrodami.

Při použití HPLC s UV či fluorescenční detekcí je dosahováno LOD přibližně $1 - 10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což je srovnatelné i s detekcí s modifikovanou měděnou elektrodou. Použitím HPLC s tandemovou spektroskopií se mez detekce o polovinu sníží, což je srovnatelné se stanovením aminokyselin voltametrickými metodami s modifikovanými a o další 3 řády je LOD snížena pomocí derivatizace. Jako příklad derivatizace je uvedeno

stanovení aminokyselin HPLC s UV detekcí, přičemž derivatizace byla provedena reakcí aminokyselin se sulfonát naftochinonem.

Tab 1.5.1: Příklady stanovení vybraných aminokyselin.

(^a mikrocylindrická měděná elektroda; ^b chemická ionizace za atmosférického tlaku s tandemovou hmotnostní spektrometrií; ^c elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná heminem; ^d elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná butyrylcholinem; ^e uhlíková pastová elektroda modifikovaná uhlíkovými nanovláknami).

Metoda	Detekce	Stanovované aminokyseliny	LOD [$\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Zdroj
HPLC	UV (210 nm)	Tyr Phe	1,00 1,50	36
HPLC	Fluorescence (Excitace 210 nm, emise 302 nm)	Tyr Phe	0,31 0,30	37
HPLC	Fluorescence (Excitace 260 nm, emise 282 nm)	Tyr Phe	5,00 10,00	38
HPLC	Cu- μCD ^a	Phe Trp	6,70 0,12	5
HPLC	APCI-MS/MS ^b	Tyr Phe	0,50 0,50	39
DPV	Hemin/GCE ^c	Trp	0,03	40
DPV	Butyrylcholin-GCE ^d	Tyr Trp	0,40 0,60	41
CV	CNF-CPE ^e (uhlíková nanovláknina)	Trp Tyr Cys	0,10 0,10 0,10	42
HPLC	UV (305 nm) Derivatizace: sulfonátem naftochinonu	Tyr Phe Leu	$4\cdot 10^{-5}$ $6\cdot 10^{-5}$ $4\cdot 10^{-5}$	43

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Modelovou látkou, která byla využita při optimalizaci plnění elektrochemického detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku, byl hexakynoželeznan draselný (p.a., Lachema Brno, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Příprava zásobního roztoku modelové látky byla provedena odvážením přesného množství hexakynoželeznanu draselného a rozpuštěním v deionizované vodě (Millipore Q- plus systém, Millipore, USA) a poté doplněním po rysku na příslušný objem v odměrné baňce. Zásobní roztok byl uchováván v lednici při 10°C .

Zásobní roztoky tyrosinu (98 %, Alfa Aesar, UK) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a fenylalaninu (98 %, Alfa Aesar, UK) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny odvážením přesného množství látky a jeho rozpuštěním v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselině chlorovodíkové (p.a., Lach-Ner, ČR) a doplněním na příslušný objem odměrné baňky.

Ostatní roztoky obou aminokyselin o nižších koncentracích byly také rozpuštěny v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselině chlorovodíkové (p.a., Lach-Ner, ČR) a doplněny na příslušné objemy odměrných baněk na požadované koncentrace. Všechny roztoky aminokyselin byly uchovávány v lednici při teplotě 10°C .

Nosným roztokem při optimalizaci plnění elektrochemického detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček uhlíku byl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ síran sodný (p.a., Lachema Brno, ČR). Pro stanovení tyrosinu byl použit jako nosný roztok Britonův-Robinsonův pufr (B-R pufr) o $\text{pH} = 4,5$. Kyselá složka B-R pufru se skládala z kyseliny fosforečné (84 % – 87 %, Lach-Ner, ČR), octové kyseliny (99%, Lach-Ner, ČR) a kyseliny borité (99,5 %, Lachema Brno, ČR). Zásaditá složka B-R pufru byla připravena z hydroxidu sodného (98%, Lach-Ner, ČR). Pro stanovení fenylalaninu byl jako nosný roztok použit fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,8$, který se skládal z $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, ČR) a $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lach-Ner, ČR).

Coulometrický detektor byl plněn suspenzí, vyrobenou rozptýlením mikrokuliček skelného uhlíku o velikosti částic $10 - 20 \text{ } \mu\text{m}$ (Alfa Aesar, UK) v nitromethanu (Polskie odczynniki chemiczne, Gliwice, Polsko), respektive mikrokuliček mědi o velikosti částic

10 – 20 μm (Alfa Aesar, UK) ve zředěné kyselině dusičné (p.a., Lach-Ner, ČR). Suspenze byly vpraveny do detektoru pomocí methanolu (p.a., Merck, Německo).

2.2 Použité přístroje

Měření bylo prováděnou metodou FIA, jejíž systém se skládal z pumpy HPP 5001 (Laboratorní přístroje Praha, ČR) a detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Coulometrický detektor byl zapojen v tříelektrodovém uspořádání, které se skládalo z pomocné platinové a referenční argentochloridové eldy ($3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl, ECO Trend, ČR).

Detektory byly plněny náplní s mikrokuličkami pomocí pumpy HPP 4001 (Laboratorní přístroje Praha, ČR) s methanolem.

Rozšíření kapilár (flanging) bylo provedeno pomocí přístroje Cheminert flanging tool 220 Vac (VICI Valco instruments, USA).

Pro přípravu pufrů byl používán ke kontrole pH pH-metr 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou eldou.

Mikroskopická studie mikrokuliček mědi byla provedena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu JEOL 6380 LV (Jeol, Japonsko).

2.3 Vícerozměrná analýza

Pro naplánování experimentu byl vybrán model Face centered central design (FCCD) z důvodu počtu studovaných parametrů, pro které byly určeny intervaly a vybrány 3 hladiny (minimální, maximální a střední hodnota). Pomocí programu Minitab 16 byl vytvořen dle modelu FCCD plán experimentu. Výsledky byly statisticky zpracovány metodou ANOVA a dále vytvořeny Pareto grafy, které vymezují vlivy parametrů na odezvu; tyto vlivy byly stanoveny s 95% pravděpodobností.

2.4 Zpracování výsledků

Všechna měření byla prováděna třikrát. Výsledky byly pro další výpočty a statistická zpracování udávány jako mediány opakovaných měření.

Hodnoty z kalibračních závislostí byly upraveny metodou lineární regrese. Meze detekce a stanovitelnosti byly určeny jako trojnásobek, respektive desetinásobek směrodatné odchylky odezvy nejnížší změřitelné koncentrace přepočítané na koncentraci.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Detektor s náplní z mikrokuliček uhlíku

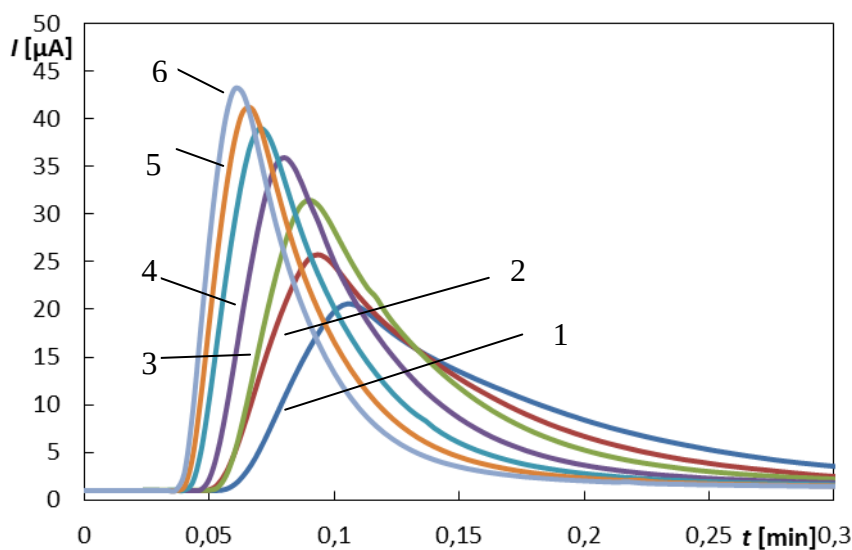
Konstrukce detektoru plněného mikrokuličkami skelného uhlíku byla převzata z práce ²⁰. Před dalším využitím byla opakována základní optimalizace parametrů detektoru a testována možnost zrychlit plnění detektoru pomocí vzduchových bublin. Po těchto úpravách byla na tomto detektoru vyvinuta metoda pro stanovení elektrochemicky oxidovatelné aminokyseliny, tyrosinu.

3.1.1 Ověření optimalizace podmínek stanovení hexakynoželeznatanu draselného

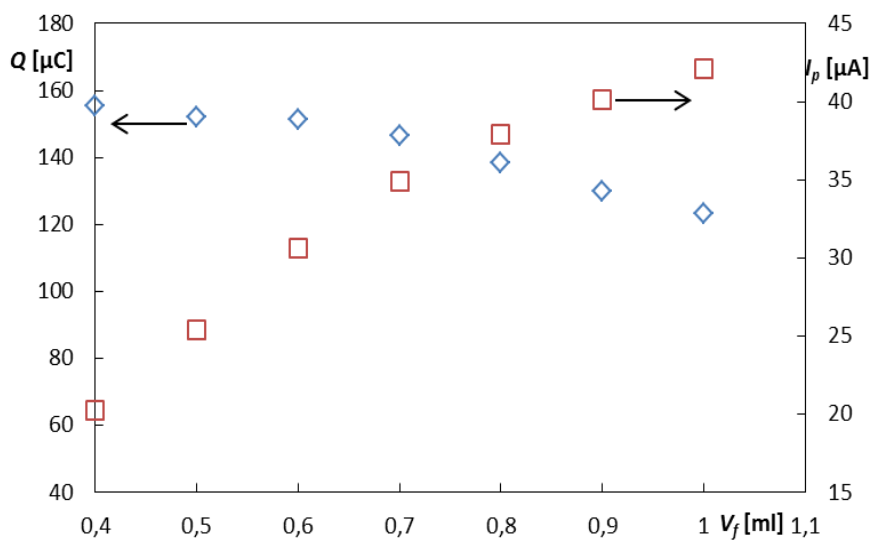
K základnímu testování podmínek použití detektoru byl použit hexakynoželeznatan draselný v nosném roztoku síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla sledována závislost jeho odezvy na průtoku, potenciálu a objemu dávkovací smyčky. Výsledné optimální hodnoty byly jednak porovnány s dříve prováděnými měřeními, jednak použity během optimalizace plnění detektoru.

3.1.1.1 Zjištění optimálního průtoku

Prvním krokem optimalizace bylo zjištění optimální průtokové rychlosti. Signál detektoru byl měřen v závislosti na průtokové rychlosti v rozmezí od $0,4$ do $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ za potenciálu $0,5 \text{ V}$ a při dávkování $20 \mu\text{l}$ hexakynoželeznatanu draselného o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vybrané křivky jsou zobrazeny na obr. 3.1.1 a výsledné hodnoty plochy a výšky píku na obr. 3.1.2. Se zvyšující se průtokovou rychlostí se zvyšuje výška píku, jak se pík méně rozmývá; plocha píku je se zvyšujícím se průtokem téměř konstantní do hodnoty $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a při vyšších průtocích se mírně snižuje, zřejmě v důsledku toho, že při vyšších průtokových rychlostech nemají železnaté ionty dostatek času na svou oxidaci. Optimální průtok byl vybrán z konstantního intervalu, ve kterém byla plocha píků nejvyšší, bez jeho krajních hodnot. Za optimální průtok byl tedy zvolen průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.1.1: Vybrané křivky hexakynoželeznatanu draselného ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) při průtokové rychlosti 0,4 (1), 0,5 (2), 0,6 (3), 0,7 (4), 0,8 (5), 0,9 (6) a 1,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (7). Měřeno při potenciálu 0,5 V, objemu dávkovací smyčky 20 μl , nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

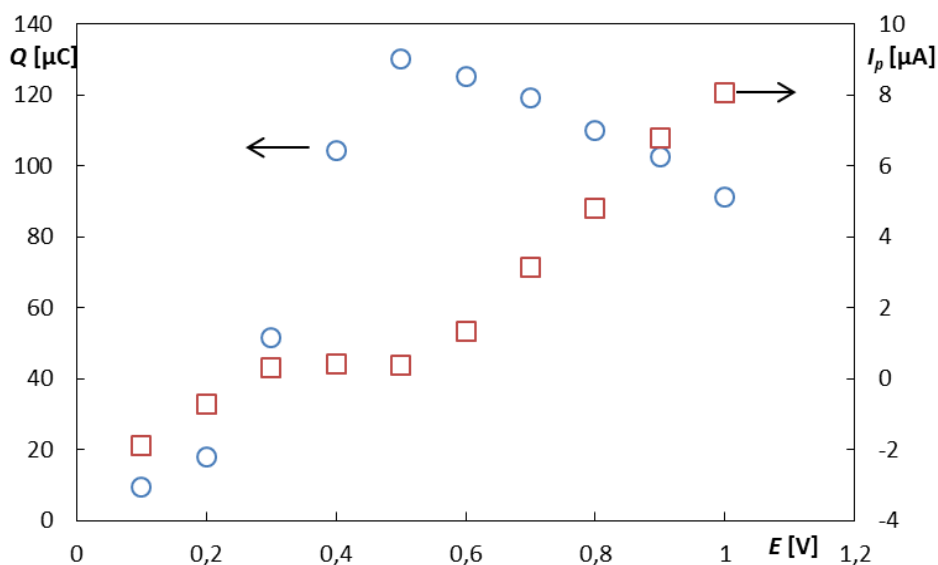


Obr. 3.1.2: Závislost výšky píku (čtverce) a plochy píku (kosočtverce) na průtokové rychlosti. Studovaná látka hexakynoželeznatan draselný ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), měřeno při potenciálu 0,5 V a objemu dávkovací smyčky 20 μl .

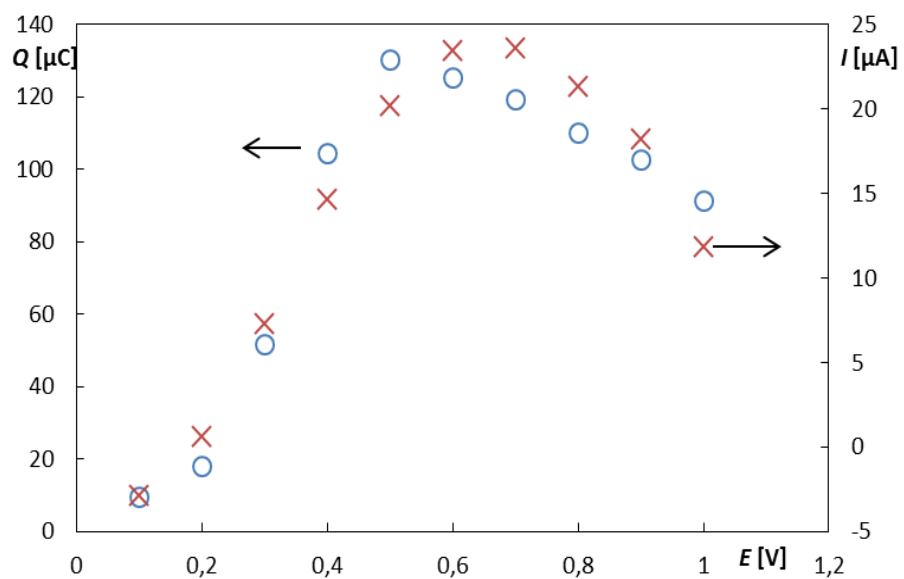
3.1.1.2 Hydrodynamický voltamogram

Dalším optimalizovaným parametrem byl vkládaný potenciál, pro určení jeho optimální hodnoty byl proměřen hydrodynamický voltamogram. Modelová látka hexakynoželeznatan draselný o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla dávkována $20 \mu\text{l}$ smyčkou a stanovena při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a při různých hodnotách potenciálu.

