

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Marcela Kotasová

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ DIACETYLU A
PYRUVÁTU POMOCÍ DERIVATIZACE
S O-FENYLENDIAMINEM

*Voltammetric Determination of Diacetyl and
Pyruvate by Derivatization
with o-Phenylenediamine*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

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 16.5.2015

Poděkování

V úvodu bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky k mé práci, dále pak Mgr. Andree Hájkové, Mgr. Evě Horákové a ostatním členům Katedry analytické chemie za velikou pomoc, ochotu a neocenitelné rady při vypracování diplomové práce. Mé poděkování patří též rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout citlivé, levné a časově nenáročné voltametrické metody pro stanovení diacetylu a pyruvátu, při kterém jsou oba analyty derivatizovány s *o*-fenylendiaminem (OPDA) a stanovují se vzniklé produkty reakcí. Za tímto účelem byly použity techniky DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE).

Optimalizace metody se skládala z hledání vhodného prostředí a vhodné regenerace elektrodového povrchu pro stanovení 2,3-dimethylchinoxalinu (2,3-DMQ) a 2-hydroxy-3-methylchinoxalinu (2-OH-3-MQ) (produkty derivatizací). Pro stanovení 2,3-DMQ bylo optimální prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (BR-pufu) o pH 6,0 pro techniku DCV (optimální regenerační potenciály $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV a dosažená mez stanovitelnosti $L_Q \approx 1,2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹) a pH 7,0 pro techniku DPV ($E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV, $L_Q \approx 1,1 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹). Pro 2-OH-3-MQ bylo nalezeno optimální prostředí BR-pufu o pH 4,0, s regeneračními potenciály $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV pro obě techniky ($L_Q \approx 4,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro DCV a $3,4 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro DPV).

Optimalizace derivatizační reakce pro stanovení diacetylu a pyruvátu se skládala z nalezení optimální koncentrace OPDA, která byla $9 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH, při kterém reakce probíhá (pH = 1,2, úprava přidáním HCl), času (30 min) a teploty (35 °C). Měření po derivatizaci byla prováděna technikou DPV při dříve nalezených optimálních podmínkách stanovení.

Pro případ stanovení diacetylu a pyruvátu ve směsi byly nalezeny nové optimální podmínky: BR-pufu o pH 5,0, $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV ($L_Q \approx 2,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro 2,3-DMQ a $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro 2-OH-3-MQ). Vyvinutá metoda byla následně použita na reálné vzorky bílého vína, světlého piva a domácího jablečného vína.

Abstract

The aim of this Diploma Thesis was to develop sensitive, inexpensive, and less time-consuming voltammetric methods for the determination of diacetyl and pyruvate, when both analytes are derivatized by *o*-fenyldiamine (OPDA) and the resulting reaction products are determined. For this purpose, techniques DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) were used.

The optimization consisted of finding a suitable medium and regeneration of the electrode surface for the determination 2,3-dimethylquinoxaline (2,3-DMQ) and 2-hydroxy-methylquinoxaline (2-OH-3-MQ), products of derivatization reactions. The optimal medium for the 2,3-DMQ determination was a solution of the Britton-Robinson buffer (BR-buffer) of pH 6.0 for DCV (optimal regeneration potentials $E_{in} = -400$ mV and $E_{fin} = -900$ mV, with limit of quantification $L_Q \approx 1.2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹) and pH 7.0 for DPV ($E_{in} = -200$ mV and $E_{fin} = -900$ mV, $L_Q \approx 1.1 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹). For 2-OH-3-MQ, the optimal medium was BR-buffer of pH 4.0 and regeneration potentials $E_{in} = -500$ mV and $E_{fin} = -900$ mV for both techniques ($L_Q \approx 4.8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ for DCV and $3,4 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ for DPV).

Optimization of derivatization reactions for the determination of diacetyl and pyruvate consisted of finding the optimal concentration of OPDA, which was $9 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, the pH of the reaction (pH = 1.2, adjusted by HCl), time (30 min) and temperature (35 °C). Post-derivatization measurements were made by DPV technique at the previously found optimal conditions for the determination.

For the determination of diacetyl and pyruvate in their mixture, new optimal conditions were found: BR-buffer pH 5.0, $E_{in} = -200$ mV and $E_{fin} = -900$ mV ($L_Q \approx 2.8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ for 2,3-DMQ and $1.8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ for 2-OH-3-MQ). The developed method was then applied to real samples of white wine, light beer and homemade cider.

Klíčová slova

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Diacetyl

Pyruvát

2,3-Dimethylchinoxilin

2-Hydroxy-3-methylchinoxalin

o-Fenylendiamin

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda

Key words

Direct Current Voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

Diacetyl

Pyruvate

2,3-Dimethylquinoxaline

2-Hydroxy-3-methylquinoxaline

o-Phenylendiamine

Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode

Seznam použitých zkratek a symbolů

2,3-DMQ	2,3-dimethylchinoxalin
2-OH-3-MQ	2-hydroxy-3-methylchinoxalin
BR-pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
CoA	koneznym A
DCV	DC voltametrie (voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	potenciál [mV]
E_p	potenciál píku [mV]
E_{reg}	regenerační potenciál [nA]
E_{in}	počáteční potenciál regenerace [mV]
E_{fin}	konečný potenciál regenerace [mV]
I	proud [nA]
I_p	proud (výška) píku [nA]
I_s	proud (šum) pozadí [nA]
$L_{1,2}$	mez opakovatelnosti
LQ	mez stanovitelnosti
MLF	malolaktátové kvašení
$m\text{-AgSAE}$	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
n	počet měření
NAD	nikotinadenindinukleotit
OPDA	<i>o</i> -fenyldiamin
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka [%]
SPE	extrakce tuhou fází
v_E	rychlost polarizace [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
\bar{x}	průměr

Obsah

1.	Úvod	10
1.1.	Cíl práce	10
1.2.	Studované látky	10
1.2.1.	Diacetyl	10
1.2.2.	Pyruvát	14
1.3.	Reakce s <i>o</i> -fenylendiaminem - Hinsbergova reakce	16
1.4.	Pracovní elektroda	17
1.5.	Použité techniky	19
2.	Experimentální část	20
2.1.	Chemikálie	20
2.2.	Aparatura	21
2.3.	Pracovní postupy	21
3.	Voltametrické stanovení produktů derivatizačních reakcí na m-AgSAE	25
3.1.	2,3-Dimethylchinoxalin	25
3.1.1.	Vliv pH	25
3.1.2.	Vliv rychlosti nárůstu potenciálu	31
3.1.3.	Opakovatelnost	33
3.1.4.	Koncentrační závislost	36
3.2.	2-Hydroxy-3-methylchinoxalin	40
3.2.1.	Vliv pH	40
3.2.2.	Vliv rychlosti nárůstu potenciálu	45
3.2.3.	Opakovatelnost	47
3.2.4.	Koncentrační závislost	50
4.	Derivatizační reakce	54
4.1.	Vliv koncentrace OPDA na účinnost reakce	55
4.2.	Vliv pH na účinnost reakce	56

4.3.	Vliv času a teploty na účinnost reakce.....	58
4.4.	Opakovatelnost reakce	59
5.	Reálné vzorky.....	61
5.1.	Bílé víno.....	61
5.2.	Světlé pivo	65
5.3.	Domácí jablečné víno	67
6.	Závěr.....	70
	Literatura	72

1. Úvod

1.1. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení diacetylů a pyruvátů pomocí derivatizace s *o*-fenylendiaminem (OPDA) za vzniku 2,3-dimethylchinoxalínu (2,3-DMQ) a 2-hydroxy-3-methylchinoxalínu (2-OH-3-MQ) technikou DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE).

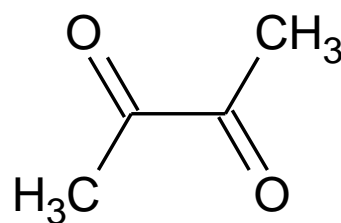
Následně pak nalézt optimální podmínky pro derivatizační reakce a stanovit diacetyl a pyruvát v reálných vzorcích.

1.2. Studované látky

1.2.1. Diacetyl

Těkavá čirá žlutá až zeleno žlutá kapalina s charakteristickým máslovým zápachem. Systematický název je 2,3-butandion. Dobře se rozpouští ve vodě (0,2 mg·L⁻¹, 20 °C). Je dráždivý a vysoce hořlavý. Další údaje jsou následně bodově shrnuty [1].

Číslo CAS	431-03-8
Empirický vzorec	C ₄ H ₆ O ₂
Molekulová hmotnost	86,09 g·mol ⁻¹
Bod varu	88 °C
Hustota (20°C)	0,9850 g·cm ⁻³
R-věty	11-20/22-37/38-41
S-věty	26-39



Během kvasných procesů a následného jablečno-mléčného kvašení (malolaktátové kvašení, MLF) vzniká mnoho látek ovlivňujících výslednou chuť a vůni produktů [2]. Nejvýznamnější z nich je diacetyl [3]. Patří mezi α -diketony, které se běžně vyskytují ve fyziologickém prostředí fermentovaných potravin [4], jako je pivo, víno, brandy, ocet či mléčné produkty (v másle je jeho hlavní chuťovou složkou) a pražená káva [5].

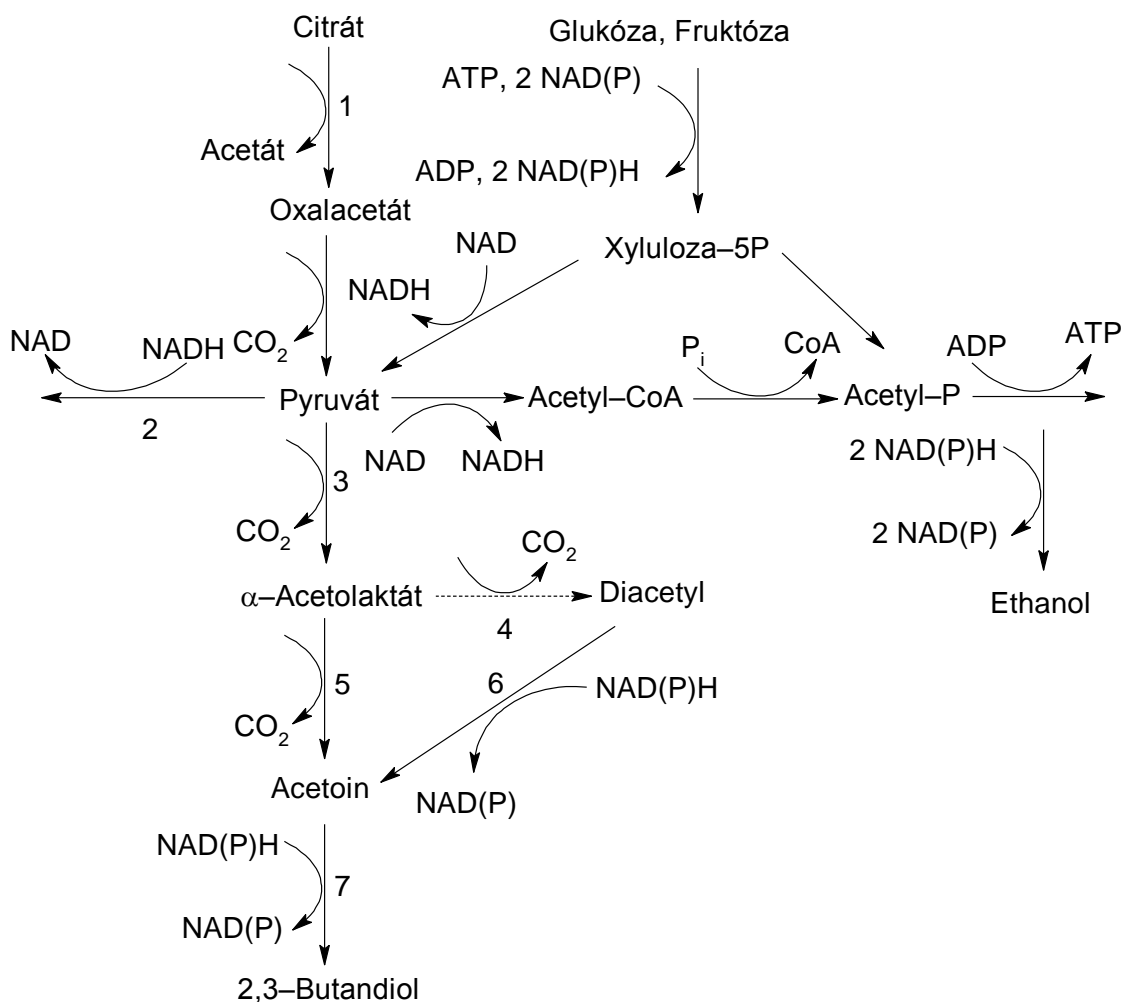
Ve vínech je koncentrace diacetylu závislá na druhu a typu vína. Aromatický práh diacetylu se pohybuje v rozmezí mezi 0,2 a 2,8 mg·L⁻¹ (2,3-32,5 μ mol·L⁻¹) [6] a jeho stanovení se jeví jako důležité pro určení stylu vína (jeho chuti a aroma). Jeho koncentrace pod těmito hodnotami dodává oříškovou nebo karamelovou chuť, při koncentracích nad těmito hodnotami je už cítit nepříjemná máslová pachů. Sensorický práh je ale velmi závislý na druhu a typu vína a na koncentraci ostatních složek v nápoji [7].

Na rozdíl od vinařství je v pivovarském průmyslu diacetyl vysoce nežádoucí a jeho koncentrace se velmi hlídá [3] pro jeho nepříjemnou máslovou chuť [8]. Za nejvyšší přípustnou koncentraci se obecně považuje koncentrace mezi 0,05-0,2 mg·L⁻¹ (0,6-2,3 μ mol·L⁻¹) [9] a v pivech typu „Ale“ koncentrace mezi 0,1-0,4 mg·L⁻¹ (1,2-4,6 μ mol·L⁻¹) [10]. Stanovení této kritické složky chutě piva, diacetylu, je proto jedno z nejdůležitějších analýz v pivovarském průmyslu nejen z hlediska zajištění kvality, ale i pro logisticko-ekonomické důvody, neboť přímo hodnotí konec fermentace/zrání, které se označuje jako „diacetyl rest“ [11].

Diacetyl je produkován některými druhy bakterií mléčného kvašení včetně rodů *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Oenococcus*. Několik z nich je schopno růst ve víně či pivě navzdory těžkým fyzikálně-chemickým vlastnostem a nízkým nutričním hodnotám [5]. Nejčastěji pozorované jsou právě bakterie mléčného kvašení [12], kde jejich růst a metabolismus je spojován se změnami v sensorických vlastnostech produktů [13]. Kvasinky produkují také diacetyl v menším množství [14] během syntézy valinu a izoleucinu, který je později metabolizován na acetoin a 2,3-butandiol, avšak hlavním zdrojem bývá udávaná bakterie *Oenococcus oeni*, která řídí MLF [7].

Jablečno-mléčné kvašení slouží ke snížení acidity [2] přeměnou L-malátu na L-laktát, stabilizaci vína [15], regeneraci koenzymu NAD(P)H [16] a tvorbě sensoricky aktivních látek [4]. Diacetyl je syntetizován jako meziprodukt oxidativní dekarboxylace

pyruvátu na α -acetolaktát a jeho dekarboxylace na diacetyl [5]. Následně je přeměňován na acetoin a 2,3-butandiol, které nemají vliv na aroma vína, a přispívá tak k vyvážení redoxního systému v buněčném metabolismu (obr. 1) [17].



Obr. 1: Metabolická cesta citrátu a glukózy, fruktózy (*b. Oenococcus oeni*):

1. Citrát lyáza, 2. laktátdehydrogenáza, 3. α -acetolaktát syntáza, 4. neenzymatická oxidativní dekarboxylace,
5. α -acetolaktát dekarboxyláza, 6. diacetyl reduktáza, 7. acetoin reduktáza.

Oxid siřičitý hraje komplexní roli ve vinařství, včetně antioxidačních a antimikrobiálních vlastností [5]. Ovlivňuje sensorické rysy, protože se váže s karbonylovými sloučeninami s vicinální strukturou, jako je diacetyl. Ty přispívají ke změnám v chuti a vůni jen jako volné. Reakce mezi nimi je exotermická, reverzibilní a koncentrace mezi volnou a vázanou složkou závisí na pH ($pK_{a1,H_2SO_3} = 1,8$, $pK_{a2,H_2SO_3} = 7,2$) [18], koncentraci SO_2 , koncentraci všech složek vázajících siřičitan [2]. Díky reverzibilitě reakce se takto dá potlačit nebo zvýšit aroma diacetylu.

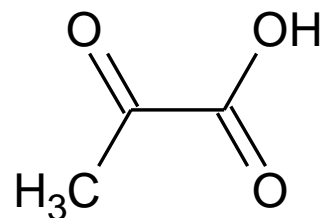
Diacetyl se pro svojí typickou máslovou vůni používá jako dochucovadlo máselného popkornu do mikrovlnné trouby, mléčných produktů a dalších podobných výrobků, rovněž se jako dochucovadlo používá v pekařství [19]. V nízkých koncentracích nebylo prokázáno, že by diacetyl přítomný v jídle nějak ohrožoval lidské zdraví [20]. Avšak při inhalaci vyšších koncentrací diacetylu ve spojení s ostatními faktory způsobuje onemocnění plic [21]. Při kontrole zaměstnanců v továrně na výrobu máslového popkornu se objevilo neobvykle vysoké procento vyvinuté obliterativní bronchiolitidy, fatálního onemocnění plic [22]. Na inhalačním krysím a myším modelu se potvrdilo, že právě vdechováním diacetylu dochází k poškození epitelu horních a dolních cest dýchacích [23].

Oficiální metoda pro stanovení diacetylu schválená European Brewing Convention spočívá v extrakci složek piva destilací vzorku nápoje, následuje reakce *o*-fenylendiaminem s UV spektrometrickým stanovením výsledného 2,3-dimethylchinoxalínu [24]. Interference s ostatními složkami reagujícími s derivatizačním činidlem je bohužel vysoká. Alternativní metodou pro stanovení je plynová chromatografie s headspace dávkováním a detekcí elektronového záchytu, iontová chromatografie [25] či extrakce na pevné fázi s následnou RP-HPLC s UV spektrometrickou [26] či hmotnostní detekcí. Kromě OPDA se k derivatizačním reakcím, vytvářejícím chinoxalinové deriváty, používají 2,4-dinitrofenylhydrazin, 1,2-diaminobenzen a 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen [4]. Tyto metody jsou citlivější a spolehlivější, avšak technicky, finančně a časově náročnější než voltametrické.

1.2.2. Pyruvát

Pyruvát je čirá kapalina bez zápachu dobře rozpustná ve vodě. Systematický název je kyselina 2-oxopropanová. Je žíravá, další údaje o látce jsou bodově shrnuty [1].

Číslo CAS	127-17-3
Empirický vzorec	C ₄ H ₆ O ₂
Molekulová hmotnost	88,06 g·mol ⁻¹
Bod varu	165 °C
Hustota (25 °C)	1,267 g·cm ⁻³
R-věty	34
S-věty	26-36/37/39-45



Pyruvát dostal své jméno podle toho, že vzniká zahřátím kyseliny vinné, hlavní kyseliny ve víně [27]. Kyselina pyrohroznová, jak z ní i jiný název, je jedním z nejdůležitějších buněčných metabolitů [28,29]. Je nejvíce reaktivní a nejrozmanitější látkou, která vystupuje v katabolických a anabolických drahách cukrů, lipidů a proteinů [30], a představuje tak centrální místo v mnoha metabolických cestách [31], mimo jiné i ve fermentačním kvašení pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (hlavní druh při fermentaci vína či piva) [27].

Pyruvát jako α -ketokyselina [31] je konečným produktem glykolýzy. Slouží k získání energie z cukrů v glykolýze probíhající jak v aerobním tak anaerobním prostředí. Vzniká také přímou transaminací alaninu [32].

Jedna z možných reakcí kyseliny pyrohroznové je přeměna pomocí enzymu pyruvátdehydrogenázy v pyruvát-dehydrogenázovém komplexu, kde za spotřeby NAD vzniká acetyl-CoA [32], sloužící jako prekurzor syntézy mastných kyselin či cholesterolu [33], anebo může vstupovat do citrátového cyklu, který pro buňku/kvasinku získá více energie [27].

V anaerobním prostředí, kde nelze využít dýchací řetězec, je pyruvát přeměňován nejprve pyruvátdekarboxylázou na acetaldehyd a následně

alkoholdehydrogenázou na ethanol [34] či pomocí laktátdehydrogenázy na laktát. Tyto reakce slouží k reoxidaci NAD [27]. Další variantou dekarboxylace pyruvátu je reakce pomocí α -acetolaktátsyntházy na α -acetolaktát, ze kterého vzniká diacetyl [35] či acetoin [36].

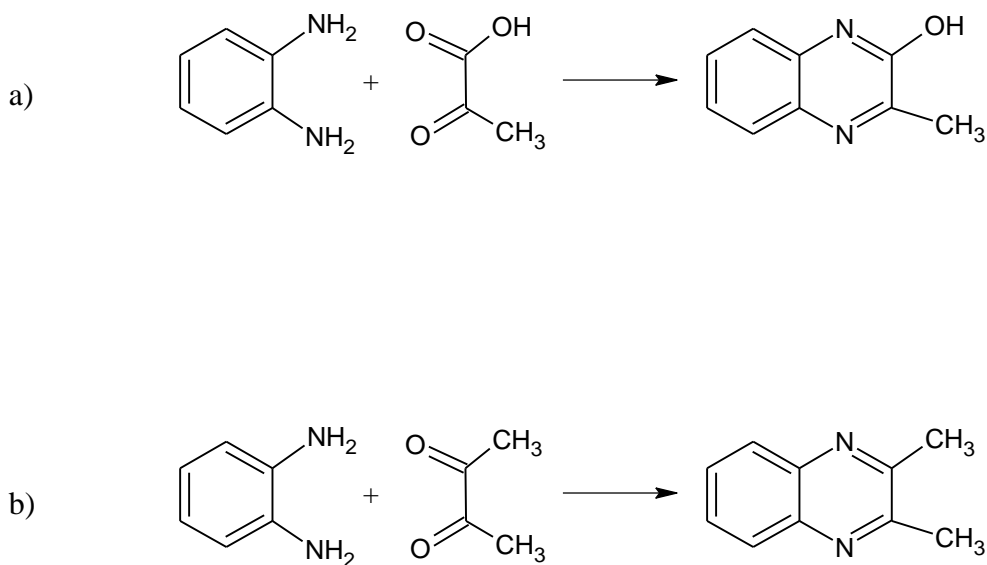
Během růstu kvasinek při kvasných procesech dochází k hromadění pyruvátu v médiu. Tento pyruvát není závislý na pyruvátdekarboxyláze v buňkách ani na množství aminokyselin v roztoku [37]. Nejvíce ho bývá na začátku růstu a na konci, přičemž jeho koncentrace koreluje s maximem růstu mikroorganismů, kdy nejvyšší koncentrace je dosaženo těsně před maximem růstu a následně se přeměňuje na acetát [38]. Konečná koncentrace je tedy závislá na načasování oddělení kvasinek. Ve výsledném produktu piva bývá rozmezí koncentrace pyruvátu $10\text{-}100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($11\text{-}110\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [37], ve vínech $0\text{-}500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0\text{-}570\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [39].

Pro stanovení pyruvátu lze využít plynovou chromatografii, iontově výměnnou chromatografii [25], HPLC s detekcí hmotnostní, spektrofotometrickou či fluorescenční, přičemž musí předcházet enzymatická nebo derivatizační reakce, dále pak například kapilární elektroforézu, polarografii [40] či elektrochemický biosenzor s enzymatickou reakcí s pyruvát oxidázou [41].

1.3. Reakce s *o*-fenylendiaminem - Hinsbergova reakce

Během Hinsbergových reakcí vznikají heterocyklické sloučeniny chinoxalinu [42]. Dochází k intermolekulární kondenzaci benzen-1,2-diaminu, případně jeho derivátu, s α -ketoskupinami s následnou cyklizací [43].

Když OPDA reaguje s látkami s dvěma vicinálními skupinami vedle sebe, vzniká bicyklický aromatický chinoxalinový kruh [3]. Tyto deriváty jsou pak polarograficky aktivní [44]. Na obr. 2 jsou znázorněny reakce OPDA s diacetylem a pyruvátem za vzniku 2,3-dimethylchinoxalinu a 2-hydroxy-3-methylchinoxalinu.



Obr. 2: Schéma reakce diacetylu (a) a pyruvátu (b) s OPDA.

1.4. Pracovní elektroda

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (m-AgSAE) byla vybrána jako pracovní elektroda z důvodu snadné, opakovatelné a rychlé přípravy.

Pro polarografické či voltametrické techniky je nejvhodnějším materiálem rtuť, avšak kvůli obavám z její toxicity se hledají náhradní materiály. Amalgámové elektrody byly proto vyvinuty jako snaha nahradit kovovou rtuť za netoxickou náhražku v podobě zubního amalgámu [45]. Elektroda je tak prakticky netoxická, má dobrou mechanickou stabilitu, snadnou regeneraci povrchu a práce s ní je jednoduchá [46]. Amalgámové elektrody lze rozdělit z hlediska stavu povrchu na leštěné (pevná amalgámová elektroda bez kapalné rtuti; p-MeSAE), filmové (p-MeSAE pokryta rtuťovým filmem; MF-MeSAE), menisková (p-MeSAE pokryta rtuťovým meniskem; m-MeSAE), kompozitní (pracovní elektroda na bázi jemného pevného amalgámu a pevného polymeru; MeSA-CE) a další [47].

Amalgámové elektrody se dají připravit naplněním vhodné skleněné trubičky, která obsahuje elektrodový kontakt, práškovým stříbrem či jiným kovem tvořící amalgám a následném ponoření přes noc do kapalné rtuti. Vzniklý amalgám lze pak upravovat do nejrůznějších typů elektrod [48] (obr. 3).

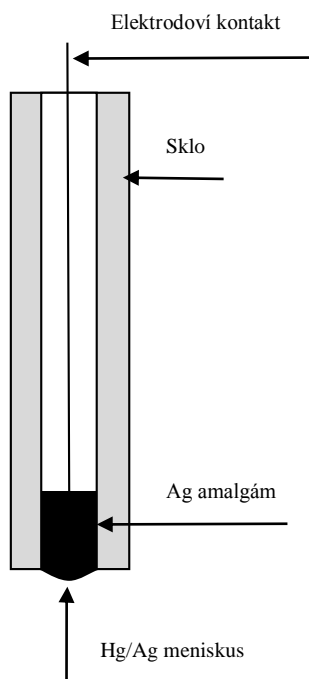
Menisková elektroda má nižší šum, lepší opakovatelnost signálu [48], vykazuje vysoké přepětí vodíku srovnatelné v některých případech s visící rtuťovou kapkovou elektrodou [49] a oproti pevné elektrodě má hladký kapalný povrch [45]. Široké potenciálové okno umožňuje měřit nejen přímou redukci analytu, ale i provádět předběžnou akumulaci vysoce elektronegativních kovů z roztoku, který obsahuje tyto kovy v podobě iontů [47].

