

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Využití uhlíkových elektrod
v analýze potravin

Ing. Simona Žabčíková

Disertační práce

2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 31. 7. 2018

Ing. Simona Žabčíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi v průběhu studia pomáhali jak po stránce odborné, tak psychické. Ráda bych vyjádřila obrovský dík mému školiteli, doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D., za jeho vstřícný a přátelský přístup v průběhu celého studia, za odborné vedení a cenné poznatky, které mi předal. Poděkování rovněž patří školiteli specialistovi, Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D., za přínosné rady z oblasti elektrochemie a za odbornou pomoc při publikování odborných prací. Své rodině děkuji za umožnění studií, za podporu jak finanční, tak morální. Děkuji také svým přátelům za důvěru ve mne vloženou.

ANOTACE

Práce se zabývá přípravou, charakterizací a použitím uhlíkových elektrod v analýze potravin. Převážná část je věnována uhlíkovým pastovým elektrodám, jejich vlastnostem a modifikacím pro stanovení vybraných analytů. V modelových i reálných vzorcích byl stanovován akrylamid, dále vitamíny rozpustné v tucích nebo vitamín C a flavonoidy. Uhlíková pastová elektroda byla rovněž použita pro zhodnocení oxidační stability jedlého oleje. V práci byly využity různé elektrochemické metody, převážně však cyklická voltametrie, square wave voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie.

KLÍČOVÁ SLOVA

uhlíková pastová elektroda, modifikované elektrody, akrylamid, vitamíny, flavonoidy

TITLE

Using of carbon electrodes in analysis of foodstuff

ANNOTATION

This thesis is focused on preparing, characterization and utilizing of carbon electrodes in analysis of foodstuffs. It is devoted to properties, characterization and modifications of carbon paste electrodes for determination of target analytes. The acrylamide, lipophilic vitamins, ascorbic acid or flavonoids were determined in model and real samples. The carbon paste electrode was also used for evaluation of oxidative stability of edible oil. The cyclic voltammetry, square wave voltammetry and differential pulse voltammetry were used as electrochemical tools for determination of analytes.

KEYWORDS

carbon paste electrode, modified electrodes, acrylamide, vitamins, flavonoids

Obsah

Úvod.....	11
1 Elektrochemické metody v analýze potravin.....	13
1.1 Voltametrie.....	13
1.1.1 Cyklická voltametrie	15
1.1.2 Square-wave voltametrie.....	16
1.1.3 Diferenčně pulzní voltametrie	16
1.1.4 Stripping voltametrie.....	17
2 Uhlíkové elektrody	18
2.1 Uhlíkové pastové elektrody	18
2.2 Skelné uhlíkové elektrody.....	20
2.3 Pentilkové uhlíkové elektrody	20
2.4 Modifikované uhlíkové pastové elektrody.....	21
2.4.1 Adamsovy elektrody	22
3 Elektrochemické stanovení akrylamidu.....	23
3.1 Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti akrylamidu	24
3.2 Toxicita	25
3.3 Výskyt a použití akrylamidu	26
3.4 Metody stanovení akrylamidu.....	28
3.4.1 Elektrochemické metody stanovení akrylamidu	32
3.5 Přílohy ke kapitole 3	41
4 Elektrochemické stanovení vitamínů.....	66
4.1 Vitamíny rozpustné v tucích	67
4.1.1 Vitamín A.....	67
4.1.2 Vitamín D.....	70
4.1.3 Vitamín E	72
4.1.4 Vitamín K.....	74

4.1.5	Elektrochemické stanovení vitamínů rozpustných v tucích.....	75
4.2	Vitamíny rozpustné ve vodě	83
4.2.1	Vitamín C	83
4.2.2	Elektrochemické stanovení vitamínů rozpustných ve vodě.....	84
4.3	Přílohy ke kapitole 4	87
5	Využití CPE v dalších oblastech analýzy potravin.....	146
5.1	Flavonoidy	147
5.1.1	Kvercetin	148
5.1.2	Rutin	152
5.2	Stanovení oxidační stability jedlých tuků a olejů	156
5.3	Přílohy ke kapitole 5	161
6	Závěr	184
7	Literatura.....	187
8	Seznam publikací.....	212

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Vzorový záznam cyklické voltametrie.....	15
Obrázek 2: Pomůcky pro zhotovení uhlíkové pastové elektrody.	20
Obrázek 3: Ukázka měření s PGE a její zapojení.....	21
Obrázek 4: Chemická struktura akrylamidu.	24
Obrázek 5: Vzorové záznamy DPV s CPE/DNA.....	36
Obrázek 6: Navržená struktura komplexu AA-Ni (převzato z [78]).	38
Obrázek 7: Vitamín A.....	68
Obrázek 8: Provitamíny A	68
Obrázek 9: Vitamín D.....	72
Obrázek 10: Vitamín E	73
Obrázek 11: Vitamín K.....	74
Obrázek 12: Vitamín C	84
Obrázek 13: Obecná struktura flavonoidů.....	148
Obrázek 14: Struktura kvercetinu.	149
Obrázek 15: Struktura rutinu.	152
Tabulka 1: Srovnávací hodnoty obsahu akrylamidu ve vybraných kategoriích potravin [50].	27
Tabulka 2: Srovnání elektroanalytických metod stanovení AA.....	33
Tabulka 3: Výsledky stanovení AAc na různých typech elektrod.....	85
Tabulka 4: Přehled dalších druhů uhlíkových elektrod pro stanovení kvercetinu.....	150

Seznam zkratek

α -TAc	α -tokoferyl acetát
α -TOH	α -tokoferol
α -TOQ-OH	hemiketal
[Bmim]BF ₄	1-butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborát
25-OHD/D ₂ /D ₃	25-hydroxyvitamín D/D ₂ /D ₃
AA	akrylamid
AAc	kyselina askorbová
ACB	octanový pufr
ACN	acetonitril
AdSDPV	adsorptivní rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie
AdSV	adsorptivní rozpouštěcí voltametrie
AMB	amonný pufr
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie
ATR-IRMS	infračervená mikrospektroskopie se zeslabeným úplným odrazem
BCB	brilantní modř
BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
CE	kapilární elektroforéza
CPE	uhlíková pastová elektroda
CPE-Hb	uhlíková pastová elektroda modifikovaná hemoglobinem
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie
CV	cyklická voltametrie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DDAB	dimethyldioctadecylamonium bromid
DDD	doporučená denní dávka
DHAAC	dehydroaskorbová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP	diferenčně pulzní polarografie
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
$E_{1/2}$	půlvlnný potenciál
E_{ampl}	amplituda pulzu
$E_{\text{dep}}, t_{\text{dep}}$	depoziční potenciál, čas

E_{fin}	koncový potenciál
E_{int}	počáteční potenciál
ELISA	imunoenzymatický test
$E_{\text{p,a}}; E_{\text{p,k}}$	potenciál anodického/katodického píku
E_{step}	velikost potenciálového skoku
EU	Evropská Unie
E_{ver}	potenciál zvratu
ExSV	extraktivní stripping voltametrie
GA	glycidamid
GC	plynová chromatografie
GC	skelný uhlík
GCE	skelná uhlíková elektroda
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GCPE	skelná uhlíková pastová elektroda
GHS	Globálně harmonizovaný systém
Gly	glycin
Hb	hemoglobin
HDME	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
I_{lim}	limitní proud
$I_{\text{p,a}}; I_{\text{p,k}}$	proud anodického/katodického píku
IR	infračervená spektrometrie
LC	kapalinová chromatografie
LC-ED	kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MWCNTPE	pastová elektroda z MWCNTs
MWCNTs	vícetěnné uhlíkové nanotrubičky
NACE	kapilární elektroforéza v nevodné fázi
NAD/NADP	nikotinamidadenindinukleotid
NIR/MIR	blízká/střední infračervená oblast
NPV	normální pulzní voltametrie

PBS	fosfátový pufr
PGE	pentilková uhlíková elektroda
Q	kvercetin
R	elektrický odpor
RA	retinol acetát
RP	retinol palmitát
S/N	poměr signál/šum
SKE	standardní kalomelová elektroda
SPE	extrakce tuhou fází
sr, v	rychlost skenu (<i>scan rate</i>)
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
SV	stripping voltametrie, rozpouštěcí voltametrie
SWCNTPE	pastová elektroda ze SWCNTs
SWCNTs	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky
SWV	square wave voltametrie
Tau	taurin
TBAB	bromid tetrabutylamonný
TBAOH	hydroxid tetrabutylamonný
TEAI	jodid tetraethylamonný
TMAI	jodid tetramethylamonný
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast světla

Úvod

Uhlíkové elektrody jsou zástupce homogenních elektrod využívaných převážně pro voltametrická měření. Základem voltametrických technik je měření proudu protékajícího obvodem, kdy je na pracovní elektrodu vkládáno měnící se napětí. Průběh vkládaného napětí, tzv. potenciálová rampa, udává typ voltametrické techniky. Pro analýzu potravin je voltametrie využívána zřídka vzhledem ke složitým matricím vzorků obsahujících převážně organické molekuly, které se voltametricky stanovují poměrně obtížně. V analýze potravin je z elektrochemických technik používáno především potenciometrické měření na iontově selektivních elektrodách, kdy hlavním příkladem je měření pH či potenciometrické titrace. Potenciometricky lze také ve složitějších matricích, jež potraviny představují, stanovit obsah fluoridů, dusitanů, dusičnanů, amoniaku, a dalších látek iontové povahy. Voltametrické techniky se osvědčily například při stanovení dusitanů v mase, kofeinu v kávě nebo energetických nápojích, vitamínu C v různých druzích šťáv a džusů, a další. Vzhledem k nízkým koncentracím stanovovaných analytů je v analýze potravin oblíbená technika rozpouštěcí voltametrie. Základem je prekoncentrační krok předcházející vlastnímu měření. Tímto lze dosáhnout zvýšení citlivosti metody, kdy lze ve vzorcích potravin stanovit i například potravinářská aditiva, barviva, těžké kovy a další látky vyskytující se v nízkých koncentracích. Rovněž je při analýze potravin hojně používáno biosenzorů, což jsou elektrody s membránou, která jistým způsobem interaguje s analytem, a jejich hlavní výhodou je možnost miniaturizace. Membrána může obsahovat například enzymy, části rostlin či orgánů živočichů, bakterie, protilátky, apod. Biosenzory lze aplikovat v analýze potravin například pro stanovení obsahu alkoholu, kyseliny askorbové a citrónové, cukrů, cholesterolu, apod. V posledních letech se rozvíjí použití elektronických nosů a jazyků, což jsou speciální přístroje schopné detekovat několik látek najednou pomocí soustavy senzorů založených na jiných principech. Výsledkem je soubor analytických dat, která jsou chemometricky zpracována do celků, kdy každý z nich přísluší jisté vůni či chuti. Elektronické nosy a jazyky lze využít například pro analýzu nápojů, chuti vybraných preparátů nebo pro hodnocení kvality surovin i finálních potravinářských výrobků.

Přes výše uvedené možnosti využití elektrochemie při analýze potravin je převážná část metod stanovení založena především na chromatografických technikách, které však ve většině případů vyžadují jak složité úpravy vzorku zahrnující např. prekoncentrační a složité čistící kroky, tak například derivatizace, apod. Tyto úpravy vzorků k analýze jsou samozřejmě velice důležitou součástí každé analýzy, nicméně jsou také velice časově náročné. Samotné

chromatografické analýzy mnohdy trvají v řádech desítek minut až hodin. Elektrochemické metody naopak často vyžadují jen minimální úpravy vzorku před vlastní analýzou a optimalizovaná elektroanalytická metoda pak trvá v řádech sekund až minut. Z tohoto důvodu se elektroanalýze v potravinářství věnuje stále více vědců ve snaze optimalizovat měření do takové míry, aby bylo možné jej využívat v běžném potravinářském provozu a ušetřit tak čas a snížit ekonomické náklady stanovení související s energií potřebnou pro analýzu. Elektrochemické metody jsou také význačné nízkou spotřebou chemikálií a s tím souvisejícím nízkým zatížením životního prostředí. Uhlíkové pastové elektrody jsou obecně použitelné pro měření ve vodných roztocích. Toto je velká výhoda z hlediska omezení použití organických rozpouštědel, která jsou často toxická.

Uhlíkové elektrody byly v práci použity pro stanovení několika analytů. První praktická část se věnuje stanovení akrylamidu, což je toxická karcinogenní látka vznikající v potravinách z asparaginu a glukózy za teplot vyšších než 120 °C. Druhá část je věnována stanovení vitamínů, převážně rozpustných v tucích, a možností použití různých typů uhlíkových elektrod. Třetí část je věnována dalším možnostem využití uhlíkových elektrod v analýze potravin, jmenovitě stanovení kvercetinů a glycinu a zhodnocení oxidační stability jedlých olejů pomocí modifikované uhlíkové pastové elektrody.

1 Elektrochemické metody v analýze potravin

Elektrochemické či elektroanalytické metody jsou založeny na reakcích mezi elektrickými veličinami, jako je proud, potenciál či náboj, se stanovovanou látkou, analytem, přičemž výsledná odezva měření je úměrná koncentraci dané látky. Tyto reakce nejčastěji probíhají v roztoku na styku analytu s měrnou elektrodou. Všeobecnou výhodou elektrochemických měření v analytické praxi je jejich instrumentální, časová i ekonomická nenáročnost v porovnání s ostatními analytickými instrumentálními metodami, dále rychlost jejich provedení, citlivost a reprodukovatelnost.

Základní elektroanalytické metody se dělí na metody elektrometrické, kde se měří elektrické vlastnosti roztoků, a na metody využívající oxidačně-redukčních dějů v roztocích, metody elektrochemické. Elektrometrické metody jsou konduktometrie, měřící vodivost roztoků, a dielektrimetrie, měřící relativní permitivitu roztoků. Metody založené na redoxních dějích se dále dělí podle toho, zda měrným článkem prochází proud. Pokud proud neprochází, jedná se o potenciometrické metody, kdy je měřeno rovnovážné napětí elektrochemického článku úměrné koncentraci analytu, přičemž analytem je látka, pro kterou je selektivní použita pracovní elektroda. Při průchodu proudem elektrochemickým článkem jsou metody dále děleny dle vlivu elektrolýzy na obsah analytu. Pokud je analyt kvantitativně přeměněn, jedná se o coulometrii, kdy je měřen prošlý náboj, a elektrogravimetrii. Pokud se obsah analytu vlivem elektrolytických reakcí nemění, jedná se o ampérometrii, voltametrii a polarografii. Při ampérometrii je měřen procházející proud při konstantním napětí pracovní elektrody. Při voltametrii a polarografii je měřena závislost proudu na měnícím se potenciálu pracovní elektrody. Polarografie je voltametrie, kdy jako pracovní elektroda je použita rtuťová kapková elektroda s obnovovaným povrchem [1].

1.1 Voltametrie

Při voltametrických měřeních je zaznamenávána časová závislost proudu I protékajícího pracovní elektrodou na potenciálu E vkládaném na tuto elektrodu. V závislosti na časovém průběhu vkládaného potenciálu je rozlišováno několik voltametrických technik: cyklická voltametrie (CV), square-wave voltametrie (SWV), diferenční a diferenčně pulzní voltametrie (DV a DPV), atd. Časový průběh změny potenciálu, který je v průběhu experimentu

neměnný, je nazýván rychlost skenu (*scan rate* (*sr*)), a je dán vztahem (1), přičemž jednotkou je $V \cdot s^{-1}$. Vzhledem k lineárnímu průběhu této časové závislosti mohou být výsledné grafy, voltamogramy, záznamem jak proudu na potenciálu, tak proudu na čase, nicméně standardně jsou uváděny závislosti I na E .

$$v = \frac{dE}{dt} \quad (1)$$

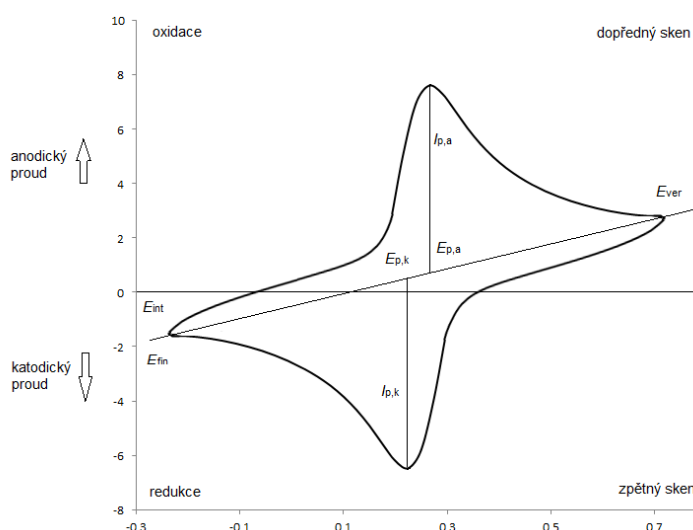
Při voltametrických technikách měření je většinou pracováno s tříelektrodovým uspořádáním, které se skládá z elektrody pracovní, pomocné a referentní. Jako referentní elektrody jsou nejčastěji využívány elektrody chloridostříbrné nebo kalomelové, elektrodou pomocnou bývá nejčastěji platinový drátek či plíšek. Pracovních elektrod používaných ve voltametrii je hned několik, od elektrod kovových (Pt, Au) po různé typy a modifikace elektrod uhlíkových. V průběhu měření prochází proud pouze mezi pracovní a pomocnou elektrodou, přičemž potenciál pracovní elektrody je měřen mezi pracovní a referentní elektrodou (jejíž potenciál je konstantní) bez průchodu proudu. Elektrochemické reakce probíhající na pomocné elektrodě (reakce složek základního elektrolytu, oxidace vody, apod.) se nesledují. Zdrojem napětí je potenciostat, který pomocí počítače udržuje stálou požadovanou hodnotu napětí vkládaného na pracovní elektrodu.

Voltametrii je možné použít pro analýzu vodných, nevodných a směsných roztoků, často bývá přidáván základní elektrolyt, který zvyšuje vodivost roztoku. Jako základní elektrolyt jsou využívány roztoky kyselin, zásad a solí, případně kvartérní amoniové báze. Pro každý typ pracovní elektrody připadá jiné potenciálové okno, tedy rozsah její použitelnosti, v závislosti na použitém rozpouštědle a základním elektrolytu. Ve vodných roztocích je elektrodový děj omezen reakcemi H^+ iontů. V katodické oblasti je limitním ukazatelem použitelnosti vylučování vodíku, v anodické vylučování kyslíku. V případě nepřítomnosti analytu v roztoku prochází pouze kapacitní (nabíjecí) proud, jehož voltametrický záznam je značným podílem šumu měření analytu. Oblast potenciálů, při nichž systémem za daných podmínek měření prochází pouze kapacitní proud, vymezuje potenciálové okno. Při voltametrických měřeních je tedy lineárně s časem měněn potenciál pracovní elektrody a v případě přítomnosti látky, která může být oxidována či redukována, dochází při vhodném potenciálu k reakci, depolarizaci elektrody, která se na voltamogramu projeví vznikem voltametrické vlny, tedy nárůstem proudu. Vrchol této vlny se nazývá limitní proud (I_{lim}), který je voltametrickým analytickým signálem. Hodnota I_{lim} je přímo úměrná koncentraci analytu (depolarizátoru) v analyzovaném roztoku. Elektrodou prochází I_{lim} tehdy,

je-li v okolí elektrody všechna reagující látka zoxidována či zredukována. Rychlost elektrodové reakce je tak vysoká a difúzní podmínky v roztoku takové, že již není možné k povrchu elektrody přivést další látku. Dalším ukazatelem je půlvlnný potenciál $E_{1/2}$, nebo potenciál píku E_p , který poskytuje kvalitativní informace charakteristické pro danou látku. V případě, že se analyty přítomné v roztoku dostatečně liší hodnotami svých potenciálů, lze je za vhodných podmínek stanovit vedle sebe [1].

1.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie patří mezi základní voltametrické techniky využívané pro charakteristiku oxidačně redukčních dějů v roztoku, proto bývá často prováděna jako první měření na počátku experimentu. Z CV voltamogramů (obrázek 1) lze usuzovat chování základního elektrolytu a analytu na dané pracovní elektrodě za daných podmínek a podle toho volit další postup optimalizace a měření pomocí citlivějších voltametrických technik. Principem CV je opakování tzv. dopředného (*forward*) a zpětného (*reverse*) skenu, kdy lineární zvyšování potenciálu vkládaného na elektrodu od počáteční hodnoty (*initial*, E_{int}) k potenciálu zlomovému (*vertex*, E_{ver}) je sken dopředný a opětovné snižování potenciálu k hodnotě konečné (*final*, E_{fin}) je sken zpětný. Potenciály E_{int} a E_{fin} jsou většinou shodné, dopředný a zpětný sken dávají dohromady jeden cyklus.



Obrázek 1: Vzorový záznam cyklické voltametrie. Příklad elektrochemického standardního systému $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$.

Napětí, vkládané v cyklické voltametii na pracovní elektrodu, má podle dE/dt tvar trojúhelníku. Z rozdílů potenciálů katodického a anodického píku lze usoudit, zda se jedná o reverzibilní či ireverzibilní elektrodový děj. Pro reverzibilní děj platí, že $E_{p,a} - E_{p,k} = 0,059/n$, $I_{p,a}/I_{p,k} = 1$, (n - počet vyměněných e^-) a potenciál píku je o $28,5/n$ mV negativnější u katodického a pozitivnější u anodického píku, než odpovídající $E_{1/2}$. V případě ireverzibilního děje závisí rozdíl potenciálů anodického a katodického píku na rychlosti polarizace, tedy na dE/dt (rychlost skenu). U dějů kontrolovaných difúzí pak také platí, že $(dE/dt)^{1/2} = I_p$. Pro elektrodové děje, které jsou řízeny adsorpcí, platí přímá úměra mezi rychlostí skenu a výškou píku [1].

1.1.2 Square-wave voltametrie

Metoda square-wave voltametrie patří mezi metody, kdy je potenciál vkládaný na elektrodu modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru o malé amplitudě a frekvenci. Měřena je potom závislost proudu na potenciálu, ovšem pouze po krátký časový úsek vždy na konci každého pulzu. Výsledný voltamogram má tvar píku (první derivace) a je záznamem rozdílů dvou po sobě změřených hodnot proudu na potenciálu. SWV je význačná malými hodnotami nabíjecího proudu, svou rychlostí a množstvím parametrů, které lze optimalizovat [1].

1.1.3 Diferenčně pulzní voltametrie

Pulzní voltametrické techniky jsou podobné SWV a navzájem se od sebe liší tvarem potenciálových pulzů vkládaných na pracovní elektrodu, přičemž proud je měřen pouze po určitou dobu. Pulzní techniky se také vyznačují lepším analytickým signálem, tedy nižším poměrem signálu k šumu (S/N), než techniky za konstantně se měnícího potenciálu. V normální pulzní voltametii (NPV) jsou vkládány napěťové pulzy o šířce několik desítek milisekund s postupně rostoucí amplitudou. Proud je zaznamenáván na konci každého pulzu po dobu řádově v milisekundách. V diferenčně pulzní voltametii je na potenciál lineárně se měnící s časem vkládán napěťový pulz o amplitudě 10 až 100 mV o délce několika milisekund. Zaznamenáván je rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci, výsledná závislost má tvar píku. Potenciál píku je závislý na kvalitě analytu, v případě reversibilních systémů je blízký hodnotě $E_{1/2}$. Výška píku je úměrná koncentraci analytu

v měřeném vzorku, ale je také závislá na amplitudě pulzu. S rostoucí amplitudou roste proud, nicméně dochází také k rozšiřování píku a tím k nežádoucímu ovlivnění selektivity stanovení, proto je v praxi třeba volit kompromis mezi citlivostí a selektivitou měření [1].

1.1.4 Stripping voltametrie

Český název pro stripping metody (*stripping voltammetry* – SV) je rozpouštěcí voltametrie. Jedná se o zvýšení koncentrace analytu na povrchu elektrody před vlastním měřením analytického signálu. Koncentrace analytu může být zvýšena několika způsoby. Prvním způsobem je předběžná elektrolýza, kdy je analyt na povrchu elektrody nakoncentrován za určitou dobu (v řádech minut) vlivem vložení konstantního potenciálu v oblasti limitního proudu (*deposition*, E_{dep}), obvykle v míchaném roztoku. Vlivem elektrolýzy dojde k reakcím mezi analytem a materiálem elektrody nebo složkou elektrolytu za vzniku sloučenin, které jsou zachyceny na povrchu elektrody a poté katodicky (*cathodic stripping voltammetry*, CSV) či anodicky (*anodic stripping voltammetry*, ASV) rozpuštěny zpět do roztoku. Vlastní měření poté probíhá v roztoku za stacionárního stavu od hodnoty E_{dep} , kdy rozpouštěcí pík je zaznamenáván v blízkosti půlvlnných potenciálů analytu. V praxi bývá častěji měřena výška píku než jeho plocha, a je přímo úměrná koncentraci. Další metodou je adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV). Jak již název napovídá, analyt je na povrchu elektrody nakoncentrován adsorpcí při určitém potenciálu, který může být roven nule, případně může být elektroda odpojena od obvodu. V případě, že je analyt elektrochemicky aktivní, je pak výška odpovídajícího píku úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Je-li analyt elektrochemicky neaktivní, dochází ke vzniku tzv. tenzametrického píku, který vzniká v důsledku desorpce analytu z povrchu elektrody po dosažení určitého potenciálu. Hodnota proudu píku je poté úměrná kapacitnímu proudu procházejícího elektrodou v důsledku změny kapacity elektrické dvojvrstvy. Lze se také setkat s pojmem extrakční rozpouštěcí voltametrie (ExSV), kdy dochází k extrakci analytu do elektrodového materiálu, nejčastěji uhlíkové pasty. K tomu však částečně dochází i v průběhu AdSV [1, 2].

2 Uhlíkové elektrody

Uhlíkové elektrody patří společně s elektrodami kovovými (Pt, Au, Cu, atd.) mezi elektrody s pevným povrchem. Nevýhodou těchto elektrod je možnost oxidace či redukce jejich povrchu či tvorba filmů na jejich povrchu díky adsorpci látek z roztoku elektrolytu či vznikajících při elektrodových reakcích. V důsledku toho může docházet k odlišnostem jednotlivých polarizačních křivek, k projevu tzv. historie elektrod, tedy k projevům předcházejících měření. Naadsorbované látky „zanášejí“ aktivní povrch elektrody a při opakovaných měřeních dochází ke snižování proudové odezvy i při konstantní koncentraci analytu. Uhlíkové elektrody jsou nicméně v porovnání s jinými tuhými elektrodami vůči oxidačním reakcím povrchu více odolné a vyznačují se nižším zbytkovým proudem. Pro správnou funkci elektrod je vhodné jejich povrch před měřením vhodně upravit, např. čištěním či aktivací povrchu pomocí CV v roztocích minerálních kyselin. Čistících metod je několik a jsou závislé na materiálu elektrody a charakteru elektrodových reakcí. Mechanické čištění zahrnuje leštění elektrodového povrchu vhodným brusným povrchem, pastové elektrody se upravují odstraněním malého množství pasty. Povrch pevných elektrod může být čištěn také chemicky či elektrochemicky, nebo upravován, kdy vznikají tzv. modifikované elektrody, které se zpravidla vyznačují vyšší citlivostí a selektivitou. Standardní uhlíkové elektrody používané pro běžná voltametrická a ampérometrická měření mají velikost pracovního povrchu v řádech mm. Lze se setkat také s elektrodami v řádech cm či dm, tzv. hydrodynamické elektrody. V posledních letech se výrazně rozvíjí použití tzv. mikroelektrod, které mají velikost pracovního povrchu v řádech μm či menší než $1 \mu\text{m}$ a vyžadují specifický látkový transport analytu k jejímu povrchu [1, 3].