Na grafu (obr. 3.1.3) je zobrazen výsledný hydrodynamický voltamogram, kde je vidět zvýšení pozadí od potenciálu $0,6 \text{ V}$, zatímco plocha se od tohoto bodu snižuje. Na obrázku 3.1.4 je zobrazena závislost výšky a plochy píku na hodnotě vkládaného potenciálu, kde lze pozorovat postupné zvyšování výšky až do bodu $0,6 \text{ V}$ a nejvyšší hodnotu plochy při potenciálu $0,5 \text{ V}$. Tyto dva body lze brát za optimální a mezi nimi bylo rozhodování podle toho, kde je nejnižší pozadí. Jako hodnota optimálního potenciálu bylo proto
vybráno
 $0,5 \text{ V}$.



Obr. 3.1.3: Hydrodynamický voltamogram hexakynoželeznatanu draselného ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); (plochy píků – kolečka, proud pozadí – čtverce), měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ nosného roztoku síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a objemu dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.



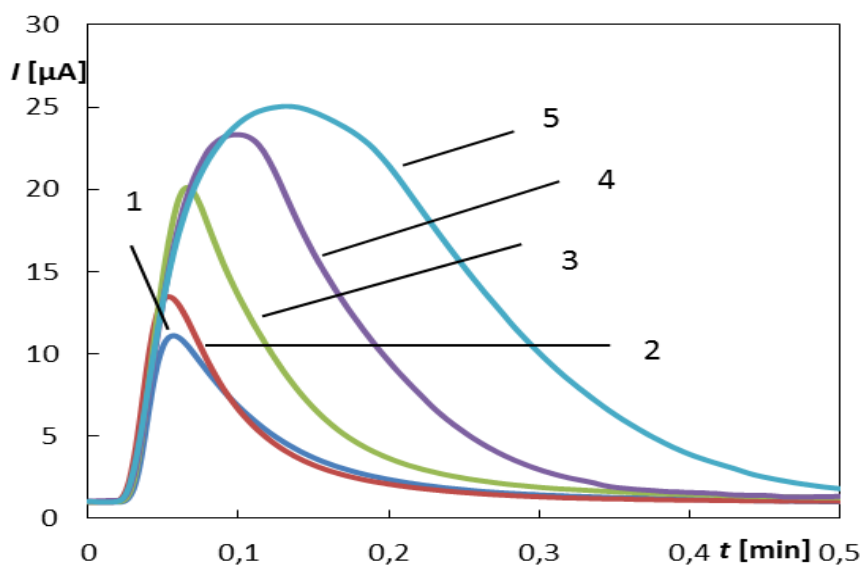
Obr. 3.1.4: Závislost výšky píku (křížky) a plochy píku (kolečka) na vkládaném potenciálu, měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovací smyčka hexakynoželeznatanu draselného ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) $20 \mu\text{l}$, nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

3.1.1.3 Objem dávkovací smyčky

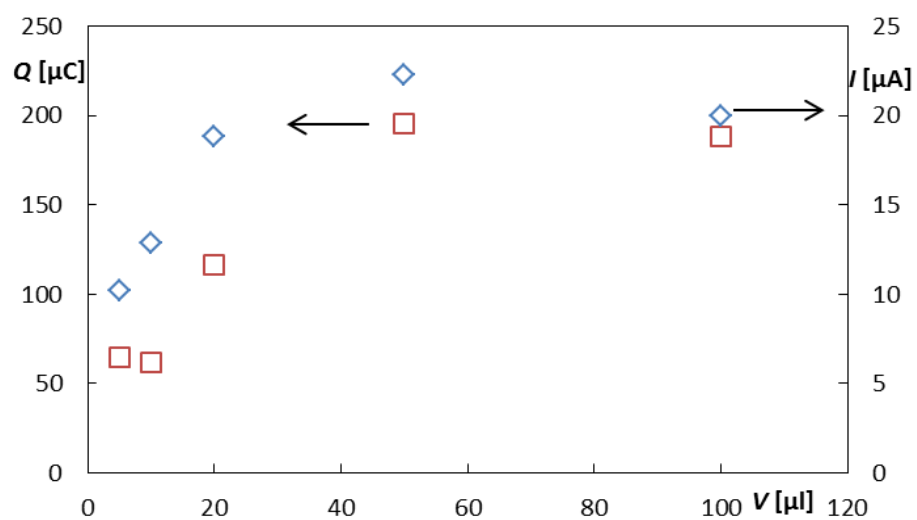
Posledním optimalizačním parametrem byl objem dávkovaného roztoku hexakynoželeznanu draselného. K testování byly zvolené objemy smyček 5, 10, 20, 50 a 100 μl . Vybrané křivky jsou uvedeny na obrázku 3.1.5 a srovnání výšek a ploch píků je uvedeno na obrázku 3.1.6.

Z grafů je patrné, že optimální objem je 20 μl , jelikož při vyšších objemech dávkovacích smyček se zvyšovala převážně plocha píku a výška píku se již nijak markantně nezvyšovala. Tento průběh se předpokládal, jelikož při velkém objemu vzorku se zóna rozmývá jen částečně a v jejím středu zůstává původní koncentrace.

Za optimální podmínky byly zvoleny tyto: průtok 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál +0,5 V a objem plnicí cívky 20 μl . Tyto podmínky byly použity pro optimalizaci plnění detektoru.



Obr. 3.1.5: Vybrané křivky hexakynoželeznanu draselného ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) při různých objemech plnicí smyčky 5 (1), 10 (2), 20 (3), 50 (4) a 100 μl (5). Měřeno při potenciálu 0,5 V a průtoku 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nosný roztok Na_2SO_4 (0,1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).



Obr. 3.1.6: Závislost výšky píku (kosočtverce) a plochy píku (čtverce) hexakynoželeznatanu draselného ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na objemu plnicí smyčky, měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a potenciálu $0,5 \text{ V}$, nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

3.1.1.4 Reprodukovatelnost měření

Výsledky optimalizace podmínek hexakynoželesnatanu draselného byly srovnány s původními výsledky, které vypracoval kolega Mika ¹⁶.

Optimální průtok byl zvolen $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, což je ve shodě s výsledkem kolegy. Při prozkoumání naměřených dat bylo zjištěno, že mnou získané křivky mají výšku i plochu dvojnásobnou než původní výsledky, ovšem byly naměřeny 20 μl smyčkou a původní křivky 10 μl smyčkou.

Vkládaný potenciál je také ve shodě, tedy 0,5 V, opět hodnoty výšek i ploch mají dvojnásobnou hodnotu než původní výsledky, což je opět způsobeno objemem dávkovací smyčky. Hydrodynamický voltamogram vyjádřený výškou píku a proudem pozadí má podobný průběh.

Posledním srovnávacím parametrem je objem dávkovací smyčky. Zde hodnoty hodnoty ploch i výšek souhlasí. V původní práci byly vybrány dva optimální objemy dávkovací smyčky 10 a 20 μl . V této práci byla vyhodnocena optimální 20 μl smyčka.

Tvar veškerých získaných píků je stejný jako u původní práce. Výsledky optimalizace stanovení hexakynoželesnatanu draselného se shodují s výsledky, které vypracoval kolega Mika ¹⁶. Detektor s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku má reprodukovatelné výsledky, jelikož byly ověřeny podmínky pro různé detektory dvěma osobami v dlouhé časové proluce.

3.1.2 Optimalizace postupu plnění detektoru

Modelovou látkou pro optimalizaci plnění byl hexakynoželeznan draselný o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, na kterém bylo provedeno prvotní měření optimálních podmínek. Optimálními podmínkami pro stanovení modelové látky jsou: průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovací smyčka $20 \mu\text{l}$ a potenciál $0,5 \text{ V}$.

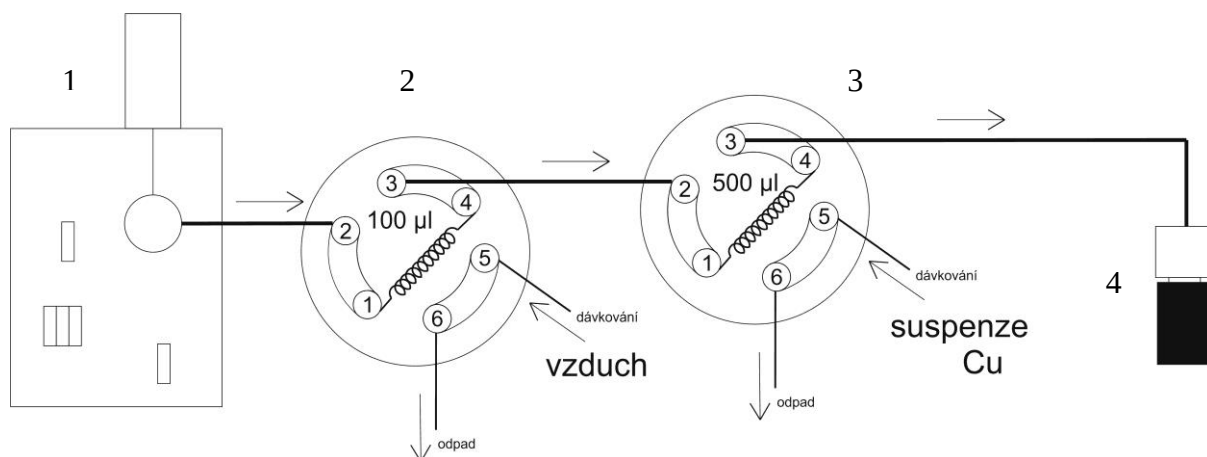
Původní plnění bylo prováděno nadávkováním $500 \mu\text{l}$ suspenze mikrokuliček skelného uhlíku v nitromethanu, přičemž zóna byla vnesená do detektoru tokem methanolu o průtoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Průtokovou rychlost nelze zvyšovat vzhledem k tlakovým omezením použité kapiláry, nicméně se nabízela otázka, jak by plnění ovlivnila jiná hustota suspenze. Proto byla vyzkoušena možnost plnění pětkrát hustší suspenzí a zároveň, pro zachování stejného množství uhlíku vpravovaného do detektoru, s dávkovací smyčkou o objemu $100 \mu\text{l}$. Kromě toho bylo v průběhu optimalizačních měření zjištěno, že při použití bublinky vzduchu se suspenze dostane do detektoru rychleji, z tohoto důvodu bylo dalším optimalizovaným parametrem množství nadávkování vzduchu; schéma pro plnění detektoru za pomoci vzduchu je zobrazeno na obrázku 3.1.7. Objem vzduchu byl testován při jednorázovém a dvojnásobném dávkování objemu 50 a $100 \mu\text{l}$.

Při různých způsobech plnění detektoru byla měřena výška sloupce uhlíkových mikrokuliček, ta se však u všech typů plnění shodovala v hodnotách okolo 4 mm .

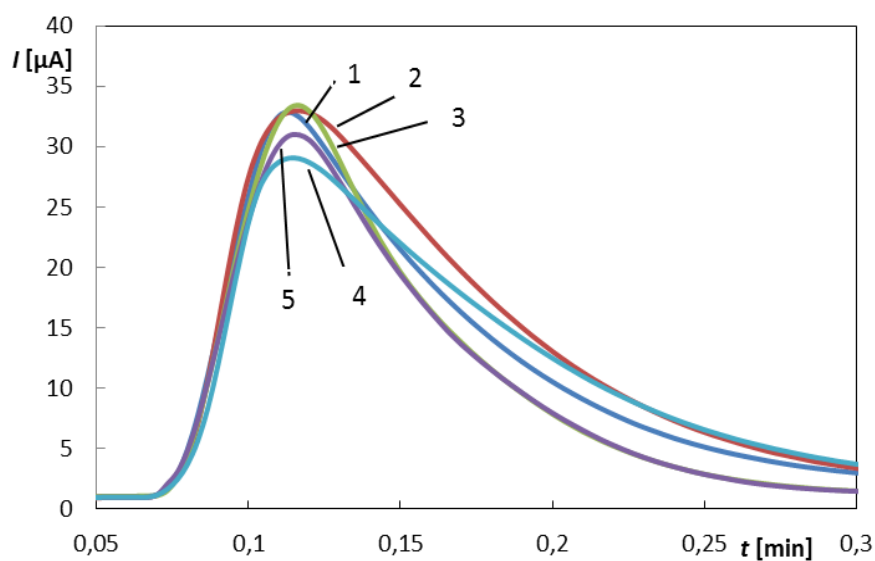
Po každém naplnění bylo prováděno měření s hexakynoželeznanem draselným o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, za optimálních podmínek. Nástrik modelové látky byl prováděn třikrát po každém naplnění, které bylo také prováděno třikrát. Na obrázku č. 3.1.8 jsou vyobrazeny vybrané křivky naměřené při různém způsobu plnění se smyčkou o objemu $100 \mu\text{l}$ a na obrázku číslo 3.1.9 jsou vybrané křivky při plnění $500 \mu\text{l}$ smyčkou se suspenzí. Z těchto grafů a následné tabulky (tab. 3.1.1) lze pozorovat po naplnění $100 \mu\text{l}$ smyčkou vyšší směrodatné odchylky pro plochy i výšky píků než při použití $500 \mu\text{l}$ smyčky. Kromě toho je s větší smyčkou a tedy méně hustou suspenzí jednodušší manipulace.

Z opakovatelnosti výsledků v tabulce 3.1.1 vyplývá, že z hlediska velikosti vzduchové bubliny je nejvhodnější použití jedné nebo dvou $100 \mu\text{l}$ bublin. Čím větší je použitá smyčka se vzduchem, tím je vzduchová bublina delší a tím pádem i robustnější. Díky této vlastnosti dokáže bublina vzduchu posunout velké množství suspenze až do detektoru. Z tohoto důvodu vychází jako optimální použití $100 \mu\text{l}$ smyčky při dvojitým nadávkování.

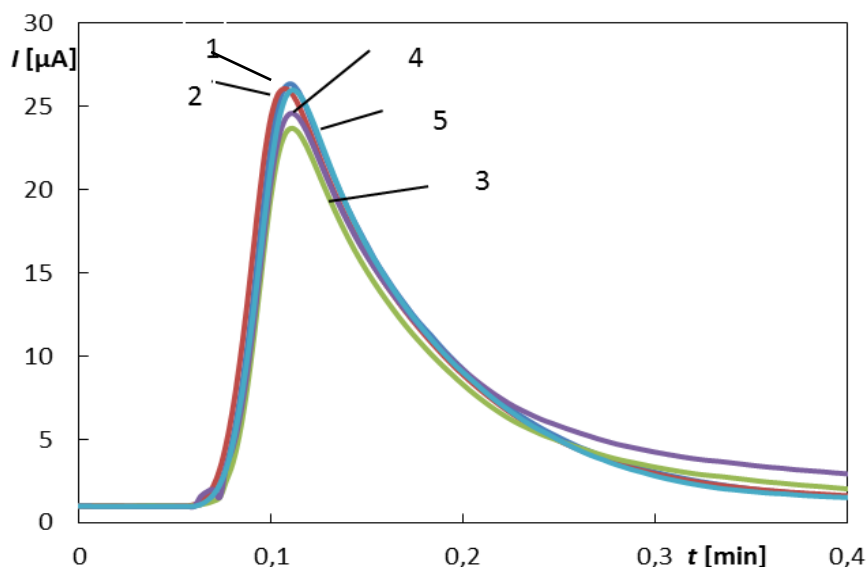
Tímto způsobem lze během průchodu vzduchových bublin nadávkovat celou zónu suspenze do detektoru a tedy zkrátit čas nutný k plnění detektoru na minimum.



Obr. 3.1.7: Schéma zařízení pro plnění detektoru: Pumpa se zásobníkem mobilní fáze methanolu (1), šesticečný ventil pro injektování vzduchu (2), šesticečný ventil pro dávkování suspenze (3), detektor (4).



Obr. 3.1.8: Vybrané křivky při plnění detektoru 100 µl suspenze uhlíku v nitromethanu při dávkování vzduchu 0 (1), 50 (2), dvakrát 50 (3), 100 (4) a dvakrát 100 µl (5). Měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,5 V, dávkovaný objem hexakynoželeznatanu draselného ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 20 µl, nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).