Velkým problémem meniskové elektrody je pasivace elektrodového povrchu analytem nebo některým z produktů elektrodové reakce. Pasivace způsobuje snižování odezvy elektrody. Tomuto problému se předchází některým z následujících čistících kroků [45]:

Amalgamace: Byla prováděna přibližně jednou týdně nebo při objevení se pasivace povrchu. Leštěná amalgámová elektroda se namočila do kapalné rtuti po dobu 35 s, tím se nanese nový meniskus a obnovil se celkový elektrodový povrch.

Aktivace: Na m-AgSAE, zapojenou v tříelektrodovém zapojení v roztoku KCl ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, při aktivaci promícháván), bylo vloženo napětí -2200 mV po dobu 300 s. Odstraní se tím adsorbované nečistoty z povrchu elektrody a zvýší citlivost. Aktivace byla prováděna po amalgamacii a jednou denně před začátkem měření.

Regenerace: Na elektrodu se střídavě vkládají po dobu 30 s (150 cyklů) regenerační potenciály E_{in} (kladnější regenerační potenciál) a E_{fin} (zápornější regenerační potenciál) s délkou pulsu 0,1 s. Hodnoty regeneračních potenciálů byly nalezeny experimentálně.



Obr. 3: Rtuňovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda (m-AgSAE).

1.5. Použité techniky

Během techniky DC voltametrie (DCV) se na pracovní elektrodu vkládá lineárně s časem měnící se potenciál. Závislost protékajícího proudu pracovní elektrodou na vloženém potenciálu zobrazuje polarizační křivka, na které se projeví voltametrická vlna/pík analytu. Poloha vlny/píku má kvalitativní vlastnost a výška vlny je úměrná koncentraci měřené látky (kvantitativní údaj) [50].

Na rozdíl od předchozí techniky se diferenční pulzní voltametrie (DPV) liší v charakteru průběhu vkládaných potenciálů. Lineárně s časem se na pracovní elektrodu vkládají měnící se potenciálové pulzy o amplitudě několika desítek mV a době trvání desítek ms. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením potenciálového pulzu a na jeho konci. Na polarizační křivce se tato změna projeví jako voltametrický pík. Poloha píku opět odpovídá druhu látky a výška píku je úměrná její koncentraci [50].

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Zásobní roztok 2,3-DMQ (97 %, Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,01631 g v deionizované vodě (Milli-Q Plus system, Millipore) na celkový objem 100 mL. Stejným způsobem o stejné koncentraci byl připraven i roztok 2-OH-3-MQ (Aldrich^{CPR}, Sigma-Aldrich) navážením 0,01602 g. Další roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním.

Jednotlivé zásobní roztoky diacetylu (97 %, Sigma-Aldrich) a pyruvátu (98 %, Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ byly připraveny pipetováním 455 μL diacetylu a 355 μL pyruvátu a doplněny deionizovanou vodou na celkový objem 50 ml. Vzorky byly uchovávány v lednici.

Roztok OPDA (99,5 %, Sigma-Aldrich) o koncentraci $9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,02445 g v Brittonově-Robinsonově pufru (BR-pufu) nebo v deionizované vodě s přídavkem $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové (HCl, p.a., Lach-Ner, 35%) pro úpravu pH v 25 mL odměrné baňce. Takto připravený roztok byl uchován v lednici, ve tmě a každý den byl připravován čerstvý kvůli jeho nestabilitě v roztoku.

Kyselá složka BR-pufu o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ byla připravena rozpuštěním 2,47 g kyseliny borité (H_3BO_4 , Penta, p.a.), 2,81 mL octové kyseliny (CH_3COOH , Lach-Ner, 80 %), 2,71 mL kyseliny fosforečné (H_3PO_4 , Lach-Ner, 85%) v 1 L deionizované vody. Zásaditá složka o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ byla připravena rozpuštěním 8,00 g hydroxidu sodného (NaOH, Penta, p.a.) v 1 L deionizované vody. Roztoky BR-pufu o různých pH byly připraveny smícháním těchto dvou složek.

Aktivační roztok chloridu draselného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Lach-Ner, p. a) byl připraven rozpuštěním 3,73 g v 250 mL deionizované vody.

2.2. Aparatura

Voltametrická stanovení se prováděla na sestavě Eco-Tribo polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (Polaro-Sensors) v tříelektrodevém zapojení. Za pracovní elektrodu byla zvolena rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (m-AgSAE, ETP CZ O X-04-01). Nasycená argentschloridová elektroda ($3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, typ RAE 113, Monokrystaly) byla použita jako referentní a platinová elektroda jako pomocná. Rychlost nárůstu byla zvolena jako $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, při měření technikou DPV byla výška pulzu -50 mV a šířka pulzu 100 ms .

Přesná hodnota pH byla naměřena na digitálním laboratorním pH metru Jenway 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway). Přístroj byl minimálně jednou týdně kalibrován standardními kalibračními pufrů o pH 4,00, 7,00 a 9,00 (Sigma-Aldrich).

Pro temperaci roztoků pro derivatizační reakce byla použita vodní lázeň s ultrazvukem Fisher Brand® FB15061.

2.3. Pracovní postupy

Závislost vlivu pH, rychlosti nárůstu potenciálu a opakovatelnosti na odezvě signálu 2,3-DMQ a 2-OH-3-MQ byla měřena v roztoku, který byl připraven pipetováním 1 ml zásobního roztoku příslušné látky ($c = 1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku příslušným BR-pufrem.

Opakovatelnost jednotlivých stanovení byla naměřena pomocí dvaceti po sobě jdoucích stanovení v BR-pufru o optimální hodnotě pH pro dané měření bez vložených regeneračních potenciálů a s několika variantami vložených regeneračních potenciálů.

Za optimálních podmínek, při kterých látky poskytovaly nejvyšší odezvu (vhodné pH prostředí a vhodná regenerace elektrodového povrchu) se následně proměřily kalibrační závislosti od nejnižší měřitelné koncentrace po hodnotu $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Všechny koncentrační řady byly proměřeny pipetováním příslušného objemu zásobního roztoku ($c = 1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku BR-pufrem o optimálním pH.

Při měření se jednotlivé roztoky nejprve probublávaly dusíkem (čistota 4.0, Linde) po dobu přibližně 5 minut pro odstranění rozpuštěného kyslíku a poté se naměřily voltametrické záznamy.

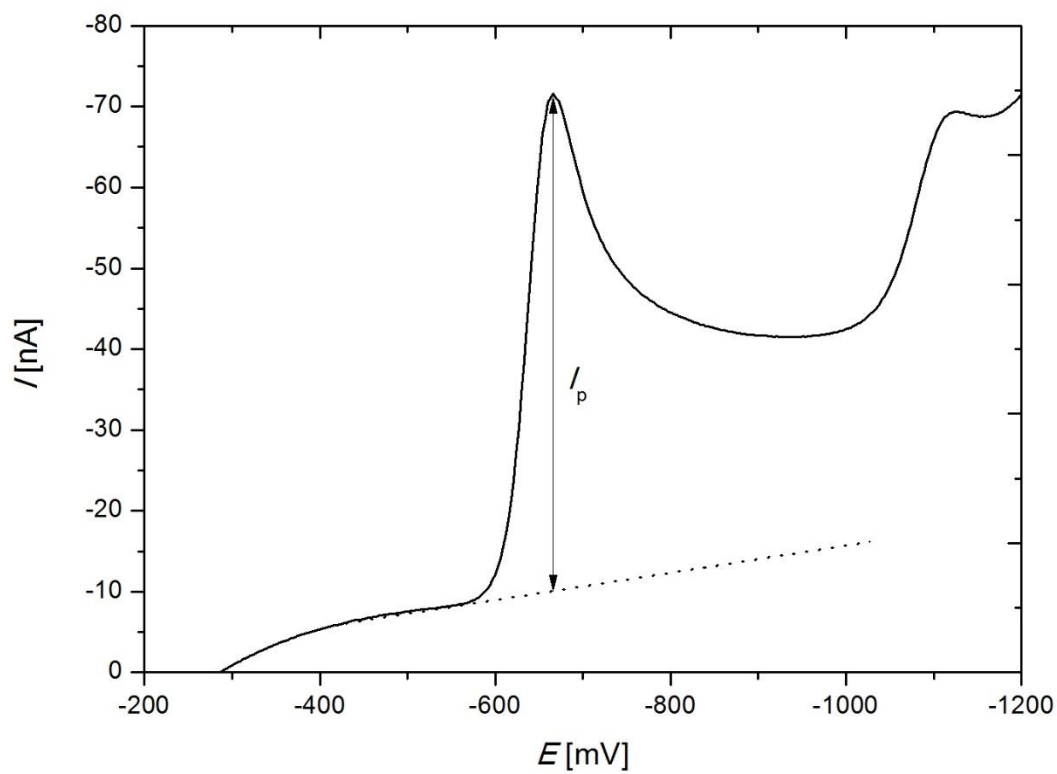
Měření při zjišťování závislosti odezvy na pH (2,0-13,0) se prováděla 5×, pro závislosti odezvy na rychlosti nárůstu potenciálu 3× a při určování opakovatelnosti stanovení 20×. Koncentrační závislost byla měřena 5×, přičemž nejnižší koncentrace u nejnižšího koncentračního řádu byla naměřena 10×.

Závislosti účinnosti derivatizačních reakcí na koncentraci OPDA, pH reakce, teplotě a času byla zjišťována pomocí zásobních roztoků standardů diacetylu a pyruvátu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pipetováním 10 μL jednotlivých látek, 1 ml roztoku OPDA rozpuštěného v daném pH (naváženo vypočítané množství OPDA rozpuštěné v příslušném pH připraveného pipetováním 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl a doplněním deionizované vody či doplněním BR-pufrem) do 10 ml odměrné baňky. Celkový čas reakce byla doba od přidání činidla po doplnění baňky po rysku příslušným BR-pufrem, optimálním pro sledovanou látku. Při studování vlivu pH reakce se reakční směs doplňovala BR-pufrem tak, aby výsledné pH reakce přibližně odpovídalo optimálním podmínkám stanovení chinoxalinových derivátů. U vlivu koncentrace, času a teploty se standard chinoxalinu pro srovnání účinnosti reakce připravoval pipetováním 1 mL standardu a 1 mL HCl o pH odpovídající pH reakce, aby výsledné potenciály byly shodné, a byl tak zanedbán vliv pH na samotné měření. Všechna měření byla prováděna 5×.

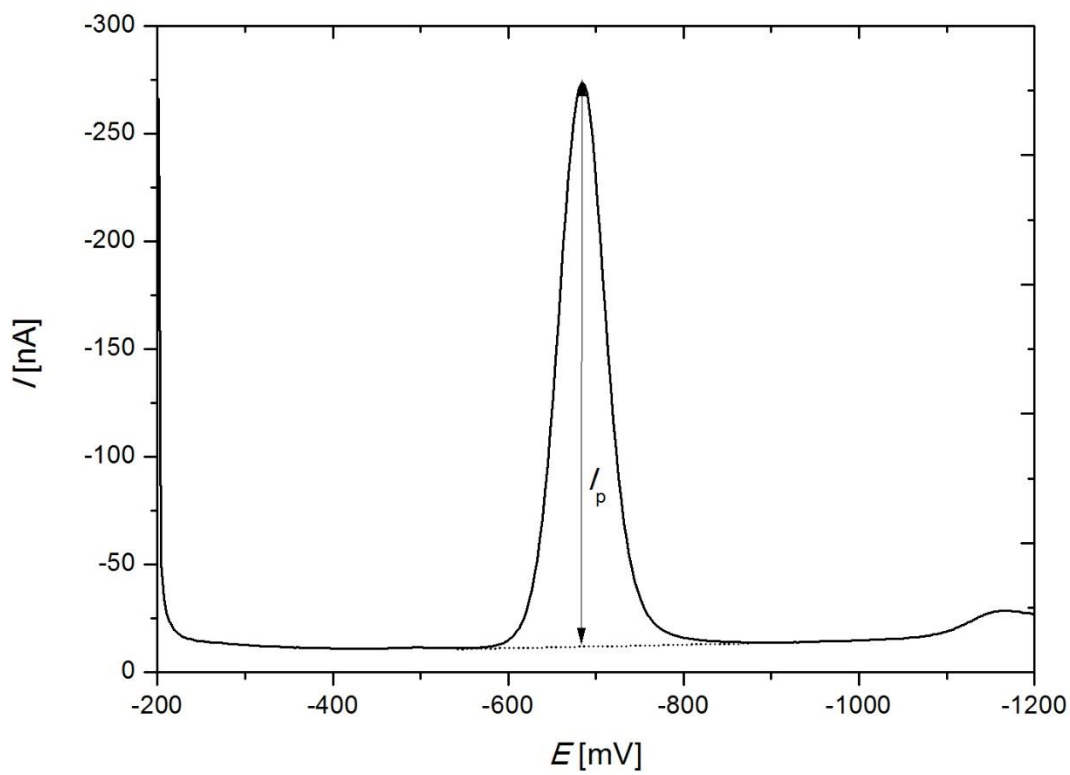
Bílé víno (Müller Thurgau, Lobkowiczské zámecké vinařství, 2012, suché, 13,5 % obj. alkoholu), světlé pivo (Svijany 11°, 4,8 % obj. alkoholu) a domácí jablečné víno (2014, neznámý obj. alkoholu) byly použity jako reálné vzorky. Bylo pipetováno 1 ml vzorku a 1 ml roztoku OPDA ($9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 1,2), nechalo se zareagovat 30 minut při 35 °C a doplnilo se příslušným BR-pufrem. Pro zjištění výtěžku reakce se navíc k 1 ml vzorku přidal přídavek standardu pyruvátu a diacetylu a nechal se opět zreagovat. Rozdíl mezi naměřenými koncentracemi odpovídá účinnosti reakce. Vzorek samotný byl změřen 3× a s přídavkem 3×. Koncentrace byla zjišťována metodou standardního přídavku 2,3-DMQ pro diacetyl a 2-OH-3-MQ pro pyruvát. Následně se změřily vzorky se čtyřmi standardními přídavky.

Výška píku pro techniku DCV byla vyhodnocena prodloužením křivky linie před růstem píku (obr. 4) a u techniky DPV spojením minim po stranách píku (obr. 5).

Pro vytvoření grafů, výpočty a statistiku byly použity programy OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation). Pomocí programu OriginPro 8.0 byly kalibrační přímky vyhodnoceny a pro ně sestrojeny konfidenční pásy ($\alpha = 0,05$). Mez stanovitelnosti (L_Q) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky deseti po sobě jdoucích měření nejnižší koncentrace příslušné kalibrační křivky, odlehlé výsledky byly vyloučeny na základě Grubbsova testu a meze opakovatelnosti (L_{12}) byly vypočteny vynásobením směrodatné odchylky s příslušným koeficientem spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) [51].



Obr. 4: Grafické znázornění odečtu výšky píku (I_p), technika DCV.



Obr. 5: Grafické znázornění odečtu výšky píku (I_p), technika DPV.

3. Voltametrické stanovení produktů derivatizačních reakcí na m-AgSAE

3.1. 2,3-Dimethylchinoxalin

3.1.1. Vliv pH

Závislost elektrochemického chování 2,3-DMQ při proměnném pH byla zjišťována v BR-pufriu v rozmezí od pH 2,0 do pH 13,0 pomocí technik DCV a DPV. Koncentrace studované látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

U obou technik látka poskytovala při pH 2,0 a 3,0 tři píky, v rozmezí pH 4,0-7,0 vznikaly dva píky, přičemž pik objevující se při negativnějších potenciálech se postupně zmenšoval a od $\text{pH} \geq 8,0$ zůstane jen jeden hlavní pik.

Na obr. 6 a 7 jsou znázorněny vybrané křivky v rozmezí pH 2,0 až pH 13,0 pro obě techniky. Lze na nich pozorovat posun potenciálů piků k zápornějším hodnotám. Důvodem posunu je obtížnější redukce látky v závislosti na nižší koncentraci H^+ iontů v měřeném prostředí.

Změny I_p a posun E_p v závislosti na pH jsou uvedeny v tabulce 1 a na obr. 8 a 9. Závislosti E_p na pH pro obě techniky v úseku pH 2,0-4,0 a pH 4,0-13,0 lze vyjádřit rovnicemi (1) a (2):

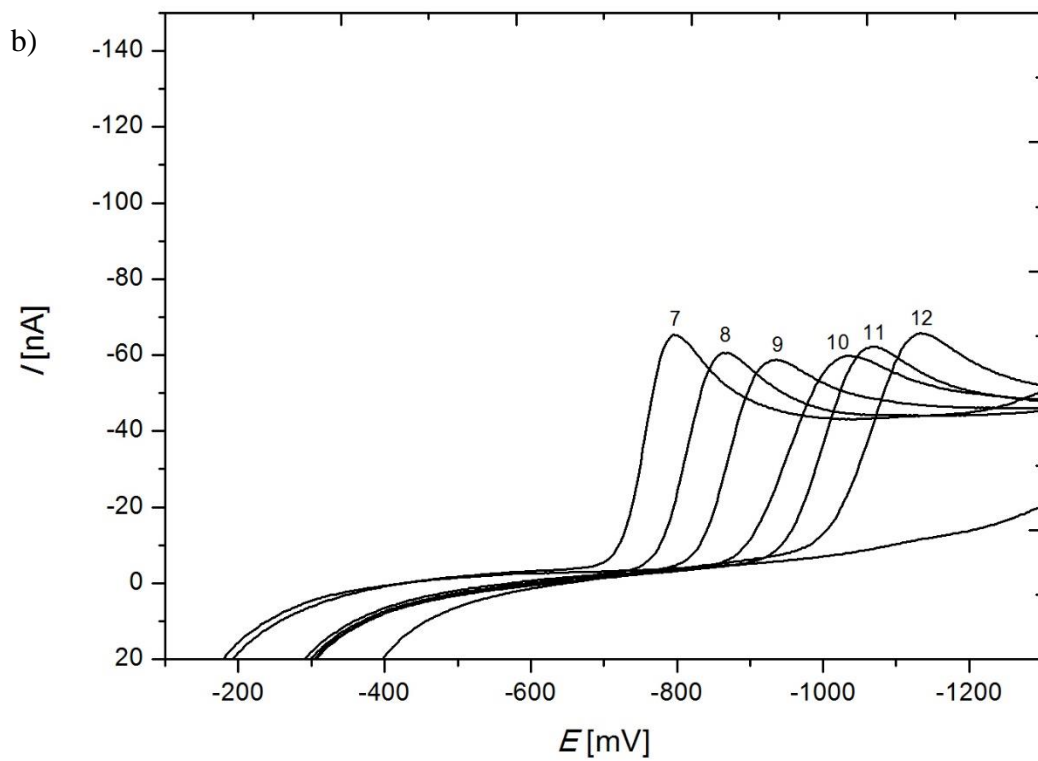
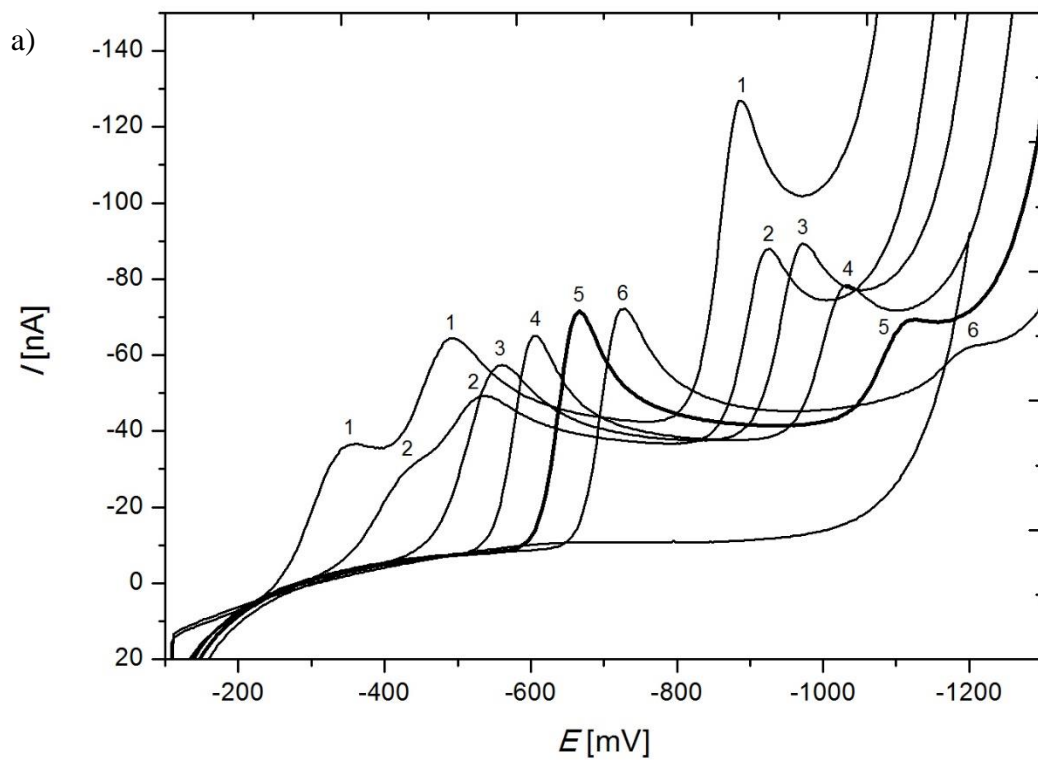
$$\text{DCV} \quad E_{p_{2,0-4,0}} [\text{mV}] = -33,9 \cdot \text{pH} - 422,0 \quad (R = -0,9804) \quad (1)$$

$$E_{p_{4,0-13,0}} [\text{mV}] = -66,3 \cdot \text{pH} - 274,6 \quad (R = -0,9967)$$

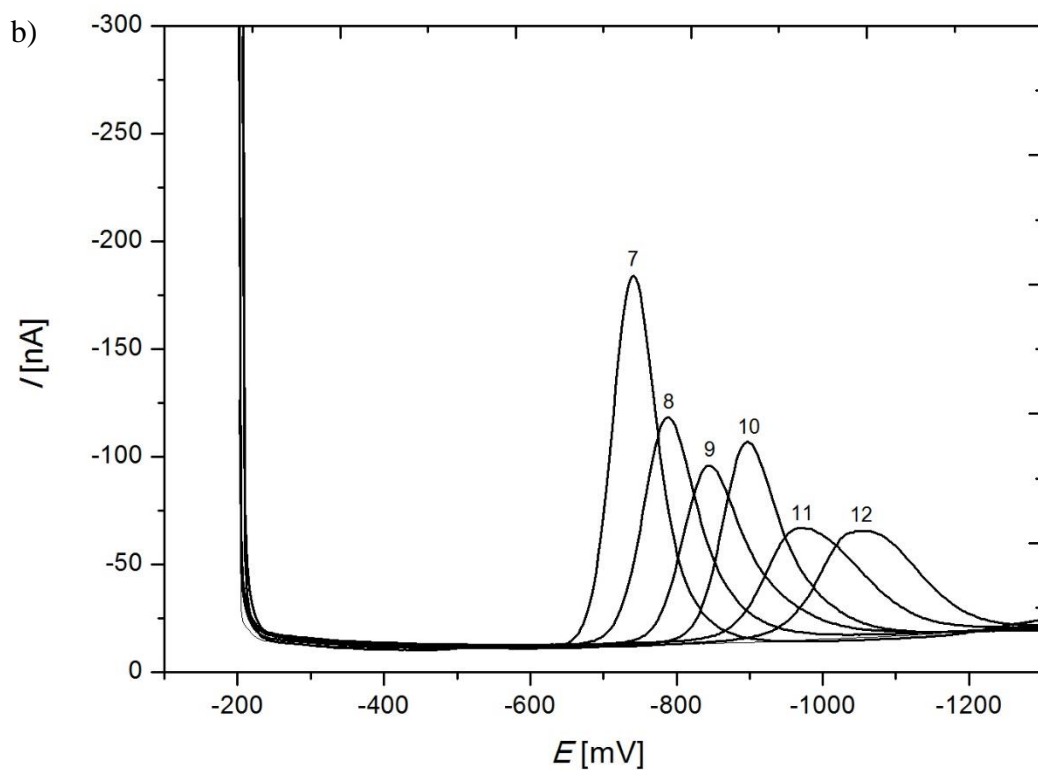
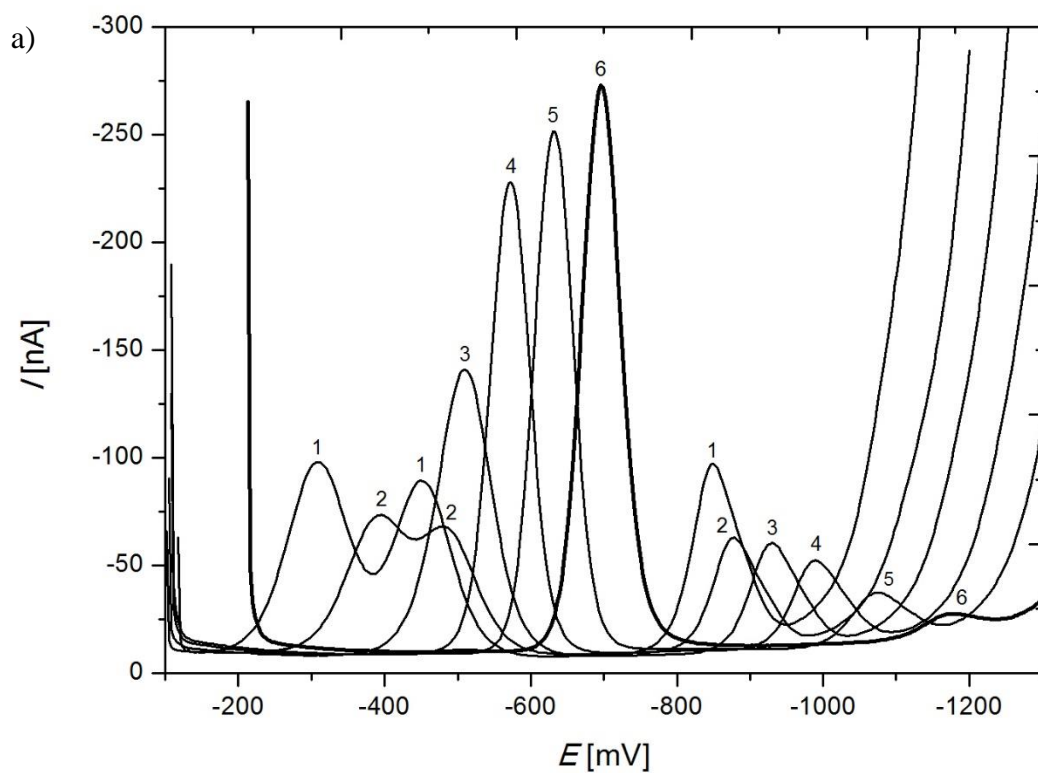
$$\text{DPV} \quad E_{p_{2,0-4,0}} [\text{mV}] = -36,2 \cdot \text{pH} - 361,3 \quad (R = -0,9631) \quad (2)$$

$$E_{p_{4,0-13,0}} [\text{mV}] = -59,2 \cdot \text{pH} - 264,8 \quad (R = -0,9983)$$

