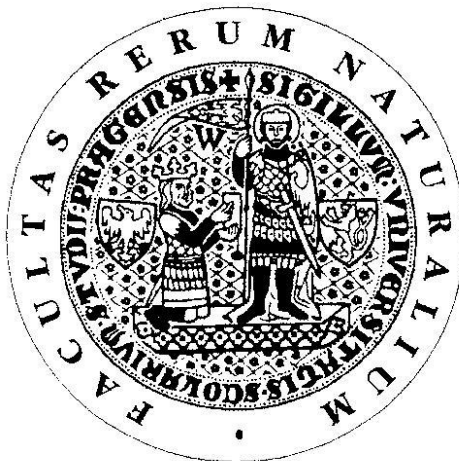


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Romana Jarošová

STANOVENÍ VANILINU NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Determination of vanillin using carbon paste
electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2011

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

Prohlášení

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

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

V Praze dne 3. dubna 2011

.....
podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Němcové za veškerou pomoc a všem členům katedry analytické chemie za vytvoření přátelského prostředí v průběhu mé práce. V neposlední řadě děkuji také svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Romana Jarošová

Název práce: Stanovení vanilinu na uhlíkové pastové elektrodě.

Anotace: Tato práce se zabývá stanovením vanilinu metodou průtokové injekční analýzy (FIA) s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a spektrofotometrickou detekcí.

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení vanilinu pomocí FIA. Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny metodou lineární regrese. Meze detekce byly vypočteny z kalibračních křivek. Při stanovení vanilinu metodou FIA s elektrochemickou detekcí na CPE bylo dosaženo srovnatelných výsledků jako při stanovení s detekcí spektrofotometrickou. Meze detekce byly shodné $1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Klíčová slova: vanilin, uhlíková pastová elektroda, průtoková injekční analýza, elektrochemická detekce, spektrofotometrická detekce

Title: Determination of vanillin using carbon paste electrode.

Abstract: The aim of this work is the determination of vanillin by flow injection analysis (FIA) with electrochemical detection using carbon paste electrode (CPE) and spectrophotometric detection. Optimal conditions for determination of vanillin by the FIA were found. Under optimal conditions calibration dependences were measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ to $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The calibration dependences were evaluated using linear regression method. Comparable results were achieved for the determination of vanillin by FIA with electrochemical detection using CPE and for the determination of vanillin by FIA with spectrophotometric detection. Limits of detection were identical $1.7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Key words: vanillin, carbon paste electrode, flow injection analysis, electrochemical detection, spectrophotometric detection

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 Cíl práce.....	7
1.2 Vanilin a jeho vlastnosti	7
1.2 Vanilin jako antioxidant	8
1.3 Uhlíková pastová elektroda	9
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	12
2.1 Studovaná látka	12
2.2 Použité chemikálie	13
2.3 Použitá aparatura	13
2.4 Další používaná zařízení.....	14
2.5 Pracovní postupy.....	14
2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku vanilinu	15
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	17
3.1 Optimalizace detekce.....	17
3.1.1 Vliv dávkovaného objemu studované látky.....	17
3.1.2 Vliv potenciálu pracovní elektrody	19
3.1.3 Vliv pH mobilní fáze na spektrofotometrickou detekci	21
3.1.4 Vliv průtokové rychlosti	23
3.2 Kalibrační závislosti	26
3.2.1 Elektrochemická detekce	26
3.2.2 Spektrofotometrická detekce.....	30
3.3 Opakovatelnost měření.....	34
3.3.1 Elektrochemická detekce	34
3.3.2 Spektrofotometrická detekce.....	36
4 ZÁVĚR.....	39
5 LITERATURA	41

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α	hladina významnosti
A	absorbance
A_p	plocha píku
AU, mAU	jednotky absorbance
BR	Brittonův-Robinsonův pufr
c	koncentrace
CAS	Chemical Abstracts Service
CPE(s)	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode(s))
DME	rtuťová kapková elektroda (Dropping Mercury Electrode)
ED	elektrochemická detekce
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
h_p	výška píku
I_p	proud píku
λ	vlnová délka
L	linearita
L_D	mez detekce
MeOH	methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
ρ	hustota
R	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
ROS	kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species)
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
t	čas
t_t	teplota tání
v/v	poměr objemů
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem stanovení vanilinu metodou průtokové injekční analýzy (FIA) na uhlíkové pastové elektrodě (CPE).

Cílem této práce bylo prozkoumání, nalezení a následné využití optimálních podmínek pro stanovení studované látky metodou průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě a spektrofotometrickou detekcí, porovnání obou detekcí a stanovení mezí detekce.

1.2 Vanilin a jeho vlastnosti

Vanilin je hlavní fenolovou součástí (1-3%) extraktu vanilky pravé, tropické popínavé orchideje pěstované původně v Mexiku¹, v současné době i v oblastech Madagaskaru, Tahiti a Indonézie². Kromě vanilinu obsahuje vanilka pravá také velká množství dalších organických složek, jmenovitě *p*-hydroxybenzaldehyd, *p*-hydroxybenzoovou kyselinu a vanilinovou kyselinu³.

Vanilin je jednou z 250 sloučenin obsažených ve vanilkovém extraktu. Ten se získává ethanolovou extrakcí vanilkových lusků. Zelené vanilkové lusky se suší za vysoce přísných teplotních a vlhkostních podmínek tak, aby byl získán nejen vanilin, ale také další senzory aktivní látky z glykosidických prekurzorů⁴.

V přírodě se vanilin nachází ve stopovém množství v mnoha rostlinách, např. v bramborách, narcisech a hyacintech. Je obsažen také v esenciálních olejích, a to ze skořice, hřebíčku nebo muškátového květu. Velké množství vanilinu bylo nalezeno ve všech rostlinách rodu *Vanilla*, kterých existuje přes 130 druhů, avšak pouze dva z nich, vanilka pravá a vanilka tahitská, jsou povoleny pro použití v potravinářském průmyslu⁵.

Vanilin poprvé izoloval v roce 1858 Nicolas Theodore Gobley, který odpařil vanilkový extrakt do sucha a překrytalizoval jej ve vanilin. V roce 1874 ho poprvé syntetizoval Ferdinand Tiemann a Wilhelm Haarmann z koniferinu nalezeného ve tkáních borovic. V roce 1876 byl vanilin syntetizován z guajakolu, o což se zasloužil

Karl Ludwig Reimer. Na konci devatenáctého století byla syntéza vanilinu dosažena také hydrolyzou eugenolu, hlavní složky hřebíčkového oleje⁴.

Vanilin je široce používaný v potravinách, nápojích, kosmetice a lécích. Koncentrace používaná v potravinách a nápojích je velmi široká, a to 0,3 až 33 mM⁶.

Kromě důležité chuťové funkce je vanilin ceněn i pro své antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Je považován také za afrodiziakum, v medicíně se používá pro zklidnění žaludku⁴.

Mezi metody používané pro stanovení vanilinu patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s UV detekcí^{7,8} nebo s detekcí fotodiodovým polem⁹. Dále pak plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)¹⁰ či kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis (CE))¹¹.

1.2 Vanilin jako antioxidant

Během posledních dvou desetiletí byly antioxidační vlastnosti vanilinu studovány mnoha vědci. V roce 1986 Otha *et al.* poprvé ukázal na antimutagenní účinek vanilinu na mutagenze vyvolané 4-nitrochinolin-1-oxidem, furylfuramidem, kaptanem nebo methylglyoxalem v *Escherichia coli*. Následně bylo zjištěno, že vanilin výrazně snižuje mutace vyvolané působením ultrafialového světla nebo rentgenového záření v savčích buňkách *in vitro* a *in vivo*.

Další prokázané tlumivé účinky má vanilin na mutace způsobené mitomycinem C a methylmethansulfonátem v somatických buňkách octomilky obecné a v buňkách kostní dřene myši. Předpokládá se, že antimutagenní vlastnosti vanilinu je dosaženo zlepšením rekombinačních oprav genů tím, že odblokuje inhibici opravy genu. Vanilin „uklízí“ kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species, ROS), čímž omezí jejich vliv. Vanilin mění jejich strukturu a tím také jejich funkci.

Obecně platí, že ROS generované *in vivo* (hydroxylový radikál, peroxidový radikál) jsou vysoce reaktivní a nestabilní. Zdá se, že rozhodující je rychlost likvidace ROS, aby nestihly napadnout a poškodit biomolekuly. I když existuje mnoho různých zpráv o antioxidačních účincích na ROS a jiné radikály, toto je s jistotou jedna z cest, jak vanilin působí proti mutacím.

Na druhou stranu bylo velmi dobře zdokumentováno, že antioxidační schopnost vanilinu je velmi nízká; vanilin nejméně účinkoval proti superoxidačnímu aniontu v pěti testovaných fenolových sloučeninách a neměl téměř žádný vliv na lipidovou peroxidaci. Vanilin vykazoval jen malou nebo žádnou antioxidační aktivitu v 1,1-difenyl-pikrylhydrazylu, β -karotenu, či při oxidaci linolové kyseliny a cholesterolu.

Avšak vanilin dokázal inhibovat oxidaci bílkovin a lipidů, které byly vyvolány fotosenzitivitou v mitochondriích krysích jater. Navíc vanilin vystavený hydroxylovým radikálům a 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonové kyselině vykazoval vychytávací (scavenging) aktivitu na radikály.

Rovněž však bylo zjištěno, že vanilin je špatný antioxidant a samotný vanilinový radikál podporuje oxidaci glutathiolu, sulfhydrylových skupin ve vaječném bílku a NADPH. Proto neexistují jednoznačné důkazy o tom, že vanilin je skutečně důležitý antioxidant⁵.

1.3 Uhlíková pastová elektroda

V roce 1958 R. N. Adams poprvé představil nový typ elektrody, uhlíkovou pastovou elektrodu (Carbon Paste Electrode, CPE). Stojí za povšimnutí, že objev uhlíkové pasty je úzce spojen s polarografií Prof. Heyrovského a jeho rtuťovou kapkovou elektrodou (Dropping Mercury Electrode, DME). Několik let po představení uhlíkové pasty její vynálezce připustil, že prvotním záměrem bylo vytvoření uhlíkové kapkové elektrody. Senzor byl zkonstruován podobně jako u DME, tj. z nádržky, ve které byl uhlíkový prášek v tekutině připojený ke kapiláře, což umožňovalo pozorovat pravidelně se objevující kapičky uhlíkové elektrody.

R. N. Adams doufal, že toto nastavení může sloužit jako určitá analogie ke rtuťové kapkové elektrodě, která by byla využitelná k anodické oxidaci organických sloučenin tam, kde elektrody na rtuťové bázi byly neaplikovatelné. Ačkoliv praktické experimenty s uhlíkovou kapkovou elektrodou byly neúspěšné, výše zmíněná hustší směs uhlíkového prášku a organické kapaliny se ukázala jako slibný elektrodový materiál. Její použitelnost byla zdůrazňována už v průkopnických záznamech, následný boom na poli elektrochemických senzorů toto očekávání jenom potvrdil¹².

Uhlíková pastová elektroda je speciální druh heterogenních uhlíkových elektrod. Skládá se z elektrodového teflonového pouzdra a uhlíkové pasty uvnitř dutého prostoru

elektrody (Obr. 1.1). Uhlíková pasta je tvořena směsí připravené z uhlíkového prášku (např. grafit, skelný uhlík a další uhlíkaté materiály) a vhodného kapalného pojiva (pastovací kapaliny). Kapalným pojivem bývá většinou inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkává látka, např. silikonový nebo parafínový olej.¹³

Uhlíková pastová elektroda je připravována smíšením uhlíkového prášku s pastovací kapalinou za vzniku uhlíkové pasty, kterou se plní elektrodové pouzdro. Optimální poměr se obvykle volí v rozmezí 0,4-0,5 ml pastovací kapaliny a 1 g uhlíkového prášku. Grafitový prášek lze velmi dobře smístit s kapalným pojivem v porcelánové třecí misce, přičemž homogenizaci pasty je vhodné provést po několika etapách, kdy se pozvolna vznikající hmota postupně seškrabuje ze stěn misky na její dno, kde lze lépe využít energický tlak a tření tloučku. Pasta je pak hotová v několika minutách a může se uskladnit nebo lépe ihned použít k přípravě elektrody. K ustálení chování uhlíkové pasty dochází většinou až po určité době, proto se doporučuje pastu nechat 24 hodin ustát, aby pasta homogenizovala a vykazovala stabilní vlastnosti. Protože může dojít k pozvolnému vysychání pasty, není vhodné nechávat pastu delší dobu na vzduchu. V důsledku toho se doporučuje uchovávat elektrodu ponořenou koncovým otvorem v nádobě s destilovanou vodou^{14, 15}. Uhlíkovou pastovou elektrodu lze uchovávat až několik měsíců, před každým měřením je však nutné obnovit povrch elektrody otřením pasty např. do vlhkého filtračního papíru¹⁶.

Uhlíkové pastové elektrody mají poměrně široký potenciálový rozsah, v kyselých roztocích přibližně -1,0 V až +1,5 V vs. SCE. V neutrálním prostředí -1,3 V až +1,4 V, v alkalických roztocích je rozsah v rozmezí -1,2 V až +1,2 V¹³. Ačkoliv nejsou příliš využívány v kombinaci s FIA¹⁷, mají uhlíkové pastové elektrody mnoho výhod. Kromě širokého potenciálového okna jsou ceněny také pro nízké hodnoty zbytkových proudů a možnost chemických nebo biologických modifikací uhlíkové pasty¹⁸. CPEs jsou citlivé detektory (typické limity detekce jsou kolem $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)¹⁹, mají velice snadnou regenerovatelnost pasivovaného povrchu elektrody, jednoduchou robustní konstrukci²⁰ a nízkou cenu²¹.

