

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Karolína Smítková

**Porovnání zlaté mikroelektrody a konvenční elektrody
pro stanovení sacharidů pulzní ampérometrií**

**Comparison of the gold microelectrode and conventional
electrode for the saccharide determination using pulsed
amperometry**

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Karolína Smítková

Abstrakt

Tato bakalářská práce se věnuje spojení pulzní ampérometrické detekce (PAD) s injekční průtokovou analýzou (FIA) s cílem jejich využití pro detekci glukózy potažmo pak sacharidů v roztoku.

Pulzní ampérometrie je účinnou detekční metodou mnohých organických sloučenin při které, jak název napovídá, je na pracovní elektrodu vkládán sled tří či čtyř potenciálových pulzů. Jsou-li parametry pulzů vhodně zvolené, pak je možné eliminovat nechtěnou pasivaci pracovní elektrody v důsledku adsorpce (mezi)produktů oxidace alifatických sloučenin, která by vedla až ke zmenšení jejího aktivního povrchu. Cílem práce je ukázat, jaký vliv má změna hodnoty vkládaných potenciálových pulzů na výšky píků odpovídajících oxidaci glukózy v roztoku a zhodnotit jejich opakovatelnost. Jako pracovní elektrody porovnává zlatou elektrodu konvenční velikosti a zlatou mikroelektrodu.

Stanovení probíhalo v prostředí borátového pufru o $\text{pH} = 10$. V první řadě byly proměřeny cyklické voltamogramy roztoku glukózy s koncentrací $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ pro získání výchozích hodnot vkládaných pulzů. Následně byla pulzní ampérometrií v kombinaci s injekční průtokovou analýzou s tímto roztokem glukózy proměřena závislost výšek píků na jejich pořadí nástřiku pro různé hodnoty jednotlivých vkládaných pulzů.

Nejllepších a nejreprodukovatelnějších výsledků z proměřených kombinací potenciálových pulzů, které byly otestovány patnácti po sobě jdoucími nástřiky, bylo dosaženo na zlaté elektrodě s hodnotami $+0,4 \text{ V}$ pro detekční potenciál (E_1) s délkou vkládání 400 ms , s oxidačním potenciálem (E_2) $+1 \text{ V}$ vkládaným po dobu 200 ms a redukčním potenciálem (E_3) 0 V o délce 400 ms pro klasickou PAD se třemi vkládanými pulzy. Pro pulzní ampérometrickou detekci se čtyřmi potenciálovými pulzy (Q-PAD) byly jako ty se stabilní odezvou zvoleny hodnoty $+0,2 \text{ V}$ pro detekční potenciál (E_1) s délkou vkládání 400 ms , -2 V pro čistící potenciál (E_2) vkládaný po dobu 20 ms , pro aktivační potenciál (E_3) $+0,6 \text{ V}$ po dobu 10 ms a redukční potenciál (E_4) 0 V na dobu 70 ms . Měření na zlaté mikroelektrodě byly vyhodnoceny jako vhodné parametry potenciálů stejných jako pro zlatou elektrodu pro klasickou PAD a pro Q-PAD $+0,4 \text{ V}$ pro detekční potenciál (E_1) s délkou vkládání 400 ms , -2 V pro čistící potenciál (E_2) vkládaný po dobu 20 ms , pro aktivační potenciál (E_3) $+0,6 \text{ V}$ po

dobu 10 ms a redukční potenciál (E_4) 0 V na dobu 70 ms. Takto zvolenými pulzními programy byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí glukózy od $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} na konvenční zlaté elektrodě a od $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} do $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} na zlaté mikroelektrodě. Vzhledem k hodnotě směrnice obou pulzních metod proměřených na konvenční zlaté elektrodě a na mikroelektrodě bylo zjištěno, že Q-PAD se čtyřmi vkládanými potenciálovými pulzy je metodou citlivější na konvenční elektrodě, zatímco na mikroelektrodě je za citlivější vyhodnocena klasická třípotenciálová PAD.

Šum na mikroelektrodě, který byl neúměrný k výškám píků, dosti komplikoval stanovení v nižších koncentracích glukózy, a i přes veškerou snahu ho redukovat, nebylo dosaženo nižších limitů detekce a kvantifikace než na zlaté elektrodě. To je důvod, proč použití mikroelektrody k tomuto typu stanovení se nejeví jako příliš výhodné a pro lepší výsledky spojenými s nižšími LOD a LOQ a pohodlností měření lze doporučit spíše klasickou zlatou elektrodu.

Abstract

This bachelor's thesis deals with combination of pulsed amperometric detection (PAD) with flow injection analysis (FIA) in order to use them to detect glucose and consequently carbohydrates in solution.

Pulsed amperometry is efficient detection method for many of organic compounds in which, as the name suggests, a sequence of three or four potential pulses is applied at the working electrode. If the pulse parameters are suitable, then it is possible to eliminate the unwanted passivation of the working electrode due to the adsorption of oxidation products and intermediate products of aliphatic compounds, which would lead to a reduction of its active surface. The aim of this work is to show the effect of the change of the value of the applied potential pulses on the peak heights corresponding to the oxidation of the glucose in solution and to evaluate their repeatability. As a working electrode, it compares a gold electrode of conventional size and a gold microelectrode.

The determination was performed in a borate buffer with $\text{pH} = 10$. First of all, cyclic voltammograms of solution with concentration of glucose $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ were measured to obtain the initial values of the applied pulses. Subsequently, the dependence of the peak heights on their injection order for different values of individual applied pulses was measured by pulse amperometry in combination with flow injection analysis with this glucose solution.

The best and most reproducible results which were tested by fifteen consecutive injection were obtained at a gold electrode with values of $+0,4 \text{ V}$ for the detection potential (E_1) with an application time of 400 ms, with an oxidation potential (E_2) $+1 \text{ V}$ applied for a time of 200 ms and a reduction potential (E_3) of 0 V with a time of 400 ms for a classic PAD with three applied pulses. For quadruple pulsed amperometric detection (Q-PAD), the value $+0,2 \text{ V}$ was selected as optimal for the detection potential (E_1) with an application time of 400 ms, -2 V for the cleaning potential (E_2) applied for 20 ms, for the activation potential (E_3) $+0,6 \text{ V}$ for 10 ms and a oxide reduction potential of 0 V for 70 ms. By measurements at the gold microelectrode the optimal pulse parameters were selected as same as at the gold electrode using classic PAD. By Q-PAD optimal values for detection potential (E_1) was $+0,4 \text{ V}$ with pulse time 400 ms, -2 V for cleaning potential (E_2) applied for 20 ms, for activation potential (E_3) $+0,6 \text{ V}$ for

10 ms and reduction potential (E_4) 0 V for 70 ms. Calibration dependences in the range of concentrations of glucose were measured from $1 \cdot 10^{-2}$ to $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ at the gold electrode and from $1 \cdot 10^{-2}$ to $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ at the gold microelectrode using these selected pulse programs. Due to the slope value of both pulse methods measured on the conventional gold electrode and the microelectrode, it was found that a Q-PAD with four applied potential pulses is a more sensitive method at a conventional electrode, while a classical three-potential PAD is evaluated as more sensitive at the microelectrode.

A noise at the microelectrode, which was disproportionate to peak heights complicated determinations at lower concentrations of glucose in solution, and despite all efforts to reduce it, lower limits of detection and quantification than at the gold electrode was not achieved. This is the reason, why using microelectrode for this type of determination does not seem to be very advantageous and it is possible to recommend a classic gold electrode for better results, particularly lower LOD and LOQ and measurement convenience.

Klíčová slova

glukóza

průtoková injekční analýza

pulzní ampérometrická detekce

zlatá elektroda

zlatá mikroelektroda

Keywords

glucose

flow injection analysis

pulsed amperometric detection

gold electrode

gold microelectrode

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odbornou pomoc, věcné připomínky, předané zkušenosti a věnovaný čas. Dále patří mé poděkování celé laboratoři 112 za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za ochotu předávat cenné rady a poznatky. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali a měli značnou trpělivost.

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	5
Klíčová slova	7
Keywords	7
Seznam použitých zkratk a symbolů.....	11
1 Cíl práce.....	13
2 Teoretická část.....	14
2.1 Elektrochemické detektory v proudících kapalinách	14
2.1.1 Ampérometrické detektory v průtokových metodách.....	15
2.1.2.1 Průtoková cela	15
2.2 Pulzní elektrochemická detekce	16
2.2.1 Pulzní ampérometrická detekce (PAD)	16
2.2.1.1 Klasický průběh pulzní ampérometrické detekce (PAD).....	18
2.2.1.2 Čtyřpotenciálový průběh pulzní ampérometrické detekce (Q-PAD)	21
2.2.1.3 Další průběhy PAD	23
2.2.1.4 Mikroelektrody.....	24
2.3 Sacharidy.....	26
2.3.1 D-Glukóza.....	28
2.3.2 Metody stanovení sacharidů	29
3 Experimentální část	34
3.1 Použitá aparatura	34
3.2 Další použité přístroje	34
3.3 Chemikálie	34
3.4 Podmínky měření	35

4	Výsledky a diskuze	37
4.1	Cyklická voltametrie	37
4.2	Modifikace potenciálů klasické PAD.....	38
4.2.1	Konvenční zlatá elektroda.....	39
4.2.2	Zlatá mikroelektroda	43
4.3	Modifikace potenciálů Q-PAD.....	47
4.3.1	Konvenční zlatá elektroda.....	47
4.3.2	Zlatá mikroelektroda	49
4.4	Stabilita výšek píků v čase	52
4.5	Kalibrační závislost	56
4.5.1	Konvenční zlatá elektroda.....	56
4.5.2	Zlatá mikroelektroda	59
5	Závěr.....	63
6	Seznam literatury.....	66

Seznam použitých zkratk a symbolů

APAD	pulzní ampérometrická detekce s přidaným aktivačním pulzem
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
c_{glu}	molární koncentrace glukózy [mol dm^{-3}]
CE	kapilární elektroforéza
CE-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na kationtových iontoměničích
CFA	kontinuální průtoková analýza
CV	cyklická voltametrie/ cyklický voltamogram
DC	přímá (ampérometrie)
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
E	potenciál [V]
ED	elektrochemická detekce
FIA	průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPAEC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na aniontových iontoměničích
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPAD	pulzní ampérometrická
I	elektrický proud [A]
I_p	výška píku [A]
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MS	hmotnostní spektrometrie
n_p	pořadí píku při nástřiku
PAD	pulzní ampérometrická detekce

pH	záporný dekadický logaritmus relativní molární aktivity oxoniových iontů
Q-PAD	pulzní ampérometrická detekce se čtyřmi pulzy
RPAD	reverzní pulzní ampérometrická detekce
rpm	otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SFE	superkritická fluidní extrakce
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny pevnou fází
SPE	extrakce na pevnou fázi
<i>t</i>	čas [s]
TOF	analyzátor doby letu
UV	ultrafialová

1 Cíl práce

Tato bakalářská práce se věnuje spojení injekční průtokové analýzy s pulzní ampérometrickou detekcí (PAD), tedy metodou, při které je na pracovní elektrodu vkládán sled tří či čtyř potenciálových pulzů. Souhrnné cíle, ke kterým předložená bakalářská práce směřuje jsou víceméně dva. Prvním z nich je ověřit, jak moc během pulzní ampérometrické detekce sacharidů záleží na změně parametrů jednotlivých pulzů. To lze shrnout jako posouzení robustnosti metody. S využitím těchto zjištění pak nalézt vhodnou kombinaci potenciálů dílčích pulzů, jejichž vkládáním na pracovní elektrodu je odezva detektoru na analyt přítomný v roztoku stabilní.

Druhým cílem práce je diskutovat a podložit, zda přináší výhody provádět měření se zlatou pracovní elektrodou konvenční velikosti či se zlatou pracovní mikroelektrodou.

2 Teoretická část

2.1 Elektrochemické detektory v proudících kapalinách

Metody chemické analýzy založené na elektrochemických procesech ve studovaných látkách obsadily jedny z předních příček ve směru využitelnosti a pojí se s nimi řada výhod. Vděčí tomu dobře prostudované teorii a možnosti modernizace za využití mikroprocesorů a počítačových technik [1]. Senzory plynů založené na ampérometrii, například Clarkovo čidlo ke stanovení kyslíku, jsou důkazem vhodnosti elektrochemie pro rutinní analýzy [2]. Vedle širokého lineárního dynamického rozsahu a vysoké přesnosti je velkou předností elektrochemie její selektivita, vzhledem k tomu, že analyty vhodné pro stanovení musí být elektroaktivní, tedy být schopné se oxidovat či redukovat [3]. Relativně velká citlivost voltametrických a ampérometrických metod závisí mimo jiné na zvoleném potenciálovém programu, typu elektrody, jejím materiálu a typu analytu. Prostřednictvím vhodně zvoleného detekčního potenciálu a elektrodového materiálu lze selektivitu dále zvyšovat. Snadná miniaturizace elektrochemických cel a elektrod, a tedy možnost pracovat s malými objemy vzorků, rozšiřuje analytické chemii pole působnosti. [2]

Zapojení elektrochemických detektorů do průtokových metod je krokem k vyšší automatizaci, která v dnešní době představuje klíč k rychlým analýzám [4]. Dle [3] lze pracovní techniky založené na průtokových měření rozdělit na kontinuální průtokovou analýzu (CFA, z angl. *continuous flow analysis*), průtokovou injekční analýzu (FIA, z angl. *flow injection analysis*) a chromatografickou detekci. Autory z [5] bylo toto rozdělení rozšířeno navíc o titraci v průtoku, kontinuální monitoring a kapilární elektroforézu.

Detektorů využívaných v proudících kapalinách je několik typů. Elektrochemické nejsou těmi nejvýznamnějšími, nicméně četné využití stále nacházejí vzhledem k výhodám popsaným výše. Elektrochemický detektor zaznamenává elektrické vlastnosti analytu ve vzorku a nejčastěji se setkáváme s detektory voltametrickými, ampérometrickými a coulometrickými [3, 5].

2.1.1 Ampérometrické detektory v průtokových metodách

Při klasické ampérometrické detekci je zaznamenáván limitní proud za konstantního vkládaného potenciálu, v závislosti na čase. Proto se často setkáváme s pojmem DC ampérometrie (z angl. *direct current*). Vkládaný potenciál je volen v oblasti limitního proudu, kde odezva detektoru závisí na koncentraci analytu a k jeho získání je vhodné zkonstruovat tzv. hydrodynamický voltamogram. Povrch pracovní elektrody je místem redoxní reakce analytu ve studovaném vzorku, která je iniciována vloženým potenciálem a v důsledku toho začíná systémem protékat proud, který je mírou jeho koncentrace analytu ve vzorku. [4]

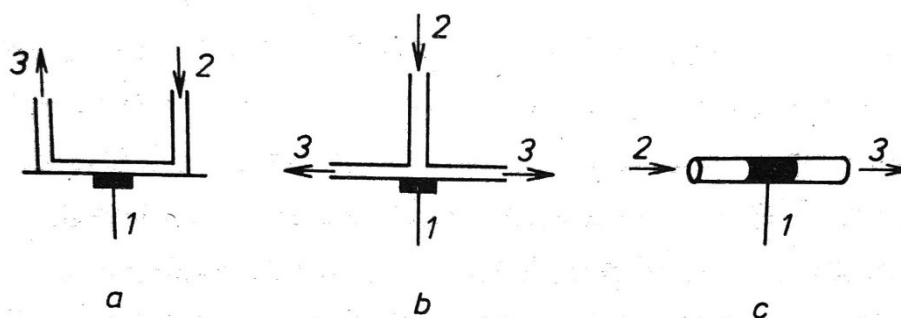
Ampérometrie je úzce spjata s voltametrií s tím rozdílem, že při voltametrii je zaznamenáván elektrický proud v závislosti na vloženém potenciálu, nikoliv na čase. Obě metody umožňují vysokou variabilitu měření. [2]

Díky snadnému ovládní a nízkému šumu mají detektory založené na ampérometrii nejširší pole působnosti v průtokových metodách, kapalinové chromatografii a kapilární elektroforéze [4]. Je-li potřeba dosáhnout vyšší citlivosti, pak jsou využívány techniky nestacionární, zejména pulzní.

2.1.2.1 Průtoková cela

Správná volba průtokové cely, resp. její geometrie a objem, jsou klíčem k co nejcitlivějšímu a nejreprodukovatějšímu měření [3, 6]. Většinou je upřednostňováno tříelektrodové zapojení před dvouelektrodovým [6], zejména v takových celách, kde by se velká část vloženého napětí ztratila na odporu analyzovaného vzorku [7]. Zároveň je vhodné umístit elektrody co nejblíže k sobě, aby byl ohmický spád co nejvíce potlačen. V případě, kdy by mohly produkty elektrodové reakce na pomocné elektrodě interferovat se stanovením na pracovní elektrodě, umísťuje se pomocná elektroda po proudu za pracovní elektrodu, zároveň však také co nejblíže. Čím větší vzdálenost mezi pomocnou a pracovní elektrodou, tím více se prohlubuje nežádoucí nerovnoměrná polarizace pracovní elektrody. Dosáhnout ideálního uspořádání elektrod je velmi obtížné a daří se tomu většinou pouze ve velkých průtokových celách. Ty jsou však pro FIA, CFA a HPLC nepoužitelné, proto je nutné poněkud zmírnit požadavky a zpravidla zanedbat elektrochemická kritéria. [3]

Z geometrického hlediska se setkáváme s několika typy ampérometrických detektorů a jejich použití závisí na požadavcích daného stanovení [3]. Uspořádání typu wall-jet a thin-layer patří k nejčastěji využívaným. Dále je možné se setkat s tubulární měrnou celou.



Obr. 2.1. Uspořádání běžných ampérometrických detektorů v průtoku: (a) tenkovrstvá cela, (b) cela wall-jet, (c) tubulární cela; (1) pracovní elektroda, (2) vstup studované kapaliny, (3) výstup studované kapaliny. Převzato z [3].