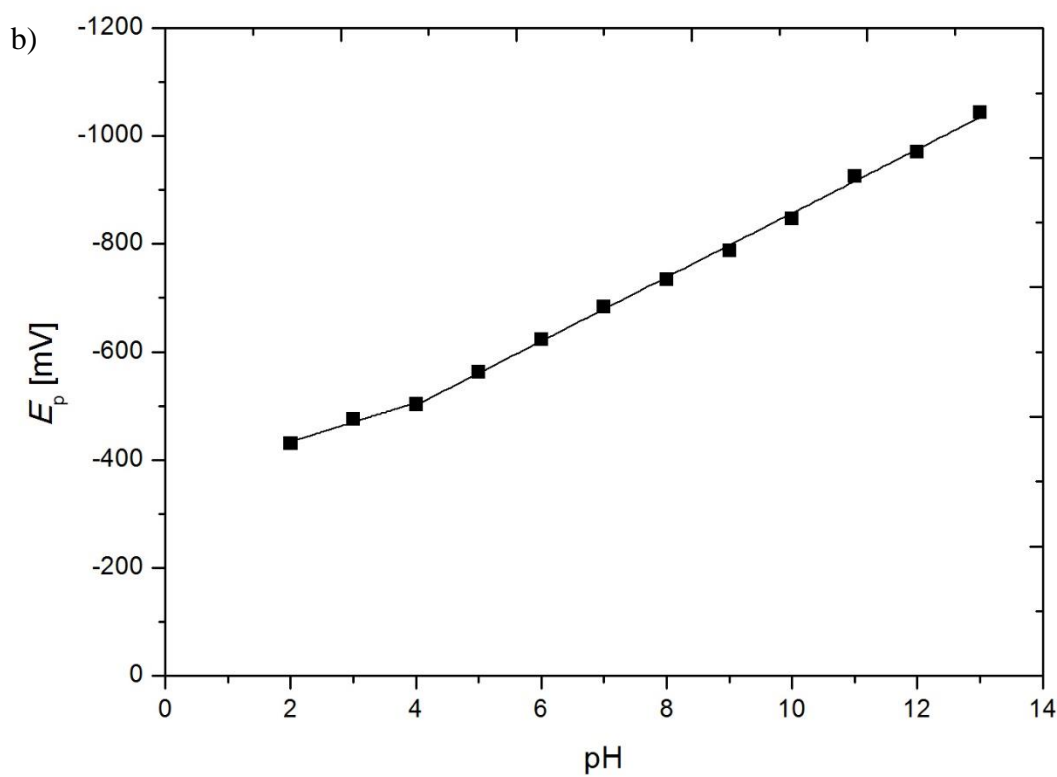
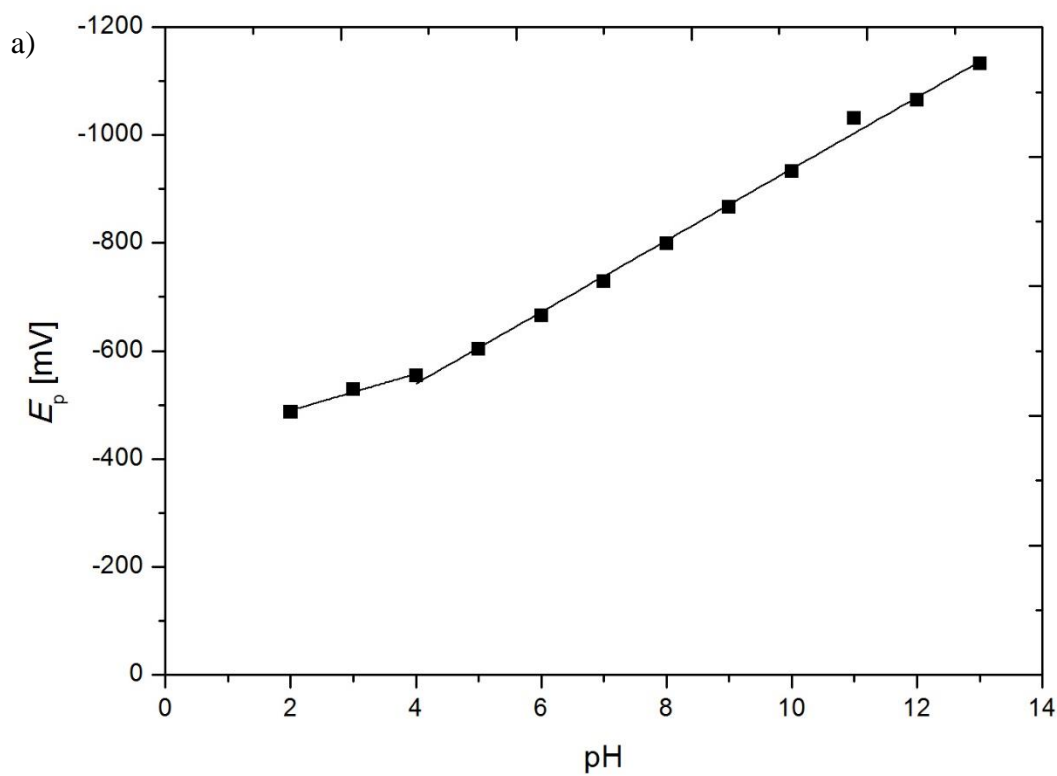
Maximální odezva byla naměřena pro techniku DCV při pH 6,0 a pro techniku DPV při pH 7,0. Proto byly zvoleny jako optimální prostředí pro další optimalizaci stanovení.



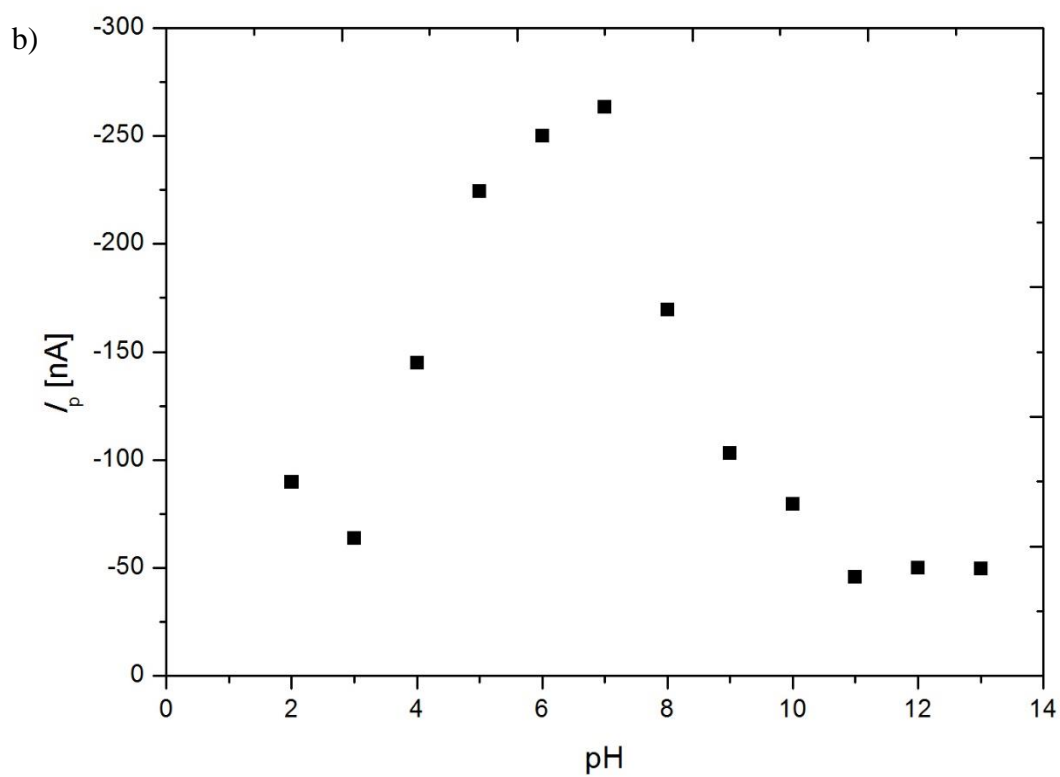
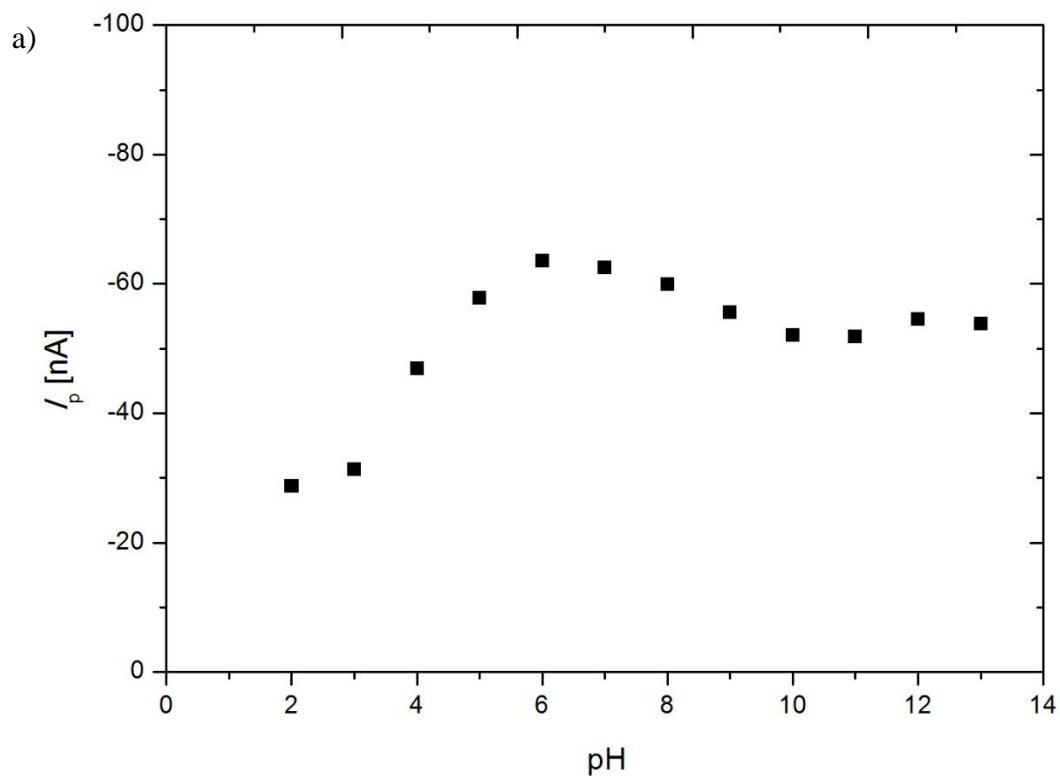
Obr. 6: DC voltamogramy 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufry o pH 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6) (a), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11), 13,0 (12) (b).



Obr. 7: DPV voltamogramy 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufu o pH 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6) (a), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11), 13,0 (12) (b).



Obr. 8: Závislost E_p na pH měřená technikami DCV (a) a DPV (b) na m -AgSAE v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 2,0 až pH 13,0. Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 9: Závislost I_p na pH měřená technikou DCV (a) a DPV (b) na $m\text{-AgSAE}$ v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufri o pH 2,0 až pH 13,0.

Tabulka 1: Závislosti hodnot I_p a E_p na pH měřené technikou DCV a DPV na m-AgSAE v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o různém pH.

pH	DCV		DPV	
	E_p [mV]	I_p [nA]	E_p [mV]	I_p [nA]
2,0	-487	-28,8	-431	-89,6
3,0	-529	-31,3	-476	-63,9
4,0	-555	-46,9	-503	-144,9
5,0	-603	-57,8	-563	-224,3
6,0	-666	-63,5	-623	-241,0
7,0	-729	-62,5	-684	-263,5
8,0	-799	-59,9	-735	-169,7
9,0	-867	-55,6	-789	-102,9
10,0	-933	-52,1	-846	-79,4
11,0	-1031	-51,8	-925	-45,8
12,0	-1065	-54,6	-971	-50,1
13,0	-1133	-53,9	-1044	-49,6

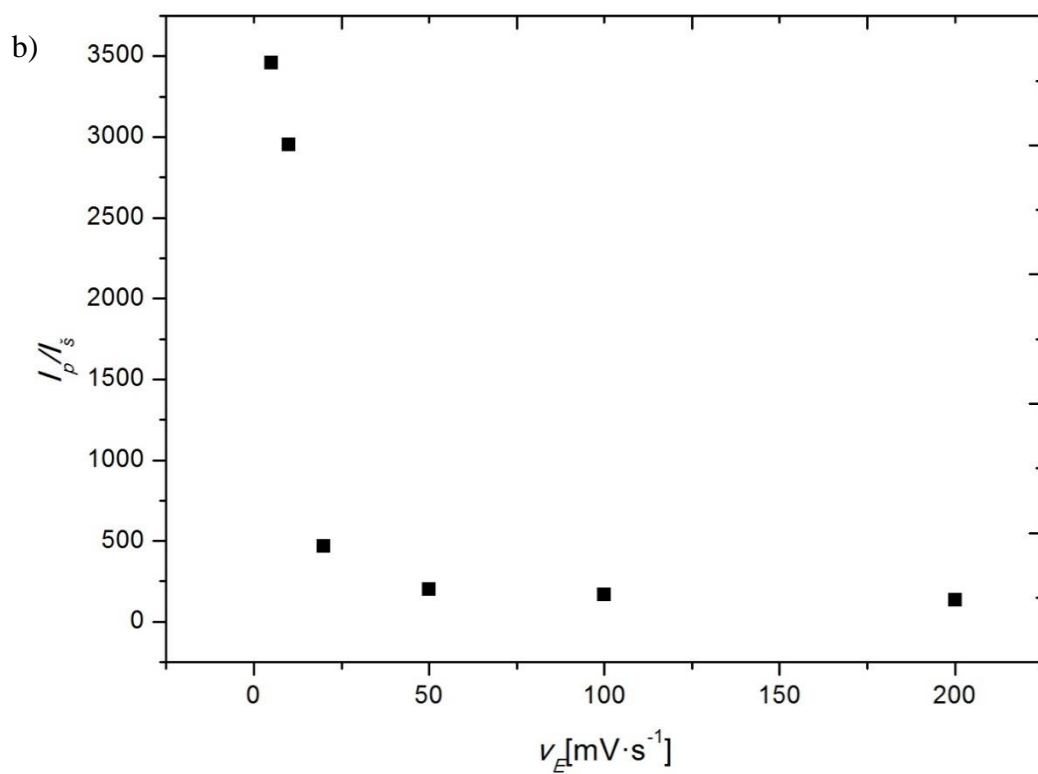
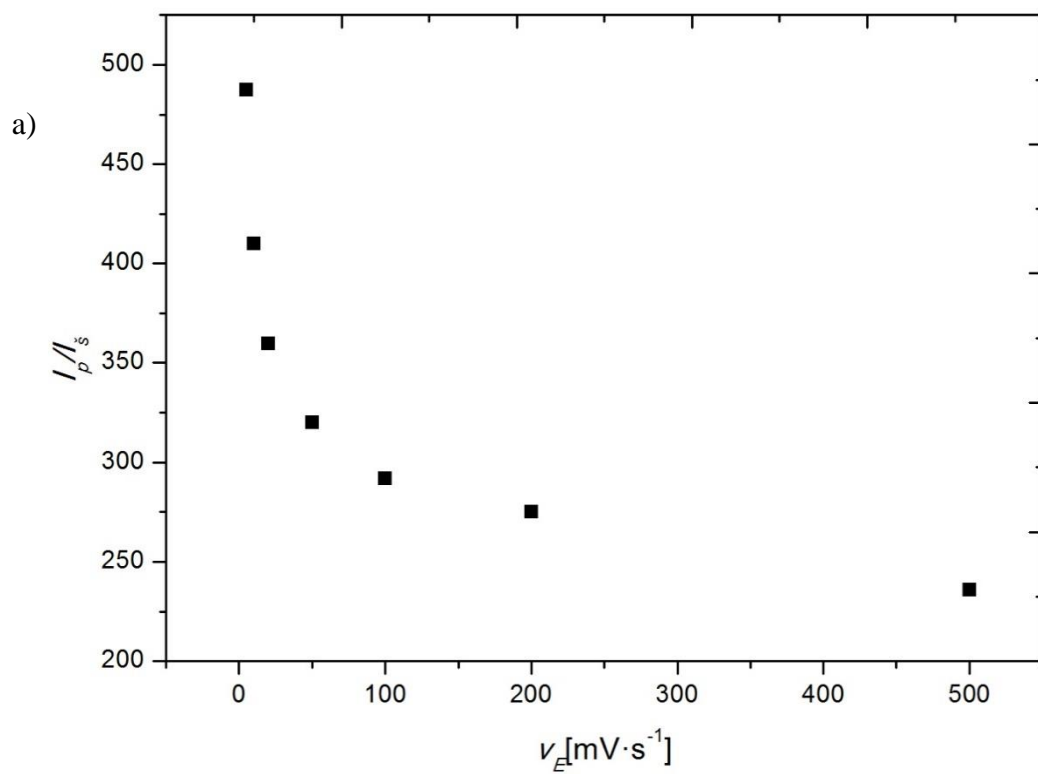
3.1.2. Vliv rychlosti nárůstu potenciálu

Vliv rychlosti nárůstu potenciálu byl studován v prostředí BR-pufry o pH 6,0 pro techniku DCV a pro techniku DPV v prostředí BR-pufry o pH 7,0 při koncentraci 2,3-DMQ $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Byly proměřeny rychlosti $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nejvhodnější rychlost má největší poměr výšky píku k velikosti šumu. Poměry I_p/I_s jsou uvedeny v tabulce 2. Na obr. 9 je znázorněna závislost poměru I_p/I_s na rychlosti nárůstu potenciálu. Nejvhodnější by byla rychlost $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, vzhledem k uvážení délky analýzy byla vybrána pro obě techniky rychlost $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabulka 2: Hodnoty poměru I_p/I_s při různých rychlostech nárůstu potenciálu měřené technikami DCV a DPV na *m*-AgSAE v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 6,0 (DCV) a 7,0 (DPV). Hodnota $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ nebyla možná naměřit technikou DPV.

$v_E [\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}]$	DCV	DPV
	I_p/I_s	I_p/I_s
5	487	3460
10	410	2950
20	360	470
50	320	202
100	292	168
200	275	136
500	236	-



Obr. 9: Graf závislosti poměru I_p/I_s při různých rychlostech růstu potenciálu měřené technikami DCV (a) a DPV (b) na m-AgSAE v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 6,0 (DCV) a 7,0 (DPV).

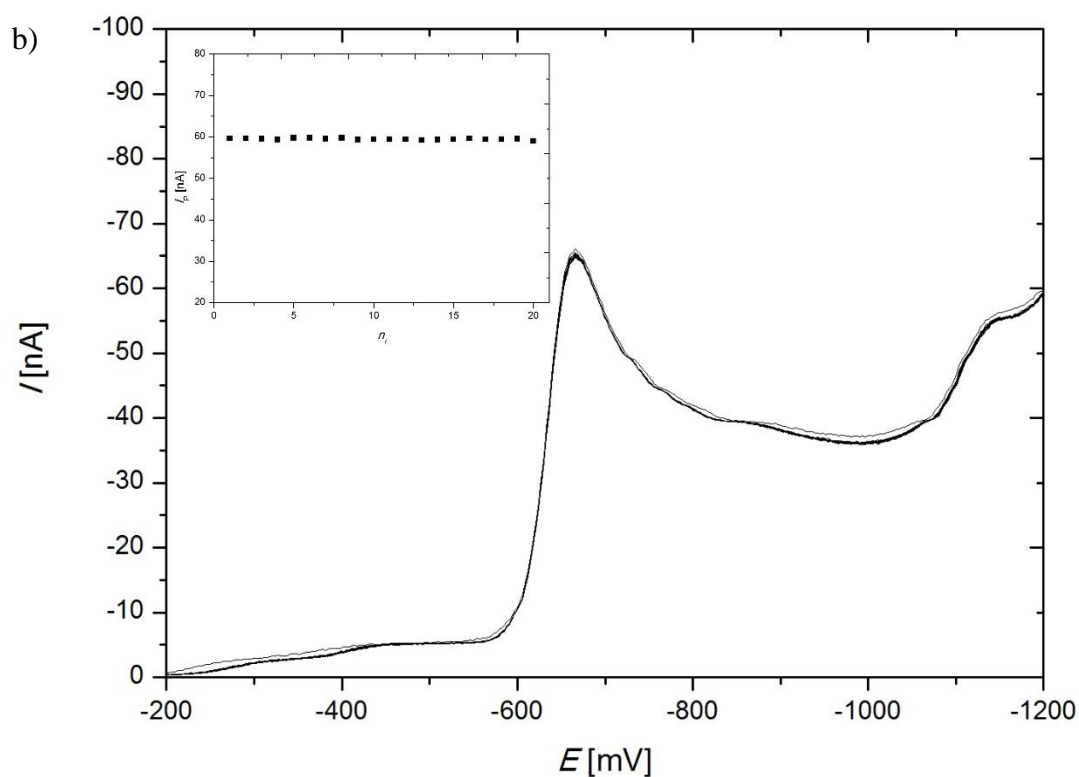
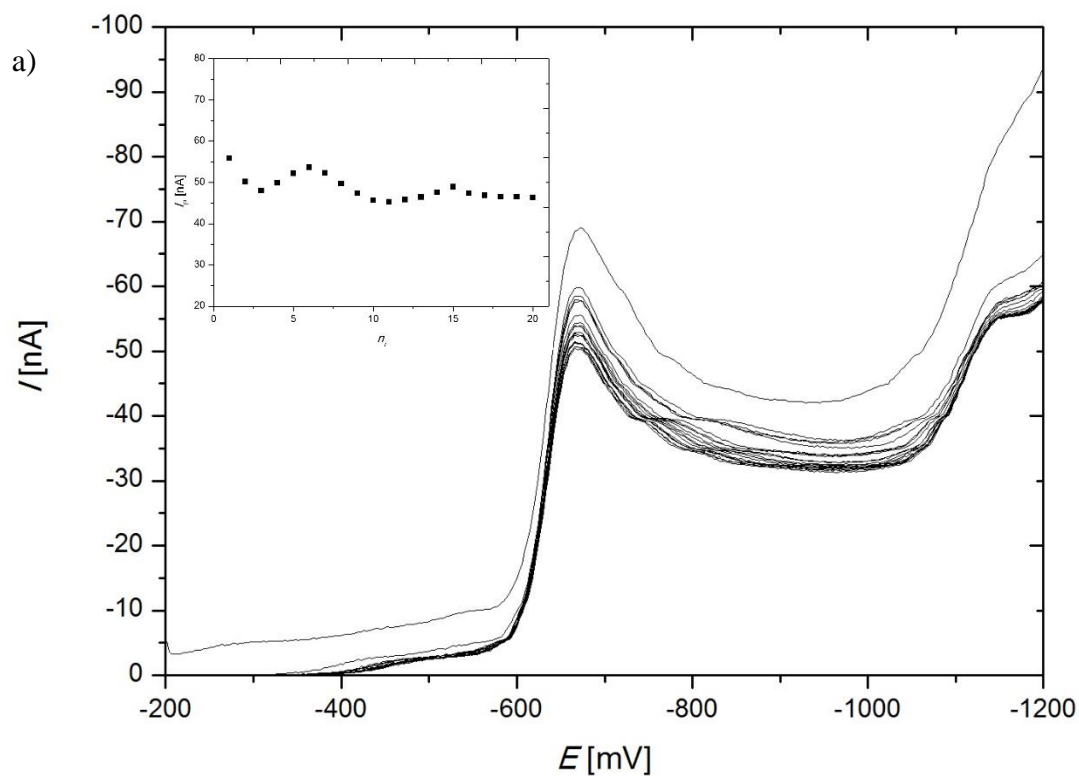
3.1.3. Opakovatelnost

Opakovatelnost dvaceti po sobě jdoucích DCV a DPV stanovení 2,3-DMQ byla měřena při jeho koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ v prostředí BR-pufro o pH 6,0 pro DCV a 7,0 pro DPV. Nejprve byla měřena bez vložených regeneračních potenciálů a pak s několika variantami vložených regeneračními potenciály (obr. 10 a 11).