Nevýhodou uhlíkových past je, že nejsou příliš použitelné pro měření při potenciálech nižších než -0,5 V, vykazují totiž nezanedbatelný proud, který vzniká v důsledku redukce kyslíku rozpuštěného v pastě¹³.

CPEs mohou být používány pro analýzu léčiv a jejich reziduí²¹. V organické analýze jsou uhlíkové pastové elektrody využívány hlavně pro přímé stanovení

oxidovatelných léčiv v různých farmaceutických výrobcích nebo k přímému stanovení některých snadno oxidovatelných fenolů, aromatických aminů nebo thiolů¹⁷.

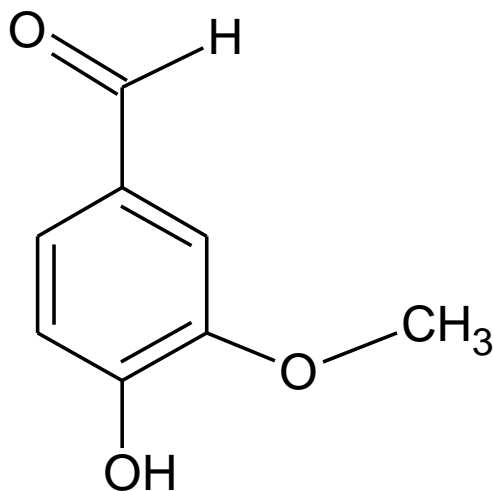


Obr. 1.1
Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Studovaná látka

Vanilin¹⁵⁻¹⁷



C.A.S. Name: 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde

C.A.S. Registry number: 121-33-5

SMILES: O=CC1=CC(OC)=C(O)C=C1

$C_8H_8O_3$

$M_r = 151,15$

$t_f = 80-81\text{ }^\circ\text{C}$

$pK_a = 7,396$

Fyzikální stav: Bílý prášek charakteristické vůně

2.2 Použité chemikálie

Studovaná látka: Vanilin, čistota $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, USA)

Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (Merck, Německo). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku směsí voda:methanol v poměru shodném se složením mobilní fáze. Roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tlumivý roztok:

Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (Lach-Ner, ČR) o koncentraci $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s vodným roztokem obsahujícím kyselinu boritou (Lachema, ČR), octovou (99,8%, Lach-Ner, ČR) a kyselinu fosforečnou (84-87%, Lach-Ner, ČR), všechny o koncentraci $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem (Jenway, UK).

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

Příprava CPE:

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

2.3 Použitá aparatura

Pumpa: vysokotlaká pumpa Beta 10 (Ecom, ČR)

Dávkovač: LCI 30 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR), nástřík prováděn injekční stříkačkou

Detektory: *Spektrofotometrický UV/VIS detektor* Sapphire 800 (Ecom, ČR)

Amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)

Elektrody: *Pracovní elektroda:* uhlíková pastová elektroda tvořena teflonovým tělem, vytlačení pasty umožňoval nerezový píst

Referenční elektroda: argentchloridová elektroda s $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$ (ETP CZ R 006-05, Monokrystaly, ČR)

Pomocná elektroda: platinová drátková elektroda

Programové vybavení: Clarity (Data Apex, ČR), pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)

2.4 Další používaná zařízení

Spektrofotometr: Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometer (USA), měřeno v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm

pH metr: digitální měřicí přístroj Conductivity and pH metr 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou

Odstranění vzduchu: ultrazvuková čistička PSO200A (Powersonic, USA)

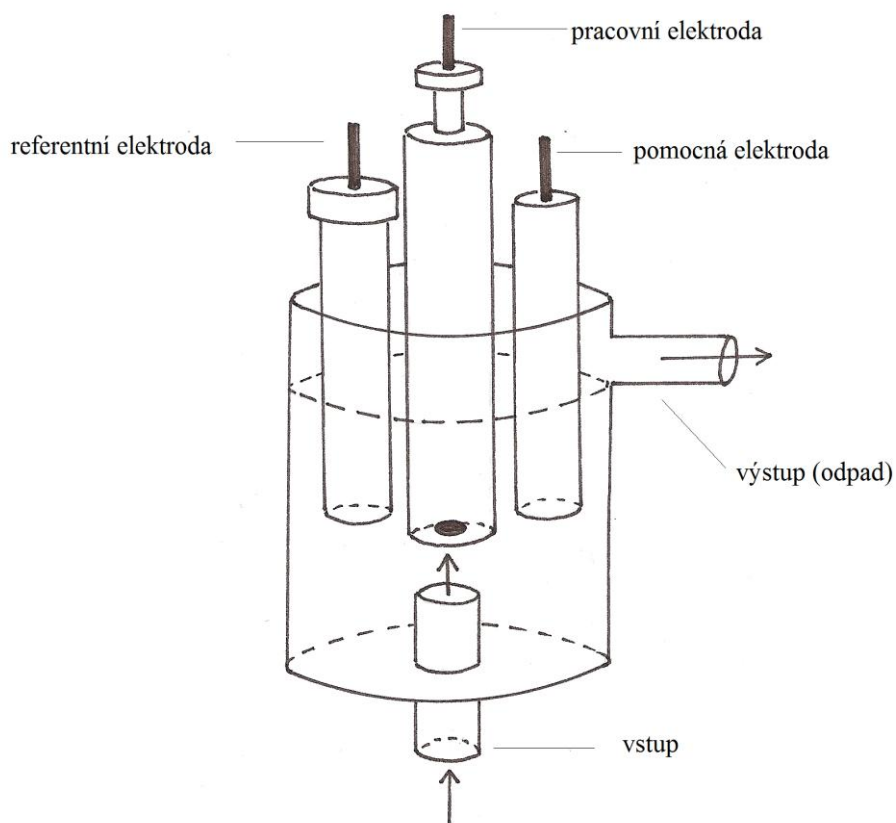
2.5 Pracovní postupy

Stanovován byl roztok vanilinu ve směsi voda:methanol v poměru 1:1 (v/v). UV detekce probíhala při vlnové délce 230 nm.

Elektrochemický detektor (ED) typu wall-jet (Obr. 2.1) byl zapojen sériově za UV detektor a pracoval v tříelektrodovém zapojení; pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda, referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda s $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a pomocnou elektrodou byla platinová drátková elektroda. Pomocná, referentní a pracovní elektroda, na kterou byl přiveden konec kapiláry, byla ponořena v mobilní fázi.

Kalibrační závislosti vanilinu byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $2\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechna měření byla provedena nejméně třikrát. Získané závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Mez detekce byla vypočítána z rovnice regrese jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Všechna měření probíhala za laboratorní teploty i tlaku.



Obr. 2.1
Detektor typu wall- jet.

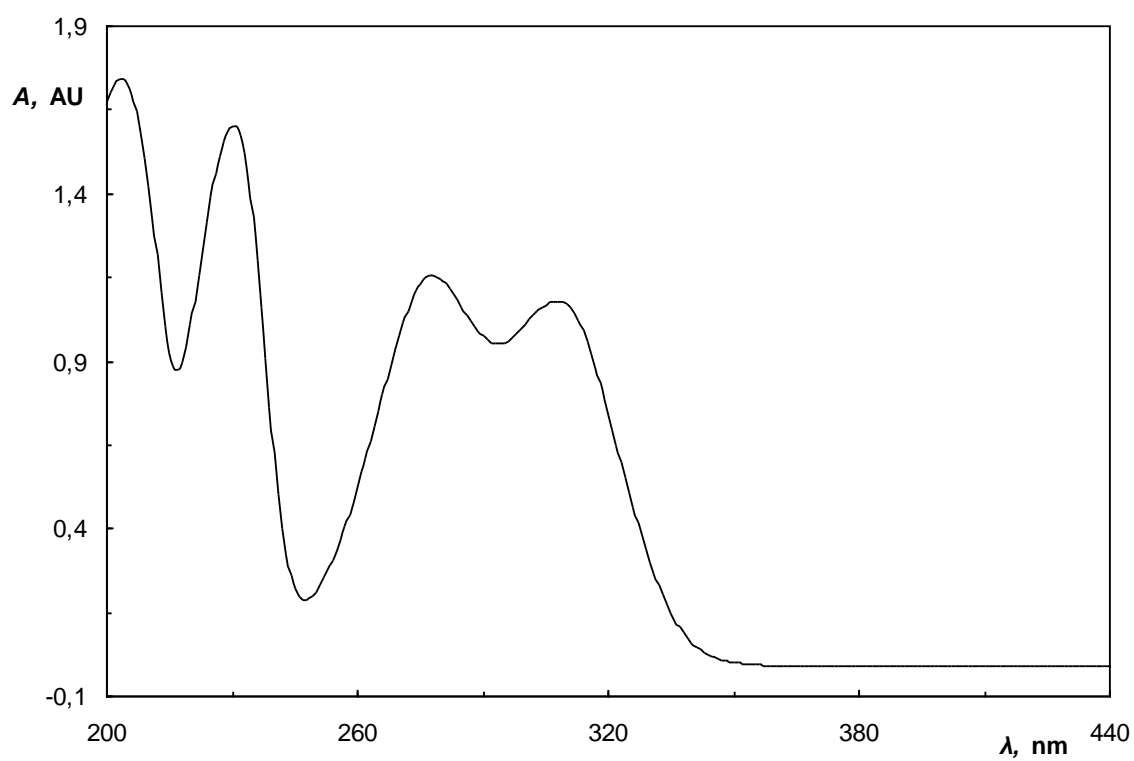
2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku vanilinu

Stálost zásobního roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu byla sledována spektrofotometricky při třech vlnových délkách (230, 278 a 308 nm) v 1 mm křemenných kyvetách proti methanolu v rozmezí vlnových délek 200 – 700 nm po dobu 3 měsíců. Naměřené spektrum je uvedeno na Obr. 2.2.

Z hodnot uvedených v Tab. 2.1 vyplývá, že v průběhu sledované doby nedošlo k výraznému poklesu koncentrace vanilinu. Roztok je tedy při uchování ve tmě v chladničce při konstantní teplotě 5 °C nejméně 3 měsíce stálý.

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

t (dny)	$\lambda = 230 \text{ nm}$		$\lambda = 278 \text{ nm}$		$\lambda = 308 \text{ nm}$	
	A (AU)	%	A (AU)	%	A (AU)	%
0	1,601	100,0	1,157	100,0	1,080	100,0
1	1,599	99,9	1,152	99,6	1,078	99,8
3	1,597	99,8	1,150	99,4	1,075	99,5
10	1,603	100,1	1,159	100,2	1,081	100,1
24	1,593	99,5	1,153	99,7	1,077	99,7
59	1,592	99,4	1,150	99,4	1,071	99,2
87	1,594	99,6	1,148	99,2	1,075	99,5

**Obr. 2.2**UV-VIS spektrum $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vanilinu v methanolu.

Měřeno v křemenné kyvetě o tloušťce 1 mm proti methanolu.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Optimalizace detekce

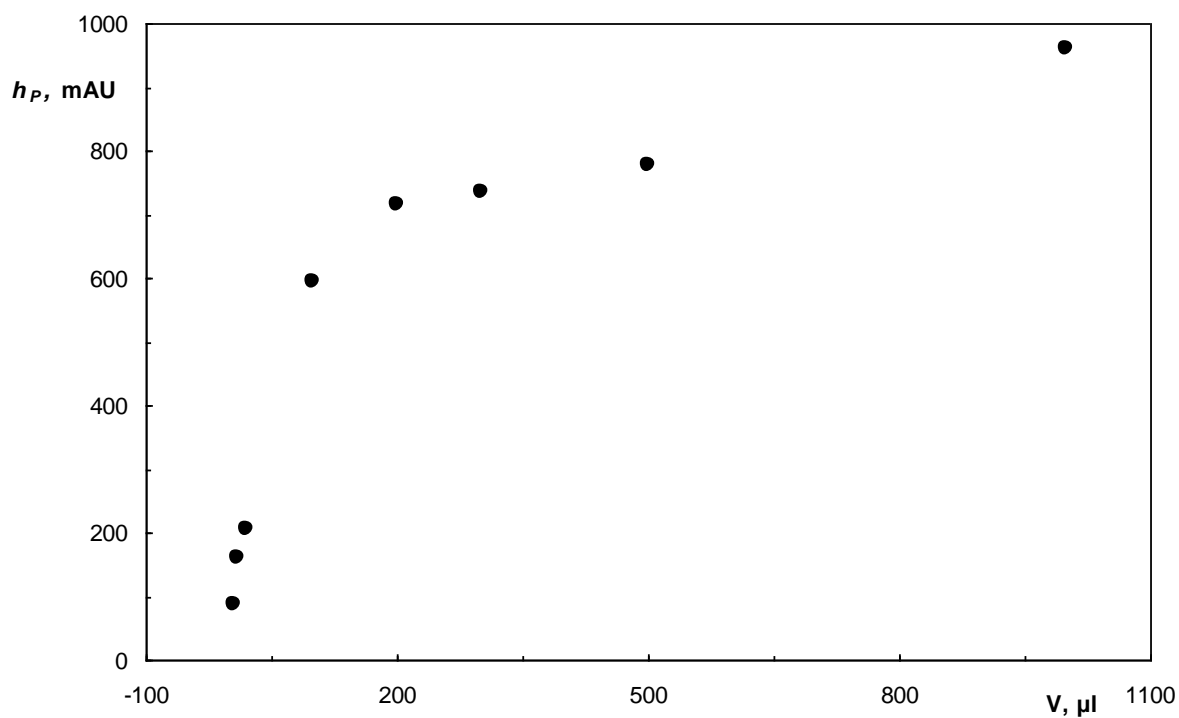
Pro optimalizaci stanovení vanilinu metodou FIA je důležité nalezení podmínek, při kterých je pík nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný. Optimalizován byl dávkovaný objem studované látky, potenciál pracovní elektrody, pH vodné složky mobilní fáze a průtoková rychlost.