2.2 Pulzní elektrochemická detekce

Na principu pulzní elektrochemické detekce pracují takové typy detektorů, na jejichž pracovní elektrodu je vkládán sled několika potenciálových pulzů. Účelem tohoto potenciálového programu je kontinuální obnovování pracovního povrchu elektrody a zlepšení poměru signál/šum a tím pádem snížení meze detekce. Pulzní elektrochemická detekce nachází využití v přímém stanovení mnohých sloučenin (např. aminů či thiolů) s vysokou citlivostí a reprodukovatelností. Je zejména ceněná pro určení analytů, které nejsou stanovitelné UV fotometrickou detekcí, jako jsou alifatické sloučeniny a sacharidy. [8]

2.2.1 Pulzní ampérometrická detekce (PAD)

Pulzní ampérometrie má základ v DC ampérometrii a představuje alternativní detekční techniku pro kvantitativní detekci mnohých organických sloučenin modulací potenciálového programu. [9-10]

Klasická DC ampérometrická detekce s sebou, i přes veškeré výhody, nese značné omezení, které snižuje její reprodukovatelnost. Během elektrodové reakce dochází k depozici meziproductů a nečistot z roztoku na povrchu elektrody, čímž se snižuje až postupně ztrácí její aktivita. Důležitým aspektem v tomto ohledu je volba elektrodového materiálu a struktura analytu [4, 9, 10]. Nejvyužívanějšími materiály pro zhotovení pracovních elektrod jsou zlato a platina jako zástupci ušlechtilých kovů a uhlík společně s jeho modifikacemi. Oproti elektrodám z ušlechtilých kovů jsou pracovní elektrody na bázi uhlíku (skelný uhlík, tištěné uhlíkové elektrody a uhlíková vlákna) méně náchylné k pasivaci a pro organické sloučeniny mají širší využitelné potenciálové okno. [4]

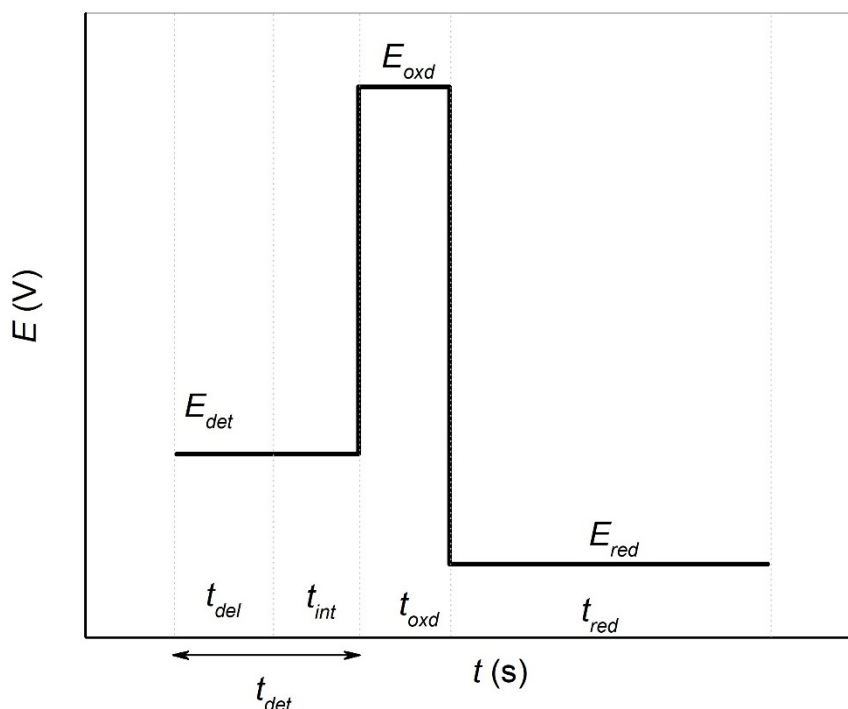
Aromatické sloučeniny, např. fenol, katecholaminy či neurotransmitery, lze na tuhých elektrodách z ušlechtilých kovů relativně lehce detekovat klasickou DC ampérometrií. Intermediáty, které se tvoří během anodické reakce, se stabilizují π -rezonancí a tím pádem poklesne aktivační bariéra pro dokončení oxidace aromatického analytu [9-10]. Nicméně alifatické sloučeniny své intermediáty nemohou stabilizovat π -rezonancí a k dokončení jejich oxidace využívají tzv. elektrokatalytických vlastností ušlechtilých kovů, ze kterých je zhotovena pracovní elektroda. Zlato a platina jsou všeobecně považovány za materiály inertní, avšak u elektroanalytického měření tomu není zcela tak. Jejich nezaplňené d-orbitaly umožňují alifatickým sloučeninám stabilizaci skrze adsorpci na elektrodový povrch, čímž je snížena aktivační bariéra pro oxidaci sloučenin. Stinnou stránkou je pasivace čistého povrchu pracovní elektrody právě v důsledku adsorpce intermediátů oxidace, která vede až k postupné ztrátě elektrochemické aktivity [8-10]. Absence π -vazeb alifatických sloučenin je také jedním z důvodů, proč tyto sloučeniny neposkytují dostatečně velké odezvy při vyhodnocení UV fotometrickou detekcí [9]. Nejčastěji uváděným příkladem těchto alifatických sloučenin jsou sacharidy či polyalkoholy [8-12]. Všechny analyty obsahující ve své struktuře alkoholovou hydroxyskupinu jsou na zlaté elektrodě detekovány v alkalickém prostředí, na platinové elektrodě v kyselém prostředí. [8]

To, co dělá z PAD vhodnou detekční techniku zejména pro alifatické organické sloučeniny je potenciálový program modifikovaný sledem opakované sekvence potenciálových pulzů, díky kterým je zajištěno kromě ampérometrické detekce také

potenciostatické čištění elektrody následované reaktivací elektrodového povrchu před každým měřícím cyklem. [4]

2.2.1.1 Klasický průběh pulzní ampérometrické detekce (PAD)

Nejjednodušší průběh PAD se skládá ze tří různých potenciálových kroků, jak je ukázáno na Obr. 2.3:



Obr. 2.2. Potenciálový program PAD. Převzato z [14] a upraveno. E_{det} - detekční potenciál pro daný analyt, E_{oxd} - oxidační potenciál vkládaný po dobu t_{oxd} a E_{red} - redukční potenciál vkládaný po dobu t_{red} . t_{det} je čas, o který se zpozdí záznam faradayického proudu po dobu t_{int} . Jejich význam je vysvětlen dále v textu.

E_{det} je na elektrodu aplikován po dobu t_{det} . Faradayický proud protékající systémem v důsledku oxidace analytu ve vzorku je zaznamenáván po dobu t_{int} , které předchází t_{det} . Během t_{det} je zajištěno ustálení kapacitního proudu pro nabití elektrické dvojvrstvy k rovnovážné hodnotě. S délkou integrační periody roste poměr signál/šum, na druhou stranu příliš dlouhé t_{int} snižují rychlost sběru dat, což má negativní dopad na reprodukovatelnost výsledků. Totéž platí pro t_{det} . [10, 12, 14]. Následuje oxidativní

desorpce intermediátů od povrchu elektrody zvýšením vkládaného potenciálu na E_{oxd} po dobu t_{oxd} . Tento proces je podporován anodickým přenosem kyslíku z molekuly vody za současné tvorby nestálých hydroxylových radikálů, jako meziproduktů v tvorbě povrchového oxidu na pracovní elektrodě. [8, 10] Proces tvorby hydroxyradikálů ukazuje rovnice 2.1 [10]:



Utváření adsorbovaných hydroxylových radikálů je reverzibilní proces a dochází k rychlému přecházení mezi jednotlivými radikálovými formami. [10] Ukazuje jej rovnice 2.2:



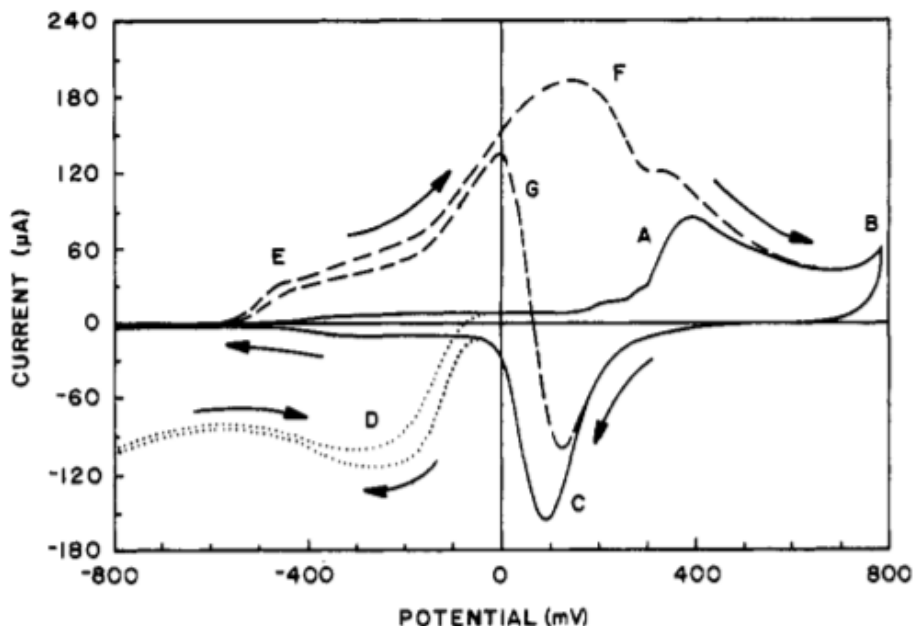
Konečná tvorba povrchového oxidu je ukázána rovnicí 2.3. a je procesem v důsledku kterého se elektroda pasivuje a stává se tedy neaktivní k další detekci organických alifatických analytů.



S cílem obnovit původní aktivitu elektrody je celý cyklus ukončen katodickým rozpuštěním povrchových oxidů vložení redukčního potenciálu E_{red} po dobu t_{red} . Tak je zajištěna elektroda, jejíž povrch by měl být zcela zbaven jak adsorbovaných interferentů, tak povrchových oxidů. [8-12]

Optimalizace průběhu PAD v sobě zahrnuje zohlednění jak hodnot vkládaných potenciálů, tak časových period, po které je třeba daný potenciál na elektrodu vkládat [12]. Zpravidla se vychází ze závislosti i vs. E (prošlý proud na vloženém potenciálu) získané proměřením cyklické voltametrie (CV) studovaného vzorku. Cyklický voltamogram roztoku glukózy, ze kterého lze dále určit, při jakých hodnotách potenciálů dochází na zlaté elektrodě k jednotlivým pochodům, a tak určit přibližné potenciály E_{det} , E_{oxd} a E_{red} , je ukázán na obr. 2.4. Oxidace aldehydové skupiny (**vlna E**), oxidace aldehydové i alkoholové skupiny (**vlna F**), tvorba povrchového oxidu (**vlna A**),

oxidace vody na molekulární kyslík (**vlna B**), katodická redukce povrchového oxidu (**vlna C**), rozpouštění O_2 (**vlna D**) a oxidace glukózy (**vlna G**).



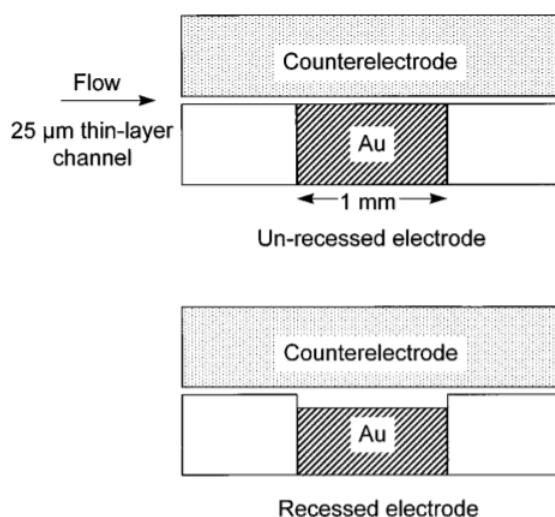
Obr. 2.3. Cyklický voltamogram roztoku glukózy ($c = 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$) v NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) na zlaté rotační diskové elektrodě. Podmínky: rychlost rotace 900 rpm, rychlost měření 200 mV s^{-1} . Roztoky: (····) NaOH s rozpuštěným kyslíkem, (—) NaOH bez rozpuštěného kyslíku a (---) glukóza. Převzato z [12]

Nedostatkem optimalizace užitím cyklické voltametrie je, že je prakticky nepoužitelná pro vyhodnocení a určení vhodných časových údajů. Požadované informace lze získat opakovanými nástřiky při LC-PAD za současného sledování vlivu změny časových period na změny výšek píků, dnes se však upřednostňuje čerpat z již publikovaných průběhů [12].

Další optimalizační metodou je pulzní voltametrie, při které je aplikován průběh PAD na elektrodou, která je pod hydrodynamickou kontrolou, nejčastěji na rotační diskovou elektrodu. S cílem proměřit vhodné rozmezí potenciálů a period se každý měřicí cyklus změni nastavená hodnota parametrů o malý přírůstek. Pulzní voltametrie je metodou, která je považována za definitivní při optimalizaci parametrů potřebných k PAD. [8, 10, 12]

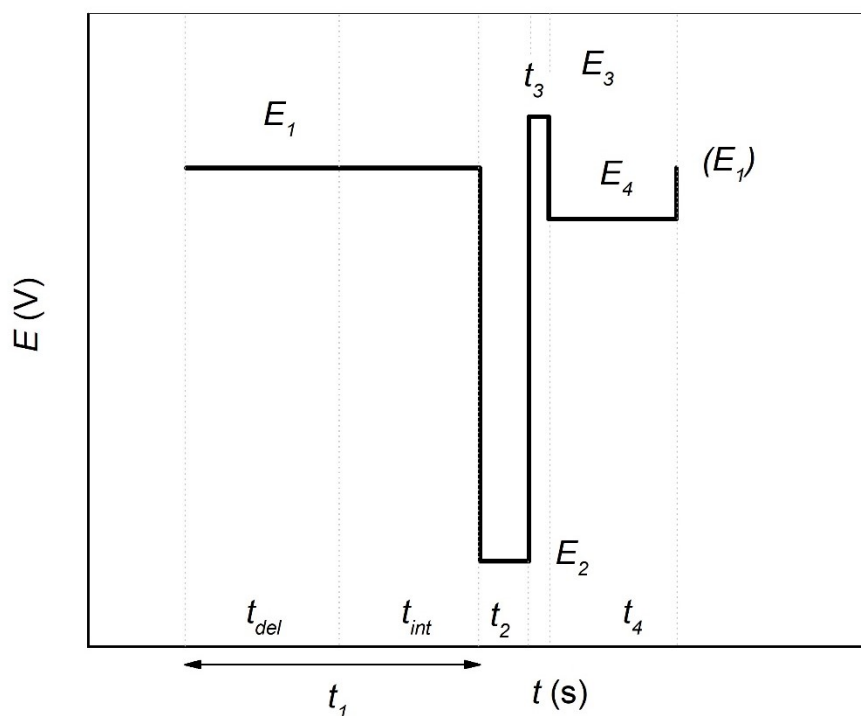
2.2.1.2 Čtyřpotenciálový průběh pulzní ampérometrické detekce (Q-PAD)

Pro zlepšení reprodukovatelnosti naměřených dat byl roku 1998 Rocklinem, Clarkem a Weitzhandlerem [13] představen poněkud obohacený průběh PAD v porovnání s původním třípotenciálovým. Prvotní myšlenka byla vyslovena Jensenem a Johnsonem [14], kteří ukázali, že odstranění adsorbovaných produktů oxidace glukózy z povrchu elektrody je efektivnější, dá-li se přednost velmi zápornému čistícímu potenciálu před kladným. Přestože tříkrokový potenciálový průběh vykazuje vyšší citlivost [8], dlouhodobou reprodukovatelnost příliš neposkytuje. Důvodem je postupné rozpouštění zlata z povrchu elektrody jako výsledek opakované tvorby a redukce povrchového oxidu zlata. Tímto procesem dochází k ústupu elektrody a jejímu zapuštění pod její původní úroveň (ukazuje obr. 2.4) což vede k nežádoucímu poklesu odezvy detektoru.



Obr. 2.4. Schematický diagram detekční cely v tenkovrstvém uspořádání (viz pododíl 2.1.1.1.). Obrázek dole ukazuje pokles pracovní elektrody, který vede ke zvětšení objemu mezi ní a pomocnou elektrodou a snížení lineární rychlosti toku kolem pracovní elektrody. Výsledkem je pokles v transportu analytu k povrchu elektrody a pokles elektrodové odezvy. Převzato ze [13].

Průběh Q-PAD (z angl. *quadruple pulsed amperometric detection*) je ukázán na obr. 2.5.:



Obr. 2.5. Potenciálový program Q-PAD; převzato z [13] a upraveno. E_1 odpovídá E_{det} vkládaný po dobu t_1 , E_2 - čistící potenciál vkládaný po dobu t_2 , E_3 - aktivační potenciál vkládaný po dobu t_3 a E_4 odpovídá E_{red} po dobu t_4 . Jejich význam vysvětlen dále v textu.

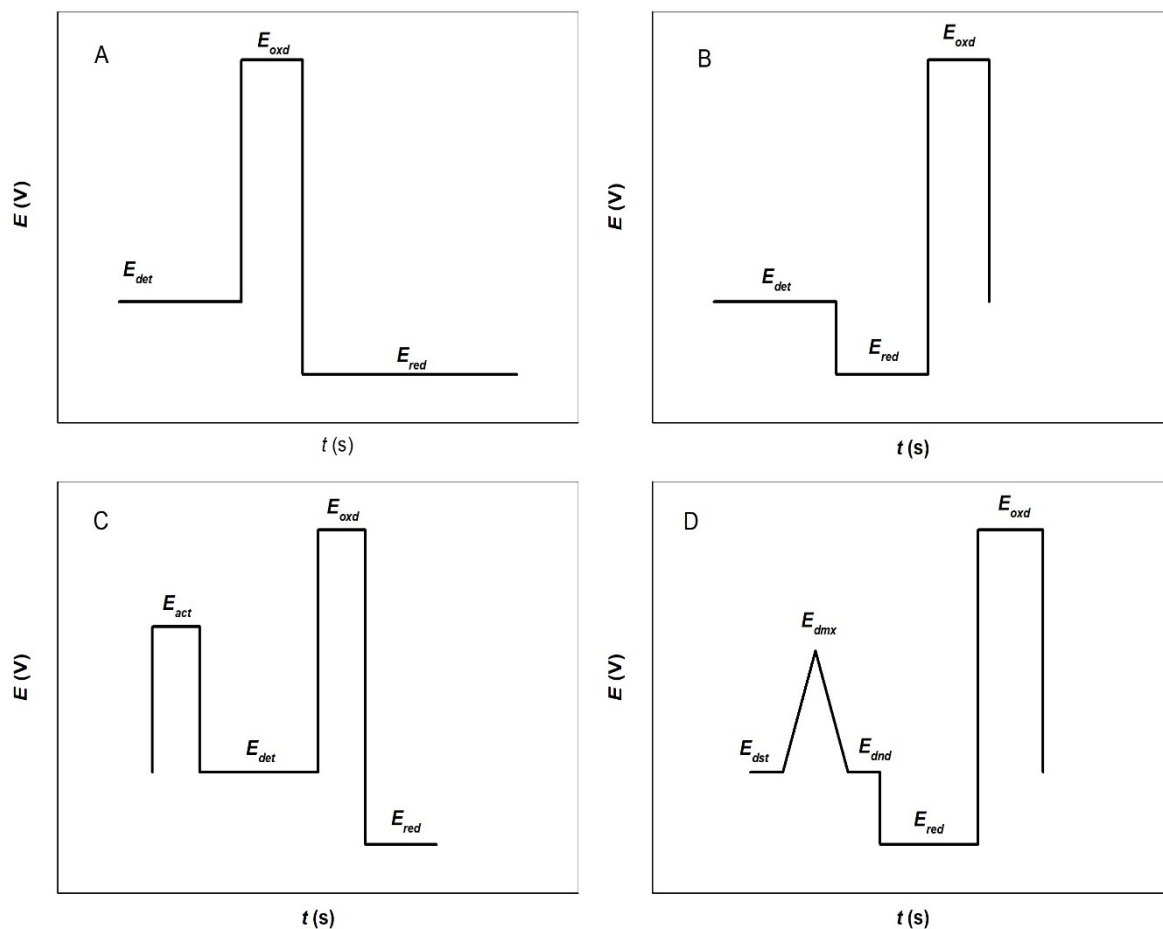
Detekční potenciál E_{det} (na obr. 2.6. odpovídá potenciálu E_1) má stejný význam jako u klasické PAD a je aplikován po dobu t_{det} a pro t_{int} a t_{del} zde platí také stejné zákonitosti vztahující se k optimalizaci jejich délky, jako tomu bylo u klasické třípotenciálové PAD [13]. Čistící potenciál E_2 významem odpovídá E_{oxd} u třípotenciálové PAD, zde je však volen do záporných hodnot. Katodické čištění pravděpodobně probíhá mechanismem vytěsnění adsorbovaných interferujících molekul atomy vodíku uvolněných redukcí vody. Čím negativnější je potenciál E_2 , tím více roste signál odpovídající šumu, protože dochází k oxidaci těchto adsorbovaných atomů vodíku. Aktivační potenciál E_3 je na elektrodu vkládán s cílem zachování aktivity elektrody. Dle [13] je dokázáno, že nejreprodukovatelnější výsledky jsou poskytnuty, jsou-li $E_2 = -2$ V a $t_2 = 10$ ms pro zajištění efektivního čištění elektrody bez nadměrného šumu, $E_3 = +0,6$ V a ihned

$E_4 = -0,1$ V (bez držení potenciálu E_3). Tak by mělo docházet k minimálnímu rozpouštění zlata z povrchu elektrody. Potenciál E_4 má za cíl redukovat případné oxidy vytvořené při vložení potenciálu E_3 . Aby odezva pozadí byla stabilní, není hodnota E_3 zároveň tak negativní, aby byl redukován rozpuštěný kyslík. Proces redukce oxidu je relativně rychlý, proto volba t_{red} není klíčovou záležitostí [8] [13]. Výše uvedené hodnoty potenciálů a period byly zvoleny na základě experimentu z [13] použitím 18 a 100 mol dm⁻³ hydroxidu sodného.