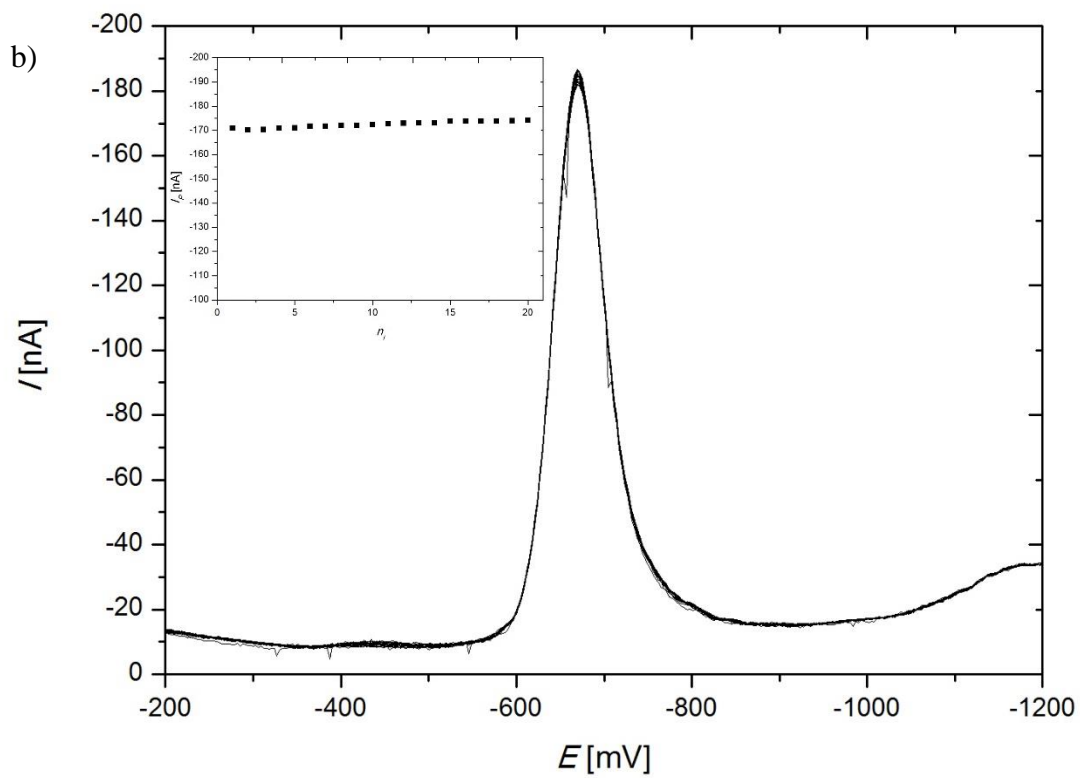
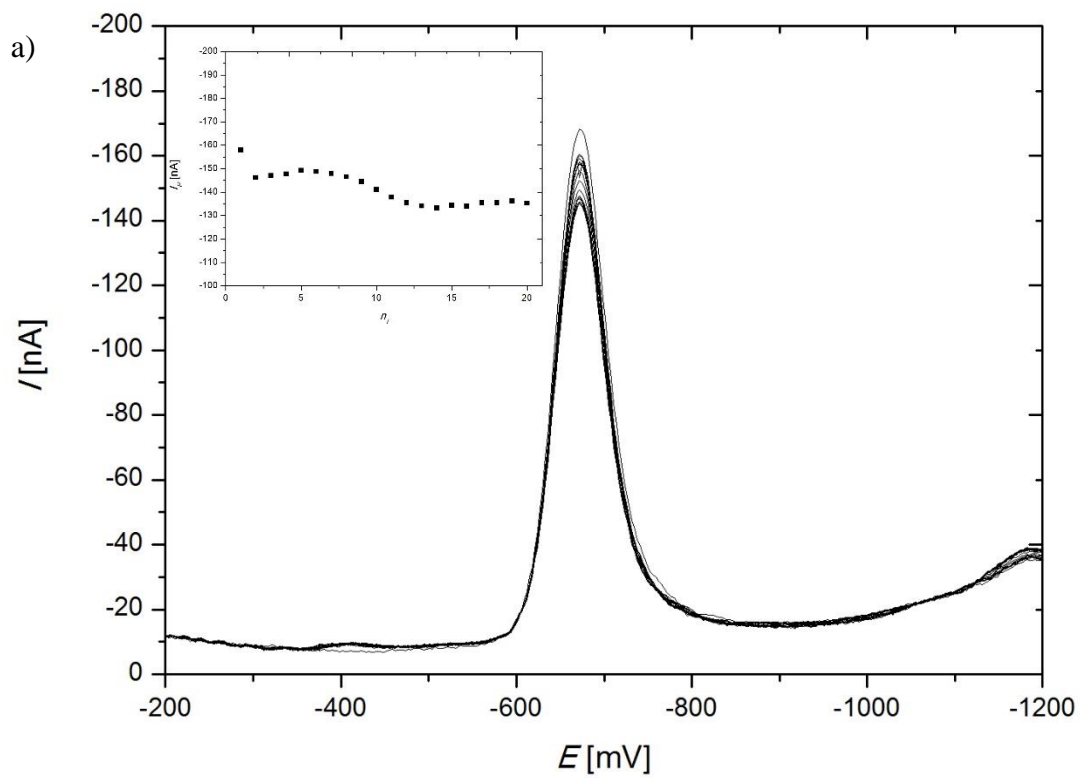
Byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (s_r) ze souborů dat jako míra opakovatelnosti stanovení. Jednotlivé s_r jsou uvedeny v tabulce 3. Opakovatelnosti měření s regenerací $E_{\text{in}} = -400 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -900 \text{ mV}$ pro DCV a regenerací $E_{\text{in}} = -200 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -900 \text{ mV}$ pro DPV měly nejmenší relativní směrodatnou odchylku oproti ostatním měřením, a proto pro následné měření koncentračních závislostí byly zvoleny tyto dvojice regeneračních potenciálů.

Tabulka 3: Hodnoty s_r pro různé vložené regenerační potenciály měřené technikami DCV a DPV na m-AgSAE v roztoku 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufro o pH 6,0 (DCV) a 7,0 (DPV).

Regenerační potenciály		s_r [%]	
E_{in}	E_{fin}	DCV	DPV
-	-	6,03	5,04
-200	-1400	1,43	4,01
-400	-1400	0,69	1,71
-200	-900	0,63	0,76
-400	-900	0,33	3,15



Obr. 10: Voltamogramy 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DCV na *m*-AgSAE v prostředí BR-pufro o pH 6,0 bez vložené regenerace (a) a s vloženými regeneračními potenciály $E_{in} = -400 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$ (b). Odpovídající závislost I_p na pořadí měření ($n=20$) je zobrazena ve vloženém grafu.

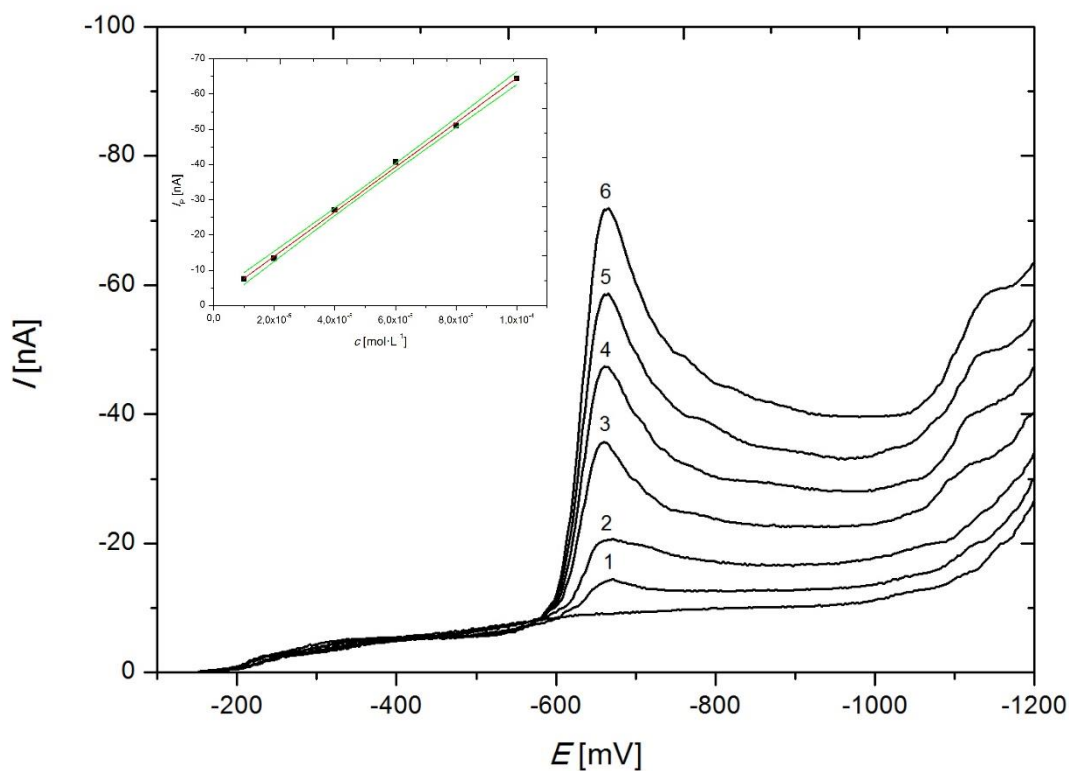


Obr. 11: Voltamogramy 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufry o pH 7,0 bez vložené regenerace (a) a s vloženými regeneračními potenciály $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$ (b). Odpovídající závislost I_p na pořadí měření ($n=20$) je zobrazena ve vloženém grafu.

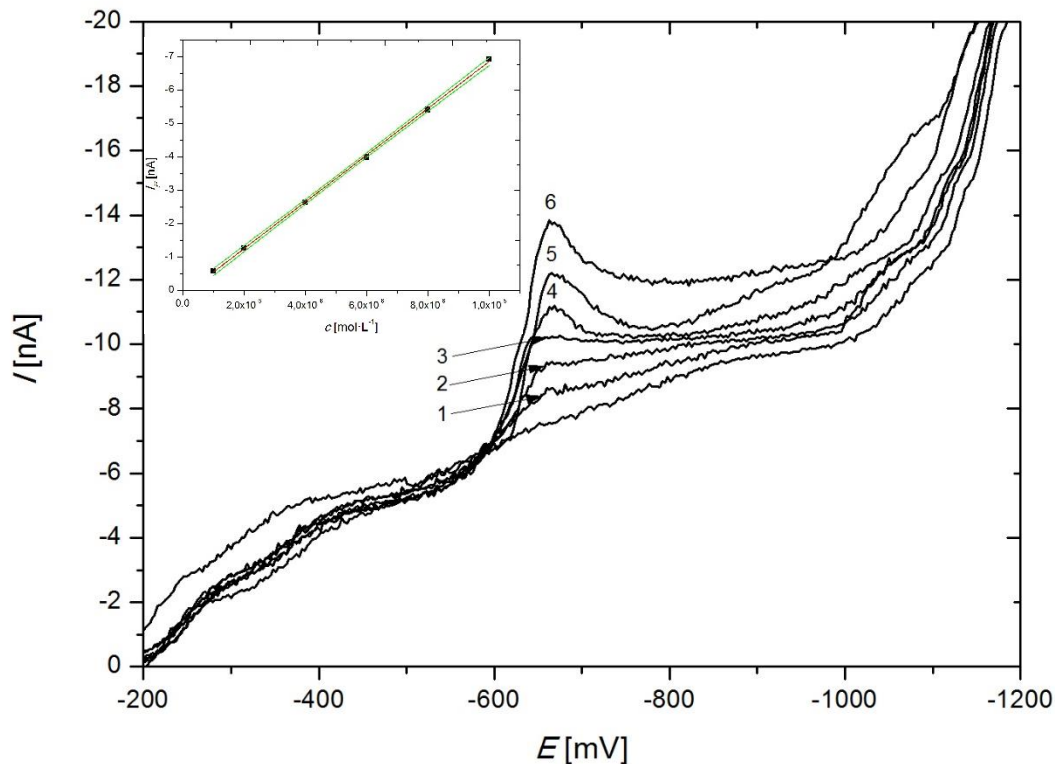
3.1.4. Koncentrační závislost

Kalibrační závislost výšky píku (I_p) na koncentraci 2,3-DMQ byla změřena technikami DCV a DPV pomocí m-AgSAE na kterou byly vkládány regenerační potenciály $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV pro DCV a potenciály $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV pro DPV v prostředí BR-pufry o pH 6,0 (DCV) a 7,0 (DPV).

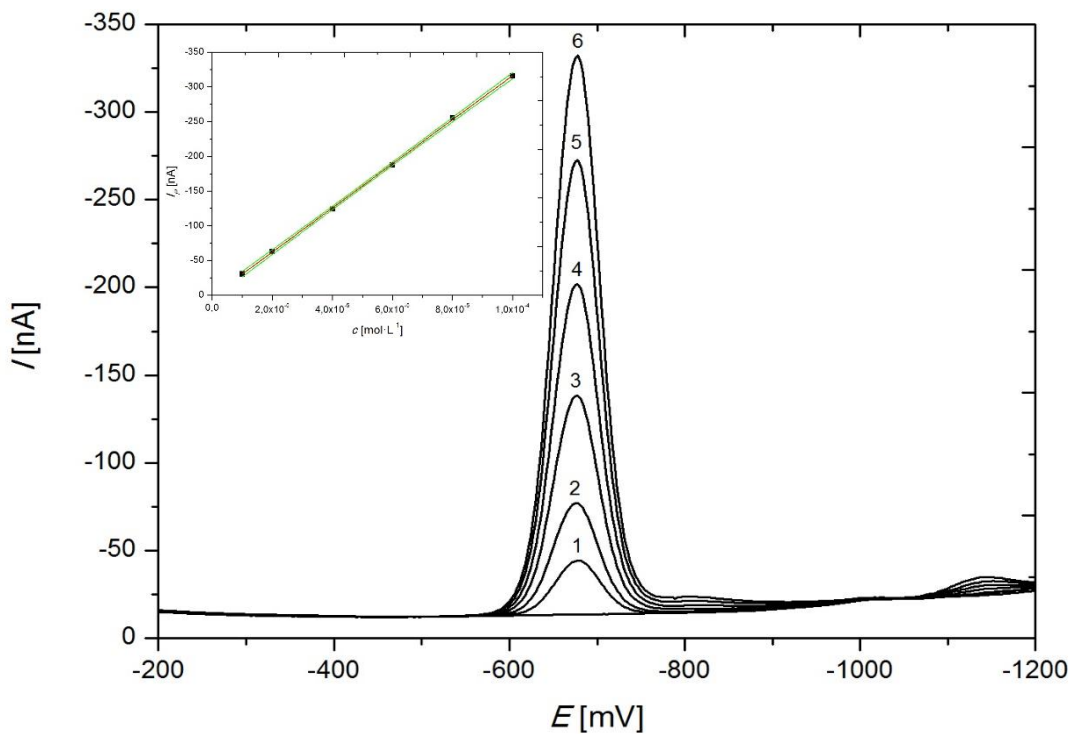
Následující obrázky (obr. 12-16) zobrazují záznam voltamogramů a kalibrační křivky řádů 10^{-5} mol·L⁻¹, 10^{-6} mol·L⁻¹ (pro obě techniky) a 10^{-7} mol·L⁻¹ (jen pro DPV). Závislost byla přes všechny koncentrační řady lineární a parametry kalibračních křivek jsou shrnuty v tabulce 4.



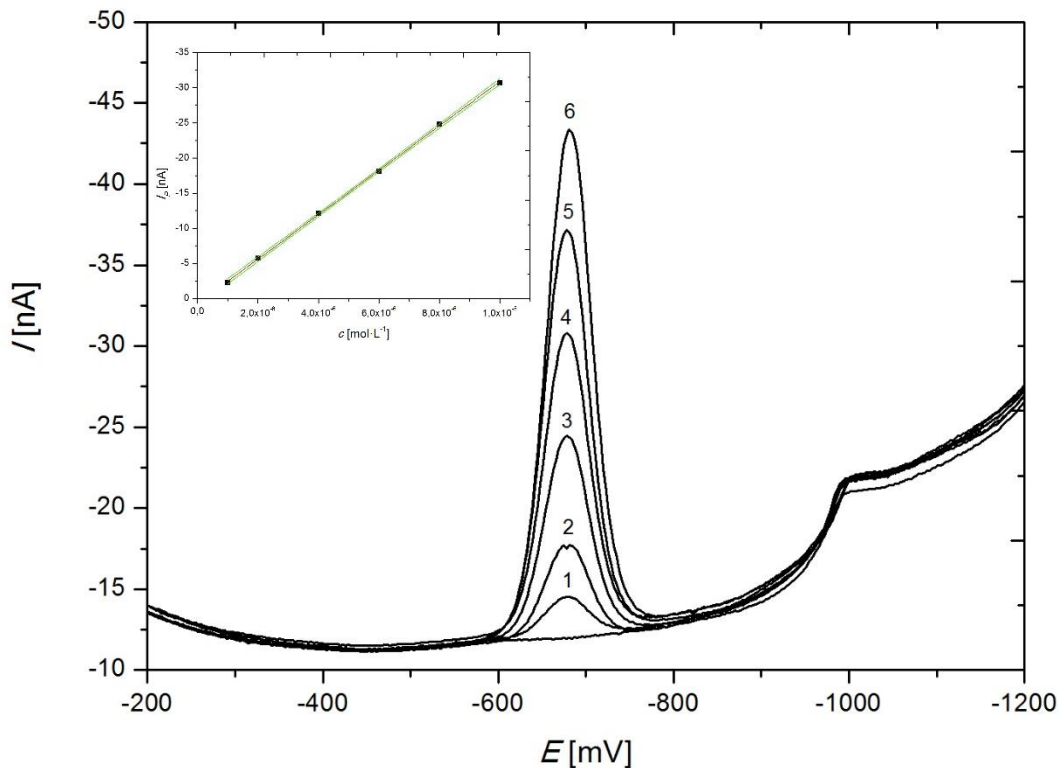
Obr. 12: Kalibrační voltamogramy 2,3-DMQ měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR-pufry o pH 6,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2,3-DMQ v BR-pufry: $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2,3-DMQ pro řád 10^{-5} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



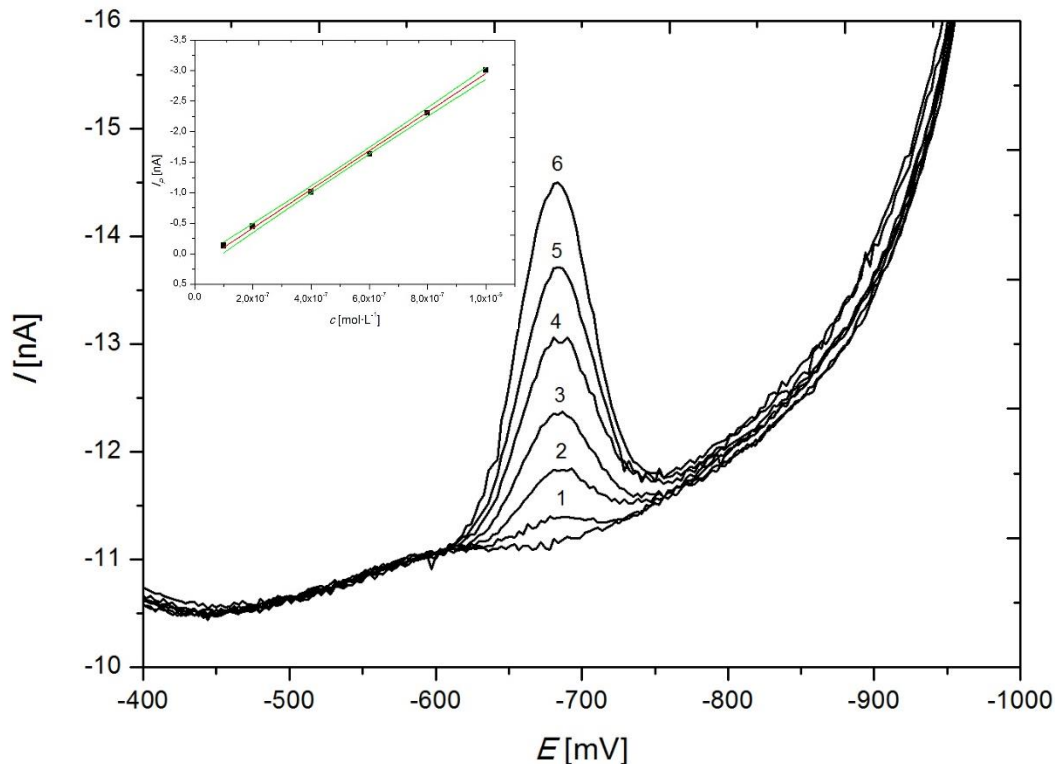
Obr. 13: Kalibrační voltamogramy 2,3-DMQ měřené technikou DCV na *m*-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 6,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2,3-DMQ v BR-puftru: $1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2,3-DMQ pro řád 10^{-6} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 14: Kalibrační voltamogramy 2,3-DMQ měřené technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 7,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2,3-DMQ v BR-puftru: $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2,3-DMQ pro řád 10^{-5} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 15: Kalibrační voltamogramy 2,3-DMQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 7,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2,3-DMQ v BR-puftru: $1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2,3-DMQ pro řád 10^{-6} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 16: Kalibrační voltamogramy 2,3-DMQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 7,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2,3-DMQ v BR-puftru: $1 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2,3-DMQ pro řád 10^{-6} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).

Tabulka 4: Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2,3-DMQ měřené technikami DCV a DPV na m-AgSAE v prostředí BR-pufri o pH 6,0 (DCV) a 7,0 (DPV) s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. a $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV.

c [mol·L ⁻¹]	Technika	Směrnice [nA·L·mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	L _Q [mol·L ⁻¹]
(1-10)·10 ⁻⁵	DCV	(-6,32±0,12)·10 ⁵	-1,31±0,70	0,9983	
	DPV	(-3,177±0,027)·10 ⁶	1,5±1,7	0,9996	
(1-10)·10 ⁻⁶	DCV	(-7,006±0,074)·10 ⁵	0,154±0,045	0,9995	1,2·10 ⁻⁶
	DPV	(-3,158±0,026)·10 ⁶	0,71±0,16	0,9997	
(1-10)·10 ⁻⁷	DPV	(-3,169±0,060)·10 ⁶	0,214±0,036	0,9982	1,1·10 ⁻⁷

3.2. 2-Hydroxy-3-methylchinoxalin

3.2.1. Vliv pH

Závislost elektrochemického chování 2-OH-3-MQ při proměnném pH byla opět studována v BR-puftru v rozmezí od pH 2,0 do pH 13,0 pomocí technik DCV a DPV. Koncentrace studované látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

U obou technik látka poskytovala při všech pH na rozdíl od předchozí látky pouze jeden hlavní pík. Na obr. 17 jsou znázorněny vybrané křivky v rozmezí pH 2,0 až pH 13,0 pro obě metody. Lze na nich pozorovat opět posun potenciálů píků k zápornějším hodnotám.

Změny I_p a posun E_p v závislosti na pH jsou uvedeny v tabulce 5 a na obr. 18 a 19. Závislosti E_p na pH pro obě techniky v úseku pH 2,0-8,0 a pH 9,0-13,0 lze vyjádřit rovnicemi (3) a (4):

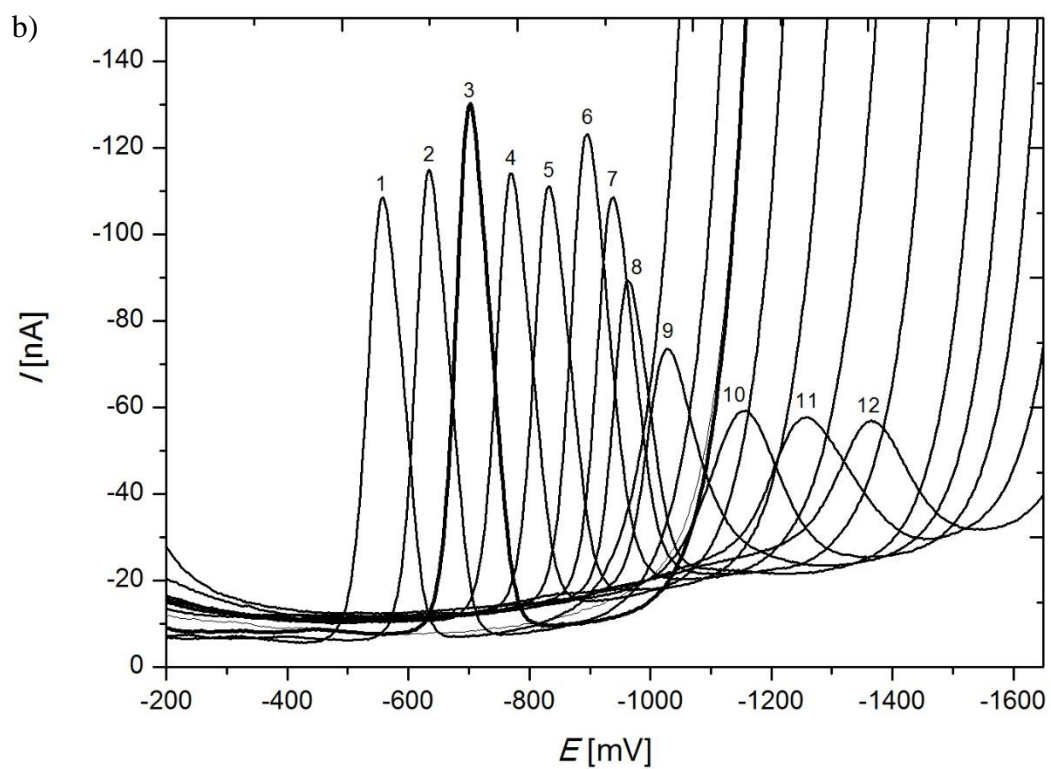
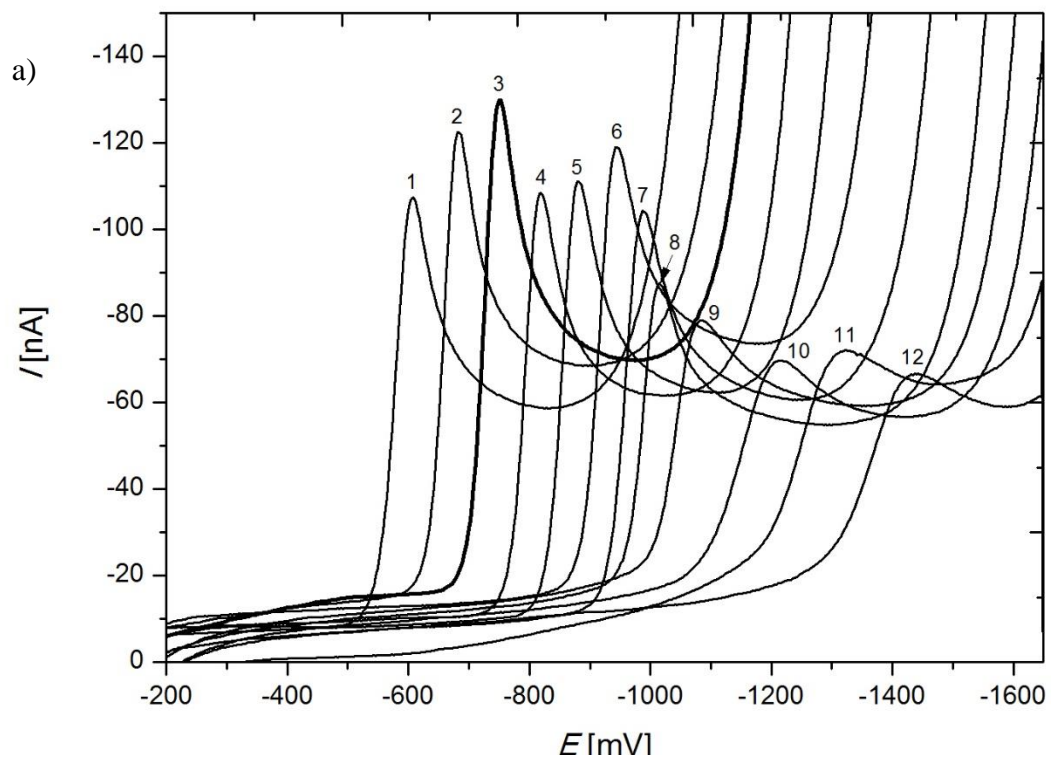
$$\text{DCV} \quad E_{p_{2,0-8,0}} [\text{mV}] = -67,8 \cdot \text{pH} - 464,3 \quad (R = -0,9847) \quad (3)$$

$$E_{p_{9,0-13,0}} [\text{mV}] = -36,2 \cdot \text{pH} - 107,4 \quad (R = -0,9920)$$