3.1.1 Vliv dávkovaného objemu studované látky

Byla proměřena závislost výšky, resp. plochy píku na dávkovaném objemu s využitím spektrofotometrické detekce. Proměřeny byly hodnoty objemů v rozmezí 5 až 1000 μl . Průtoková rychlost byla 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, mobilní fází byl Brittonův-Robinsonův pufr o pH 8 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).

Získané závislosti výšky píků, resp. plochy píků na dávkovaném objemu jsou znázorněny na Obr. 3.1, resp. Obr. 3.2. Záznam FIA pro různé dávkované objemy je na Obr. 3.3.

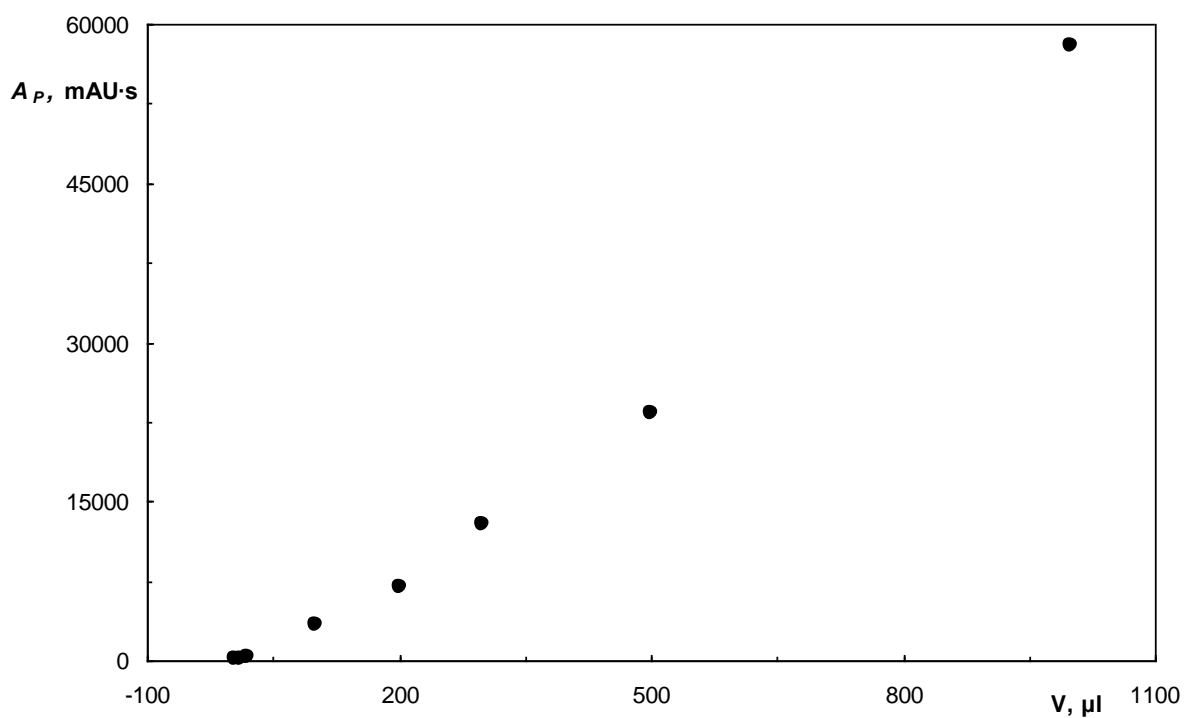
Jako optimální dávkovaný objem pro stanovení vanilinu s ohledem na velikost píku a spotřebu stanovované látky byl zvolen objem 100 μl .



Obr. 3.1

Závislost výšek píků (h_P) na dávkovaném objemu.

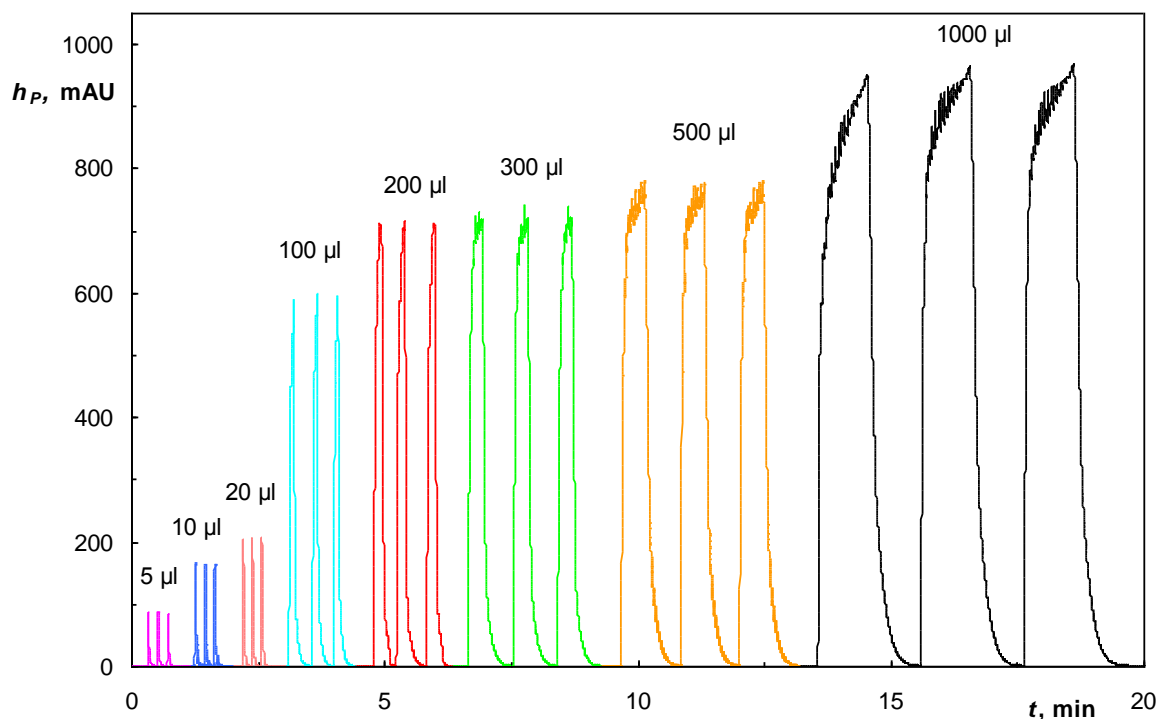
Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR pufr o pH 8 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.2

Závislost ploch píků (A_P) na dávkovaném objemu.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR o pH 8 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.3

Záznam FIA se spektrofotometrickou detekcí ($\lambda=230$ nm) pro různé dávkované objemy.

Dávkováno 5, 10, 20, 100, 200, 300, 500 a 1000 μl roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze BR o pH 8 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

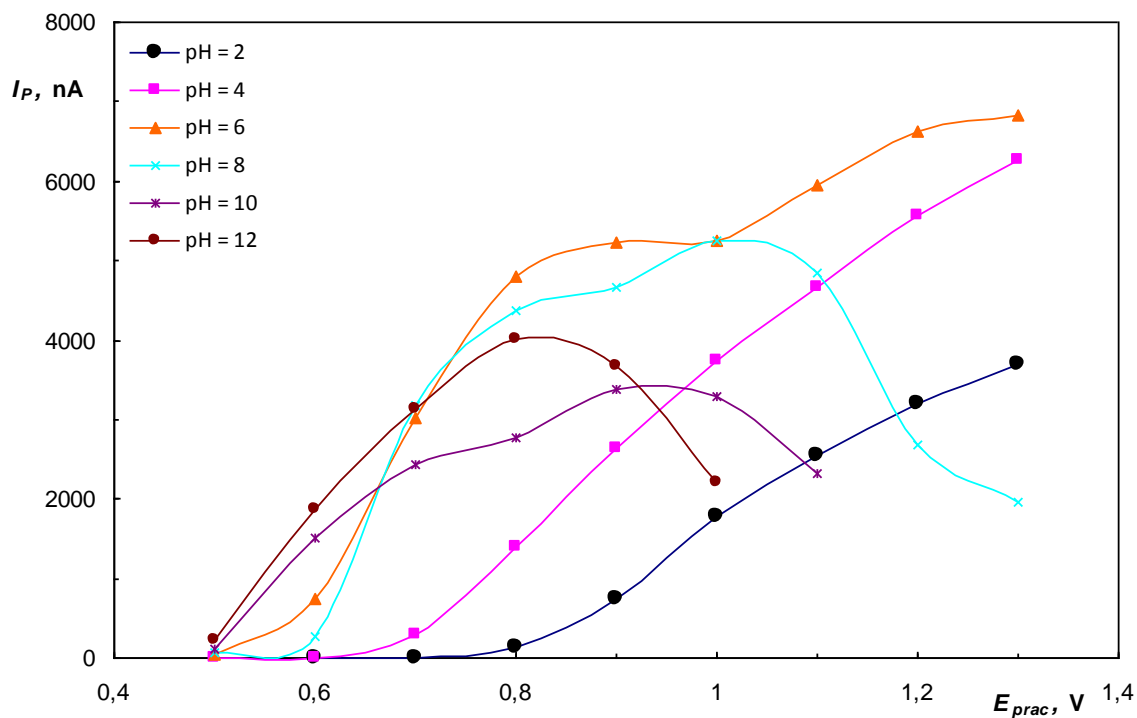
3.1.2 Vliv potenciálu pracovní elektrody

Vliv potenciálu pracovní elektrody byl vyhodnocen z výšek a ploch píků.

Měření bylo provedeno pro pH vodné složky mobilní fáze 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Proměřeny byly hodnoty potenciálu pracovní elektrody v rozmezí +0,1 až +1,3 V. Dávkováno bylo 100 μl roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, průtoková rychlost byla $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Získané hydrodynamické voltamogramy jsou znázorněny na Obr. 3.4 pro výšky píků a na Obr. 3.5 pro plochy píků.

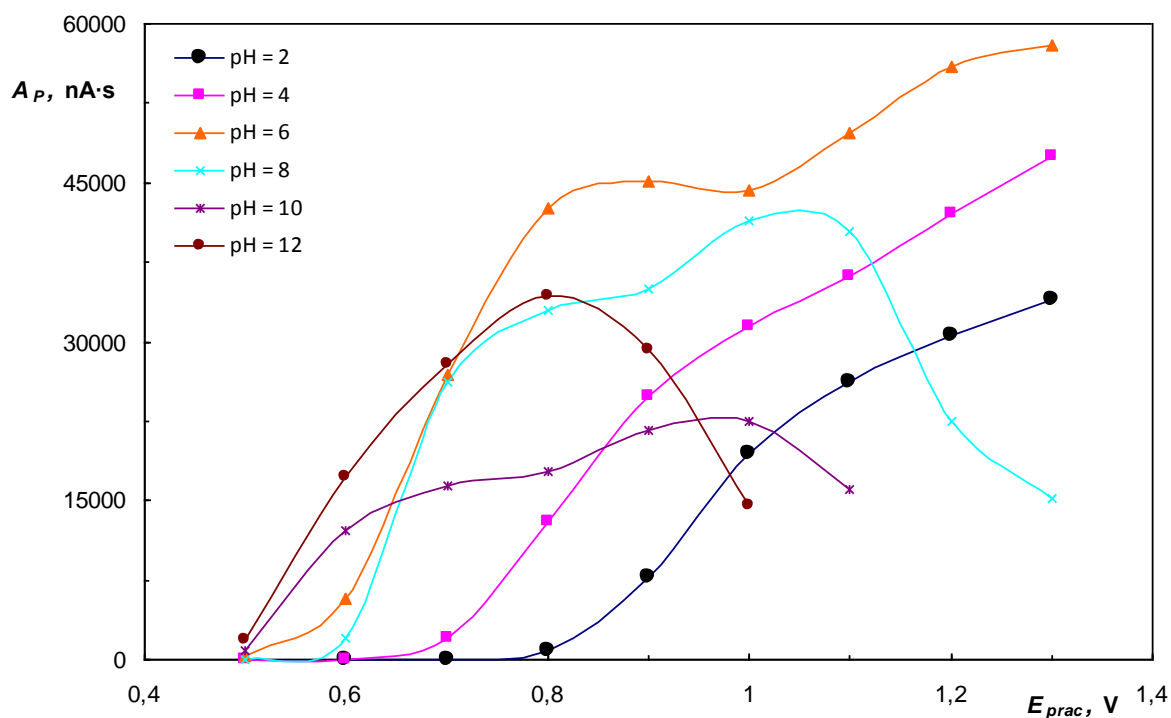
Jako optimální potenciál pracovní elektrody byl zvolen potenciál +1,1 V v mobilní fázi BR pufr pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).



Obr. 3.4

Závislost výšek píků (I_p) na vloženém potenciálu pracovní elektrody.

Elektrochemická detekce, dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR pufr (pH uvedeno v grafu) s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.5

Závislost ploch píků (A_p) na vloženém potenciálu pracovní elektrody.

Elektrochemická detekce, dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR pufr (pH uvedeno v grafu) s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.