Obr. 3.1.9: Vybrané křivky při plnění detektoru 500μl suspenze v nitromethanu při dávkování vzduchu 0 (1), 50 (2), dvakrát 50 (3), 100 (4) a dvakrát 100 μl (5). Měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,5 V, dávkovaný objem hexakynoželeznatanu draselného ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 20 μl, nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Tab. 3.1.1: Shrnutí parametrů naměřených křivek při různém objemu dávkované suspenze uhlíkových mikrokuliček v nitromethanu.

Objem dávkované suspenze [μl]	Objem dávkovaného vzduchu [μl]	Průměrná plocha [μC]	Relativní směrodatná odchylka plochy [%]	Průměrná výška [μA]	Relativní směrodatná odchylka výšky [%]
100	0	1657	0,37	305	0,80
	50	1105	0,50	172	0,84
	2x50	1622	0,19	312	0,25
	100	1282	0,54	242	0,55
	2x100	1443	0,62	309	0,69
500	0	1363	0,39	201	0,12
	50	1395	0,19	248	0,15
	2x50	1380	0,24	230	0,40
	100	1552	0,15	314	0,10
	2x100	1430	0,15	256	0,17

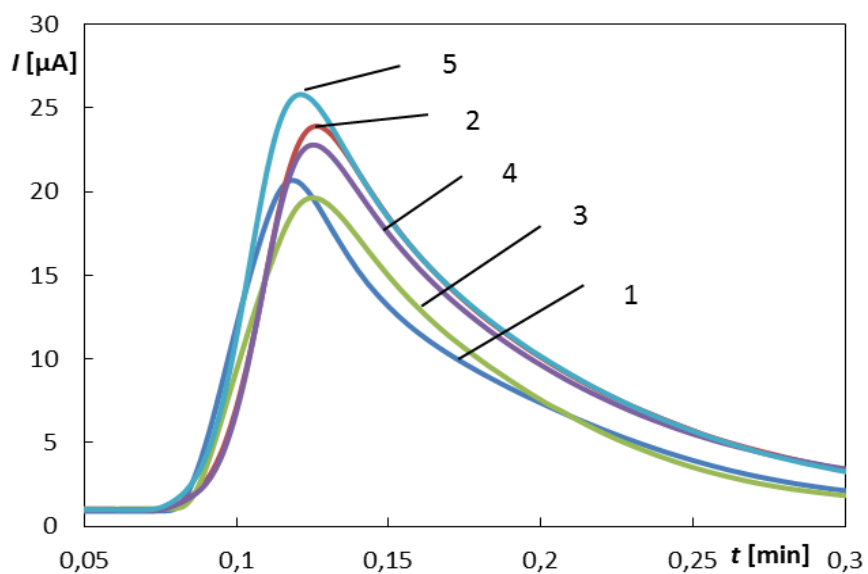
Při původní přípravě suspenze jako kapalná složka byl použit nitromethan, protože jeho hustota se blíží hustotě mikrokuliček uhlíku a suspenze je tak stabilnější. Jako alternativa byla vyzkoušena i suspenze v methanolu; vzhledem k rozdílu hustot je méně stabilní, což ji činí příhodným modelem pro plánovanou práci s detektorem plněným mikrokuličkami mědi. Změna složení suspenze byla otestována pouze na plnící smyčce o objemu 500 μ l, poněvadž tato smyčka měla dobré výsledky s nitromethanovou suspenzí.

Obdobně jako v předchozím měření byl jednorázově a dvojnásobně dávkován objem vzduchu 50 a 100 μ l, výška uhlíkového sloupce byla okolo 4 mm a odezva detektoru byla testována pomocí hexakyanoželeznatnanu draselného v nosném roztoku síranu draselného. Doba plnění detektoru se zkracovala s větším objemem vzduchu, jako tomu bylo i u první suspenze. Každé plnění bylo opakováno třikrát a při všech naplněních byly pořízeny tři záznamy nadávkování modelové látky.

Vybrané křivky jsou uvedeny na obrázku 3.1.10 a shrnutí výsledků v tabulce 3.1.2, přičemž výsledky měření jsou podobné výsledkům měření po naplnění pomocí nitromethanové suspenze.

Práce při plnění detektoru pomocí suspenze s nitromethanem byla rychlejší než při práci se suspenzí s methanolem, ovšem pouze v řádu sekund. Na obrázku 3.1.11 je znázorněné srovnání časů plnění pro suspenze v nitromethanu i methanolu pro všechny objemy vzduchu. Při použití 500 μ l smyčky se suspenzí s methanolem se s větším objemem vzduchu čas zkracoval, ovšem na rozdíl od 500 μ l smyčky se suspenzí s nitromethanem byl velký rozptyl jednotlivých časů. Manipulace se suspenzí s methanolem byla obtížnější než s nitromethanovou suspenzí. U 100 μ l smyčky s nitromethanovou suspenzí byly rovněž naměřeny velké rozdíly mezi časy. U 500 μ l smyčky s nitromethanem byly časy nejkratší bez velkých vzájemných rozdílů.

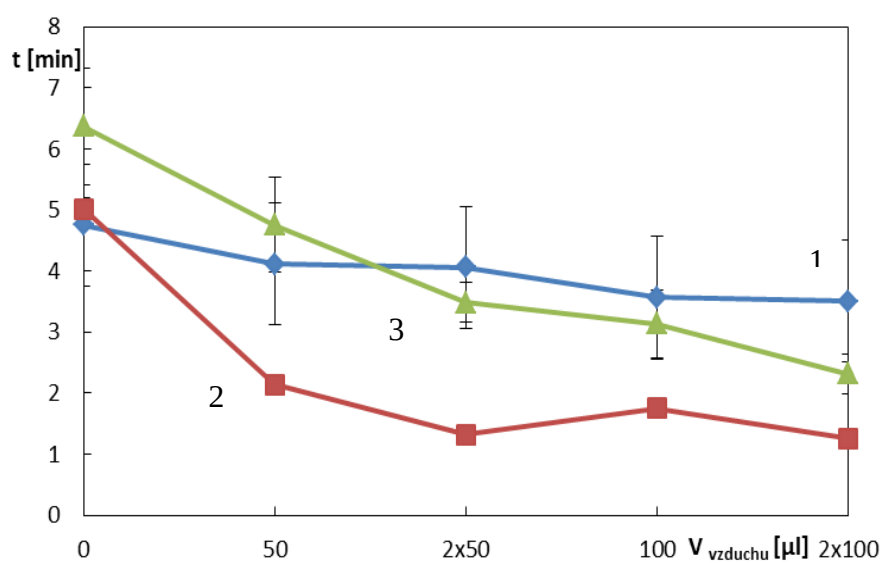
Z naměřených výsledků vyplývá, že při použití dávkovací smyčky o objemu 500 μ l a tedy řidší suspenze s nitromethanem lze rychleji dopravit uhlíkové kuličky do detektoru pomocí dvojího injektování vzduchu o objemu 100 μ l. Tyto podmínky pro plnění detektoru byly dále použity pro všechna plnění detektoru.



Obr. 3.1.10: Vybrané křivky při plnění detektoru 500 μl suspenze v methanolu při dávkování vzduchu 0 (1), 50 (2), dvakrát 50 (3), 100 (4) a dvakrát 100 μl (5). Měřeno při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,5 V, dávkovaný objem hexakynoželeznatanu draselného ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 20 μl , nosný roztok Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Tab. 3.1.2: Shrnutí výsledků naměřených křivek a statistické zpracování při objemu methanolové suspenze 500 μl .

Objem dávkovaného vzduchu [μl]	Průměrná plocha [μC]	Relativní směrodatná odchylka plochy [%]	Průměrná výška [μA]	Relativní směrodatná odchylka výšky [%]
0	1181	0,62	180	0,59
50	1324	0,34	223	0,21
2x50	1506	0,24	312	0,18
100	1289	0,19	224	0,25
2x100	1399	0,28	249	0,27



Obr. 3.1.11: Srovnání doby plnění při použití 100 μl (1) a 500 μl (2) suspenze v nitromethanu a v 500 μl suspenze methanolu (3) při dávkování vzduchu 0, 50, dvakrát 50, 100 a dvakrát 100 μl . Plněno při průtokové rychlosti nosného roztoku methanolu 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.1.3 Optimalizace stanovení tyrosinu

3.1.3.1 Vícerozměrná analýza

Tyrosin je elektrochemicky aktivní aminokyselina a lze ji stanovit přímou elektrochemickou oxidací pomocí detektoru s uhlíkovými mikrokuličkami, na rozdíl od většiny ostatních aminokyselin, pro jejichž stanovení je třeba používat jiné elektrodové materiály.

Pro nalezení optimálních podmínek stanovení tyrosinu na uhlíkovém detektoru byla použita vícerozměrná statistická metoda - frakční faktorový design. Optimalizační parametry byly vybrány tyto: průtoková rychlost, pH, objem dávkovací smyčky a vkládaný potenciál. Intervaly parametrů byly vybrány na základě předešlých měření.

Vzhledem k počtu parametrů byl pro naplánování experimentu vybrán model Face centered central design (FCCD). Pro určené parametry a jejich intervaly byly vybrány 3 hladiny - minimální hodnota, maximální a střední hodnota (tab. 3.1.3). Střední hodnota odpovídá centrálnímu bodu kvadratického modelu. Pomocí programu Minitab 16 byl vytvořen dle modelu FCCD plán experimentu (Tab. 3.1.4). Na obrázku 3.1.12 jsou uvedeny vybrané křivky, naměřené dle experimentálního plánu.

Za sledované odpovědi byly zvoleny plocha píků a jejich výška. Výsledky byly statisticky zpracovány metodou ANOVA a pro přehlednost byly vytvořeny Pareto grafy (Obr. 3.1.13 a 3.1.14) ukazující, který z parametrů má největší vliv na odpověď. Všechny parametry, včetně jejich vzájemných interakcí, jsou vyneseny na ose Y, na ose X jsou zobrazeny standardizované efekty. Parametry, které mají hlavní efekt, byly stanoveny s 95 % pravděpodobností.

První Pareto graf (Obr. 3.1.13) je pro odpověď plochy píku, lze na něm pozorovat vlivy významné, pohybující se za referenční linií, jejíž hodnota činí 4,30. Na plochu píku má tedy největší vliv objem dávkovací smyčky a dále pak vkládaný potenciál a jejich vzájemná interakce. Ostatní parametry, pH a interakce potenciálu s pH, ovlivňují odpověď nevýznamně. Průtoková rychlost nemá žádný vliv na plochu píku.

Druhá odpověď, výška píku, je sledována na druhém Pareto grafu (Obr. 3.1.14), kde hodnotou referenční linie je 12,7. Pro tuto odpověď je více statisticky významných vlivů, výjimku tvoří parametr pH, který nemá významný vliv. Nejvýznamněji ovlivňuje výšku

píku potenciál. Mezi další významné parametry patří průtok a jeho interakce s potenciálem a dále objem dávkovací smyčky a interakce průtoku s pH.

Při pohledu na obrázek 3.1.12 s vybranými křivkami lze vidět závislost všech parametrů na určené odezvy detektoru. I z pohledu na tyto křivky lze vysledovat některé vlivy, které zachytila multifaktorová analýza.

Nejvýraznější změna je mezi křivkami 15 a 16, kde se za jinak stejných podmínek zvyšuje vkládaný potenciál a tím se zvyšuje plocha i výška píku. Tento jev lze pozorovat na všech křivkách, kde byl vložen vysoký potenciál, kromě křivky 4, kde je velikost píku omezena v důsledku souběhu malé dávkovací smyčky a malé průtokové rychlosti.

Při použití většího objemu vzorku se zvyšuje plocha píku (křivky 13 a 14), ovšem zejména v důsledku jeho rozšíření, což způsobuje deformaci píku, jako je tomu u křivky 14; tento jev je obdobný trendu popisovanému v kap. 3.1.1.3.

Zvýšením průtoku je možno zvýšit výšku píku, což je způsobeno rychlým transportem vzorku tyrosinu k mikrokuličkám uhlíku, viz křivky 9 a 10.

Vzájemné působení zvyšování potenciálu i průtoku je zobrazeno na křivkách 10 a 16, kde se zvýšila výška píku. Jak již bylo zmíněno, příčinou těchto změn je větší reaktivita a také transport.

Posledním významným vlivem je interakce průtoku a pH, která způsobuje malé zvýšení výšky píku (křivky 11 a 10). Tyto dva parametry spolu souvisí, jelikož samotné pH nezpůsobí dostatečnou změnu, ale v souvislosti s průtokem je již změna patrná.

Na plošném grafu (Obr. 3.1.15), který byl vytvořen programem Minitab 16 je vyjádřena závislost plochy píku na pH a objemu dávkovací smyčky, přičemž ostatní parametry jsou konstantní na optimálních hodnotách. Vrchol plošného grafu vyjadřuje optimum.

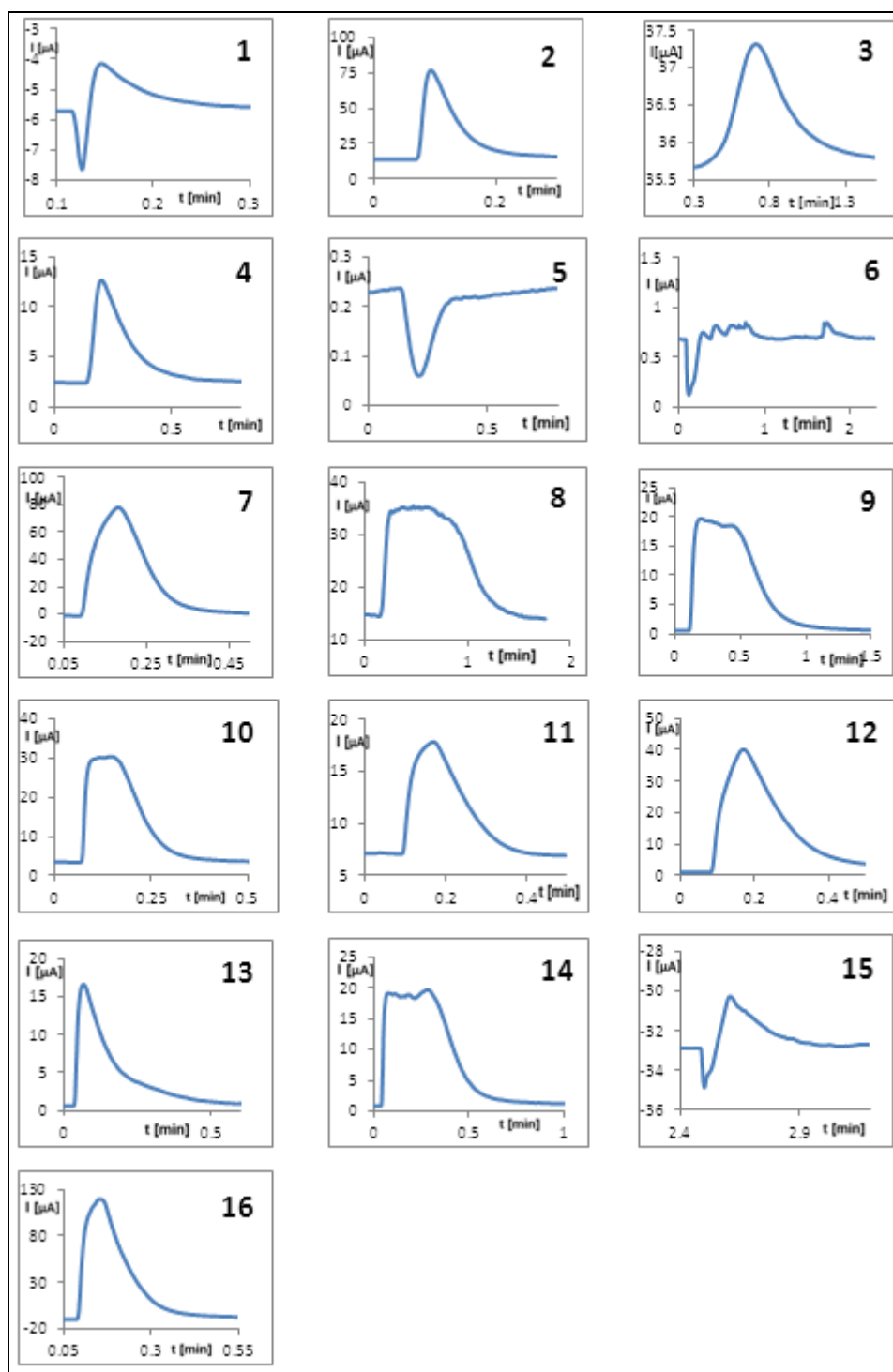
Výslednými optimálními podmínkami jsou průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky $50 \mu\text{l}$, potenciál $1,5 \text{ V}$ a pH $4,5$.