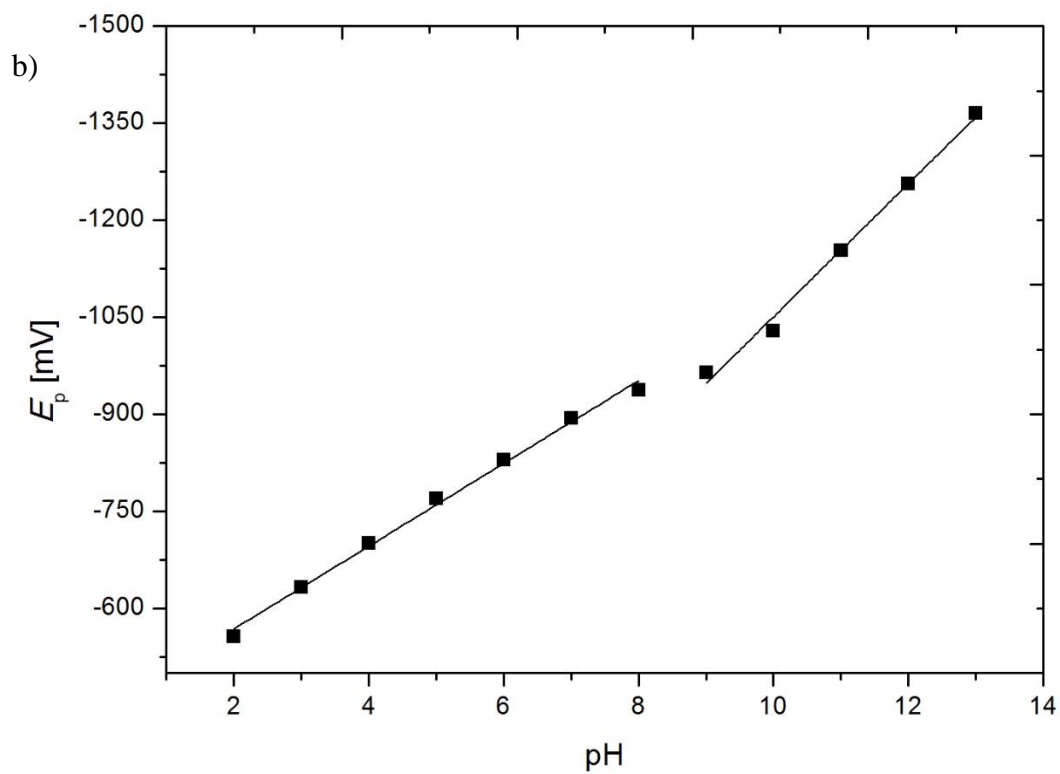
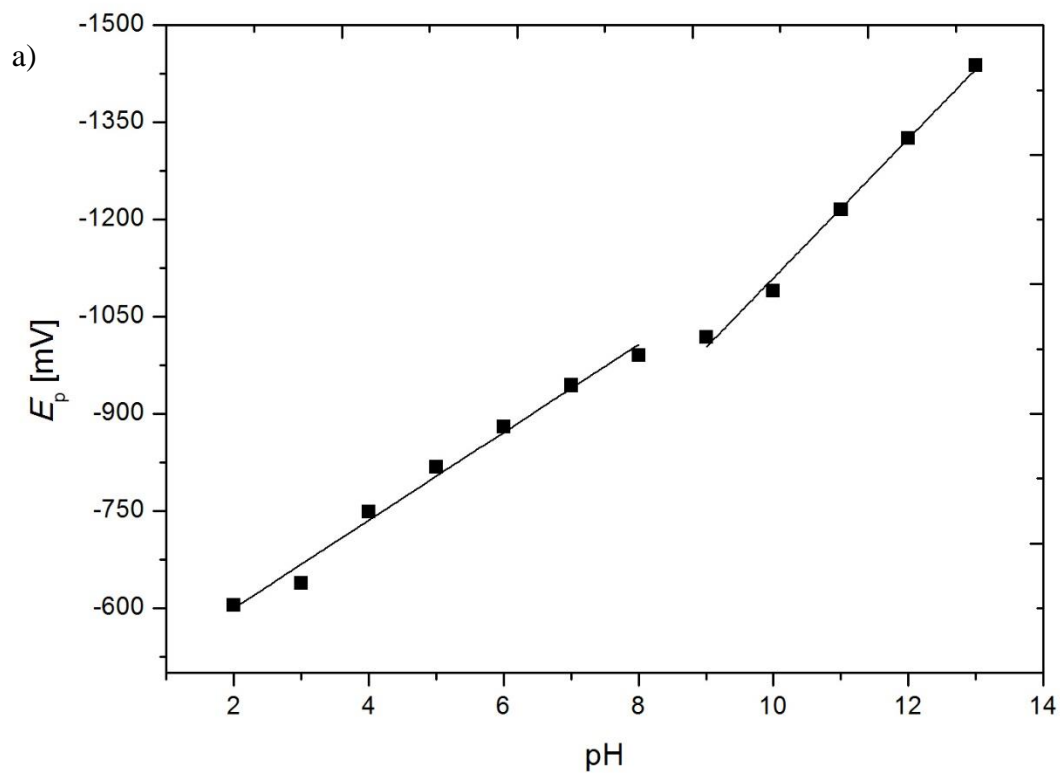
$$\text{DPV} \quad E_{p_{2,0-8,0}} [\text{mV}] = -64,0 \cdot \text{pH} - 440,1 \quad (R = -0,9944) \quad (4)$$

$$E_{p_{9,0-13,0}} [\text{mV}] = -22,4 \cdot \text{pH} - 102,8 \quad (R = -0,9901)$$

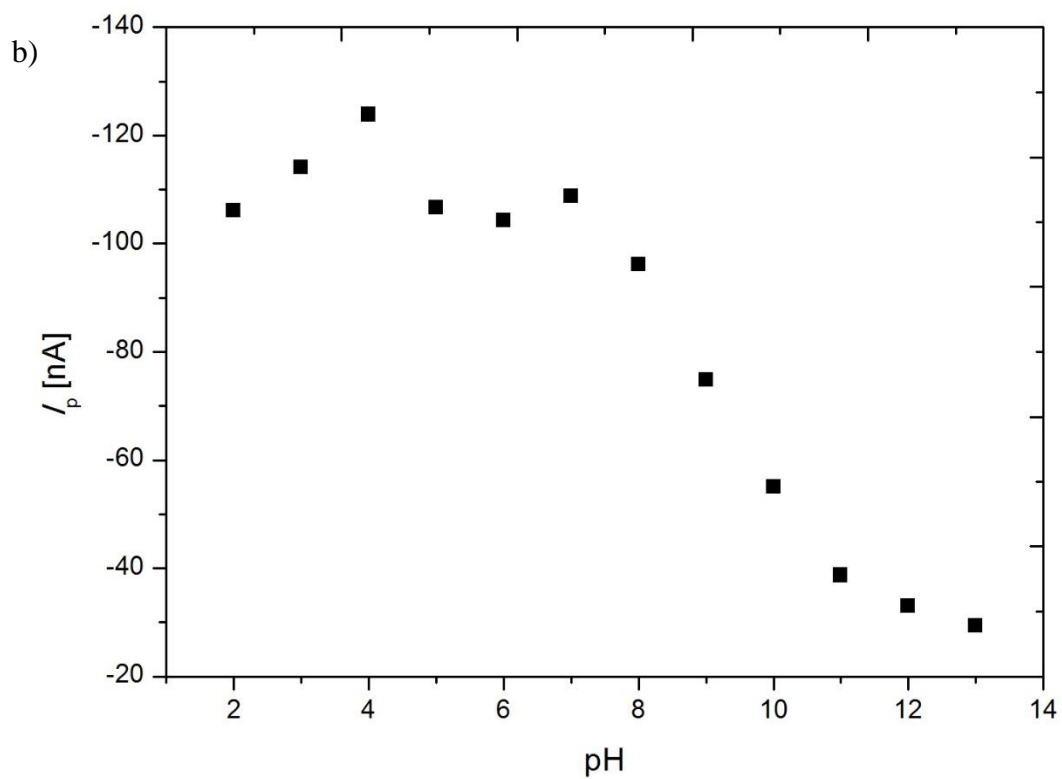
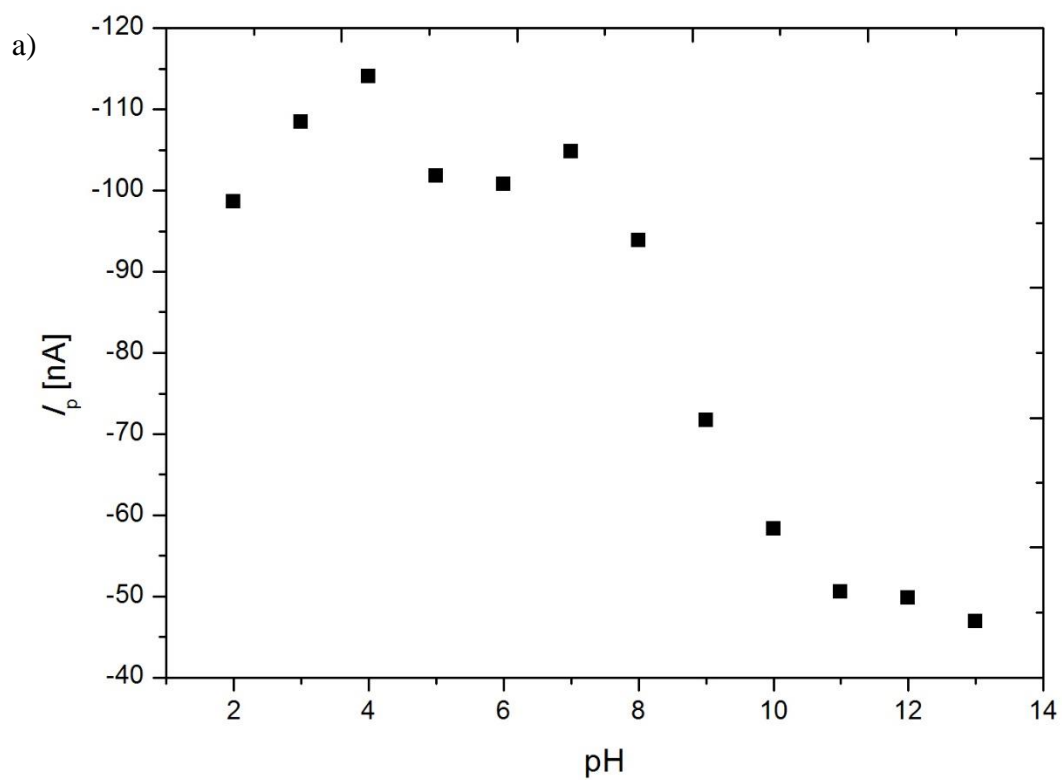
Maximální odezva byla naměřena pro obě techniky při pH 4,0 a pro další sledování závislostí byla použito toto prostředí.



Obr. 17: DCV (a) a DPV (b) voltamogramy 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufry o pH 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11), 13,0 (12).



Obr. 18: Závislost E_p na pH měřené technikami DCV (a) a DPV (b) na m -AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 2,0 až pH 13,0. Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 19: Závislost I_p na pH měřená technikou DCV (a) a DPV (b) na *m*-AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufri o pH 2,0 až pH 13,0.

Tabulka 5: Závislost hodnot I_p a E_p na pH měřené technikou DCV a DPV na m-AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o různém pH.

pH	DCV		DPV	
	E_p [mV]	I_p [nA]	E_p [mV]	I_p [nA]
2,0	-605	-98,6	-557	-106,0
3,0	-638	-108,4	-632	-114,1
4,0	-749	-114,1	-701	-123,8
5,0	-818	-101,8	-770	-106,7
6,0	-880	-100,8	-830	-104,2
7,0	-944	-104,8	-894	-108,8
8,0	-991	-93,8	-937	-96,1
9,0	-1019	-71,7	-965	-74,9
10,0	-1090	-58,3	-1029	-55,0
11,0	-1215	-50,5	-1154	-38,7
12,0	-1326	-49,8	-1256	-33,0
13,0	-1438	-46,9	-1365	-29,4

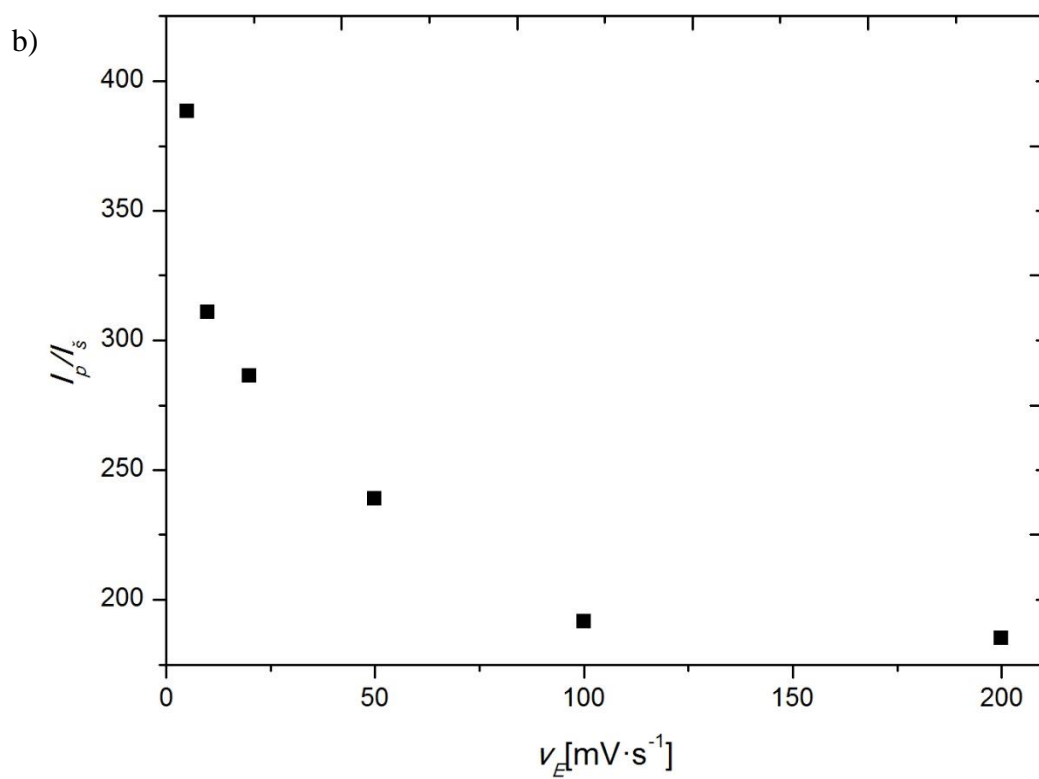
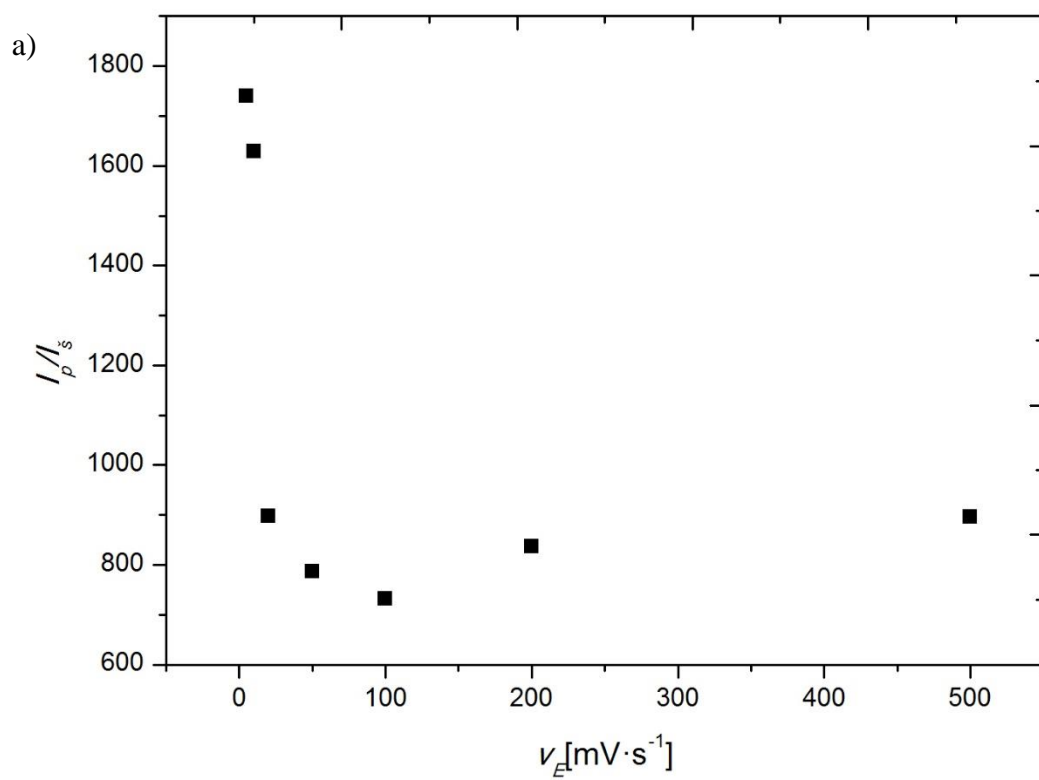
3.2.2. Vliv rychlosti nárůstu potenciálu

Vliv rychlosti nárůstu potenciálu na měření technikami DCV a DPV byl studován v prostředí BR-pufry o pH 4,0 při koncentraci 2-OH-3-MQ $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Byly opět proměřeny rychlosti $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Poměry I_p/I_s jsou uvedeny v tabulce 6. Na obr. 20 je znázorněna závislost poměru I_p/I_s na rychlosti nárůstu potenciálu. Nejvhodnější by byla opět rychlost $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, ale byla opět vybrána pro obě techniky rychlost $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabulka 6: Hodnoty poměru I_p/I_s při různých rychlostech nárůstu potenciálu měřené technikami DCV a DPV na *m*-AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 4,0. Hodnota $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ nebyla možná naměřit technikou DPV.

$v_E [\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}]$	DCV	DPV
	I_p/I_s	I_p/I_s
5	1740	388
10	1628	311
20	898	286
50	787	239
100	732	191
200	836	189
500	896	-



Obr. 20: Graf závislosti poměru I_p/I_s při různých rychlostech růstu potenciálu měřené technikami DCV (a) a DPV (b) na m-AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-pufry o pH 4,0.

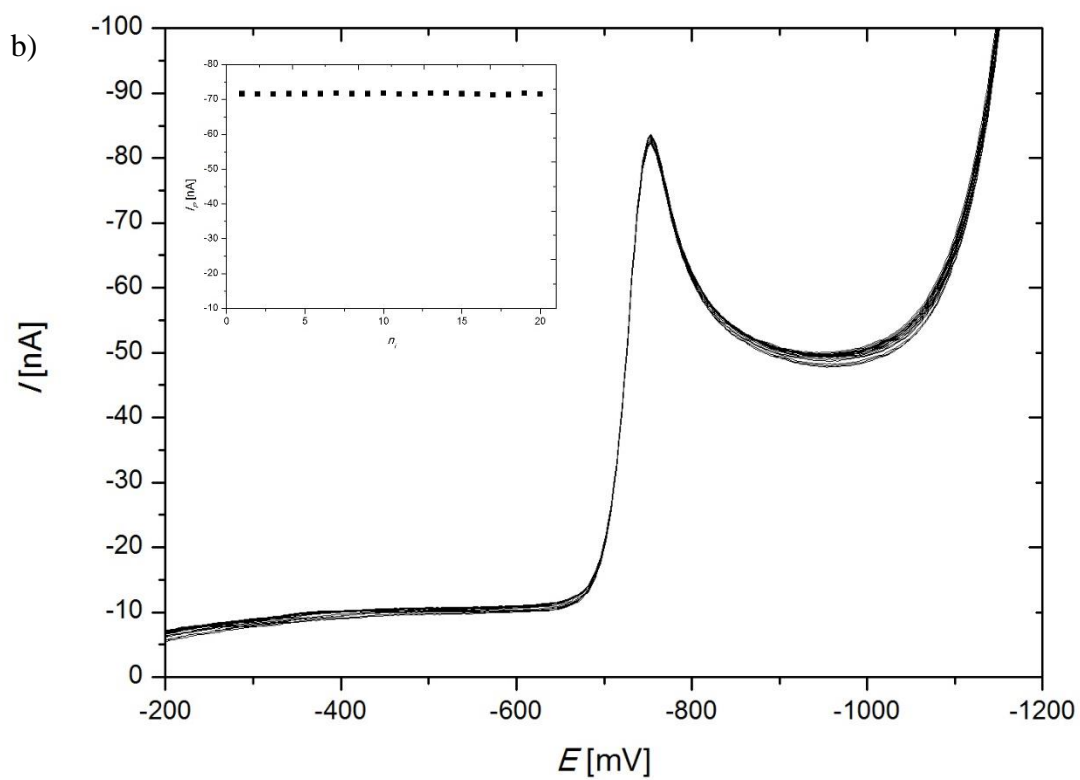
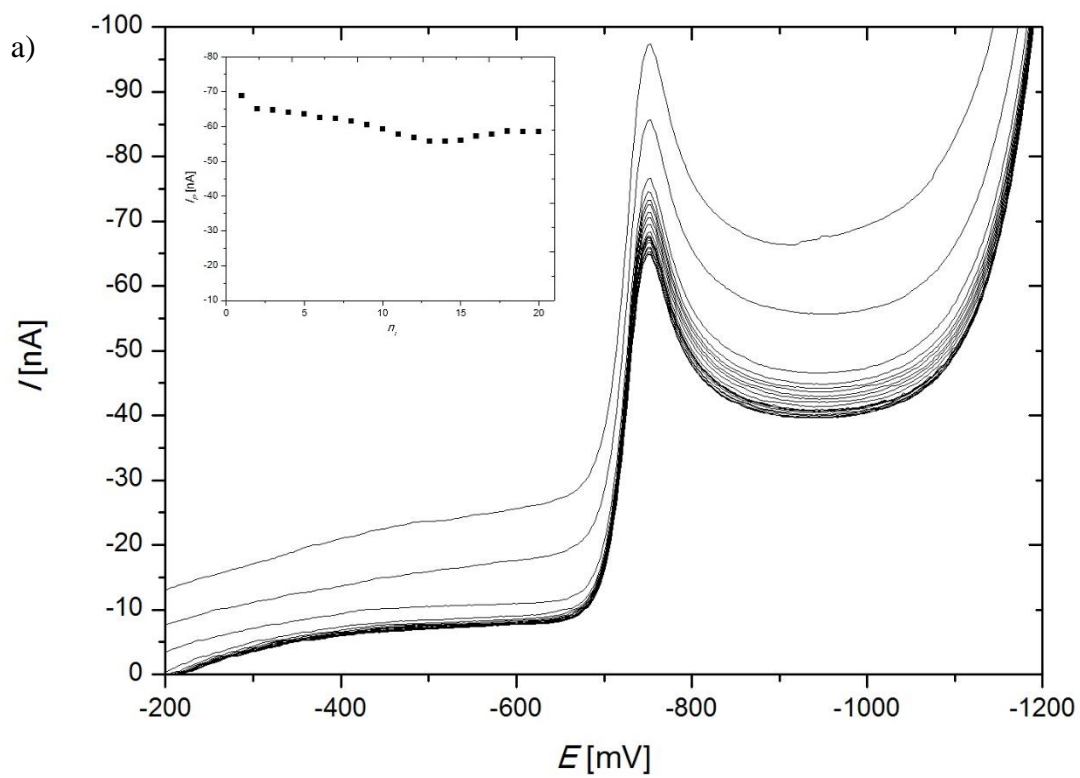
3.2.3. Opakovatelnost

Opakovatelnost dvaceti po sobě jdoucích DCV a DPV stanovení 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-puftru o pH 4,0 byla nejprve měřena bez vložených regeneračních potenciálů a pak s několika variantami vložených regeneračními potenciály (obr. 21 a 22).