2.2.1.3 Další průběhy PAD

Některé látky, jako například alifatické aminy, aminokyseliny či sirné sloučeniny nejsou na povrch elektrody adsorbovány prostřednictvím elektrokatalytických vlastností ušlechtilého kovu, nýbrž k adsorpci využívají komplexaci s povrchovým oxidem. Tento detekční mód, v literatuře označován také jako „oxidem katalyzovaná oxidace“, však u klasického průběhu PAD (obr. 2.2., str. 14) vede k horším odezvám než u látek adsorbovaných na čistý elektrodový povrch bez oxidů. Důvodem je fakt, že tvorbou povrchového oxidu je nepřetržitě generována proudová odezva, která přispívá k většímu šumu [10]. V návaznosti na zjištění, že použitím nižších potenciálů je zpomalen proces tvorby povrchového oxidu [15], Polta a Johnson [16] předvedli **RPAD** (z angl. *reverse pulsed amperometric detection*), kde zaměnili kroky vložení E_{oxd} a E_{red} , jak je ukázáno na obr. 2.7. (B). Výhodou RPAD je menší šum, zejména pro sirné sloučeniny [16], nicméně oxidativní čištění elektrody není tak efektivní a s tímto průběhem nejsou výsledky příliš reprodukovatelné. Z průběhu **APAD** (z angl. *activated pulsed amperometric detection*), na obr. 2.7. (C) je patrné, že vložení E_{det} předchází nejprve aktivační potenciál E_{act} . Jeho zakomponování vede k efektivnějšímu oxidativnímu čištění elektrody ještě před samotnou detekcí analytu. Účinnost APAD byla demonstrována při stanovení As(III) na platinové elektrodě v kyselém prostředí [17] či stanovení cysteinu na platinové elektrodě [18]. Průběh **IPAD** (z angl. *integrated pulsed amperometric detection*) je zahájen na E_{det} , který zahrnuje cyklický sken. V jeho rostoucím průběhu je formován povrchový oxid, poté hodnota potenciálu klesá zpět na původní hladinu. Průběh IPAD je často aplikován v kombinaci s chromatografií, jelikož lze díky němu potlačit změny v signálu spojené s malými výkyvy pH či složení mobilní

fáze použitím gradientových elucí a lze jím analyzovat také směsi sacharidů s aminokyselinami. [19, 20]



Obr. 2.6. Ukázka alternativních průběhů PAD, převzato z [10] a upraveno: (A) klasická PAD, viz pododдіl 2.2.1.1. (B) RPAD (C) APAD (D) IPAD. Vysvětlení zkratk a náležitostí k jednotlivým průběhům v textu výše.

2.2.1.4 Mikroelektrody

Miniaturizace v oblasti analytické a bioanalytické chemie se zdá být velkým trendem [20]. Se zmenšováním měřítka v těchto systémech se pojí mnoho výhod, které jsou důsledkem zcela odlišného chování oproti systémům konvenční velikosti. [21]

Termínem mikroelektrody označujeme taková zařízení, jejichž rozměry jsou o řád i více menší než rozměry klasických elektrod, které se běžně používají pro

voltametrická či ampérometrická měření. Dostupné publikace se ne vždy shodují vymezením rozměrů mikroelektrod v číslech, nicméně obecně lze říci, že se pohybují v řádech desítek mikrometrů a méně [21-22]. Zapojením mikroelektrod do elektroanalytických detekčních metod se otevírají dveře měření v různých odvětvích vědy, které ke stanovení využívají velmi malé objemy vzorků či omezený prostor [23], např. stanovení neurotransmiterů v mozku. [24]

Detekce v elektroanalytických systémech, tedy také v PAD, je spojena s redoxní reakcí na povrchu elektrody, proto je aplikace mikroelektrod vhodná pro mikroseparační techniky. Jejich vhodnost pro použití v průtokových metodách typu FIA, HPLC a CE, je determinována poskytnutím rychlé odpovědi, která není ovlivněna změnou v rychlosti průtoku. [8, 25]

Vysvětlení odlišného chování mikroelektrod od elektrod konvenční velikosti vychází ze skutečnosti, že jejich rozměr je za aktuálních experimentálních podmínek menší, než je tloušťka difúzní vrstvy. Dochází tak ke změnám v mechanismu transportu hmoty v okolí elektrody, konkrétně k přechodu z lineární difúze na difúzi sférickou. Jedním z projevů sférické difúze je vzestup procházejícího elektrického proudu oproti jeho hodnotě, kdyby procházel planární elektrodou o stejné geometrické ploše za podmínek lineární difúze. Tak se zvyšuje hodnota proudové odezvy a k jejímu ustálení (z angl. *steady-state*, ustálený stav) dochází řádově v mikrosekundách. Klasickým elektrodám může dosáhnoutí tohoto stavu trvat milisekundy i více. [21, 22, 26]

Rychlost, se kterou se hmota pohybuje k a od povrchu elektrody roste s klesajícími rozměry elektrody, a to dovoluje vyhodnotit elektroanalytická měření při velmi nízkých koncentracích analytu ve vzorku [22]. Měření za nízkých elektrických proudů, řádově pA nebo nA, právě v důsledku malých rozměrů mikroelektrody, vede k tomu, že ztráty dané ohmickým spádem jsou minimalizovány, a tak nedochází k většímu zkreslení voltametrických (ampérometrických) vln [26]. Zároveň lze tak měření provádět v málo vodivých prostředích jako jsou roztoky bez základního elektrolytu, organická rozpouštědla či živé tkáně [22, 23, 26]. Relativně snadná realizace měření s nimi je další výhodou mikroelektrod vedle většinou nízkých nákladů na jejich zhotovení [21-22]. V neposlední řadě vyšší citlivost mikroelektrod v porovnání s elektrodami běžných rozměrů. Kapacitní proud, který je limitujícím faktorem mnohých elektrochemických měření a způsobuje šum, je redukován, jelikož jeho velikost je přímo úměrná ploše

elektrody (druhé mocnině poloměru elektrody). Naopak faradayický proud, který odpovídá signálu analytu ve studovaném vzorku, je přímo úměrný poloměru elektrody.

Geometricky variabilní tvary mikroelektrod nachází četné využití a vedle zapojení jedné mikroelektrody se k elektroanalytickému měření též využívají tzv. mikroelektrodová pole (z angl. *microelectrode arrays*), která řeší obtížnosti při měření s individuální mikroelektrodou v důsledku nízkých hodnot procházejícího elektrického proudu [27]. Difúzní vrstvy jednotlivých mikroelektrod v poli se mohou a nemusí překrývat. Z tohoto hlediska rozlišujeme tři hlavní případy, při zvažování difúzního toku směrem k mikroelektrodovému poli. 1) Difúzní vrstvy jednotlivých elektrod se nepřekrývají a celkový prošlý elektrický proud je dán součtem jednotlivých proudů protékajícími skrze individuální elektrody. 2) Difúzní vrstvy dvou sousedních elektrod se překrývají. 3) Dochází k úplnému překryvu difúzních vrstev. Největšího poměru signál/šum s použitím mikroelektrodového pole je dosaženo v případě 3. [21, 27]

Mikroelektrody, i přes řadu značných výhod, trpí poměrně malou mechanickou odolností. Nicméně je snahou co nejvíce křehkost eliminovat či kompenzovat. [26]

Využití mikroelektrod a mikroelektrodových polí vychází z jejich výše popsaných vlastností. Studium mechanismů elektrochemických reakcí je jednou z možných aplikací. Nízký odpor na mikroelektrodách a nižší kapacita vycházející z nepatrných rozměrů umožňují aplikovat na ně voltametrické techniky s rychlými potenciálovými skeny (až cca 10^6 V s^{-1}) v různých prostředích zahrnujících ta s nízkou relativní permitivitou či vzorky bez základního elektrolytu, jak bylo popsáno výše. Další využití mikroelektrody nachází ve stopové elektrochemické analýze, kde je s výhodou využíváno vysoké hodnoty poměru signál analytu/šum, což vede ke snížení limitu detekce (LOD) [21]. V neposlední řadě nachází mikroelektrody široké využití ve sledování biologických objektů *in vivo*, skenovací elektrochemické mikroskopii a vyskytují se také jako součásti čipových mikroanalytických přístrojů (z angl. *lab-on-chip*). [21, 26]

2.3 Sacharidy

Souhrnným pojmem sacharidy jsou označovány polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, jejichž základní řetězec je tvořen minimálně třemi alifaticky

vázanými atomy uhlíku [28]. K sacharidům řadíme také jejich deriváty (glykosidy, deoxycukry, aldonové kyseliny a alduronové kyseliny), které vznikají oxidačními, redukčními a jinými reakcemi, a cyklitoly.

Základními jednotkami a také nejjednoduššími sacharidy jsou monosacharidy. Nelze je dále štěpit kyselou hydrolyzou na nižší podjednotky. Monosacharidy dělíme dle počtu uhlíků v řetězci na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy atd. Vzájemnou kondenzací monosacharidů a jejich propojením acetalovou (glykosidovou) vazbou vznikají složené sacharidy – di-, oligo- a polysacharidy.

Přítomnost aldehydické skupiny ve struktuře zařazuje daný monosacharid mezi aldosity, zatímco ketosy mají keto skupinu. Mezi významné aldosity řadíme D-glukózu, D-ribosu či D-mannosu a mezi biologicky významné ketosy D-fruktosu.

Označením D- a L- náleží daný monosacharid ke konfigurační řadě, která je určována podle shody konfigurace na chirálním atomu uhlíku, který má nejvyšší pořadové číslo v řetězci, s konfigurací chirálního atomu uhlíku D- či L-glyceraldehydu. D- a L-sacharidy jsou si navzájem tzv. enantiomery. [29]

Tetrosy, pentosy, hexosy a vyšší monosacharidy existují v roztocích převážně v cyklických strukturách. K cyklizaci dochází spontánní intramolekulární adicí jedné z hydroxylových skupin na skupinu karbonylovou. Vznikají tak hemiacetaly a hemiketaly, které jsou znázorňovány tzv. Haworthovými projekčními vzorci. Na tzv. anomerním uhlíku tak vzniká nové chirální centrum a konfigurací na tomto uhlíku rozlišujeme diastereoizomery sacharidů na α -anomer a β -anomer.

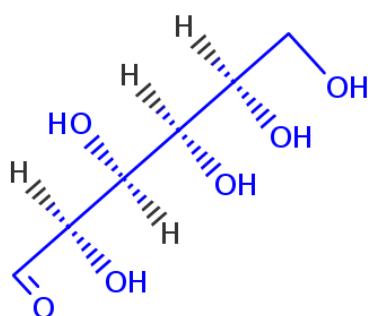
Některé sacharidy řadíme k tzv. redukujícím. Příslušnost k této skupině sacharidů je podmíněna přítomností volné keto-, či aldehydické skupiny, která dává molekule redukční účinky. Řadíme sem veškeré monosacharidy, společně s některými složenými sacharidy. Aldosity mají volně přístupnou oxidovatelnou aldehydickou skupinu, ketosy nejprve musí tautomerizovat na aldosity, aby se mohly chovat v reakcích jako redukční činidla. V případě disacharidů záleží na typu propojení dvou monosacharidů. Například laktóza či maltóza jsou redukující, protože vznikají propojením dvou monosacharidů přes jiný než poloacetalový hydroxyl. Naproti tomu sacharóza redukující není, protože při její syntéze reaguje poloacetalový hydroxyl jednoho monosacharidu s poloacetalovým hydroxylem druhého [28, 29].

Redukující sacharidy reagují s Fehlingovým činidlem (vodný roztok pentahydrátu síranu měďnatého v alkalickém roztoku vinanu sodno-draselného) za vzniku příslušné aldonové kyseliny. Měďnaté ionty jsou redukovány na červenou sraženinu oxidu měďného. Při reakci s Tollensovým činidlem dochází k vyredukování kovového stříbra z alkalicko-amoniakálního roztoku hydroxidu stříbrného.

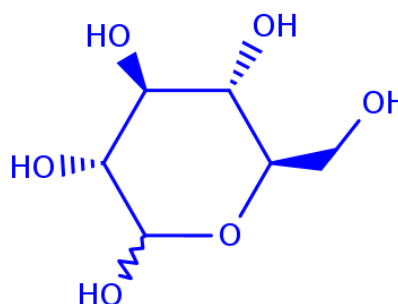
2.3.1 D-Glukóza

Strukturní vzorec:

Obr. 2.7. Fischerův vzorec [30]



Obr. 2.8. Haworthův [31]



Sumární vzorec: $C_6H_{12}O_6$

Systematický název: (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanal

CAS číslo: 2280-44-6

Molekulová hmotnost: $180,158 \text{ g mol}^{-1}$

Vnější vzhled: bílý prášek

D-glukóza je aldohexosa. Je primárním zdrojem energie obratlovců a zároveň jedním z produktů fotosyntézy, kterou si sacharidy syntetizují zelené rostliny. Je stavební složkou mnoha složených sacharidů, např. sacharosy, laktosy, inulinu či škrobu [29, 32].

Glukózu řadíme mezi osm esenciálních monosacharidů společně s L-fukosou, D-galaktosou, D-mannosou a dalšími, které jsou nezbytné pro správné fungování lidského organismu. [29]

2.3.2 Metody stanovení sacharidů

Sacharidy jsou nedílnou součástí živé přírody a nabývají v ní mnoho funkcí. Rostlinám a živočichům slouží jako zdroj energie a uhlíku, jsou jednou z hlavních makrosložek výživy a jejich polymerní zástupci jako jsou škrob, pektin a celulóza slouží jako hojně využívaná aditiva v potravinářském průmyslu. Sacharidy nacházíme ve stěnách rostlinných buněk a jsou jednou z komponent extracelulární matrix tkání živočichů kde zastupují strukturní funkci. Tvoří kostru DNA a jako složky glykoproteinů a glykolipidů se podílejí na mnoha biologických procesech. S rostoucím uvědoměním si jejich nepostradatelnosti roste též zájem o dostupnost vhodných (bio)analytických technik pro jejich studium. Nicméně, jejich vývoj je ztížen mnohými vlastnostmi, které se se sacharidy a glykokonjugáty pojí. Obrovské množství možných izomerických forem, kterých mohou sacharidy nabývat spojené s α - a β - konfigurací glykosidických vazeb či odlišným větvením, přispívá k následným komplikacím při jejich analýze. Vysoká polarita společně s jejich netěkavostí jsou dalšími obtížemi vedle nedostatku náboje u většiny sacharidů a nepřítomnosti fluoroforů či chromoforů, což téměř znemožňuje jejich přímou UV spektrofotometrickou a fluorescenční detekci. [33-36]

Kolorimetrické reakce sacharidů jsou známy již značnou dobu. Příkladem je reakce mono-, oligo-, polysacharidů a jejich derivátů s fenolem a kyselinou sírovou za vzniku stabilního žluto-oranžového zbarvení [37]. Pro následnou separaci a kvantitativní vyhodnocení pak lze využít papírovou chromatografii či UV fotometrickou detekci [37-38]. Pro důkaz redukujících sacharidů slouží Fehlingův test (viz pododíl 2.3.2.) či Benediktův test.

Postup času dal za vývoj různým dalším high- a low-cost technikám, díky kterým lze stanovit sacharidy specificky. Separální metody sloužící například k oddělení podjednotek složených sacharidů [33], kam spadají mimo jiné různé typy chromatografií a kapilární elektroforéza (CE), mohou být následovány hmotnostní (MS, z angl. *mass-spectrometry*) detekcí, nukleární magnetickou rezonancí a v neposlední řadě elektrochemickou detekcí. [33-36, 38]

Jelikož se sacharidy vyskytují v různých maticích, v nichž mohou při jejich analýze interferovat jiné látky, zejména proteiny a lipidy v potravinových vzorcích, je na místě předřadit samotnému separačnímu kroku krok(y) izolační. Většinou se k tomuto účelu

používá různých typů extrakcí (SLE, SFE, LLE, DLLME, SPE), k uvolnění monosacharidů ze složených sacharidů pak hydrolyza. [36]

V dalším kroku v postupu charakterizace se můžeme setkat s pre-, či post-kolonovou derivatizací analytu ve vzorku. Zařazení tohoto mezikroku není nutné pro každý typ detekce, pouze je-li odpověď detektoru na daný sacharid či glykokonjugát malá až žádná. Reakcí s derivatizačním činidlem je daná látka převedena na derivát, jehož struktura a vlastnosti vyhovují zvolené detekční technice, čímž je poskytnuta dostatečně velká odezva. Typicky je prováděna před UV fotodetekcí sacharidů pro zavedení vhodného záření absorbujícího substituentu do jejich struktury. Jedním z možných a také nejčastějších mechanismů derivatizace je reduktivní aminace, jejímž příkladem je použití nabitého fluoroforu 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonátu a následná detekce laserem indukovanou fluorescencí [33, 34]. Reduktivní aminace může také předcházet UV detekci [34]. Derivatizaci lze též provést kondenzací sacharidů s 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem [41].

Plynová chromatografie (GC) je efektivní technikou pro analýzu sacharidů, nicméně se neobejde bez předběžné derivatizace pro zajištění dostatečné těkavosti a teplotní stability. Nejběžnější derivatizační technikou pro GC analýzu je trimethylsilace a pro její provedení známe různá činidla, např. hexamethyldisilazan [36]. Jako detekční techniky po separaci je využíván plamenově-ionizační detektor, UV spektroskopie ve vakuu a hmotnostní spektrometrie [36, 39].

Daleko více se v analýze sacharidů setkáváme s kapalinovou chromatografií (LC), respektive s HPLC. Výhodou je její rychlost, spolehlivost, preciznost a možnost využití pro širokou škálu koncentrací analytu ve vzorku. Komerční dostupnost mnoha běžných fází umožňuje LC techniku nadimenzovat tak, aby byla co nejvhodnější pro separaci cílených analytů s ohledem na matrici, ve které se nachází. Zároveň volba LC systému závisí na požadovaném stupni separace, koncentraci analytu ve vzorku a složitosti matrice [35].

Nativní sacharidy, tedy bez derivatizační značky či chránící skupiny, jsou velmi polární sloučeniny, a proto je pro jejich separaci vhodné použít LC na normálních fázích [40]. Nevýhodou tohoto uspořádání je nízká rozpustnost sacharidů v dané mobilní fázi. To lze vyřešit použitím aprotického rozpouštědla, zpravidla acetonitrilu, s malým přídatkem vody jako mobilní fáze. Taková technika je pak známá pod

zkratkou HILIC (z angl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*), jejíž mechanismus není zatím zcela objasněn, nicméně při separaci hrají roli elektrostatické interakce a adsorpce. V porovnání s ostatními LC technikami vykazuje HILIC vysokou selektivitu a též lepší kompatibilitu s hmotnostní detekcí.