Tab. 3.1.3: Testované hodnoty vybrané dle FCCD

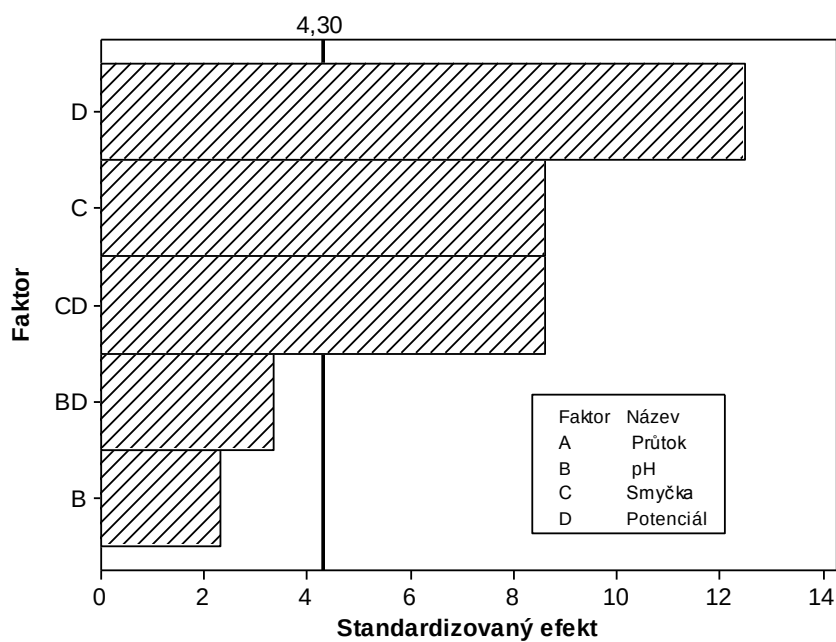
Parametr	Min	Střed	Max
Průtoková rychlost [ml·min ⁻¹]	0,2	0,6	1,0
pH	2,5	4,5	6,5
Objem dávkovací smyčky [μl]	5	50	100
Potenciál [V]	0,5	1	1,5

Tab. 3.1.4: Plán experimentu.

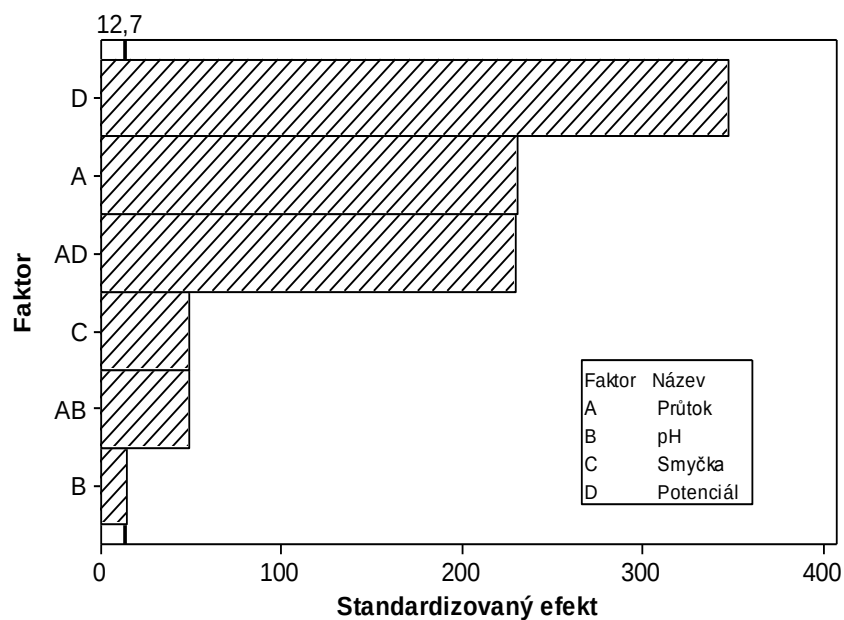
Měření číslo	Průtok [ml·min ⁻¹]	pH	Objem smyčky [μl]	Potenciál [V]
1	1	6,5	5	0,5
2	1	2,5	5	1,5
3	0,2	6,5	100	0,5
4	0,2	6,5	5	1,5
5	0,2	2,5	5	0,5
6	1	2,5	100	0,5
7	1	6,5	100	1,5
8	0,2	2,5	100	1,5
9	0,2	4,5	52,5	1
10	1	4,5	52,5	1
11	0,6	2,5	52,5	1
12	0,6	6,5	52,5	1
13	0,6	4,5	5	1
14	0,6	4,5	100	1
15	0,6	4,5	52,5	0,5
16	0,6	4,5	52,5	1,5



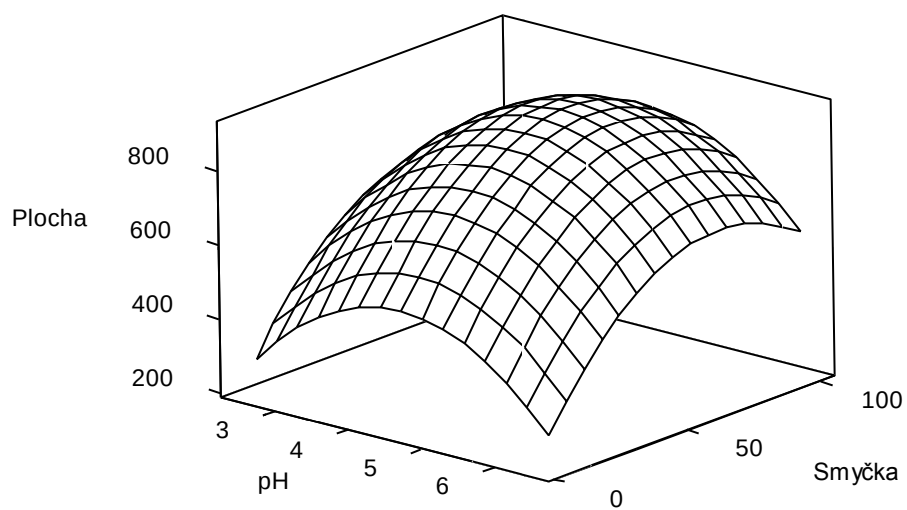
Obr. 3.1.12: Křivky měřené dle experimentálního plánu podle podmínek uvedených v tabulce 3.1.4.



Obr. 3.1.13: Pareto graf: vliv odpovědi plochy píku pro jednotlivé parametry a jejich interakce. (A- průtok, B- pH, C- objem dávkovací smyčky, D- potenciál).



Obr. 3.1.14: Pareto graf: vliv odpovědi výšky píku pro jednotlivé parametry a jejich interakce. (A- průtok, B- pH, C- objem dávkovací smyčky, D- potenciál).



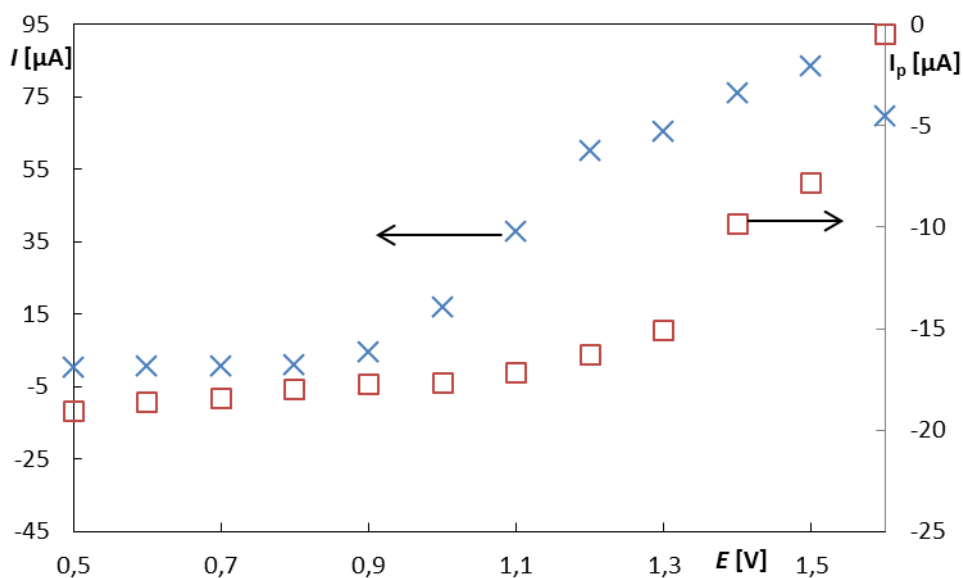
Obr. 3.1.15: 3D- graf závislosti plochy píku na pH a objemu dávkovací smyčky za konstantního průtoku 0,6 ml/min a potenciálu 1,5 V.

3.1.3.2 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu

Při práci s elektrochemickými detektory je důležitá závislost na potenciálu, jak bylo ověřeno i při vícerozměrné analýze optimálních podmínek, ale současně typický tvar této závislosti může být pomocí vícerozměrné analýzy těžko modelovatelný. Z tohoto důvodu byl ještě i po provedené optimalizaci proměřen hydrodynamický voltamogram pro tyrosin při zachování ostatních optimálních podmínek.

Hydrodynamický voltamogram byl měřen při koncentraci tyrosinu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v intervalu potenciálů od 0,5 V do 1,6 V. Výsledná křivka, ukazující výšky píku a proudové pozadí, je uvedena na obrázku 3.1.16. Je možno pozorovat, že od hodnoty potenciálu 1,3 V výrazně stoupá proud pozadí, zatímco výška píku se již mění pouze nevýrazně. Pro tyto důvody byla za optimální detekční potenciál vybrána hodnota 1,3 V.

Za optimální podmínky byly tedy zvoleny výsledky z vícerozměrné analýzy, přičemž potenciál byl změněn dle výsledku hydrodynamického voltamogramu tyrosinu. Optimálními detekčními podmínkami tyrosinu tedy jsou: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$, pH 4,5 a potenciál 1,5 V.



Obr. 3.1.16: Hydrodynamický voltamogram tyrosinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); (výšky píků – křížky, proud pozadí – čtverce), měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ B-R pufru o pH 4,5 a objemu dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$.

3.1.4 Stabilita odezvy tyrosinu

3.1.4.1 Opakovatelnost plnění detektoru

Stálost signálu při opakovaném plnění detektoru byla ověřena i pro stanovení tyrosinu. Po opakovaném naplnění detektoru byly pro tyrosin o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vždy naměřeny tři záznamy při optimálních podmínkách, tedy průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ B-R pufru o pH 4,5, potenciál +1,3 V a objemu plnicí cívky 50 μl . Bylo provedeno pět naplnění detektoru, stálost signálu vyjádřená plochou a výškou píku je uvedena a statisticky vyhodnocena v tabulce 3.1.5. Pro každé naplnění je v tab. 3.1.5 uvedena hodnota mediánu i relativní směrodatná odchylka, jejíž hodnota je pro plochu i výšku do 5 %. Při srovnání pěti různých plnění je opět relativní směrodatná odchylka 5 % pro plochy píků a pro výšku 5,9 %.

Z výsledků lze usoudit, že při opakovaném přeplňování detektoru je variabilita odezvy detektoru ovlivněna plněním jen minimálně. Tyto výsledky jsou přiměřené pro použitelnost uhlíkového detektoru.

Tab. 3.1.5: Statistické vyhodnocení opakovaného plnění uhlíkového detektoru vyjádřené plochou a výškou píků.

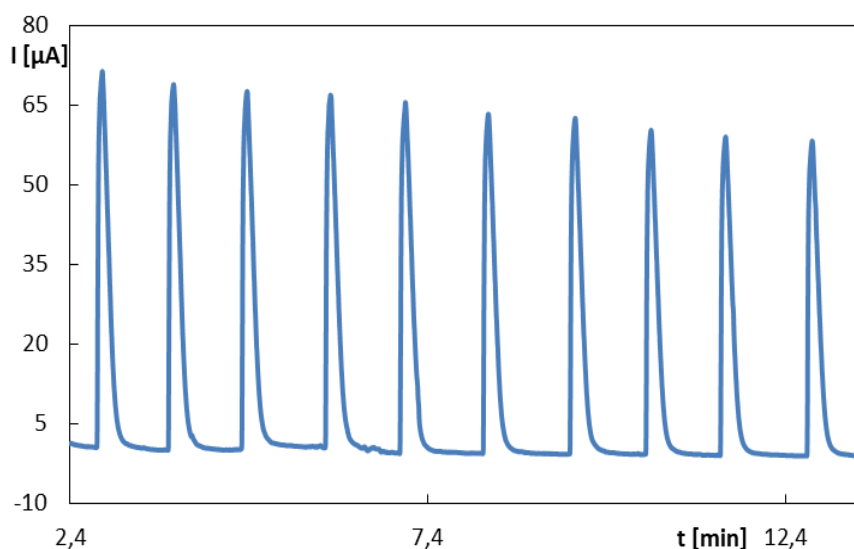
Plnění číslo	plocha		výška	
	Medián [μC]	RSD [%]	Medián [μA]	RSD [%]
1	681,1	3,4	71,7	5,0
2	700,2	2,0	73,6	2,7
3	662,3	2,2	70,8	3,8
4	740,4	4,8	80,3	3,5
5	742,4	3,8	80,7	3,8
Celkové srovnání	700,2	5,0	75,8	5,9

3.1.4.2 Pasivace tyrosinu

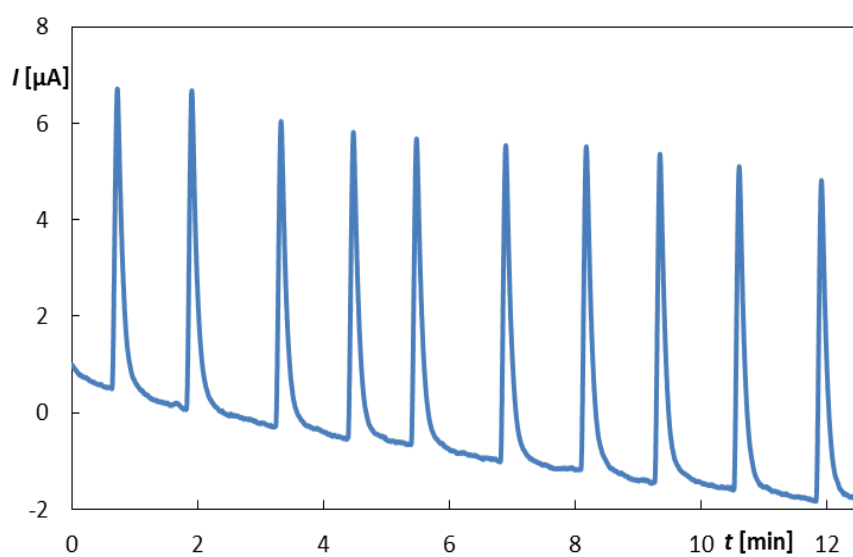
V případě elektrochemického stanovení fenolických látek dochází často k pasivaci elektrod v důsledku ukládání produktů elektrochemické reakce na jejich povrch. Byla proto provedena opakovaná stanovení tyrosinu za optimálních podmínek bez výměny elektrodového materiálu. Pro stanovení byly zvoleny dvě koncentrační hladiny, $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Záznam ukazující postupující pasivaci je znázorněn na obr. 3.1.17 pro vyšší a na obr. 3.1.18 pro nižší koncentrační hladinu. Zatímco při vyšší koncentraci bylo pozorovatelné snížení plochy píku po desátém nástřiku o 23,3% a výšky píku o 19,3% a po třetím nástřiku snížení plochy o 4,2 % a výšky o 5,1 %, při nižší koncentraci pasivace pozorována nebyla, nesnižovala se ani plocha píků a ani výška píků. Opakovatelnost pro tuto koncentrační hladinu byla tedy hodnocena dle relativní směrodatné odchylky (RSD); RSD pro deset nástřiků pro plochy píků měla hodnotu 4,3 % a pro výšky píků 3,3 %.