2.1 Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (*carbon paste electrode* - CPE) byly vynalezeny v roce 1958 americkým elektroanalytikem Ralphem Normanem Adamsem. Původně se zajímal o vytvoření uhlíkové kapaliny, která by mohla nahradit v polarografii používanou toxickou rtuť. Tuto myšlenku se nicméně nepodařilo realizovat, a tak po zvýšení obsahu uhlíku v organickém pojivu vznikla uhlíková pasta, jak ji známe dnes. V následujících letech se postupně rozvíjelo používání CPE a jejich různých variací a modifikací. Uhlíkové pastové

elektrody jsou v základu vyrobeny ze spektrálního uhlíku a pastové kapaliny. Uhlíkový prášek zastupuje v případě CPE elektrodový materiál, přičemž pastové pojivo slouží ke spojení jednotlivých částic uhlíkového prášku a funguje jako elektrický izolátor. Základním typem uhlíkového prášku používaného pro přípravu elektrodových past je spektroskopický grafitový prášek, relativně nově je také často využíván skelný uhlíkový prášek (*glassy carbon*, GC) nebo jedno či vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky (*single-/multiwalled carbon nanotubes*, SWCNTs/MWCNTs). Pro přípravu CPE je nutné brát v potaz vlastnosti jednotlivých typů uhlíkových prášků, přičemž je potřeba zohlednit velikost jednotlivých částic uhlíku (jednotky či desítky mikrometrů a jednotnost velikosti částic), jejich adsorpční vlastnosti (adsorpce kyslíku), a v neposlední řadě také čistotu prášku (nežádoucí interference). Pastových pojiv je používáno několik druhů, přičemž je nutné, aby se jednalo o látku netěkavou, nerozpustnou ve vodě, chemicky stálou a nereaktivní. Nejčastěji se jedná o parafinový (Nujol[®]) či silikonový olej. Dalšími vhodnými pojivy mohou být alifatické i aromatické uhlovodíky, silikonový či parafinový vosk nebo vazelína. Jako pastových pojiv je možné také použít halogenovaných uhlovodíků, nicméně ty mohou být jednak toxické a jednak elektroaktivní, proto jsou používány pouze ve speciálních případech. V posledních letech jsou také jako pojivo zkoumány různé iontové kapaliny, které mohou být výhodné převážně pro výrobu biosenzorů. Výsledné vlastnosti uhlíkové pasty výrazně ovlivňuje poměr zastoupení jednotlivých složek. Poměr zastoupení uhlíkového prášku ku obsahu pastového pojiva bývá v rozmezí 1,0 g C:0,4 – 1,0 mL pojiva. Cílem je, aby výsledná pasta měla správnou konzistenci, aby nebyla příliš řídká, ani tuhá. Obsah pastového pojiva ovlivňuje hodnotu ohmického odporu (R) a tím tedy vodivost elektrody, což se odrazí také v hodnotách proudu pozadí. Obecně lze říci, že čím více pojiva, tím vyšší je kapacitní proud. Vlastní příprava základní uhlíkové pasty spočívá v precizní homogenizaci uhlíkového prášku s vhodným pastovým pojivem, které je nemísitelné s vodou. Homogenizace se nejčastěji provádí ručně v laboratoři v třecí misce s tloučkem. Přestože již hotové uhlíkové pasty jsou komerčně dostupné, častěji si je každý elektrochemik vyrábí sám, a to převážně z toho důvodu, že si může experimentálně upravit požadované složení i výslednou konzistenci pasty, velkou výhodou je také znalost přesného složení. Výsledná pasta je poté vpravena do těla elektrody. V našich laboratořích je pro přípravu CPE používáno teflonové pouzdro elektrody opatřené závitovým vodivým pístem. Všechny potřebné pomůcky pro přípravu CPE jsou uvedeny na obrázku 2. Hotová pasta může být také uchovávána v zásobníku, kde se její životnost pohybuje v řádech týdnů až měsíců, časem však dochází k vysychání pasty a jejímu sypání [1, 3-10].



Obrázek 2: Pomůcky pro zhotovení uhlíkové pastové elektrody.

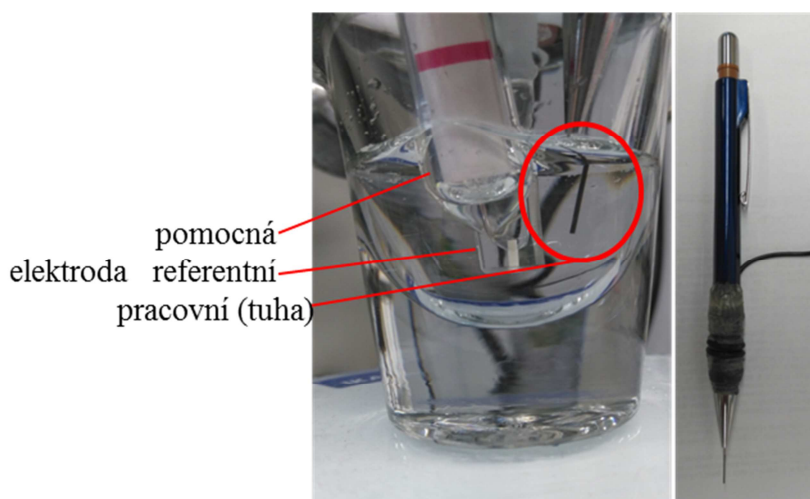
2.2 Skelné uhlíkové elektrody

Skelný uhlík je méně pórovitá forma uhlíku vyrobená pyrolýzou uhlovodíků. Vzhledem k nízké pórovitosti není potřeba pro přípravu skelných elektrod používat pastových kapalin. Tento typ elektrod lze mechanickým leštěním vyleštit do zrcadlového lesku a tak docílit dobře definovaného pracovního povrchu elektrody. V elektrochemii jsou také využívány pastové elektrody ze skelného uhlíkového prášku (GCPE). Tyto pastové elektrody se vyznačují použitelností ve vodně-organických rozpouštědlech do obsahu organické složky až 80 %. Jednotlivé částice skelného uhlíkového prášku mají na rozdíl od spektrografického uhlíku (šupinky) tvar kuliček. S tvarem uhlíkových částic úzce souvisí kompozice uhlíkové pasty, tedy prostorové uspořádání jednotlivých částic uhlíku a obsah pastového pojiva, který má vliv na elektrickou vodivost a stabilitu uhlíkových past [3, 6, 8, 11-14]. Obecně lze říci, že standardní CPE ze spektrografického uhlíku jsou lépe vodivé než GCPE. To je způsobeno lepším kontaktem mezi šupinkami spektrálního uhlíku než mezi kuličkami skelného uhlíkového prášku.

2.3 Pentilkové uhlíkové elektrody

Pentilkové uhlíkové elektrody (*pencil graphite electrode* – PGE) jsou založeny na využití obyčejné tuhy do pentilkových tužek. Tuhy jsou složeny z grafitu (elektrodový materiál) a jílu, který funguje jednak jako pojivo, obsahuje však také kovové ionty, které

zlepšují vodivost tuh. Kontakt mezi tuhou (elektrodovým materiálem) a měřícím zařízením (potenciostatem) je zprostředkován pomocí vodivého drátu, který spojuje kovovou část špičky pentilkové tužky, v níž se nachází tuha ponořená do měřeného roztoku, a samotným kontaktem měřícího zařízení (obrázek 3). V průběhu měření je potřeba dbát na to, aby v kontaktu s měřeným roztokem byla pouze grafitová tuha (10 mm), ne i kovová špička tužky. Tento typ elektrod byl využit pro stanovení několika látek [15-18]. Experimentálně bylo zjištěno, že ne všechny komerčně dostupné tuhy jsou vhodné pro elektrochemická měření. Z praktických zkušeností z laboratoře se jako nejlepší pro toto použití jeví tuhy od firmy KOH-I-NOOR HARDTMUTH a.s. (České Budějovice, Česká republika), které vykazují dostatečnou vodivost materiálu. Naopak např. tuhy firmy Q-CONNECT (Gent, Belgie) jsou pro toto využití naprosto nevhodné, neboť nejsou vodivé.



Obrázek 3: Ukázka měření s PGE a její zapojení.

2.4 Modifikované uhlíkové pastové elektrody

Standardní CPE mají velkou výhodu jednoduché modifikace. Pasty mohou být modifikovány buď přímo přimícháním další komponenty při její výrobě, případně lze modifikovat povrch již hotové CPE. Modifikované pastové elektrody se dělí na elektrody modifikované chemicky, biologicky či fyzikálně. Chemicky modifikovanými elektrodami se rozumí CPE obsahující navíc chemickou látku ať už v celém objemu či pouze na povrchu. Patří sem například elektrody filmové mající na povrchu například bizmutový nebo rtuťový

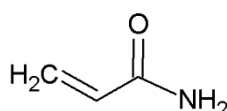
film. Do této skupiny mohou být řazeny také ty elektrody, kde je při výrobě pasty použito jiné pastové pojivo, než je běžné. Lze použít také elektrochemicky aktivní pastovací kapaliny. Biologicky modifikované elektrody jsou nazývány biosenzory. Jedná se o CPE obsahující biologickou komponentu, kterou můžou být např. enzymy, mikroorganismy, protilátky, DNA, části rostlin i živočichů, atd. Fyzikálně modifikovanými elektrodami se rozumí takové, které jsou před vlastním měřením upraveny pomocí například ultrazvuku, změny teploty, vystavení magnetickému poli, apod. [3].

2.4.1 Adamsovy elektrody

Elektrody obsahující látky zabraňující rozpuštění pastového pojiva a následný rozpad CPE působením organických rozpouštědel, tzv. tenzidy, jsou nazývány podle svého strůjce jako elektrody Adamsovy. Tento druh elektrod byl poprvé testován v roce 1965 [19]. Vyznačují se velice nízkými hodnotami proudového pozadí v organických elektrolytech v porovnání s např. elektrodou platinovou. Tenzidy, nebo též surfaktanty, jsou bipolární chemické látky obsahující ve své molekule dvě části – hydrofilní a hydrofobní. Podle iontového charakteru hydrofilní skupiny se tenzidy dělí na ionogenní a neionogenní. Ionogenní tenzidy se dále dělí na kationické, anionické či amfolytické, které se chovají jako anionické či kationické v závislosti na pH prostředí. V praxi je jako tenzidů pro modifikaci CPE využíváno několik látek, např. anionický dodecylsírán sodný (SDS), kationický hexadecylpyridinium chlorid (CPC), neionogenní Triton X-100[®], Triton[®], Tween[®], atd. Elektrody mohou být tenzidy modifikovány přimícháním látky do uhlíkové pasty případně ponořením nemodifikované CPE do roztoku tenzidu (stripping), lze také provést analýzu v přítomnosti tenzidu v měrném elektrolytu. Standardní složení Adamsovy elektrody je uhlík:pastové pojivo:tenzid v poměru 50:20:30 % [3, 20-23].

3 Elektrochemické stanovení akrylamidu

Akrylamid (AA) ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$, obrázek 4) je průmyslově produkovaná látka používaná především k syntéze polyakrylamidu. Polyakrylamidové polymery a kopolymery jsou využívány v mnoha odvětvích, v kosmetickém, papírenském nebo textilním průmyslu, při čištění odpadní i pitné vody, nebo také v laboratořích pro přípravu polyakrylamidového gelu pro elektroforetickou separaci proteinů nebo jako selektivní modifikátor strukturních a funkčních proteinů [24]. Synonymy pro akrylamid jsou amid kyseliny akrylové, ethylenkarboxamid, 2-propenamid, amid kyseliny propenové nebo vinylamid [25].



Obrázek 4: Chemická struktura akrylamidu.

3.1 Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti akrylamidu

Akrylamid je bezbarvá krystalická látka bez zápachu s bodem tání $84,5\text{ }^\circ\text{C}$, vzniká hydratací akrylonitrilu. Jedná se o neutrální, vysoce polární látku. Je dobře rozpustný ve vodě (2120 g/L), dále v acetonu a etanolu [24, 26, 27]. Akrylamid má dvě reaktivní místa – konjugovanou dvojnou vazbu a amidovou skupinu. Vzhledem k tomu, že AA je α,β -nenasycený amid, je dobrým Michaelovým akceptorem různých nukleofilů. S tímto úzce souvisí vysoká reaktivita AA s thioley, které jsou dobrým donorem nukleofilů. Reaktivita AA s SH skupinami je $100 - 300\text{ x}$ vyšší, než reaktivita s amino skupinami [24, 28]. AA je ve vodných roztocích rozkládán při teplotách vyšších než $180\text{ }^\circ\text{C}$, přičemž míra rozkladu je úměrná době zahřívání. Bylo nicméně zjištěno, že AA se rozkládá už i při teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$, tedy že při skladování roztoku AA dochází ke snižování koncentrace, nicméně ne nijak významně. K degradaci AA ve vodných roztocích dochází pravděpodobně v důsledku polymerace. Na rozklad AA ve vodných roztocích má také vliv pH roztoku, přičemž míra rozkladu AA je úměrná zvyšujícímu se pH, závisí také na typu použitého pufru. Přesný mechanismus degradace, stejně jako vzniku AA v potravinách, nebyl dosud řádně objasněn [28]. Dle Globálně harmonizovaného systému (*Globally Harmonized System*, GHS) klasifikace a označování chemických látek je řazen do skupiny 6 (látky toxické) a 8 (látky nebezpečné pro zdraví) [29]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research of Cancer*, IARC) klasifikuje AA do třídy 2A, tedy jako látku „pravděpodobně karcinogenní pro člověka“ [26, 30]. Polymery a kopolymery akrylamidu jsou používány v zemědělství jako pomocné látky pro snížení eroze půdy, k čištění odpadních vod

jako flokulanty, mohou také být součástí hnojiv. Polyakrylamid může být rozkládán na monomer akrylamidu, který má vysokou mobilitu v půdě a podzemních vodách, nicméně je biodegradovatelný na CO₂ a NH₃. Na degradaci polymeru AA nemá vliv pH, nicméně podmínky venkovního prostředí jako je teplo a světlo jeho rozklad urychlují [24, 27]. Polyakrylamid po zesítnění obsahuje zbytkové množství 0,05–5,0 % volného akrylamidu. V důsledku těchto použití se volný AA vyskytuje v malém množství v půdě. Přestože je AA přítomný v půdě vstřebáván do rostlin, jeho obsah je z velké části odbourán již po 18 hodinách [24, 27]. Monomer AA se však v průběhu pěstování nedostává do plodin [31]. Některé mikroorganismy mají schopnost produkovat enzymy, které katalyzují buď syntézu, nebo rozklad akrylamidu. Mezi tyto mikroorganismy patří například *Rhodococcus rhodochorus* produkující nitril hydratázu, glutamin syntetázu a dehydrogenázu. Bakterie rodu *Nocardia* produkují nitrilhydratázu, která se využívá v průmyslové výrobě akrylamidu. Amidázy schopné degradovat AA byly izolovány z bakterie *Klebsiella pneumoniae* nebo *Brevibacterium* sp. [24, 32]. Bakterie *Pseudomonas stutzeri* je schopna metabolizovat AA za anaerobních podmínek, následně mohou denitrifikační bakterie využívat vzniklou kyselinu akrylovou a amoniak jako zdroj uhlíku a dusíku [33].

3.2 Toxicita

První zmínky o otravách člověka akrylamidem jsou známy z roku 1967. Akrylamid je neurotoxický, způsobuje poruchy nervového systému, periferní neuropatie. Hlavními příznaky intoxikace AA je necitlivost nebo slabost v končetinách, třes, ztráta rovnováhy, nestabilita, dále také nadměrné pocení, olupování kůže, ospalost, může docházet k úbytku na váze a poruchám řeči. AA vykazuje toxicitu při dermálním, orálním i parenterálním podání [34, 35]. Reprodukční toxicita byla pozorována pouze u mužů [36], příjem akrylamidu v těhotenství však nepříznivě ovlivňuje růst plodu [37]. Mechanismus neurotoxického působení AA v organismu není dosud plně objasněn, nicméně existuje několik hypotéz. Podle jedné teorie AA inhibuje produkci kinesinu a tím zpomaluje rychlý transport funkčních částí buněk. Další hypotéza se zabývá přímou inhibicí neurotransmise, nebo také změnou hladiny neurotransmiterů [38]. AA je schopen vázat se na thiolové skupiny proteinů a potlačovat tak uvolňování neurotransmiterů. Má negativní účinky na metabolismus dopaminu, který slouží v organismu k přenosu nervových vzruchů a má vliv také na motoriku, jejíž porucha je jedním z hlavních příznaků intoxikace AA [39]. K indikaci AA v organismu je využíváno také jeho

hlavního metabolitu – glycidamidu (GA). Glycidamid vzniká z AA reakcí s cytochromem P450 a dále reaguje s DNA za vzniku aduktů, které jsou pravděpodobně hlavní příčinou mutagenních a karcinogenních vlastností AA [40, 41]. Příjem doplňků stravy s obsahem vitamínů skupiny B může snižovat neurotoxicitu akrylamidu [42].

3.3 Výskyt a použití akrylamidu

Akrylamid je hojně používán pro tvorbu polyakrylamidových gelů sloužících k separaci proteinů a jiných biomolekul. Monomeru akrylamidu je v gelu přítomné takové množství, že může docházet k alkylaci SH skupin např. cysteinu, nebo NH₂ skupin lysinu při elektroforéze. Akrylamid je schopen reagovat také se složkami pufru použitým při separaci proteinů, čímž dochází ke snížení pH pufru, změně izoelektrického bodu a elektroforetické mobility proteinů [24]. Polyakrylamid je využíván také v kosmetickém průmyslu, do některých přípravků je přidáván v koncentracích 0,05–2,8 %. Studie prokázaly, že přestože se v jinak netoxickém polyakrylamidu nachází také volný akrylamid, v množství, ve kterém se vyskytuje v kosmetických přípravcích, tedy do 0,1 %, nevyvolává neurotoxicitu. I přes toto zjištění je ovšem doporučováno, aby obsah akrylamidu v kosmetických přípravcích nepřesahoval hodnotu 5 ppm [36].

V roce 2000 byl švédskými vědci zaznamenán vysoký obsah aduktů akrylamidu na hemoglobin u nekuřáků, kteří nebyli vystaveni intoxikaci akrylamidem, což vedlo k zaměření se na analýzu obsahu akrylamidu v potravinách [43], jehož přítomnost se zde o dva roky později potvrdila [44]. Hlavním zdrojem AA v potravinách jsou Maillardovy reakce. V Maillardově reakci, která zapříčiňuje hnědnutí potravin při tepelné úpravě, vzniká akrylamid jako vedlejší meziprodukt. Dochází k reakci mezi aminokyselinami a cukry přítomnými v potravinách, které mohou být společně s časnými produkty Maillardovy reakce, N-glykosidy, zdrojem AA. Nejvýznamnější aminokyselinou pro tvorbu AA je asparagin, nicméně může vznikat také z metioninu, cysteinu, glutaminu. Z cukrů se v této reakci uplatňuje hlavně glukóza, ale také fruktóza, galaktóza, laktóza nebo sacharóza. Vznik akrylamidu podporuje vodné prostředí, kdy ho vzniká až trojnásobné množství. Mechanismů vzniku AA v potravinách je navržených několik, bylo však prokázáno, že AA vzniká převážně z postranního amidového řetězce asparaginu. Po tepelné úpravě pokrmů vznikají meziprodukty Maillardovy reakce, N-glykosidy, u kterých může docházet k dekarboxylaci a heterolytickému štěpení vazby N-C, a tak ke vzniku akrylamidu. Přestože dekarboxylace by

měla za vyšších teplot probíhat přednostně, zdá se, že u N-glykosidické vazby dochází snadněji k deaminaci. N-glykosidy jsou ve vodném kyselém nebo neutrálním prostředí nestabilní a rychle hydrolyzují na redukující cukr a aminokyselinu. V procesu přípravy potravin za vysoké teploty, kdy dochází ke ztrátě vody, může tedy docházet k tvorbě AA z těchto Maillardových meziproductů [45, 46]. Další navržený mechanismus vzniku AA zahrnuje v prvním kroku tvorbu Schiffovy báze z karbonylové skupiny cukru a amino skupiny asparaginu. Schiffova báze za vyšších teplot podléhá dekarboxylaci, vzniká meziproduct, který může reagovat dvojím způsobem. Buď může docházet k hydrolyzaci tohoto meziproductu za vzniku 3-aminopropionamidu, ze kterého dále odstraněním amoniaku zahřátím vzniká akrylamid, nebo je dekarboxylovaný meziproduct Schiffovy báze přímo rozložen a po odštěpení iminu vzniká AA [47].

Tabulka 1: Porovnávací hodnoty obsahu akrylamidu ve vybraných kategoriích potravin [50].

Potravina	Porovnávací hodnota [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
Hranolky ke přímé spotřebě	500
Bramborové lupínky z čerstvých brambor a z bramborového těsta, bramborové kreky, jiné bramborové výrobky z bramborového těsta	750
Měkký chléb	
a) pšeničný	50
b) měkký chléb, jiný než pšeničný	100
Snídaňové cereálie (kromě obilné kaše)	
a) Výrobky z otrub a celozrnné cereálie, zrna pufrovaná v pufrovacím dělu	300
b) Pšeničné a žitné výrobky ⁽¹⁾	300
c) Výrobky z kukuřice, ovsa, pšenice špaldy, ječmene a rýže	150
Sušenky a oplatky	350
Krekry s výjimkou bramborových krekrů	400
Křupavý chléb	350
Perník	800
Výrobky podobné ostatním výrobkům této kategorie	300
Pražená káva	400
Instantní (rozpustná) káva	850
Náhražky kávy	
a) Náhražky kávy výhradně z obilovin	500 ⁽²⁾
b) Náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky	
c) Náhražky kávy výhradně z čekanky	4000
Potraviny pro malé děti, obilné příkrmy pro kojence a malé děti, kromě sušenek a sucharů	40
Sušenky a suchary pro kojence a malé děti ⁽³⁾	150

(1) Jiné než celozrnné cereálie a/nebo jiné než otrubové cereálie. Obilovina přítomná v největším množství určuje kategorii. (2) Porovnávací hodnota, která se použije na náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky, zohledňuje relativní podíl těchto složek v konečném výrobku.

(3) Podle definice v nařízení (EU) č. 609/2013.

Nejvyšší obsah AA byl nalezen ve smažených bramborových lupíncích a všeobecně výrobcích z brambor. Ve vařených pokrmech nebyl akrylamid nalezen, protože při vaření se nedosahuje teplot vyšších než 100 °C, kdežto u smažení, pečení nebo grilování teplota přesahuje 120 °C, tedy teplotu, při které AA vzniká. Akrylamid se do potravin může dostávat také z obalového materiálu, při jehož výrobě se akrylamid používá [48]. V roce 2011 bylo vydáno Doporučení Evropské komise o zkoumání množství akrylamidu v potravinách na základě údajů získaných z průzkumu v členských státech v letech 2007 – 2009. Jednalo se o výzkum, zda a jak se výrobci snaží minimalizovat obsah akrylamidu v rizikových potravinách. Výsledkem byly směrné hodnoty pro jednotlivé kategorie [49]. Od dubna roku 2018 vzešlo v platnost nové nařízení Evropské Unie (Nařízení komise (EU) 2017/2158) stanovující opatření pro zmírnění obsahu AA v rizikových potravinách a také porovnávací hodnoty, jež jsou maximálními hodnotami AA, které by měly dané potraviny obsahovat. Porovnávací hodnoty pro jednotlivé kategorie potravin jsou uvedeny v tabulce 1 [50].

3.4 Metody stanovení akrylamidu

Akrylamid lze stanovit mnoha metodami. Byla vyvinuta spolehlivá metoda analýzy AA pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS), případně plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS/MS), dále kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) [48, 51]. Akrylamid lze stanovit také infračervenou spektroskopií (IR), kapilární elektroforézou (CE), imunoenzymatickým testem ELISA nebo elektrochemicky. Akrylamid nelze ve vzorcích stanovovat pomocí UV spektrofotometrie, protože v jeho molekule nejsou dostatečně silné dvojně ani trojně konjugované vazby ani aromatický kruh [52]. Základní postup úpravy vzorku ke stanovení akrylamidu v reálných vzorcích zahrnuje přidavek vnitřního standardu, extrakci vodou, následné přečištění extraktu na pevné fázi a následnou analýzu, nejčastěji pomocí GC-MS po bromaci nebo přímo LC-MS/MS. V případě IR, CE, ELISA nebo elektrochemických metod není obecně třeba složitá příprava vzorku.

Plynová chromatografie (GC)

Metoda GC se pro stanovení akrylamidu používá převážně ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). V případě použití této techniky je vhodné použít derivatizačního kroku, lze ji také provést bez něj [51]. V případě nevyužití derivatizace při stanovení AA metodou

GC-MS je kladen velký důraz na extrakci vzorku. Jako extrakční rozpouštědlo může být použita voda nebo směsi vody a organických rozpouštědel (např. methanol, n-propanol, 2-butanon). Výtěžnost extrakce se pohybuje od 68 do 75 %. K extrakci AA ze vzorků např. bramborových lupínků může být použita také Soxhletova extrakce s „předextrakcí“ pro uvolnění veškerého analytu ze vzorku. Tento způsob extrakce je sice velice účinný, ale také zdoluhavý, navíc není známo, zda v průběhu Soxhletovy extrakce nedochází k dalšímu vzniku AA a tím k falešně pozitivním výsledkům. Hlavní nevýhodou separace nederivatizovaného AA je nedostatek charakteristických iontů v hmotnostním spektru látek. Kvantifikace AA se provádí přidáním různých vnitřních standardů, propionamidu nebo izotopicky značeného akrylamidu. Při stanovení akrylamidu v reálných vzorcích potravin je nutné brát v potaz vliv matrice vzorku. Vzorky jako např. rajčata nebo houby nevyžadují další kroky navíc před vlastní derivatizací extraktu. Naproti tomu u vzorků, obsahující velké množství bílkovin nebo sacharidů, jako jsou např. maso, bramborové lupínky nebo chléb, je nutné použít dalších čistících kroků, např. filtraci surového extraktu vrstvou grafitu (extrakce tuhou fází, SPE) [51].

V případě použití spojení GC-MS lze využít několikero způsobů derivatizace, a to silylace, bromace, derivatizace za použití xanthidolu, nebo nově derivatizace s anhydridem kyseliny trifluoroctové [53-56]. Separace analytu probíhá zpravidla na standardní kapilární koloně se střední až vysokou polaritou. Původní metoda použití GC-MS pro stanovení AA využívala bromace s přídatkem methakrylamidu jako vnitřního standardu ke vzorku, produktem derivatizace byl 2,3-dibrom-2-methylpropionamid. V pozdější inovaci této původní metody byl methakrylamid derivatizován samostatně a byl přidán k extraktu analytu až před vlastní analýzou. Kvantifikace vzorku je prováděna metodou standardního přídatku. Metoda GC-MS s bromací je používána jako referenční pro stanovení obsahu AA v obalových materiálech [48, 51].