Velmi efektivní metodou k analýze sacharidů a zároveň nejpoužívanější HPLC technikou pro onen účel je kapalinová chromatografie na měničích aniontů (HPAEC, z angl. *high performance anion exchange chromatography*). Disociační konstanta sacharidů zpravidla leží mezi hodnotami 12 a 14, což jim udává slabě kyselé vlastnosti. Důsledkem toho se v roztocích o vysokém pH ionizují některé hydroxylové skupiny v jejich struktuře a tím je umožněna následná separace na kolonách, jejichž stacionární fáze jsou tvořeny měniči aniontů [35, 38]. Nutnost použití silně alkalické mobilní fáze s sebou přináší též katalýzu mutarotace redukujících cukrů, což má za následek společnou eluci α i β anomerů příslušného monosacharidu [35]. Zpravidla využívanou detekcí HPAEC je pulzní ampérometrická detekce. Pomocí HPAEC-PAD jsou nejčastěji separovány N-vázané glykoproteiny, ale též aldopentózy a aldohexózy. V komplexních vzorcích polysacharidů je nutné chromatografickou separaci opakovat, což je základem multidimenzionálních chromatografií [40]. Jakožto hlavní technika pro analýzu sacharidů je HPAEC-PAD často využívána již k jejich rutinní analýze v potravinových vzorcích. Nevýhodami této metody je nestabilita základní linie, ztráta citlivosti v důsledku značného šumu a nutnosti pracovat při vysokých hodnotách pH a ve vysokých koncentracích solí [42]. Úskalí spojená s UV detekcí sacharidů již byla zmíněna, nicméně i přes nepřítomnost chromoforů ve struktuře sacharidů lze HPAEC spojit též s UV fotodetekcí bez předchozího začlenění vhodného absorbujícího substituentu do struktury derivatizací. V silně alkalickém prostředí probíhá během detekčního okna fotochemická reakce, která převádí sacharidy na malonenolátové sloučeniny, které absorbují při 266 nm. [40]

Kapalinová chromatografie na katexech (CE-HPLC) je též možná a s ní spojený detekční systém obvykle představuje refraktometrický detektor [35]. Stacionární fázi, tedy silný katex, tvoří imobilizované pomocné kationty, zpravidla ionty vápenaté na pryskyřicích. Vzorek je rozpuštěn ve vápenaté soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, která plní funkci mobilní fáze. Výsledné komplexy vápenatých iontů s monosacharidy se pak liší konstantou stability a eluující cukry vykazují různé retenční časy. Vylučovací

efekt je ovlivněn stupněm zesíťování divinylnbenzenu v polystyrenu formujícího kationtový iontoměnič. Výhodou refraktometrického detektorumje široký dynamický rozsah a jednoduchost, na druhou stranu není tento typ detektoru kompatibilní s gradientovou elucí a má dlouhou periodu pro ustálení základní linie během změn mobilní fáze.

Zapojení hmotnostní spektrometrie do detekce sacharidů se pomalu dostává do popředí zájmů, nicméně se nejedná o rutinní záležitost [36, 38]. Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí vykazuje vysokou rychlost separace, značnou citlivost a využívá malé vstřikované objemy. Jako iontový zdroj zde slouží povětšinou elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku a maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) [36]. Obecně lze říci, že účinnost ionizace sacharidů je nízká, proto často bývají spektra složitá. Pro zjednodušení a zvýšení citlivosti k detektoru jsou obvykle sacharidy, resp. jejich redukuující konce, před samotnou hmotnostní analýzou derivatizovány substituentem s vysokou afinitou k protonům. Elektrosprej jako iontový zdroj se vyznačuje vysokou citlivostí pro sacharidy, nicméně nelze jej využít pro analýzu komplexnějších polysacharidů [43]. Ionizační metodou MALDI vznikají většinou jednou nabitě ionty, což zjednodušuje hmotnostní spektrum. Je preferovaná pro svou vysokou citlivost pro sacharidy a také toleranci k přítomnosti možných kontaminantů v maticí. Zároveň je vhodná volba matrice klíčovým faktorem pro další zvyšování citlivosti. [36]

Samotných hmotnostních analyzátorů jako míst, kde probíhá seřazení vygenerovaných iontů dle poměru m/z je též využíváno několik typů a neexistuje jeden univerzální pro analýzu sacharidů [36]. Kvadrupólový analyzátor je poměrně jednoduchý a robustní, a je-li trojitý, vyznačuje se vyšší citlivostí, selektivitou, specifitou a širokým lineárním dynamickým rozsahem. Vyžaduje-li hmotnostní analýza vysoké rozlišení, pak je vhodnou volbou TOF analyzátor (z angl. *time of flight*), jehož výhodami je velká přesnost, rychlost měření, citlivost a lze jím dosáhnout nízkých LOD a limitů kvantifikace (LOQ).

Další detektory, které lze ve spojení s LC použít pro analýzu sacharidů je např. odpařovací detektor rozptylu světla jako nadějná alternativa k UV či refraktometrické detekci, ke které není potřeba předběžná derivatizace analytu, nabízí vysokou citlivost a jednoduchou přípravu vzorku [42]. Je kompatibilní s gradientovou

elucí a odolný vůči nestabilitě základní linie [36, 42]. Fluorescenční detektor vyžaduje předběžnou derivatizaci, jelikož sacharidy postrádají fluorescenční skupiny. Lze jí dosáhnout poměrně vysoké citlivosti v porovnání např. s UV detekcí.

Separace CE a následná detekce je též aplikovatelná jak pro sacharidy derivatizované, tak pro jejich nativní formy. Přímá UV-detekce je nejuniverzálnější detekční metodou ve spojení s CE a pro nederivatizované formy je aplikovatelná na kyselé disacharidy uvolněné z glykosaminoglykanů při 232 nm nebo po komplexaci sacharidů s borátem přítomným v koloně při 195 nm. Kapilární elektroforéza je komplementární technikou k HPLC a detektory pro derivatizované sacharidy jsou obdobné pro ni uvedeným, jako je UV-detekce po reduktivní aminaci či po kondenzaci s 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem, dále pak fluorescenční detekce. [34]

3 Experimentální část

3.1 Použitá aparatura

Jednoduchá aparatura pro ampérometrické měření metodou FIA se skládala ze stříkačkové pumpy (SyringePump NO. NE-510L, U.S.A.) pro vytvoření nosného proudu borátového pufru vedoucí skrze šesticečný ventil s dávkovací smyčkou o objemu 100 μl . Jako detektor byl použit Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Nizozemsko) s nastaveným modulem pro měření nízkých hodnot proudů. Detektor byl řízen softwarem NOVA (verze 2.1), který pracoval v tříelektrodovém zapojení v uspořádání wall-jet. Konvenční zlatá elektroda (průměr 3 mm, Metrohm) a zlatá mikroelektroda (průměr 100 μm , Metrohm) sloužily jako pracovní elektrody. Referenční elektrodu tvořila argentchloridová (koncentrace vnitřního elektrolytu 3 mol dm^{-3} , Metrohm) a pomocnou elektrodu platinová (Metrohm). Detekční cela s elektrodami byla umístěna ve Faradayově kleci.

Proměření cyklických voltamogramů bylo provedeno ve vsádkovém uspořádání. Detektor, použité elektrody, umístění detekční cely s elektrodami ve Faradayově kleci a přítomnost borátového pufru jako slepého roztoku byly obdobné podmínky těm použitým v ampérometrickém měření.

3.2 Další použité přístroje

pH metr (digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510; Jenway, UK)
Magnetická míchačka (Microstirrer Magnetic Stirrer, VELP Scientifica, Europe)

3.3 Chemikálie

Zásobní roztok glukózy (Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} byl připraven kvantitativním převedením přesné navážky látky do odměrné baňky. Ta byla následně doplněna po rysku borátovým pufrem. Pro měření byla dále použita koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , které byly připraveny ředěním zásobního roztoku glukózy.

Borátový pufr byl připraven z kyseliny borité (min 99,5 %, Chemapol, Praha) o koncentraci 0,1 mol dm^{-3} a hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytica, Německo) o koncentraci 1 mol dm^{-3} . Pro přípravu kyseliny borité byla její přesná navážka

kvantitativně převedena do odměrné baňky. Ta byla destilovanou vodou (Millipore, USA) doplněna po rysku a navážka kyseliny byla rozpuštěna pro dosažení požadované koncentrace. Hydroxid sodný o koncentraci 8 mol dm^{-3} byl zředěn destilovanou vodou na výslednou koncentraci 1 mol dm^{-3} . Požadovaného $\text{pH} = 10$ pufru bylo dosaženo přidávkem hydroxidu sodného do roztoku kyseliny borité za stálého míchání na magnetické míchače a kontroly pH metrem.

3.4 Podmínky měření

Voltametrická měření byla provedena s roztokem glukózy o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ s rychlostí měření 1 V s^{-1} . Počáteční potenciál byl nastaven na $-0,8 \text{ V}$ a konečný na $+1,1 \text{ V}$. V průběhu měření byla Faradayova klec s celou a elektrodami uzavřena.

Pro optimalizaci pulzních programů byl použit zásobní roztok glukózy s koncentrací $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Borátový pufr o $\text{pH} = 10$ sloužil jako nosný roztok a byl pumpován stříkačkovou pumpou s rychlostí průtoku 1 ml min^{-1} . Při ampérometrickém měření byla Faradayova klec z důvodu průtokového uspořádání s nutností manuálních nástřiků otevřena.

Volba výchozích hodnot potenciálů pro klasickou PAD se třemi vloženými pulzy měl základ v proměřených cyklických voltamogramech. Délky trvání jednotlivých pulzů byly převzaty z literatury [12]. Výchozí detekční potenciál E_1 měl velikost $+0,3 \text{ V}$ s délkou trvání 400 ms , oxidační E_2 byl nastaven na $+1 \text{ V}$ a jeho perioda t_2 trvala 200 ms a konečný redukční potenciál $E_3 = 0 \text{ V}$ s periodou $t_3 = 400 \text{ ms}$. Během optimalizace byly jednotlivé potenciály pulzů upravovány (směrem k vyšším i nižším hodnotám) a byla sledována závislost výšky píku na změně velikosti daného potenciálu.

Základní nastavení Q-PAD vycházelo z literatury [13] a taktéž z proměřených voltamogramů. Hodnoty potenciálů E_2 (čisticí) a E_3 (aktivační) zůstávaly neměnné, nicméně s hodnotami detekčního a redukčního potenciálu bylo manipulováno podobně jako v případě klasické PAD. Výchozí podmínky byly nastaveny pro detekční potenciál $E_1 +0,3 \text{ V}$ s trváním 400 ms , čisticí potenciál $E_2 -2 \text{ V}$ a trvání 20 ms , aktivační potenciál $E_3 +0,6 \text{ V}$ s periodou 10 ms a konečný redukční potenciál E_4 měl hodnotu 0 V s periodou $t_4 = 70 \text{ ms}$.

Všechna měření byla provedena se zlatou konvenční elektrodou a potažmo se zlatou mikroelektrodou jakožto s pracovními elektrodami. Pro obě uvedené elektrody byla zvolena taková kombinace dílčích potenciálů pro klasickou PAD i Q-PAD tak, aby výška píků v její závislosti na čase byla co nejstabilnější. Pro tento sled byla proměřena kalibrační závislost metodou nejmenších čtverců. Povrch obou elektrod byl před každým novým měřením leštěn na alumině. Limity detekce a kvantifikace pro obě zlaté pracovní elektrody obou pulzních metod byly počítány dle vztahů:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad \text{rov. 3.1}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad \text{rov. 3.2}$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační přímky.

4 Výsledky a diskuze

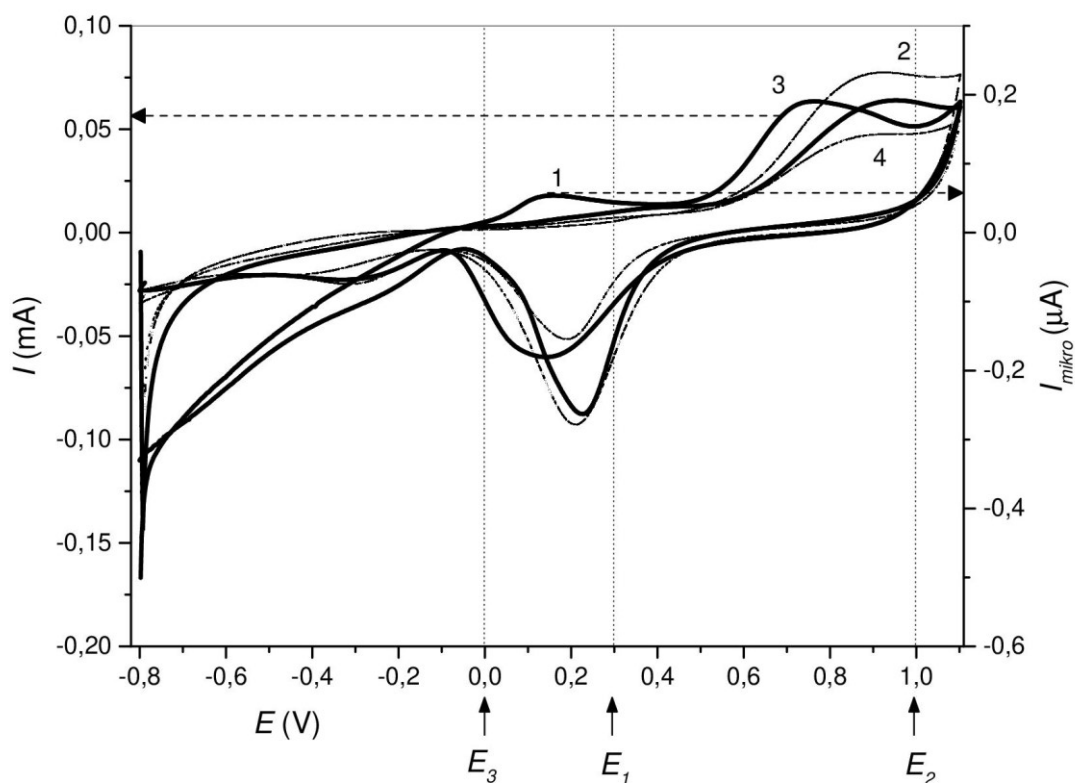
4.1 Cyklická voltametrie

Pro optimalizaci pulzních programů, resp. velikosti jednotlivých potenciálových pulzů, bylo nezbytné získat alespoň odhad výchozích hodnot potenciálů E_1 , E_2 , E_3 , popř. E_4 , okolo kterých by se hodnoty optimální měly pohybovat. Pro tento účel byla zvolena metoda proměření cyklických voltamogramů daného studovaného roztoku glukózy.

Uspořádání cyklické voltametrie bylo vsádkové a jako pracovní byly postupně zapojeny konvenční zlatá elektroda a zlatá mikroelektroda. Byl proměřen roztok glukózy s koncentrací $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} v borátovém pufru o $\text{pH} = 10$. Rychlost měření byla nastavena na hodnotu 1 V s^{-1} , hodnota počátečního potenciálu $-0,8 \text{ V}$ a konečného potenciálu $+1,1 \text{ V}$.

Znatelný pík viditelný na obr. 4.1 – cyklický voltamogram 1 odpovídající signálu oxidace glukózy byl patrný pouze na mikroelektrodě ve vsádkovém uspořádání s rychlostí měření 1 V s^{-1} v kombinaci s koncentrací glukózy v roztoku $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} . Hodnoty potenciálů výchozích pulzů pro klasickou třípotenciálovou PAD byly z voltamogramu odečteny a jsou vyznačeny přerušovanými svislými čarami a popsány pod osou y grafu. Hodnota výchozího detekčního potenciálu (E_1) byla zvolena $+0,3 \text{ V}$, tedy v oblasti mezi nárůstem proudu v důsledku oxidace glukózy a nárůstem proudu v důsledku tvorby povrchového oxidu. Pro oxidační potenciál (E_2) byla zvolena hodnota $+1 \text{ V}$ a jako redukční potenciál (E_3) 0 V .

Pro Q-PAD byla zvolena totožná hodnota detekčního potenciálu (E_1), tedy $+0,3 \text{ V}$ a hodnota konečného redukčního potenciálu (E_4) byla totožná s redukčním potenciálem klasické PAD (E_3), tedy 0 V . Čistící potenciál (E_2) s hodnotou -2 V a aktivační potenciál (E_3) s hodnotou $+0,6 \text{ V}$ byly převzaty z literatury [13].



Obr. 4.1 Cyklické voltamogramy (CV) glukózy ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) na mikroelektrodě (1) a základního elektrolytu (2), glukózy ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) na konvenční elektrodě (3) a základního elektrolytu (4). Rychlost měření 1 V s^{-1} . Přerušovanými čarami vyznačeny výchozí potenciály pro klasickou PAD. Vysvětleno v textu nad obrázkem.

4.2 Modifikace potenciálů klasické PAD

Klasickou třípotenciálovou PAD v kombinaci s FIA bylo provedeno sledování chování glukózy a optimalizace hodnot jednotlivých potenciálových pulzů. Borátový pufr o $\text{pH} = 10$ sloužil jako nosný roztok, do jehož proudu bylo aplikováno vždy minimálně pět nástřiků zásobního roztoku glukózy s koncentrací $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Byla sledována závislost výšky píku na jeho pořadí nástřiku v čase při změně detekčního, oxidačního a v neposlední řadě též redukčního potenciálu. Toto měření bylo provedeno zapojením konvenční zlaté pracovní elektrody a bylo zopakováno také za použití zlaté pracovní mikroelektrody. Před každým novým započatým měřením byl povrch pracovní elektrody přeleštěn na alumině.

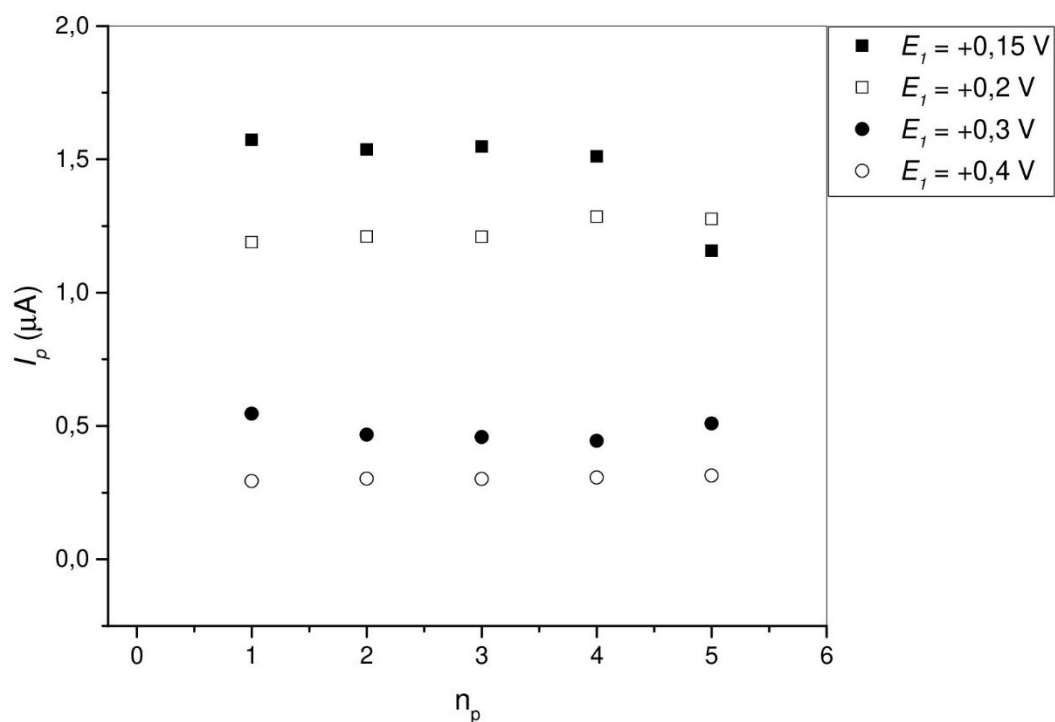
Jednotlivá měření byla zopakována minimálně dvakrát a mezi nimi byl dostatečně dlouhý časový interval (v rádech dnů), aby bylo jisté, že jednotlivé průběhy při stejném potenciálovém programu nemění trend (pokles píků/ růst píků/ stabilní výšky píků).