3.1.3 Vliv pH mobilní fáze na spektrofotometrickou detekci

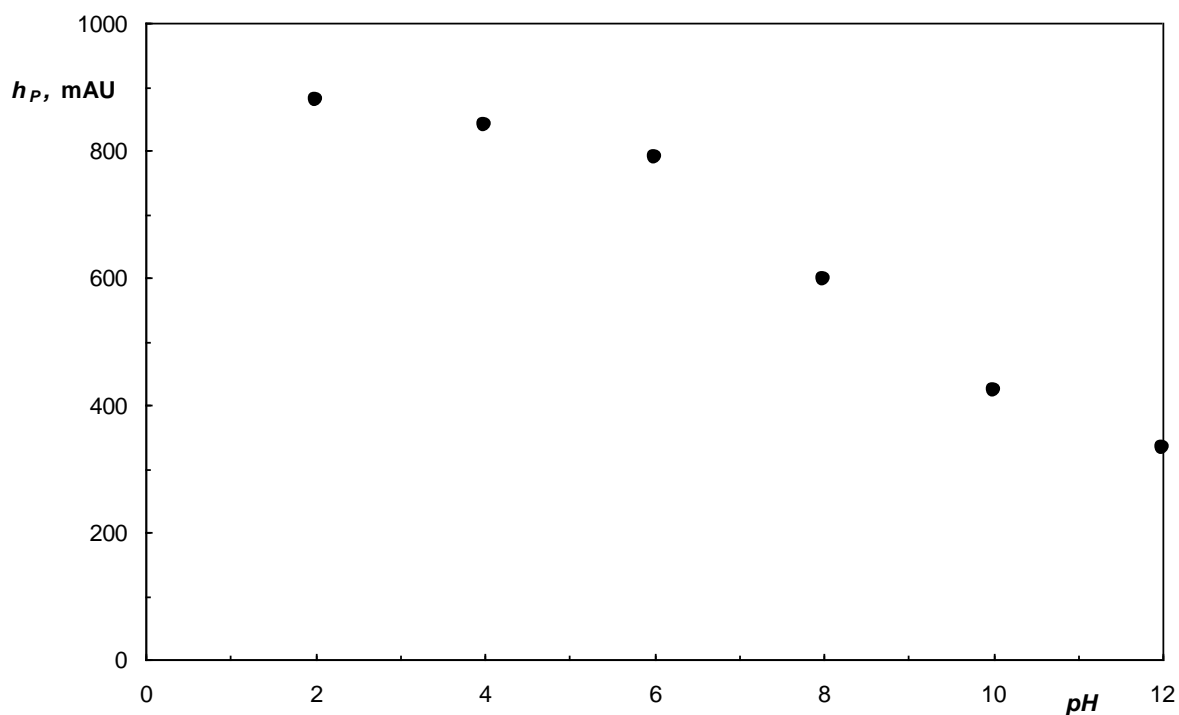
Jelikož byla pozorována změna absorpance při různých pH mobilní fáze, bylo chování roztoku vanilinu o různém pH proměřeno také spektrofotometricky.

Pro stanovení optimálního pH vodné složky mobilní fáze při stanovení vanilinu metodou FIA byla změřena závislost výšky, resp. plochy píku na pH vodné složky použité mobilní fáze. Měření bylo provedeno pro pH mobilní fáze 2, 4, 6, 8, 10 a 12 (BR pufru). Dávkováno bylo 100 μl roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, potenciál pracovní elektrody byl +1,1 V a průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Získané závislosti jsou zobrazeny na Obr 3.6 pro výšky píků a na Obr. 3.7 pro plochy píků.

Byly měřeny roztoky vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi BR pufr o uvedeném pH s methanolem v poměru 1:1 (v/v). Spektra byla měřena v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm proti roztoku voda s methanolem v poměru 1:1 (v/v). Rozmezí vlnových délek bylo 200 – 440 nm. Proměřená spektra vanilinu v roztoku o pH 2 až 12 jsou uvedena na Obr. 3.8.

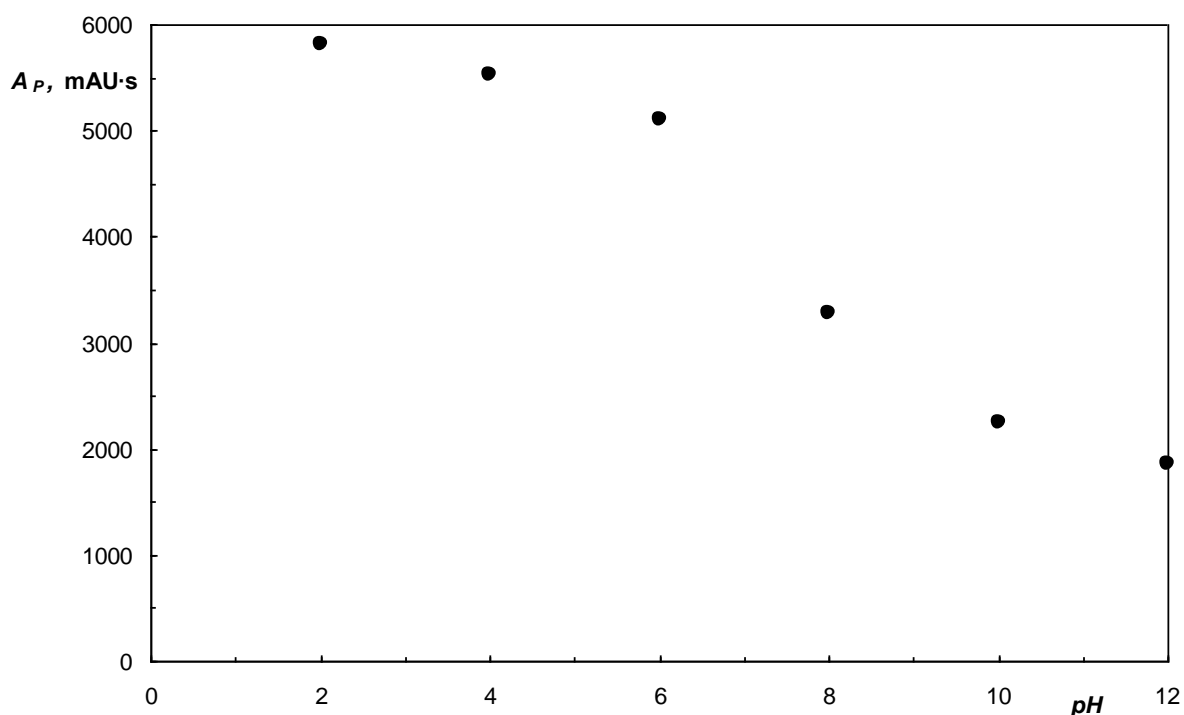
Z uvedených obrázků vyplývá, že výška, resp. plocha píků s rostoucím pH klesá. Výška i plocha píků je tedy největší při pH 2, s ohledem na hydrodynamické voltamogramy a UV-VIS spektrum byl jako optimální pro další měření zvolen BR pufr pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).



Obr. 3.6

Závislost výšek píků (h_P) na pH vodné složky mobilní fáze.

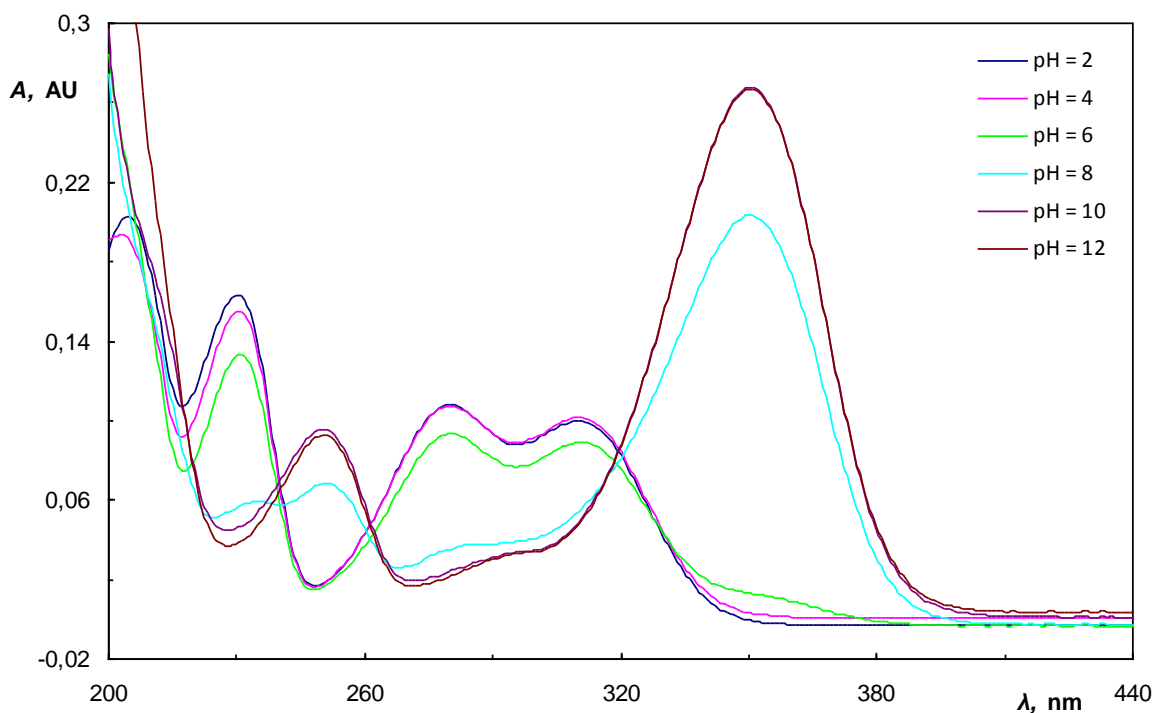
Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR pufr o uvedeném pH s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.7

Závislost ploch píků (A_P) na pH vodné složky mobilní fáze.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$, mobilní fáze BR pufr o uvedeném pH s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.8

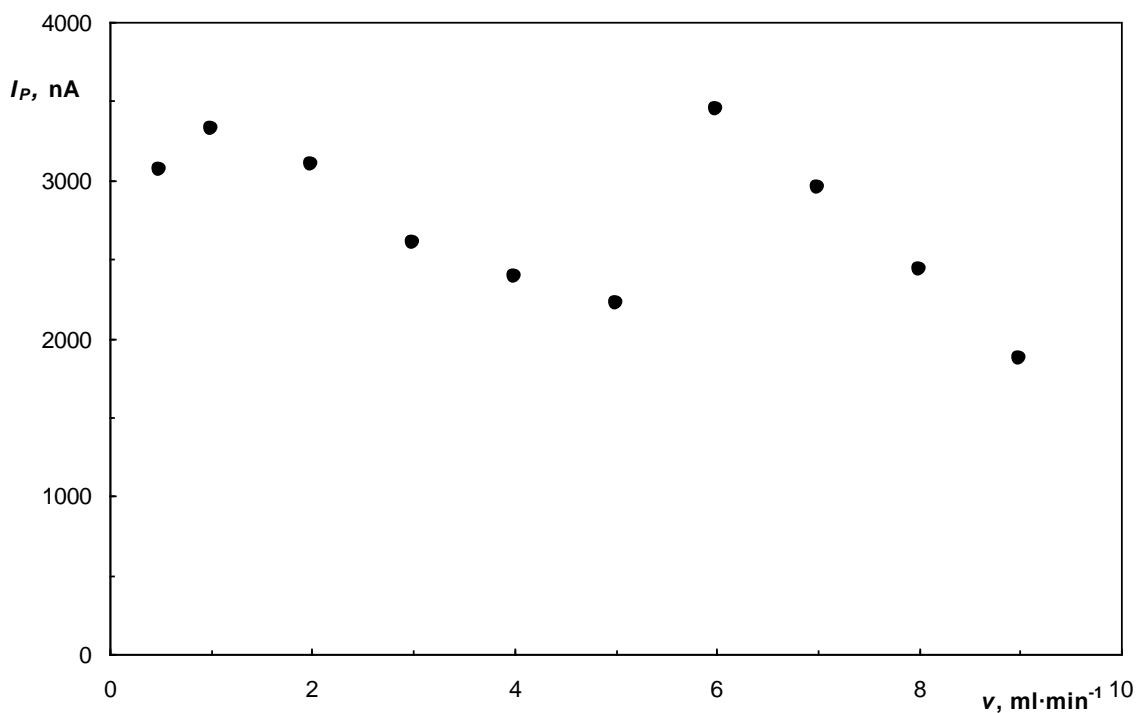
Závislost absorbance na pH roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi BR pufr příslušného pH s MeOH 1:1 (v/v) v rozmezí vlnových délek 200 až 440 nm, měřeno v křemenné kyvetě o tloušťce 1 mm proti roztoku voda s MeOH 1:1 (v/v).

3.1.4 Vliv průtokové rychlosti

Měření závislosti výšky, resp. plochy píků na průtokové rychlosti mobilní fáze probíhalo za optimálních podmínek zjištěných v měřeních předchozích, tj. BR pufr pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v), potenciálu pracovní elektrody +1,1 V, dávkováno bylo 100 μl roztoku vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Průtoková rychlost byla měřena v rozmezí 0,5 až 9 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Naměřená závislost průtokové rychlosti na výšce píků (ploše píků) je pro elektrochemickou detekci na Obr. 3.9 (Obr. 3.10).

Měření bylo provedeno také pomocí UV detekce při vlnové délce 230 nm. Závislosti jsou znázorněny na Obr. 3.11 pro výšky píků a na Obr. 3.12 pro plochy píků.