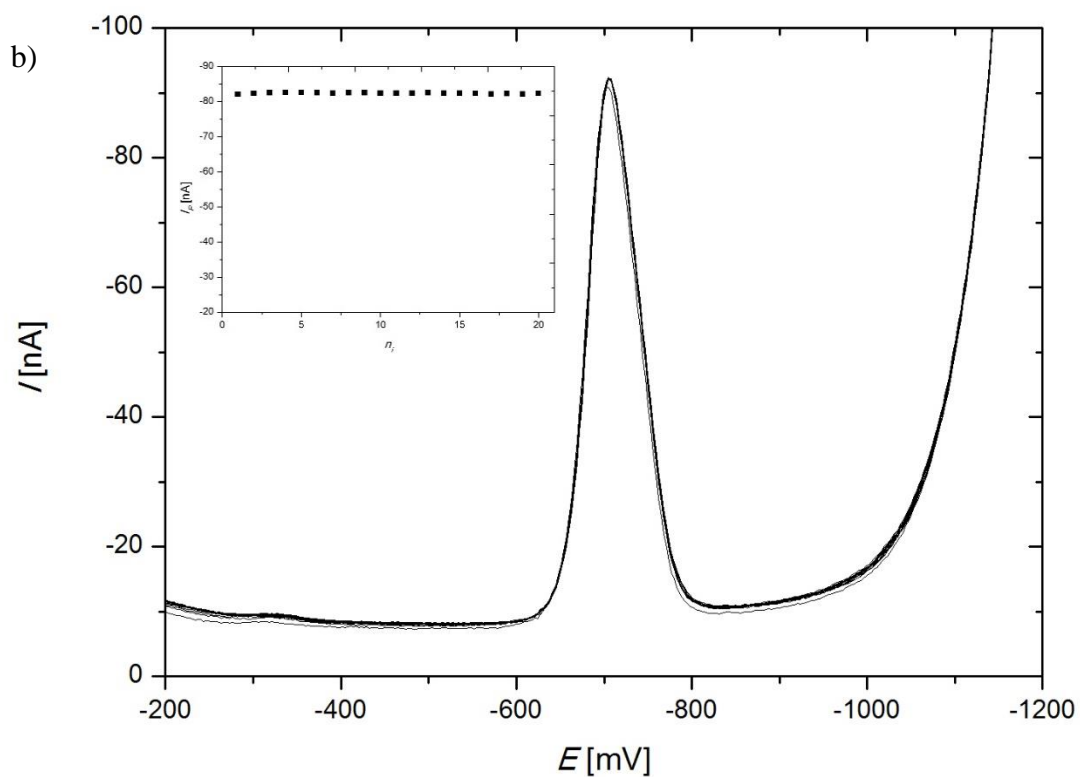
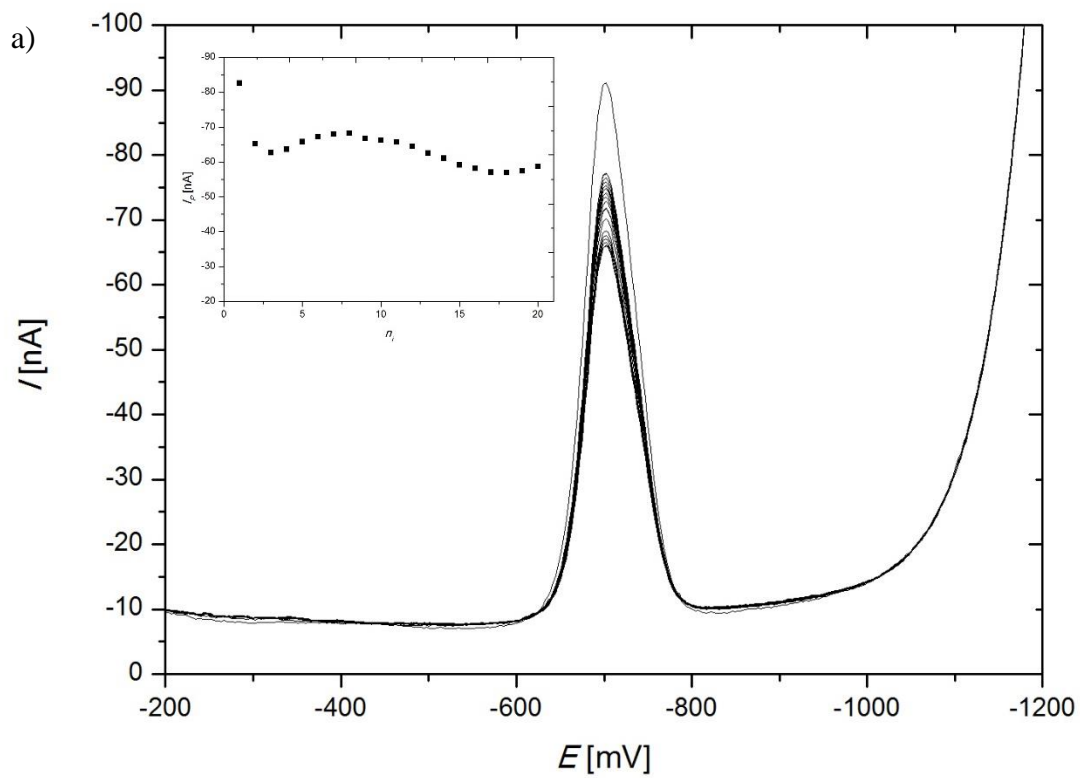
Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena ze souborů dat jako míra opakovatelnosti stanovení. Jednotlivé s_r jsou uvedeny v tabulce 7. Opakovatelnost měření s regenerací $E_{\text{in}} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -900 \text{ mV}$ byla pro obě dvě techniky zvolena jako optimální pro svoji nejnižší relativní směrodatnou odchylku. Byla proto zvolena pro následné měření koncentračních závislostí.

Tabulka 7: Hodnoty s_r pro různé vložené regenerační potenciály měřené technikami DCV a DPV na m-AgSAE v roztoku 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) v prostředí BR-puftru o pH 4,0.

Regenerační potenciály		s_r [%]	
E_{in}	E_{fin}	DCV	DPV
-	-	6,07	9,17
-100	-1300	0,51	1,71
-500	-1300	0,42	0,34
-100	-900	0,19	0,27
-500	-900	0,18	0,16



Obr. 21: Voltamogramy 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufro o pH 4,0 bez vložené regenerace (a) a s vloženými regeneračními potenciály $E_{in} = -500 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$ (b). Odpovídající závislost I_p na pořadí měření ($n=20$) je zobrazená ve vloženém grafu.

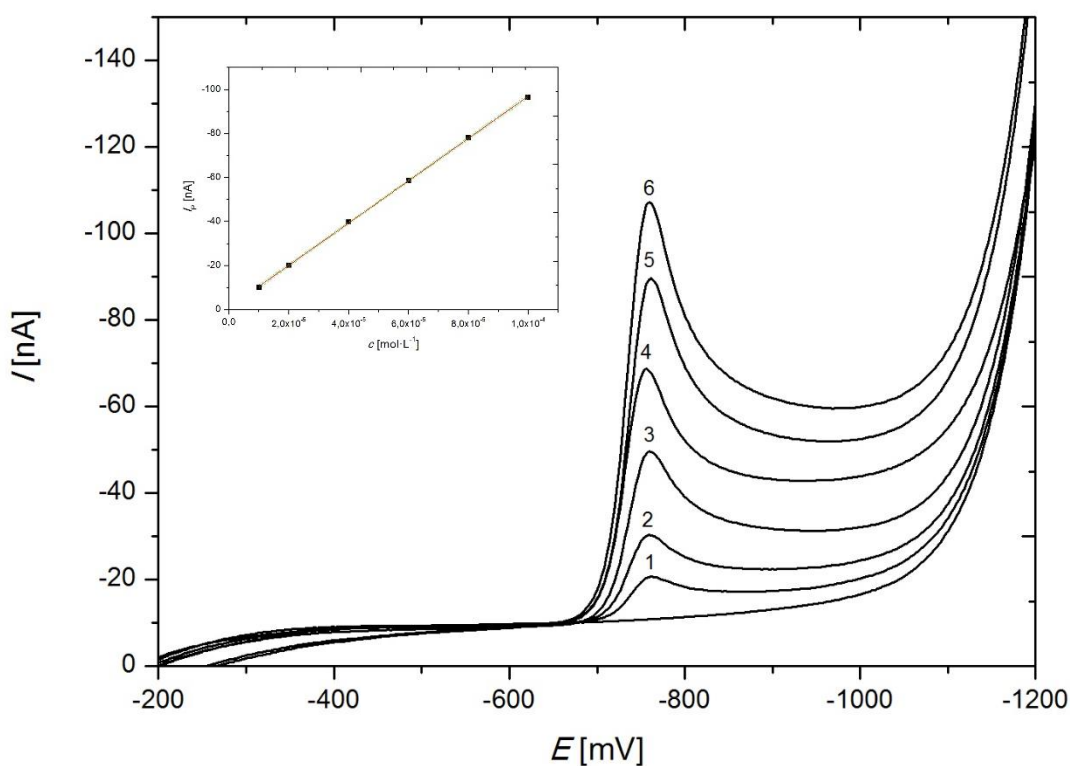


Obr. 22: Voltamogramy 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR-pufro o pH 4,0 bez vložené regenerace (a) a s vloženými regeneračními potenciály $E_{in} = -500 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$ (b). Odpovídající závislost I_p na pořadí měření ($n=20$) je zobrazená ve vloženém grafu.

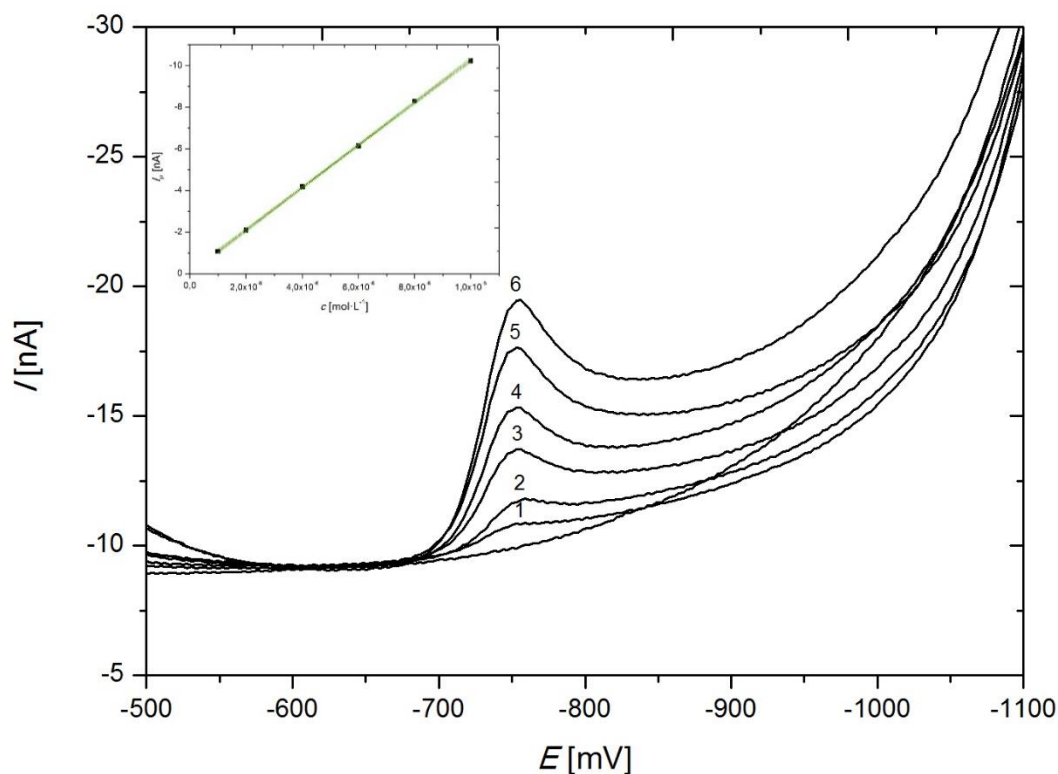
3.2.4. Koncentrační závislost

Kalibrační závislost výšky píku (I_p) na koncentraci 2-OH-3-MQ byla změřena technikami DCV a DPV pomocí m-AgSAE na kterou byly vkládány regenerační potenciály $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV v prostředí BR-pufry o pH 4,0.

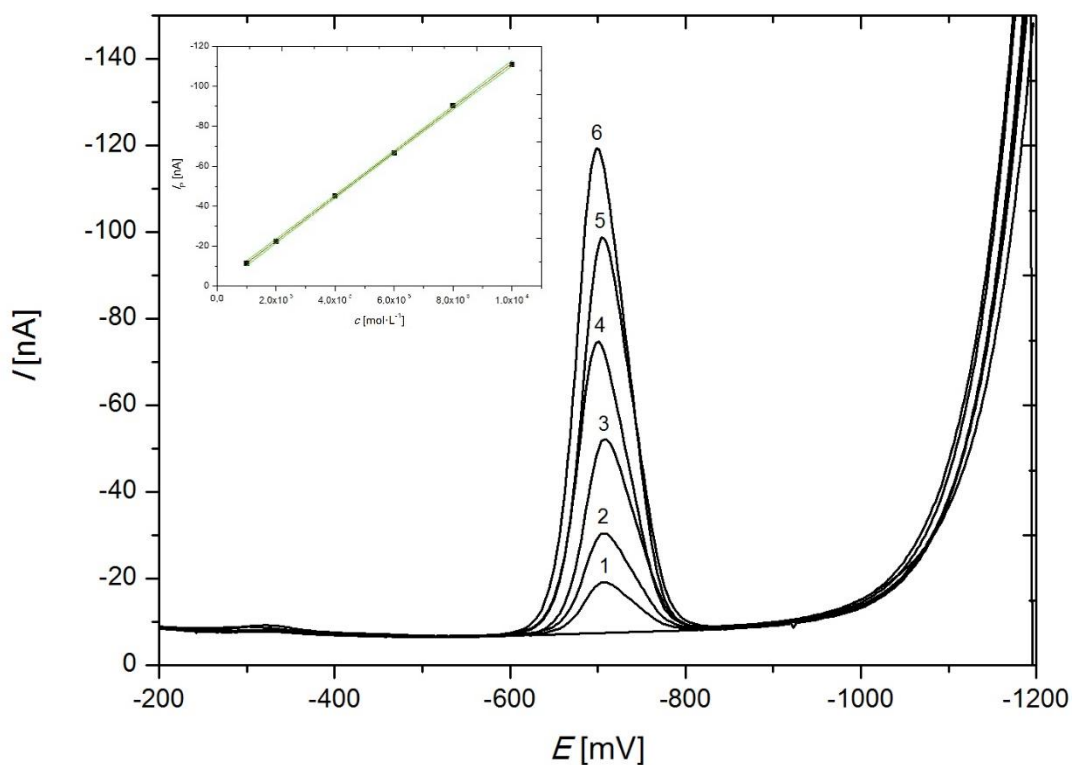
Následující obrázky (obr. 24-26) zobrazují záznam voltamogramů a kalibrační křivky koncentračních řádů 10^{-5} mol·L⁻¹ až 10^{-6} mol·L⁻¹ pro obě dvě techniky. Závislost byla přes všechny koncentrační řády lineární a parametry kalibračních křivek jsou shrnuty v tabulce 8.



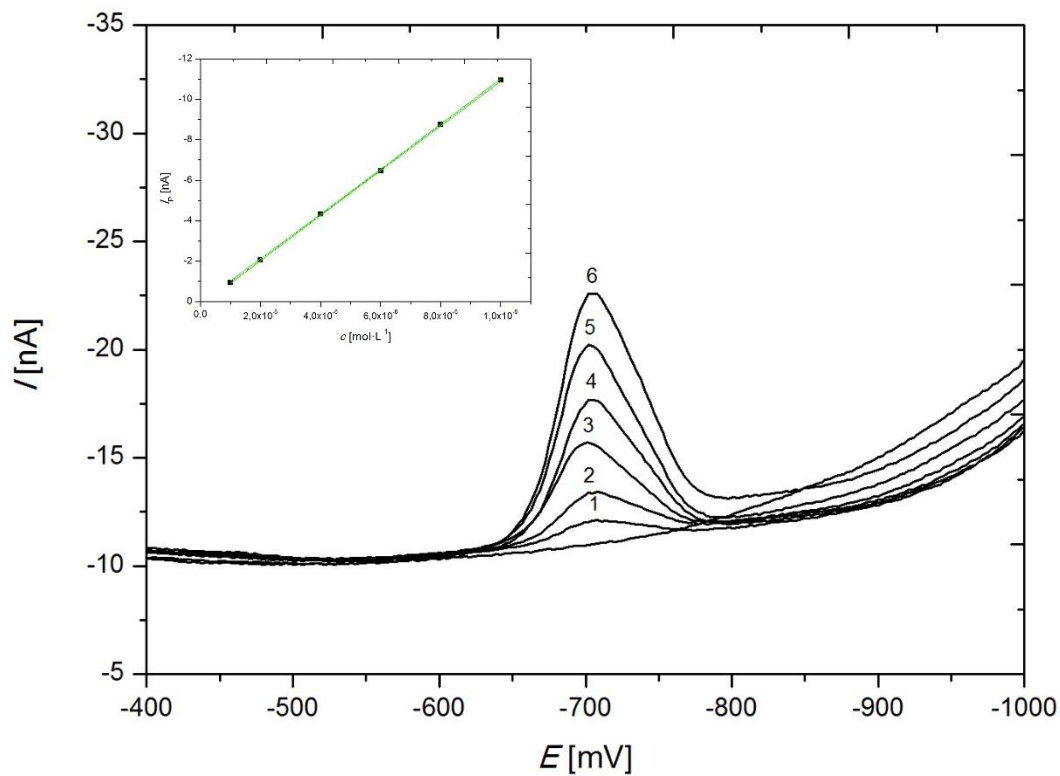
Obr.23: Kalibrační voltamogramy 2-OH-3-MQ měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR-pufry o pH 4,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2-OH-3-MQ v BR-pufry: $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2-OH-3-MQ pro řád 10^{-5} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 24: Kalibrační voltamogramy 2-OH-3-MQ měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR-pufru o pH 4,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2-OH-3-MQ v BR-pufru: $1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2-OH-3-MQ pro řád 10^{-6} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr.25: Kalibrační voltamogramy 2-OH-3-MQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR-pufru o pH 4,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2-OH-3-MQ v BR-pufru: $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2-OH-3-MQ pro řád 10^{-5} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).



Obr. 26: Kalibrační voltamogramy 2-OH-3-MQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR-puftru o pH 4,0 s vloženou regenerací $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Koncentrace 2-OH-3-MQ v BR-puftru: $1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(1), $2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(2), $4 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(3), $6 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(4), $8 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹(5) a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹(6). Ve vloženém grafu je kalibrační křivka 2-OH-3-MQ pro řád 10^{-6} mol·L⁻¹. Konfidenční pásy jsou zobrazeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n=5$).

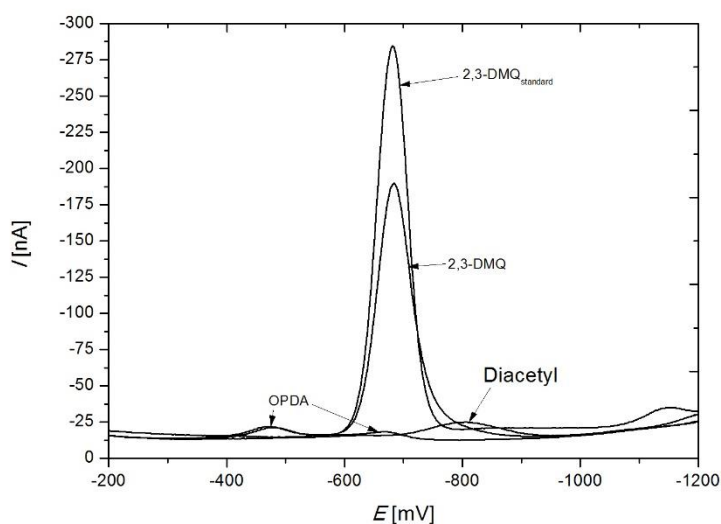
Tabulka 8: Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-OH-3-MQ měřené technikami DCV a DPV na m-AgSAE v prostředí BR-pufro o pH 4,0 s vloženými regeneracemi $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV.

c [mol·L ⁻¹]	Technika	Směrnice (nA·L·mol ⁻¹)	Úsek [nA]	R^2	L_Q [mol·L ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	DCV	$(-9,600 \pm 0,056) \cdot 10^5$	$-0,90 \pm 0,34$	0,9998	
	DPV	$(-1,1122 \pm 0,0084) \cdot 10^6$	$-0,37 \pm 0,51$	0,9997	
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	DCV	$(-1,0213 \pm 0,0059) \cdot 10^6$	$-0,063 \pm 0,036$	0,9998	$4,8 \cdot 10^{-7}$
	DPV	$(-1,1084 \pm 0,0043) \cdot 10^6$	$0,141 \pm 0,026$	1,0000	$3,4 \cdot 10^{-7}$

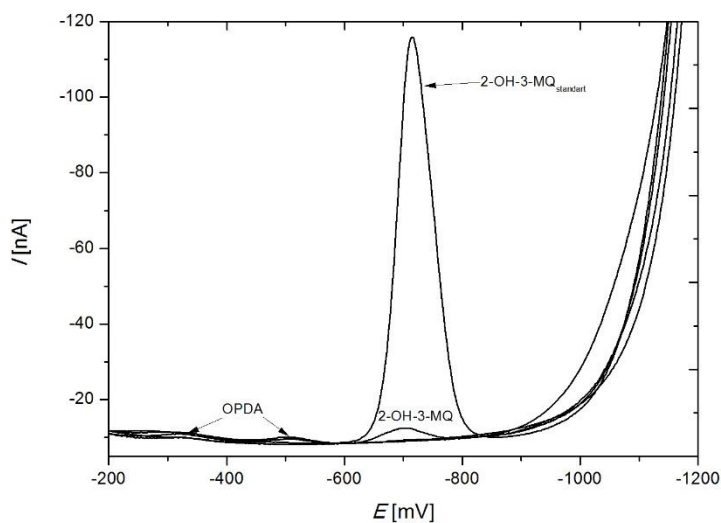
4. Derivatizační reakce

Pro studium derivatizačních reakcí byla nadále zvolena technika DPV, při jejímž použití bylo dosaženo nejnižší meze stanovitelnosti.

Nejjednodušší varianta pro derivatizační reakci byla reakce OPDA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, což je množství desetinásobně větší než koncentrace diacetylu nebo pyruvátu, v prostředí BR-pufry o pH optimálním pro jednotlivé stanovení (2,3-DMQ - 7,0, 2-OH-3-MQ - 4,0) s časem 30 min na reakci. Výsledná účinnost byla pro diacetyl 70,0 %, a pro pyruvát jenom 4,8 % (obr. 26 a 27).



Obrázek 26: Voltamogramy standardu diacetylu, 2,3-DMQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), OPDA ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a produktu reakce v prostředí BR-pufry o pH 7,0.



Obrázek 27: Voltamogramy standardu pyruvátu, 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), OPDA ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a produktu reakce v prostředí BR-pufry o pH 4,0. Pyruvát na rozdíl od diacetylu neposkytoval žádný voltametrický pík.

4.1. Vliv koncentrace OPDA na účinnost reakce

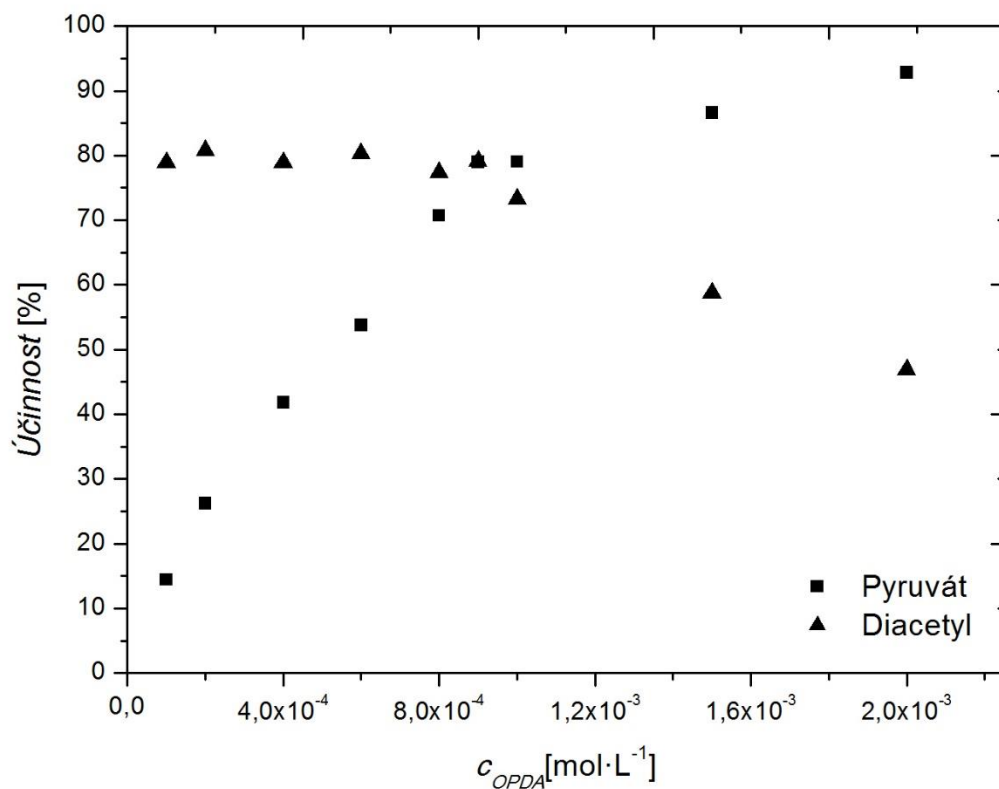
Vliv koncentrace OPDA na derivatizační reakce diacetylu a pyruvátu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) se zkoumal v prostředí reakce o pH 1,6, které z předběžných pokusů vykazovalo nejlepší účinnost reakce s časem reakce 30 min. Proměřovány byly koncentrace OPDA v rozsahu od 0,1 do 2,0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Standard produktu reakce pro porovnání účinnosti byl měřen s přidavkem HCl o pH 1,6, pro korekci na výsledné pH.

Jako optimální koncentrace pro obě látky byla zvolena $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pod ní byly malé účinnosti pro pyruvát, nad touto koncentrací se snižuje účinnost pro diacetyl.

Účinnosti jednotlivých reakcí jsou shrnuty v obr. 28 a tabulce 9.

Tabulka 9: Účinnost derivatizačních reakcí na proměnné koncentraci OPDA, pH reakce 1,6, $t = 30 \text{ min}$.

c_{OPDA} [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]	Pyruvát Účinnost [%]	Diacetyl Účinnost [%]
0,1	14,4	79,0
0,2	26,2	80,8
0,4	41,8	78,9
0,6	53,8	80,3
0,8	70,7	77,4
0,9	77,8	79,1
1,0	79,0	73,2
1,5	86,6	58,9
2,0	92,8	46,9



Obr. 28: Vliv koncentrace OPDA na účinnost reakce o pH 1,6, $t = 30$ min.

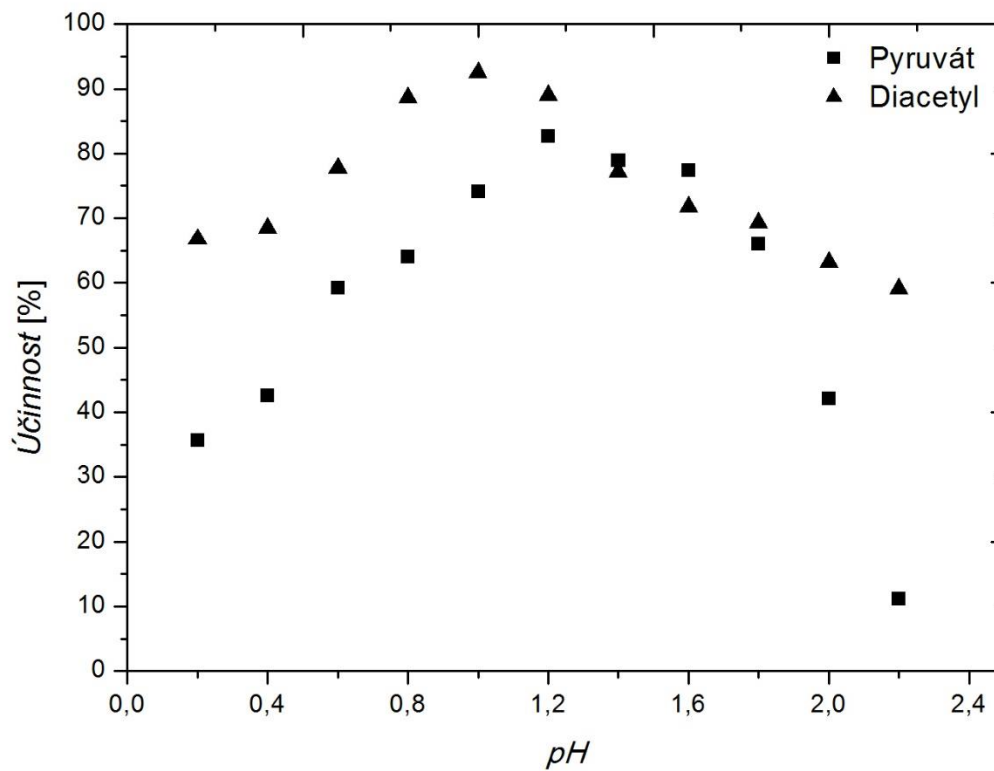
4.2. Vliv pH na účinnost reakce

Vliv pH na derivatizační reakce diacetylu a pyruvátu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹) se zkoumal pomocí OPDA ($9 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹), s časem reakce 30 min v rozmezí pH 0,2 - 2,2. Po ukončení se doplňoval roztokem BR-pufuru, tak aby výsledné pH odpovídalo přibližně pH optimálnímu.