4.2.1 Konvenční zlatá elektroda

Závislosti výšek píků na jejich pořadí nástřiku při daném potenciálovém programu jsou zobrazeny na obr. 4.2 (změna E_1), 4.3 (změna E_2) a 4.4 (změna E_3). Z obr. 4.2 je z jednotlivých průběhů patrné, že ač při potenciálu +0,15 V dosahují píky největších výšek, nevede takto zvolený detekční potenciál ke stabilní odezvě ani v rámci pouze pěti nástřiků a trend je klesající. Při zbylých třech proměřených detekčních potenciálech je proudová odezva elektrody stabilní. Při nižších vkládaných potenciálech, tedy +0,15 V a +0,2 V jsou píky vyšší, než při potenciálech +0,3 V a +0,4 V.

Na obr. 4.3 je demonstrováno, jak se na proudové odezvě projeví změna oxidačního potenciálu E_2 . Z jednotlivých průběhů lze uvažovat, že jeho změna nemá velký dopad na výšky píků, vzhledem k tomu, že se jejich absolutní velikost uvedená v tabulce 4.2 příliš neliší. Odlišnosti jsou patrné spíše ve stabilitě jednotlivých průběhů. Odezvu při vkládaném oxidačním potenciálu +1,1 V s relativní směrodatnou odchylkou 12,78 % (viz tab. 4.2) nelze považovat za stabilní. Důvodem rostoucího trendu by mohl být nedostatečně přečištěný elektrodový povrch na alumině či předpoklad, že vyšší vkládaný oxidační potenciál je účinnější cestou v čištění elektrodového povrchu než leštění na alumině.

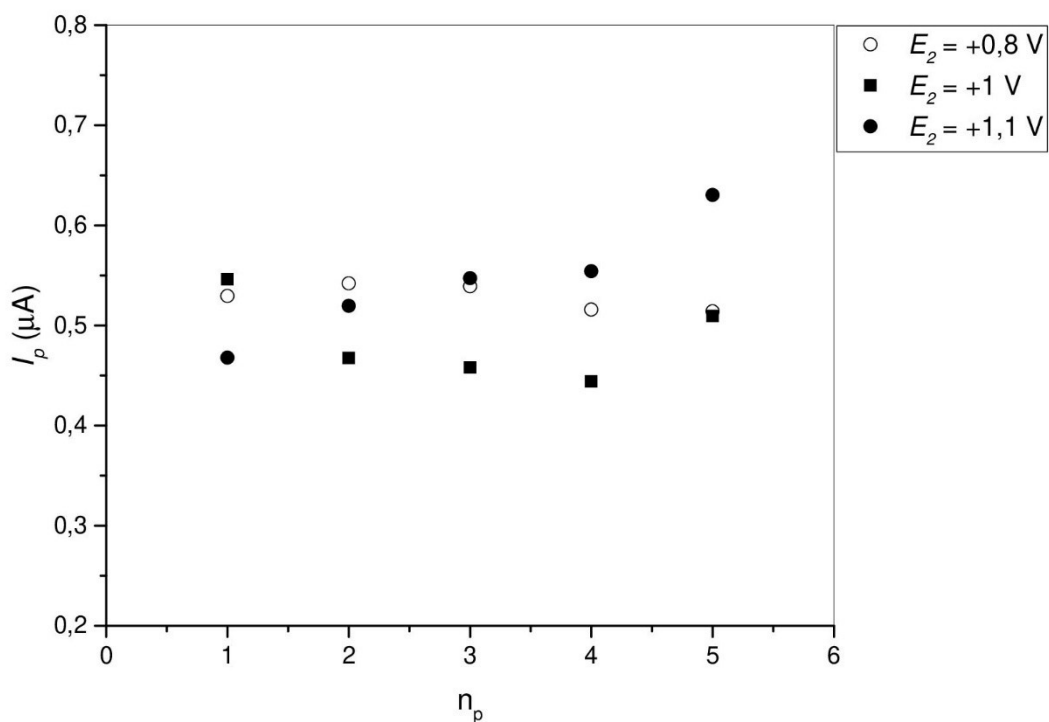
Změnu redukčního potenciálu E_3 zobrazuje obr. 4.4. Všechny tři průběhy mají RSD pod 10 % (ukázáno v tab. 4.3) a žádný z nich nevykazuje žádný trend, který by, kdyby byl klesající, mohl být výsledkem postupné pasivace elektrody oxidačními (mezi)produkty. Vložením redukčního potenciálu +0,1 V jsou píky vyšší v porovnání se zbylými dvěma vloženými potenciály.



Obr. 4.2 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách detekčního potenciálu (E_1). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota oxidačního potenciálu (E_2) +1 V a redukčního potenciálu (E_3) 0 V. Měřeno na konvenční zlaté elektrodě.

Tab. 4.1 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty detekčního potenciálu E_1 na konvenční zlaté elektrodě

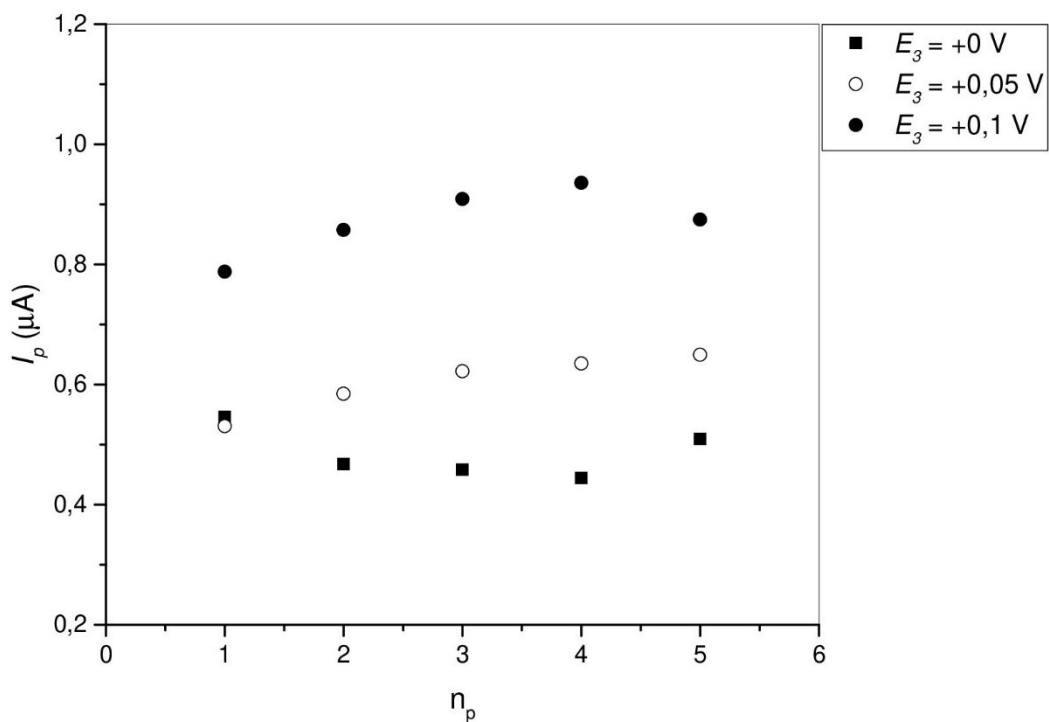
Detekční potenciál E_1 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [μA]	RSD [%]
+0,15 V	$1,537 \pm 0,211$	10,66
+0,2 V	$1,210 \pm 0,486$	3,11
+0,3 V	$0,468 \pm 0,044$	9,38
+0,4 V	$0,303 \pm 0,010$	2,92



Obr. 4.3 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách oxidačního potenciálu (E_2). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota detekčního potenciálu (E_1) $+0,3 \text{ V}$ a redukčního potenciálu (E_3) 0 V . Měřeno na konvenční zlaté elektrodě.

Tab 4.2 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty oxidačního potenciálu E_2 na konvenční zlaté elektrodě

Oxidační potenciál E_2 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [μA]	RSD [%]
+0,8 V	$0,529 \pm 0,014$	2,27
+1 V	$0,468 \pm 0,044$	9,38
+1,1 V	$0,547 \pm 0,082$	12,78



Obr. 4.4 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách redukčního potenciálu (E_3). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota detekčního potenciálu (E_1) +0,3 V a oxidačního potenciálu (E_2) +1. Měřeno na konvenční zlaté elektrodě.

Tab 4.3 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty redukčního potenciálu E_3 na konvenční zlaté elektrodě

Redukční potenciál E_3 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [μA]	RSD [%]
0 V	$0,468 \pm 0,044$	9,38
+0,05 V	$0,622 \pm 0,006$	8,21
+0,1 V	$0,875 \pm 0,008$	6,68

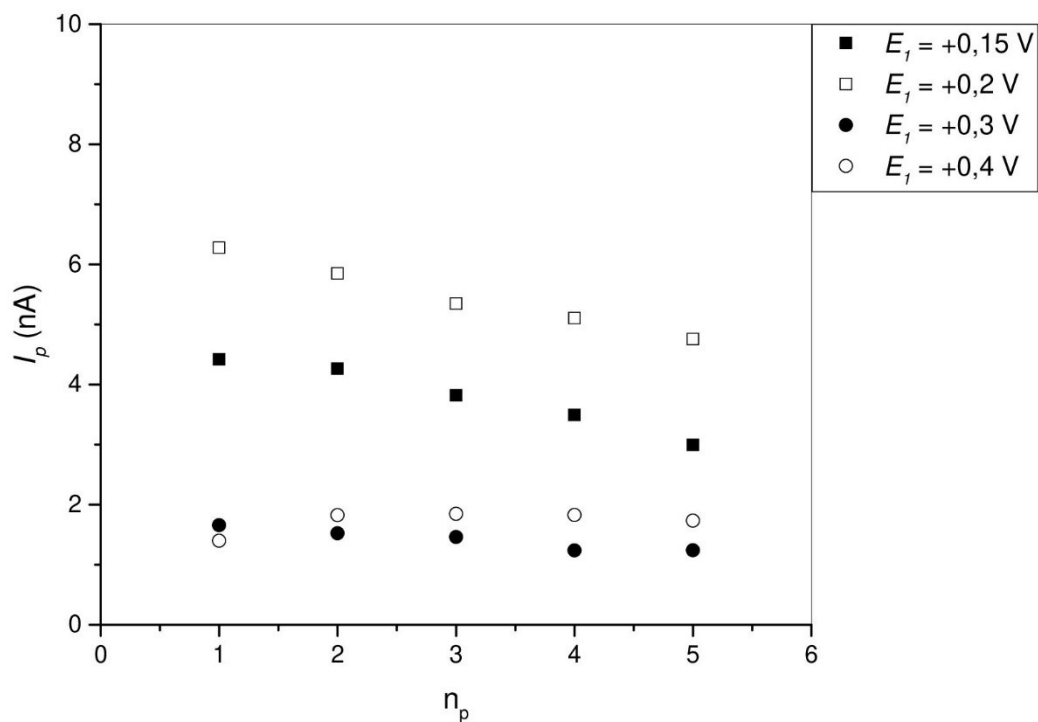
4.2.2 Zlatá mikroelektroda

Obdobná měření, která byla provedena na konvenční zlaté elektrodě a jež jsou shrnuta v pododdíle 4.2.1, byla zopakována na mikroelektrodě. Podmínky měření jsou totožné, stejně tak postup obměňování jednotlivých pulzů.

Na obr. 4.5 je ukázána změna detekčního potenciálu E_1 . Se současným nahlédnutím do tab. 4.4 lze vyhodnotit, že je-li $E_1 = 0,4$ V, pak mají výšky píků nejnižší RSD a ze všech čtyř proměřených detekčních potenciálů největší tendenci ke stabilní odezvě bez postupného klesání výšek píků přisuzovaném pasivaci povrchu pracovní elektrody. Na druhou stranu, při vložení nižších detekčních potenciálů jsou píky vyšší, nejvyšší s +0,2 V. Při potenciálech +0,3 a +0,4 je jak průběh, tak nižší relativní hodnota výšek píků oproti zbylým dvěma obdobným závislostmi naměřené na konvenční zlaté elektrodě (viz obr. 4.2).

Obr. 4.6 zobrazuje proměření různých oxidačních potenciálů E_2 . Při potenciálu +0,8 V je oxidační čištění pravděpodobně nedostatečné, proto dochází k pasivaci elektrody a postupnému snižování výšky píku. Postupný růst odezvy při potenciálu +1,1 V může být známkou toho, že povrch pracovní elektrody nebyl předem dostatečně vyleštěn na alumině a následným vkládáním potenciálových pulzů se ne plně aktivní povrch postupně elektrochemicky čistil a stával se více aktivním. Nicméně tato příčina je diskutabilní, jelikož podobného výsledku bylo dosaženo za stejných podmínek na zlaté elektrodě (viz obr. 4.3) a pravděpodobnost, že v obou případech byl elektrodový povrch pouze nedoleštěn, není vysoká. Další možnou příčinou, která již byla uvedena, je předpoklad, že vyšší vkládaný oxidační potenciál je účinnější cestou v čištění elektrodového povrchu než leštění na alumině.

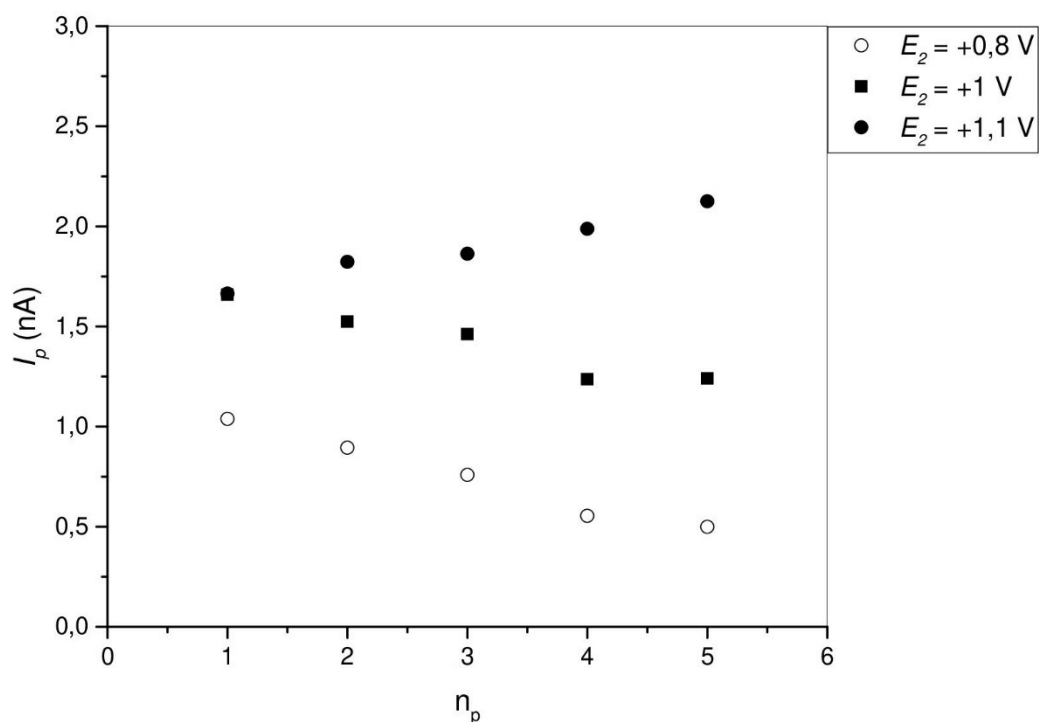
Změna redukčního potenciálu je ukázána na obr. 4.7. Pro všechny tři průběhy platí, že mají klesající tendenci a z tabulky 4.6 lze vyčíst, že největší RSD, a tedy také největší pokles vykazují píky při potenciálu +0,05 V. Volba tohoto potenciálu tedy nebude klíčová při snaze nalézt co nejstabilnější odezvu. Zároveň při vloženém potenciálu +0,1 V jsou píky v relativní hodnotě nejvyšší, a to jak na mikroelektrodě, tak na konvenční elektrodě, jak je ukázáno na obr. 4.4, kde je na ni tatáž závislost ukázána.



Obr. 4.5 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách detekčního potenciálu (E_1). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota oxidačního potenciálu (E_2) +1 V a redukčního potenciálu (E_3) 0 V. Měřeno na zlaté mikroelektrodě.

Tab 4.4 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty detekčního potenciálu E_1 na zlaté mikroelektrodě

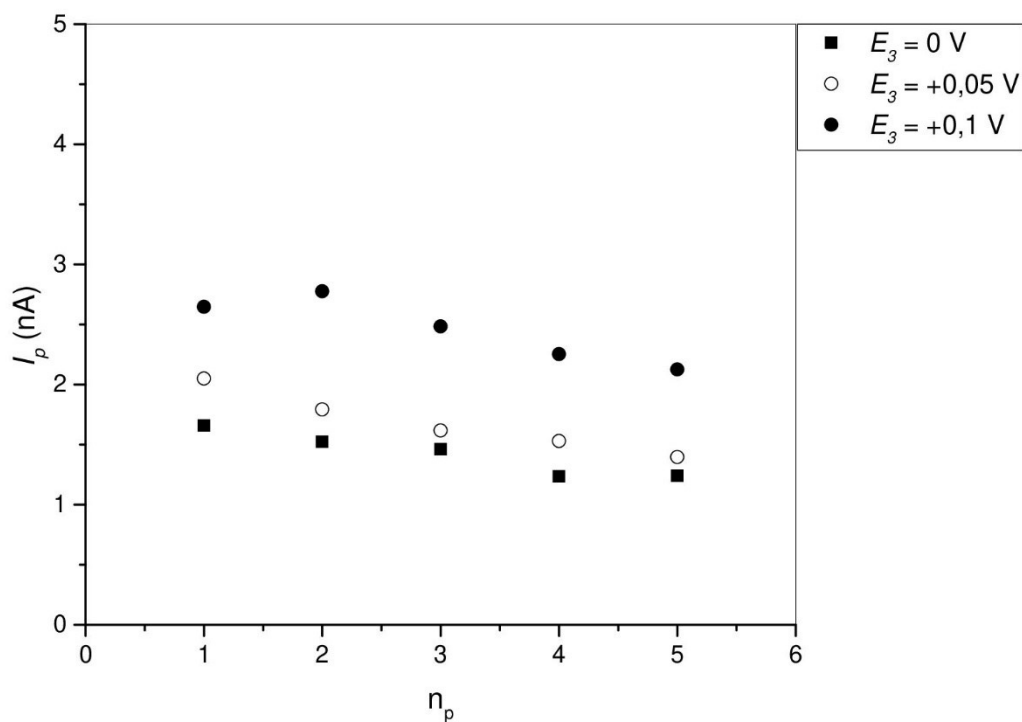
Detekční potenciál E_1 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
+0,15 V	$3,821 \pm 0,723$	16,05
+0,2 V	$5,348 \pm 0,771$	12,22
+0,3 V	$1,4621 \pm 0,212$	12,28
+0,4 V	$1,826 \pm 0,228$	10,58



Obr. 4.6 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách oxidačního potenciálu (E_2). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota detekčního potenciálu (E_1) +0,3 V a redukčního potenciálu (E_3) 0 V. Měřeno na zlaté mikroelektrodě.

Tab 4.5 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty oxidačního potenciálu E_2 na zlaté mikroelektrodě

Oxidační potenciál E_2 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
+0,8 V	$0,759 \pm 0,273$	30,57
+1 V	$1,4621 \pm 0,212$	12,28
+1,1 V	$1,863 \pm 0,234$	10,64



Obr. 4.7 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách redukčního potenciálu (E_3). Změny jeho hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota detekčního potenciálu (E_1) +0,3 V a oxidačního potenciálu (E_2) +1 V. Měřeno na zlaté mikroelektrodě.