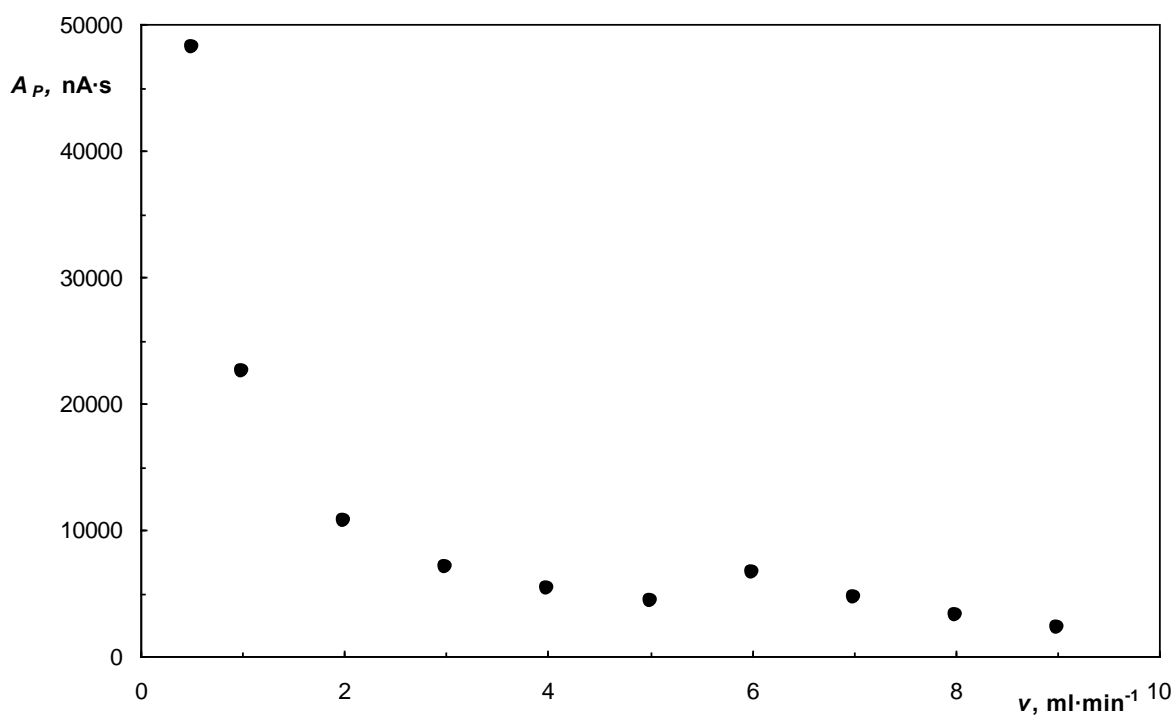
Z daných závislostí je patrné, že průtoková rychlost ovlivňuje spíše plochu píků, na výšce píků nemá zásadní vliv. Jako nejvhodnější průtoková rychlost byla tedy zvolena hodnota 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.9

Závislost výšek píkú (I_p) na průtokové rychlosti mobilní fáze.

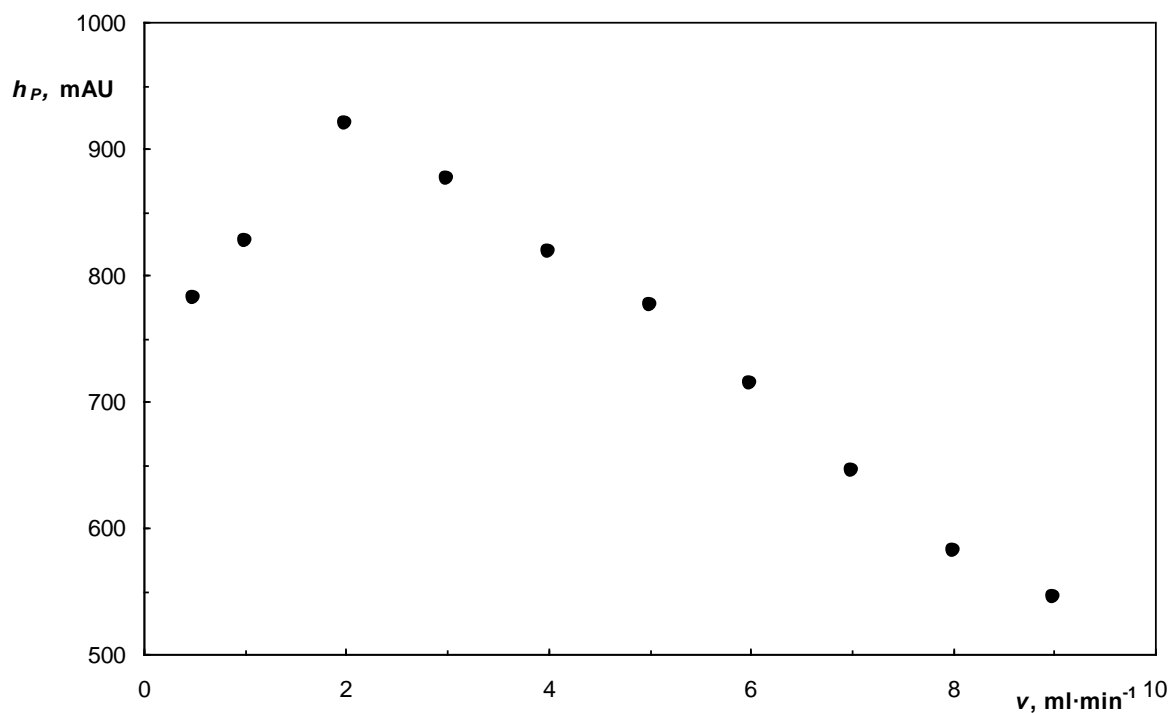
Elektrochemická detekce při potenciálu +1,1 V, dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v).



Obr. 3.10

Závislost ploch píkú (A_p) na průtokové rychlosti mobilní fáze.

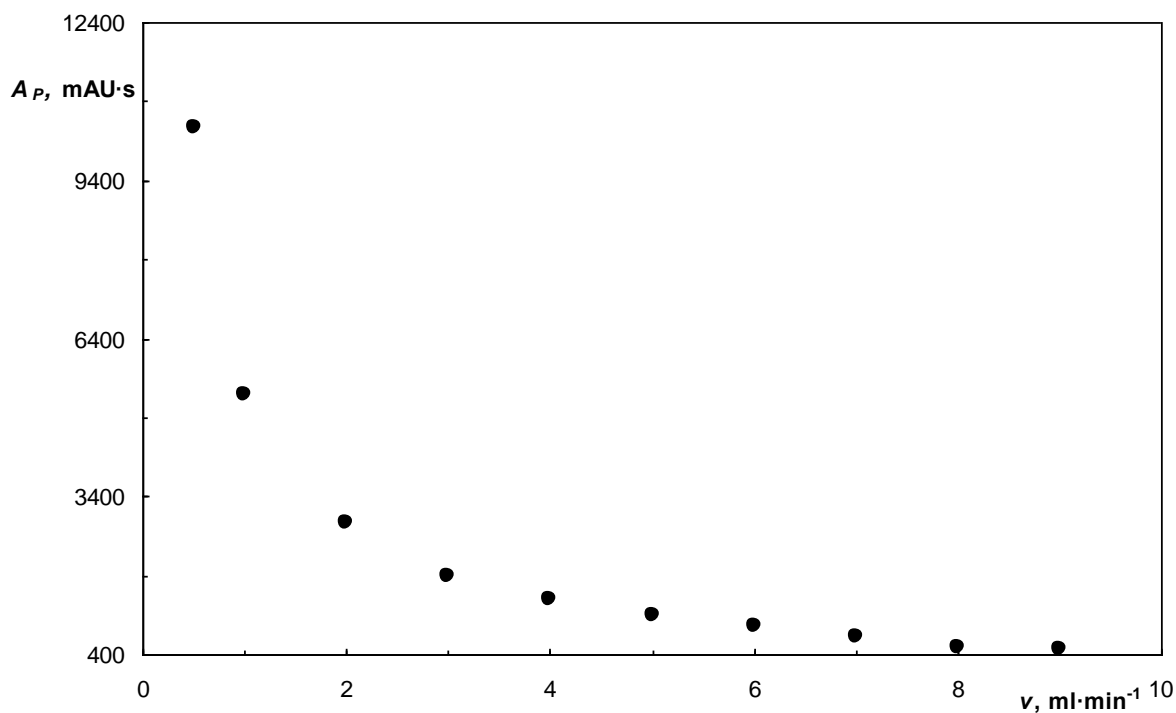
Elektrochemická detekce při potenciálu +1,1 V, dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v).



Obr. 3.11

Závislost výšky píků na průtokové rychlosti mobilní fáze.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230\text{nm}$), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v).



Obr. 3.12

Závislost plochy píků na průtokové rychlosti mobilní fáze.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230\text{nm}$), dávkován roztok vanilinu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v).

3.2 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti roztoku vanilinu byly proměřeny při stanovených optimálních podmínkách. Mobilní fáze byla složena z Brittonova-Robinsonova pufru o pH 6 a methanolu v poměru 1:1 (v/v). Potenciál pracovní elektrody byl +1,1 V, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkováno bylo $100 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).

3.2.1 Elektrochemická detekce

Kalibrační závislosti byly proměřeny s elektrochemickou detekcí při potenciálu pracovní uhlíkové pastové elektrody +1,1 V. Proměřeny byly koncentrace vanilinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny pro výšky a plochy píků a byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.1 a Tab. 3.2. Na Obr. 3.13 a 3.14 jsou znázorněny kalibrační závislosti výšek, resp. ploch píků vanilinu v celém koncentračním rozmezí. Obr. 3.15 a 3.16 pak znázorňuje stejné závislosti v logaritmické formě. FIA záznamy v koncentračním rozmezí $10 \cdot 10^{-7}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsou na Obr. 3.17.

V měřené oblasti koncentrací jsou kalibrační závislosti lineární, což potvrzují hodnoty směrnic logaritmických závislostí, jejichž hodnota se blíží jedné.

Mez detekce $L_D = 1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla stanovena jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Tab. 3.1

Parametry kalibračních závislostí vanilinu pro FIA s elektrochemickou detekcí na CPE při potenciálu +1,1 V, vyhodnoceno z výšek píků.

c (mol·l ⁻¹)	směrnice (mA·mol ⁻¹ ·l)	úsek (nA)	R ²	L_D (mol·l ⁻¹)
1·10 ⁻⁵ – 1·10 ⁻⁴	40,4	114,7	0,9984	-
1·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻⁵	41,8	14,8	0,9953	-
2·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁶	30,8	6,2	0,9982	-
2·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁴	41,7	16,5	0,9992	1,7·10 ⁻⁷

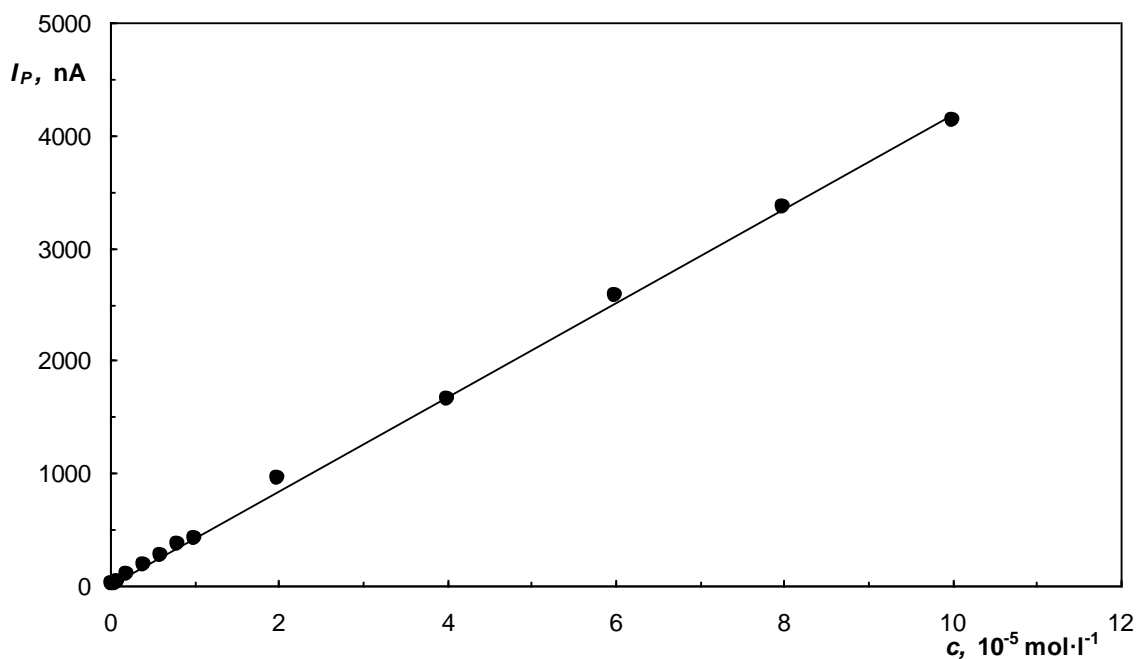
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 0,982$; $b = 7,55$; $R^2 = 0,9968$

Tab. 3.2

Parametry kalibračních závislostí vanilinu pro FIA s elektrochemickou detekcí na CPE při potenciálu +1,1 V, vyhodnoceno z ploch píků.