Nejvhodnější pH pro stanovení obou látek bylo zvoleno pH reakce 1,2. Účinnosti jsou opět shrnuty v tabulce 10 a v obr. 29.

Tabulka 10: Účinnost derivatizačních reakcí na proměnném pH, $c_{OPDA} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $t = 30 \text{ min}$.

pH	Pyruvát	Diacetyl
	Účinnost [%]	Účinnost [%]
0,2	35,6	66,8
0,4	42,6	68,5
0,6	59,2	77,7
0,8	64,0	88,7
1,0	74,1	94,5
1,2	82,7	89,0
1,4	78,5	77,5
1,6	77,4	71,7
1,8	66,1	69,3
2	42,1	63,2
2,2	11,2	59,1



Obr. 29: Vliv pH na účinnost reakce, $c_{OPDA} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $t = 30 \text{ min}$.

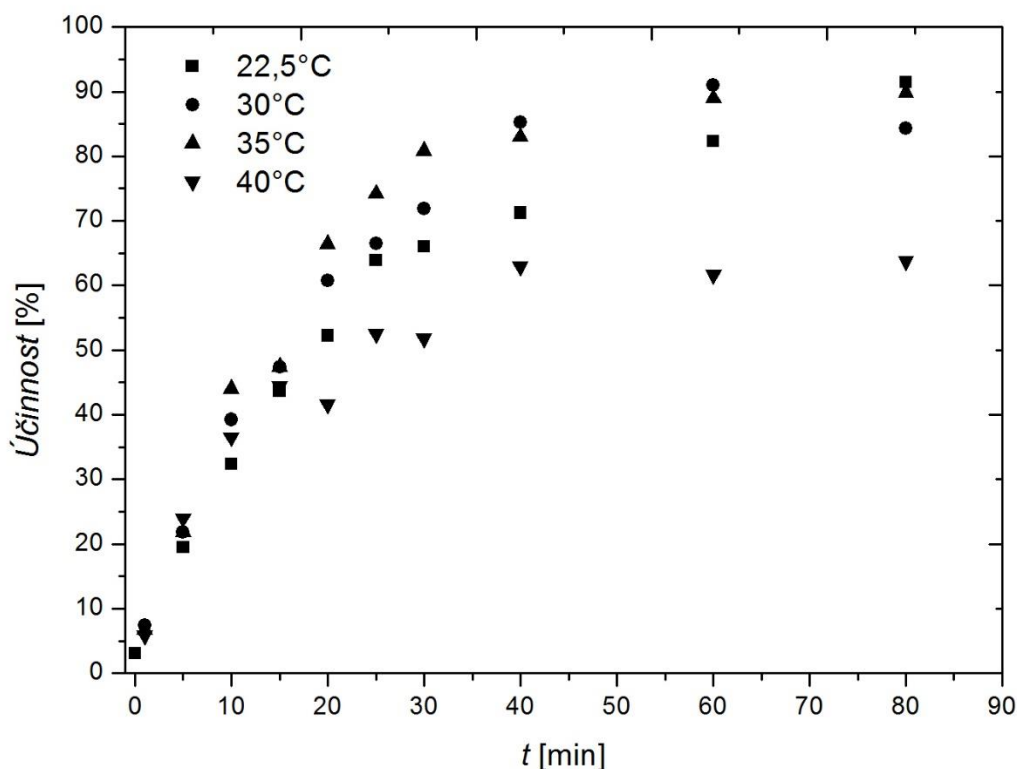
4.3. Vliv času a teploty na účinnost reakce

Vliv času a teploty na účinnost derivatizace pyruvátu se zkoumal v prostředí reakce o pH 1,2, s OPDA o koncentraci $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Proměřovaly se teploty 22,5 °C (laboratorní teplota), 30 °C, 35 °C a 40 °C v časech 0 případně 1 min u teplot 30 °C a výše, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 40 min, 60 min a 80 min.

Reakce probíhající při 40 °C, dosahovala nižších výtěžků, než reakce předchozí, důvodem je degradace reakčního činidla. Optimálnější by byla doba 80 min při laboratorní teplotě, ale vzhledem k časové náročnosti stanovení byla nakonec vybrána teplota 35 °C a čas 30 min. Jednotlivé účinnosti reakce jsou shrnuty v tabulce 11 a obr. 30.

Tabulka 11: Účinnost derivatizačních reakcí na čase a teplotě, $c_{\text{OPDA}} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$.

Čas [min]	Teplota 22,5 °C Účinnost [%]	Čas [min]	Teplota 30 °C Účinnost [%]	Teplota 35 °C Účinnost [%]	Teplota 40 °C Účinnost [%]
0	3,07	1	7,43	6,7	5,84
5	19,5	5	21,9	21,9	24,0
10	32,4	10	39,2	44,1	36,5
15	43,7	15	47,4	47,4	44,4
20	52,3	20	60,7	66,4	41,6
25	63,9	25	66,5	74,2	52,5
30	66,0	30	71,9	80,8	51,8
40	71,3	40	85,3	83,0	62,9
60	82,3	60	90,9	89,0	61,6
80	91,4	80	84,4	90,0	63,7



Obrázek 30: Vliv času a teploty na účinnost reakce s pyruvátém, $c_{OPDA} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$.

4.4. Opakovatelnost reakce

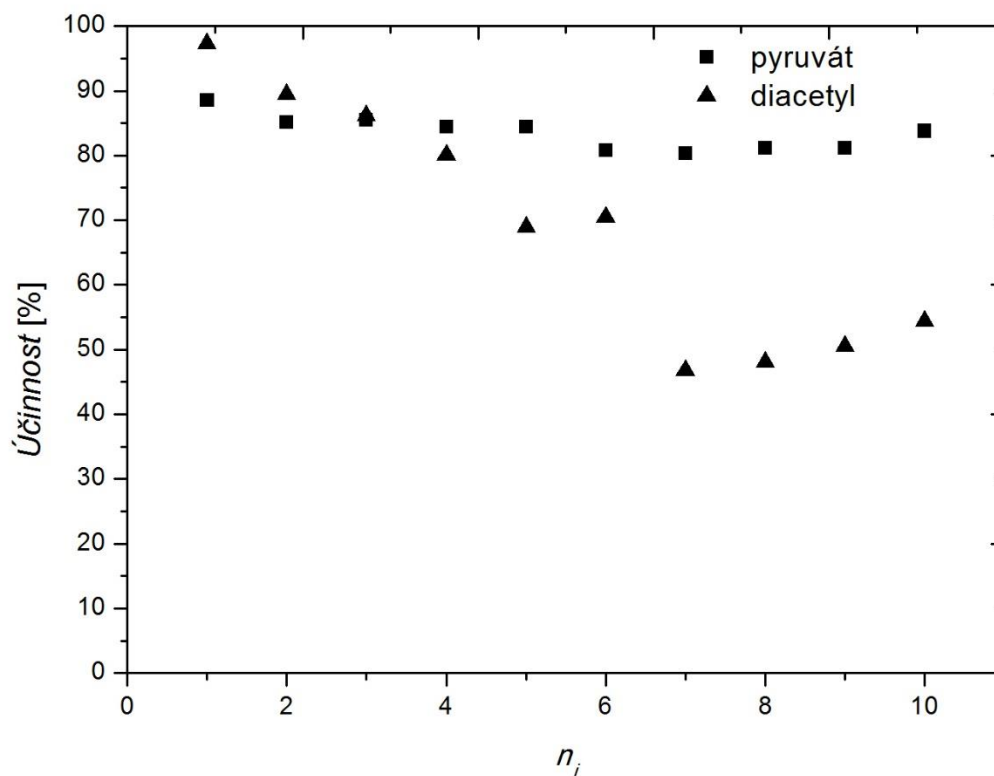
Opakovatelnost reakce byla sledována v 10 nezávislých stanovení pyruvátu a diacetylů s reakcí OPDA o koncentraci $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH reakce 1,2, teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a čase 30 min.

Byla vypočítána relativní směrodatná odchylka z jednotlivých stanovení jako míra opakovatelnosti. Pro pyruvát činila 3,1 %, avšak pro diacetyl měla hodnotu 26,9 % (obr. 31). Bylo zjištěno, že na samotné stanovení 2,3-DMQ má pravděpodobně vliv přídavek HCl, který změnil iontovou sílu roztoku. Proměřila se opakovatelnost stanovení 2,3-DMQ při doplnění BR-pufrem o pH 4,0, 5,0 a 6,0 na celkový objem 10 mL. Relativní směrodatné odchylky pak činily 2,5 % pro pH 5,0 a 8,5 % pro pH 6,0. Při doplnění pufrem o pH 4,0 docházelo k dělení hlavního píku na dva. Jelikož se ve vzorcích obě látky vyskytují společně, byly znovu proměřeny kalibrační křivky pro obě látky při doplnění BR-pufrem o pH 5,0 (výsledné pH pro měření bylo 4,6). Účinnost reakce pro pyruvát byla 83 % a pro diacetyl 91 %. Parametry a meze stanovitelnosti jsou shrnuty v tabulce

12. Proto pro stanovení v reálných vzorcích byl nakonec použit pufr pro doplnění o pH 5,0 a regenerační potenciály $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV.

Tabulka 12: Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2,3-DMQ a 2-OH-3-MQ měřené technikou DPV na m-AgSAE s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV.

c [mol·L ⁻¹]	Látka	Směrnice [nA·L·mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R^2	L_Q [mol·L ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	2,3-DMQ	$(-2,082 \pm 0,0388) \cdot 10^6$	$-0,86 \pm 2,4$	0,9983	
	2-OH-3-MQ	$(-7,803 \pm 0,093) \cdot 10^5$	$-1,05 \pm 0,56$	0,9993	
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	2,3-DMQ	$(-2,169 \pm 0,032) \cdot 10^6$	$0,78 \pm 0,20$	0,9989	
	2-OH-3-MQ	$(-6,95 \pm 0,14) \cdot 10^5$	$0,194 \pm 0,082$	0,9981	$2,8 \cdot 10^{-7}$
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	2,3-DMQ	$(-1,678 \pm 0,027) \cdot 10^6$	$0,108 \pm 0,016$	0,9987	$1,8 \cdot 10^{-7}$



Obr. 31: Opakovatelnost reakce pyruvátu a diacetylů s OPDA ($c = 9 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH = 1,2, $t = 30$ min, 35°C).

5. Reálné vzorky

Koncentrace diacetylu a pyruvátu v reálných vzorcích byla stanovena pomocí derivatizační reakce s OPDA (1 ml vzorku, 1 ml OPDA, $c = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}_{\text{reakce}} = 1,2$, 30 min, 35 °C). Ke zjištění účinnosti reakce bylo navíc do vzorku přidáno známé množství diacetylu a pyruvátu. Pro stanovení byla použita technika DPV s regeneračními potenciály $E_{\text{in}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{fin}} = -900 \text{ mV}$ s doplněním BR-pufrem o pH 5,0. Množství jednotlivých látek byla stanovena pomocí metody standardního přídatku standardů produktů reakce.

Výsledné pH stanovení, přídatky diacetylu a pyruvátu a přídatky pro zjištění účinnosti jsou uvedeny u příslušného vzorku. Grubbsovým testem ($T_k = 1,155$) byly vyloučeny odlehlé hodnoty a meze opakovatelnosti ($L_{1,2}$) byly vypočteny na hladině významnosti 95 % ($f_{n2} = 2,8$).

5.1. Bílé víno

Za vzorek bylo použito bílé suché víno Müller Thurgau z Lobkowiczského zámeckého vinařství, ročník 2012 se 13,5 % obj. alkoholu. Po doplnění BR-pufrem (pH 5,0) bylo pH měřeného roztoku 4,2. Pro určení účinnosti reakce byl navíc ke vzorku přidán diacetyl o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pyruvát o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Obě měření byla prováděna ve stejný den.

Standardní přídatky pro stanovení činily 10 μL 2,3-DMQ a 100 μL 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Jednotlivé parametry křivek jsou uvedeny v tabulkách 13 (diacetyl) a 14 (pyruvát), koncentrace jsou přepočítaná po ředění (10 \times), v tabulce 15 jsou vypočítány výsledné koncentrace a na obr. 32 jsou znázorněny voltamogramy pro vzorek se standardními přídatky a s přídatkem standardu diacetylu a pyruvátu do vzorku.

Tabulka 13 : Parametry přímek standardních přidavků 2,3-DMQ pro stanovení diacetylu ve víně bez přidavku a s přidavkem standardu diacetylu o $c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ měřené technikou DPV na m-AgSAE s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 s vloženými regeneracemi $E_m = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{řm}} = -900 \text{ mV}$.

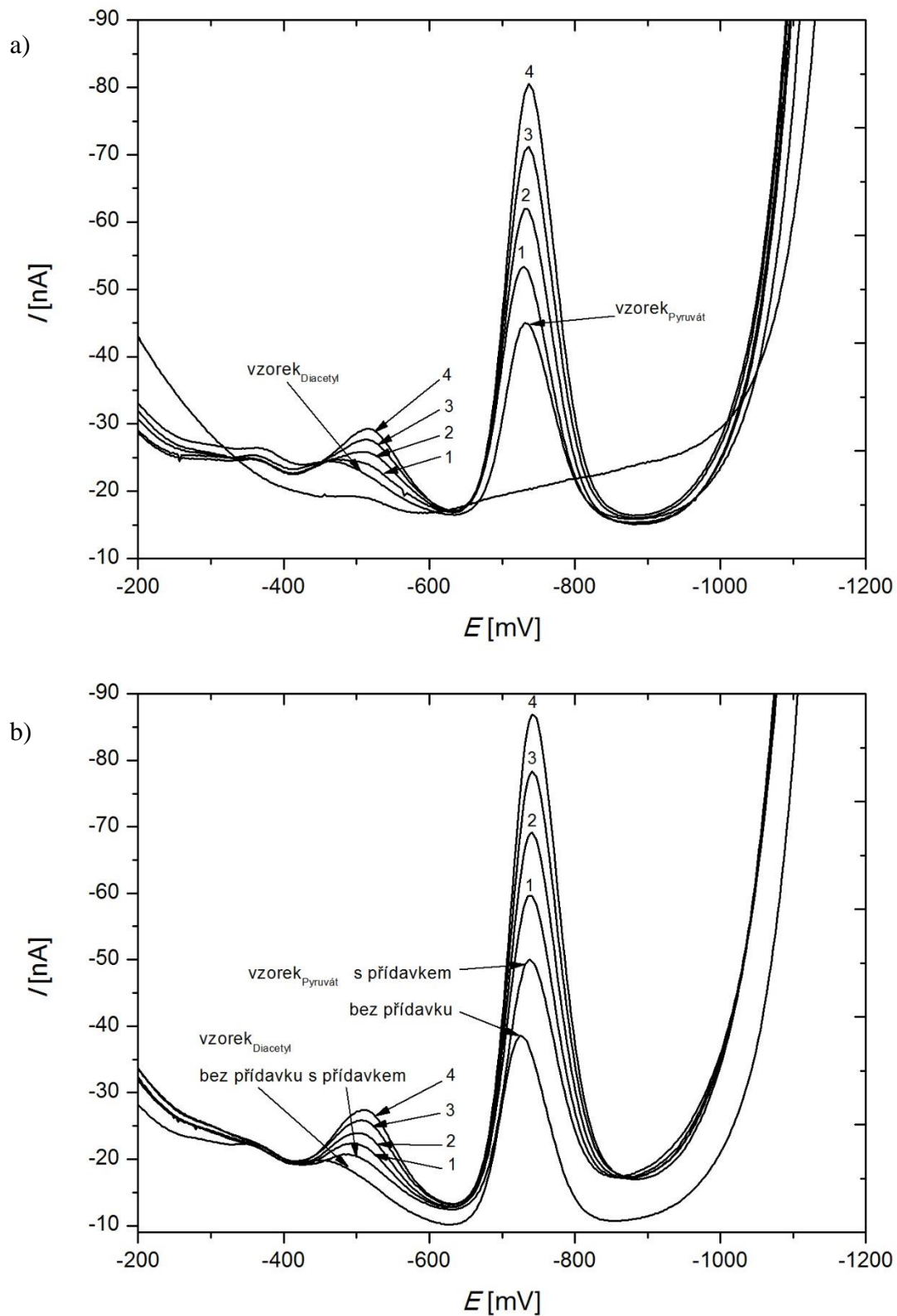
Vzorek	Směrnice [mA·L·mol ⁻¹]	Úsek [mA]	R ²	c [μmol·L ⁻¹]
Bez přidavku	-21,03±0,27	(-2,203±0,063)·10 ⁻⁶	0,9994	1,05
	-18,49±0,67	(-2,37±0,16)·10 ⁻⁶	0,9948	1,28
	-17,09±0,45	(-2,28±0,11)·10 ⁻⁶	0,9972	1,33
S přidavkem	-17,739±0,087	(-4,006±0,021)·10 ⁻⁶	0,9999	2,26
	-15,03 ±0,42	(-3,818±0,099)·10 ⁻⁶	0,9969	2,54
	-10,83±0,83	(-3,92±0,20)·10 ⁻⁶	0,9771	3,62

Tabulka 14 : Parametry přímek standardních přidavků 2-OH-3-MQ pro stanovení pyruvátu ve víně bez přidavku a s přidavkem standardu pyruvátu o $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ měřené technikou DPV na m-AgSAE s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 s vloženými regeneracemi $E_m = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{řm}} = -900 \text{ mV}$.

Vzorek	Směrnice [mA·L·mol ⁻¹]	Úsek [mA]	R ²	c [mmol·L ⁻¹]
Bez přidavku	-0,9007±0,0068	(-30,45±0,16)·10 ⁻⁶	0,9998	0,338
	-0,910±0,012	(-28,03±0,29)·10 ⁻⁶	0,9993	0,308
	-0,923±0,012	(-26,55±0,29)·10 ⁻⁶	0,9993	0,288
S přidavkem	-0,9531±0,0043	(-35,33±0,10)·10 ⁻⁶	0,9999	0,371
	-0,915±0,014	(-30,45±0,33)·10 ⁻⁶	0,9991	0,333
	-0,550±0,034	(-31,38±0,81)·10 ⁻⁶	0,9849	0,571

Tabulka 15 : Vypočítané účinnosti reakcí a výsledné koncentrace a meze opakovatelnosti ($\alpha = 95 \%$) pro stanovení diacetylu a pyruvátu ve vzorku bílého vína.

Vzorek		\bar{x}	Účinnost reakce	c	$L_{1,2}$
		$[\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\%]$	$[\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$
Diacetyl	Bez	1,31	109	1,202	0,064
	S	2,40			
Pyruvát	Bez	298	18	1666	55
	S	352			



Obrázek 32: Voltamogramy stanovení diacetylu a pyruvátu ve vzorku vína pomocí derivatizace s OPDA ($c = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$) bez přidavku (a) a s přidavkem (b) standardu diacetylu ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a pyruvát ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ s doplněním BR-pufrem o $\text{pH} 5,0$ s vloženými regeneracemi $E_{\text{in}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{fin}} = -900 \text{ mV}$. Standardní přidavky 2,3-DMQ (diacetyl) a 2-OH-3-MQ (pyruvát) jsou označeny příslušnými čísly.

5.2. Světlé pivo

Točené pivo Svijany 11° s 4,8 % obj. alkoholu byly zvoleny jako vzorek piva, po doplnění BR-pufrem (pH 5,0) bylo pH stanovení 4,6. Pro určení účinnosti reakce byl navíc ke vzorku přidán pyruvát o výsledné koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Toto měření bylo prováděno následující den.

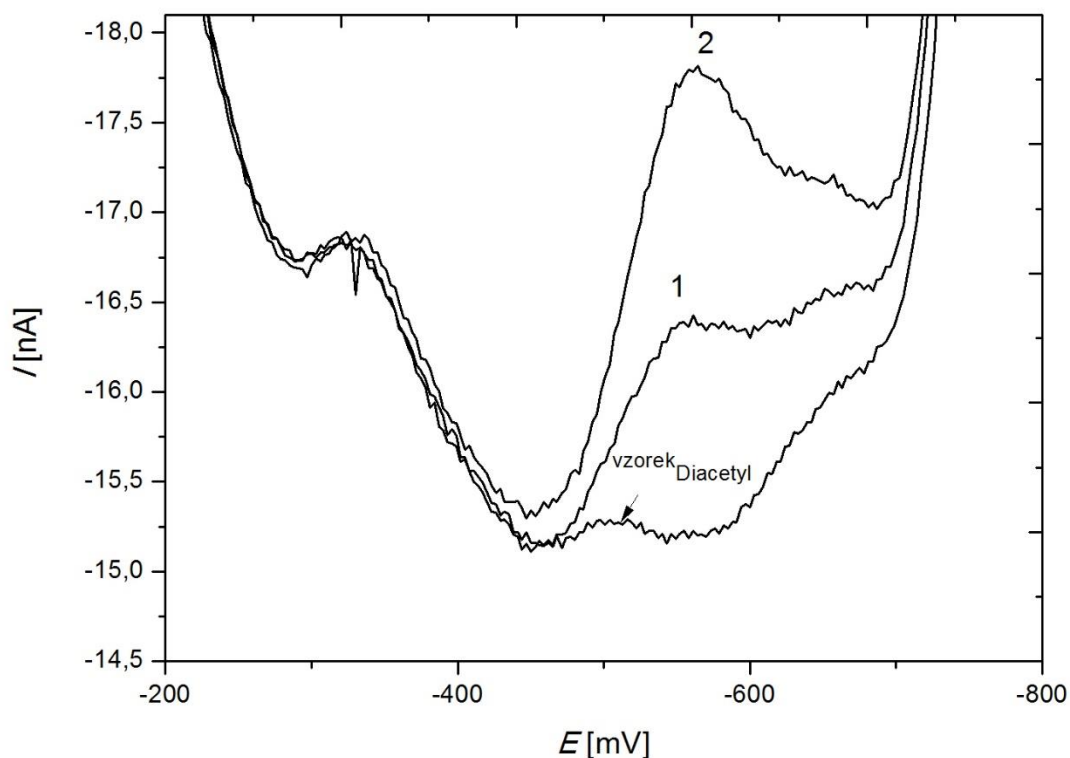
Standardní přídavky pro stanovení byly 20 μL 2,3-DMQ a 100 μL 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Velikost píku diacetylu ve vzorku byla velmi malá a signál nešel s dostatečnou přesností vyhodnotit. Koncentrace byla pod mezí stanovitelnosti a nešla tak metodou standardních přídavků určit množství (obr. 33). Jednotlivé parametry křivek pro pyruvát jsou uvedeny v tabulce 16, koncentrace jsou přepočítána po ředění ($10\times$), v tabulce 17 jsou vypočítány výsledné koncentrace a na obr. 34 jsou znázorněny voltamogramy pro vzorek se standardními přídavky.

Tabulka 16 : Parametry přímek standardních přídavků 2-OH-3-MQ pro stanovení pyruvát v pivě bez přídavku a s přídavkem standardu pyruvátu o $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ měřené technikou DPV na m-AgSAE s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 a s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$.

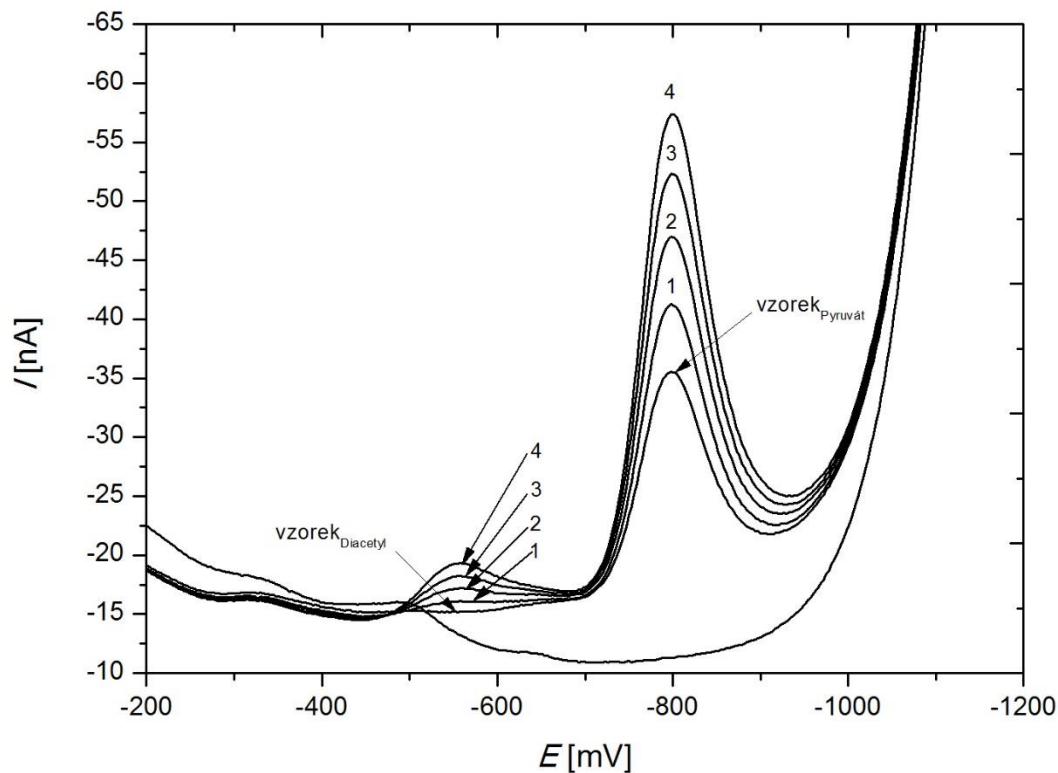
Vzorek	Směrnice [mA·L·mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	c [mmol·L ⁻¹]
Bez přídavku	-0,5240±0,0055	(-17,67±0,13)·10 ⁻⁶	0,9996	0,337
	-0,5209±0,0064	(-16,76±0,15)·10 ⁻⁶	0,9994	0,322
	-0,5092±0,0039	(-19,354±0,093)·10 ⁻⁶	0,9998	0,380
S přídavkem	-0,2595±0,0092	(-10,22 ± 0,22)·10 ⁻⁶	0,9950	0,394
	-0,3011±0,0022	(-9,969±0,052)·10 ⁻⁶	0,9998	0,331
	-0,2980±0,0034	(-10,37 ± 0,082)·10 ⁻⁶	0,9995	0,348

Tabulka 17 : Vypočítané účinnosti reakcí a výsledné koncentrace a meze opakovatelnosti ($\alpha = 95 \%$) pro stanovení pyruvátu ve vzorku piva.