Kapalinová chromatografie (LC)

Pro stanovení akrylamidu se LC využívá ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Při této metodě stanovení AA není potřeba využívat derivatizačního kroku, jedná se o přímou analýzu [48]. Extrakce AA ze vzorku pro LC se provádí vodou při pokojové teplotě. Zahřívání směsi vzorku s vodou nebo její ultrazvukování se nedoporučuje, mohly by vznikat mikroskopické částice vzorku, které by v následujícím čistícím kroku ucply póry pevného filtru. K extrakci je nicméně možné použít vodu předem vytemperovanou na teplotu 80 °C. Někdy je k extrakci používána také směs vody a polárních

organických rozpouštědel, např. směs vody s acetonem. V laboratořích provádějících analýzy obsahu AA v potravinách se využívá k extrakci několik způsobů mechanické homogenizace vzorku – třepání na vodorovné, rotační nebo vířivé třepače, míchání v mixéru nebo na vortexu. Při přípravě vzorku může být také využit odmašťovací krok, tedy extrakce tukových látek hexanem, toluenem nebo cyklohexanem, nicméně při použití odmaštění nebyly pozorovány žádné významné rozdíly ve výsledcích analýz v porovnání s extrakcí analytu pouze vodou. Po samotné extrakci je vodná fáze odstředěna a extrakt je přečištěn filtrací. V případě, že se laboratoř chce vyhnout přečištění extraktu filtrací, lze extrakci provádět směsí acetonitrilu a vody s přidavkem Carrezových čiřících činidel.

Metoda LC-MS/MS lze použít pro současné stanovení akrylamidu a jeho prekurzorů, aminokyseliny asparaginu a cukrů glukózy, fruktózy a sacharózy. Přestože při tomto stanovení je potřeba provedení dvojího nástřiku vzorku na kolonu, vzhledem k jinému režimu elektrosprejového ionizátoru pro asparagin v porovnání s ostatními analyty, je celková doba analýzy pouhých 30 minut [57, 58]. Metodou LC-MS/MS lze také stanovit současně AA a jeho metabolit glycidamid vedle sebe [40]. Pro zlepšení citlivosti, přesnosti a specifity lze pro toto stanovení využít derivatizace GA s např. kyselinou 2-merkaptobenzoovou, p-nitrobenzylpyridinem, glutationem, nicméně zde je nutná dlouhá reakční doba [59]. LC lze použít také k dvoustupňové kvantifikaci AA ve vzorcích, kdy jsou na reverzních fázích odděleny analyty (AA a kyselina akrylová) a kvantifikace probíhá pomocí pulzní amperometrické detekce (LC-ED). Při použití LC-ED není potřeba žádné speciální úpravy vzorku, k extrakci je používána voda a Carrezovy čiřící roztoky s následným SPE zakoncentrováním extraktu [60].

Infračervená spektroskopie (IR)

Pro stanovení akrylamidu v reálných vzorcích je využíváno metody ATR-IRMS (*Attenuated Total Reflection Infrared Microspectroscopy* – Infračervená mikrospektroskopie se zeslabeným úplným odrazem) nebo IR spektroskopie v blízké (NIR) a střední (MIR) oblasti. IR metody v porovnání s chromatografickými metodami nevyžadují téměř žádnou úpravu vzorku. V případě použití ATR-IRMS je akrylamid ze vzorků extrahován vodou. U získaných extraktů není nutné použití dalších extrakčních ani čistících kroků. Vodný extrakt se odpaří do sucha, resuspenduje ve vodě a po napipetování do mikrotitrační destičky opět odpaří do sucha. V této destičce je poté provedeno měření [61]. Při použití metody MIR nebo NIR je vzorek slisován do tablety, aby byl odstraněn přebytek tuků přítomných

ve vzorku. Tuhy v infračervené oblasti absorbují záření a ruší stanovení a identifikaci výsledných spekter [62].

Kapilární elektroforéza (CE)

CE je relativně novou a stále se vyvíjející metodou pro stanovení AA v potravinách. Jedná se o rychlou univerzální techniku s vysokou citlivostí a rozlišovací schopností. Principem je separace složek vzorku v křemenné kapiláře naplněné pufrovacím roztokem o definovaném pH na základě jejich distribuce mezi vodnou a pseudostacionární fázi, micelami. Rozpuštěné látky s nábojem v elektrolytu migrují k elektrodám různou rychlostí v závislosti na vloženém napětí. Detektory používanými v elektroforetické kvantitativní analýze AA jsou obvykle UV spektrofotometry s diodovým polem (DAD) vyznačující se nízkým detekčním limitem. Tohoto spojení lze využít pro stanovení stopového množství AA v komplexních matricích vzorků. Účinnost CE je srovnatelná s HPLC. Další variantou je kapilární zónová elektroforéza (*capillary zone electrophoresis*, CZE), nicméně zde je nutné použití derivatizace AA, nejlépe s 2-merkaptobenzoovou kyselinou. Touto metodou jsou látky děleny na základě rozdílných poměrů náboje ku hmotnosti. Detektory u CZE jsou UV/VIS nebo MS/MS. Použití tandemové hmotnostní detekce zajišťuje vysokou citlivost a selektivitu, podobně jako LC-MS/MS [52, 63]. Novinkou v elektroforetických stanoveních AA je kapilární elektroforéza v nevodné fázi (*nonaqueous capillary electrophoresis*, NACE) s UV detekcí. U této metody není vzorek v kapiláře ve vodném prostředí, ale kapilára je plněna organickým rozpouštědlem (např. acetonitrilem). Akrylamid ve vodném prostředí je polární, ovšem nenesení žádný náboj, kdežto v prostředí s nízkým pH je schopen vázat protony, tím získat elektrický náboj a schopnost elektroforetické mobility. NACE je oproti CZE citlivější, s nízkou mezí detekce ($4,4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) [52].

Imunologické metody

Metoda stanovení AA v potravinových vzorcích ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) je založena na specifické reakci mezi antigenem a značenou protilátkou, která je vysoce selektivní pouze k danému antigenu. Protilátky jsou globulární proteiny, imunoglobuliny, syntetizované imunitním systémem v reakci na vznik a přítomnost antigenů. Imunologické testy se vyznačují svou vysokou specifitou a selektivitou a umožňují detekovat i stopová množství látek. Organické látky jsou před analýzou nasorbovány na proteiny, které vyvolávají tvorbu specifických protilátek. Tyto protilátky mohou reagovat pouze s daným antigenem a tak lze kvantifikovat danou látku. Kvantifikace je pak možná z rozdílu zbytkové

nevázané protilátky, která je buď spojena s enzymem, nebo pochází od jiného živočišného druhu, nebo je značená chemicky, např. biotinem. Aktivita enzymu je obvykle stanovena měřením absorbance po navázání na substrát za vzniku barevné reakce. Pro stanovení AA jsou používány polyklonální protilátky. Samotný AA nemá schopnost vyvolávat tvorbu protilátek, proto je potřeba jej spojit s imunostimulačním proteinem. Pro jejich spojení je využívána derivatizace AA s 3-merkaptobezoovou kyselinou, kdy dojde ke vzniku derivátu schopného navázání s proteinem, např. lidským sérovým albuminem. Kvantifikace AA se poté provádí měřením absorbance komplexu derivátu AA s lidským sérovým albuminem a specifické protilátky značené křenovou peroxidázou při vlnové délce 450 nm. Pro stanovení AA metodou ELISA lze také použít systém avidin-biotin s N-akryloxysukcinimidem a hovězím sérovým albuminem, kdy je dosaženo vyšší citlivosti stanovení, nebo k derivatizaci AA použít kyselinu 4-merkaptofenolovou [52, 64-66]. Výhodou imunoenzymatických testů jsou dostatečná přesnost, vysoká citlivost, nízké náklady, krátká doba analýzy a její jednoduchost a pro její provedení není potřeba speciálně vyškoleného personálu ani drahého vybavení [52].

3.4.1 Elektrochemické metody stanovení akrylamidu

Jediná přímá elektrochemická metoda stanovení akrylamidu je polarografická redukce na rtuťové elektrodě, ostatní jsou metody nepřímé využívající převážně voltametrii s různými typy pracovních elektrod. Srovnání různých elektroanalytických metod pro stanovení AA je uvedeno v tabulce 2. V následujících odstavcích jsou uvedeny elektroanalytické metody stanovení AA popsané v literatuře a také ty, jež byly provedeny v laboratoři v rámci doktorského studia [67].

Polarografická metoda stanovení AA

Jak je známo, v polarografii je využíváno rtuťové kapkové elektrody jako měrné. Metoda byla použita pro stanovení AA ve vodném, organickém i vodně-organickém prostředí, přičemž $E_{1/2}$ AA se odvíjí od typu prostředí. Přímá polarografie v prostředí alkalického směsného elektrolytu methanol:voda (80:20) s 0,091 M hydroxidem tetrabutylamonným (TBAOH) poskytuje redukční signál AA při -1,970 V oproti standardní kalomelové elektrodě (SKE) [68]. Inovací této metody je diferenčně pulzní polarografie (DPP), kde v prostředí methanolického roztoku TBAOH poskytuje AA odezvu v oblasti

$E_{1/2}$ -2,000 V vs. SKE [69]. Tyto dvě metody nejsou vhodné pro stanovení AA v čistě vodném prostředí, projevuje se také značná interference alkalických kovů. Ve studii Niaz et al. (2008) byly testovány různé elektrolyty metodou DPP.

Tabulka 2: Srovnání elektroanalytických metod stanovení AA.

Metoda	Typ pracovní elektrody	Elektrolyt	LOD	Literatura
DC polarografie	DME	0,091 M TBAOH	0,0005 – 0,001 % AA	[68]
DPP	DME	0,1 M TBAOH	$<1,4 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	[69]
DPP	DME	0,5 M LiCl	$3,8 \cdot 10^{-7}$ mol.L ⁻¹	[70]
potenciometrie	NH ⁴⁺ ISE/ glutaraldehyd/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H ₂ O	$4,48 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	[71]
SWV	CPE/Hb/DDAB	0,2 M ACB pH 4,8 a 0,05 M NaBr	$1,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L ⁻¹	[72]
SWV	GCE/SWCNTs/Hb	0,2 M ACB pH 5,0 a 0,05 M NaCl	$1,0 \cdot 10^{-9}$ mol.L ⁻¹	[73]
DPV	PGE/Hb/MWCNTs/CuNP/PANI	0,1 M ACB pH 5,5	$2,0 \cdot 10^{-10}$ mol.L ⁻¹	[74]
DPV	GE/ssDNA	0,1 M PBS pH 8,0	$8,1 \cdot 10^{-9}$ mol.L ⁻¹	[75]
DPV	GCE/dsDNA	0,1 M PBS pH 7,0	$5,0 \cdot 10^{-8}$ mol.L ⁻¹	[76]
SWV	HDME	0,02 M KNO ₃	$4,9 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	[77]
AdSWV	HDME	0,1 M AMB pH 9,5	12 µg/kg	[78]
CV	CPE/RuO ₂	1,0 M LiCl	0,94 mol.L ⁻¹	[79]

DPP – diferenční pulzní polarografie, SWV – square-wave voltametrie, DPV – diferenčně pulzní voltametrie, AdSWV – adsorptivní rozpouštěcí square-wave voltametrie, CV – cyklická voltametrie; DME – kapající rtuťová elektroda, NH⁴⁺ISE – iontově selektivní elektroda pro NH⁴⁺, CPE/HbDDAB – uhlíková pastová elektroda modifikovaná hemoglobinem a dimethyldioctadecylamonium bromidem, GCE/SWCNTs/Hb – skelná uhlíková elektroda modifikovaná SWCNTs a hemoglobinem, PGE/Hb/MWCNTs/CuNP/PANI – pentilová uhlíková elektroda modifikovaná hemoglobinem, MWCNTs, nanočásticemi mědi a anilinem, GE/ssDNA – zlatá elektroda modifikovaná jednováknovou DNA, GCE/dsDNA – skelná uhlíková elektroda modifikovaná dvouvláknovou DNA, HDME – visící rtuťová kapková elektroda, CPE/RuO₂ – uhlíková pastová elektroda modifikovaná RuO₂.

Jako elektrolytů bylo použito 0,5 M tetraalkylamoniových (R₄N⁺) bází (bromid tetrabutylamonnný (TBAB), TBAOH, jodid tetraethylamonnný (TEAI), jodid tetramethylamonnný (TMAI)) a chloridu lithného. V prostředí TBAB byly viditelné dva redukční píky v přítomnosti AA, přičemž první z nich (-1,620 V) je přisuzován samotnému TBAB, druhý (-1,90 V) pravděpodobně patří redukci AA. Ve stejné oblasti byly pozorovány

redukční píky AA v ostatních elektrolytech (-1,880 V pro TBAOH, -1,860 V pro TEAI, -1,860 V pro TMAI). R₄N⁺ vykazují specifickou adsorpci na povrch pracovní elektrody a to v závislosti na velikosti alkylového řetězce (TMA < TEA < TBA), způsobují tak posun potenciálů k negativnějším hodnotám a snížení proudové odezvy. Z tohoto důvodu, a také vzhledem k lepší rozpustnosti ve vodě, byl vybrán 0,5 M LiCl, který poskytuje odezvu při potenciálu -1,870 V. Metodou CV bylo prokázáno, že se jedná o ireversibilní reakci. Tato metoda je velice výhodná z hlediska vysoké rozpustnosti AA ve vodě, tudíž i snadné úpravě vzorku, nehledě na rychlost a selektivitu stanovení [70].

Elektrochemické biosenzory v analýze AA

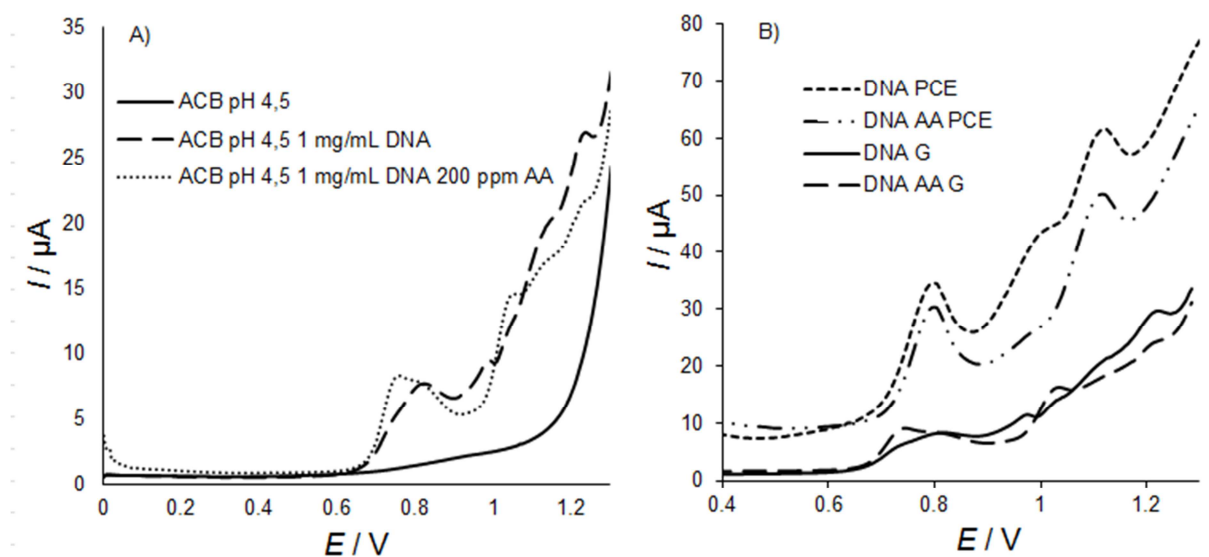
Pro analýzu AA ve vodách byl vyvinut potenciometrický iontově-selektivní biosenzor s celými buňkami bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která vykazuje amidázovou aktivitu a je tak schopná katalyzovat hydrolýzu amidů na amoniak a organickou kyselinu, v případě AA tedy na amonný iont a kyselinu akrylovou. Metoda se ukázala jako velice spolehlivá a citlivá, s detekčním limitem $4,48 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ AA [71]. Pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody a buněk *Brevibacterium* sp. byl detekován obsah AA v odpadních vodách na základě rozdílu spotřeby kyslíku těmito bakteriemi [32]. Pro zjišťování obsahu AA v plynné fázi byly navrženy gravimetrické a piezoelektrické senzory pracující na principu specifické vazby AA uvnitř tetralactamových makrocyclických sloučenin typu Hunter-Vögtle, které jsou naneseny na povrch křemenné mikrováhy. Po interakci těchto sloučenin s AA dojde ke změně hmotnosti čidla a jeho rezonančních vibrací. Toho lze využít v technologiích tzv. „elektronických nosů“ [52, 80].

Nejčastěji jsou však využívány biosenzory amperometrické a voltametrické (CV a SW). Mezi jedny z prvních biosenzorů pro stanovení AA ve vodných extraktech z potravin patří ty s hemoglobinem (Hb) imobilizovaným na pracovní elektrodě. Na základě Michaelovy reakce dochází k tvorbě aduktů mezi AA a amino skupinou valinu na N konci polypeptidového řetězce hemoglobinu. Hemoglobinem lze modifikovat povrch CPE pomocí povrchově aktivní látky (dimethyldioctadecylamonium bromid, DDAB) jež poté vykazuje oxidačně-redukční reakci Hb-Fe³⁺/Hb-Fe²⁺, přičemž interakce mezi Hb-Fe a AA je sledována na redukčním proudu. Tato metoda vykazovala velmi nízké limity detekce ($1,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹) a je vhodná ke stanovení AA v matricích potravin [72]. Upravený povrch GCE byl pokryt suspenzí SWCNTs, po zaschnutí byla nanesena kapka roztoku obsahujícího 10 mg.mL⁻¹ hemoglobinu v 0,2 M ACB o pH 5,0 s 0,05 M NaCl. AA na této elektrodě

vykazoval v prostředí ACB o pH 5,0 quasireverzibilní chování (CV: $E_{p,k} = +0,720$ V, $E_{p,a} = +0,141$ V), ve SWV byl E_p v rozmezí +0,390 V až +0,590 V, přičemž se zvyšující se koncentrací analytu se potenciál posouval směrem k negativnějším hodnotám. Limit detekce byl stanoven $1,0 \cdot 10^{-9}$ mol.L⁻¹. GCE/SWCNTs/Hb byla aplikována na stanovení AA ve vodném extraktu z bramborových lupínků, kde byl jeho obsah úspěšně stanoven pomocí metody kalibrační přímky [73]. Byla navržena povrchová modifikace PGE pomocí anilinu, karboxylovaných MWCNTs, nanočástic mědi a hemoglobinu (PGE/Hb/MWCNTs/CuNP/PANI). Tato elektroda byla rovněž úspěšně použita pro stanovení AA ve vodném extraktu bramborových lupínků metodou DPV s detekčním limitem 0,2 nmol.L⁻¹ [74]. Hemoglobinu jako modifikátoru pracovní elektrody pro stanovení AA bylo použito i v dalších studiích [81, 82]. Tomuto typu biosenzoru a jeho zdokonalení pro rutinní analýzu se vědci věnují stále. Důkazem je článek z roku 2018, kdy byl testován biosenzor založený na GCE modifikované Hb s využitím dalších modifikačních komponent jako MWCNTs s iontovou kapalinou, chitosanem a dalšími [83].

Dalším typem biosenzoru pro stanovení AA je elektroda s imobilizovanou DNA, jež tvoří s AA adukty. Zachycení DNA na povrchu pracovní elektrody lze provést několika způsoby. Ve studii Li et al. (2014) byla použita jako pracovní elektroda GCE. Biosenzor se skládal z vrstvy grafenu (2,5 µg) pro usnadnění přenosu elektronů, na nějž byla zachycena DNA. Imobilizace probíhala v prostředí 0,1 M PBS o pH 7,0 s 5 mg.mL⁻¹ DNA při aplikaci depozičního potenciálu 0,5 V po dobu 200 s. Výslednou odezvou elektrody, studovanou rovněž v PBS o pH 7,0, byl oxidační pík pro guanin při potenciálu +0,680 V a adenin při +0,980 V. Vzhledem k vyššímu I_p pro guanin byl tento využíván pro detekci tvorby aduktu AA-DNA. Jako vzorek byla použita pitná voda. Metoda vykazovala mez detekce $5,0 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹ s použitím metody DPV [76]. Jednovláknová DNA (ssDNA), jež byla využita ve studii Huang et al. (2016), byla zachycena na povrchu zlaté elektrody (GE) kápnutím suspenze ssDNA na povrch a poté ponechána při 4 °C po dobu 6 hod zaschnout. Po zaschnutí vrstvy ssDNA byla elektroda opláchnuta pufrům a 0,1 % roztokem dodecylsíranu sodného (SDS). Výsledná modifikovaná elektroda GE/ssDNA byla použita pro stanovení obsahu AA ve vodném extraktu bramborových lupínků a vodě s detekcí píku guaninu v DPV při potenciálu +0,740 V. Za podmínek metody (0,1 M PBS pH 8,0) se jedná o nevratnou reakci $2e^-/2H^+$ řízenou adsorpcí. Mez detekce na GE/ssDNA byla stanovena na $8,1 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹ [75]. Na základě těchto studií byla provedena optimalizace stanovení AA pomocí DNA imobilizované na povrchu CPE. Práce byla započata na Univerzitě ve Štýrském

Hradci (Karl-Franzens University of Graz (Uni Graz)) v rámci odborné stáže v týmu prof. Kurta Kalchera, kdy byla provedena optimalizace pH elektrolytu, koncentrace DNA a depozičního potenciálu a času. CPE/DNA byla připravována ponořením standardní CPE do roztoku DNA o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v pufru. Po optimalizaci podmínek depozice byl vybrán potenciál $+0,500 \text{ V}$ a čas 200 s . Metodou CV byla provedena optimalizace pH prostředí pracovního elektrolytu, kdy byly testovány pufrы ACB (octanový) pH 4,5, PBS (fosfátový) pH 7,5 a AMB (amonný) pH 9,5. V prostředí AMB nebyly v CV zaznamenány měřitelné proudové odezvy. V PBS byly detekovatelné dva oxidační píky při potenciálech $+0,665 \text{ V}$ a $+0,918 \text{ V}$, které byly přisuzovány oxidační reakci guaninu a adeninu, podobně jako v předchozích studiích. Při přidavku AA však nedošlo k žádné změně těchto oxidačních vln. V ACB byly rovněž detekovány dva oxidační proudy při potenciálech $+0,930 \text{ V}$ a $+1,070 \text{ V}$, přičemž druhý z nich mizel v přítomnosti $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ AA. Pro stanovení AA byla dále použita metoda DPV. V prostředí ACB o pH 4,5 v DPV poskytovala DNA zachycená na povrchu CPE 4 oxidační píky v oblastech potenciálu $+0,813 \text{ V}$, $+0,989 \text{ V}$, $+1,142 \text{ V}$ a $+1,238 \text{ V}$ (obrázek 5A). Při přidavku AA byl detekován další oxidační pík v oblasti potenciálu $+0,752 \text{ V}$ a docházelo k posunu druhého oxidačního píku DNA k zápornějším hodnotám. Vznik oxidačního píku byl přisuzován tvorbě aduktu AA a guaninem v molekule DNA. Tato měření se však nicméně nepovedla zreprodukovat v laboratořích na domovské univerzitě (obrázek 5B), pravděpodobně v důsledku jiného typu DNA a jeho stáří, jiných druhů chemikálií nebo rozdílné konstrukce CPE.



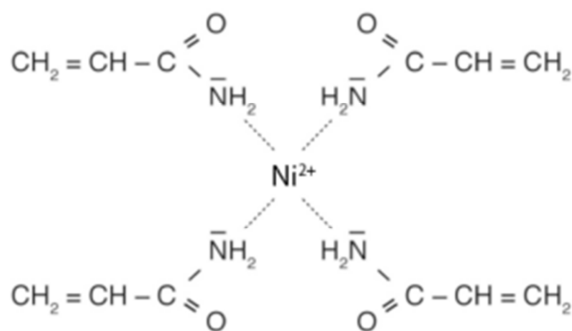
Obrázek 5: Vzorové záznamy DPV s CPE/DNA. A) záznam DPV měření 200 ppm AA na Uni Graz, B) srovnání záznamů DPV s 200 ppm AA z Uni Graz (G) a z Univerzity Pardubice (PCE).

Nepřímé metody stanovení AA

Akrylamid tvoří adukty také s taurinem (Tau), derivátem cysteinu. Principem je reakce dvojně vazby v molekule AA se sulfanylovou skupinou taurinu za vzniku sloučeniny, která je detekovatelná pomocí LC-QTOF-MS [84, 85]. Vznik této sloučeniny se nicméně neprokázal elektrochemicky. Byla provedena studie nepřímého stanovení AA pomocí taurinu metodou CV a SWV na CPE, kdy AA s Tau byly přítomny v roztoku v prostředí 0,1 mol.L⁻¹ H₂SO₄, NaOH a KCl. V záznamech CV ani SWV však nebyly detekovány žádné oxidačně redukční proudové odezvy, data z těchto měření tak nejsou publikována.

Na základě možnosti reakce fenolických látek nebo aminokyselin s dvojnou vazbou AA, bylo provedeno kvalitativní stanovení AA prostřednictvím reakce s glycinem (Gly) nebo kvercetinem (Q) pomocí PGE (**příloha 1**) [85, 86]. Kvercetin (viz kapitola 5.1.1) je elektroaktivní látka, v kyselém a neutrálním prostředí lze v CV pozorovat až 4 oxidační píky (+0,150, +0,300, +0,600 a +0,800 V), přičemž první z nich odpovídá reverzibilní reakci katecholové skupiny na kruhu B (viz kapitola 5.1) a jeho odpovídající redukční pík leží v oblasti potenciálu +0,120 V [87]. Tento redukční pík byl sledován pomocí SWV na PGE po reakci AA s Q v roztoku v prostředí Britton-Robinsonova pufru (BR) o pH 7,0. Potenciál redukčního píku byl +0,128 V. V prostředí BR pufru o pH 2 a 10 nebyl tento pík viditelný. Samotný Q neposkytoval měřitelnou proudovou odezvu na PGE v SWV, pravděpodobně v důsledku zanesení povrchu tuhy oxidačními produkty kvercetinu. Glycin za podmínek metody nevykazoval žádnou odezvu v SWV. Vzhledem k faktu, že reakce AA s Gly je teplotně závislá, byla provedena temperace (100 °C, 60 min) směsi AA/Gly, a zároveň pro zajímavost také směsi AA/Q. Po tepelném ošetření směsi AA/Gly byla v prostředí BR pufru o pH 2,0 zaznamenána oxidačně-redukční reakce s potenciály $E_{p,a}$ v rozmezí +0,140 V až +0,180 V s odpovídajícím $E_{p,k}$ při -0,590 V. Reakce pravděpodobně odpovídá mechanismu navrženému ve studii Zamora et al. [88], kdy při reakci AA s Gly za vyšší teploty vzniká odpovídající 3-alkylaminopropionamid. Kvercetin po temperaci poskytoval na PGE redukční pík s mírně pozitivnějším potenciálem (+0,140 V) než před temperací, nicméně byla pozorována asi 1,5x větší proudová odezva ($I_{p,před} = 37,85 \pm 2 \mu A$, $I_{p,po} = 60,70 \pm 4 \mu A$). Detekce těchto píků pro oba analyty byla na PGE v SWV možná při koncentraci 1,0.10⁻³ mol.L⁻¹. Vzhledem k nízké citlivosti metody nebylo možné ji aplikovat na reálné vzorky. Citlivost metody by pravděpodobně mohla být zvýšena například vhodnou úpravou povrchu elektrody případně modifikací povrchu PGE látkou umožňující usnadnění přenosu náboje.