Tab. 4.6 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty redukčního potenciálu E_3 na zlaté mikroelektrodě

Redukční potenciál E_3 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
0 V	$1,4621 \pm 0,212$	12,28
+0,05 V	$1,617 \pm 0,331$	17,38
+0,1 V	$2,484 \pm 0,330$	11,26

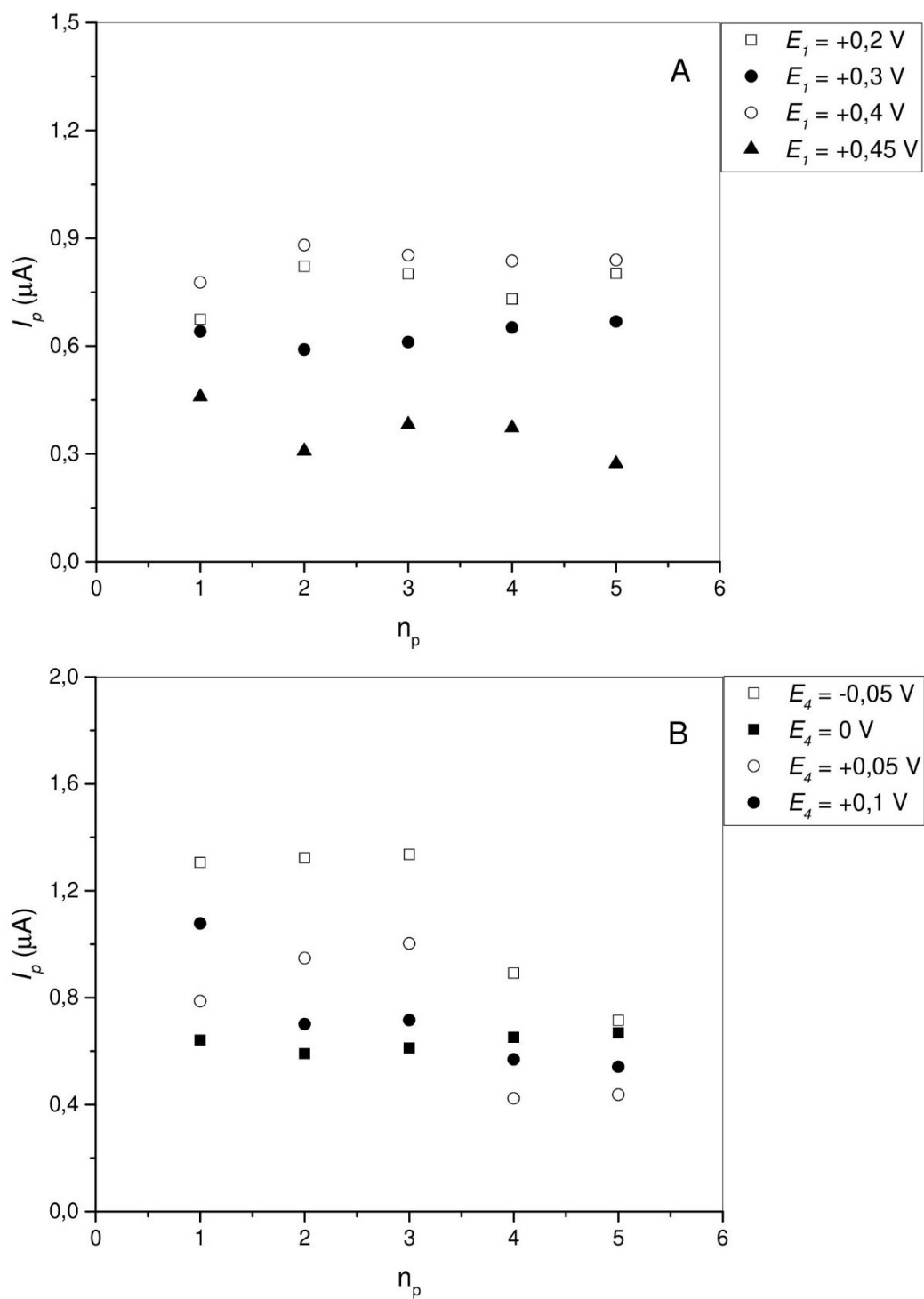
4.3 Modifikace potenciálů Q-PAD

Metodou Q-PAD v kombinaci s FIA byla proměřena závislost výšky píku na jeho pořadí nástřiku v každém novém započatém měření, tj. změně kombinace vkládaných potenciálových pulzů obdobně, jako bylo provedeno v pododdíle 4.2 s třípotenciálovou PAD. Byl použit zásobní roztok glukózy o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a nosný proud tvořil borátový pufr s $\text{pH} = 10$. Každá změna potenciálových pulzů byla proměřena minimálně pěti nástřiky zásobního roztoku glukózy. Potenciály čistící (E_2) a aktivační (E_3) zůstaly přes všechny změny detekčního (E_1) a redukčního (E_4) potenciálu konstantní. Měření bylo provedeno s konvenční zlatou pracovní elektrodou a poté se zlatou pracovní mikroelektrodou.

4.3.1 Konvenční zlatá elektroda

Výšky píků proměřené detekčními potenciály +0,2 V, +0,3 V i +0,4 V jsou v rámci pěti nástřiků stabilní, jak je vidět na obr. 4.8 A, s relativní směrodatnou odchylkou menší než 10 % (viz tab. 4.9). Vložením detekčního potenciálu +0,45 V se s každým dalším nástřikem výška píku viditelně mění a vytváří skoky.

Při změně redukčního potenciálu, obr. 4.8 B, se rozdíly v jednotlivých průbězích projeví více, kdy za použitelný pro další měření lze považovat pouze 0 V, také vzhledem k tomu, že nepodléhá žádnému trendu. Píky získané při zbylých třech proměřených redukčních potenciálech, jejichž RSD značně přesahují 15 %, nelze považovat za stabilní.



Obr. 4.8 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách detekčního potenciálu (E_1) – obr. 4.8 A, a při dílčích změnách redukčního potenciálu (E_4) - obr. 4.8 B. Změny jejich hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota čistícího potenciálu (E_2) -2 V a aktivačního potenciálu (E_3) $+0,6$. Měřeno na zlaté elektrodě.

Tab. 4.9 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty detekčního potenciálu E_1 na konvenční zlaté elektrodě

Detekční potenciál E_1	Výška píku $\pm L_{1,2}$	RSD
[V]	[μA]	[%]
+0,2 V	0,801 \pm 0,046	7,89
+0,3 V	0,641 \pm 0,040	4,80
+0,4 V	0,839 \pm 0,052	5,30
+0,45 V	0,372 \pm 0,094	18,48

Tab 4.10 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty redukčního potenciálu E_4 na konvenční zlaté elektrodě

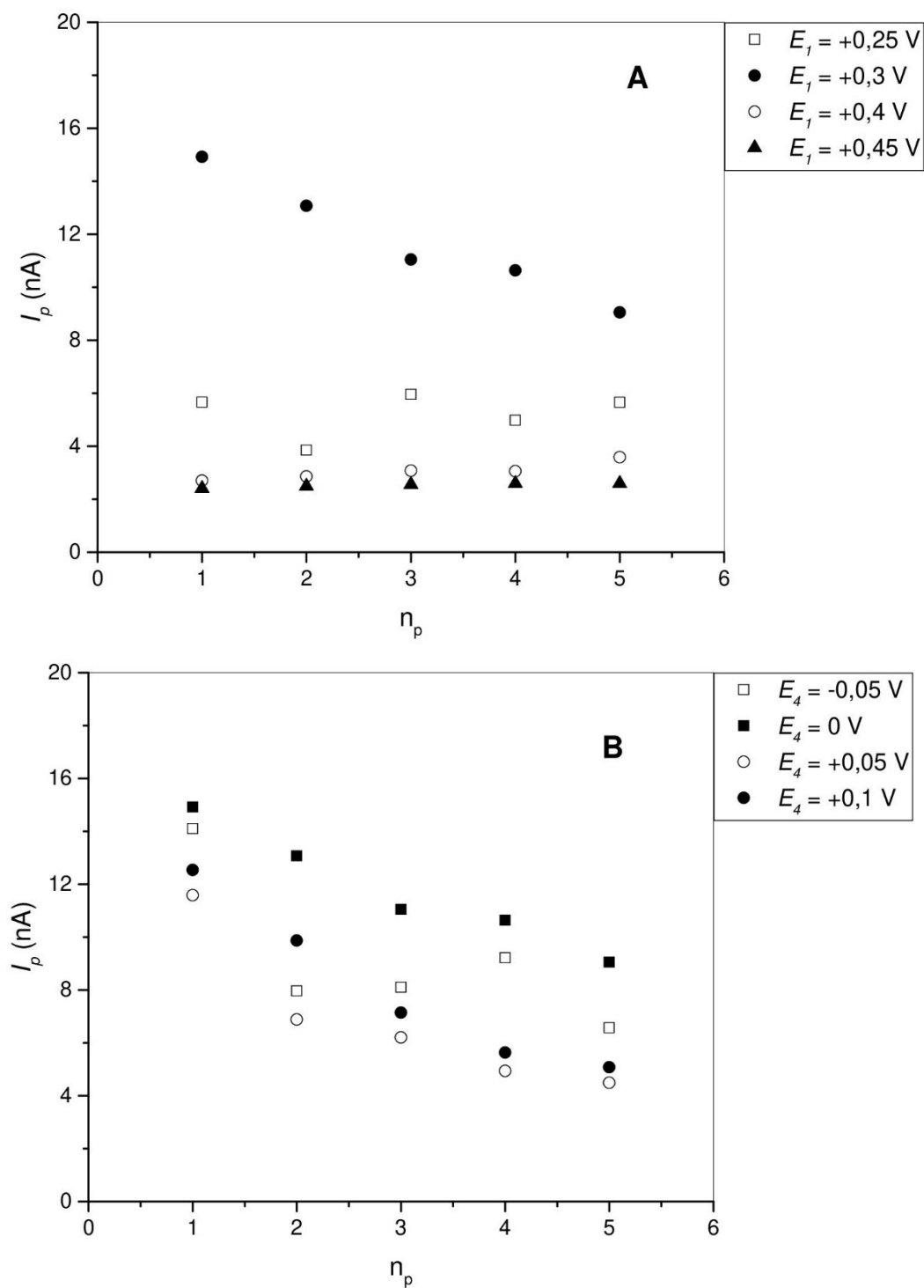
Redukční potenciál E_4	Výška píku $\pm L_{1,2}$	RSD
[V]	[μA]	[%]
-0,05 V	1,305 \pm 0,315	18,77
0 V	0,641 \pm 0,040	4,80
+0,05 V	0,787 \pm 0,294	27,21
+0,1 V	0,701 \pm 0,272	30,20

4.3.2 Zlatá mikroelektroda

Měření obdobná provedeným v pododdíle 4.3.1 na konvenční zlaté elektrodě byla zopakována na mikroelektrodě. Podmínky měření jsou totožné, stejně tak postup obměňování jednotlivých pulzů.

Obr. 4.9 A ukazuje, že pro stabilní výšky píků jsou vhodnější volbou detekční potenciály vyšší než nižší a potenciál +0,45 V, při němž byly výšky píků na konvenční zlaté elektrodě nejméně stabilní, je v rámci pěti nástřiků nejvhodnější. Ačkoliv vložení detekčního potenciálu +0,4 V vykazují píky relativní směrodatnou odchylku poměrně vysokou, 12,47 % (viz tab. 4.11), z jejich průběhu není patrný žádný trend. Potenciál +0,3 V, který měl na konvenční elektrodě ze všech proměřených potenciálů nejstabilnější odezvu, je na mikroelektrodě stabilní nejméně.

Vzhledem ke klesajícím průběhům na obr. 4.9 B, že při změnách redukčního potenciálu je patrné, že detekční potenciál +0,3 V není vhodný v kombinaci s ani jedním proměřeným redukčním potenciálem, a proto bude nutné proměřit je v rámci testování stability s jiným detekčním potenciálem.



Obr. 4.9 Závislost výšky píku I_p na jeho pořadí n_p při dílčích změnách detekčního potenciálu (E_1) – obr. 4.9 A, a při dílčích změnách redukčního potenciálu (E_4) - obr. 4.9 B. Změny jejich hodnot uvedeny v legendě vedle grafu. Hodnota čistícího potenciálu (E_2) -2 V a aktivačního potenciálu (E_3) $+0,6$. Měřeno na mikroelektrodě.

Tab 4.11 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty redukčního potenciálu E_1 na zlaté mikroelektrodě

Detekční potenciál E_1 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
+0,25 V	5,655 \pm 1,066	20,46
+0,3 V	11,044 \pm 2,978	22,86
+0,4 V	3,056 \pm 0,449	12,47
+0,45 V	2,558 \pm 0,098	3,20

Tab 4.12 Opakovatelnost měření pro různé hodnoty redukčního potenciálu E_4 na zlaté mikroelektrodě

Redukční potenciál E_4 [V]	Výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
-0,05 V	8,100 \pm 3,818	39,96
0 V	11,044 \pm 2,978	22,86
+0,05 V	2,984 \pm 0,407	11,56
+0,1 V	7,144 \pm 3,782	44,89

4.4 Stabilita výšek píků v čase

Z průběhů předvedených v pododdíle 4.2 a 4.3 byly vybrány takové kombinace potenciálových pulzů, které se, s přihlédnutím na jejich průběh v rámci pěti nástřiků a do tabulek s výškami píků a relativními směrodatnými odchylkami, jevíly jako stabilní, což bylo dále otestováno patnácti po sobě jdoucím nástřiky. Parametry pro obě pracovní elektrody proměřené klasickou PAD a Q-PAD jsou uvedeny v přehledných tabulkách 4.13 a 4.14.

Na obr. 4.10 jsou zobrazeny ampérogramy naměřené na konvenční zlaté elektrodě s parametry vkládaných pulzů uvedenými v tab. 4.13 a 4.14. I přes to, že výšky píků v celém průběhu viditelně kolísají, což dokazují také relativní směrodatné odchylky z tab. 4.15 spočtené pro obě metody a oba koncentrované roztoky glukózy, nepodléhají žádnému trendu. Takto zvolená kombinace potenciálových pulzů tedy vede k obnovování a relativně účinné reaktivaci elektrodového povrchu, který je během měření pasivován (mezi)produkty oxidace glukózy ve studovaném roztoku. Obr. 4.11

zobrazuje týž ampérogram s tím rozdílem, že byl proměřen na mikroelektrodě a s odlišnými vkládanými potenciály, které jsou opět uvedeny v tab. 4.13 a 4.14. Při koncentraci glukózy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, jež zobrazuje pravá polovina obrázku (B) je šum základní linie daleko více patrný než na konvenční elektrodě, zejména pak při Q-PAD (spodní obrázek) a projevuje se též značné kolísání výšek píků, což opět dokazují relativní směrodatné odchylky uvedené v tab. 4.16. Naopak při vyšší koncentraci glukózy v roztoku se výšky píků na mikroelektrodě téměř vyrovnávají.

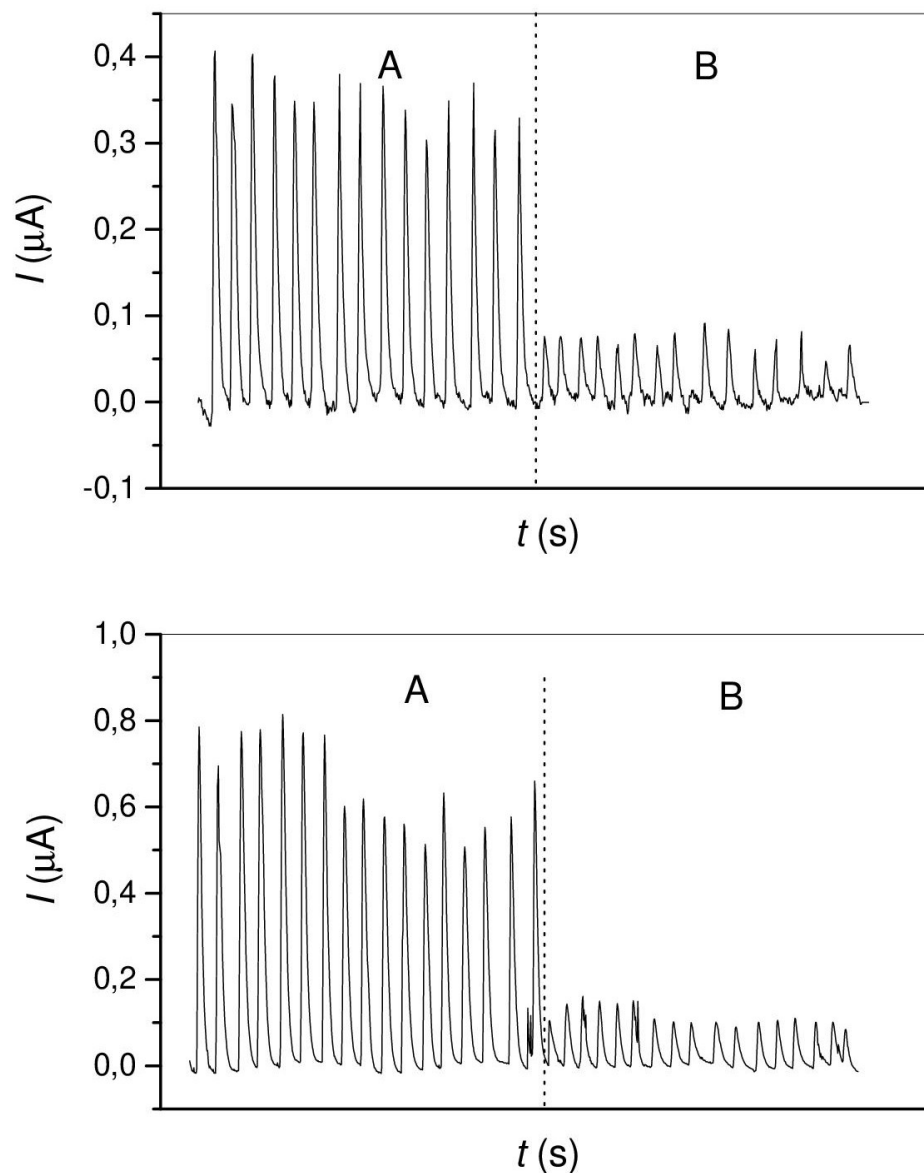
Parametry z tab. 4.13 a 4.14, kterými byly proměřeny ampérogramy na obr. 4.10 a 4.11 byly vyhodnoceny jako ty, při jejichž vkládání na pracovní elektrodu je proudová odezva z oxidace glukózy ve studovaném roztoku stabilní a dochází při nich k obnovování a reaktivaci elektrodového povrchu. Bylo tak uvažováno na základě toho, že výšky jednotlivých po sobě jdoucích píků nevykazují postupné snižování, které by poukazovalo na zmenšování aktivního povrchu elektrody v důsledku její pasivace.