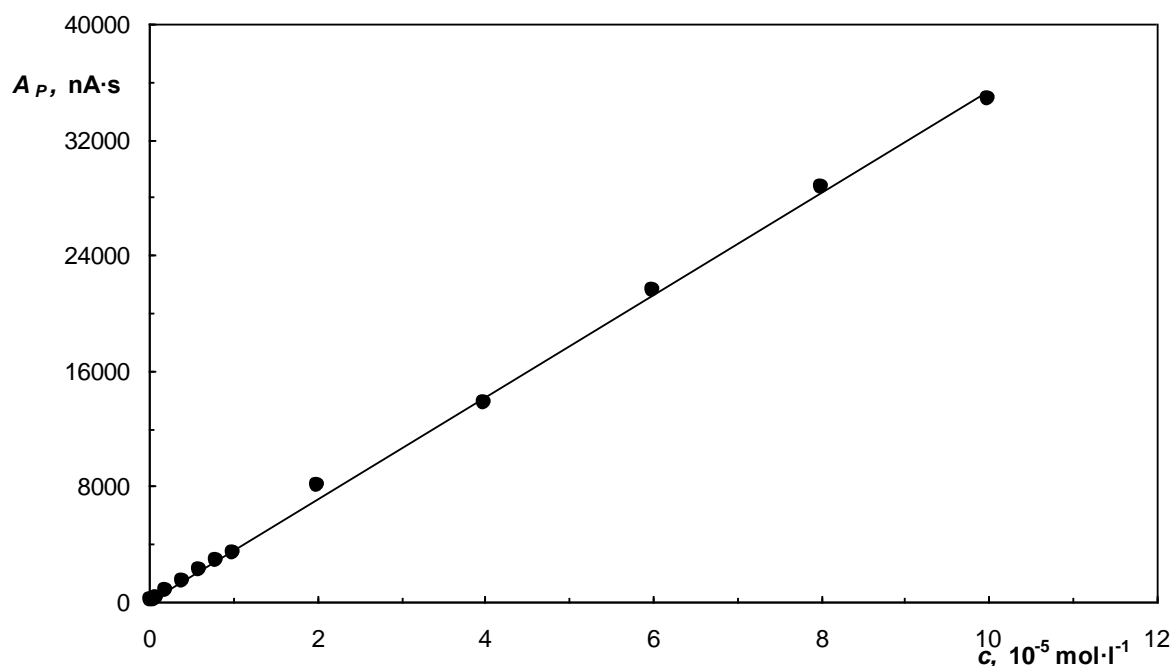
c (mol·l ⁻¹)	směrnice (mA·s·mol ⁻¹ ·l)	úsek (nA·s)	R ²	L_D (mol·l ⁻¹)
1·10 ⁻⁵ – 1·10 ⁻⁴	342,5	819,4	0,9977	-
1·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻⁵	328,9	163,0	0,9981	-
2·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁶	275,0	19,9	0,9989	-
2·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁴	352,6	68,9	0,9991	1,7·10 ⁻⁷

Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 1,015$; $b = 8,62$; $R^2 = 0,9980$



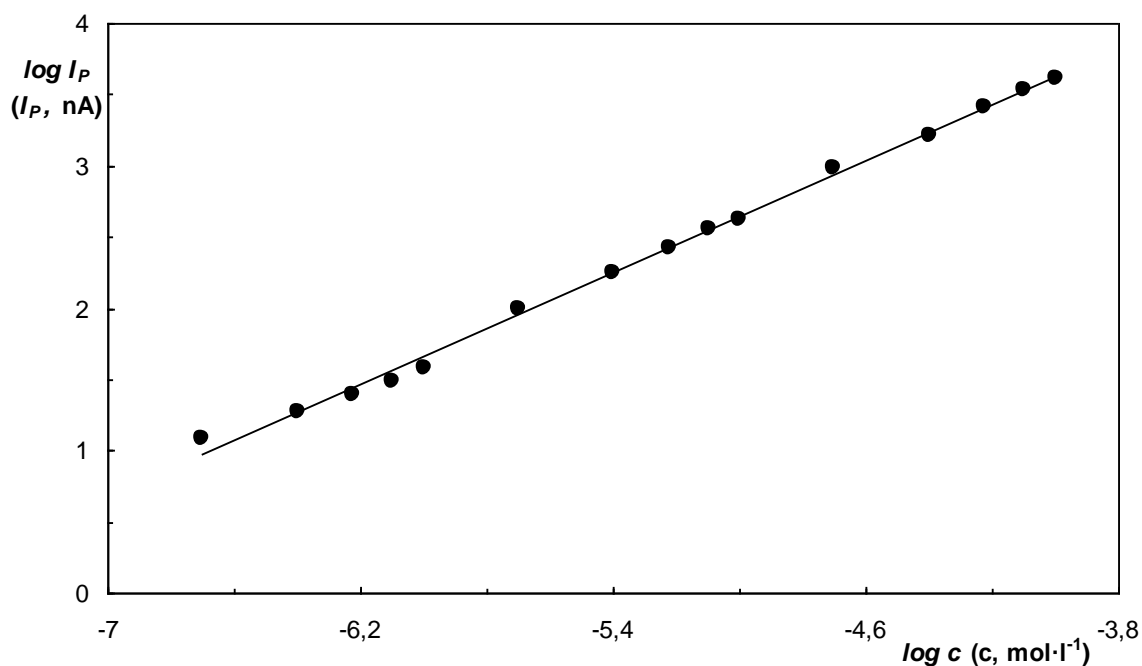
Obr. 3.13

Kalibrační závislost vanilinu vyhodnocená z výšek píků (I_p) v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.14

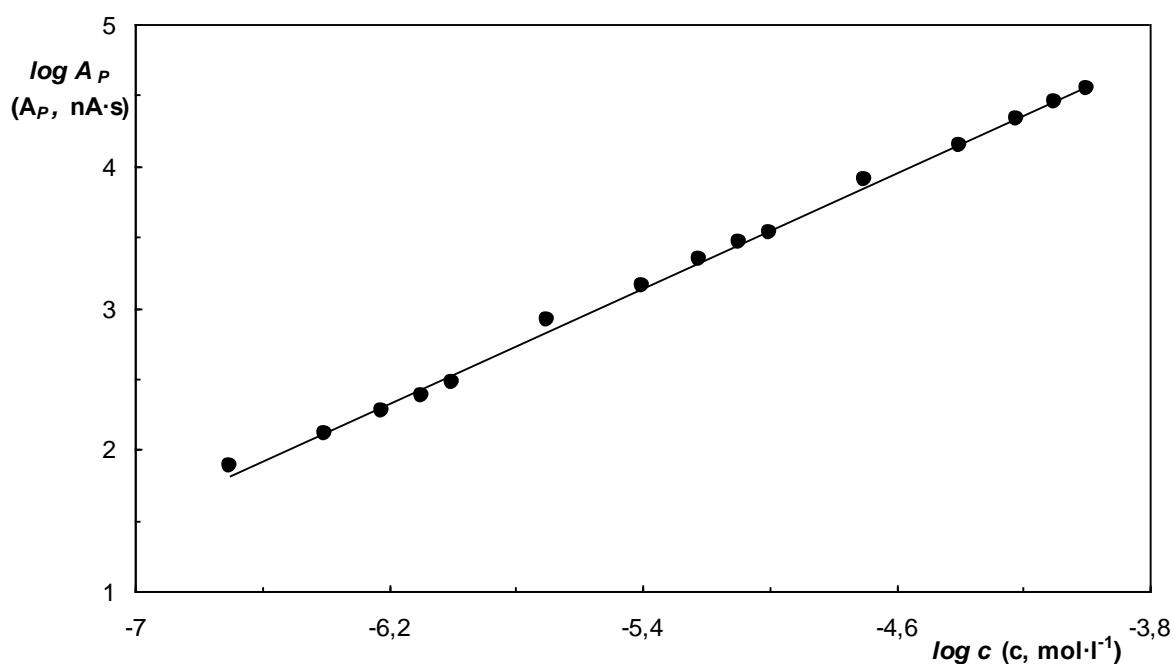
Kalibrační závislost vanilinu vyhodnocená z ploch píků (A_p) v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.15

Kalibrační závislost vanilinu v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků (I_p) v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

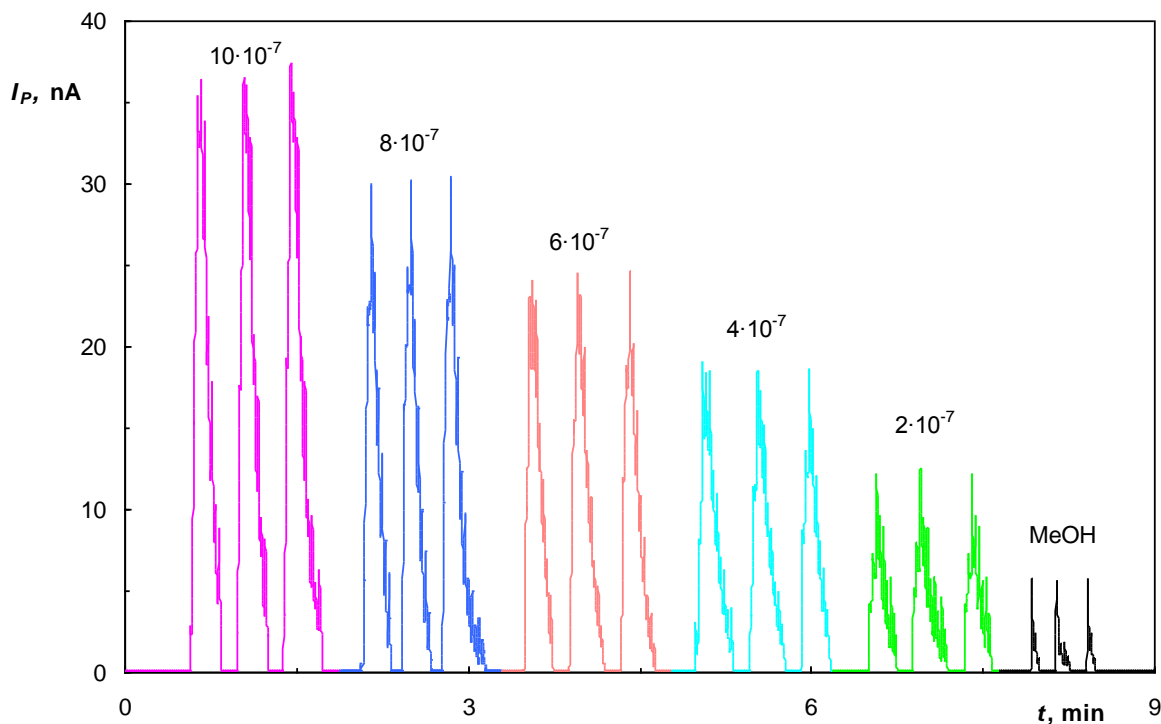
Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.16

Kalibrační závislost vanilinu v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků (A_p) v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.17

FIA-ED záznamy vanilinu.

Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Koncentrace vanilinu: $10\cdot 10^{-7}$, $8\cdot 10^{-7}$, $6\cdot 10^{-7}$, $4\cdot 10^{-7}$, $2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.2.2 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrická detekce byla proměřena při vlnové délce 230 nm.

Proměřeny byly kalibrační závislosti vanilinu v rozmezí koncentrací $1\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny pro výšky a plochy píků a byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.3 a Tab. 3.4. Na Obr. 3.18 a 3.19 jsou znázorněny kalibrační závislosti výšek, resp. ploch píků vanilinu v celém koncentračním rozmezí. Obr. 3.20 a 3.21 pak ukazuje stejné závislosti v logaritmické formě. Záznamy FIA v koncentračním rozmezí $10\cdot 10^{-7}$ až $2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou na Obr. 3.22.

V celé měřené oblasti koncentrací jsou kalibrační závislosti lineární. Linearitu potvrzují také hodnoty směrníc logaritmických závislostí, které se blíží jedné.

Mez detekce $L_D = 1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla stanovena jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Mez detekce stanovená spektrofotometrickou detekcí je po zaokrouhlení shodná s elektrochemickou detekcí.

Tab. 3.3

Parametry kalibračních závislostí vanilinu pro FIA s spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 230 nm vyhodnocené z výšek píků.

c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{AU} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	úsek (mAU)	R^2	L_D ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6320	13,6	0,9960	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	7440	0,7	0,9916	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	9360	0,3	0,9932	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6440	5,1	0,9986	$1,7 \cdot 10^{-7}$

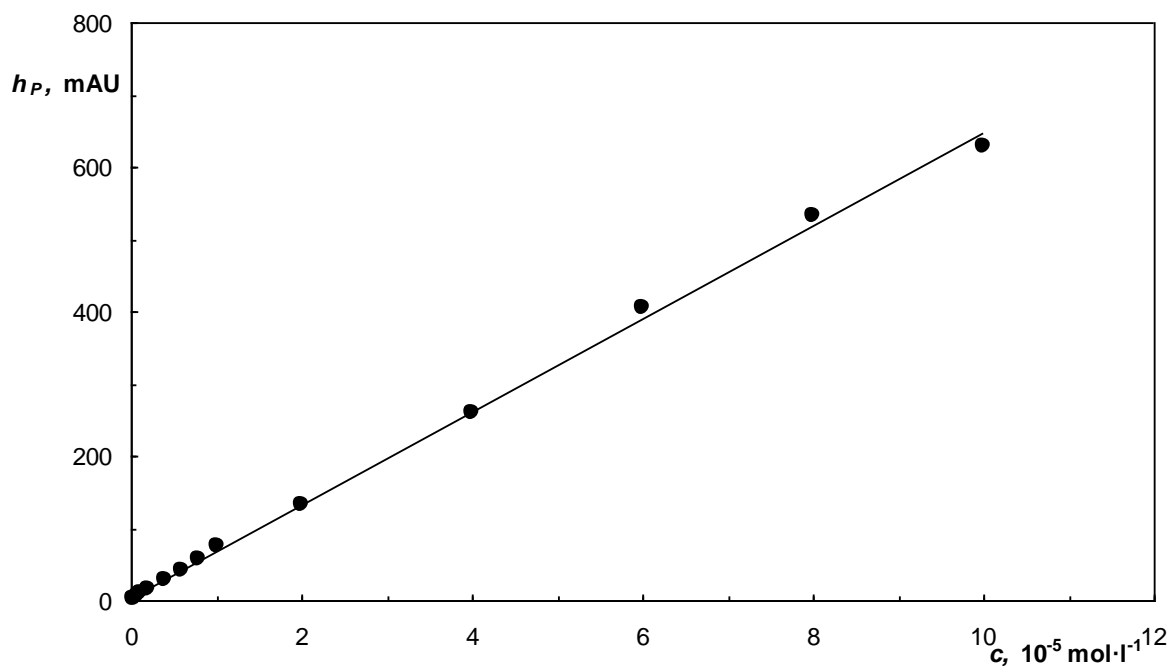
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 0,909$; $b = 6,42$; $R^2 = 0,9982$