Z výsledků bylo rozhodnuto, že lze po naplnění naměřit 3 křivky, aby opakovatelnost nebyla významně ovlivněna, tato podmínka byla splněna pro všechna následující měření. Při nízkých koncentracích tyrosinu lze měřit neomezeně bez obav z pasivace.



Obr. 3.1.17: Záznam deseti opakovaných nástřiků tyrosinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po jednom naplnění detektoru s náplní z mikrokuliček skelného uhlíku. Při optimálních podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$, potenciál $1,3 \text{ V}$ a $\text{pH } 4,5$.



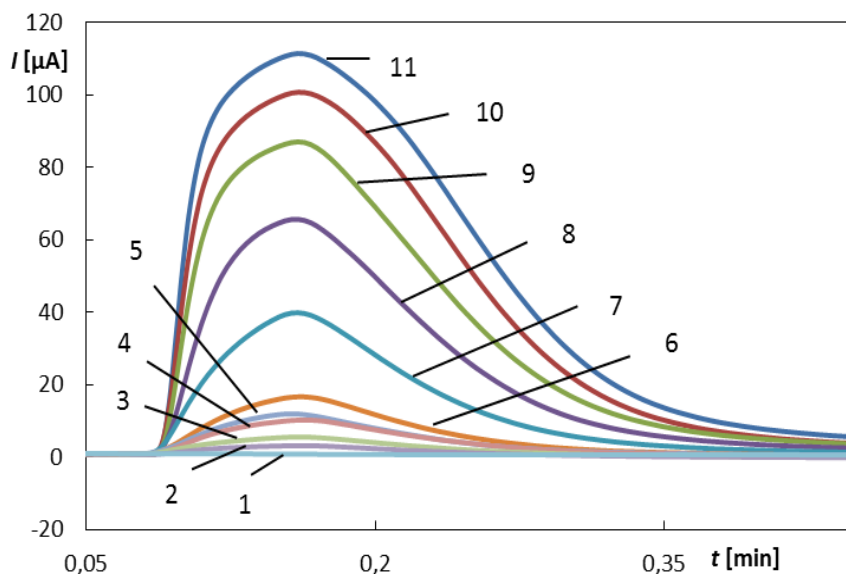
Obr. 3.1.18: Záznam deseti opakovaných nástřiků tyrosinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po jednom naplnění detektoru s náplní z mikrokuliček skelného uhlíku. Při optimálních podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$, potenciál $1,3 \text{ V}$ a pH $4,5$.

3.1.5 Kalibrační závislosti tyrosinu

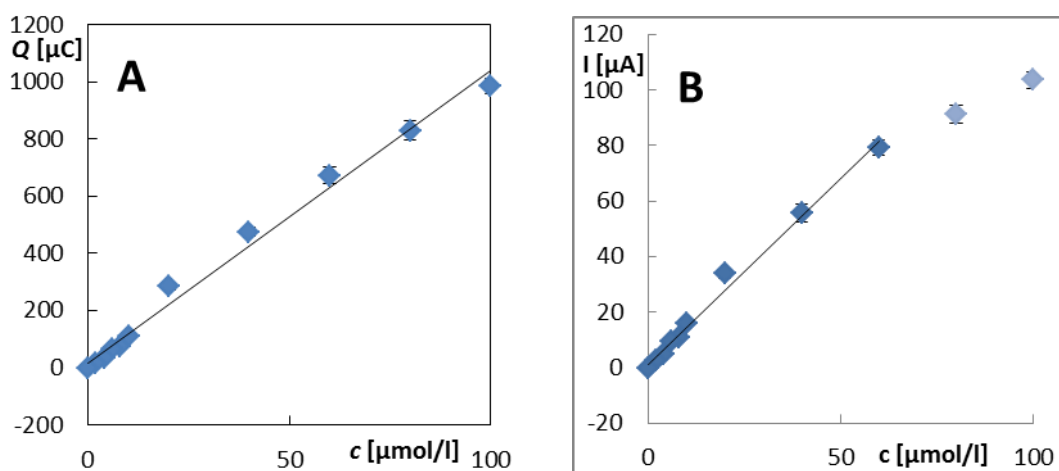
Kalibrační křivky byly naměřeny pro ověření linearitu závislosti odezvy detektoru na koncentraci tyrosinu a pro zjištění meze detekce a stanovitelnosti. Měřeno bylo za optimálních pracovních podmínek v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ tyrosinu; vybrané křivky jsou uvedeny na obrázku 3.1.19. Výsledná kalibrační závislost v celém rozsahu proměřených koncentrací je uvedena na obrázku 3.1.20. Na obrázku 3.1.21 je vybrána část kalibrační křivky o rozsahu koncentrací od $5 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³.

Zatímco kalibrační křivka vyjádřená plochou píku je v celém rozsahu lineární, kalibrační křivky vyjádřené výškami je u vyšších koncentrací zjevně zakřivená a její linearita je omezena pouze na koncentrační rozsah od $6 \cdot 10^{-5}$ do $2 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Tento jev byl pozorován již v předchozích pracích s tímto detektorem a mohl by souviset deformací píku způsobenou nerovnoměrným průběhem elektrodové reakce při vyšších koncentracích, zatímco celkový stupeň konverze a tím i plocha píku zůstává neovlivněna.

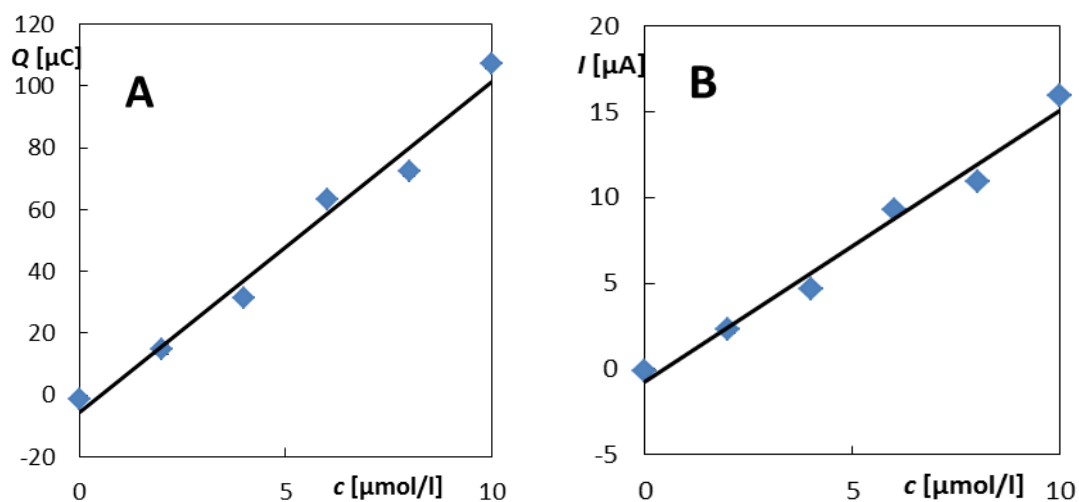
Kalibrační závislosti v celém rozsahu byly statisticky vyhodnoceny a získané parametry jsou uvedeny v tabulce 3.1.6 včetně meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Vyvinutá metoda poskytuje řádově shodné meze detekce tyrosinu jako meze detekce při stanovení tyrosinu HPLC s UV či fluorescenční detekcí získaná z literatury^{41–43} a metodou FIA s detekcí coulometrickým detektorem s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku tedy lze stanovit tyrosin při dostatečně nízkých koncentracích.



Obr. 3.1.19: Vybrané FIA křivky koncentrační závislosti tyrosinu. Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $1,3 \text{ V}$, objemu dávkovací smyčky $50 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí B-R pufru o pH 4,5. Koncentrace tyrosinu $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6), 20 (7), 40 (8), 60 (9), 80 (10) a $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, základní elektrolyt (1).



Obr. 3.1.20: Kalibrační závislost tyrosinu vyjádřená plochou (A) a výškou (B). Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $1,3 \text{ V}$, dávkovací smyčka $50 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí B-R pufru o pH 4,5.



Obr. 3.1.21: Úsek kalibrační závislosti tyrosinu v rozsahu koncentrací od $5 \cdot 10^{-4}$ po $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vyjádřená plochou (A) a výškou (B). Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 1,3 V, dávkovací smyčka 50 μl , v prostředí B-R pufru o pH 4,5.

Tab. 3.1.6: Přehled parametrů kalibrační závislosti tyrosinu v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ po $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 1,3 V, dávkovací smyčka 50 μl , v prostředí B-R pufru o pH 4,5.

[^a jednotky směrnice vyjádřené plochou $\mu\text{C} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ a vyjádřené výškou $\mu\text{A} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$,
^b jednotky úseku vyjádřené plochou μC a vyjádřené výškou μA].

	Lineární dynamický rozsah [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice ^a	Úsek ^b	R	LOD [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	LOQ [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
plocha	100 – 0	10,662	5,372	0,995	0,5	1,6
výška	60 – 0	1,339	1,163	0,992	0,5	1,7

3.2 Detektor s náplní z mikrokuliček mědi

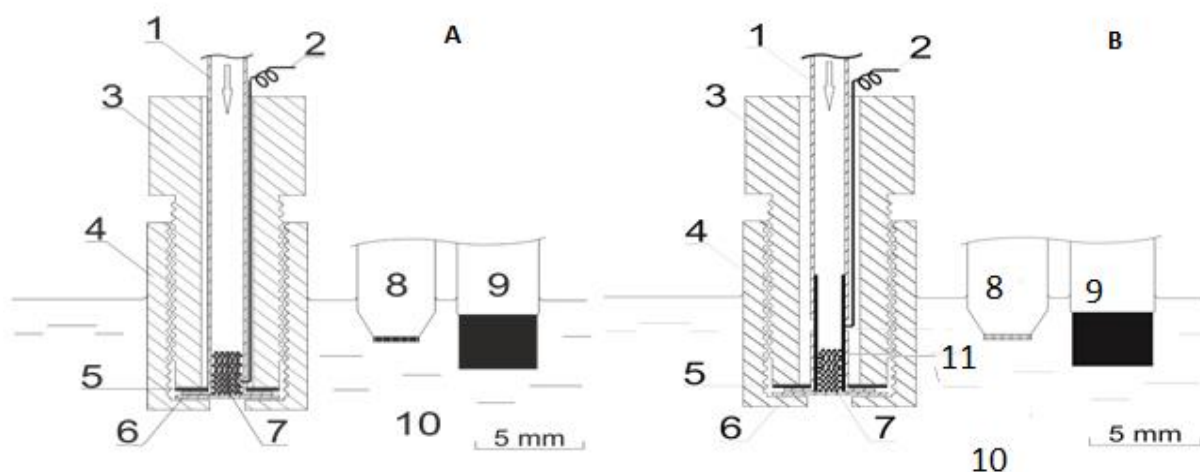
Měděný materiál mikrokuliček byl vybrán pomocí předešlých prací založených na detekci aminokyselin pomocí mědi^{5, 9, 10, 47}. Ke stanovení aminokyselin elektrochemickou detekcí byla použita například měděná disková elektroda ve spojení s mikrokolonovou chromatografií¹⁰, ale také s FIA metodou⁴⁷.

Přechod z detektoru plněného mikrokuličkami skelného uhlíku na detektor plněný mikrokuličkami mědi se neomezil pouze na změnu pevné složky plnicí suspenze. Odlišnosti v mechanických i chemických vlastnostech mědi si vyžádaly změny v konstrukci detektoru, ve složení suspenze i v postupu plnění.

3.2.1 Konstrukce coulometrického detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček mědi

Prvním problémem, který bylo zapotřebí vyřešit, byla výměna náplně - kontakt zavedený do kapiláry detektoru zabráňoval vymytí veškeré použité mědi. Uhlíkové mikrokuličky vzhledem ke svému tvaru a nejspíše i nižší hustotě lze vymýt z původní konstrukce, měď má však tvar nepravidelný a hustotu mnohem vyšší a tak pro ni byl tento prostor nedostatečný. Proto bylo nutné pozměnit konstrukci detektoru. Zdroj inspirace tvořila již dříve vyvinutá konstrukce tubulárních platinových detektorů, které byly tvořeny platinovou trubičkou přetaženou z obou stran teflonovou kapilárou, napojenou na výstup z kolony^{44, 46}. Na obrázku 3.2.1A lze vidět původní konstrukci detektoru a na obrázku 3.2.1B je vyobrazena nová konstrukce detektoru.

Nový detektor tvoří přírodní kapilára, do které je nasunuta Pt-trubička a naplněna částicemi mědi. Na Pt-trubičku je nasunuta koncová kapilára, která je ukončena obrubou a spojena pomocí šroubů a spojky, přičemž mezi nimi je ukotven vhodný filtr. Elektrický kontakt je tvořen Pt-drátkem, připojeným na trubičku mezi oběma teflonovými kapilárami. Ostatní parametry zůstaly nezměněné od staré konstrukce detektoru.



I

Obr. 3.2.1: Srovnání konstrukce detektorů. A: Původní konstrukce detektoru; B: Nová konstrukce detektoru. (1. PTFE kapilára (1/16'' x 0,5 mm ID), 2. Platinový drátek (průměr 0,5 mm), 3. Šroub, 4. Spojka, 5. Ocelová podložka, 6. Filtrační papír, 7. Sloupec náplně mikrokuliček, 8. Referenční argentochloridová elektroda, 9. Pomocná platinová elektroda, 10. Elektrolyt, 11. Pt- trubička.)

3.2.2 Optimalizace postupu plnění detektoru

Na rozdíl od uhlíku není měď dostatečně chemicky stálá a na jejím povrchu se vytváří zoxidovaná vrstva bránící průchodu elektrického proudu. Proto je zapotřebí tuto vrstvu odstranit, zaktivovat měď.

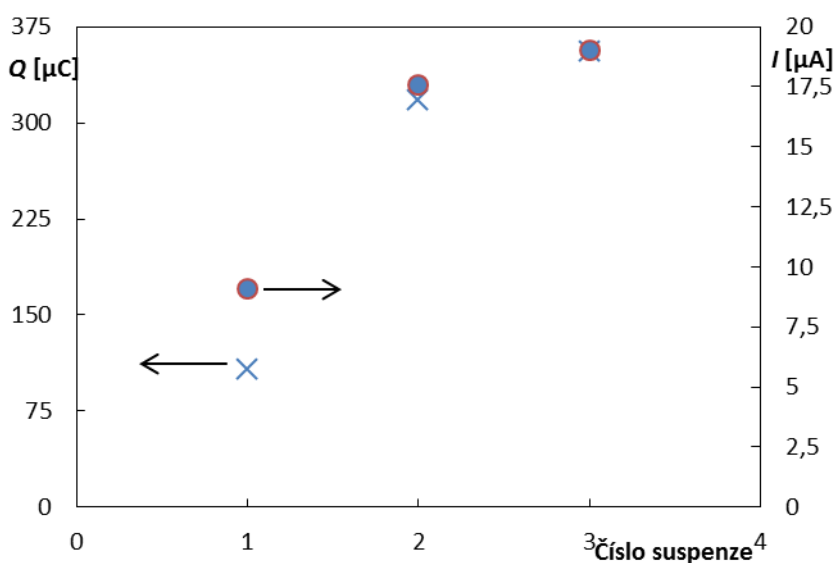
K originálním mikrokuličkám mědi byl přidán roztok kyseliny dusičné, byly vybrány tři koncentrace a doby aktivace (uvedeno v tab. 3.2.1). Aktivace byla ukončena přidáním vhodného objemu vody, aby konečný objem suspenze byl 9 ml a hustota suspenzí byla tedy vždy stejná.