Pro elektrochemickou detekci lze využít schopnost AA tvořit komplexy s kationty přechodných kovů [89]. Těto vlastnosti bylo využito např. ve studii Zargar et al. (2009) [77]. V prostředí 0,02 M KNO₃ s 1,0 μg.mL⁻¹ Co²⁺ byla pomocí SWV na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) detekována redukční proudová odezva v oblasti potenciálu -1,250 V s posunem k zápornějším hodnotám s vyšší koncentrací AA. Limit detekce metody byl 3,52 ng.mL⁻¹. SWV na HDME v přítomnosti Co²⁺ byla aplikována na extrakty bramborových lupínků. Metoda v porovnání se stanovením AA pomocí HPLC vykazovala relativně dobrou citlivost (vzorek 1: SWV – 967 μg.mL⁻¹, HPLC – 1010 μg.mL⁻¹; vzorek 2: SWV – 985 μg.mL⁻¹, HPLC – 1000 μg.mL⁻¹). Nespornou výhodou je však rychlost a cena stanovení. Tvorby komplexu AA s kovovými ionty bylo využito také ve studii Veselý a Šucmana (2013) [78]. Autoři využili tvorby komplexu akrylamidu s nikelnatými ionty. Vznikající komplex, jehož pravděpodobná podoba byla navržena autory a je zobrazena na obrázku 6, byl sorbován na povrch pracovní elektrody, kterou v tomto případě byla také HDME, po dobu 300 s. Detekce AA byla provedena metodou AdSV v prostředí AMB o pH 9,5, který obsahoval 500 μmol.L⁻¹ Ni²⁺. Byla zaznamenána redukční proudová odezva v oblasti potenciálu -0,350 V až -0,200 V, kdy se *E_p* posouval ke kladnějším hodnotám se zvyšující se koncentrací AA. Metoda byla aplikována na stanovení AA v reálných vzorcích sušenek a krekrů zakoupených v běžných obchodech v ČR. Mez detekce byla stanovena na 12 μg.kg⁻¹ [78]. Touto metodou byla stanovena koncentrace AA ve vzorcích jako odpovídající normám pro obsah AA. Stejná metoda byla použita také pro stanovení obsahu akrylamidu v kočičích a psích granulích, kde bylo AA nalezeno nižší množství v porovnání s potravinami pro lidskou spotřebu [90].



Obrázek 6: Navržená struktura komplexu AA-Ni (převzato z [78]).

Uhlíkové pastové elektrody lze poměrně jednoduše modifikovat různými kovy pomocí tvorby kovového filmu na povrchu. Tyto filmové elektrody mohou být využity jako náhrada

rtuťových elektrod [3]. Předchozí úspěšné pokusy o stanovení AA na HMDE pomocí tvorby jeho komplexů s kationty přechodných kovů vedly k úvaze nahradit rtuťovou elektrodu za CPE. Byla testována modifikace CPE pomocí RuO₂ (**příloha 2**). Modifikátor byl přimíchán do pasty, jednalo se tedy o modifikaci objemovou. Uhlíková pasta byla připravena smícháním 0,5 g uhlíkového prášku (5,5 – 7,5 μm, CR-5, Maziva Týn n. L., s.r.o, Česká republika) se 130 μL minerálního oleje (M5904, Sigma-Aldrich, Německo), při přípravě modifikované CPE bylo navíc přidáno 5, 10 nebo 15 % RuO₂ (Sigma-Aldrich, Německo). Všechny komponenty byly precizně zhomogenizovány v třecí misce s tloučkem a pasta byla poté vpravena do teflonového držáku s pístem. Vzhledem k redukčním záznamům byl před měřením z roztoku odstraněn kyslík probubláním argonem po dobu 5 min. Charakterizace elektrod, optimalizace i samotné stanovení obsahu AA bylo provedeno metodou CV s rozsahem potenciálů -1,000 až +1,400 V při rychlosti skenování 100 mV.s⁻¹. Jako měřicího elektrolytu bylo využito 1,0 M KNO₃ a 1,0 M LiCl. V případě použití KNO₃ jako elektrolytu nebyl detekován žádný pík. V prostředí 1,0 M LiCl byl zaznamenán redukční pík soli ruthenia při potenciálu +1,030 V, který pravděpodobně odpovídá jak reakci Ru⁴⁺/Ru³⁺, tak interakci Ru s Cl⁻ v roztoku elektrolytu [91, 92]. Byl optimalizován také obsah RuO₂ v uhlíkové pastě, kdy 10% CPE/RuO₂ poskytovala nejvyšší proudové odezvy. Se zvyšujícím se počtem skenů v CV se zvyšovala proudová odezva Ru. Pro další měření byl jako optimální vybrán patnáctý sken v pořadí, kdy došlo k ustálení hodnot proudových výtěžků. Toto chování lze přisuzovat pomalé kinetice reakce, kdy s každým dalším skenem docházelo k obsazení dalších molekul Ru ionty Cl⁻. S přidavkem AA do roztoku docházelo ke snižování redukční proudové odezvy. Toto lze vysvětlit obsazením volných molekul Ru na povrchu CPE molekulami AA a tak k jejich blokaci pro další reakci. Metoda byla aplikována na reálný vzorek, jímž byly bramborové lupínky dostupné v běžné maloobchodní síti v České republice. Vzorek byl připraven upraveným postupem převzatým ze studie Stobiecka et al. (2007) [72] s využitím Carrezových roztoků. Výtěžnost metody byla 97,9 % s mezí detekce (*limit of detection*, LOD) 0,94 mol.L⁻¹ (**příloha 2**, obrázek 5).

CPE modifikovaná RuO₂ byla použita také v další studii (**příloha 3**), kde bylo využito rovněž tvorby komplexů AA s dalšími ionty kovů přítomnými v roztoku. Byly testovány soli zinečnatá, manganatá, nikelnatá, železitá a kobaltnatá (ZnSO₄.7H₂O (Penta, Chrudim, Česká republika), MnSO₄.XH₂O (DORAPIS, Praha, Česká republika), NiCl₂.6H₂O, Fe(NO)₃.9H₂O, CoCl₂.6H₂O (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) při koncentraci 0,01 mol.L⁻¹. Jako elektrolytu bylo použito BR pufru o pH 3,0, 7,0 a 9,0. V přítomnosti soli manganaté

a železité nebyly na CPE zaznamenány žádné píky. U ostatních třech solí byly zaznamenány oxidační proudové odezvy při pH 3 (Zn^{2+} : $E_p = +0,025$ V, $I_p = 3,5 \pm 0,890$ μA ; Ni^{2+} : $E_p = +0,125$ V, $I_p = 7,1 \pm 0,122$ μA ; Co^{2+} : $E_p = -0,225$ V, $I_p = 6,1 \pm 0,672$ μA). Kobaltnatá sůl poskytovala oxidační proudové signály také při pH 7,0 ($E_p = -0,200$ V, $I_p = 84,3 \pm 6,480$ μA) a 9,0 ($E_p = -0,275$ V, $I_p = 9,8 \pm 0,373$ μA), nicméně docházelo k zanášení povrchu platinové pomocné elektrody. Proto byla koncentrace kobaltnaté soli v roztoku snížena na $0,004$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, což však vedlo k detekci oxidačních proudů pouze při pH 3. Pro další měření byla použita CPE s 10 % RuO_2 s pro ni optimálním elektrolytem, 1,0 M LiCl (viz odstavec výše). Při použití CPE/ RuO_2 v prostředí LiCl byl detekován oxidační proud kobaltnaté soli při potenciálu $-0,225$ V s proudovým výtěžkem $+65,970$ μA . Detekce komplexu AA- Co^{2+} pomocí CPE/ RuO_2 byla úspěšná v modelových vzorcích, které obsahovaly $0,0001 - 0,01$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA. Oxidační proudová odezva lineárně klesala se zvyšující se koncentrací akrylamidu (**příloha 3**, obrázek 2). Pokles detekovaného proudu byl způsoben tvorbou komplexu a tak snížením obsahu Co^{2+} v roztoku, jehož signál byl měřen. Neúspěšné stanovení AA v reálných vzorcích bramborových lupínku je pravděpodobně způsobeno metodikou přípravy vzorku, která byla stejná jako v předchozím případě. Lze to vysvětlit vznikem vedlejšího produktu reakcí, síranu draselného, který s Co^{2+} tvoří síran kobaltnatý, který neposkytuje signál v CV. Řešením by mohlo být použití jiného činidla.

3.5 Přílohy ke kapitole 3

Příloha 1

Žabčíková S, Kučerová P, Červenka L., *Quercetin or glycine reaction products with acrylamide: A Quantitative approach to acrylamide detection using a pencil Graphite electrode*, Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, 22, str. 15 - 22, 2016, ISBN 978-80-7560-015-8.

Příloha 2

Červenka L., Žabčíková S., Křivská L., *Determination of acrylamide using ruthenium dioxide modified carbon paste electrode*, Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, 21, str. 21 - 29 , 2015, ISBN 978-80-7395-898-5.

Příloha 3

Žabčíková S., Červenka L., Sýs M., Křivská L., *Využití komplexotvorných reakcí pro voltametrické stanovení akrylamidu*, Bezpečnost a kontrola potravin, Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, str. 296 - 300, 2017, ISBN 978-80-552-1649-2.

Příloha 1

SCIENTIFIC PAPERS
OF THE UNIVERSITY OF PARDUBICE
Series A
Faculty of Chemical Technology
22 (2016)

**QUERCETIN OR GLYCINE REACTION PRODUCTS
WITH ACRYLAMIDE: A QUANTATIVE APPROACH
TO ACRYLAMIDE DETECTION USING A PENCIL
GRAPHITE ELECTRODE**

Simona ŽABČÍKOVÁ¹, Petra KUČEROVÁ, and Libor ČERVENKA
Department Analytical Chemistry,
The University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice

Received March 22, 2016

In this article, the equimolar mixtures of acrylamide (AAm) and quercetin or glycine in aqueous solution at different pH, and after heating (100 °C for 60 min) have been studied. (Bare) pencil graphite electrode (PGE) in combination with square wave voltammetry were applied to the qualitative identification of the products. An interaction of AAm and quercetin at pH 2.0 resulted in the increase of reduction current at +128 mV, and an additional shift to +140 mV before and after heat treatment, respectively. PGE gave rise to only response for heat-treated AA/glycine mixture at pH 2.0, showing a higher oxidation current at positive potential and a higher reduction current at negative potential. In neutral media, two oxidation peaks were observed for heated AAm/glycine mixture. Theoretical considerations have been proposed.

¹ To whom correspondence should be addressed.

Introduction

Acrylamide (AAM) is formed in foods by heating as a consequence of asparagine degradation in the presence of the reducing sugars and other carbonyl compounds [1]. Since the substance is consensually genotoxic and carcinogenic, AAM was classified as a Category 2 carcinogen and Category 2 mutagen by the European Union legislative [2]. Therefore, the quantification of AAM in various food matrices is of continuing interest among researches; liquid or gas chromatography with MS-detection having prevailed among the methods of choice for the AAM quantification [3]. Separation techniques represent selective and sensitive tools for its determination; however, they require expensive laboratory equipment, special environment (air conditioning), and highly pure solvents. In contrast, electrochemical methods are capable to determine AAM with high accuracy and sensitivity at low costs and minimal consumption of solvents with a possibility of miniaturization toward portable lab-on-chip units.

Acrylamide is capable of reduction at relatively high negative potentials, which limits the direct electrochemical determination of AAM to the use of mercury-based working electrodes. A polarographic method was successfully applied to direct determination of AAM in water sample [4], and the formation of AAM-cobalt [5] or AAM-nickel [6] adducts was exploited for quantification of native substance in food samples using the hanging mercury drop electrode. Due to the health and environmental consequences of using mercury in industry and research, novel electrode materials are sought and the respective attempts examined. For instance, it has been shown that AAM forms an adduct with haemoglobin (Hb) — as a result of reaction with the α -NH₂ group of N-terminal valine in the Hb molecule — when experimenting with a carbon paste electrode [7]. This chemical reaction could also be used by other researchers for the determination of AAM by employing a sensor with gold nanoparticles [8] or a multiwalled carbon nanotubes / copper nanoparticles / polyaniline hybrid film deposited onto a pencil graphite electrode [9]. The strong affinity of the AAM molecule toward the nucleophilic groups, such as thiol [10] or carboxyl [11] has then been utilized in measurements with carbon-based electrodes, as well as by using the sol-gel electrodes with molecularly imprinted polymer membranes [12, 13]. Also, an enzymatic biosensor based on the detection of NH₄⁺ ion released by the activity of microbial amidase was developed [14]. Finally, a carbon paste electrode modified with RuO₂ for indirect determination of AAM in a LiCl-based supporting electrolyte was described by the collective of authors [15]. This has confirmed that various organic molecules with nucleophiles group can react with AAM, including polyphenolic compounds [16], and amino acids [17-20].

In this research, an attempt to find the proper conditions for the determination of AAM via its reaction with nucleophiles at the bare pencil graphite electrode (PGE) is described. Since AAM did not give rise to any response at the

surface of PGE, we have at least tried to qualitatively detect the products of such a reaction at various pH accelerated by the increased temperature.

Materials and Methods

Reagents and Equipment

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and deionised water ($G \leq 0.055 \mu\text{S}$) used throughout this study. All the measurements were performed in the presence of dissolved oxygen. Britton–Robinson buffer solutions (B-R, 0.04 mol l^{-1}) were used as a supporting electrolyte. Stock solution of acrylamide (1.0 M AAm) was prepared in B-R buffer solutions at various pH (2.0, 5.0, 7.0 and 10.0) and stored in laboratory temperature for one month. Similarly, stock solutions of glycine and quercetin (both 1.0 M in concentration) were prepared by dissolving the appropriate amount in B-R buffer solutions. Since quercetin is poorly soluble in water, mixed ethanol/B-R buffer solutions (1:1) were used.

A three-electrode system, consisting of pencil graphite working electrode, Ag/AgCl/3M KCl as the reference, and a platinum wire as the counter electrode, was connected to a potentiostat (PalmSens, Ivium Technologies, Utrecht, The Netherlands) was used for all electrochemical measurements. Hard and black (HB) pencil graphite lead with a diameter of 0.5 mm was obtained from Koh-i-noor Hardtmuth a. s. (České Budějovice, the Czech Republic). In this study, a common pencil was used as a holder for the graphite lead. Electrical contact was accomplished by wrapping a wire around the metallic part of the holder. For each individual measurement, a new graphite lead (with fresh surface) was used with a 10-mm long column immersed into the working solution.

Measurement Conditions

Square wave voltammetry (SWV) technique in the anodic and cathodic regime was used for measurements with the mixture of AAm ($1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) and the testing substance ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) at pH 2.0, 5.0, 7.0, and 10.0. The SWV mode was applied to measure the voltammetric characteristics of reaction mixtures before and after the temperature treatment in a block heater ($100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min). The conditions for the SWV-potential ramp were as follows: potential range: -1.0 to $+1.3 \text{ V}$ vs. ref. and *vice versa* (i.e., applied either as anodic or cathodic scan), potential step increment: 0.004 V , pulse amplitude: 0.05 V , and SW-frequency: 25 Hz . An accumulation step was carried out in an open-circuit arrangement for 5 min at regular stirring (350 rpm), followed by the SWV measurement. These experiments were done doubly, and performed at laboratory temperature.

Results and Discussion

Polyphenolic compounds are known to prevent the formation of acrylamide upon heating by various reactions. On the contrary, once acrylamide is formed, its elimination is blocked by the polyphenolic free radicals leading to the polymer products [16]. Quercetin was chosen as a representative compound of a kind in this research belonging to the class of flavonoids with known beneficial effects on the health [21]. Reportedly, quercetin is readily oxidized on the surface of PGE, giving rise to a pair of oxidation peaks occurred at positive potentials in acidic media [22].

In this study, the measurement with PGE did not exhibit a distinct response in the fresh solution of quercetin at pH 7.0

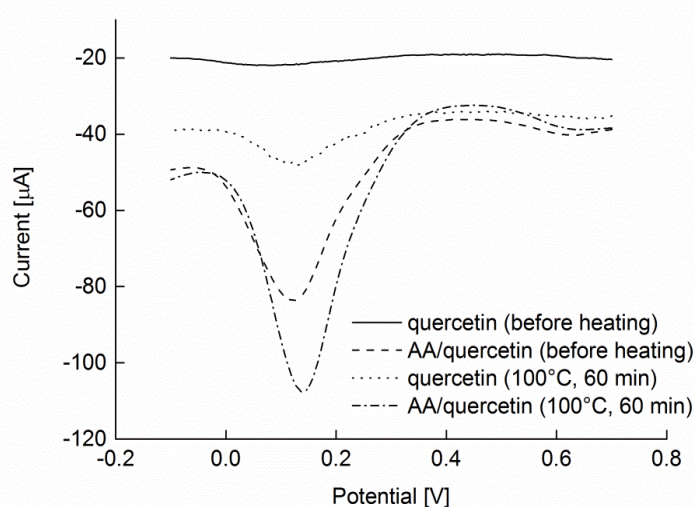


Fig. 1 Square wave voltammograms of quercetin and acrylamide / quercetin mixture ($1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) in Britton–Robinson buffer (pH 7.0) using the bare pencil graphite electrode after 5 min accumulation (at 350 rpm) in open circuit. Experimental conditions: scan from +1.3 V to -1.0 V , potential step increment 0.004 V , amplitude 0.05 V , frequency 25 Hz

As can be seen from Fig. 1, SWV of AAm/quercetin mixture recorded before heating has resulted in a reduction peak at +128 mV (with a magnitude of $35.0\text{--}40.0 \mu\text{A}$). After a treatment at 100°C for 60 min, a small reduction peak at +140 mV (with $4.8\text{--}6.4 \mu\text{A}$) appeared for quercetin alone (at pH 7.0). The heated mixture of AAm/quercetin gave significantly higher reduction current ($56.0\text{--}65.0 \mu\text{A}$) at the same potential. In this experiment, a positive shift of the potential for the reduction current in the case of heated AAm/quercetin sample was observed compared to the response for non-heated AAm/quercetin sample. The presence of reduction current at +128 mV and an additional increase (and shifting) at +140 mV for non-heated and heated AAm/quercetin solution, respectively, might indicate a formation of the electroactive species; this process being pronounced by elevated temperature. In literature, it has been described in detail that the thermal

degradation of quercetin at physiological pH (in the presence of oxygen) is initiated by the formation of chalcone structure with the subsequent attack of nucleophilic species [23]. The similar reaction pathways have been documented for UV-light induced degradation of quercetin in solution [24]. Since the respective products seemed to be consumers of nucleophiles, the reaction of double C-C bond of AAm with any of known degradation products of quercetin can unlikely occur [23]. The presence of reduction peak for both heat untreated and heat treated mixtures of AAm/quercetin may imply the electrochemical reduction of polymer-like structure [16]. Acrylamide is well known to behave like a monomer unit for the preparation of AAm polymers using electrochemical initiation [25], and polyphenolic compounds easily form polymer-like structure on the electrode surface. Therefore, we suppose that the formation of polymer-like structure between AAm and quercetin is the case in our study and responsible for electroactivity of the samples chosen. No significant response of PGE was observed in acidic (pH 2.0) and alkaline (pH 10.0) environment.

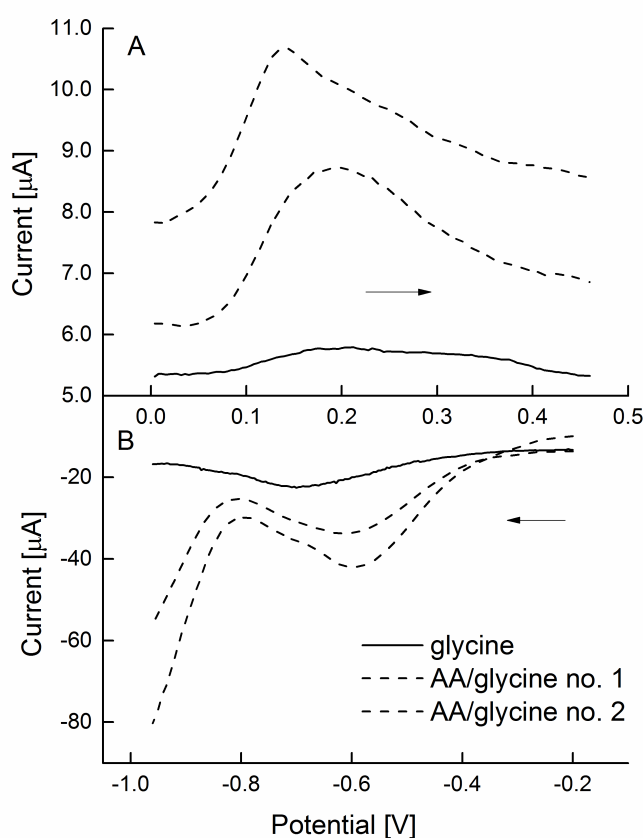


Fig. 2 Square wave voltammograms of heated (100 °C, 60 min) glycine and acrylamide / glycine mixture ($1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) in Britton–Robinson buffer (pH 2.0) using the bare pencil graphite electrode after 5 min accumulation step (350 rpm) in open circuit. Experimental condition: potential range from +1.3 to -1.0 V , potential step increment 0.004 V , amplitude 0.05 V , frequency 25 Hz . Dash curves indicate AAm/glycine voltammograms in duplicate

As previously documented, the heating of AAm with various nucleophiles has resulted in a decrease of acrylamide content in the solutions tested [17-20]. The reactivity varied with temperature, the structure of nucleophile, time, and pH value of the working solution. In our research, the glycine neither alone nor in mixture with AAm gave response in PGE, when measured in solutions at various pH before temperature treatment. However, SW-voltammogram of heated mixture of AAm/glycine (at pH 2.0) showed the oxidation current at a potential ranging from +140 to +180 mV in comparison with the heated glycine solution (Fig. 2A). In the reverse scan, glycine alone gave a small reduction current at -680 mV, whereas the mixture of AAm/glycine was reducible at -590 mV (with 12.0-19.0 μ A) on the surface of PGE (see Fig. 2B).

At extreme acidic conditions — namely, in 1M H₂SO₄ —, glycine was found to decompose to various intermediates that subsequently adsorbed on the surface of Pt working electrode, and then involved in the electrooxidation process [26]. Two alternative pathways were found in the study of reaction mechanisms after heating AAm and glycine: the first one was (i) Michael addition and oxidation followed by (another) Michael addition [20]. Secondly, Zamora *et al.* [17] have revealed that 3-(alkylamino)propionamides (Fig. 3A) are formed in the reaction between AAm and glycine in the acidic environment, which may be theoretically attributed to the proper electrochemical process at the PGE.

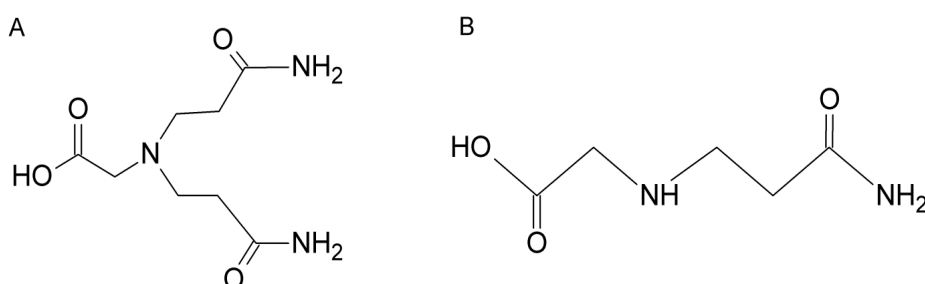


Fig. 3 The reaction product of acrylamide and glycine identified at higher temperature in A) acidic and B) neutral condition as described by Zamora *et al.* [17] and Zhu *et al.* [19], respectively

The voltammograms obtained from two separately prepared AAm/glycine solutions exhibited a behaviour similar to that observed at the PGE electrode. In the respective voltammograms, two oxidation peaks were detected for the adduct of glycine-AAm at 7.0 pH; see Fig. 4.

The first one appeared in the negative potential region, at -110 mV, the second at +88 mV vs. ref. Reportedly, the AAm molecule was able to react with nucleophilic compounds at a neutral pH and the reaction kinetics increased with elevated temperature [18]. Zhu *et al.* [19] identified 2-((3-amino-3-oxopropyl)amino)acetic acid as the major reaction product between glycine and AAm. Although further identification of the reaction product(s) has not been performed

in our study, the structure of the above-mentioned compound may imply its possible electroactivity (see Fig. 3B).

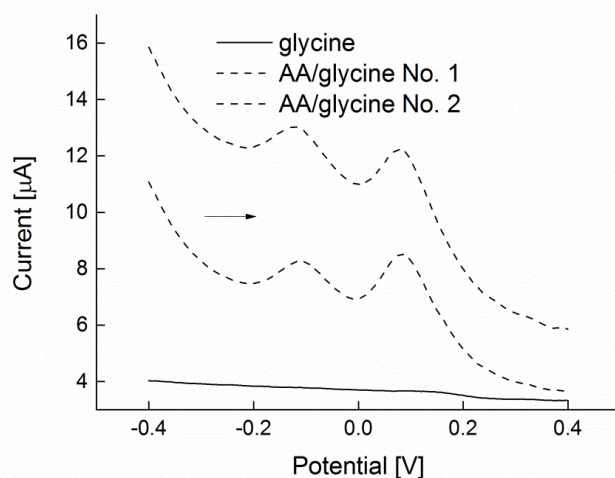


Fig. 4 Voltammogram of acrylamide / glycine mixture ($1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) heated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min in Britton–Robinson buffer (pH 7.0) using the bare pencil graphite electrode after 5 min accumulation (at 350 rpm) in open circuit. Experimental condition: potential range from -1.0 to $+1.3 \text{ V}$, potential step increment 0.004 V , amplitude 0.05 V , frequency 25 Hz . Dash curves indicate AAm/glycine voltammograms in duplicate

Conclusion

In mixtures of acrylamide with quercetin or glycine, the reaction products observed at the bare pencil graphite electrode have exhibited noticeable electrochemical activity. Although the specific electroactive compound was not identified within the study presented herein, an attempt to explain the redox properties of such reaction mixtures has been made. It seems that the reaction mechanism between acrylamide and glycine corresponds to an addition to the double C-C bond of acrylamide according to the literature cited. Quercetin and acrylamide might probably be subjected to the polymerization-like reactions, although it was not confirmed by other electrochemical methods (e.g., cyclic voltammetry).

Our preliminary results have shown that, at particular conditions, the bare pencil graphite electrode is capable to detect electrochemically the active species after reactions of acrylamide with quercetin or glycine. A further research is needed to elucidate the yield of these reactions and to determine the sensitivity with respect to various acrylamide concentrations.