Vzorek	\bar{x} [mmol·L ⁻¹]	Účinnost reakce [%]	c [mmol·L ⁻¹]	L _{1,2} [mmol·L ⁻¹]
Pyruvát	Bez	0,330	3,55	0,23
	S	0,358		



Obrázek 33: Voltamogramy stanovení diacetylů ve vzorku piva pomocí derivatizace s OPDA ($c = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ s doplněním BR-pufrem o $\text{pH} 5,0$ s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$. První dva standardní přídatky 2,3-DMQ (diacetyl) jsou označeny příslušnými čísly



Obrázek 34: Voltamogramy stanovení diacetylů a pyruvátů ve vzorku piva pomocí derivatizace s OPDA ($c = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$) bez přídatku (a) a s přídatkem (b) standardu diacetylů ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a pyruvát ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ s doplněním BR-pufrem o $\text{pH} 5,0$ s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$. Standardní přídatky 2,3-DMQ (diacetyl) a 2-OH-3-MQ (pyruvát) jsou označeny příslušnými čísly.

5.3. Domácí jablečné víno

Domácí jablečné víno (2014, objem alkoholu neznámý) bylo vybráno pro porovnání mezi řízeným kvašením v potravinářství a kvašením, které nepodléhalo žádným kontrolám. Po doplnění BR-pufrem o pH 5,0 bylo výsledné pH 4,2, tedy stejné jako u vína. Pro zjištění účinnosti reakce se ke vzorku přidal diacetyl o výsledné koncentraci $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pyruvát o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Obě měření byla prováděna ve stejný den.

Standardní přídatky pro stanovení byly 10 μL 2,3-DMQ a 200 μL 2-OH-3-MQ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Jednotlivé parametry křivek jsou uvedeny v tabulkách 18 (diacetyl) a 19 (pyruvát), koncentrace jsou přepočítána po ředění ($10\times$), v tabulce 20 jsou vypočítány výsledné koncentrace a na obr. 35 jsou znázorněny voltamogramy pro vzorek se standardními přídatky a s přídatkem standardu diacetylu a pyruvátu do vzorku.

Tabulka 18 : Parametry přímek standardních přídatků pro stanovení diacetylu v domácím jablečném víně bez přídatku a s přídatkem standardu diacetylu o $c = 3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$.

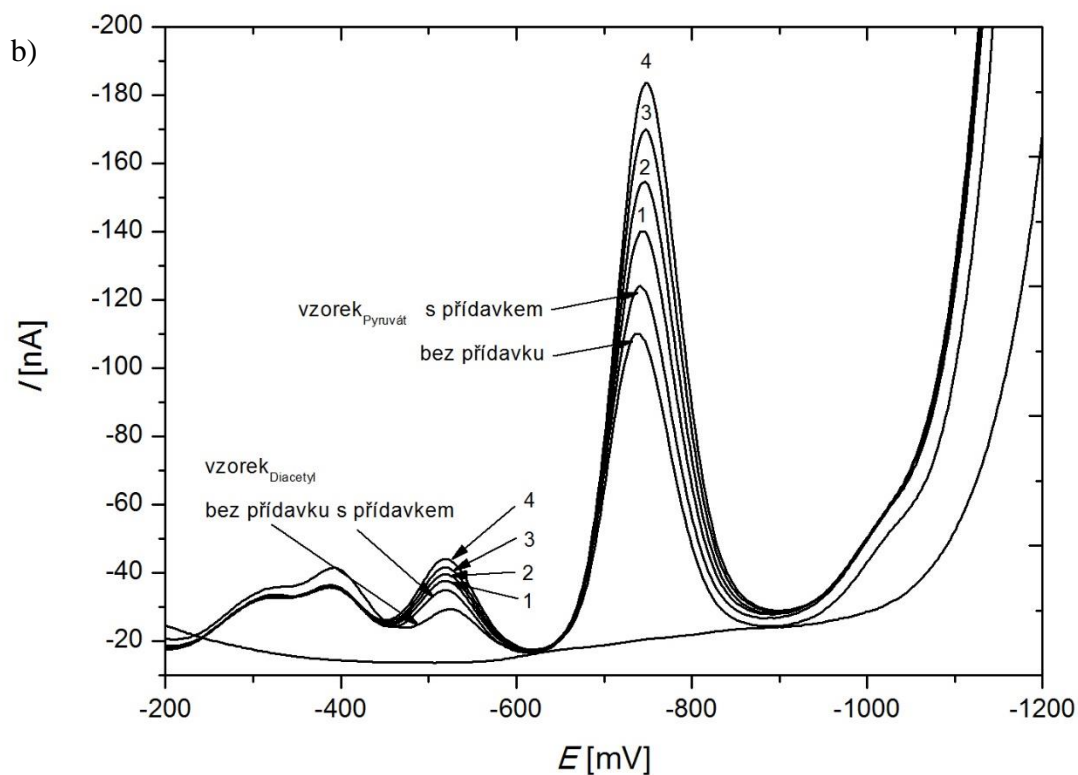
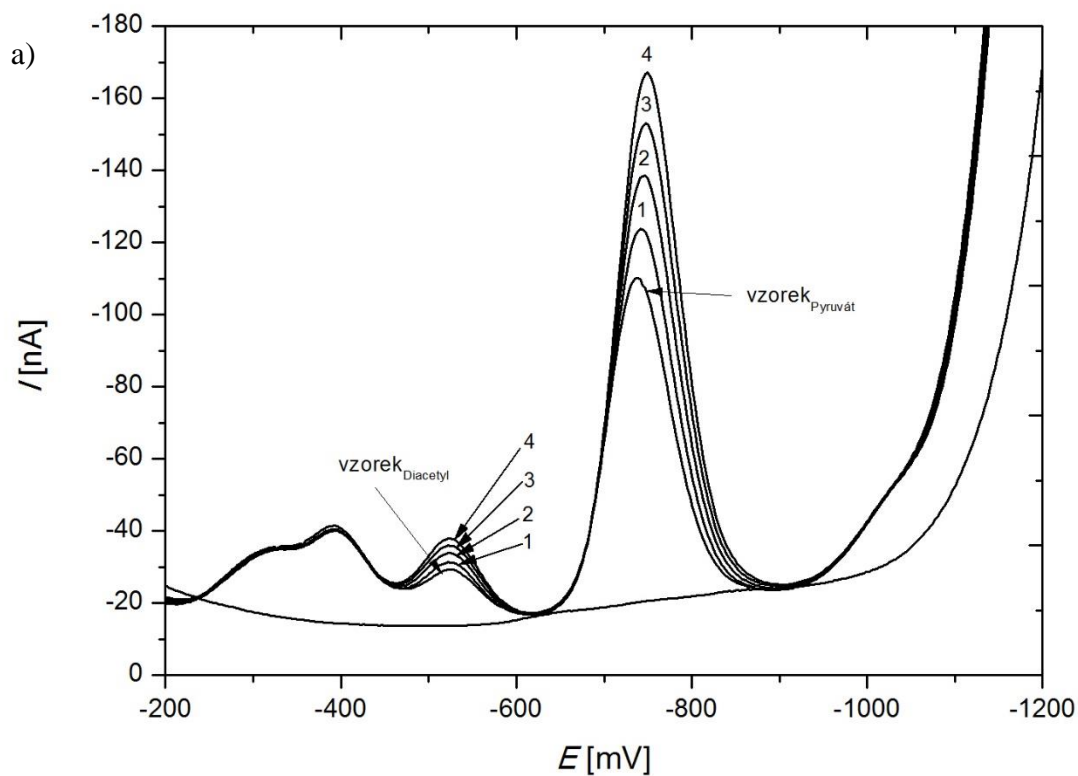
Vzorek	Směrnice [mA·L·mol ⁻¹]	Úsek [mA]	R ²	c [μmol·L ⁻¹]
Bez přídatku	-24,67±0,47	(-6,32±0,11)·10 ⁻⁶	0,9985	2,56
	-20,49±0,31	(-8,13±0,070)·10 ⁻⁶	0,9991	3,97
	-19,94±0,19	(-9,37±0,044)·10 ⁻⁶	0,9996	4,70
S přídatkem	-19,75±0,82	(-13,86±0,19)·10 ⁻⁶	0,9932	6,47
	-21,43±0,38	(-12,77±0,088)·10 ⁻⁶	0,9987	5,96
	-18,32±0,30	(-15,92±0,067)·10 ⁻⁶	0,9989	8,70

Tabulka 19 : Parametry přímek standardních přídavek pro stanovení pyruvátu v domácím jablečném víně bez přídávku a s přídavkem standardu pyruvátu o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ měřené technikou DPV na m-AgSAE s doplněním BR-pufrem o pH 5,0 a s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$.

Vzorek	Směrnice [mA·L·mol ⁻¹]	Úsek [mA]	R ²	c [mmol·L ⁻¹]
Bez přídavku	-0,674±0,022	(-90,94±0,52)·10 ⁻⁶	0,9958	1,35
	-0,7576±0,0072	(-88,60±0,33)·10 ⁻⁶	0,9996	1,17
	-0,7620±0,0017	(-89,491±0,079)·10 ⁻⁶	1,0000	1,17
S přídavkem	-0,7580±0,0051	(-101,96±0,23)·10 ⁻⁶	0,9998	1,35
	-0,7763±0,0030	(-102,19±0,14)·10 ⁻⁶	0,9999	1,32
	-0,7745±0,0034	(-102,59±0,16)·10 ⁻⁶	0,9999	1,33

Tabulka 20 : Vypočítané účinnosti reakcí a výsledné koncentrace a meze opakovatelnosti ($\alpha = 95 \%$) pro stanovení diacetylu a pyruvátu ve vzorku domácího jablečného vína.

Vzorek	\bar{x} [μmol·L ⁻¹]	Účinnost reakce [%]	c [μmol·L ⁻¹]	L _{1,2} [μmol·L ⁻¹]
Diacetyl	Bez	63	7,0	1,6
	S			
Pyruvát	Bez	15	7813	47
	S			



Obrázek 35: Voltamogramy stanovení diacetylu a pyruvátu ve vzorku domácího jablečného vína pomocí derivatizace s OPDA ($c = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,2$) bez přidavku (a) a s přidavkem (b) standardu diacetylu ($c = 3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a pyruvátu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ s doplněním BR-pufrem o $\text{pH} 5,0$ s vloženými regeneracemi $E_{in} = -200 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -900 \text{ mV}$. Standardní přidavky 2,3-DMQ (diacetyl) a 2-OH-3-MQ (pyruvát) jsou označeny příslušnými čísly.

6. Závěr

V této diplomové práci byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení diacetylu a pyruvát pomocí derivatizace s *o*-fenylendiaminem (OPDA) a následného stanovení produktů reakcí 2,3-dimethylchinoxalinu (2,3-DMQ) a 2-hydroxy-3-methylchinoxalinu (2-OH-3-MQ) technikami DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE).

Následná měření koncentračních závislostí byla v prostředí optimálním pro dané techniky s regeneračními potenciály $E_{in} = -400$ mV a $E_{fin} = -900$ mV pro DCV a pro DPV $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Relativní směrodatná odchylka při měření opakovatelnosti pro I_p ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; $n = 20$) s vloženými regeneračními potenciály byla 0,33 % pro DCV a 0,76 % pro DPV. Koncentrační závislosti 2,3-DMQ byly za optimálních podmínek proměřeny v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ pro DCV a $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ pro DPV na m-AgSAE. Meze stanovitelnosti (L_Q) byly pro techniku DCV $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹ a pro techniku DPV $1,1 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹.

Pro 2-OH-3-MQ bylo nalezeno optimální prostředí v BR-pufriu o pH 4,0 pro obě techniky. Rychlost nárůstu byla opět zvolena pro obě techniky 20 mV·s⁻¹. Měření koncentračních závislostí byly poté změřeny v optimálním prostředí s regeneračními potenciály $E_{in} = -500$ mV a $E_{fin} = -900$ mV. Relativní směrodatná odchylka při měření opakovatelnosti pro I_p ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; $n = 20$) s vloženými regeneračními potenciály byla 0,18 % pro DCV a 0,16 % pro DPV. Koncentrační závislosti 2-OH-3-MQ byly proměřeny v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ na m-AgSAE s optimálním prostředím a regeneračním potenciálem L_Q byly pro techniku DCV $4,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ a pro techniku DPV $3,4 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹.

Optimalizace derivatizační reakce pro stanovení diacetylu a pyruvátu se skládala z nalezení optimální koncentrace OPDA, která byla $9 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH při kterém reakce probíhá (pH = 1,2 úprava přidáním HCl), času (30 min) a teploty (35 °C). Měření byla prováděna technikou DPV při optimálním stanovení pro daný produkt reakce.

Opakovatelnost reakce byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka z deseti nezávislých měření. Pro stanovení pyruvátu činila 3,1 %, pro diacetyl 26,9 %. Změřením samotného produktu reakce diacetylu a OPDA (2,3-DMQ) se zjistilo, že na jeho stanovení má zřejmě vliv přidavek HCl, který změní iontovou sílu roztoku. Při doplnění BR-pufrem o pH 5,0 ($pH_{roztoku} = 4,6$) se relativní směrodatná odchylka zmenšila

na 2,5 %. Pro obě látky byla proto znova proměřena kalibrační závislost a meze stanovitelnosti při doplnění BR-pufrem o pH 5,0 s regeneračními potenciály $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV ($L_Q \approx 2,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro 2,3-DMQ a $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹ pro 2-OH-3-MQ). Výsledná účinnost reakce byla pro pyruvát 83 % a pro diacetyl 91 %

Reálné vzorky bílého vína (Müller Thurgau, Lobkowiczské zámecké vinařství, 2012, suché, 13,5 % obj. alkoholu), světlého piva (Svijany 11°, 4,8 % obj. alkoholu) a domácího jablečného vína (2014, neznámý obj. alkoholu) byly stanoveny pomocí derivatizační reakce s OPDA při optimálních podmínkách reakce. Ke zjištění účinnosti reakce bylo do vzorku přidáno známé množství diacetylu a pyruvátu. Pro stanovení byla zvolena technika DPV s regeneračními potenciály $E_{in} = -200$ mV a $E_{fin} = -900$ mV s doplněním BR-pufrem o pH 5,0. Množství jednotlivých látek byla stanovena pomocí metody standardního přídavku standardů produktů reakce. Naměřené koncentrace s mezemi opakovatelnosti ($L_{1,2}$), účinnosti reakcí a pH měření jsou shrnuty v tabulce 21. Nízké výtěžky reakcí pyruvátu mohou být způsobeny reakcí ostatních složek ve vzorku s derivatizačním činidlem. Avšak vysoké koncentrace pyruvátu mohou být zapříčiněny interferencemi s ostatními α -ketokyselinami, jejichž reakční produkty se nemusí podařit rozlišit od 2-OH-3-MQ.

Tabulka 21: Koncentrace diacetylu a pyruvátu ve vzorcích vína, piva a jablečného vína.

Vzorek	pH _{reakce}	Látka	Účinnost reakce	c	$L_{1,2}$
			[%]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
Bílé víno	4,2	Diacetyl	109	1,200	0,064
		Pyruvát	18	1666	55
Pivo	4,6	Pyruvát	9,3	3554	23
Jablečné víno	4,2	Diacetyl	62	7,0	1,6
		Pyruvát	15	7813	47

Literatura

1. Sigma-Aldrich. [Online] Citace: 25. 4 2015.
2. BARTOWSKY, E., FRANCIS, I., BELLON, J., HENSCHKE, P. Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration? *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2002, vol. 8, no. 3, p. 180–185. ISSN 1322-7130.
3. BARROS, A., RODRIGUES, J., ALMEIDA, P., OLIVA-TELES, M. Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with *o*-phenylenediamine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 1999, vol. 22, no. 13, p. 2031–2069. ISSN 1082-6076.
4. HURTADO-SANCHEZ, M., ESPINOSA-MANSILLA, A., RODRIGUEZ-CACERES, M., DURAN-MERAS, I. Evaluation of liquid chromatographic behavior of lumazinic derivatives, from α -dicarbonyl compounds, in different C18 columns: application to wine samples using a fused-core column and Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, vol. 62, no. 1, p. 97–106. ISSN 0021-8561.
5. BARTOWSKY, E., HENSCHKE, P. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, vol. 96, no. 3, p. 235–252. ISSN 0168-1605.
6. MINK, R., SOMMER, S., KOLLING, R., SCHMARR, H., BAUMBACH, L., SCHARFENBERGER-SCHMEER, M. Diacetyl reduction by commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains during vinification. *J. Inst. Brew.*, 2014, vol. 120, no. 1, p. 23–26. ISSN 0046-9750.
7. MINK, R., SOMMER, S., KÖLLING, R., SCHMARR, H., SCHARFENBERGER-SCHMEER, M. Time course of diacetyl formation during vinification with *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* co-cultivation. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2014, vol. 20, no. 2, p. 194–198. ISSN 1322-7130.

8. RODRIGUES, J., BARROS, A., RODRIGUES, P. Differential pulse polarographic determination of alpha-dicarbonyl compounds in foodstuffs after derivatization with *o*-phenylenediamine and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, vol. 48, no. 8, p. 321–3222. ISSN 0021-8561.
9. HORÁK, T., ČULÍK, J., JURKOVÁ, M., ČEJKA, P., KELLNER, V. Využití některých moderních extrakčních postupů pro kvantitativní stanovení vicinálních diketonů v pivu. *Kvasny Prum.*, 2009, vol. 55, no. 3, p. 66–72. ISSN 0023-5830.
10. HORÁK, T., ČULÍK, J., ČEJKA, P., JURKOVÁ, M., KELLNER, V. Stanovení vicinálních diketonů v pivu metodou SPME. *Kvasny Prum.*, 2001, vol. 47, no. 11, p. 316–321. ISSN 0023-5830.
11. RODRIGUES, P., RODRIGUES, J., BARROS, A., LAPA, R., LIMA, J., CRUZ, J., FERREIRA, A. Automatic flow system with voltammetric detection for diacetyl monitoring during Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, no. 13, p. 3647–3653. ISSN 0021-856.
12. MARTINEAU, B., ACREE, T., HENICKKLING, T. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int.*, 1995, vol. 28, no. 2, p. 139–143. ISSN 0963-9969.
13. RUIZ, P., IZQUIERDO, P., SESENA, S., GARCIA, E., PALOP, M. Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines. *J. Food Sci.*, 2012, vol. 77, no. 10, p. M579–M585. ISSN 0022-1147.
14. REVEL, G., PRIPIS-NICOLAU, L., BARBE, J., BERTRAND, A. The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, vol. 80, no. 1, p. 102–108. ISSN 0022-5142.
15. PETRI, A., PFANNEBECKER, J., FROHLICH, J., KONIG, H. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol.*, 2013, vol. 33, no. 1, p. 48–54. ISSN 0740-0020.

16. MAICAS, S., FERRER, S., PARDO, I. NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology*, 2002, vol. 148, no. 1, p. 325–332. ISSN 1350-0872.
17. NIELSEN, J., RICHELIEU, M. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 2, p. 740–745. ISSN 0099-2240.
18. RAMOS, R., PACHECO, J., GONCALVES, L., VALENTE, I., RODRIGUES, J., BARROS, A. Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC-UV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization. *Food Control*, 2012, vol. 24, no. 1, p. 220–224. ISSN 0956-7135.
19. MORGAN, D., FLAKE, G., KIRBY, P., PALMER, S. Respiratory toxicity of diacetyl in C57Bl/6 mice. *Toxicol. Sci.*, 2008, vol. 103, no. 1, p. 169–180. ISSN 1096-0929.
20. SHIBAMOTO, T. Diacetyl: Occurrence, analysis, and toxicity. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, vol. 62, no. 18, p. 4048–4053. ISSN 0021-8561.
21. MORRIS, J., HUBBS, A. Inhalation dosimetry of diacetyl and butyric acid, two components of butter flavoring vapors. *Toxicol. Sci.*, 2009, vol. 108, no. 1, p. 173–183. ISSN 1096-6080.
22. HUBBS, A., GOLDSMITH, W., KASHON, M., FRAZER, D., MERCER, R., BATTELLI, L., KULLMAN, G., SCHWEGLER-BERRY, D., FRIEND, S., CASTRANOVA, V. Respiratory toxicologic pathology of inhaled diacetyl in sprague-dawley Rats. *Toxicol. Pathol.*, 2008, vol. 36, no. 2, p. 330-344 ISSN 0192-6233.
23. FEDAN, J., DOWDY, J., FEDAN, K., HUBBS, A. Popcorn worker's lung: In vitro exposure to diacetyl, an ingredient in microwave popcorn butter flavoring, increases reactivity to methacholine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006, vol. 215, no. 1, p. 17–22. ISSN 0041-008X.

24. RODRIGUES, J., BARROS, A., CRUZ, J., FERREIRA, A. Determination of diacetyl in beer using differential-pulse polarography. *J. Inst. Brew.*, 1997, vol. 103, no. 5, p. 311–314. ISSN 0046-9750.
25. YAN, Z., ZHANG, X., NIU, W. Simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in beer and wine by ion chromatography derivatization. *Microchim. Acta*, 1997, vol. 127, no. 3, p. 189–194. ISSN 0026-3672.
26. DA SILVA FERREIRA, A., REIS, S., RODRIGUES, C., OLIVEIRA, C., DE PINHO, P. Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.*, 2007, vol. 72, no. 5, p. S314–S318. ISSN 0022-1147.
27. PRONK, J., STEENSMA, H., VANDIJKEN, J. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, vol. 12, no. 16, p. 1607–1633. ISSN 0749-503X.
28. MONTENEGRO, P., VALENTE, I., GONCALVES, L., RODRIGUES, J., BARROS, A. Single determination of alpha-ketoglutaric acid and pyruvic acid in beer by HPLC with UV detection. *Anal. Methods*, 2011, vol. 3, no. 5, p. 1207–1212. ISSN 1759-9679.
29. SHAPIRO, F., SILANIKOVE, N. Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Application in colorful juices and fermentable food (yogurt, wine) analysis. *Food Chem.*, 2011, vol. 129, no. 2, p. 608–613. ISSN 0308-8146.
30. STOTZ, E. Pyruvate metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 1945, vol. 5, p. 129–164. ISSN 0096-5316.
31. OKANE, D., GUNSALUS, I. Pyruvic acid metabolism - A factor required for oxidation by *Streptococcus-faecalis*. *J. Bacteriol.*, 1948, vol. 56, no. 4, p. 499–506. ISSN 0021-9193.

32. JARDINE, K., SOMMER, E., SALESKA, S., HUXMAN, T., HARLEY, P., ABRELL, L. Gas phase measurements of pyruvic acid and its volatile metabolites. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, vol. 44, no. 7, p. 2454–2460. ISSN 0013-936X.
33. ANKER, H. Some aspects of the metabolism of pyruvic acid in the intact animal. *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 176, no. 3, p. 1337–1352. ISSN 0021-9258.
34. MILANOVIC, V., CIANI, M., ORO, L., COMITINI, F. *Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. *Microb. Cell Fact.*, 2012, vol. 11, no. 18, p. 1–11. ISSN 1475-2859.
35. HAQ, A., DAWES, E. Pyruvic acid metabolism and ethanol formation in *Erwinia-amylovora*. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, vol. 68, no. 11, p. 259–306. ISSN 0022-1287.
36. DOLIN, M., GUNSALUS, I. Pyruvic acid metabolism - 2. An acetoin-forming enzyme system in *Streptococcus-faecalis*. *J. Bacteriol.*, 1951, vol. 62, no. 2, p. 199–214. ISSN 0021-9193.
37. COOTE, N., KIRSOP, B., BUCKEE, G. Concentration and significance of pyruvate in beer. *J. Inst. Brew.*, 1973, vol. 79, no. 4, p. 298–304. ISSN 0046-9750.
38. YOSHIDA, S., YOKOYAMA Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, vol. 113, no. 5, p. 556–561. ISSN 389-1723.
39. MORATA, A., GOMEZ-CORDOVES, A., COLOMO, B., SUAREZ, J. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, no. 25, p. 7402–7409. ISSN 0021-8561.
40. MONTENEGRO, P., VALENTE, I., GONCALVES, L., RODRIGUES, J., BARROS, A. Single determination of alpha-ketoglutaric acid and pyruvic acid in beer by HPLC with UV detection. *Anal. Methods*, 2011, vol. 3, no. 5, p. 1207–1212. ISSN 1759-9679.

41. GHICA, M., BRETT, C. Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples. *Electroanalysis*, 2006, vol. 18, no. 8, p. 748–756. ISSN 1040-0397.
42. GRIS, J., GLISONI, R., FABIAN, L., FERNANDEZ, B., MOGLIONI, A. Synthesis of potential chemotherapeutic quinoxalinone derivatives by biocatalysis or microwave-assisted Hinsberg reaction. *Tetrahedron Lett.*, 2008, vol. 49, no. 6, p. 1053–1056. ISSN 0040-4039.
43. MURTHY, S., MADHAV, B., NAGESWAR, Y. Revisiting the Hinsberg reaction: Facile and expeditious synthesis of 3-substituted quinoxalin-2(1H)-ones under catalyst-free conditions in Water. *Helv. Chim. Acta*, 2010, vol. 93, no. 6, p. 1216–1220. ISSN 0018-019X.
44. STRIER, M. P., CAVAGNOL, J. C. The polarography of quinoxaline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, vol. 76, no. 16, p. 4331–4335. ISSN 1424-8220.
45. BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., YOSYPCHUK, B. Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens. *Sensors*, 2006, vol. 6, no. 4, p. 445–452. ISSN 1424-8220.
46. YOSYPCHUK, B., NOVOTNÝ, L. Nontoxic electrodes of solid amalgams. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2002, vol. 32, no. 2, p. 141–151. ISSN 1040-8347.
47. YOSYPCHUK, B., BAREK, J. Vlastnosti pevných pastových amalgamových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chem. Listy*, 2009, vol. 103, no. 4, p. 284–290. ISSN 0009-2770.
48. VYSKOČIL, V., DAŇHEL, A., FISCHER, J., NOVOTNÝ, V., DEÝLOVÁ, D., MUSILOVÁ-KARAOVÁ, J., MAIXNEROVÁ, L., PECKOVÁ, K., BAREK, J. Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chem. Listy*, 2010, vol. 104, no. 12, p. 1181–1195. ISSN 0009-2770.

49. YOSYPCHUK, B., NOVOTNÝ, L. Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis*, 2002, vol. 14, no. 24, p. 1733–1739. ISSN 1040-0397.
50. BAREK J, FISCHER J, NAVRATIL T, PECKOVA K, YOSYPCHUK B. Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens. *Sensors*, 2006, vol. 6, no. 4, p. 445–452. ISSN 1424-8220.
51. BARD, A., FAULKNER, L. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*. 2nd ed. *New York: John Wiley & Sons*, 2001. p. 833 ISBN 0-471-04372-9.