Tab 4.13 Parametry vybraných pulzů pro klasickou PAD

	E_1	E_2	E_3	t_1	t_2	t_3
	[V]	[V]	[V]	[ms]	[ms]	[ms]
Konvenční elektroda	+0,4	0	+1	400	200	400
Mikroelektroda	+0,4	0	+1	400	200	400

Tab 4.14 Parametry vybraných pulzů pro Q-PAD

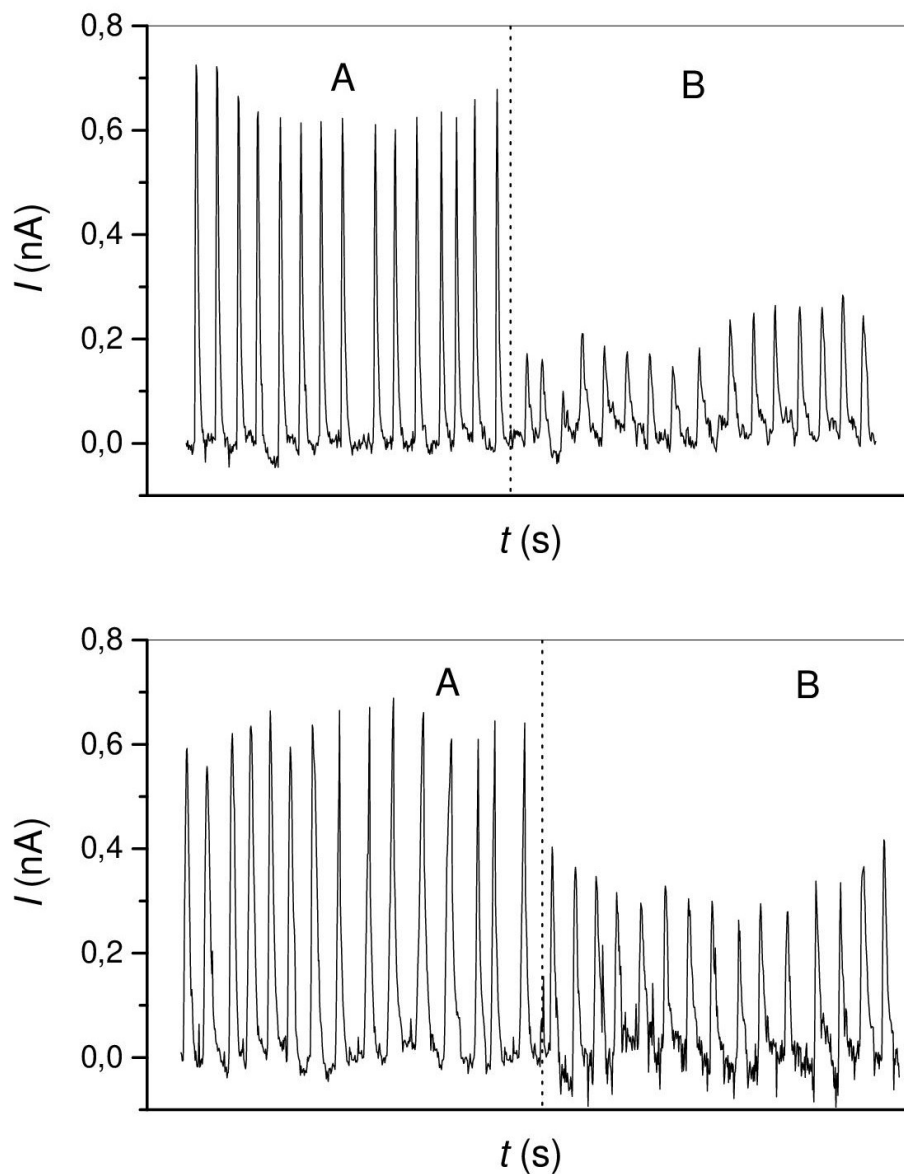
	E_1	E_2	E_3	E_4	t_1	t_2	t_3	t_4
	[V]	[V]	[V]	[V]	[ms]	[ms]	[ms]	[ms]
Konvenční elektroda	+0,2	-2	+0,6	0	400	20	10	70
Mikroelektroda	+0,4	-2	+0,6	0	400	20	10	70



Obr. 4.10 Ampérogramy roztoků glukózy na konvenční zlaté elektrodě ukazující stabilitu odezvy při vybraných potenciálových pulzech. Klasická PAD (horní obrázek) a Q-PAD (spodní obrázek). Levá polovina grafů (A) $c_{\text{glu}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pravá (B) $c_{\text{glu}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 4.15 Relativní směrodatné odchylky pro sérii píků různě koncentrovaných roztoků glukózy na konvenční zlaté elektrodě. Vychází z ampérogramu na obr. 4.10

$c_{\text{glu}} [\text{mol dm}^{-3}]$	RSD [%]	
	PAD	Q-PAD
$1 \cdot 10^{-3}$	8,71	17,18
$1 \cdot 10^{-4}$	14,65	24,54



Obr. 4.11 Ampéromagramy roztoků glukózy na mikroelektrodě ukazující stabilitu odezvy při vybraných potenciálových pulzech. Klasická PAD (horní obrázek) a Q-PAD (spodní obrázek). Levá polovina grafů (A) $c_{\text{glu}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pravá (B) $c_{\text{glu}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 4.15 Relativní směrodatné odchylky pro série píků různě koncentrovaných roztoků glukózy na zlaté mikroelektrodě. Vychází z ampéromagramu na obr. 4.11

$c_{\text{glu}} [\text{mol dm}^{-3}]$	RSD [%]	
	PAD	Q-PAD
$1 \cdot 10^{-3}$	6,20	5,92
$1 \cdot 10^{-4}$	21,57	13,40

4.5 Kalibrační závislost

Koncentrační závislost byla proměřena pulzní ampérometrií v kombinaci s FIA pro klasickou PAD a pro Q-PAD pro zvolené vhodné kombinace jednotlivých potenciálových pulzů, které byly předvedeny v pododdíle 4.4.

4.5.1 Konvenční zlatá elektroda

Kalibrační závislost pro klasickou PAD byla na konvenční zlaté elektrodě proměřena s detekčním potenciálem (E_1) +0,4 V s délkou vkládání 400 ms, oxidačním potenciálem (E_2) +1 V vkládaným po dobu 200 ms a redukčním potenciálem (E_3) 0 V o délce 400 ms. Pro Q-PAD byly zvoleny hodnoty potenciálů +0,2 V pro detekční (E_1) s délkou vkládání 400 ms, -2 V pro čistící potenciál (E_2) vkládaný po dobu 20 ms, pro aktivační potenciál (E_3) +0,6 V po dobu 10 ms a redukční potenciál (E_4) 0 V na dobu 70 ms.

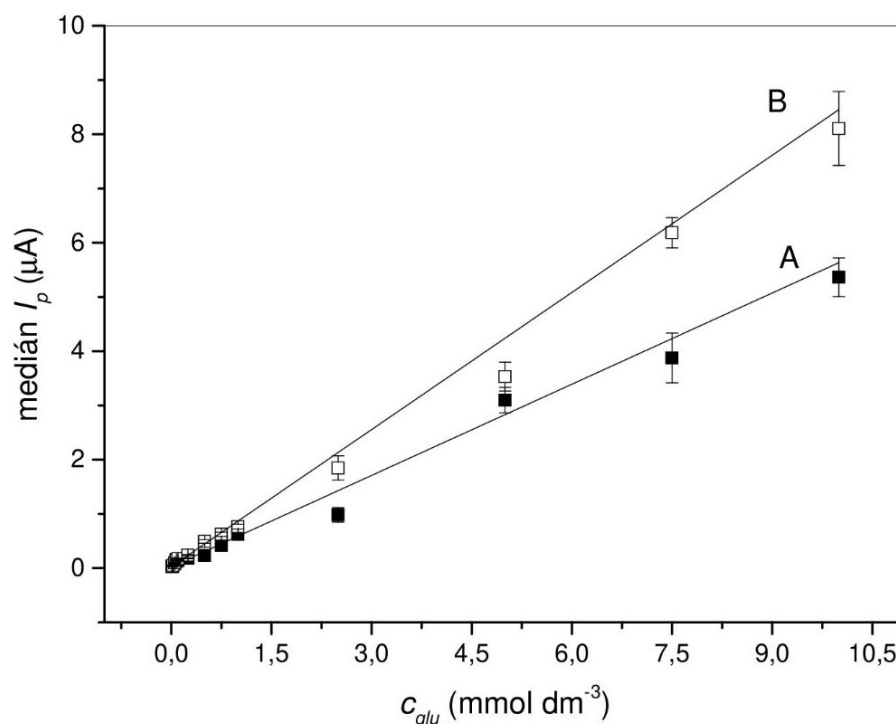
V tabulce 4.16 jsou shrnuty parametry kalibračních závislostí pro obě pulzní metody na konvenční zlaté elektrodě. Směrnice kalibrační přímky, respektive její velikost, je jedno z kritérií pro porovnání citlivosti metody. Čím větší je její hodnota, tím větší úhel přímka svírá s kladnou poloosou x a tím strmější je kalibrační přímka a velká změna odezvy je důsledkem pouze malé změny koncentrace. Směrnice kalibrační závislosti proměřené Q-PAD je větší než u klasické PAD, proto je pro konvenční zlatou elektrodu citlivější.

Hodnota korelačního koeficientu R rovna 0,974 pro PAD, ani 0,973 pro Q-PAD nejsou zcela vyhovující, což je také patrné z obr. 4.12, kde ne všechny body závislosti leží v těsné blízkosti proložené přímky.

Přesnost obou proměřených kalibračních závislostí lze vyhodnotit z chybových úseček kolem jednotlivých kalibračních bodů. K největším odchýlkám docházelo při vyšších koncentracích glukózy ve studovaném roztoku. Pro Q-PAD je největší rozptyl při koncentraci glukózy $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a pro PAD při $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Při nižších koncentracích glukózy nejsou chybové úsečky téměř viditelné.

Meze detekce a meze stanovitelnosti uvedené v tab. 4.17 jsou pro Q-PAD znatelně nižší než pro PAD, což je v souladu s vyšší citlivostí metody na dané pracovní elektrodě.

Na obr. 4.13 a 4.14 jsou ukázány ampérogramy, kde výšky jednotlivých píků, konkrétně mediány, byly použity pro sestavení kalibračních závislostí. Přerušované svislé čáry oddělují koncentrační změny glukózy v roztoku. Pro lepší orientaci a čitelnost píků i v nižších koncentracích glukózy nejsou ampérogramy vyneseny v celé koncentrační závislosti, která by odpovídala té kalibrační z obr. 4.12 a je vynesena pouze její část. Nicméně koncentrační rozmezí odpovídá použitému na vnitřním obrázku. Pro ampérogram klasické PAD (obr. 4.13) je toto rozmezí od koncentrace glukózy $1 \cdot 10^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} a pro Q-PAD (obr. 4.14) od $5 \cdot 10^{-2}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}



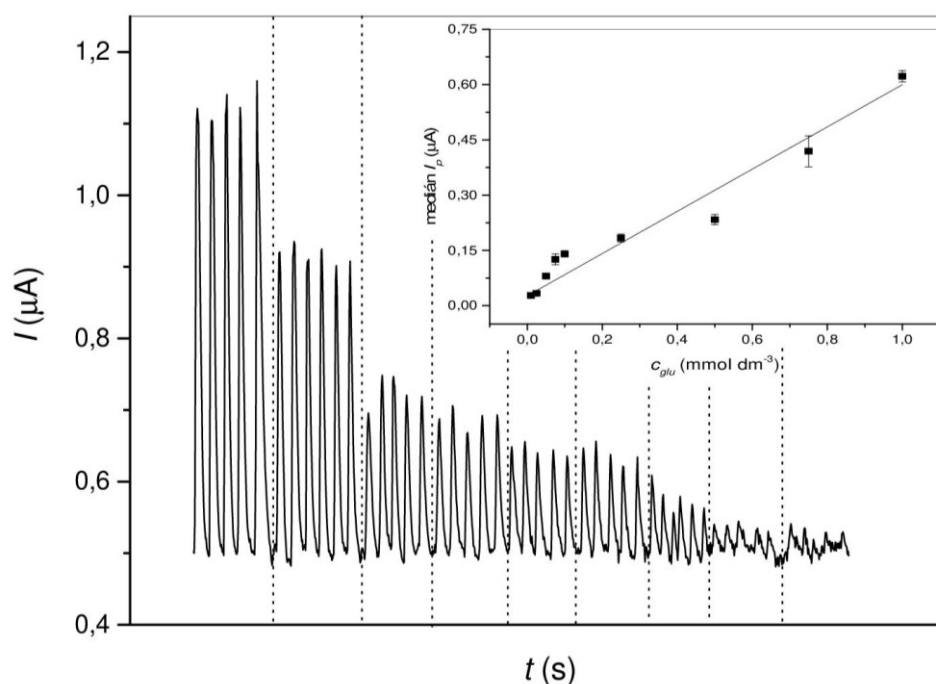
Obr. 4.12 Kalibrační závislosti glukózy klasické PAD (4.11 A) a Q-PAD (4.11 B) na konvenční zlaté elektrodě. Vyjádřeno závislostí mediánu výšek píků změřených při potenciálech a periodách uvedených výše, na koncentraci glukózy v roztoku pro $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} až $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} .

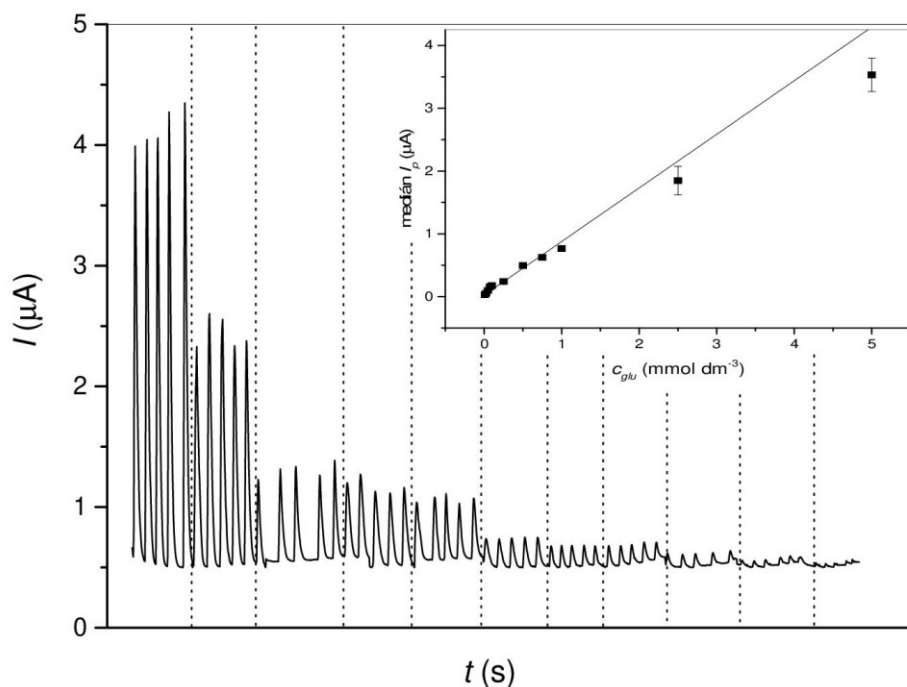
Tab 4.16 Parametry kalibračních závislostí pro konvenční zlatou elektrodu

	Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [mA mol ⁻¹ dm ³]	Úsek [A]	R
PAD	1·10 ⁻² až 1·10 ⁻⁵	0,561	2,75·10 ⁻⁸	0,947
Q-PAD	1·10 ⁻² až 1·10 ⁻⁵	0,843	2,48·10 ⁻⁸	0,973

Tab 4.17 Limity detekce a kvantifikace pro konvenční zlatou elektrodu. Vypočteny dle vztahů 3.1 a 3.2 (viz pododíl 3.4)

	LOD [mol dm ⁻³]	LOQ [mol dm ⁻³]
PAD	8,02·10 ⁻⁵	2,67·10 ⁻⁴
Q-PAD	1,78·10 ⁻⁵	5,93·10 ⁻⁵

**Obr. 4.13** Ampérogram FIA-PAD na konvenční zlaté elektrodě s koncentračním rozmezím glukózy od $1 \cdot 10^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Uvnitř k němu příslušná kalibrační závislost s odpovídajícím koncentračním rozsahem.



Obr. 4.14 Ampérogram FIA s Q-PAD na konvenční zlaté elektrodě s koncentračním rozmezím glukózy od $5 \cdot 10^{-2}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Uvnitř k němu příslušná kalibrační závislost s odpovídajícím koncentračním rozsahem.

4.5.2 Zlatá mikroelektroda

Na zlaté pracovní mikroelektrodě byla kalibrační závislost klasickou PAD proměřena s následujícími potenciály. Pro detekční potenciál (E_1) $+0,4$ V s délkou vkládání 400 ms, oxidační potenciál (E_2) $+1$ V vkládaný po dobu 200 ms a redukční potenciál (E_3) 0 V o délce 400 ms.

Pro Q-PAD byly zvoleny potenciály $+0,4$ V pro detekční (E_1) s délkou vkládání 400 ms, -2 V pro čistící potenciál (E_2) vkládaný po dobu 20 ms, pro aktivační potenciál (E_3) $+0,6$ V po dobu 10 ms a redukční potenciál (E_4) 0 V na dobu 70 ms.

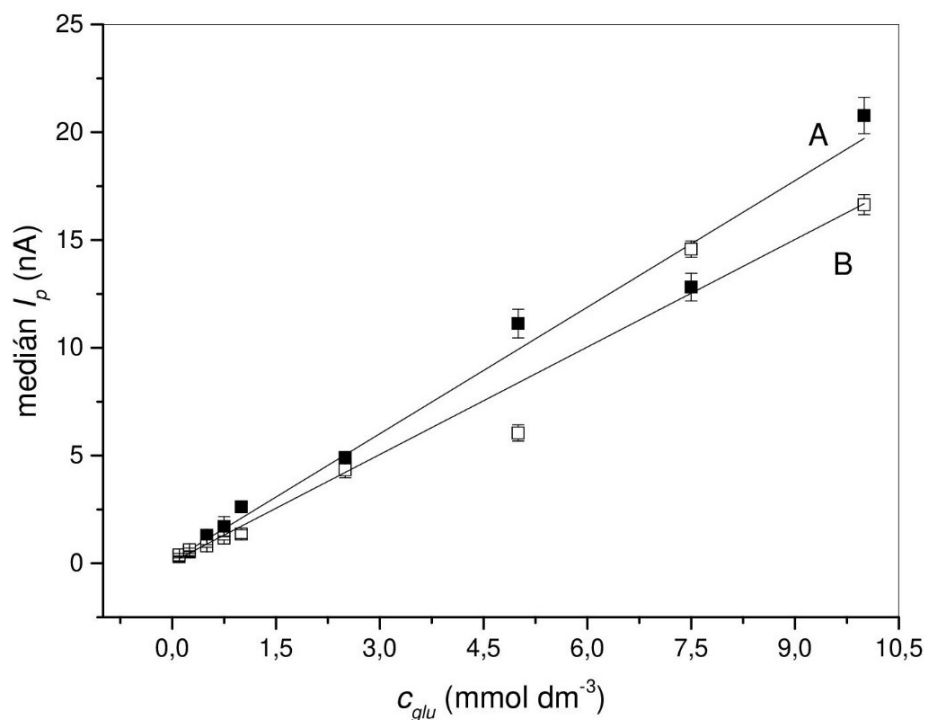
Citlivost obou pulzních metod je hodnocena dle směrnice kalibrační přímky, kterou lze s dalšími parametry kalibračních závislostí vyčíst z tab. 4.18. Hodnota směrnice je větší pro klasickou PAD a je-li bráno v potaz odlišné řádové rozmezí procházejících proudů oběma elektrodami, tak rozdíl mezi hodnotami směrnic PAD a Q-PAD je pro obě elektrody podobný. Oproti konvenční zlaté elektrodě, pro mikroelektrodu je

citlivější metoda PAD, čemuž nasvědčují vyšší hodnoty proudové odezvy oproti odezvám metodou Q-PAD a strmější kalibrační přímka (obr. 4.15).

Poloha jednotlivých bodů kalibračních závislostí se od proložené přímky viditelně méně odchylojí, než tomu bylo u zlaté konvenční elektrody a také přesnosti vyjádřené chybovými úsečkami vycházejícími z bodů bylo dosaženo větší. Korelační koeficient R se blíží jedné, zejména hodnota 0,993 u PAD což značí přiblížení se linearitě závislosti.