References

- [1] Xu Y., Cui B., Ran R., Liu Y., Chen H., Kai G., Shi J.: *Food Chem. Tox.* **69**, 1 (2014).
- [2] EFSA CONTAM Panel: *EFSA Journal* **14** (6): 4104, 321 pp. (2015).
- [3] Tekkeli S.E.K., Önal C., Önal A.: *Food Anal. Methods* **5**, 29 (2012).
- [4] Niaz A., Shah A., Bhanger M.I., Saeed M., Jamali M.K., Arain M.B.: *Talanta* **74**, 1608 (2008).
- [5] Zargar B., Sahraie N.R., Khoshnam F.: *Anal. Lett.* **42**, 1407 (2009).
- [6] Veselá H., Šucman E.: *Czech J. Food Sci.* **31**, 401 (2013).
- [7] Stobiecka A., Radecka H., Radecki J.: *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2165 (2007).
- [8] Garabagiu S., Mihailescu G.: *J. Electroanal. Chem.* **659**, 195 (2011).
- [9] Batra B., Lata S., Sharma M., Pundir C.S.: *Anal. Biochem.* **433**, 210 (2013).
- [10] Huang S., Lu S., Huang C., Sheng J., Zhang L., Su W., Xiao Q.: *Sens. Actuator B-Chem.* **224**, 22 (2016).
- [11] González-Fuentes F.J., Manríquez J., Godínez L.A., Escarpa A., Mendoza S.: *Electroanalysis* **26**, 1039 (2014).
- [12] Wang Q., Ji J., Jiang D., Wang Y., Zhang Y., Sun X.: *Anal. Methods* **6**, 6452 (2014).
- [13] Liu X., Mao L.-G., Wang Y.-L., Shi X.-B., Liu Y., Yang Y., He Z.: *Food Anal. Methods* **9**, 1 (2015).
- [14] Silva N.A.F., Matos M.J., Karmali A., Rocha M.M.: *Portugaliae Electrochim. Acta* **29**, 361 (2011).
- [15] Červenka L., Žabčíková S., Křivská L.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **21**, 21 (2015).
- [16] Liu Y., Wang P., Chen F., Yuan Y., Zhu Y., Yan H., Hu X.: *Food Chem.* **186**, 46 (2015).
- [17] Zamora R., Delgado R.M., Hidalgo F.J.: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1708 (2010).
- [18] Tong G.C., Cornwell W.K., Means G.E.: *Toxicol. Lett.* **147**, 127 (2004).
- [19] Zhu Y., Wang F., Zhao M., Hu Y., Chen F.: *J. Sci. Food Agric.* **95**, 1 (2015).
- [20] Liu J., Chen F., Man Y., Dong J., Hu Y.: *Food Chem.* **128**, 442 (2011).
- [21] D'Andrea G.: *Fitoterapia* **106**, 256 (2015).
- [22] Vu D. L., Žabčíková S., Červenka L., Ertek B., Dilgin Y.: *Food Technol. Biotech.* **53**, 347 (2015).
- [23] Barnes J.S., Foss F.W. Jr., Schug K.A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1513 (2013).
- [24] Zvezdanovic J.B., Stanojevic J.S., Markovic D.S., Cvetkovic D.J.: *J. Serb. Chem. Soc.* **77**, 297 (2012).
- [25] Siyam T.: *Des. Monomer Polym.* **4**, 107 (2001).
- [26] Marangoni G.D., Smith R.S., Rosoe S.G.: *Can. J. Chem.* **67**, 921 (1989).

Příloha 2

SCIENTIFIC PAPERS
OF THE UNIVERSITY OF PARDUBICE
Series A
Faculty of Chemical Technology
21 (2015)

**DETERMINATION OF ACRYLAMIDE
USING RUTHENIUM DIOXIDE MODIFIED CARBON
PASTE ELECTRODE**

Libor ČERVENKA¹, Simona ŽABČÍKOVÁ, and Lenka KŘIVSKÁ
Department of Analytical Chemistry,
The University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice

Received September 1, 2014

A simple indirect method for acrylamide determination using a carbon paste electrode (CPE) modified with powdered ruthenium dioxide is described in the study. The voltammetric response of RuO₂/CPE in a 1.0 M LiCl supporting electrolyte resulted in the reduction current at a potential of 1.03 V vs. Ag/AgCl/3.0 M KCl due to the formation of unspecified Ru-Cl species. The addition of acrylamide decreased the reduction current at 1.03 V, giving rise to a linear response in the concentration range from 0.25 μM to 1.5 μM with a limit of detection found to be 0.94 μM. The method developed was successfully applied to analyse potato crisps sample with a recovery rate of 97.9 %.

¹ To whom correspondence should be addressed.

Introduction

Acrylamide (AA) is a chemical used in the industry to produce polyacrylamide as a flocculent agent for the treatment of potable water, in processing of pulp for the production of paper, in cosmetics, and for food package materials as additive [1,2]. AA can generate neurotoxicity, neuropathy, and it is considered to act as possible carcinogenic in humans [3,4]. In 2002, the Swedish Agency of Food Security had reported on high concentrations of acrylamide in starch rich food processed at temperature higher than 120 °C, such as fried potato chips, breads or coffee. AA is generated from the reaction of reducing sugars and aminoacids; especially, from asparagin [5,6].

The presence of AA in foods and its harmful effects to human health makes its determination and quantification an important issue. Chromatographic separations including gas chromatography/mass spectrometry, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (MS/MS), and capillary electrophoresis are the most widely used analytical techniques [7,8]. The respective methods require an expensive instrumentation, special labor condition (e.g., air-conditioned laboratory), and are rather unfriendly to environment. Therefore, the easy, fast, inexpensive and reliable methods are of great importance. In this context, the electroanalytical techniques offer these desired features and can be employed for detection and quantification of target compounds. Literature search shows two electroanalytical approaches for detection of acrylamide: direct and indirect. Differential pulse polarography was used for direct determination of AA in aqueous solution [9]. Since AA is known for its ability to form complexes with various metals [10], Zargar *et al.* [11] and Veselá and Šucman [12] have developed methods for direct determination of AA complexes using the hanging mercury drop electrode. Among the carbon-based electrodes, only carboxylic group-modified single-walled carbon nanotube screen-printed electrode allowed direct detection and quantification of AA [13]. A formation of an adduct between AA and hemoglobin leads to numerous indirect methods for determination of AA using a single-walled carbon nanotubes glassy carbon electrode [14], hemoglobin-gold-nanoparticles ITO glass electrode [15], and hemoglobin-multiwalled-copper-nanoparticles-polyaniline hybrid film deposited onto the surface of a pencil graphite electrode [16]. Furthermore, a biosensor for AA determination based on the interaction of the analyte and *P. aeruginosa* enzymatic activity has been developed [17]. In this paper, ammonium ion-selective electrode has been used for detection of NH_4^+ released from AA molecule *via* hydrolysis using amidase.

Carbon paste represents an appealing and widely used electrode material in the field of electroanalysis due to its attractive advantages, such as simple preparation, low-cost implementation, renewability, low background currents, and the ease of modification [18]. Carbon paste electrode (CPE) with various metallic films (Bi, Sb, etc.) represents a suitable substitution for the mercury electrode;

mainly, in stripping analysis of trace heavy metals [19]. Modification of CPE with ruthenium leads to an improvement of the responses toward various organic compounds, such as amino acids [20] or glycerol [21].

Since ruthenium salts were considered to form be strongly coordinated with AA *via* the carbonyl oxygen [10], an attempt to determine AA using ruthenium dioxide-modified CPE has been proposed in this study.

Experimental

Chemicals, Reagents, and Equipment

All the chemicals and reagents were purchased in Sigma-Aldrich (the Czech Republic). Deionized water was used throughout this study ($G \leq 0.055 \mu\text{S}$). Dissolved oxygen was removed from all the solutions by purging with argon for 5 min (purity 99.99 %, Linde Technoplyn, the Czech Republic).

A stock solution of acrylamide (0.1 M) was prepared freshly using deionized water and kept in dark before the experiment.

Three-electrode system consisting of a CPE (working), Ag/AgCl/3.0 M KCl (reference), and a platinum wire (counter electrode) was used connected to a PalmSens analyser (Ivium Technologies, The Netherlands) for electrochemical measurement. Modified CPE was regenerated by mechanical surface renewal by wiping with a wet filter paper before each measurement.

The Preparation of Ruthenium Dioxide-Modified CPE. Ruthenium(IV) oxide powder (99.9%) and graphite powder 5.5-7.0 μm (CR-5, Maziva Týn n. L., s.r.o., the Czech Republic) were weighed and the total mass was controlled at 0.5 g. The mass ratio of RuO_2 was set to 5, 10 and 15 %. After that, 130 μl mineral oil (M5904, Sigma-Aldrich, Germany) was added to the powder and thoroughly hand mixed together in ceramic mortar with a pestle. The resulting paste was packed into the Teflon piston holder (3.0 mm in diameter) [22]. The bare CPE was used as the control.

Electrochemical Procedure. First of all, the various amount of RuO_2 (5, 10, and 15 %) in the carbon paste electrode material was investigated in a 1.0 M LiCl supporting electrolyte when using cyclic voltammetry in the potential range from -1.0 to 1.4 V, and at the scan rate of 100 mV s^{-1} . All the measurements were performed using cyclic voltammetric technique using with the RuO_2/CPE and the supporting electrolyte of the same composition.

Sample Preparation. A portion of salted potato crisps (manufactured by Petr Hobža, Strážnice, the Czech Republic) was homogenized and soaked in 50 ml deionized water for 20 min. Acrylamide was extracted by shaking for 60 min at laboratory temperature, followed by centrifugation at 4100 rpm for 10 min. Carezz treatment was selected for purification of the supernatant, followed by the

filtration using Watmann filter paper No. 2. An appropriate amount of the purified sample was added to the supporting electrolyte and the amount of AA determined using cyclic voltammetry specified above. For recovery studies, the same procedure was applied with the sample spiked with the standard AA solution.

Results and Discussion

Reportedly [18], the bare CPE is not suitable for determination of AA in aqueous solutions because of its electrochemical inactivity in the potential window from -1.0 to 1.4 V vs. ref. The oxidation of AA occurred at highly negative potential (-1.84 V) when using the hanging mercury drop electrode [9]; however, CPE is not already stable at such a potential. In another study, the formation of the AA- Ni^{2+} complex led to the decrease in the oxidation potential to -0.3 V; again, using the hanging mercury drop electrode [12]. The direct measurement of AA alone or as a complex with ruthenium (due to limited solubility of ruthenium dioxide in aqueous solution) using the bare CPE was not possible in the current study. Nevertheless, after a few cycling of RuO_2/CPE in the supporting electrode containing Cl^- ions, the reduction current appeared at the 1.03 V (Fig. 1).

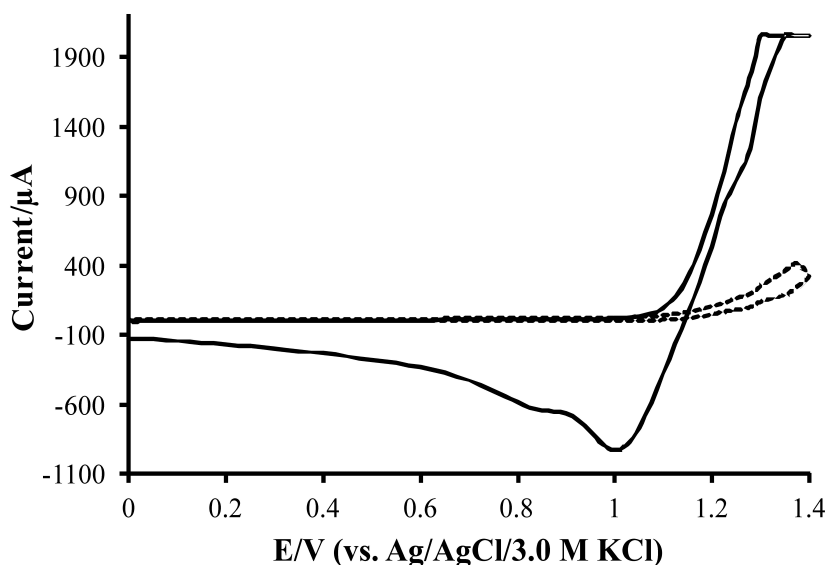


Fig. 1 Cyclic voltammograms (15th cycle) of 10% RuO_2/CPE in 1.0 M LiCl (solid line) and 1.0 M KNO_3 (dashed line), scan rate: 100 mVs^{-1} , potential range from -1.0 to 1.4 V vs. Ag/AgCl/3.0 M KCl

In a study of Horányi and Rizmayer [23], a significant adsorption of chloride on the surface of ruthenium electrode was noticed. It is evident from Fig. 1 that the process appearing at the potential of 1.03 V corresponds to the presence of chloride salt and Ru. When a solution of 1.0 M KNO_3 was used as the

supporting electrolyte, the reduction current was not apparent. It is important to notice in Fig. 2 that the current response has increased with the number of cycles exhibiting a steady-state response after the 10th cycle. This behaviour can be explained by the slow formation of a specific Ru-Cl film on the surface of the CPE during cycling until all the ruthenium dioxide on the surface of RuO₂/CPE had interacted.

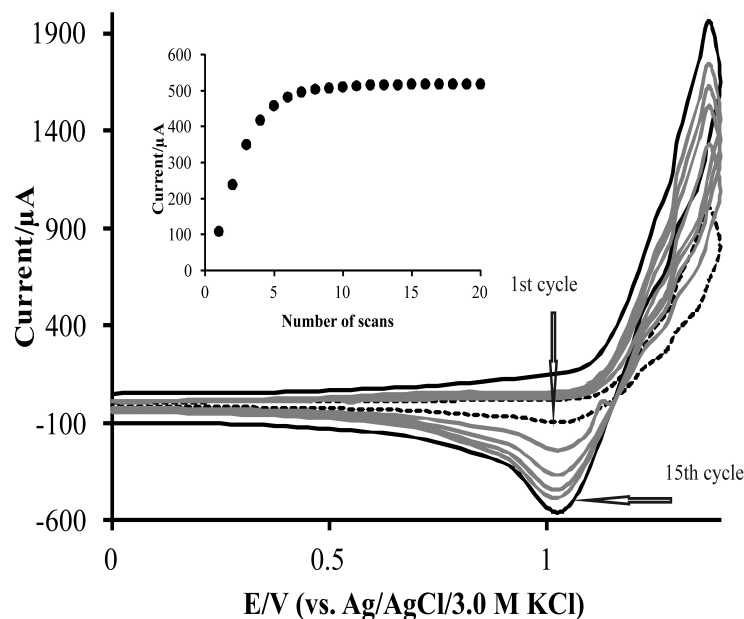


Fig. 2 Cyclic voltammograms (15 cycles) of 10 % RuO₂/CPE in 1.0 M LiCl, scan rate 100 mVs⁻¹, potential range from -1.0 to 1.4 V vs. Ag/AgCl/3.0 M KCl. 1st cycle in dashed line, 15th cycle in solid line. Inlet: the effect of the number of cycles on the reduction peak current at 1.03 V

As previously described, ruthenium(III) Schiff's base complex proved to be a selective sensor for Cl⁻ determination [23]. In another study, remaining chloride ions in composite material impaired the electrochemical performance of amorphous RuO₂/carbon electrode [24] by forming an unspecified ruthenium-chloride product. In the study of Martinez–Alvarez and Miranda–Hernandez, the authors found that an oxy-aquacomplex of ruthenium had provided the electroactive species for dissolution of RuCl₃ in 1M HClO₄ (pH 1.0) [25].

The effect of RuO₂ content on the response of RuO₂/CPE in 1.0 M LiCl supporting electrolyte was also investigated. As can be seen in Fig. 3, there is no linear relationship between the RuO₂ content and reduction current at the potential of 1.03 V vs. ref.

The most satisfactory response was obtained with 10 % RuO₂ in the composite material. The reduction current is linearly proportional to the scan rate in the range from 20 to 100 mV s⁻¹ (Fig. 4) ($I = 5575.3 \text{ Vs}^{-1} + 371.8$; $R^2 = 0.998$). These findings have indicated that the electrochemical process at the RuO₂/CPE

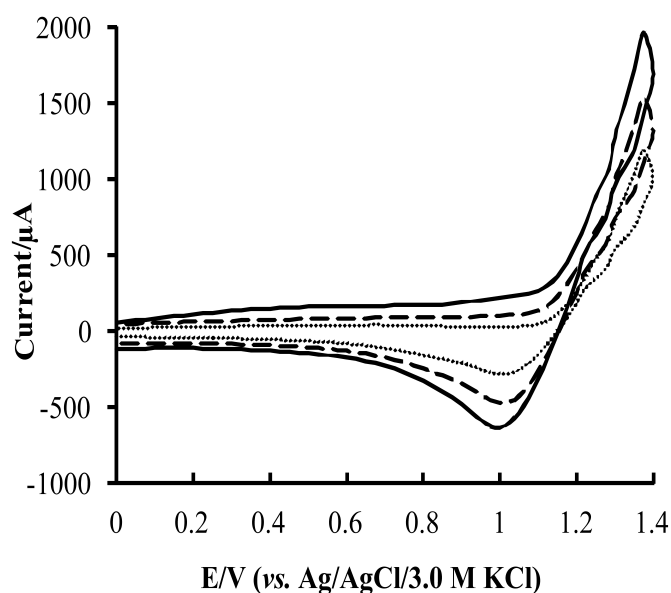


Fig. 3 Cyclic voltammograms (15th cycle) of RuO₂/CPE with 5 (·····), 10 (—) and 15 % (---) content of RuO₂ in 1.0 M LiCl, scan rate: 100 mVs⁻¹, potential range from -1.0 to 1.4 V

in the 1.0 M LiCl supporting electrolyte is surface-controlled in the limited range of scan rates.

Analytical Application

The effect of the presence of AA in 1.0 M LiCl on the reduction current at the potential of 1.03 V vs. ref. is shown in Fig. 5, where the reduction current has linearly decreased with the increasing concentration of AA in the range of 0.25-1.5 μM, giving the regression equation $I (\mu\text{A}) = -28.52 \times c (10^{-7} \text{ mol l}^{-1}) + 948.66$ ($R^2 = 0.979$).

The mechanism of decreasing the reduction current in the dependence upon the addition of AA to the LiCl-based electrolyte solution has not been yet successfully explained in the framework of the present study and the respective study has to be made. Herein, we can just deduce that AA may preferentially form a complex with ruthenium on the surface of the RuO₂/CPE electrode, so that the lesser amount of free Ru substance has been available for the Ru-Cl formation, giving rise to the reduction current at the potential of 1.03 V.

The limit of detection (*LOD*) By using the equation $LOD = 3s_b/m$, where s_b is the standard deviation of the blank response and m the slope of the calibration plot, the limit of detection (*LOD*) has been found to be 0.94 μM whereas the limit of quantification (*LOQ*, signal/noise = 10) being 3.1 μM.

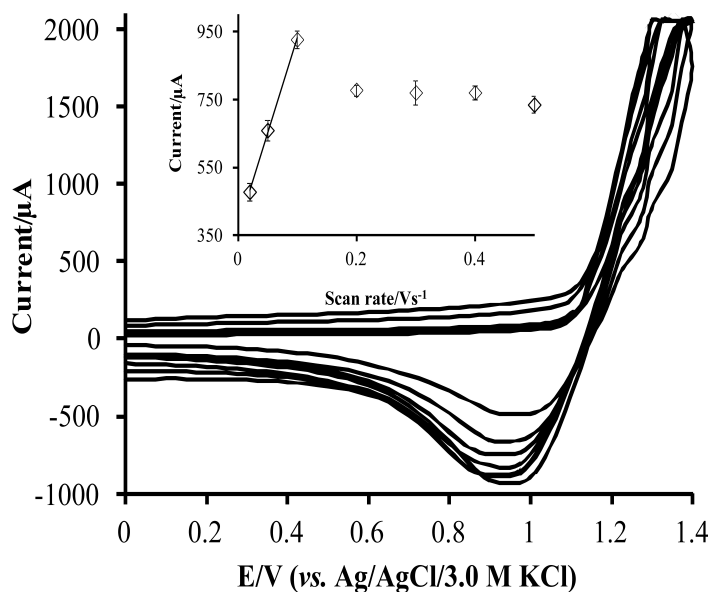


Fig. 4 The effect of the scan rate (20-500 mVs⁻¹) on the cyclic voltammograms (15th cycle) of 10 % RuO₂/CPE in 1.0 M LiCl, potential range from -1.0 to 1.4 V vs. Ag/AgCl/3.0 M KCl. Inlet: the effect of the scan rate on the reduction peak current at the potential 1.03 V

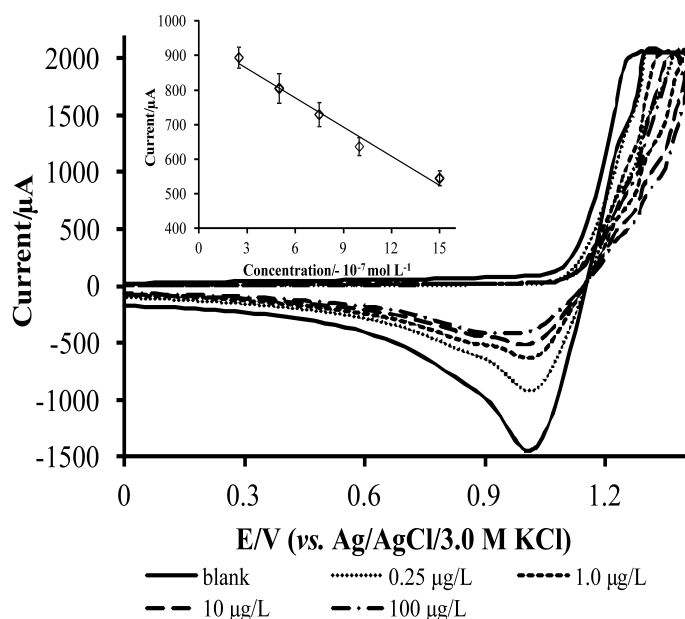


Fig. 5 Cyclic voltammograms of 10 % RuO₂/CPE in 1.0 M LiCl in the presence of 0.25 (·····), 1.0 (---), 10.0 (—) and 100 µM (- · - · - ·) of acrylamide (15th cycle), scan rate: 100 mVs⁻¹, potential range from -1.0 to 1.4 V. Inlet: The calibration plot of reduction current (1.03 V) vs. concentration of acrylamide. Vertical bars represent the standard deviation (for $n = 6$)

The proposed method was applied to the determination of acrylamide in potato crisps and the respective results are shown in Table I. It can be seen that the method is sensitive toward the acrylamide determination with a good recovery of 97.7 %.

Table I Determination of acrylamide in potato crisps sample and the recovery data ($n = 6$)

Spiked $\mu\text{g l}^{-1}$	Found $\mu\text{g l}^{-1}$	Recovery %
0.00	50.5	-
7.12	56.44	97.9

Conclusion

The results of the present study have shown that RuO_2/CPE electrode has some potential to determine acrylamide in potato crisps. A further study has to be made to identify the Ru-Cl electroactive species being reduced on the surface of the electrode. The indicative value of acrylamide for potato crisps was set to $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ according to the Commission Recommendation 2010/307/EU; therefore, our method is still suitable for AA quantification despite a limited linearity between the reduction current on and the concentration of AA, together with relatively high *LOD* and *LOQ* in comparison with the previous studies cited was determined in this study [9,13,15,16].

References

- [1] Taeymans D., Wood J., Ashby P., Blank I., Studer A., Stadler R. A. et al.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 323 (2004).
- [2] Pedreschi F., Mariotti M. S., Granby K.: *J. Sci. Food Agric.* **94**, 9 (2014).
- [3] Cwiková O.: *Chem. Listy* **108**, 205 (2014).
- [4] Xu Y., Cui B., Ran R., Liu Y., Chen H., Kai G., Shi J.: *Food Chem. Toxicol.* **69**, 1 (2014)
- [5] BeMiller J.N., Huber K.C.: *Carbohydrates in: Fennema's Food Chemistry* (S. Damodaran, K.L. Parkin, O.R. Fennema, Eds), pp. 83-154, CRC-Press, Boca Raton, 2008.
- [6] Zhang Y., Ren Y., Zhang Y.: *Chem. Rev.* **109**, 4375 (2009).
- [7] Keramat J., LeBail A., Prost C., Soltanizadeh N.: *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 340 (2011).
- [8] Tekkeli S.E.K., Önal C., Önal A.: *Food Anal. Methods* **5**, 29 (2012).
- [9] Niaz A., Shah S.A., Bhangar M.I., Saeed M., Jamali M.K., Arain M.B.: *Talanta* **74**, 1608 (2008).
- [10] Girma K.B., Lorenz V., Blaurock S., Edelmann F.T.: *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 1283 (2005).
- [11] Zargar B., Sahraie N., Khoshnam F.: *Anal. Lett.*, **42**, 1407 (2010).

- [12] Veselá H., Šucman E.: Czech J. Food Sci., **31**, 401 (2013).
- [13] González-Fuentes F.J., Manríquez J., Godínez L.A., Escarpa A., Mendoza S.: Electroanalysis **26**, 1039 (2014).
- [14] Krajewska A., Radecki J., Radecka H.: Sensors **8**, 5832 (2008).
- [15] Garabagiu S., Mihailescu G.: J. Electroanal. Chem., **659**, 196 (2011).
- [16] Batra B., Lata S., Sharma M., Pundir C.S.: Anal. Biochem., **433**, 210 (2013).
- [17] Silva N.A.F., Matos M.J., Karmali A., Rocha M.M.: Portugal. Electrochim. Acta, **29**, 361 (2011).
- [18] Švancara I., Kalcher K., Walcarius A., Vytřas K.: *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*, CRC Press, Boca Raton (2012).
- [19] Vytřas K., Švancara I., Metelka R.: J. Serb. Chem. Soc., **10**, 1021 (2009).
- [20] Shaidarova L.G., Ziganshina S.A., Budnikov G.K.: J. Anal. Chem., **58**, 640 (2003).
- [21] Ivanova E.V., Schuhmann W., Ryabov A.D.: J. Anal. Chem., **64**, 404 (2009).
- [22] Švancara I., Metelka R.: Piston-driven carbon paste holder for electrochemical measurements in: Sensing in Electroanalysis (K. Vytřas, K. Kalcher, Eds.), Vol. 1, pp. 7-18, Pardubice, 2000.
- [23] Ganjali M.R., Pourjavid M.R., Rezapour M., Poursaberi T., Daftari A., Salavati-Niasari M.: Electroanalysis **16**, 922 (2004).
- [24] Zhang J.-R., Chen B., Li W.-K., Zhu J.-J., Jiang L.-P.: Int. J. Mod. Phys. B., **16**, 4479 (2002).
- [25] Martinez-Alvarez O., Miranda-Hernandez M.: Carbon Sci. Tech., **2**, 125 (2009).

Příloha 3

VYUŽITÍ KOMPLEXOTVORNÝCH REAKCÍ PRO VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ AKRYLAMIDU

USING OF COMPLEX REACTIONS IN VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF ACRYLAMIDE

Simona Žabčíková, Libor Červenka, Milan Sýs, Lenka Křivská

Abstract: Cyclic voltammetry (CV) was used for determination of acrylamide using carbon paste electrode (CPE) modified with 10 % RuO₂ with cobalt ions in solution. The experimental conditions have been studied. Optimal electrolytes have been described also as number of scans and scan rate. Method has been successfully applied on model samples with linear response in the concentration range from 0.0001 to 0.01 mol.L⁻¹ of acrylamide (AA) in solution with R²=0.9928. Unfortunately, after preparing of real samples the method cannot be used on it.