Tab. 3.4

Parametry kalibračních závislostí vanilinu pro FIA se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 230 nm vyhodnocené z ploch píků.

c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	směrnice ($\text{AU} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	úsek (mAU·s)	R^2	L_D ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	45690	107,7	0,9956	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	54170	12,1	0,9926	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	70870	12,6	0,9952	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	46550	47,2	0,9986	$1,7 \cdot 10^{-7}$

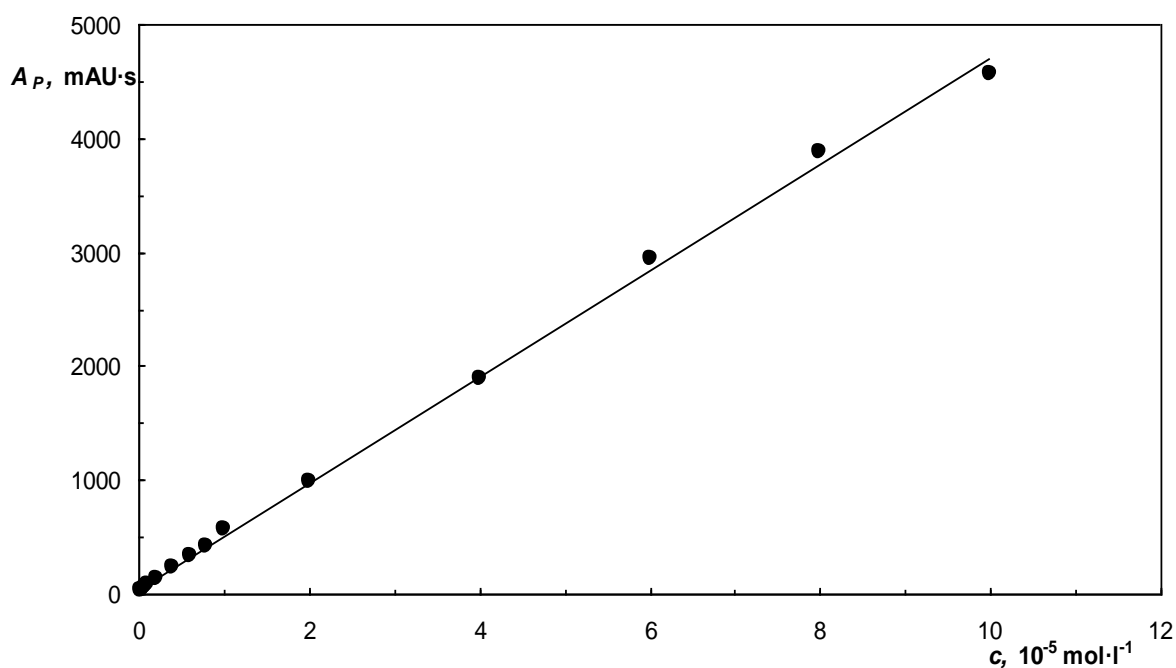
Parametry logaritmické závislosti: $\log I = a \log c + b$; $a = 0,845$; $b = 6,99$; $R^2 = 0,9949$



Obr. 3.18

Kalibrační závislost vanilinu vyhodnocená z výšek pík (h_p) v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

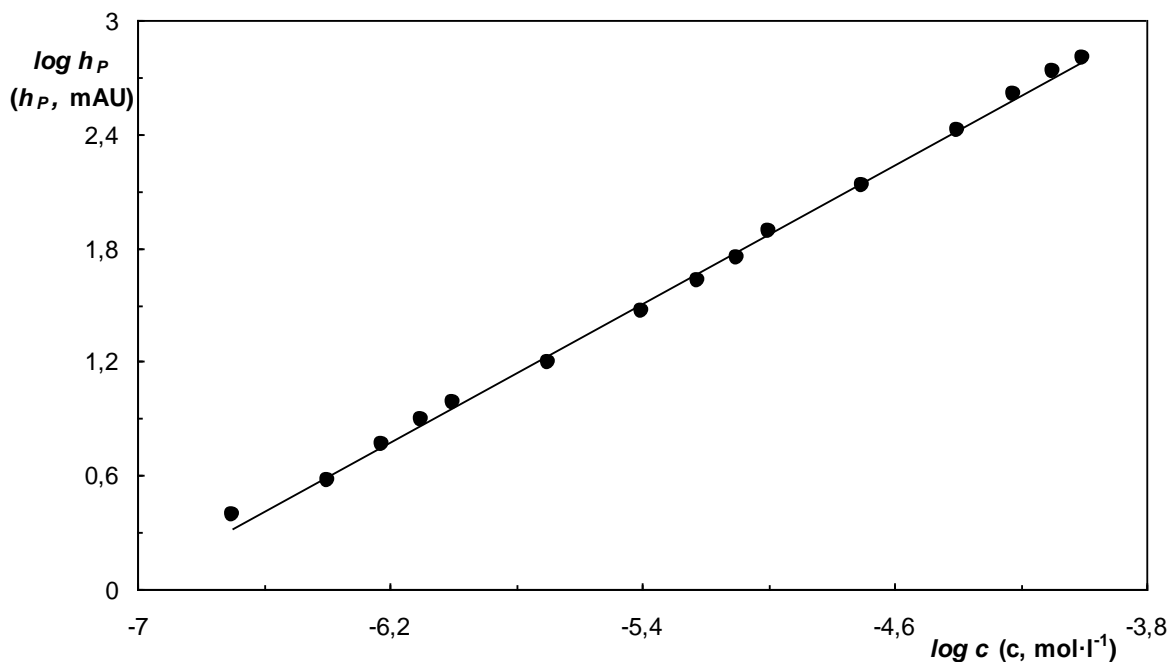
Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230 \text{ nm}$), dávkováno $100 \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.19

Kalibrační závislost vanilinu vyhodnocená z ploch pík (A_p) v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

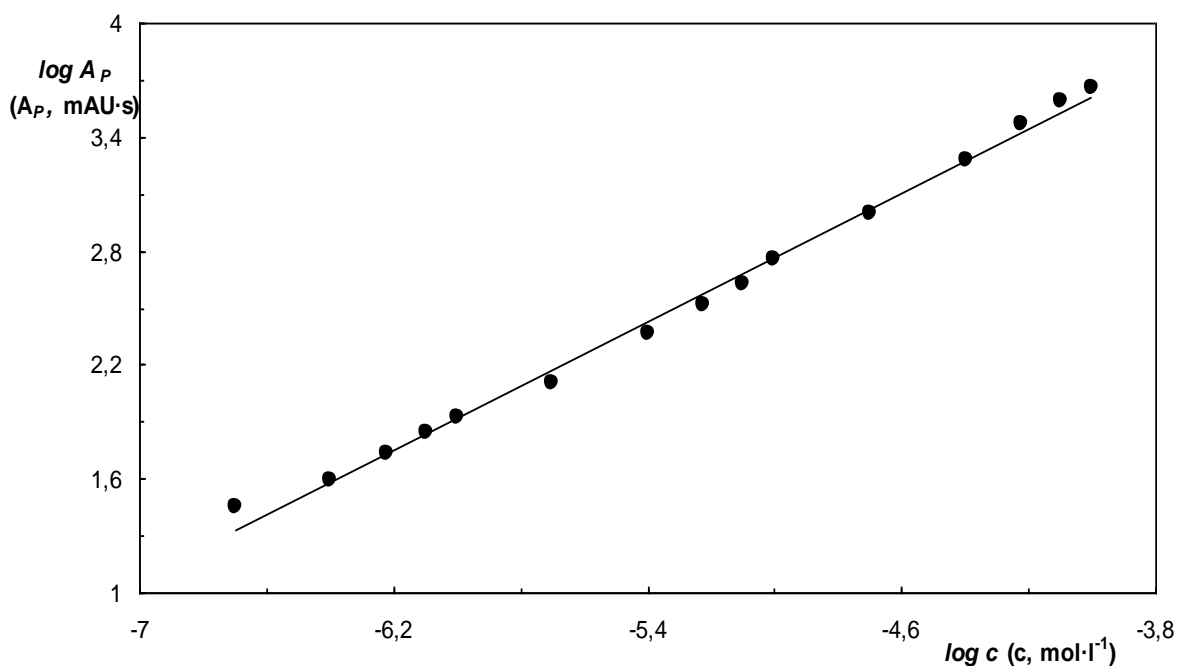
Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230 \text{ nm}$), dávkováno $100 \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.20

Kalibrační závislost vanilinu v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků (h_p) v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

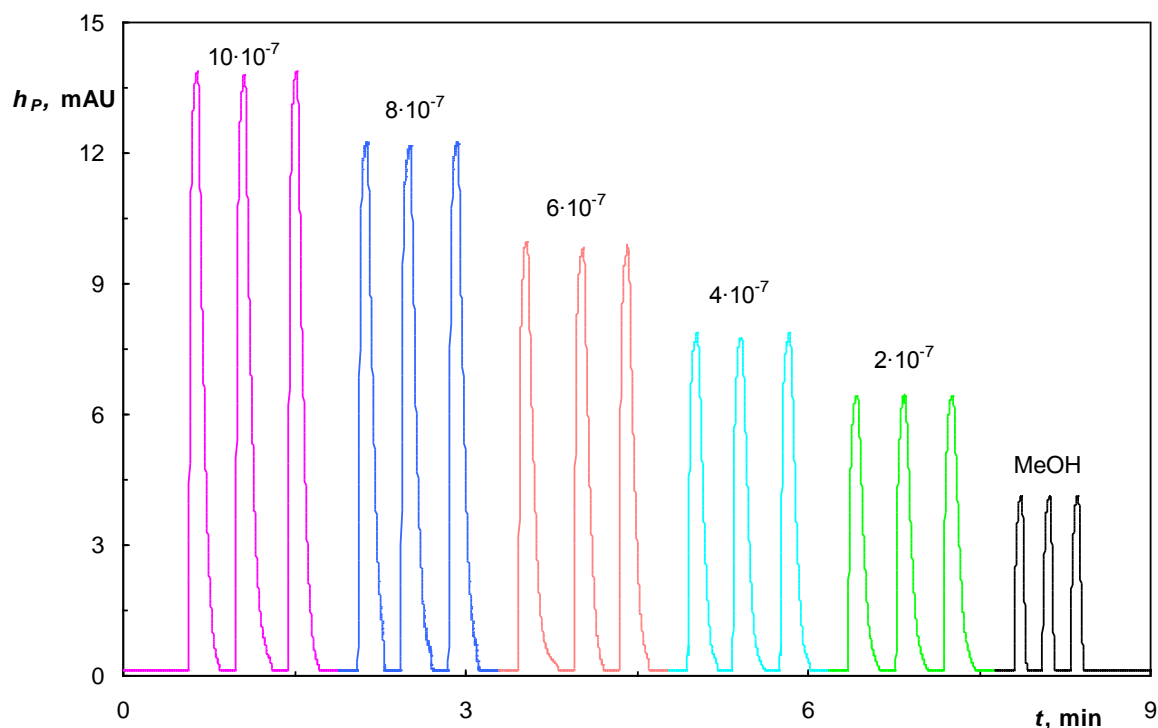
Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230 \text{ nm}$), dávkováno $100 \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.21

Kalibrační závislost vanilinu v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků (A_p) v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230 \text{ nm}$), dávkováno $100 \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.22

FIA-UV záznamy vanilinu.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml·min⁻¹.

Koncentrace vanilinu: $10 \cdot 10^{-7}$, $8 \cdot 10^{-7}$, $6 \cdot 10^{-7}$, $4 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹.

3.3 Opakovatelnost měření

3.3.1 Elektrochemická detekce

Opakovatelnost měření elektrochemické detekce na uhlíkové pastové elektrodě byla zjištěna dvacetinásobným nadávkováním 100 μ l roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ ve směsi BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v). Roztok byl dávkován v intervalech 60 sekund.

Pro opakovatelnost měření byly použity zjištěné optimální podmínky; dávkovaný objem 100 μ l roztoku vanilinu ve směsi BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v), potenciál vkládaný na pracovní elektrodu +1,1 V, průtoková rychlost 1 ml·min⁻¹ a mobilní fáze tvořená BR puforem o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).

Získané výsledky měření jsou zaznamenány v Tab. 3.5, na Obr. 3.23 je zobrazen FIA-ED záznam pro vyhodnocení opakovatelnosti měření s elektrochemickou detekcí. Relativní směrodatná odchylka je 2,29 % pro výšku píku a 2,46 % pro plochu píku.