Meze detekce a meze kvantifikace uvedené v tab. 4.19 naopak nesplňují očekávání, dle kterých by měly být značně nižší než meze, které byly získány na konvenční zlaté elektrodě a tyto hodnoty nejsou zcela uspokojivé. To bylo pravděpodobně zapříčiněno vysokým šumem základní linie neúměrným výškám píků, což bylo komplikací měření na mikroelektrodě.

Obrázky 4.16 a 4.17 zobrazují ampérogramy obdobné ukázaným v pododdíle 4.5.1 obr. 4.13 a 4.14., tentokrát získané na mikroelektrodě. Vnitřní obrázek totožný s odpovídající kalibrační závislostí z obr. 4.15 a není zde vyobrazena pouze její část.



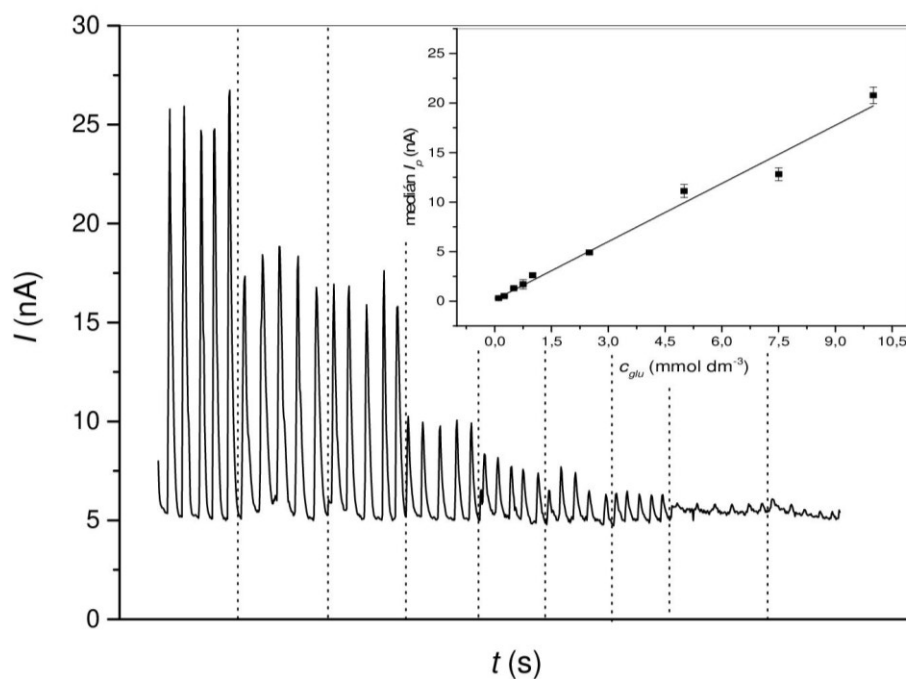
Obr. 4.15 Kalibrační závislosti glukózy proměřené klasickou PAD (4.12 A) a Q-PAD (4.12 B) na mikroelektrodě. Vyjádřeno závislostí mediánu výšek píků změřených při potenciálech a periodách uvedených výše, na koncentraci glukózy v roztoku pro $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm⁻³ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³.

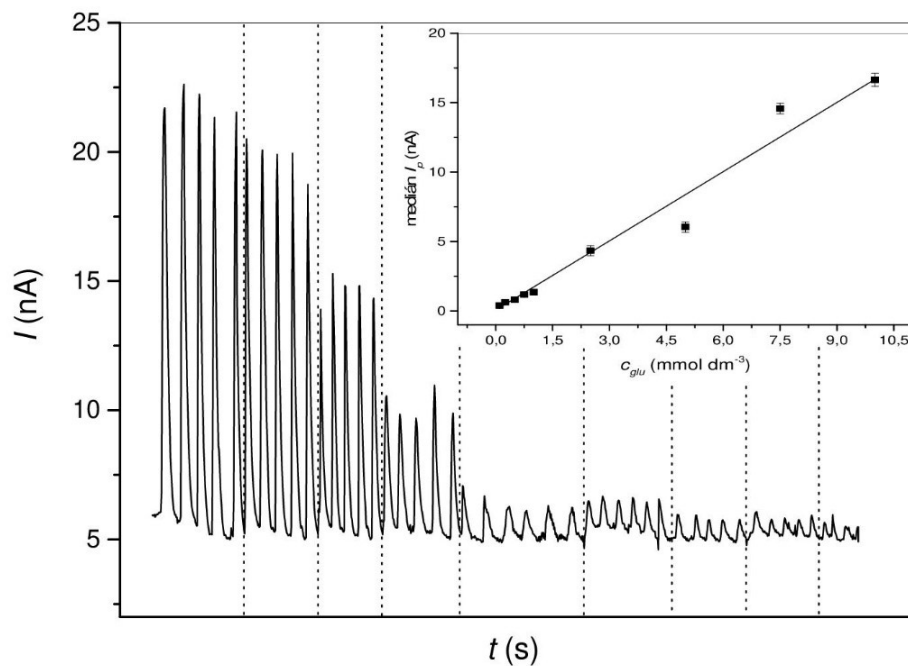
Tab 4.18 Parametry kalibračních závislostí pro zlatou mikroelektrodu

	Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [μA mol ⁻¹ dm ³]	Úsek [nA]	R
PAD	1·10 ⁻² až 1·10 ⁻⁴	1,96	0,143	0,993
Q-PAD	1·10 ⁻² až 1·10 ⁻⁴	1,66	0,0640	0,985

Tab 4.19 Limity detekce a kvantifikace pro zlatou mikroelektrodu. Vypočteny dle vztahů 3.1 a 3.2 (viz pododíl 3.4)

	LOD [mol dm ⁻³]	LOQ [mol dm ⁻³]
PAD	2,30·10 ⁻⁴	7,66·10 ⁻⁴
Q-PAD	2,71·10 ⁻⁴	9,03·10 ⁻⁴

**Obr. 4.16** Ampérogram získaný kombinací FIA-PAD na zlaté mikroelektrodě s koncentračním rozmezím glukózy od 1·10⁻² do 1·10⁻⁴ mol dm⁻³ a uvnitř obrázku k němu příslušná kalibrační závislost s totožným koncentračním rozmezím.



Obr. 4.17 Ampérogram získaný kombinací FIA s Q-PAD na zlaté mikroelektrodě s koncentračním rozmezím glukózy od $1 \cdot 10^{-2}$ do $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³. Uvnitř obrázku k němu příslušná kalibrační závislost s totožným koncentračním rozmezím.

5 Závěr

V této bakalářské práci byl předveden vliv změny hodnot potenciálů jednotlivých pulzů při stanovení glukózy pulzní ampérometrickou detekcí se třemi a se čtyřmi pulzy v kombinaci s průtokovou injekční analýzou.

Proměřením cyklických voltamogramů roztoku glukózy s koncentrací $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ byl získán odhad hodnot potenciálů dílčích pulzů. Znatelný pík, který byl přiřazen nárůstu elektrického proudu v důsledku oxidace glukózy byl patrný pouze na mikroelektrodě, ve vsádkovém uspořádání s rychlostí měření 1 V s^{-1} v kombinaci s koncentrací glukózy v roztoku $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. To byl jeden z důvodů, proč byla takto vysoká koncentrace zvolena pro optimalizaci pulzních programů. Druhým důvodem této volby byl vysoký šum v porovnání s výškami píků, který zejména u mikroelektrody komplikoval měření s nižšími koncentracemi glukózy v roztoku pufru.

Na počátku optimalizace pulzních programů byl vždy proměřen roztok glukózy minimálně pěti nástřiky s nastavenými hodnotami jednotlivých pulzů vycházejících z proměřených voltamogramů. Vybraný potenciálový program byl otestován patnácti po sobě jdoucími nástřiky, během kterých by výška píků neměla s časem znatelně klesat. Pro tento pulzní program byla proměřena výška píků roztoků glukózy s rozmezím koncentrací od $1 \cdot 10^{-2}$ do $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ na zlaté mikroelektrodě a od $1 \cdot 10^{-2}$ do $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ na konvenční zlaté elektrodě a byla sestrojena kalibrační závislost. Pro konvenční zlatou elektrodu byly potenciálové pulzy za těchto podmínek za optimální zvoleny $+0,4 \text{ V}$ pro detekční potenciál (E_1) s délkou vkládání 400 ms , oxidačním potenciálem (E_2) $+1 \text{ V}$ vkládaným po dobu 200 ms a redukčním potenciálem (E_3) 0 V o délce 400 ms . Pro zlatou mikroelektrodu byly zvoleny stejné optimální podmínky a parametry.

Postup proměřování jednotlivých kombinací potenciálových pulzů metodou Q-PAD byl obdobný, jako při klasické PAD s tím rozdílem, že hodnoty čistícího a aktivačního potenciálu zůstaly stále na stejných hodnotách a jejich optimalizace tedy provedena nebyla. Vhodnost vybraných potenciálových kombinací byla pak otestována patnácti po sobě jdoucími nástřiky, zda výšky píků znatelně neklesají, což by poukazovalo na nedostatečné čištění elektrody od naadsorbovaných (mezi)produktů oxidace. Pro zlatou pracovní elektrodu byly zvoleny optimální hodnoty potenciálů $+0,2 \text{ V}$ pro detekční (E_1)

s délkou vkládání 400 ms, -2 V pro čistící potenciál (E_2) vkládaný po dobu 20 ms, pro aktivační potenciál (E_3) $+0,6$ V po dobu 10 ms a redukční potenciál (E_4) 0 V na dobu 70 ms. Parametry pro zlatou pracovní mikroelektrodu se od ní liší pouze v hodnotě detekčního potenciálu (E_1), která činí $+0,4$ V. Také pro tyto pulzní programy byla proměřena koncentrační závislost a byla sestrojena kalibrační přímka pro totožné koncentrační rozmezí, které bylo proměřeno klasickou PAD. Pro konvenční zlatou elektrodu byla citlivější metoda Q-PAD s větší číselnou hodnotou směrnice, naopak pro mikroelektrodu byla za citlivější vyhodnocena klasická třípotenciálová PAD. Dosažené limity detekce a kvantifikace pro obě elektrody jsou uvedeny v tabulce 5.1:

Tab. 5.1 Limity detekce a kvantifikace pro konvenční elektrodu a mikroelektrodu

		LOD	LOQ
		[mol dm ⁻³]	[mol dm ⁻³]
Zlatá elektroda	PAD	$8,02 \cdot 10^{-5}$	$2,67 \cdot 10^{-4}$
	Q-PAD	$1,78 \cdot 10^{-5}$	$5,93 \cdot 10^{-5}$
Mikroelektroda	PAD	$2,30 \cdot 10^{-4}$	$7,66 \cdot 10^{-4}$
	Q-PAD	$2,71 \cdot 10^{-4}$	$9,03 \cdot 10^{-4}$

Komplikací při měření s mikroelektrodou byl poměrně vysoký šum, ve kterém se proudový signál oxidace glukózy, oproti zlaté elektrodě, ztrácel při vyšší koncentraci glukózy ve studovaném roztoku. I přes to, že v absolutní hodnotě byl šum na mikroelektrodě menší, poměr signál/šum byl v porovnání s konvenční zlatou elektrodou také menší. Bylo vyzkoušeno ještě dodatečné uzemnění samotného detektoru a umístění části aparatury do Faradayovy klece, nicméně nebylo dosaženo lepších výsledků. Z tohoto důvodu jsou hodnoty LOD a LOQ pro zlatou mikroelektrodu vyšší, a tedy horší než pro konvenční zlatou elektrodu. Nelze zcela jasně určit, zda hlavním problémem byl vysoký šum na mikroelektrodě či příliš nízké proudové odezvy, nicméně na výsledek tato skutečnost nemá velký vliv.

Závěrem lze říci, že změnou hodnot jednotlivých potenciálových pulzů je možnost stabilitu odezvy v zásadě jednoduše regulovat, respektive ovlivňovat účinnost potenciostatického čištění a reaktivaci elektrodového povrchu. Upřednostnit zlatou mikroelektrodu před konvenční elektrodou se konkrétně v tomto typu stanovení nejevilo

jako značná výhoda, naopak použitím konvenční zlaté elektrody bylo dosaženo nižších hodnot limitu detekce a limitu kvantifikace pro obě metody.

6 Seznam literatury

- [1] Kamenev, A. I. Electrochemical detection of components in a flow. *Journal of Analytical Chemistry* **57**, p. 935–939 (2002).
- [2] Trojanowicz, M. Recent developments in electrochemical flow detections-A review. Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **653**, p. 36–58 (2009).
- [3] Štulík, K.; Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. Praha, SNTL, 1989.
- [4] Siangproh, W.; Leesutthipornchai, W.; Dungchai, W.; Chailapakul, O. Electrochemical Detection for Flow-Based System: A Review. *Journal of Flow Injection Analysis* **26**, p. 5–25 (2009).
- [5] Tóth, K.; Štulík, K.; Kutner, W.; Fehér, Z.; Lindner, E. Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: Characterization and classification (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, **76**, p. 1119–1138 (2004).
- [6] Trojanowicz, M.: *Flow injection analysis: Instrumentation and Applications*, Singapore, 2000, p. 129.
- [7] Chen, S.: Practitcal Electrochemical cells. Ciobanu, M.; Wilburn, J., P.; Krim, M., L.; Cliffel, D., E. In: *Handbook of Electrochemistry*, Oxford, Elsevier Science & Technology, 2007, p. 33-56.
- [8] LaCourse, W. R.; Modi, S. J. Microelectrode applications of pulsed electrochemical detection. *Electroanalysis*, **17**, p. 1141–1152 (2005).
- [9] Johnson, D. C.; LaCourse, W. R. Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection at Gold and Platinum Electrodes. *Analytical Chemistry*, **62**, 589A-597A (1990).
- [10] Fedorowski, J.; LaCourse, W. R. A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **861**, p. 1–11 (2015).
- [11] LaCourse, W. R.; Swartz, M. Pulsed electrochemical detection: Waveform evolution. *LCGC North America*, **29**, p. 584–597 (2011).

-
- [12] LaCourse, W. R.; Johnson, D. C. Optimization of Waveforms for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Based on Pulsed Voltammetry. *Analytical Chemistry*, **65**, p. 589A-597A (1993).
- [13] Rocklin, R. D.; Clarke, A. P.; Weitzhandler, M. Improved Long-Term Reproducibility for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates via a New Quadruple-Potential Waveform. *Analytical Chemistry* **70**, p. 1496–1501 (1998).
- [14] Jensen, M. B.; Johnson, D. C. Fast Wave Forms for Pulsed Electrochemical Detection of Glucose by Incorporation of Reductive Desorption of Oxidation Products. *Analytical Chemistry*, **69**, p. 1776–1781 (1997).
- [15] Fedorowski, J.; LaCourse, W. R. A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **861**, p. 1-11(2015); cf. Chemical Abstracts 85:101151.
- [16] Fedorowski, J.; LaCourse, W. R. A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **861**, p. 4 (2015); cf. Chemical Abstracts 105:218102.
- [17] Williams, D. G.; Johnson, D. C. Pulsed voltammetric detection of arsenic(III) at platinum electrodes in acidic media. *Analytical Chemistry* **64**, p. 1785–1789 (1992).
- [18] Johll, M. E.; Williams, D. G.; Johnson, D. C. Activated Pulsed Amperometric Detection of Cysteine at Platinum Electrodes in Acidic Media. *Electroanalysis* **9**, p. 1397–1402 (1997).
- [19] Jandik, P.; Cheng, J.; Avdalovic, N. Analysis of amino acid-carbohydrate mixtures by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **60**, p. 191–203 (2004).
- [20] Matysik, F. M. Miniaturization of electroanalytical systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**, p. 33–35 (2003).
- [21] Štulík, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Mareček, V.; Kutner, W. Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical report). *Pure and Applied Chemistry* **72**, p. 1483–1492 (2000).
- [22] Pons, S.; Fleischmann, M. The Behavior of Microelectrodes. *Analytical Chemistry* **59**, p. 1391A-1399A (1987).

-
- [23] Ciobanu, M.; Wilburn, J., P.; Krim, M., L.; Cliffel, D., E.: Microelectrode Application. In: *Handbook of Electrochemistry*, Oxford, Elsevier Science & Technology, 2007, p. 171-188.
- [24] Wightman, R. M. Microvoltammetric Electrodes. *Analytical Chemistry* **53**, p. 1125A-1134A (1981).
- [25] Guzmán, A.; Agüí, L.; Pedrero, M.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Flow injection and HPLC determination of furosemide using pulsed amperometric detection at microelectrodes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33**, p. 923–933 (2003).
- [26] Skoog, D., A.; West, D., M.; Holler, F., J.; Crouch, S., R.: *Analytická chemie*, Praha, VŠCHT Praha, 2019, p. 589.
- [27] Tomčík, P.; Jursa, S.; Bustin, D.; Tvarožek, V. Microelectrode Arrays with Interacting Diffusion Layers: Fabrication and Characterization. *Chemické Listy*, **92**, p. 626–632 (1998).
- [28] Černý, M.; Trnka, T.; Buděšínský, M.: *Sacharidy*, Praha, ČSCH, 2010
- [29] McMurry, J: *Organická chemie*, Brno, VUTIUM, 2015, p. 859-889.
- [30] D-glucose. *Reaxys* [online]. [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/RX007_2615457502916662628/UlgwMDc9UyNIMDIzPUMjSDAyNT1S/list/70442e3c-36b6-4c5c-b2c1-451fe395fe5f/1/desc/IDE.NUMREF///
- [31] D-glucopyranose. *Reaxys* [online]. [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/RX013_2615457502916662628/UlgwMTM9UyNIMDMjPUMjSDAzMz1S/list/3a5e0ee2-e2e7-4c99-87a2-1c976b8029ec/1/desc/IDE.NUMREF///
- [32] Jenkins, D.J.A; Augustin, L.S.A; Malick, A.; Esfahani., A.; Kendall., C.W.C., Glucose: Chemistry and dietary sources. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*, 3rd ed. Caballero, B.; Allen, L.; Prentice, A., Academic Press, 2013, p. 372-380.
- [33] Guttman, A. Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. in *Journal of Chromatography A*, **763**, p. 271–277 (1997).
- [34] Paulus, A.; Klockow, A. Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **720**, p. 353–376 (1996).

-
- [35] Brunt, K. Liquid chromatography of carbohydrates in human food and animal feeding stuffs. *LC-GC North America*, **32**, p. 10–17 (2014).
- [36] Jie, L.; Yuan, Z.; Yu, Z.; Xue-song, F. Progress in the pretreatment and analysis of carbohydrates in food: An update since 2013. *Journal of Chromatography A*, **1655**, p. 1-16 (2021).
- [37] Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**, p. 350–356 (1956).
- [38] BeMiller, J., N.: Carbohydrate analysis. In: *Food analysis, Fifth edition*. Nielsen, S., S. (ed.), Switzerland AG, Springer Nature, 2017, p. 333-357.
- [39] Rodríguez-Sánchez, S.; Soria, A. C.; Lebrón-Aguilar, R.; Sanz, M. L.; Ruiz-Matute, A. I. Evaluation of different ionic liquid stationary phases for the analysis of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **411**, p. 7461–7472 (2019).
- [40] Nagy, G.; Peng, T.; Pohl, N. L. B. Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates. *Analytical Methods*, **9**, p. 3579–3593 (2017).
- [41] Honda, S.; Akao, E.; Suzuki, S.; Okuda, M.; Kakehi, K.; Nakamura: High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Analytical Biochemistry*, **180**, p. 351–357 (1989).
- [42] Dvořáčková, E.; Šnobllová, M.; Hrdlička, P. Carbohydrate analysis: From sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science*, **37**, p. 323–337 (2014).
- [43] Ozdemir, A.; Lin, J. L.; Gillig, K. J.; Gulfen, M.; Chen, C. H. Analysis of Saccharides by the Addition of Amino Acids. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **27**(6), p. 1113–1121 (2016)