Key words: carbon paste electrode, cyclic voltammetry, acrylamide

ÚVOD

Akrylamid (AA) je od roku 1994 Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC – International Agency for Research of Cancer) klasifikován do třídy 2A, tedy jako látka „pravděpodobně karcinogenní pro člověka“. V roce 2002 byl poprvé vysoký obsah AA nalezen v potravinách Švédskou Národní potravinovou správou (NFA – National Food Agency) (**WHO, 2002; Ciesarová et al., 2005**). Hlavním mechanismem vzniku AA v potravinách je Maillardova reakce, kdy dochází k reakci hlavních prekurzorů vzniku AA – mezi aminokyselinou asparaginem a redukcujícím cukrem, glukózou, za teplot přesahujících 120 °C (**Tareke et al., 200; Stadler et al., 2004**). Nejvyšší obsah AA byl nalezen ve smažených bramborových lupíncích a všeobecně výrobcích z brambor. Ve vařených pokrmech nebyl akrylamid nalezen, protože při vaření se nedosahuje teplot vyšších než 100 °C, kdežto u smažení, pečení nebo grilování teplota přesahuje 120 °C, tedy teplotu, při které AA vzniká. Akrylamid se do potravin může dostávat také skrze obalový materiál, při jehož výrobě se akrylamid používá. Vysoký obsah AA byl zaznamenán také v potravinách z pšenice, dále v kávě, olivách a dalších (**Friedman et al., 2003; Ahn et al., 2002**). Obsah AA jako neurotoxické, mutagenní a karcinogenní látky je potřeba v potravinách sledovat. Bylo vyvinuto několik spolehlivých funkčních metod pro detekci AA v potravinách. Patří mezi ně např. analýza AA pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS), případně plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS/MS), dále kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) (**Ahn et al., 2002; Wenzl et al., 2003**). AA lze stanovit také infračervenou spektroskopií (IR), kapilární elektroforézou (CE), imunoenzymatickým testem ELISA nebo elektrochemickými biosenzory. Akrylamid nelze ve vzorcích stanovovat pomocí UV spektrofotometrie, protože v jeho molekule nejsou dostatečně silné dvojně ani trojně konjugované vazby ani aromatický kruh (**Oracz et al., 2011**). Mezi reakce využívané k elektrochemickému stanovení AA patří např. reakce mezi AA a amino skupinou valinu na N konci polypeptidového řetězce hemoglobinu. Hemoglobin lze imobilizovat na povrch uhlíkové pastové elektrody (CPE - Carbon Paste Electrode) (**Stobiecka et al., 2007**), skleněné uhlíkové elektrody (GCE - Glassy Carbon Electrode) nebo tužkové grafitové elektrody (PGE – Pencil Graphite Electrode) pomocí uhlíkových nanotrubiček, nebo také na povrch zlaté nebo skleněné elektrody (**Oracz et al., 2011; Batra et al., 2013**). Nejvyužívanější techniky při elektrochemické analýze AA jsou cyklická voltametrie (CV) a square wave voltametrie (SW), které poskytují informace o průběhu oxidačních a redukčních reakcí v daném systému. Dle článku **Girma et al. (2005)** o koordinační chemii akrylamidu byla zkoušena aplikace tvorby komplexů iontů Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ spolu s akrylamidem a jejich aplikace pro detekci akrylamidu v modelových a reálných vzorcích.

MATERIÁL A METODY

Pro přípravu všech roztoků byla použita redestilovaná voda (Milli-Q systém, Millipore, Francie). Jako elektrolyt byl použit 1 mol.L⁻¹ LiCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a Britton-Robinsonův (BR) pufr o pH 3, 7. Pro přípravu roztoků obsahujících kovový iont byly použity roztoky solí NiCl₂.6H₂O, Fe(NO₃)₃.9H₂O, CoCl₂.6H₂O (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), ZnSO₄.7H₂O

(Penta, Chrudim, Česká republika), $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (DORAPIS, Praha, Česká republika). Roztoky těchto solí byly připravovány v koncentraci $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, k vlastnímu měření byla používána koncentrace $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. Uhlíkové pastové elektrody byly vždy připraveny homogenizací $0,5 \text{ g}$ uhlíkového prášku $5,5 \mu\text{m} - 7,0 \mu\text{m}$ (CR-5, Maziva Týn n. L., s.r.o., Česká republika) a $130 \mu\text{L}$ minerálního oleje (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v třecí misce po dobu 30 min. Vzniklá homogenní pasta byla poté vpravena do teflonového držáku s pístem dle Švancara a Metelka, 2000. Před každým měřením byl povrch CPE o průměru 2 mm obnoven vytlačněním malého množství pasty z držáku

a vyleštěn o navlhčený filtrační papír. Pro přípravu modifikované CPE bylo navíc ke směsi uhlíkového prášku a oleje přidáno 10 % RuO_2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Jako referentní elektroda byla použita argentochloridová elektroda Ag/AgCl/3,0 M KCl (Referentní argentochloridová elektroda, typ 410-25+; ED. spol. s.r.o., Ostrava, Česká republika), jako pracovní elektroda byla použita nemodifikovaná CPE a CPE modifikovaná 10 % RuO_2 v pastě a jako pomocná byla použita platinová elektroda (Platinová elektroda typ Pt 1+L, Elektrochemické detektory, spol. s.r.o., Turnov, Česká republika). K měření bylo použito elektrochemické rozhraní PalmSens (Ivium Technologies, Eindhoven, Nizozemsko). Byla využívána metoda cyklické voltametrie. Všechna měření byla provedena celkem šestkrát. Pro aplikaci metody na reálné vzorky byly použity vzorky Strážnické brambůrky jemně solené (Petr Hobža, Strážnice) a Domácí brambůrky ručně smažené Solené (Milan Rais, Prachovice). Pro přípravu vzorku byla použita modifikace postupu úpravy vzorku Stobiecka et al., 2007. Vzorek bramborových lupínků byl rozmělněn v třecí misce a poté bylo 5 g vzorku vpraveno do Erlenmayerovy baňky. Ke vzorku bylo přidání 50 ml redestilované vody. Suspenze byla ponechána bobtnat po dobu 20 min při pokojové teplotě. Následně byla provedena extrakce v třepačce (TYP T22, Autocentrum, Praha) po dobu 60 min rovněž při pokojové teplotě. Vzorek byl poté vložen do centrifugy (NF 400, stolní centrifuga, Nüve, Ankara, Turecko) po dobu 10 min při otáčkách 4100 rpm. Výsledný supernatant byl vyčeřen Carrezovými činidly a nakonec byl roztok zfiltrován přes skládaný filtr (No. 2, Watmann a.s., Prešov, Slovensko).

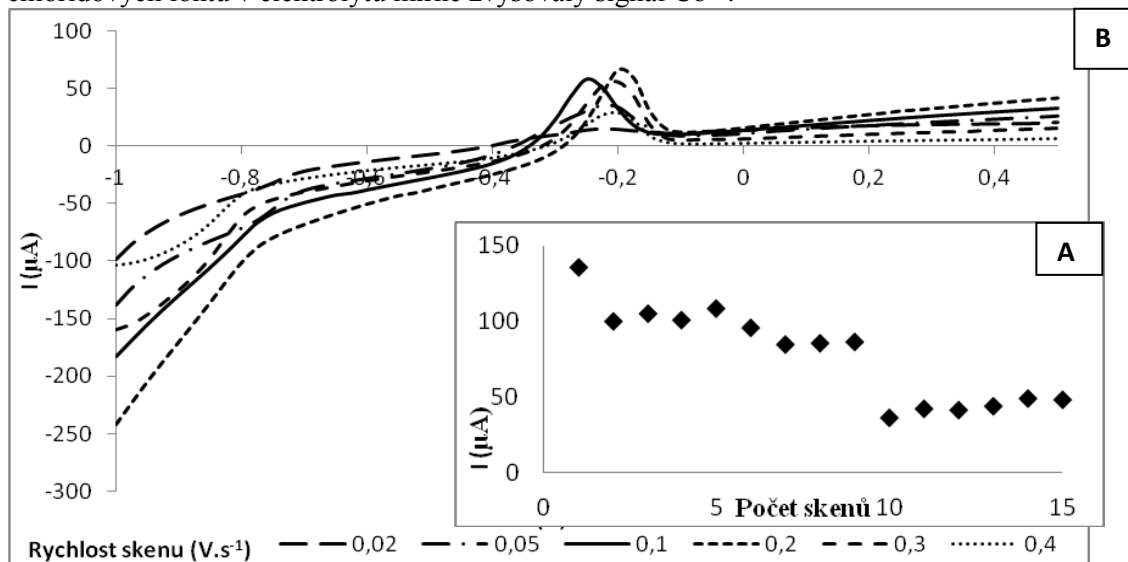
VÝSLEDKY A DISKUSE

V jedné z přechozích publikací Červenka et al., 2015 byla popsána nepřímá metoda stanovení akrylamidu s využitím CPE modifikované RuO_2 . Při této modifikaci CPE při měření cyklické voltametrie byl zaznamenán nejvyšší a nejstabilnější signál při $1,03 \text{ V}$ v prostředí $1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiCl}$ o proudovém výtěžku $1372,3 \pm 89,2 \mu\text{A}$. Horányi and Rozmayer, 1984 popsali adsorpci chloridových iontů na povrch rutheniové elektrody. Signál CPE modifikované RuO_2 odpovídá přeměně redoxního páru Ru (III/IV) , který je v prostředí $1,0 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiCl}$ umocněn interakcí ruthenia s chloridovými ionty. V práci byl testován vliv tvorby komplexu akrylamidu s kovovými ionty pomocí cyklické voltametrie s nemodifikovanou CPE a CPE modifikovanou 10 % RuO_2 jako pracovní elektrody. V případě použití nemodifikované CPE jako pracovní elektrody poskytovaly odezvu v CV ionty kobaltnaté, nikelnaté a zinečnaté, ionty železité a manganaté neposkytovaly odezvu v žádném z testovaných elektrolytů. Ionty zinečnaté a nikelnaté poskytovaly proudovou odezvu v oxidační oblasti pouze v prostředí BR pufru o pH 3. V případě Ni^{2+} byla oxidační vlna při $0,125 \text{ V}$ s proudovým výtěžkem $7,1 \pm 0,1221 \mu\text{A}$. Zinečnaté ionty poskytovaly odezvu při $0,025 \text{ V}$ s proudovým výtěžkem $3,5 \pm 0,8897 \mu\text{A}$. V prostředí BR o pH 7 a 9 nebyla ani u těchto iontů pozorována žádná odezva. Kobaltnaté ionty poskytovaly proudovou odezvu v BR o všech třech testovaných pH (Tab. 1), nicméně vlivem polarizace docházelo při koncentraci kobaltnatých iontů $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ k zanášeni povrchu platinové elektrody. Z tohoto důvodu byla pro další měření koncentrace Co^{2+} snížena na $0,004 \text{ mol.L}^{-1}$. Vlivem snížení koncentrace ovšem došlo k vymizení signálu Co^{2+} v prostředí BR při pH 7 a 9 a ke snížení proudové odezvy v pH 3, proto byla dále použita CPE modifikovaná 10 % RuO_2 pro zlepšení signálu kobaltnatých iontů.

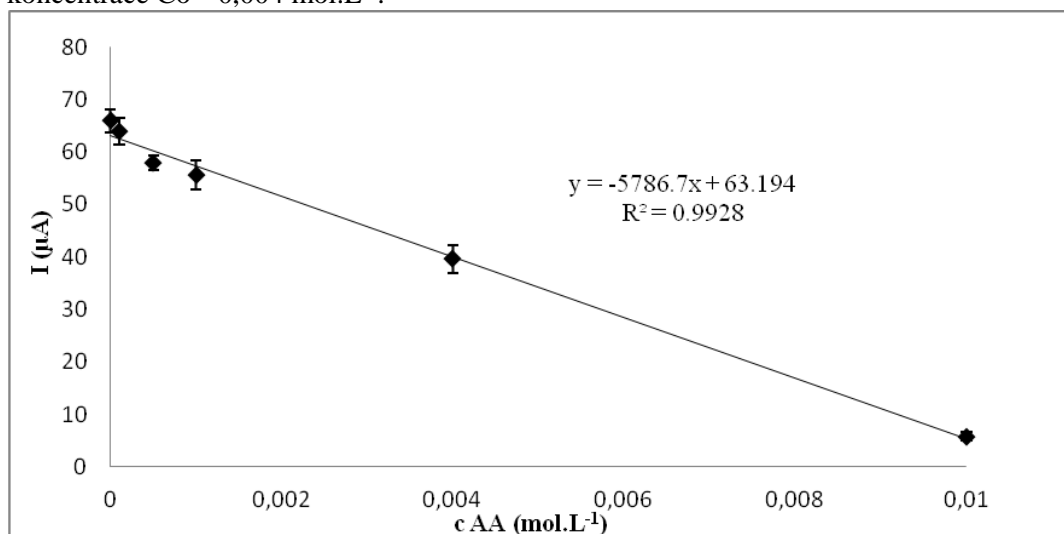
Tabulka 1: Hodnoty potenciálů a proudových výtěžků kobaltnatých iontů v CV s nemodifikovanou pastovou elektrodou při koncentraci $\text{Co}^{2+} 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$.

pH BR	3	7	9
E / V	-0.225	-0.2	-0.275
I / μA	6.1 ± 0.6716	84.3 ± 6.4765	9.8 ± 0.3729

Při použití CPE modifikované 10 % RuO₂ byla zaznamenána oxidační proudová odezva kobaltnatých iontů při potenciálu +0,225 V s proudovým výtěžkem 65,97 μA. Vzhledem k předchozímu testování Červenka et al., 2015 CPE modifikované oxidem rutheničitým byl testován také vliv přítomnosti chloridových iontů v elektrolytu, kde byl použit 1 mol.L⁻¹ LiCl. Tento elektrolyt se ukázal jako nejvhodnější k měření s modifikovanou elektrodou, přičemž prostředí nemělo výrazný vliv na odezvu kobaltnatých iontů, naopak kombinace RuO₂ v uhlíkové pastě s přítomností chloridových iontů v elektrolytu mírně zvyšovaly signál Co²⁺.



Obrázek 1: Optimalizace počtu skenů CV (A) a rychlosti skenu (B). Podmínky měření: elektrolyt: 1 mol.L⁻¹ LiCl, metoda měření: cyklická voltametrie, elektroda použitá k měření: CPE s 10% RuO₂, podmínky CV: E_{start} -1 V, E_{end} +1,4 V, potenciálový skok 0,025 V, rychlost skenu 0,02 – 0,4 V.s⁻¹; koncentrace Co²⁺ 0,004 mol.L⁻¹.



Obrázek 2: Kalibrační závislost proudových výtěžků Co²⁺ v roztoku na obsahu přidaného akrylamidu. Metoda měření: cyklická voltametrie; podmínky měření: elektrolyt: 1 mol.L⁻¹ LiCl, elektroda použitá k měření: CPE s 10 % RuO₂, podmínky CV: E_{start} -1 V, E_{end} +1,4 V, potenciálový skok 0,025 V, rychlost skenu 0,1 V.s⁻¹; koncentrace Co²⁺ 0,004 mol.L⁻¹; koncentrace AA 0 - 0,01 mol.L⁻¹; vybrány 5. skeny CV.

Pro další měření byl optimalizován počet skenů CV a rychlost skenu. Byl vybrán pátý sken z celkového počtu 15 vzhledem k ustáleným hodnotám v 5. skenu a stabilitě signálu. Optimalizace rychlosti skenu byla provedena v rozmezí 0,02 – 0,4 V.s⁻¹ pro proudovou odezvu v oblasti 0,02 – 0,275 V. Nejvyšší proudová odezva Co²⁺ byla zaznamenána při rychlosti skenu 0,02 V.s⁻¹, poté hodnoty proudových výtěžků stoupaly až do hodnoty rychlosti skenu 0,1 V.s⁻¹, kdy začaly opět klesat. Z tohoto důvodu byla pro další měření zvolena rychlost skenu 0,1 V.s⁻¹ (Obrázek 1). Po optimalizaci podmínek měření byl zkoumán vliv přídavku akrylamidu (AA) k roztoku Co²⁺ v elektrolytu. AA byl

přidáván ve výsledných koncentracích 0,0001 – 0,01 mol.L⁻¹. S přidavkem akrylamidu lineárně klesala proudová odezva Co²⁺ iontu (**Obrázek 2**). Tento pokles proudových výtěžků je způsoben vznikem komplexu AA s Co²⁺ ionty. Metoda byla dále aplikována na reálné vzorky bramborových lupínek, v nichž

je předpokládán vysoký obsah AA. Přestože byl systém měření funkční v modelovém vzorku obsahujícím Co²⁺ ionty a AA, v reálném vzorku nebyla zaznamenána proudová odezva odpovídající komplexu AA s Co²⁺. Toto je způsobeno vyčeřením vzorku pomocí Carrezových činidel. Při procesu čiření vzorku dochází působením Carrezových činidel ke tvorbě málo rozpustné sraženiny Zn₄[Fe(CN)₆]. Tato sraženina se vyznačuje vysokou molekulovou hmotností, díky čemuž se nečistoty, pokud nejsou vysráženy, váží na její povrch. Sraženina s nečistotami je poté odstraněna centrifugací a filtrací. Vedlejším produktem je ve vodě rozpustný síran draselný, který je schopen reagovat s Co²⁺ ionty přítomnými v roztoku a tvořit síran kobaltnatý, který neposkytuje za daných podmínek CV žádnou odezvu. Řešením by mohla být jiná metoda úpravy vzorku pro měření. Vzhledem k vysoké rozpustnosti AA ve vodě by mohla být využitelná varianta metody úpravy vzorku pouze vyluhováním vzorku ve vodě s následnou filtrací a centrifugací, s vynecháním kroku čiření pomocí Carrezových činidel.

LITERATURA

- Ahn J.S., Castle L., Clarke D. B., Lloyd A. S., Philo M. R., Speck D. R. 2002. Verification of the findings of acrylamide in heated foods. *Food Addit Contam*, 19, 1116 – 1124.
- Batra B., Lata S., Sharma M., Pundir C. S. 2013. An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film, *Anal Biochem*, 433, 210 – 217.
- Ciesarová Z. 2005. Minimálizácia obsahu akrylamidu v potravinách, *Chem. Listy*, 99, 483 – 491.
- Červenka L., Žabčíková S., Krivská L. 2015. Determination of acrylamide using ruthenium dioxide modified carbon paste electrode, *Sci. Pap. Univ. Pardubice*, 21, 21 – 29.
- Friedman M. 2003. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 4504 - 4526.
- Girma K. B., Lorenz V., Blaurock S., Edelmann F. T. 2005. Coordination chemistry of acrylamide, *Coordin Chem Rev*, 249, 1283 – 1293.
- Horányi G., Rizmayer E. M. 1984. A study of the adsorption of chloride ions at ruthenium electrodes, *J Electroanal Chem*, 181, 199 – 208.
- Oracz J., Nebesny E., Zyżelewicz D. 2011. New trends in quantification of acrylamide in food products, *Talanta*, 86, 23 – 34.
- Stadler R. H., Scholz G. 2004. Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanism of Formation, and Potential Strategies of Control. *Nutr Rev*, 62, 449 – 467.
- Stobiecka A., Radecka H., Radecki J. 2007. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples, *Biosens Bioelectron*, 22, 2165 – 2170.
- Švancara, I., Metelka, R. 2000. Piston-driven carbon paste holders for electrochemical measurements. In: Vytřas, K. and Kalcher, K. Eds., *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 1, University of Pardubice, Pardubice, 7-18.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M. 2000. Acrylamide: A Cooking Carcinogen?, *Chem. Res. Toxicol.*, 517 – 522.
- Wenzl T., De La Calle M. B., Anklam E. 2003. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review, *Food Addit Contam*, 20, 885 – 902.
- WHO, 2002. WHO to hold urgent expert consultation on acrylamide in food after findings of Swedish National Food Administration [online] s.a. [cit.2017-01-16] Dostupné na: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/release32/en/>

Kontaktní adresa: Ing. Simona Žabčíková, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie; Studentská 573, 532 10 Pardubice; simona.zabcikova@student.upce.cz
Doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D., Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie; Studentská 573, 532 10 Pardubice; libor.cervenka@upce.cz
Ing. Milan Sýs, Ph.D., Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie; Studentská 573, 532 10 Pardubice; m.sys@seznam.cz
Ing. Lenka Krivská, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie; Studentská 573, 532 10 Pardubice; lenka.krivska@student.upce.cz

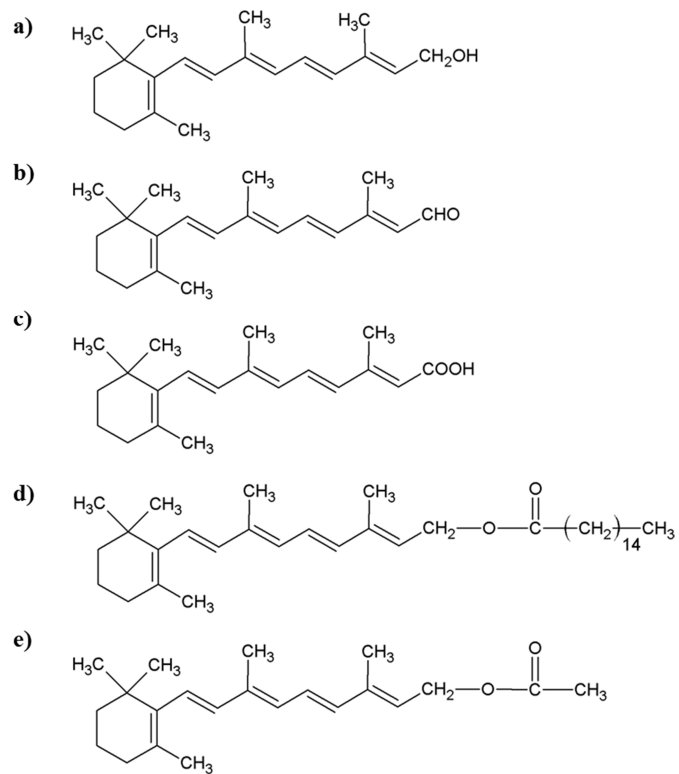
4 Elektrochemické stanovení vitamínů

Vitamíny představují různorodou skupinu organických látek majících charakter esenciálních živin. Lidský organismus si je, až na výjimky, není schopen sám vyrobit, proto je musí získávat z potravy. Funkcí vitamínů v lidském těle je hned několik. Zajišťují katalytické procesy v organismu, tedy napomáhají vstřebávání látek v organismu. Účastní se také metabolických procesů cukrů, tuků i bílkovin. Vitamíny mají prokazatelný vliv na imunitní systém, jsou nezbytné pro správnou funkci organismu a mohou také ovlivnit léčbu některých onemocnění. Při nedostatku vitamínů, hypovitaminóze, dochází k poruchám organismu, které mohou v krajních případech vést až k onemocnění. Hypovitaminóza může být zapříčiněna špatnými stravovacími návyky či onemocněním, kdy organismus není schopen vitamín vstřebávat. Opakem hypovitaminózy je hypervitaminóza, tedy nadbytek vitamínu v organismu. K tomuto jevu může docházet při nadměrné konzumaci vitamínů, nicméně je to stav reverzibilní, a po redukci obsahu vitamínu ve stravě samovolně odezní. Extrémní nedostatek vitamínu v organismu je označován jako avitaminóza. K tomuto může docházet v případě poruchy vstřebávání organismu, ale také díky dlouhodobému nedostatku vitamínu ve stravě. Nedostatek určitého vitamínu vede k různým onemocněním, například nedostatek vitamínu B₃, niacinu, vede k pelagře, vitamínu A k šerosleposti, vitamínu C ke kurdějím, atd. Vitamíny se dělí na vitamíny rozpustné ve vodě (B, C a H) a vitamíny rozpustné v tucích, kam patří vitamíny A, D, E a K [93].

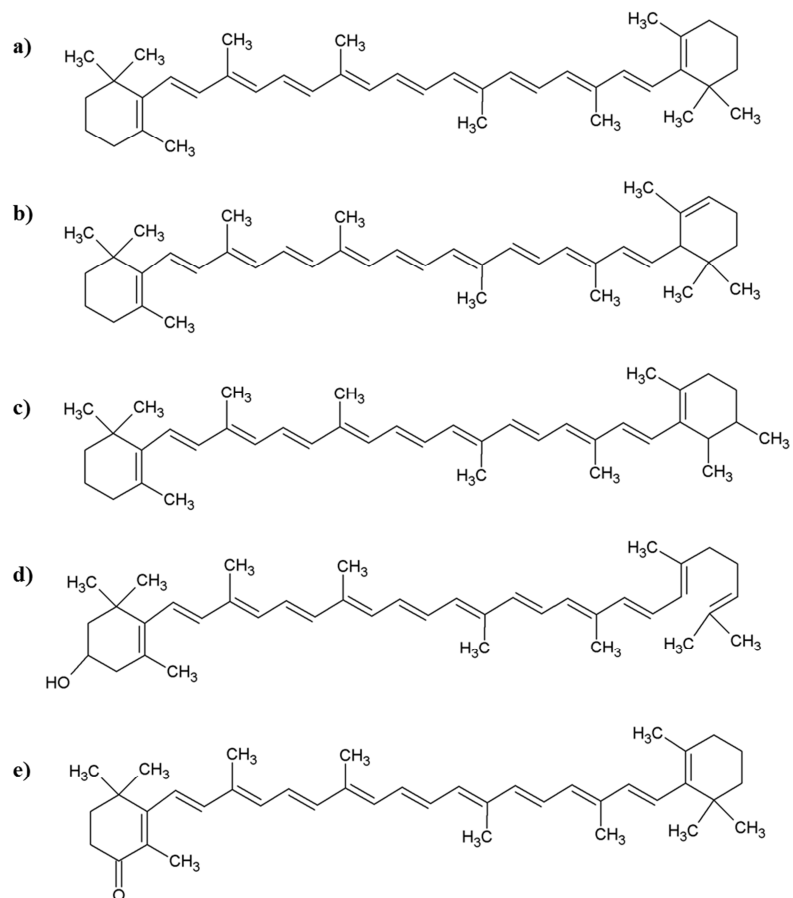
4.1 Vitamíny rozpustné v tucích

4.1.1 Vitamín A

Vitamín A je označení pro skupinu látek odvozených od retinolu. Látky vykazující aktivitu vitamínu A jsou obecně nazývány retinoidy. Patří zde retinol, jeho estery a karotenoidy. Nejvýznamnější látkou z této skupiny je *all-trans*-retinol nesoucí označení vitamín A₁. Látky vykazující aktivitu vitamínu A musí být strukturně podobné retinolu, musí obsahovat alespoň jeden β -jononový cyklus a isoprenoidní postranní řetězec s alkoholovou, aldehydovou nebo karboxylovou skupinou vázanou na jeho konci (obrázek 7). Aktivitu vitamínu A vykazují také další přírodní látky, karotenoidy, které jsou označovány jako provitamín A. Tyto látky jsou *in vivo* transformovány metabolickými procesy na retinol nebo jeho estery, které může organismus využívat. Nejvýznamnějším provitamínem A je β -karoten (obrázek 8), který je často doprovázen také α - a γ -karotenem, β -kryptoxanthinem, echinenonem, a dalšími.



Obrázek 7: Vitamín A. a) all-*trans*-retinol, b) retinal, c) kyselina retinová, d) retinyl palmitát, e) retinyl acetát.