Takto připravené suspenze byly vyzkoušeny při stanovení fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka 20 μl , v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8; tyto podmínky byly zvoleny podle práce ⁹. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 3.2.2, a je z nich je patrné, že suspenze 1 nezaktivuje veškeré množství mědi tak, jako suspenze 2 a 3. Rozdíl aktivace při použití suspenze 2 a 3 není nijak markantní, avšak o něco vyšší signál poskytují mikrokuličky zaktivované suspenzí 3 a z tohoto důvodu byla vybrána jako optimální a byla použita pro všechna další měření.

Při dlouhodobém uchovávání suspenzí (týden) bylo zaznamenáno zbarvení čirého roztoku nad mikrokuličkami na tyrkysovou barvu, což je zřejmě výsledkem trvalého působení zředěné kyseliny dusičné. Z tohoto důvodu byly suspenze uchovávány maximálně týden.

Tab. 3.2.1: Aktivace měděných mikrokuliček různými koncentracemi kyseliny dusičné a časem aktivace.

Číslo suspenze	Koncentrace kyseliny dusičné [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Čas aktivace [s]
1	$1 \cdot 10^{-6}$	30
2	$1 \cdot 10^{-4}$	30
3	$2 \cdot 10^{-4}$	45



Obr. 3.2.2: Srovnání výsledků plnění dle suspenzí viz podmínky uvedené v tabulce 3.2.1. Plocha (křížky), výška (kolečka). Měřené za podmínek: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $0,2 \text{ V}$, dávkovací smyčka $20 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

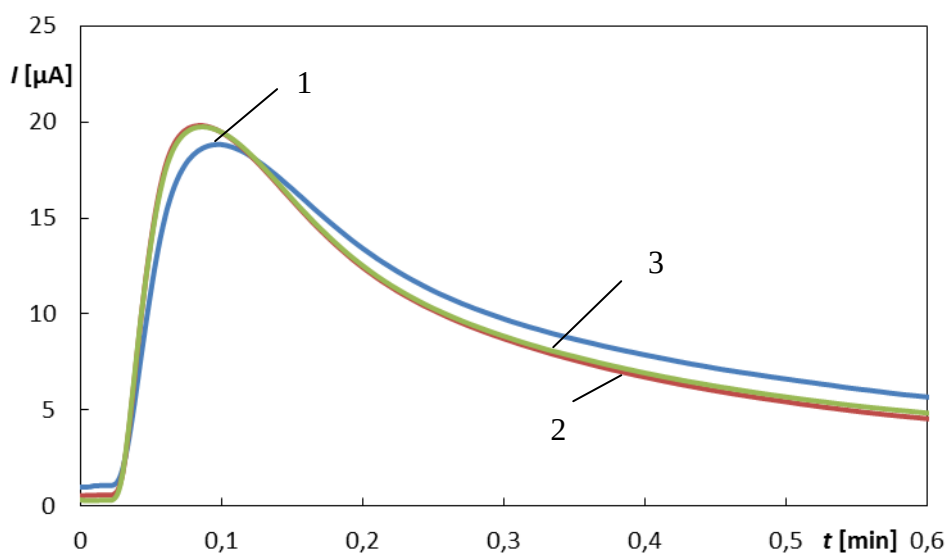
Dalším problémem bylo samotné plnění detektoru suspenzí, což bylo způsobeno rozdílnou hustotou mikrokuliček a rozpouštědla suspenze. Plnění za pomoci bublinek vzduchu, jako tomu bylo u suspenze s mikrokuličkami uhlíku, nebylo možné z důvodu ovlivnění ustalování základní linie. Ponechán byl objem dávkovací smyčky suspenze – $500 \text{ } \mu\text{l}$ a hnací kapalina – methanol.

Vzhledem k rozdílné hustotě složek suspenze mikrokuličky po promíchání rychle klesají ke dnu a není možné provést reprodukovatelné naplnění dávkovací smyčky, proto bylo využito plnění do dosažení vhodné hodnoty tlaku. Jelikož se konstrukce detektoru skládala z teflonové kapiláry, jejíž limitní tlak má hodnotu 3 MPa , byly vyzkoušeny tři tlaky: 1, 2 a 3 MPa . Pro tyto tlaky byly nejprve zjištěny výšky sloupce mědi v detektoru, jejichž výsledky jsou uvedeny v tab. 3.2.2, Výsledky byly ještě ověřeny pomocí stanovení fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (obr. 3.2.3) při podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $0,2 \text{ V}$, dávkovací smyčka $20 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8. Z naměřených křivek a získaných výšek sloupců mědi vyplývá, že plnění tlakem 3 MPa poskytuje stejně vysoký signál, jako poskytuje plnění tlakem 2 MPa . Plnění tlakem 1 MPa poskytuje jen nepatrně nižší signál.

Z vyhodnocení výsledků a také vzhledem k obdobné výšce sloupce jako u uhlíkem plněného detektoru bylo plnění tlakem 2 MPa zvoleno jako optimální a bylo použito pro všechna další měření.

Tab. 3.2.2: Srovnání výšky sloupce mědi při použití různých tlaků plnění.

Tlak [MPa]	Výška sloupce Cu [mm]
3	8
2	4,5
1	3



Obr. 3.2.3: Vybrané křivky fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ plnění tlakem 1MPa (1), 2MPa (2), 3MPa (3) Měřené za podmínek: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka 20 μl , v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

3.2.3 Mikroskopická studie povrchových změn mikrokuliček mědi

Při práci s detektorem naplněným mikrokuličkami mědi bylo na mikrokuličky vyvíjeno několik vlivů, které by mohly ovlivnit tvar kuliček, což bylo otestováno pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). V předchozím případě u mikrokuliček uhlíku ²⁰ nebyl pozorován žádný rozdíl mezi tím, jestli byly nebo nebyly použity v detektoru, kuličky byly ve všech případech symetrické kulovité částice.

Při práci s náplňovým detektorem byly mikrokuličky mědi vystaveny aktivaci pomocí kyseliny dusičné, tlaku při plnění a vkládanému potenciálu.

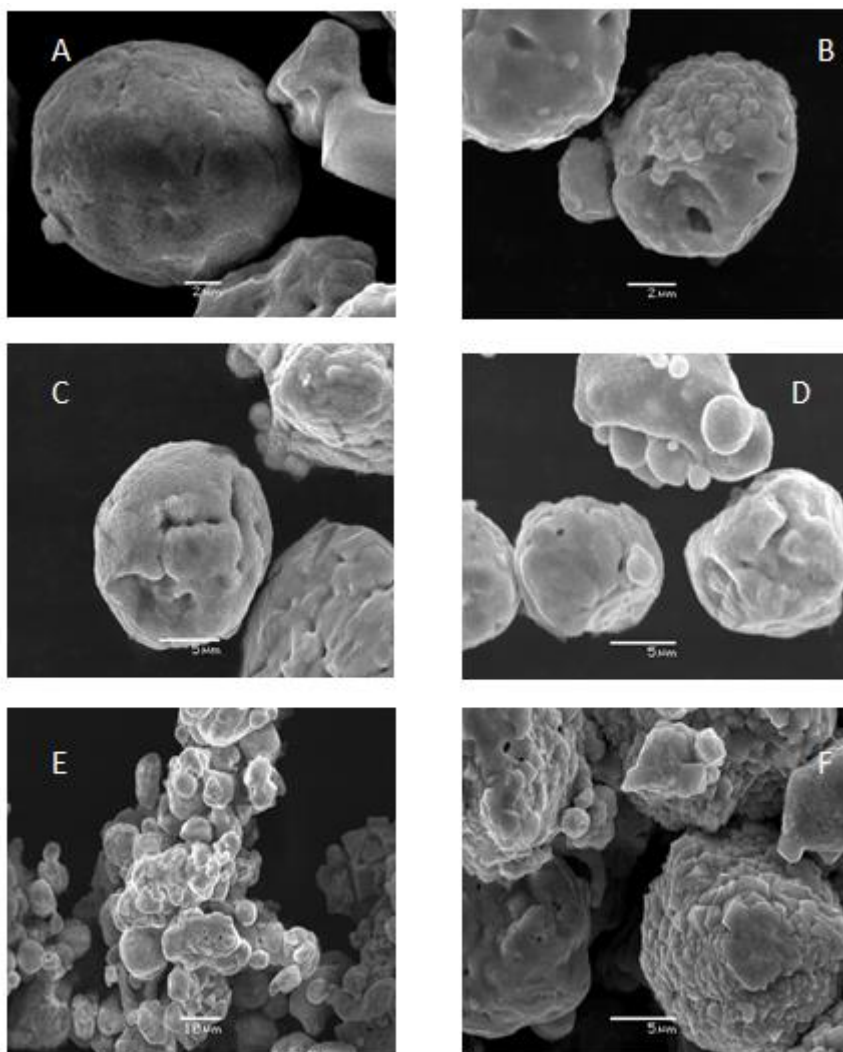
Prvním mikroskopickým vzorkem byly původní mikrokuličky mědi od výrobce (Obr. 3.2.4A), dalším vzorkem byly mikrokuličky mědi zaktivované kyselinou dusičnou (Obr. 3.2.4B). Vzorek obsahující originální mikrokuličky vystavené tlaku v detektoru je zobrazen na obr. 3.2.4C a na obr. 3.2.4 D je snímek vzorku mikrokuliček, které byly zaktivovány kyselinou dusičnou a následně vystaveny tlaku; v obou případech byly vzorky ponechány 60 min při tlaku 2 MPa a průtoku 0,5 ml/min. Posledním vzorkem byly zaktivované mikrokuličky mědi vystavené 60 minut potenciálu 0,2 V bez vlivu tlaku (Obr. 3.2.4E). Vzorek E spojuje všechny vlivy působící na mikrokuličky, jelikož na zaktivované mikrokuličky působil jak potenciál, tak zároveň i tlak způsobený průtokem elektrolytu při průtoku 0,5 ml·min⁻¹ pod tlakem 2 MPa.

Vzorky byly před snímáním vždy vysušeny, pomocí oboustranné lepicí pásky připraveny na kovový terčík a vloženy do skenovacího detektoru (parametry přístroje: Acc Volt 23 kV, Spot size 32).

Po pořízení záznamů ze SEM bylo pozorováno, že originální mikročástice mají na rozdíl od uhlíkových částic nepravidelné tvary a jejich velikosti se pohybují mezi 3 až 15 μm. U vzorků A – D nebyly shledány markantní změny ve velikosti ani tvaru od originálních kuliček.

Lze pozorovat mírné shlukování mikrokuliček (Obr. 3.2.4E), což je nejspíše způsobeno opakovaným rozpouštěním mikrokuliček mědi po vystavení potenciálu. Shluky však nejsou tak časté, aby se vzorek E markantně lišil od ostatních vzorků. Je předpokládáno, že se shluky tvoří v závislosti na době a hodnotě vkládaného potenciálu.

Při pořizování snímků vzorků mikrokuliček B – E, byla pozorována jakási „šupinatost“ některých kuliček (Obr. 3.2.4F), nepodařilo se nicméně najít souvislost předchozí úpravou mikročástic mědi a tím ani odhadnout jejich pravděpodobný původ.



Obr. 3.2.4: Vzorčky SEM: Originální kuličky (A), Po aktivaci (B), Originální kuličky vystavené tlaku (C), Aktivované kuličky vystavené tlaku (D), Aktivované kuličky vystavené potenciálu (E), „Šupinaté“ mikročástice (F).

3.2.4 Čištění detektoru

Detektor poskytuje stabilní signál při opakovaném plnění, avšak po delší době jeho nepoužívání (například přes noc) se signál rapidně sníží. Z tohoto důvodu byl hledán způsob, jak čistit a před dalším měřením aktivovat platinovou část detektoru. Výchozím bodem zde bylo čištění tubulárního detektoru s platinovou trubičkou popsaného v literatuře⁴⁴. Odezva byla testována na stanovení fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál $0,2 \text{ V}$, dávkovací smyčka $20 \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8,

Nejprve bylo vyzkoušeno čištění popsané v literatuře, které využívá kyselinu sírovou o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ve které je detektor ponořený a postupně se vkládá potenciál měnící se skokem z $-0,3 \text{ V}$ na $1,4 \text{ V}$, přičemž každý potenciál byl udržován po dobu 5 – 10 s a celkový počet změn byl 10. Odezva detektoru se sice zvýšila (viz obr. 3.2.5), ale ne na původní hodnotu a proto bylo vyzkoušeno zdvojnásobení počtu změn potenciálu, což signál zvýšilo znovu jen mírně. Celkový počet změn byl navýšen na 40, avšak signál to nijak rapidně nezvýšilo.

Dalším postupem byla změněna koncentrace kyseliny sírové na $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, při zachování původních podmínek. Tento způsob sice zvýšil signál, ale přesto byla odezva nízká. Také bylo vyzkoušeno máčení detektoru v 50% roztoku methanolu přes noc, toto samotné nikterak nápadně signál nezvedlo, tak byla vyzkoušena kombinace máčení detektoru přes noc v 50% roztoku methanolu a dále čištění v roztoku kyseliny sírové o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a vkládán byl potenciál měnící se skokem z $-0,6 \text{ V}$ na $1,7 \text{ V}$, každý potenciál byl udržován po dobu 5 – 10 s a celkový počet změn byl 10.

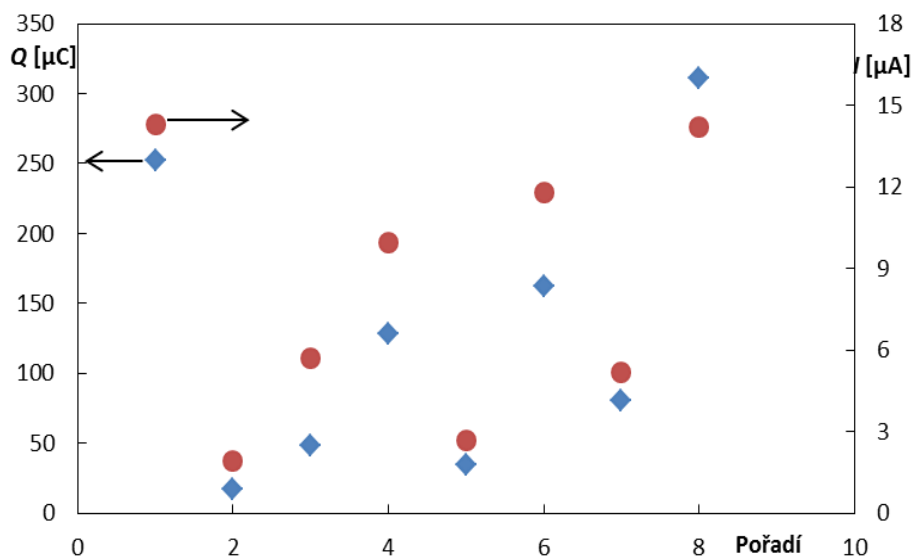
Poslední postup čištění detektoru se projevil výraznou změnou signálu, srovnatelnou s původním signálem detektoru.

Čištění detektoru a jednotlivé použité čisticí postupy jsou srovnány v tabulce 3.2.3 a výsledky výšek píků a ploch jsou zobrazeny na grafu 3.2.5.

Z výsledků byl vybrán optimální způsob čištění detektoru, který zahrnuje noční máčení detektoru v methanolvém roztoku a ponoření detektoru do roztoku kyseliny sírové o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ za vkládání měnícího se potenciálu skokem z $-0,6 \text{ V}$ na $1,7 \text{ V}$, každý potenciál byl udržován po dobu 5 – 10 s a celkový počet změn byl 10. Tento postup byl prováděn denně před začátkem měření.

Tab. 3.2.3: Použité způsoby čištění detektoru.