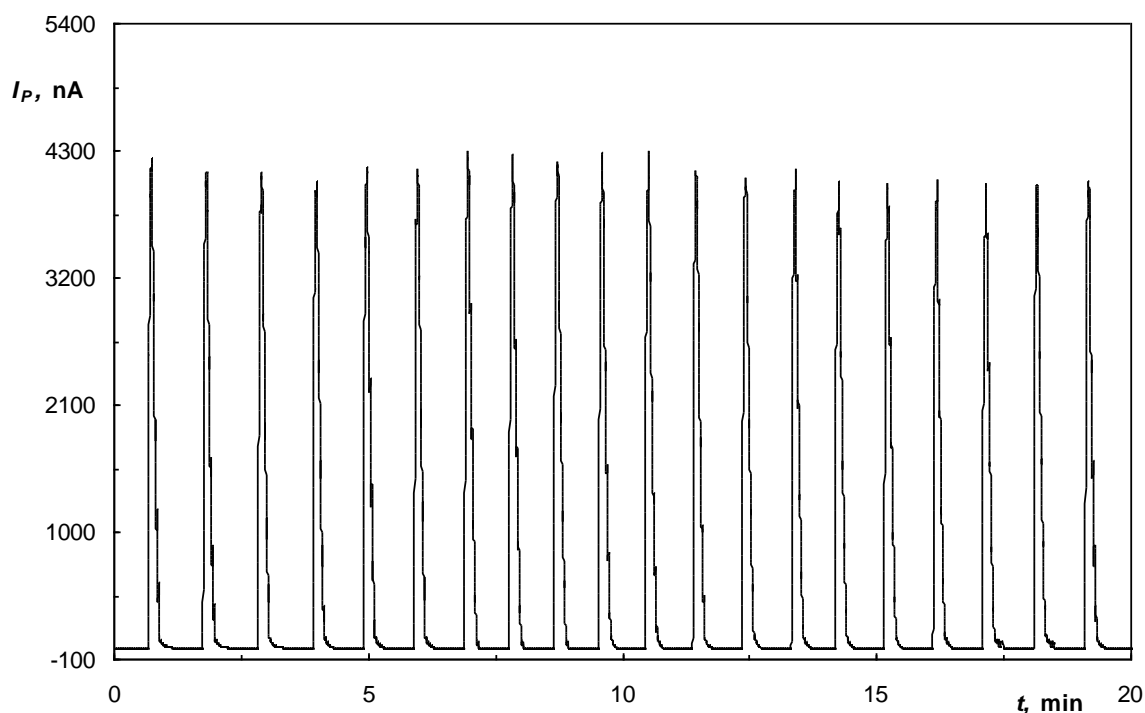
Tab. 3.5

Opakovatelnost měření.

Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ ve směsi BR pufr o pH 6 s MeOH v poměru 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr o pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.

Pík	I_P (nA)	A_P (nA \cdot s)
1	4 236,6	35 669,4
2	4 121,3	34 671,5
3	4 111,0	34 601,4
4	4 040,7	33 961,0
5	4 161,9	34 725,6
6	4 138,3	34 610,9
7	4 296,8	36 920,1
8	4 272,7	36 011,2
9	4 173,1	36 751,8
10	4 289,8	36 272,4
11	4 246,6	35 555,8
12	4 124,3	35 729,5
13	4 066,5	35 763,8
14	4 143,3	35 234,8
15	4 043,3	34 637,8
16	4 013,6	34 834,1
17	4 044,8	34 659,0
18	4 015,1	34 184,9
19	4 009,1	34 664,7
20	4 161,9	34 070,2

Průměr	4 135,5 nA	35 176,5 nA.s
s	94,8 nA	864,3 nA.s
s_r	2,29 %	2,46 %



Obr. 3.23

FIA-ED záznam opakovatelnosti měření.

Elektrochemická detekce na CPE při potenciálu +1,1 V, dávkováno 100 μl roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.3.2 Spektrofotometrická detekce

Opakovatelnost měření pro UV detekci při vlnové délce 230 nm byla zjištěna dvacetinásobným nadávkováním 100 μl roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v). Roztok byl dávkován v intervalech 60 sekund. Pro opakovatelnost měření byly použity zjištěné optimální podmínky; dávkovaný objem 100 μl roztoku vanilinu ve směsi BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a mobilní fáze tvořená BR pufr o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v).

V Tab. 3.6 jsou zaznamenány získané výsledky měření, Obr. 3.24 zobrazuje FIA-UV záznam pro vyhodnocení opakovatelnosti měření s UV detekcí. Relativní směrodatná odchylka je 0,42 % pro výšku píku a 0,67 % pro plochu píku.

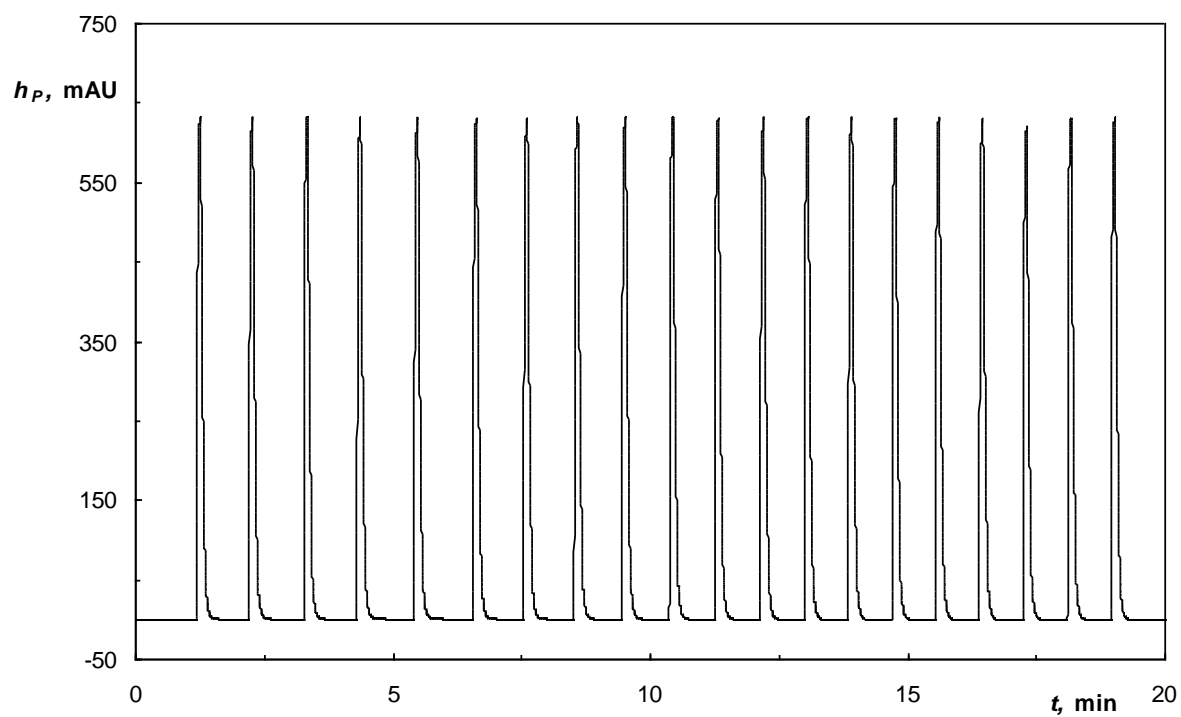
Tab. 3.6

Opakovatelnost měření.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.

Pík	h_P (mAU)	A_P (mAU \cdot s)
1	633,7	4 557,5
2	632,1	4 547,6
3	633,9	4 576,0
4	633,1	4 554,6
5	632,5	4 572,1
6	631,8	4 561,9
7	633,4	4 553,5
8	635,3	4 582,9
9	635,5	4 591,8
10	634,8	4 598,4
11	633,5	4 605,9
12	634,0	4 572,6
13	632,4	4 537,1
14	633,9	4 587,7
15	632,5	4 547,8
16	633,3	4 574,0
17	632,0	4 582,5
18	622,5	4 460,8
19	633,1	4 564,9
20	633,1	4 554,6

Průměr	632,8 mAU	4 564,2 mAU.s
s	2,6 mAU	30,4 mAU.s
s_r	0,42 %	0,67 %



Obr. 3.24

FIA-UV záznam opakovatelnosti měření.

Spektrofotometrická detekce ($\lambda=230$ nm), dávkováno 100 μ l roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v), průtoková rychlost 1 ml·min⁻¹.

4 ZÁVĚR

Byla proměřena stálost zásobního roztoku vanilinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu po dobu 3 měsíců. Roztok byl po celou sledovanou dobu stálý a byl uchováván v temnu v chladničce o konstantní teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bylo prostudováno chování vanilinu pomocí FIA se spektrofotometrickou ($\lambda = 230 \text{ nm}$) a elektrochemickou detekcí za použití uhlíkové pastové elektrody.

Byla prostudována závislost výšky (h_p), resp. plochy píku (A_p) na dávkovaném objemu, potenciálu pracovní elektrody, pH mobilní fáze a průtokové rychlosti. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení studované látky metodou FIA na uhlíkové pastové elektrodě, při kterých byl pík nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný.

Optimální podmínky: $100 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku vanilinu v methanolu, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu $+1,1 \text{ V}$, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a mobilní fáze tvořená Brittonovým-Robinsonovým pufrům o pH 6 s methanolem v poměru 1:1 (v/v). Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 230 nm .

Za zjištěných optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti v rozmezí od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny metodou lineární regrese. Meze detekce byly vypočteny z kalibračních křivek. Získané limity detekce jsou uvedeny v Tab. 4.1.

Tab. 4.1

Meze detekce vanilinu pro metodu FIA s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí.

Spektrofotometrická detekce při vlnové délce 230 nm , elektrochemická detekce na CPE při potenciálu $+1,1 \text{ V}$, dávkováno $100 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku vanilinu ve směsi BR pufr pH 6 s MeOH 1:1(v/v), mobilní fáze BR pufr pH 6 s MeOH 1:1 (v/v).

Metoda stanovení	$L_D, \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Elektrochemická detekce na CPE	$1,7 \cdot 10^{-7}$
Spektrofotometrická detekce	$1,7 \cdot 10^{-7}$

Meze detekce s UV spektrofotometrickou detekcí a elektrochemickou detekcí jsou po zaokrouhlení shodné. Při stanovení vanilinu metodou FIA s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě bylo dosaženo stejných výsledků jako při stanovení s detekcí spektrofotometrickou.

Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti měření elektrochemického detektoru je 2,29 % pro výšku píku a 2,46 % pro plochu píku. U spektrofotometrického detektoru je relativní směrodatná odchylka 0,42 % pro výšku píku, resp. 0,67 % pro plochu píku. Ze záznamu opakovatelnosti obou detektorů vyplývá, že zatímco spektrofotometrický detektor není příliš ovlivněn vnějšími vlivy a způsobem dávkování, detektor elektrochemický je naopak citlivější a výška, resp. plocha píků je nepatrně ovlivněna způsobem nadávkování a mechanickým zacházením s aparaturou.

5 LITERATURA

1. Ávila, M.; Zougagh, M.; Escarpa, A.; Ríos, Á.: Supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer for determination of vanillin in food samples. *Talanta* **72**, 1362-1369 (2007).
2. Longares-Patrón, A.; Cañizaser-Macías, M.P.: Focuses microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determinativ of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from vaniila gragans. *Talanta* **69**, 882-887 (2006).
3. Bettazzi, F.; Palchetti, I.; Sisalli, S.; Mascini, M.: Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic coumpounds in vanilla planifolia. *Analytica Chemica Acta* **535**, 134-138 (2006).
4. Havkin-Frenkel, D.; Belanger, F. C.: Biotechnological production of vanillin, *Biotechnology in flavor production*. Blackwell Publishing, Oxford (2008)
5. Tai, Akihiro.; Sawano, T.; Yazama, F.; Ito, H.: Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assai. *Biochemica et Biophysica Acta* **1810**, 170-177 (2011).
6. Kamat, J.P.; Ghosh, A.; Devasagayam, T.P.: Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensatization. *Molecular and Cellular Biochemistry* **209**, 47-53 (2000).
7. Sobolev, V.S: Vanillin content in boiled peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3725-3727 (2001).
8. Farthing, D.; Sica, D.; Abernathy, Ch.; Fakhry I.; Roberts, J.D.; Abraham D.J.; Swerdlow, P.: High performance liquid chromatographic method for determination of vanillin and vanillic acid in human plasma, red blood cells and urine. *Journal of Chromatography B* **726**, 303-307 (1999).
9. Jagerdeo, E.; Passetti, E.; Dugar, S.M.J.: Liquid chromatographic determination of vanillin and related aromatic compounds. *The Journal of AOAC International* **83**, 237 (2000).

10. Sostarik, T.; Boyce, M.C.E.E.; Spicket, J.: Determination of vanillin in orange, grapefruit, tangerine, lemon, and lime juices using GC–olfactometry and GC–MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5802 (2000).
11. Ohashi, M.; Omae, H.; Hashida, M.; Sowa, Y.; Imai, S.: Determination of vanillin and related flavor compounds in cocoa drink by capillary electrophoresis. *The Journal of Chromatography A* **1138**, 262 (2007).
12. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311-345 (2001).
13. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
14. Švancara, I.: Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami. *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii* 49-58 (2006).
15. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490-499 (1999).
16. Švancara, I.; Vytřas, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J.: Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis* **21**, 7-28 (2009).
17. Patriarcho, G.J.; Viré J.C.: Applications of polarography and voltmetry in analysis for drugs. *Analytica Chimica Acta* **196**, 193-204 (1987).
18. Němcová, L.; Zima, J.; Barek, J.; Janovská, D.: Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode. *Food Chemistry* **126**, 374-378 (2011).
19. Barek, J.; Fischer, J.; Navratil, T.; Peckova, K.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: Nontraditional electrode material in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19**, 2003 (2007).
20. Novotný, V.; Barek, J.: Voltametrické stanovení acifluorfenu, nitrofenu a oxyfluorfenu na stříbrné tuhé amalgánové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě. *Chemické Listy* **103**, 217-223 (2009).
21. Uslu, B.; Okzan, S.A.: Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Analytical Letters* **40**, 817-853 (2007).