Obrázek 8: Provitamíny A. a) β -karoten, b) α -karoten, c) γ -karoten, d) β -kryptoxanthin, e) echinenon.

Karotenoidy významně přispívají k aktivitě vitamínu A jak v potravinách živočišného, tak rostlinného původu. Celkem je známo asi 600 karotenoidních sloučenin, z nichž asi 50 je považováno za provitamín A. Aktivita karotenoidů jako provitamínu A je závislá na struktuře molekuly, respektive na počtu β -jononových cyklů. Provitamínová aktivita klesá, pokud je v molekule karotenoidu přítomen pouze jeden tento cyklus (β -karoten má dva), a karotenoid se stává neaktivním v případě, že oba cykly jsou okysličené. Retinol může být v potravinách přítomen ve formě různých strukturně se lišících analogů a metabolitů. V potravinách živočišného původu se vyskytuje převážně retinol a jeho estery, retinal a kyselina retinová. Nejvyšší koncentrace vitamínu A je v játrech. Vitamín A₂, 3-dehydroretinoid, se vyskytuje převážně v rybách. Retinoidy jsou využívány k fortifikaci (obohacení) potravin či ve farmacii. Pro fortifikaci mléčných produktů je používáno především retinyl palmitátu (RP) [94]. Retinoidy a karotenoidy jsou náchylné k degradaci působením vzdušného kyslíku, světla, vlivem vysokých teplot, ale ke ztrátám účinnosti dochází také v přítomnosti volných radikálů. *All-trans*-retinoidy mohou vlivem vysokých teplot přecházet na *cis* izomery, a tak ztrácet svou vitamínovou aktivitu. Hodnocení aktivity retinoidů a provitamínů A je založeno na základě ekvivalentních jednotek retinolu. Je uvažováno, že jednomu miligramu retinolu odpovídá 12 mg β -karotenu nebo 24 mg karotenoidu majícího ve své molekule jen jeden β -jononový cyklus [93, 94]. Nedostatek vitamínu A vede k šerosleposti, případně k nevratné slepotě, ovlivňuje také imunitní systém a reprodukci, může způsobovat potraty či špatný vývoj plodu. Nedostatkem vitamínu A trpí především děti a adolescenti v rozvojových zemích. Nadbytek vitamínu A ovšem může také vést k teratogenezi [95-97].

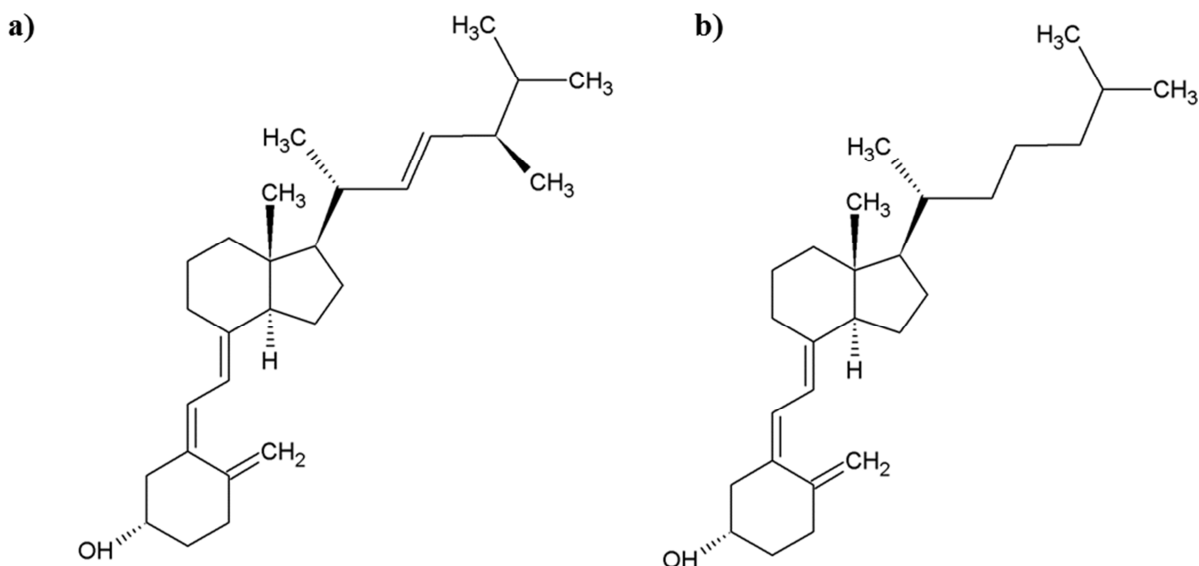
Retinoidy lze díky jejich konjugovanému systému dvojných vazeb stanovovat spektrofotometricky v UV spektru, naproti tomu karotenoidy se stanovují ve viditelné oblasti. Retinoidy i karotenoidní provitamíny A jsou díky své nepolární struktuře silně lipofilní látky a tedy asociují s tukovými složkami. V potravinách tedy může docházet k jejich zadržování v tukové fázi a tak k falešně negativním výsledkům. Navíc v průběhu zpracování potravin může docházet k izomeraci retinoidů, kterou tyto metody nejsou schopny zachytit. Při použití vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) ke stanovení vitamínu A je naopak možné zachytit množství jednotlivých retinoidů. HPLC je pro stanovení vitamínu A nejčastěji využívána ve spojení s UV detektorem, kdy vitamín A absorbuje při 310 až 328 nm. Základem této metody je saponifikace vzorku v zásaditém roztoku etanolu a vody s následnou neutralizací a zředěním, kdy dojde k přeměně retinoidů na retinol a tuků na mastné kyseliny [98-101]. Specifické úpravy této metodiky jsou považovány za referenční pro stanovení vitamínu A v margarínech, krmivech a dalších potravinách, retinyl palmitátu jako

fortifikačního činidla v mléce, atd. Jako vnitřního standardu je využíváno retinyl acetátu (RA) z důvodu podobných fyzikálních a chemických vlastností a vhodného retenčního času [94]. Stanovení vitamínu A a retinoidů je obecně složitý proces vzhledem k přirozenému výskytu jejich mnoha chemických forem [93]. Vitamín A v krevním séru může být také stanovován pomocí kapilární zónové elektroforézy s fluorescenční detekcí [96]. Vitamín A lze stanovovat elektrochemicky na různých typech elektrod s využitím různých elektrolytů. Při elektrochemickém stanovení vitamínu A nedochází k interakci s vitamínem D ani s ostatními lipofilními vitamíny, protože hodnoty E_p jednotlivých vitamínů jsou v dostatečné vzdálenosti a lze je dobře rozlišit [102, 103]. Přestože jednotlivé retinoidy mají odlišné E_p za podmínek metody, v analýze reálného vzorku je od sebe nelze rozlišit, jako např. v HPLC, protože hodnoty potenciálů nejsou dostatečně vzdálené a odpovídající vlny se slévají v jednu, je tedy stanovována jejich suma [104]. Podrobnější elektrochemické chování vitamínu A je popsáno v kapitole 4.1.5.

4.1.2 Vitamín D

Vitamínem D jsou označovány lipofilní analogy sterolů, cholekalciferol (D_3) a ergokalciferol (D_2) (obrázek 9). Cholekalciferol je vytvářen v kůži z provitamínu 7-hydrocholesterolu působením slunečního záření. Dietetická potřeba vitamínu D je tedy spjata s vystavením organismu slunečnímu záření, jeho nedostatek se tedy častěji projevuje v zimním období [105]. Ergokalciferol vzniká v rostlinách rovněž působením UV záření z provitamínu ergosterolu. Vitamín D_3 se vyskytuje převážně v potravinách živočišného původu. Bylo prokázáno, že obsah vitamínu D v krmivech hospodářských zvířat ovlivňuje finální obsah vitamínu v mase [106]. V rostlinných zdrojích (mrkev, zelí, špenát, houby) se vyskytuje ergosterol, ze kterého vlivem slunečního záření vzniká ergokalciferol. Ergosterol je také hlavním steroidem plísní a kvasinek. V průběhu zpracování potravin dochází k poklesu účinnosti vitamínu, podobně jako dalších lipofilních vitamínů. Míra degradace je závislá jak na druhu potraviny, tak na způsobu skladování a tepelné úpravě. Při tepelné úpravě dochází k největším úbytkům vitamínu při pečení (zhruba 60 %), při smažení či vaření je úbytek menší, asi 20 % [107]. Velký vliv na degradaci vitamínu D má také UV záření, kdy např. v mléce dochází k úbytku až o 50 % za 12 dnů. Nedostatek vitamínu D vede ke křivici, tj. ke kosterním změnám, deformaci či měknutí již vyvinutých kostí, má vliv na vstřebávání vápníku a fosforu v organismu. Doporučená denní dávka (DDD) vitamínu D je 10 μg

u dětí a 2,5 – 5 µg u dospělých osob [108]. Několik studií zabývajících se hodnocením příjmu vitamínu D došlo k závěru, že celkově je příjem nižší než DDD, a to hlavně v evropských zemích a u dětí [105, 109-111]. Dlouhodobý nadbytek vitamínu D může způsobit hromadění vápníku v plicích, srdci, apod. K fortifikaci potravin, převážně margarínů, mléka a snídaňových cereálií, je používán vitamín D₂. Byla také studována metoda fortifikace mléka pomocí vitamínu D₃ zapouzdřeném ve škrobových nanočásticích [112]. V klinické praxi se pro stanovení vitamínu D v biologických matricích využívá 25-hydroxyvitamin D (25-OHD), což je metabolit vznikající z vitamínu D *in vivo*, přičemž z cholekalciferolu vzniká 25-hydroxyvitamin D₂ (25-OHD₂) a z ergokalciferolu 25-hydroxyvitamin D₃ (25-OHD₃). K tomuto stanovení je využíváno především HPLC a LC-MS/MS. Lze využít také biochemické a imunologické metody, jako např. radioimunologickou analýzu, nicméně tyto metody mají nízkou citlivost a nejsou schopny rozlišit 25-OHD₂ a 25-OHD₃ [113, 114]. Při všech těchto stanoveních je potřeba metabolity vitamínu D nejprve oddělit od transportního proteinu pomocí vysrážení a následné extrakce. Pro stanovení 25-OHD pomocí HPLC lze použít elektrochemickou detekci, častěji je však používána detekce UV při 265 nm [115]. Metoda LC-MS/MS je pro stanovení vitamínu D nejlepší, je možné rozlišit jednotlivé metabolity, nicméně je potřeba složitá úprava vzorku či derivatizace [114, 116, 117]. Při stanovení vitamínu D v potravinách je potřeba odstranit matricový efekt, tedy vyextrahovat vitamín z tukových látek. Toho je docíleno převážně díky zmýdelnění tuků pomocí alkalického hydroxidu s organickým rozpouštědlem a následná extrakce organickými rozpouštědly s případným přečištěním extraktu vzorku [93, 118]. Pomocí LC-MS/MS lze také stanovit jednotlivé analogy vitamínu D vedle sebe s využitím zmýdelnění a extrakce po vysrážení bílkovin [119]. Vitamín D lze stanovit elektrochemicky v organických, vodných i vodně organických roztocích, kdy podléhá ireversibilní jednoelektronové oxidační reakci. Elektrochemické metody stanovení vitamínu D jsou dále uvedeny v kapitole 4.1.5.

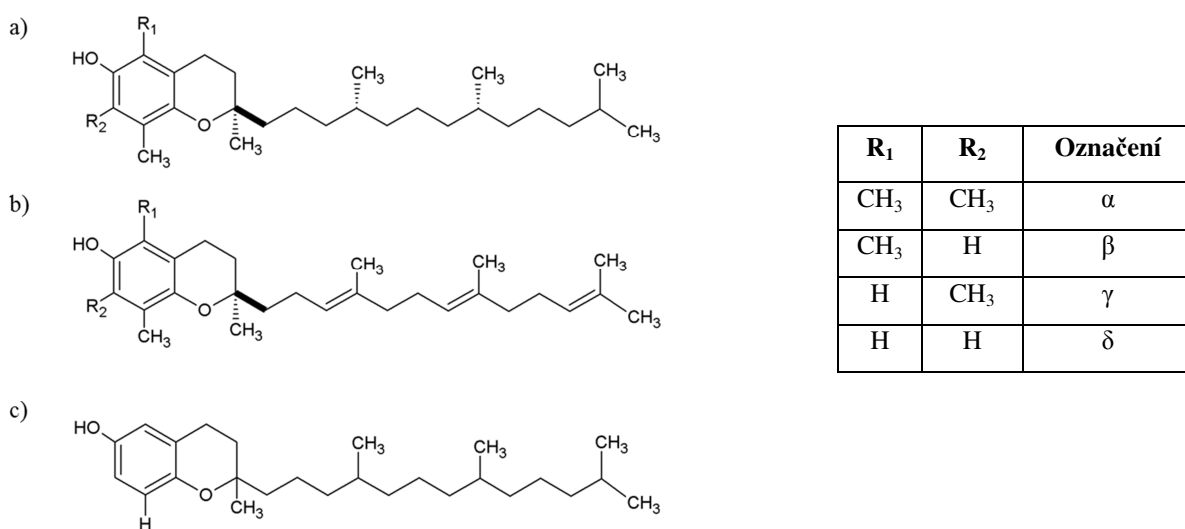


Obrázek 9: Vitamín D. a) ergokalciferol – vitamín D₂, b) cholekalciferol – vitamín D₃.

4.1.3 Vitamín E

Jako vitamín E jsou označovány deriváty tokolu vykazující vitamínovou aktivitu, tokoferoly a tokotrienoly. Obě tyto látky mohou být označovány jako α , β , γ a δ v závislosti na funkčních skupinách vázaných na pozicích 5', 7' a 8' chromanového kruhu v molekule tokolu (obrázek 10). α -tokoferol vykazuje nejvyšší vitamínovou aktivitu [120]. Je to přirozený stereoisomer vyskytující se převážně v potravinách rostlinného původu, obsah v potravinách živočišného původu je závislý na jeho obsahu v krmivu zvířat [121]. Ostatní isomery tokoferolu a tokotrienolu se vyskytují převážně v potravinách rostlinného původu a mají nižší vitamínovou aktivitu v porovnání s α -tokoferolem. Tokotrienoly mají nižší biologickou aktivitu v porovnání s α -tokoferolem díky přítomnosti dvojných vazeb v postranním řetězci. Tokoferoly a tokotrienoly jsou velmi nepolární látky, relativně stabilní v nepřítomnosti kyslíku a oxidačních lipidů vyskytujících se pouze v tukové fázi, a mají vysoké antioxidační účinky. Syntetický α -tokoferol acetát je používán k fortifikaci potravin, převážně rostlinných olejů, a kosmetických výrobků. Jedná se o racemickou směs všech možných stereoisomerů α -tokoferolu, nazývá se také *all-rac- α -tokoferol*. α -tokoferol je používán ke snižování tvorby nitrosaminů v uzeninách. V průběhu skladování a zpracování potravin dochází ke ztrátám vitamínu E v závislosti na podmínkách, jako jsou čas, teplota a vlhkost. Největší podíl na jeho degradaci v průběhu skladování je přisuzován přirozené oxidaci lipidů a jeho antioxidačním vlastnostem. Všeobecně lze říci, že ke ztrátám dochází při jakékoli manipulaci s potravinami,

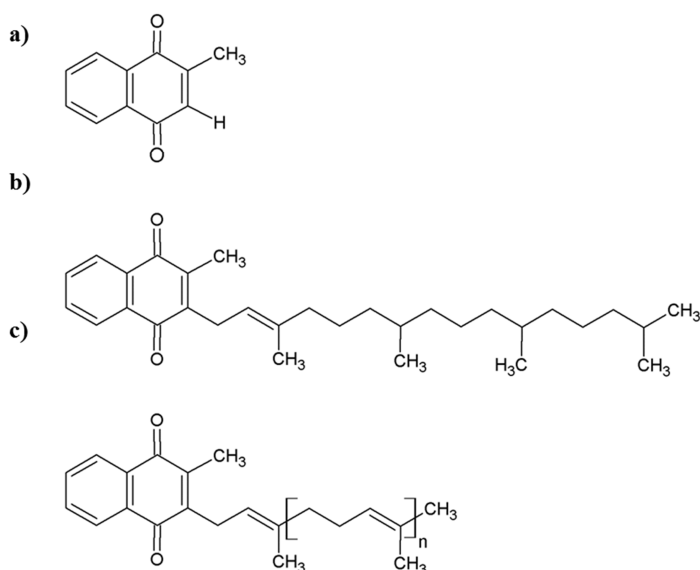
při vaření, pečení, smažení, sušení, mražení, apod. Vitamín E slouží k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, zpomaluje proces stárnutí buněk. Potřebu vitamínu pokrývají převážně rostlinné oleje, nicméně důležitým zdrojem je také maso, mléko a mléčné výrobky, ovoce a zelenina. K hypovitaminóze téměř nedochází, a když, je způsobena převážně metabolickými či genetickými poruchami, projevuje se degenerativními nervovými a svalovými změnami [93, 121, 122]. Pro oddělení tuků od vitamínu E je používána saponifikace, kdy dojde k alkalické hydrolýze všech esterů vitamínu E na α -tokoferol. Při stanovení musí být brán zřetel na možné oxidační reakce při úpravě vzorku. Při reakci vitamínu E s volnými radikály dochází ke vzniku oxidovaného tokoferoxylového radikálu, který je možné převést zpět na tokoferol působením kyseliny askorbové (vitamín C) [122]. Vitamín E byl dříve stanovován metodou GC. Ve většině případů je pro GC stanovení vitamínu E nutno převést tokoferoly a tokotrienoly derivatizací na trimethylsilylery. Ke stanovení vitamínu E v potravinách, biologických matricích i kosmetických výrobcích je využívána LC a převážně HPLC s UV, fluorescenční nebo ampérometrickou detekcí. Kapalinová chromatografie může probíhat na obrácených i normálních fázích [93, 98, 101, 121, 123-126]. Elektrochemické chování vitamínu E bylo popsáno v mnoha studiích. Oxidačně redukční mechanismus reakce tokoferolu je závislý na obsahu vody v elektrolytu a na jeho pH. Základem je dvouelektronová oxidace α -tokoferolu (α -TOH) za vzniku diamagnetického kationtu α -TO⁺, který je pak zpětně redukován opět dvouelektronovou reakcí na α -TOH. Jedná se o reversibilní reakci. Meziproduktem oxidační reakce je vznik radikál kationtu α -TOH^{•+}, který má dlouhou životnost. Pokud je v elektrolytu přítomno větší množství vody, dochází ke vzniku meziprojektu nazývaného hemiketal (α -TOQ-OH).



Obrázek 10: Vitamín E. a) tokoferol, b) tokotrienol, c) tokol.

4.1.4 Vitamín K

Do této skupiny patří deriváty menadionu, fylochinon (K_1) a menachinon (K_2) (obrázek 11). Jedná se o látky vycházející z naftochinonů s postranním řetězcem izoprenových jednotek v poloze 3'. Menadion je nesubstituovaný naftochinon (v poloze 3 má pouze metylovou skupinu), někdy může být označován jako vitamin K_3 . Je to syntetická forma vitamínu K využívána pro fortifikaci potravin a krmiv. Fylochinon je tvořen v rostlinách, velké množství je obsaženo v listové zelenině včetně špenátu či zelí. Menachinon je produktem střevní mikroflóry. Vitamín K přispívá při léčbě osteoporózy, podporuje tvrdost kostí. Nedostatek vitamínu K je u zdravých jedinců velmi výjimečný, právě díky tvorbě vitamínu K_2 v tlustém střevě. Může k němu docházet v případě onemocnění jater nebo při užívání léku proti srážlivosti krve. V případě nedostatku vitamínu K dochází k projevům poruchy srážlivosti krve. Vitamín K je relativně stabilní vůči teplotě, k degradaci může docházet vlivem světla. Ke stanovení vitamínu K lze využít spektrofotometrických metod, nicméně pro stanovení jednotlivých forem je používána metoda HPLC ve spojení s UV, fluorescenčními, elektrochemickými, chemiluminiscenčními i hmotnostními detektory [79, 93]. Chemiluminiscence vitamínu K je považována za specifickou reakci s luminolem bez přítomnosti oxidačních činidel či katalyzátorů reakce. Homology vitamínu K jsou nejprve vystaveny UV záření v prostředí imidazolového pufru a poté smíchány s derivátem luminolu. Výsledná chemiluminiscence je pozorovatelná po dobu 10 min, a pravděpodobně lze dále prodloužit přidavkem vhodných oxidačních činidel či katalyzátorů [79, 127].



Obrázek 11: Vitamín K. a) menadion, b) fylochinon – vitamin K_1 , c) menachinon – vitamin K_2 ($n = 0-13$).

4.1.5 Elektrochemické stanovení vitamínů rozpustných v tucích

Vzhledem k povaze lipofilních vitamínů je žádoucí jejich stanovení provádět ve směsných vodně-organických nebo čistě organických elektrolytech. V tomto případě je ovšem použití CPE i některých dalších elektrod omezeno obsahem organické složky v elektrolytu. Přesto bylo vyvinuto několik metod pro jejich stanovení, například přímé voltametrické stanovení lipofilních vitamínů s využitím GCE v prostředí 0,05 M chloristanu lithného ve směsi methanol/benzen 2:1 [102], stanovení retinolu a vitamínu E pomocí GCE modifikované MWCNTs v prostředí 0,1 M HClO₄ v acetonitrilu [128], voltametrické stanovení retinyl palmitátu a dalších lipofilních vitamínů v prostředí 0,1 M HClO₄ a CH₃COONa v ACN s použitím Pt elektrody [129], a další. Elektrodová oxidační reakce retinolu nebyla dosud jasně objasněna. Zpočátku bylo usuzováno na reakci $2e^-/2H^+$ [128]. Na základě podobného elektrochemického chování esterů retinolu se však pravděpodobně jedná o ireversibilní reakci $2e^- + H^+$, přičemž retinoidy poskytují oxidační pík v oblasti +0,500 V až +0,900 V v závislosti na použitém elektrolytu a pracovní elektrodě [2, 21, 130-133].

Pro stanovení vitamínu D lze využít rotující GCE v methanolickém roztoku LiClO₄ [134], kdy vitamín D poskytuje proudovou odezvu v oblasti +1,100 V, podobného výsledku bylo dosaženo při použití GCE v methanolickém octanovém pufru [135]. Cha et al. (2014) zkoumali elektrochemické chování vitamínů D₂ a D₃ v prostředí dichlormethanu a acetonitrilu pomocí CV a SWV s využitím Pt a GC diskové elektrody. Vitamín D poskytoval oxidační pík v oblasti +0,800 V. Cholekalciferol vykazoval oxidační pík při hodnotě +0,790 V na GC a +0,801 V na Pt elektrodě, ergokalciferol poskytoval pík při hodnotě potenciálu +0,785 V na GC a +0,801 V na Pt. Tyto velice podobné hodnoty potenciálů neumožňují rozlišení jednotlivých forem vitamínu D. Jsou-li přítomny ve vzorku obě formy vitamínu, jsou stanovovány jako suma s potenciálem píku okolo +0,820 V [136].

Vitamín E se projevuje na GCE i GCPE oxidačně redukční reakcí, α -TO⁺ poskytuje oxidační pík při +0,535 V a redukční při +0,440 V [131, 137, 138]. Podobných výsledků bylo dosaženo také ve studii Giacomelli et al., (2004) a Tan et al., (2011) [139, 140]. V případě použití organického rozpouštědla, tedy bezvodého prostředí, dochází k posunu potenciálů k pozitivnějším hodnotám (oxidační pík +0,860 V s odpovídajícím redukčním píkem +0,600 V na GCE). Toto pravděpodobně odpovídá vzniku oxidačního produktu α -TOH²⁺ a jeho zpětné redukci na α -TOH [137]. Elektrochemické stanovení tokoferolů bylo realizováno s využitím různých druhů elektrod, elektrolytů i metod. Platinová elektroda

v čistě organickém směsném rozpouštědle byla úspěšně aplikována na stanovení tokoferolů v olejích pomocí DPV, přičemž hodnoty potenciálů pro α -, γ - a δ -tokoferol se lišily (+0,550 V, +0,700 V a +0,750 V) [141]. Přestože $E_{1/2}$ pro jednotlivé tokoferoly jsou relativně odlišné, je-li ve vzorku přítomna více než jedna jeho forma, nelze je od sebe při elektrochemickém stanovení rozlišit. V důsledku blízkých hodnot potenciálů dojde ke vzniku jednoho širokého píku, který může mít více vrcholů. Takovýto pík však lze velmi špatně vyhodnotit [142, 143]. Při stanovení vitamínu E na GCE v organickém prostředí (hexan-methanol 40:60) lze rozlišit α - a δ -tokoferol (+0,500 V a +0,650 V), nicméně píky pro β - a γ -tokoferol se překrývaly (+0,570 V) [144]. Byla vyvinuta metoda pro DPV stanovení vitamínu E pomocí GCE v prostředí 0,1 M NaClO₄ v acetonitrilu, kdy byl detekován pík α -tokoferyl acetátu při +1,750 V [145]. Vitamín E jako sumu tokoferolů lze stanovit v potravinářských vzorcích (olejích) pomocí ExS-SWV s využitím GCPE v prostředí 0,1 M HNO₃, kdy je vitamín extrahován do silikonového oleje použitého jako pastového pojiva při výrobě GCPE. Tato metoda dosahuje podobných výsledků ve srovnání se standardní metodou HPLC [146]. Uhlíková pastová elektroda modifikovaná DNA byla použita pro SWV stanovení α -tokoferolu v sójovém oleji [147]. Vitamín E lze také stanovit pomocí CPE modifikované tenzidy [2, 148].

Elektrochemické stanovení vitamínu K bylo dříve zkoumáno na rtuťových elektrodách v prostředí vodně-methanolického elektrolytu, kdy vitamín K poskytoval redukční pík v oblasti -0,300 V [149, 150]. Jak vitamín K₁ tak K₂ vykazují dvouelektronovou reversibilní oxidačně redukční reakci. Jedná se v zásadě o známý redoxní systém chinon/hydrochinon. Hodnoty $E_{1/2}$ obou oxidačně redukčních píků vitamínu K jsou závislé na obsahu vody v elektrolytu, přičemž se posouvají k pozitivnějším hodnotám se zvyšujícím se obsahem vody. Vzhledem k tomu, že redukční pík vitamínu K je ve stejné oblasti jako redukční pík kyslíku, je nutné jej před analýzou odstranit ze vzorku vyubláním roztoku inertním plynem [131].