Pořadí	Namáčení	Koncentrace H_2SO_4 [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Počet změn potenciálu	Měněné potenciály [V]
1	Původní vyrobený detektor			
2	Pasivovaný detektor bez vymytí			
3	/	$5 \cdot 10^{-2}$	10	-0,3 - 1,4
4	/	$5 \cdot 10^{-2}$	20	-0,3 - 1,4
5	/	$5 \cdot 10^{-2}$	40	-0,3 - 1,4
6	/	0,1	10	-0,3 - 1,4
7	Methanol (1/1;v/v)	/	/	/
8	Methanol (1/1;v/v)	0,1	10	-0,6 – 1,7

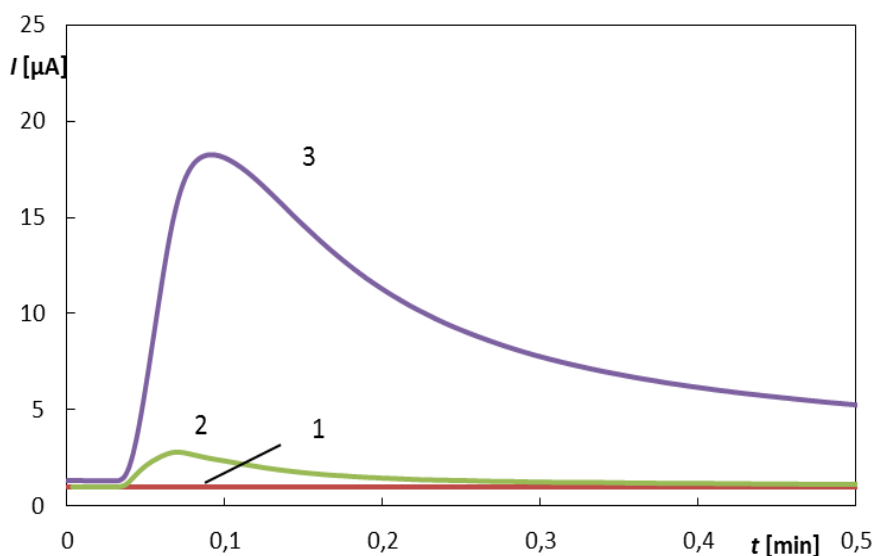


Obr. 3.2.5: Srovnání všech způsobů čištění detektoru dle tabulky 1. Měřené za podmínek: fenylationin o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka 20 μl , v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

3.2.5 Optimalizace podmínek stanovení fenylalaninu

Podmínky stanovení fenylalaninu byly založeny na popsáném stanovení pomocí pracovní měděné elektrody⁹ a upraveny pro použitý coulometrický detektor. Byl proměřen vliv nejdůležitějších parametrů, tedy detekčního potenciálu a pH nosného roztoku, velikost dalších parametrů, konkrétně průtoková rychlost $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a objem dávkovací smyčky $20 \text{ } \mu\text{l}$, byly zachovány z předchozích měření.

Při práci s náplňovým detektorem s mikrokuličkami mědi bylo důležité ověřit použitelnost pro metodu FIA, zda při měření nevzniká systémový pík. Byl proměřen základní elektrolyt – fosfátový pufr o pH 6,8, a dále pak fenylalanin o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, při podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál 0,2 V, dávkovací smyčka $20 \text{ } \mu\text{l}$ v prostředí základního elektrolytu. Výsledné křivky jsou uvedeny na obr. 3.2.6 a žádný systémový pík není pozorován, tudíž je FIA aplikovatelná.

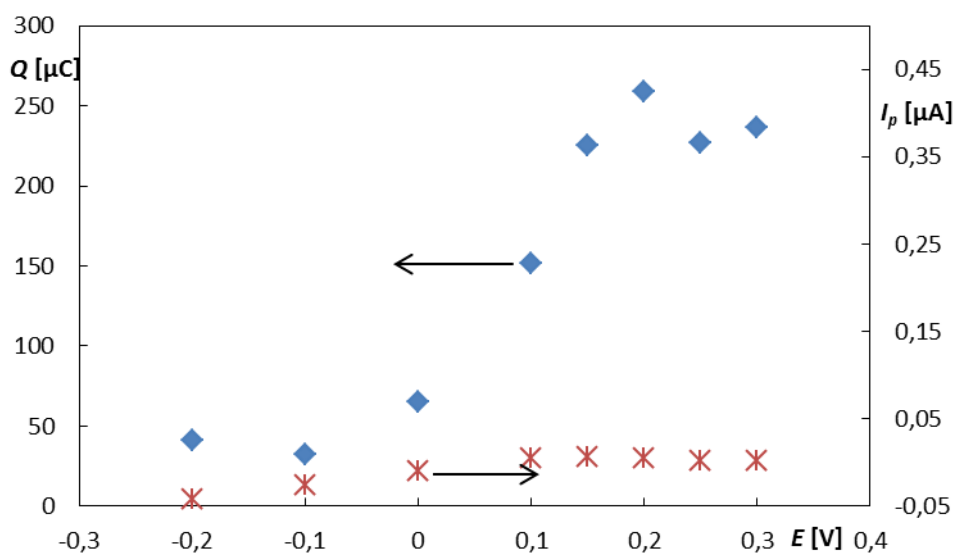


Obr. 3.2.6: Porovnání odezvy fenylalaninu a slepého vzorku. Fosfátový pufr o pH 6,8 (1), fenylalanin o $c = 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2), fenylalanin o $c = 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3). Měřené za podmínek: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka $20 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

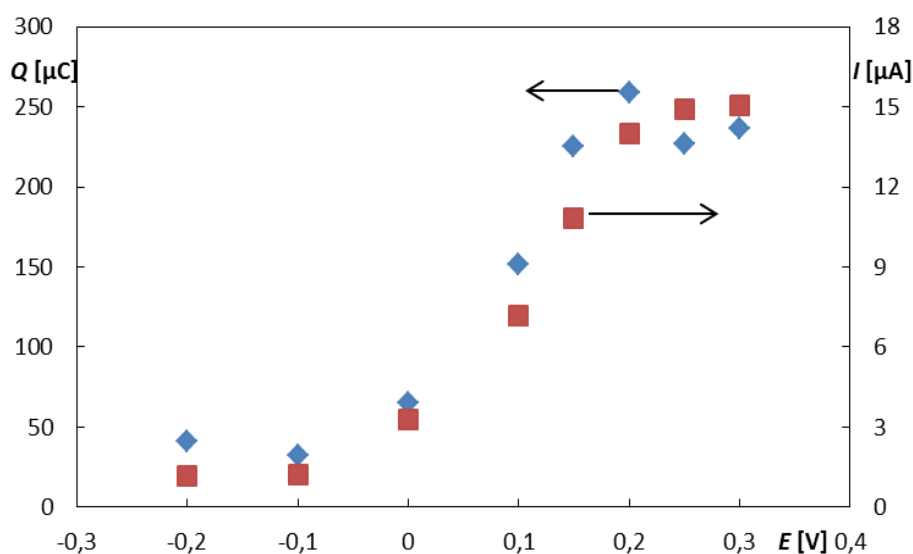
3.2.5.1 Hydrodynamický voltamogram

Prvním optimalizovaným parametrem, který výrazně ovlivňuje odezvu detektoru, byl vkládaný potenciál. Byl proměřen hydrodynamický voltamogram od potenciálu -0,2 V do 0,3 V. Na výsledném hydrodynamickém voltamogramu (Obr. 3.2.7) lze pozorovat se zvyšujícím se potenciálem zvýšení plochy až do potenciálu 0,2 V, dále již plocha neroste. Proud pozadí je v tomto rozsahu potenciálů zanedbatelný, pohybuje se od -0,05 po 0,01 μA .

Na obrázku 3.2.8 lze pro další srovnání pozorovat průběh plochy i výšky píku se změnou vkládaného potenciálu. Obě odpovědi systému se až do hodnoty 0,2 V zvyšují, poté se již jejich hodnoty výrazně nemění. Z těchto výsledků byl za optimální vkládaný potenciál vybrán 0,2 V.



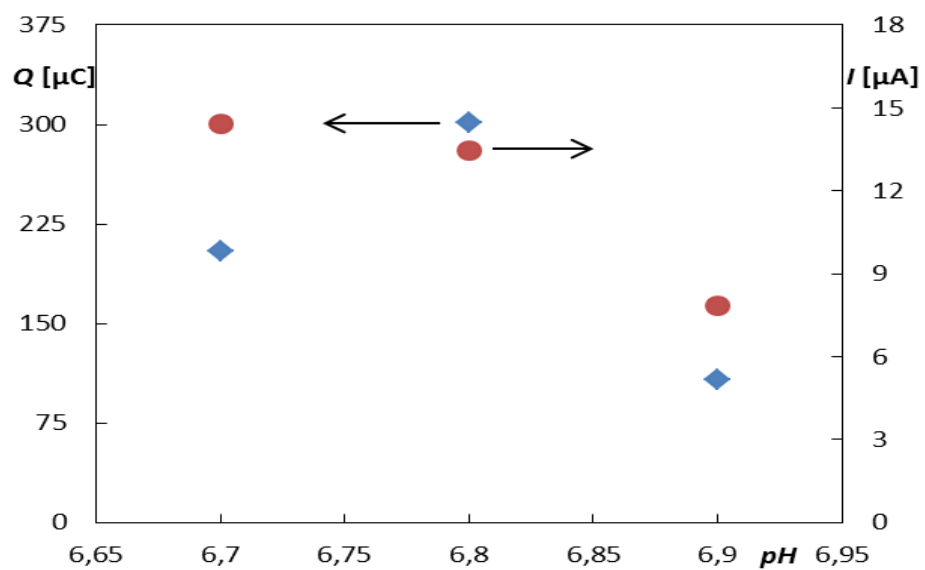
Obr. 3.2.7: Hydrodynamický voltamogram fenylalaninu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); (plocha píků – kosočtverec, proud pozadí – křížek), měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 6,8 a objemu dávkovací smyčky 20 μl .



Obr. 3.2.8: Závislost výšky píku (čtverce) a plochy píku (kosočtverce) fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na vkládaném potenciálu, měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 6,8 a objemu dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.

3.2.5.2 Vliv pH na odezvu detektoru

Druhým krokem optimalizace byla kontrola optimálního pH. V literatuře⁹ je popsáno, že komplexometrická reakce mědi s fenylalaninem probíhá při pH 6,8, byla tedy testována jen oblast okolo tohoto pH; konkrétně hodnoty pH 6,7, 6,8 a 6,9. Získané závislosti odezvy na pH jsou uvedeny na obrázku 3.2.9. Lze pozorovat, že odchýlení od pH 6,8 do zásaditější oblasti způsobí silný pokles plochy i výšky píku, při vychýlení do kyselější oblasti se sníží plocha píku. Z toho vyplývá nejen optimální hodnota pH 6,8, ale i fakt, že tato hodnota musí být pečlivě udržována, protože i drobná nepřesnost při přípravě nosného elektrolytu způsobí velkou odchylku výsledku.



Obr. 3.2.9: Vliv pH na změnu odezvy detektoru. Závislost výšky píku (kuličky) a plochy píku (kosočtverce) fenylalaninu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na pH, měřeno při podmínkách: průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 6,8, potenciálu 0,2V a objemu dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.

3.2.6 Opakovatelnost podmínek stanovení fenylalaninu

3.2.6.1 Opakovatelnost plnění

Stálost signálu při opakovaném plnění detektoru byla ověřena pro stanovení fenylalaninu. Po opakovaném naplnění detektoru byly pro fenylalanin o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ naměřeny vždy tři záznamy při optimálních podmínkách – fosfátovém pufru o pH 6,8, průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál 0,2 V a objemu plnicí cívky 20 μl . Bylo provedeno pět naplnění detektoru, vyjádření stálosti signálu plochou a výškou píku je uvedeno a statisticky vyhodnoceno v tabulce 3.2.4.

V tabulce jsou uvedeny hodnoty mediánu a relativní směrodatné odchylky plochy a výšky, přičemž hodnoty směrodatných odchylek pro plochy byla maximálně do 5,4% a pro výšku do 4,4%. Při srovnání pěti různých plnění je relativní směrodatná odchylka pro plochy píků 2,9 % a pro výšku 2,7 %.

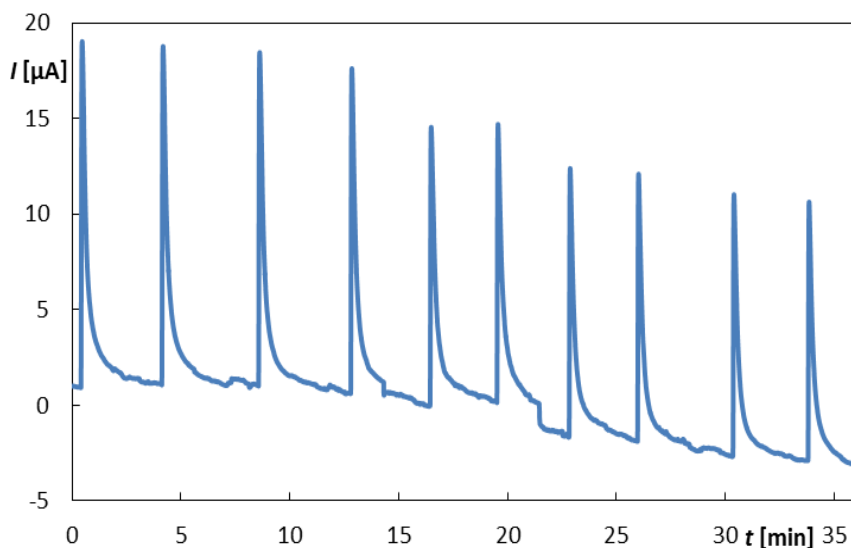
Jako tomu bylo u detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku i zde lze z výsledků dojít k závěru, že opakované přeplňování detektoru má minimální vliv na variabilitu těchto výsledků. Výsledky jsou vhodné pro používání náplňového detektoru

Tab. 3.2.4: Statistické vyhodnocení opakovaného plnění detektoru s výměnnou náplní mikrokuliček mědi.

Plnění číslo	plocha		výška	
	Medián [μC]	RSD [%]	Medián [μA]	RSD [%]
1	273	5,4	22	4,4
2	311	2,9	18	1,0
3	278	2,1	23	1,5
4	259	4,6	21	2,7
5	254	1,8	17	3,0
Celkové srovnání	273	2,9	21	2,7

3.2.6.2 Stabilita odezvy při opakovaném nástřiku fenylalaninu

Stabilita odezvy mikrokuliček mědi pro stanovení fenylalaninu byla ověřena desetinásobným nástřikem roztoku fenylalaninu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při optimálních podmínkách. Pořízené křivky jsou uvedeny na obrázku 3.2.10, kde je možné vidět postupně se snižující plochy i výšky píků, po desátém nástřiku bylo pozorováno snížení výšky píku o 25,6 % a plochy o 44,6 %. Po třetím nástřiku se sníží plocha píku o 9,1 % a výška o 3,9 %. Z výsledků lze usoudit, že fenylalanin významně snižuje stabilitu signálu mikrokuliček mědi, je tedy možné provést po naplnění pouze 3 nástřiky vzorku, aby nebyly výsledky výrazně ovlivněny. Tento způsob měření byl použit pro všechna další měření.



Obr. 3.2.10: Opakovatelnost deseti nástřiků fenylalaninu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po jednom naplnění detektoru s výměnnou náplní z mikrokuliček mědi. Při optimálních podmínkách: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$, potenciál $0,2 \text{ V}$ a pH $6,8$.

3.2.7 Kalibrační závislost fenylalaninu

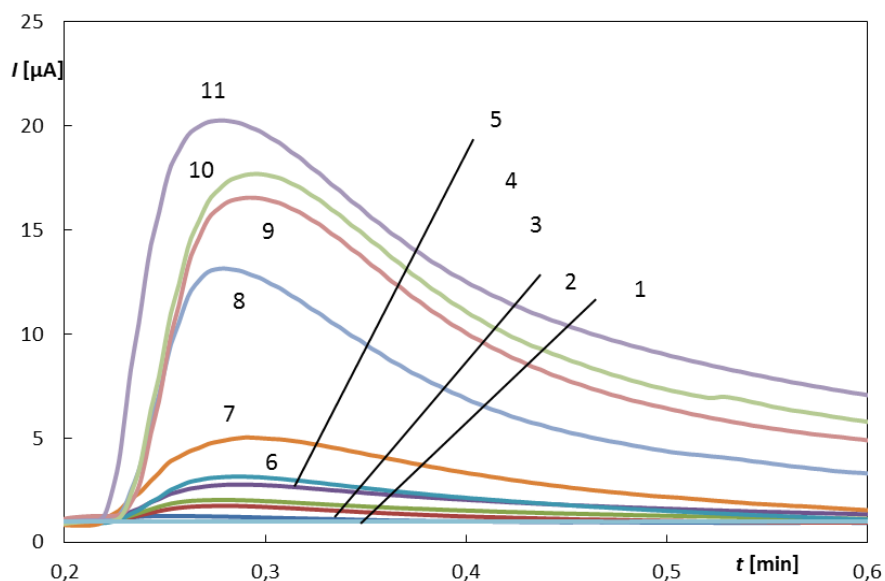
Pro ověření linearity odezvy detektoru s náplní měděných mikrokuliček byla naměřena kalibrační závislost a zjištěna mez detekce a stanovitelnosti. Kalibrační závislost byla měřena za optimálních podmínek v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-3}$ do $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ fenylalaninu, vybrané křivky jsou uvedeny na obrázku 3.2.11, na obrázku 3.2.12A je vyjádřena kalibrační závislost pomocí ploch a na obrázku 3.2.12B pomocí výšek.

Na obrázku 3.2.13 jsou vybrané části kalibrační závislosti od koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ do $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³, opět vyjádřené plochou (A) a výškou (B).

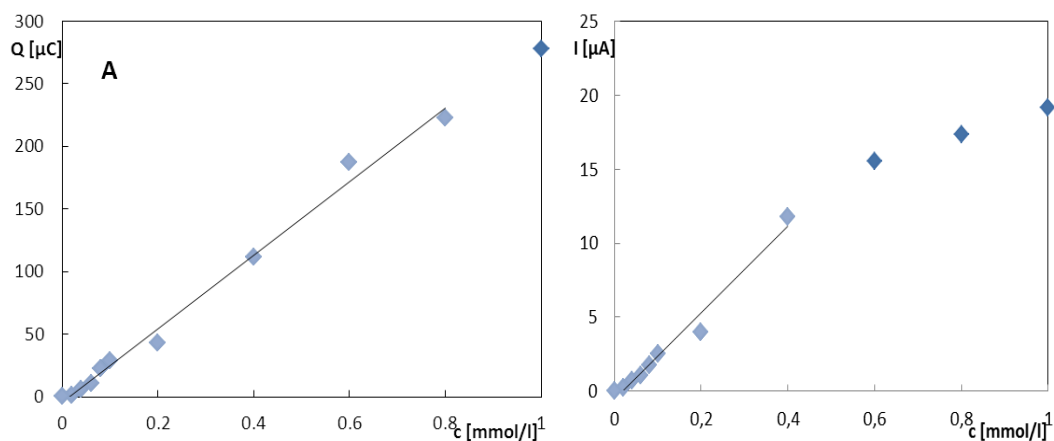
Kalibrační závislosti byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny do tabulky 3.2.5, ve které jsou uvedeny i meze detekce a stanovitelnosti.

Stejně jako v případě stanovení tyrosinu na uhlíkem plněném detektoru je i v tomto případě koncentrační závislost vyjádřená pomocí výšky píku lineární jen v nižších koncentracích, zatímco koncentrační závislost vyjádřená plochou je v celém rozsahu lineární.

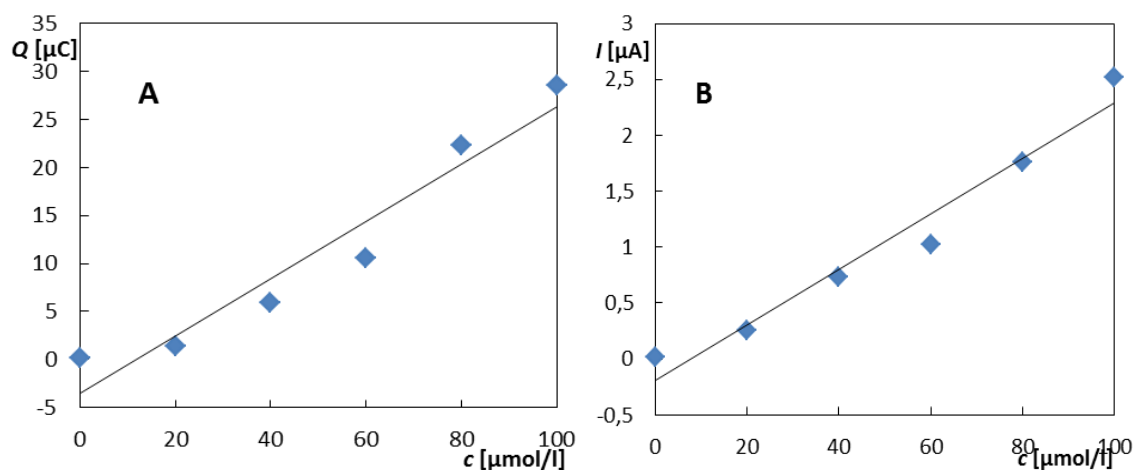
Stanovená mez detekce má řádově stejnou hodnotu jako u stanovení fenylalaninu HPLC s UV či fluorescenční detekcí získaná z literatury^{36–38} a také je obdobná stanovení fenylalaninu metodou HPLC s elektrochemickou detekcí za použití mikrocylické měděné elektrody⁵. Důležitým výsledkem je rovněž to, že hodnota LOD a LOQ je obdobná výsledkům získaným pro tyrosin na uhlíkem plněném coulometrickém detektoru; tato shoda ukazuje, že menší výška píku u detektoru plněném mědí je kompenzována nižším proudem pozadí, a potvrzuje použitelnost metody FIA s detekcí coulometrickým detektorem s výměnnou náplní z mikrokuliček mědi pro stanovení fenylalaninu při nízkých koncentracích.



Obr. 3.2.11: Vybrané FIA křivky koncentrační závislosti fenyalaninu. Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $0,2 \text{ V}$, objemu dávkovací smyčky $20 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8. Koncentrace tyrosinu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6), $2 \cdot 10^{-4}$ (7), $4 \cdot 10^{-4}$ (8), $6 \cdot 10^{-4}$ (9), $8 \cdot 10^{-4}$ (10) a $1 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, základní elektrolyt (1).



Obr. 3.2.12: Kalibrační závislost fenyalaninu - vyjádřená plochou (A) a výškou (B). Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu $0,2 \text{ V}$, dávkovací smyčka $20 \text{ } \mu\text{l}$, v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.



Obr. 3.2.13: Úsek kalibrační závislosti fenylalaninu v rozsahu koncentrací od $1 \cdot 10^{-4}$ do $2 \cdot 10^{-5}$ M vyjádřená plochou (A) a výškou (B). Měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka 20 μl , v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

Tab. 3.2.5: Přehled parametrů kalibrační závislosti fenylalaninu v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ po $2 \cdot 10^{-6}$ M, měřeno při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 0,2 V, dávkovací smyčka 20 μl , v prostředí fosfátového pufru o pH 6,8.

^a jednotky směrnice vyjádřené plochou $\mu\text{C} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ a vyjádřené výškou $\mu\text{A} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$,
^b jednotky úseku vyjádřené plochou μC a vyjádřené výškou μA .

Lineární dynamický rozsah [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]		Směrnice ^a	Úsek ^b	R	LOD [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	LOQ [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
800 – 20	plocha	0,299	-3,511	0,985	1,4	4,7
400 – 20	výška	0,025	-0,189	0,986	1,2	3,9

4. Závěr

V této práci bylo ověřeno chování již dříve vyvinutého coulometrického detektoru s výměnnou náplní mikrokuliček skelného uhlíku pomocí optimalizace podmínek hexakynoželeznatanu draselného. Z výsledků vyplývá velká reprodukovatelnost měření na detektoru.

Při práci s detektorem s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného uhlíku bylo zrychleno plnění detektoru pomocí vzduchových bublin vpravených za injektovanou zónu suspenze – za pomoci 500 μl smyčky se suspenzí a dvojnásobným nadávkováním 100 μl vzduchu bylo dosaženo rychlého naplnění detektoru. Z této skutečnosti lze vycházet pro další optimalizaci plnění pomocí automatizace.

Coulometrickým detektorem s výměnnou náplní z mikrokuliček skelného lze stanovit aminokyselinu tyrosin při optimálních podmínkách průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciálu 1,3 V, objemu dávkovací smyčky 50 μl , v prostředí B-R pufru o pH 4,5. Mez detekce byla stanovena na hodnotu $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $1,6 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při změně náplně coulometrického detektoru za mikrokuličky mědi bylo zjištěno, že stávající konstrukce je pro tuto náplň nevyhovující a z tohoto důvodu byla upravena. Rovněž byl vyvinut způsob čištění modifikovaného detektoru (doplnit). Dále bylo zjištěno, že je nutné měď před měřením aktivovat – vystavit po dobu 45 s kyselině dusičné o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto zaktivovaná suspenze byla vpravována do detektoru bez bublin vzduchu, jelikož plnění neurychlovaly, nýbrž pouze způsobovaly nestálost signálu.

Za zjištěných optimálních podmínek, kterými byly: průtok $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 6,8 při potenciálu 0,2V a objemu dávkovací smyčky 20 μl , byla naměřena kalibrační závislost fenylalaninu a zjištěny meze detekce $1,4 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $4,7 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Získané meze detekce obou typů detektorů byly srovnatelné s mezemi detekcí u metod HPLC s UV či fluorescenční detekcí.

5. Seznam použité literatury

- 1 K. Štulík, V. Pacáková: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách, SNTL Nakladatelství technické literatury 1989.
- 2 K. Tóth, et al.: Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: characterization and classification. *Pure and Applied Chemistry* 76 (2004), 1119 – 1138.
- 3 L. T. Skeggs: An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 28 (1957), 311 – 322.
- 4 J. Růžicka, E. H. Hansen: Flow injection analyses: Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 78 (1975), 145 – 157.
- 5 K. Pecková, et al.: Miniaturizované amperometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu. *Chemické listy* 100 (2006), 124 – 132.
- 6 H. Shen, et al.: Detection of peptides by precolumn derivatization with biuret reagent and preconcentration on capillary liquid chromatography columns with electrochemical detection. *Analytical Chemistry* 71 (1999), 987 – 994.
- 7 R. S. Stojanovic, et al.: Liquid chromatography-electrochemical detection of inorganic arsenic using a wall jet cell with conventional and micro-sized platinum disk electrodes. *Analytical Chemistry* 62 (1990), 2692 – 2697.
- 8 W. L. Caudill, et al.: Liquid chromatography with rapid scanning electrochemical detection at carbon electrodes. *Analytical Chemistry* 55 (1983), 1877 – 1881.
- 9 K. Štulík, et al.: Operation parameters of voltametric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors. *Journal of Chromatography* 367 (1983), 311 – 321.
- 10 W. T. Kok, et al.: Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode. *Journal of Chromatography* 256 (1983), 17 – 26.
- 11 J. V. Kenkel, et al.: A dual working electrode coulometric flow cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 54 (1974), 47 – 54.

- 12 J Wang, et al.: Deposit of metals at a flow-through reticulated vitreous carbon electrode coupled with on-line monitoring of effluent. *Journal of The Electrochemical Society* 130 (1983), 1814 – 1818.
- 13 L. I. Ilcheva, et al.: Coulometric detector cell for use with flow injection. *Analyst* 155 (1990), 1247 – 1249.
- 14 M. Mayer, et al.: Flow injection based renewable electrochemical sensor system. *Analytical Chemistry* 68 (1996), 3808 – 3814.
- 15 J. Mika, : New flow-through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC. *Electrochimica Acta* 154 (2015), 397 – 403.
- 16 J. Mika: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012.
- 17 M. A. Bezzera, R. E. Santelli: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76 (2008), 965 – 977.
- 18 H. Tye, et al.: Application of statistical ‘design of experiments’ methods in drug discovery. *Drug Discovery Today* 9 (2004), 485 – 491.
- 19 T. Lundstedt, et al.: Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42 (1998), 3 – 40.
- 20 T. Alizadeh, et al.: Enhancement of molecularly imprinted polymer based parathion voltammetric sensor by using experimental design techniques. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* 1 (2009), 169 – 187.
- 21 A. Vallejo, et al.: Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for determination of estrogenic compounds in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010), 8327 – 8333.
- 22 J. Michálek: Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE). http://www.crr.vutbr.cz/system/files/brozura_05_1012_2.pdf (Staženo 30.7.2016).
- 23 R. Leardi, et al.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytical Chimica Acta* 652 (2009), 161 – 172.
- 24 S. Ferreira, et al.: Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 1158 (2007), 2 – 14.
- 25 C. B. Powar: Biochemistry. Himalaya Publishing House, 2008.

- 26 R. K. Murray: Harperova biochemie. H&H, Praha 1998.
- 27 P. Karlson: Základy biochemie. Praha: Academia, 1971.
- 28 Tyrosine. University of Maryland, Medical centre.
<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/tyrosine> (Staženo 5.8.2016).
- 29 Phenylalanine. University of Maryland, Medical centre.
<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/phenylalanine> (Staženo 5.8.2016).
- 30 H. Vaňková, et al.: Peptidové mapy. *Chemické listy* 93 (1999), 120 – 127.
- 31 J. A. Reynaud, et al.: Electrochemical investigations of amino acids at solide electrodes: Part 1 Sulfur components: cystine, cysteine, methionine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 114 (1980), 195 – 211.
- 32 I. Molnár, et al.: Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 142 (1977), 623 – 640.
- 33 N. A. Hampson, et al.: Oxidation at copper electrodes, Part 4: The oxidation of α -amino acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 34 (1972), 91 – 99.
- 34 R. P. Baldwin, et al.: Determination of amino acids and peptides by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *Analytical Chemistry* 66 (1994), 2669 – 2674.
- 35 F. Zhang, et al.: Constant potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode. *Analytical Chemistry* 63 (1991), 1702 – 1707.
- 36 M. Xi-ming, et al.: Simultaneous determination of phenylalanine and tyrosine in peripheral capillary blood by HPLC with ultraviolet detection. *Clinical Biochemistry* 46 (2013), 1074 – 1078.
- 37 S. Neurauter, et al.: Simultaneous measurement of phenylalanin and tyrosine by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. *Clinical Biochemistry* 46 (2013), 1848 – 1851.
- 38 R. Kand'ár, et al.: Determination of phenylalanin and tyrosine in plasma dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 877 (2009), 3926 – 3929.

- 39 H. Orhan, et al.: Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *Journal of Chromatography B* 799 (2004), 245 – 254.
- 40 C. G. Nan, et al.: Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin. *Analytica Chimica Acta* 452 (2002), 245 – 254.
- 41 G. Jin, et al.: The electrochemical behavior and amperometric determination of tyrosine and tryptophan at a glassy carbon electrode modified with butyrylchloride. *Electrochemistry Communications* 6 (2004), 454 – 460.
- 42 X. Tang, et al.: Electrochemical determination of L-tryptofan and L-tyrosine, L-cysteine using electrospun carbon nanofibers modified electrode. *Talanta* 80 (2010), 2182 – 2186.
- 43 J. Saurina, et al.: Chromatographic determination of amino acids by pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as reagent. *Journal of Chromatography A* 740 (1996), 21 – 30.
- 44 J. Cvačka, et al.: An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography. *Electroanalysis* 12 (2000), 39 – 43.
- 45 J. Cvačka: Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 2001.
- 46 J. Zavázalová, et al.: Tubular and microcylindrical platinum electrodes for amperometric detection of aminobiphenyls and aminonaphtalenes in HPLC. *Electroanalysis* 26 (2014), 687 – 696.
- 47 W. T. Kok, et al.: Amperometric detection of amino acids with a passivated copper electrode. *Analytica Chimica Acta* 142 (1982), 31 – 45.