Současné stanovení všech lipofilních vitamínů bylo v modelovém i reálném vzorku provedeno na GCE (**příloha 4**). Jako standardy pro optimalizaci metody byly na základě nejčastějšího výskytu v potravinách vybrány retinol (vitamín A₁), (+)- α -tokoferol (vitamín E), fylochinon (vitamín K₁) a cholekalciferol (vitamín D₃). Stanovení bylo provedeno na GCE metodou adsorptivní rozpouštěcí voltametrie v kombinaci s cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií. AdSV spočívá ve dvou krocích, kdy v prvním je analyt adsorbován na povrch pracovní elektrody a ve druhém je naadsorbovaná látka rozpouštěna zpět do roztoku. Adsorpce byla provedena v prostředí 50 % ACN s obsahem 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ každého

z vitamínů. Elektroda byla ponořena do roztoku standardu a adsorpce probíhala po dobu 10 min v míchaném roztoku o otáčkách míchadla 400 rpm. Následně byla provedena CV v ACB o pH 4,5 při podmínkách $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $sr = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ s pěti opakováními pro studium elektrochemického chování vitamínů. Vitamín A₁, retinol, poskytoval oxidační pík v oblasti +0,708 V, který se v následujících cyklech již neobjevil. Toto odpovídá ireverzibilní reakci $2 e^-/2 H^+$. S každým cyklem rostla základní linie, což je přisuzováno zanesení povrchu GCE oxidačními produkty reakce. Cholekalciferol (vitamín D₃) poskytoval oxidační pík při +1,032 V, ale stejně jako retinol pouze v prvním skenu CV. Vitamín E (α-tokoferol) poskytoval reverzibilní dvouelektronovou oxidačně redukční reakci. Vitamín K₁ (fylochinon) se vyskytuje ve své oxidované formě. Pro současné stanovení s dalšími vitamíny bylo potřeba provést nejprve elektrochemickou redukci fylochinonu na fylohydrochinon. Samotný K₁ poskytoval v ACB o pH 4,5 na GCE oxidačně redukční reakci s potenciály píků $E_{p,a} = -0,006 \text{ V}$ a $E_{p,k} = -0,325 \text{ V}$. Pro zajištění redukčního kroku před simultánní analýzou byla provedena depozice při potenciálu -0,6 V po dobu 120 s. Tento krok nijak neovlivňoval oxidační stanovení ostatních vitamínů, proto bylo možné provést následné stanovení všech čtyř vitamínů v jednom kroku. Pro stanovení lipofilních vitamínů vedle sebe byla použita metoda DPV. AdSV probíhala v prostředí 25 % ACN s 100 μmol.L⁻¹ každého vitamínu po dobu 10 min při 400 rpm. Vlastní analýza byla poté provedena v ACB o pH 4,5 za podmínek $E_{\text{dep}} = -0,600 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $sr = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Jednotlivé vitamíny poskytovaly oxidační píky při potenciálech dostatečně vzdálených pro jejich rozlišení (fylochinon -0,015 V, tokoferol + 0,337 V, retinol + 0,737 V a cholekalciferol + 1,074 V; **příloha 4**, obrázek 4). Metoda byla aplikována na vzorek margarínu běžně dostupného v maloobchodních řetězcích v ČR. Úprava vzorku zahrnovala pouze rozpuštění v 25 % ACN. Přestože výrobce deklaroval obsah vitamínu A 800 μg/100g a vitamínu D 7,5 μg/100g, ve vzorku byly pomocí DPV nalezeny vitamíny K a E. Toto je pravděpodobně způsobeno složením margarínu. Margaríny jsou vyráběny ztužením rostlinného tuku. Často pro jejich výrobu bývá použito směsi různých druhů olejů, a to kvůli různému zastoupení mastných kyselin v nich obsažených. Vitamín E v reálném vzorku neposkytoval tak ostrý pík jako standard, byly viditelné dva vrcholy (**příloha 4**, obrázek 5). Toto bylo způsobeno zastoupením jednotlivých forem vitamínů v reálných maticích, které od sebe nelze elektrochemicky rozlišit vzhledem k blízkým hodnotám potenciálů.

Vzhledem k nízké citlivosti AdSDPV na GCE byla podobná studie provedena na CPE/MWCNTs, CPE/grafen a GCPE (**příloha 5**). Pro zhodnocení citlivosti metody byl vybrán jako standard retinol, který je zástupcem biologicky aktivních retinoidů běžně se

vyskytujících v potravinách. CPE pro přípravu modifikovaných elektrod byla připravena standardním postupem, smícháním uhlíkového prášku (CR-2, Maziva Týn nad Vltavou, Česká republika) se silikonovým olejem (MV 8000, Lučební závody Kolín, Česká republika) v poměru 4:1. GCPE byla připravena obdobně, smícháním skelného uhlíkového prášku (Sigradur-G, 5-20 μm , HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH., Německo) se silikonovým olejem v poměru zhruba 5:1. Při přípravě GCPE je potřeba dbát na to, aby při plnění teflonového pouzdra elektrody bylo naplněno vždy maximálně cca 2 cm dutiny. Vzhledem ke tvaru skleného uhlíku (kuličky) a s tím souvisejícího obsahu pastovacie kapaliny dochází k velkému tření a tak ucpávání držáku. Pasta pak nejde vytlačit a elektroda je nepoužitelná pro měření. Modifikované CPE byly připraveny aplikací 20 μL homogenní suspenze modifikátoru (vždy 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ v dimethylfurfuralu) na povrch a ponecháním při laboratorní teplotě do zaschnutí. V práci byla porovnávána účinnost adsorpce analytu na povrch modifikovaných CPE s extrakcí do nitra GCPE, tedy do silikonového oleje. Citlivost elektrochemické metody byla značně ovlivněna velikostí aktivního povrchu elektrody, a tedy i podmínkami akumulace analytu na povrch. Ve standardní rozpouštěcí voltametrii (ASV nebo CSV) je akumulace řízena vloženým potenciálem. Při AdSV a ExSV je potřeba optimalizovat mnoho podmínek, protože v tomto případě je akumulace závislá na velikosti povrchu elektrody, obsahu a druhu pastového pojiva, na druhu a poměru látek obsažených v roztoku, dále také na teplotě prostředí, rychlosti míchání, apod. Modifikace CPE pomocí MWCNTs a grafenu byla prováděna za účelem zvětšení pracovního povrchu elektrody a usnadnění přenosu náboje. Jako pastovacie kapaliny pro přípravu CPE a GCPE byly testovány parafínový olej a vosk, polypropylen, silikonový olej a vazelína. Jako nejvyšší obsah pojiva je doporučováno 30 %, vyšší obsah může způsobit špatnou homogenitu pasty a výrazně zvýšit ohmický odpor. Protože pojivo funguje jako elektrický izolátor, jeho vysoký obsah v pastě způsobí velké vzdálenosti mezi částicemi uhlíků a tak výrazně snížit vodivost [6]. V této práci bylo vybráno 15 % silikonového oleje vzhledem k nejvyšším proudovým výtěžkům. Jako rozpouštědlo pro akumulační krok byl vybrán acetonitril vzhledem k dobré mísitelnosti s vodou a pomalému odpařování, což je důležité pro zachování konstantního obsahu organické složky v roztoku v průběhu akumulace. Nejvyšších proudových výtěžků bylo dosaženo při 25% obsahu ACN nezávisle na typu použité elektrody. Při obsahu ACN 25 % bylo také zanedbatelné zvýšení proudové odezvy pozadí v případě měření s GCPE. Se zvyšujícím se obsahem organické složky elektrolytu docházelo k rozpouštění pastového pojiva a tak postupně až k rozpadu uhlíkové pasty, v důsledku čehož z počátku značně roste proud základní linie až do nepoužitelnosti elektrody k měření.

Pro první krok AdSV i ExSV byly podmínky stejné jako v předchozím případě, tedy prostředí 25 % ACN s $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ retinolu po dobu 10 min s mícháním 400 rpm. Rychlost otáček i doba akumulace byly optimalizovány. Vzhledem k tomu, že I_p je závislý na koncentraci analytu, je důležité, aby v průběhu adsorpčního (extrakčního) kroku byla využita celá kapacita povrchu elektrody a nedocházelo tak k falešně negativní výsledkům. Jako optimální byla vybrána doba 10 minut s otáčkami 400 rpm. Při vyšších otáčkách i po delší dobu akumulace nedocházelo dále ke zvyšování proudu retinolu.

Následná detekce byla provedena metodou DPV v prostředí ACB o pH 4,5 za podmínek $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $t = 0,1 \text{ s}$ a $sr = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ v rozsahu potenciálů 0 V až +1,400 V. Jako optimální měrný elektrolyt byl vybrán 0,1 M octanový pufr o pH 4,5 z důvodu nejvyšších proudových výtěžků. Vedle ACB byl testován také 0,1 M PBS o pH 7,05, 0,1 M KCl o pH 6,2, 0,05 M H_2SO_4 o pH 1,13, 0,1 M HCl o pH 1,02, 0,1 M HNO_3 o pH 1,05, 0,2 M KOH o pH 13,4 a 0,1 M NaOH o pH 12,3. Retinol poskytoval na GCE v DPV v prostředí ACB o pH 4,5 dva oxidační píky (+0,680 V a +1,075 V), podobně jako v prostředí 95% methanolického ACB o pH 5,0 [133]. Další testované elektrody poskytovaly za podmínek metody tři oxidační píky (CPE/MWCNTs: +0,750 V, +0,970 V a +1,330 V; CPE/grafen: +0,725 V, +1,090 V a +1,240 V; GCPE: +0,670 V, +1,080 V a +1,230 V). Podobného výsledku bylo dosaženo ve studii Atuma et al, 1975 [102]. Pro zhodnocení citlivosti metody stanovení obsahu retinolu byl vybrán první pík v oblasti potenciálu kolem +0,700 V vzhledem k jeho nejvyšším proudovým odezvám ve všech testovaných prostředích i na všech elektrodách (**příloha 5**, obrázek 2). Citlivost metody na testovaných modifikovaných elektrodách byla porovnávána s výsledky pro GCE, která je běžně používanou a komerčně dostupnou uhlíkovou elektrodou s pevným povrchem a lze ji použít v přítomnosti organické složky v roztoku, aniž by došlo k jejímu znehodnocení. CPE modifikované MWCNTs nebo grafenem vykazovaly v AdSDPV nižší limity detekce i širší lineární rozsahy, nicméně byly značně zvýšené proudy základní linie. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití ExSDPV na GCPE, která vykazovala nejnižší mez detekce ($4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) v porovnání s dalšími testovanými elektrodami. Tato nízká hodnota LOD byla pravděpodobně způsobena extrakcí analytu do pastovací kapaliny. Na druhou stranu, lineární rozsah stanovení pro GCE byl pouze 1,0 až $40,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, což je v porovnání s modifikovanými CPE ($10,0$ až $100,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) mnohem méně. Nejlepší hodnoty reprodukovatelnosti vykazovala CPE modifikovaná vrstvou grafenu (4,9 %). To lze vysvětlit homogenní strukturou takto upraveného povrchu. Přestože GCPE vykazovala nejvyšší citlivost, reprodukovatelnost byla z pěti opakování vypočtena jako 8,9 %. Toto může být

důsledkem neideálně homogenního povrchu elektrody a celkově struktury skelné uhlíkové pasty, následkem čehož dochází k nerovnoměrné extrakci analytu. Řešením by mohla být dodatečná modifikace povrchu GCPE například vrstvou již zmíněného grafenu. Dalším důvodem mohla být přítomnost organické složky v průběhu akumulčního kroku, která mohla způsobit mírné nesouměrné změny ve struktuře pasty v důsledku rozkladu pastového pojiva. Tento jev by se dal značně omezit přidáním tenzidu do pasty.

Uhlíkové elektrody s přidáním tenzidu pro zamezení rozpadu pasty při použití organického rozpouštědla byly rovněž předmětem zájmu našeho studia elektrochemického stanovení lipofilních vitamínů. Adamsovy elektrody byly použity pro studium elektrochemického chování a stanovení retinol acetátu a α -tokoferolu (**příloha 6**). Byly testovány elektrody s obsahem aniontového tenzidu dodecylsírany sodného (SDS) a kationového tenzidu monohydrátu chloridu hexadecylpyridinia (CPC). Kromě druhu tenzidu byl testován také jeho obsah. Uhlíková pasta byla připravena vždy smícháním 0,2 g parafinového oleje (Merck, Německo) s uhlíkovým práškem (CR-5, Graphite Týn, spol. s.r.o., Česká republika) a s odpovídajícím obsahem tenzidu tak, aby výsledná hmotnost byla 1 g. Jako měrný elektrolyt byl zvolen 0,1 M roztok LiClO_4 v 99,8 % ACN. Organický roztok byl použit vzhledem k nerozpustnosti lipofilních vitamínů ve vodě a LiClO_4 pro dostatečnou iontovou sílu elektrolytu. Cyklická voltametrie s podmínkami $sr = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v pěti opakováních při potenciálovém rozsahu -0,2 V až +1,2 V byla použita pro charakterizaci připravených elektrod. SDS a CPC jsou rozpustné v pastovací kapalině. Funkci tenzidů si lze představit tak, že díky svým dlouhým nevětveným alifatickým řetězcům v molekule se přichytí do pojiva a v kontaktu s roztokem je jejich nabitá část molekuly, která zachytí analyt. Se zvyšujícím se obsahem tenzidu v pojivu roste jeho objem a tak vzdálenost mezi uhlíkovými částicemi, čímž dojde ke snížení viskozity a vodivosti a zvýšení ohmického odporu elektrody. Z tohoto důvodu je potřeba volit obsah tenzidu v řádech desítek hmotnostních procent aby nedošlo k výraznému zhoršení elektrických vlastností připravené uhlíkové elektrody. CPC byl shledán vzhledem k vysokému proudu základní linie ($\sim 50 \mu\text{A}$) jako nepoužitelný. Jako optimální obsah SDS byl stanoven 30 %, kdy byla zachována dostatečná odolnost pasty vůči organickým rozpouštědlům a zároveň dobrá vodivost elektrody a nízké hodnoty proudu základní linie. Vysoký obsah tenzidu v pastě také způsoboval posun E_p analytu. Retinol acetát poskytoval v nevodném prostředí tři oxidační píky, α -tokoferol jeden. Píky RA však byly v dostatečné vzdálenosti od α -tokoferolu, bylo možné je tedy od sebe rozlišit. Při stanovení obou analytů vedle sebe pomocí CPE se 30 %

SDS poskytoval α - tokoferol oxidační pík při +0,593 V a RA při +0,861 V. Při vyšším obsahu SDS byly oxidační píky obou látek posunuty k pozitivnějším hodnotám, pík RA byl však mnohem ostřejší (**příloha 6**, obrázek 4).

Adamsovy elektrody byly také testovány pro studium elektrochemického chování *all-trans*-retinolu (**příloha 7**). Vitamín A obsahuje ve své struktuře systém konjugovaných dvojných vazeb, díky kterým jej lze stanovovat spektrofotometricky v UV/VIS oblasti. Bylo zjištěno, že nejvyšší elektronová hustota je lokalizována právě v tomto systému dvojných vazeb mezi uhlíky C5 až C14, oxidace retinolu tedy pravděpodobně probíhá v těchto místech. CPE/SDS byla připravena stejně jako v předchozím případě smícháním 0,5 g uhlíkového prášku (CR-5, Graphite Týn, spol. s.r.o., Česká republika) s 0,2 g parafinového oleje (Merck, Německo) a 0,3 g SDS (Sigma-Aldrich, Česká republika). Výsledky získané pomocí CPE/SDS byly porovnány s pevnou GCE (Metrohm, Česká republika). Pro studium elektrochemického chování retinolu, retinol acetátu a retinol palmitátu byla použita metoda CV se stejnými podmínkami jako v předchozích případech. Oxidační chování retinoidů bylo testováno v prostředí 0,1 M LiClO₄ v 99,8% ACN, v 50% ACN s 0,1 M ACB o pH 4,5 a v čistém ACB, kde byla aplikována metoda AdSV (viz výše). Ve všech testovaných elektrolytech poskytovaly retinoidy vždy oxidační pík v oblasti potenciálu +0,800 V na obou typech elektrod. V případě retinolu v přítomnosti organické složky byly oxidační píky dva. Vzhledem k nízkému rozlišení CV byla dále použita metoda DPV, která umožňuje citlivější rozlišení jednotlivých analytů. Podmínky DPV byly optimalizovány a jako nejlepší bylo vybráno $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $t = 0,1 \text{ s}$, $sr 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ s rozsahem potenciálu od 0 V po +1,200 V nebo +1,600 V. Při zvýšení sr nad $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ docházelo k výraznému zvyšování proudu základní linie. V DPV poskytovaly opět všechny tři analyty první oxidační pík v oblasti +0,800 V, nelze je tedy od sebe rozlišit, podobně jako jednotlivé formy vitamínu E. Při rozsahu potenciálů do +1,600 V byly pozorovány 4 oxidační píky vitamínu A. Podobných výsledků bylo dosaženo také ve studii AdSV a ExSV s elektrodami CPE/MWCNTs, CPE/grafen, GCE nebo GCPE [2]. Pro zhodnocení využití metody pro stanovení vitamínu A byla sestrojena kalibrační křivka pro elektrodu CPE/SDS i GCE. CPE/SDS vykazovala lineární odezvu v rozsahu koncentrací 1,5 až 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vitamínu A (**příloha 7**, obrázek 5). Naproti tomu GCE poskytla lineární odezvu od 4,4 do 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (**příloha 7**, obrázek 6), což je více než 3x více. Na druhou stranu, CPE/SDS vykazovala nejnižší limit detekce $4,6\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Byla také testována návratnost metody pomocí měření roztoku 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vitamínu A v 0,1 M LiClO₄ v 99,8 % ACN metodou standardního přidavku, kdy bylo

dosazeno pro GCE návratnosti 94,3 % se standardní odchylkou 5,1 %, pro CPE/SDS byla návratnost stanovení 95 % s odchylkou měření 3,9 %.

Metoda byla aplikována na vzorky kosmetických přípravků (**příloha 8**), kdy jako analyt byl zvolen α -tokoferyl acetát (α -TAc), který je využíván jako fortifikační činidlo vzhledem k podobným vlastnostem, ale vyšší chemické stabilitě, než α -tokoferol. Elektrochemické chování α -TAc bylo testováno pomocí CV za stejných podmínek jako dříve při potenciálovém rozsahu -0,4 V až +1,6 V. V prostředí 0,1 M LiClO₄ v 99,8 % ACN poskytoval α -TAc jeden oxidační pík při potenciálu +1,350 V. Jedná se pravděpodobně o nevratnou jednoelektronovou reakci. Přesný mechanismus je těžké určit vzhledem k radikálovým elektrodovým reakcím tokoferolů. Stanovení α -TAc bylo provedeno metodou SWV za podmínek $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 10$ mV, $f = 10$ Hz při potenciálovém rozsahu 0 V až +1,6 V. Hodnoty E_{ampl} a f byly optimalizovány. Obecně lze říci, že čím vyšší jsou hodnoty těchto parametrů, tím vyšší je I_p analytu. Vzhledem k vysoké hodnotě potenciálu píku α -TAc, která se nachází již ve zvyšující se základní linii elektrolytu, způsobilo zvýšení E_{ampl} a f nad hodnotu 10 mV, respektive 10 Hz, výrazné zhoršení tvaru píku α -TAc. Z důvodu polohy píku α -TAc nebylo také možné dosáhnout nižší meze detekce než 17,0 mg.L⁻¹. Toto ale není na překážku pro stanovení α -TAc v kosmetických přípravcích, protože ten je využíván pro jejich fortifikaci ve vyšších koncentracích, obvykle v řádech desetin až desítek procent [28]. Jako vzorky byly použity kosmetické přípravky běžně dostupné v ČR. Jmenovitě se jednalo o odličovací mléko Nivea (Německo), opalovací krém Astrid 30 UVA+UVB (Česká republika) a krém na ruce od Oriflame (Švédsko). Na obalech těchto výrobků, které jsou emulzemi, výrobce uvádí obsah vitamínu E, respektive α -TAc, ovšem neuvádí jeho koncentraci. V kosmetických výrobcích může být jako fortifikační činidlo přítomen také vitamín A, respektive retinol palmitát nebo acetát. Tyto látky neruší stanovení α -TAc, protože jejich E_p se za podmínek metody dostatečně liší ($E_{p,RA} = +0,850$ V, $E_{p,RP} = +1,050$ V). Úprava vzorku pro stanovení byla velice jednoduchá, spočívala v rozpuštění 2 g vzorku v čistém 99,8 % ACN v ultrazvuku a následné dvojité filtraci přes skládaný filtr o velikosti pórů 2. Obsah α -TAc byl stanoven metodou standardního přídatku (**příloha 8**, obrázek 6). Byly provedeny tři přídatky 200 μ L 0,01 mol.L⁻¹ α -TAc do 10 mL desetkrát zředěného vzorku. Obsah α -TAc ve vzorcích se pohyboval od 0,5 do 2 % hmotnostních. Tyto hodnoty odpovídají množství α -TAc, které bývá v těch kosmetických přípravcích běžně přítomno.

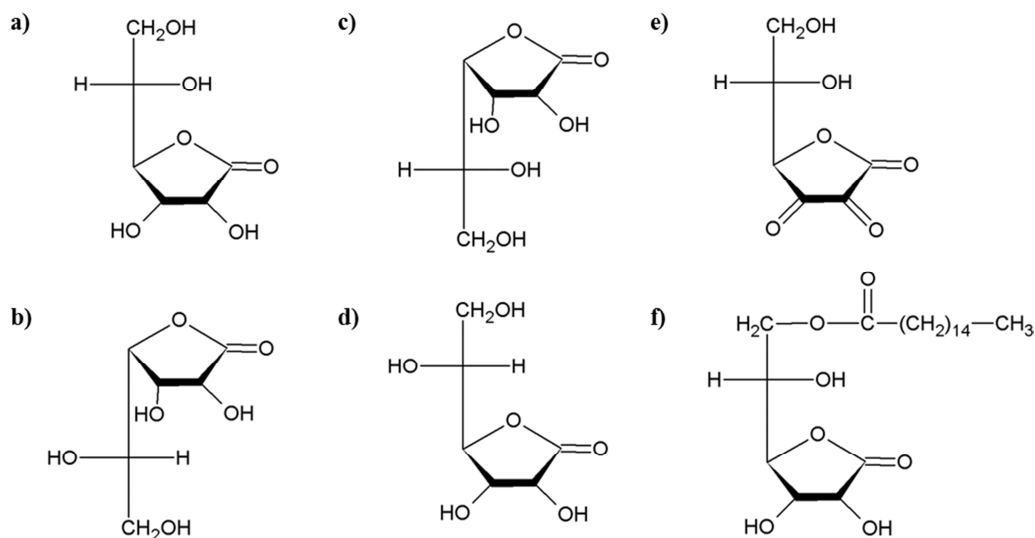
4.2 Vitamíny rozpustné ve vodě

Do skupiny vitamínů B, tzv. B-komplex, patří vitamíny B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (kyselina panthothenová), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin), B₉ (foláty, kyselina listová), B₁₂ (kobalamin) a PP (kyselina nikotinová), která se vyskytuje spolu s ostatními vitamíny skupiny B. Žádný z těchto vitamínů nebyl v naší práci stanovován, proto jim není dále věnována pozornost.

4.2.1 Vitamín C

Vitamín C je ve své podstatě kyselina askorbová a její isomery. V potravinářství jsou využívány kyselina L-isoaskorbová a L-askorbová (*ascorbic acid*- AAc) jako aditiva pro jejich antioxidační aktivitu, slouží jako látky potlačující enzymatické hnědnutí např. ovoce či zeleniny. Isoaskorbová kyselina nicméně nemá žádný nutriční význam, stejně jako D-askorbová (obrázek 12). Jako fortifikační činidlo se využívá v masném průmyslu pro snížení tvorby nitrosaminů, toxických látek vznikajících při zpracování masa (uzení, přídavek dusitanů a dusičnanů). Vitamín C může být použit také k fortifikaci olejů a olejových emulzí v kombinaci s tokoferolem nebo ve formě lipofilního derivátu askorbyl palmitátu. Pro fortifikaci může být využíváno také sodné soli kyseliny L-askorbové. Nedostatek vitamínu C se projevuje jako nemoc, nazývaná kurděje. Projevuje se zvýšenou krvácivostí, zánětem dásní a zubů a jejich vikláním. AAc se přirozeně nachází v ovoci a zelenině, v potravinách živočišného původu v malé míře vzhledem k metabolickým přeměnám v živém organismu. AAc je vysoce rozpustná ve vodě, v důsledku čehož může docházet k významným ztrátám při manipulaci s ovocem a zeleninou, ať už se jedná o krájení či přirozené nedokonalosti povrchu způsobené vnějšími vlivy, tak následné praní či blanšírování, apod. AAc snadno podléhá oxidaci vlivem podmínek prostředí jako je vysoká teplota, obsah vody, světlo, pH, další doprovodné látky, apod. Z kyseliny L-askorbové vzniká oxidací kyselina dehydroaskorbová (*dehydroascorbic acid*- DHAAC), která dále hydrolyzuje za vzniku nutričně nevýznamných produktů. Tyto reakce jsou závislé na pH prostředí, koncentraci kyslíku, teplotě a také přítomnosti katalyzátorů, kterými jsou kovové ionty, např. železité či měďnaté. Pro stanovení vitamínu C je využíváno mnoho metod. Čistá AAc absorbuje ultrafialové záření při 245 nm, čehož ovšem v potravinářství nelze využít vzhledem k velkému matricovému efektu. Pro stanovení AAc lze využít tradičních titračních metod, kde je ovšem velké riziko interferencí. Nejpřesnější je stanovení pomocí HPLC v kombinaci se spektrofotometrickým, fluorescenčním, hmotnostním či elektrochemickým detektorem. Metoda HPLC umožňuje také stanovení jednotlivých forem kyseliny askorbové vedle sebe.

Byla vyvinuta také metoda plynové chromatografie, nicméně zde je potřeba velice náročná úprava vzorku před vlastní analýzou [93, 151-153].



Obrázek 12: Vitamín C. a) kyselina L-askorbová, b) kyselina L-isoaskorbová, c) kyselina D-askorbová, d) kyselina D-isoaskorbová, e) kyselina L-dehydroaskorbová, f) askorbyl palmitát.

4.2.2 Elektrochemické stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Kyselina askorbová je elektroaktivní látkou, lze ji proto jednoduše stanovit pomocí elektrochemických metod. Elektrochemická oxidace AAC je difúzí řízený proces závislý na pH roztoku. Při oxidaci AAC na DHAAC se vyměňují dva protony a dva elektrony, což je vratná reversibilní reakce. Při pH nižším než 4 následuje nevratná reakce za vzniku 2,3-diketo-L-gulonové kyseliny. Elektrochemická oxidace kyseliny askorbové lze měřit na různých typech elektrod (GCE, CPE, Pt, atd.) pomocí voltametrických metod. Potenciál oxidačního píku je proměnlivý v závislosti na typu použité pracovní elektrody a elektrolytu k měření. Byla zkoumána metoda CV a DPV pro stanovení AAC ve vzorcích čerstvých ovocných šťáv a vitamínových doplňků stravy [154]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Výhodou byla velice jednoduchá úprava vzorku spočívající pouze v rozpuštění tablet s vitamínem s následnou filtrací a odstředěním či naředění džusů. Metoda DPV na GCE vykazovala velice dobrou stabilitu signálu [154]. Metoda DPV ke stanovení AAC byla aplikována také na vzorky vína s využitím Pt a CPE (tabulka 3) [155]. Pro zlepšení citlivosti detekce AAC pomocí CPE byly studovány její různé modifikace. Úprava uhlíkové pasty pomocí aplikace nanokompozitů NiO/MWCNTs

a 1-butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborátu ([Bmim]BF₄) byla testována na vzorcích ovocných a zeleninových džusů a vitamínových doplňků stravy pro detekci jak vitamínu C, tak vitamínu B₉. Oxidační signál poskytovaný těmito dvěma vitamíny se při elektrochemickém stanovení překrývá. Při použití elektrody modifikované NiO/MWCNTs/[Bmim]BF₄ byl detekován oxidační pík AAc při +0,440 V s vyššími proudovými výtěžky v porovnání s nemodifikovanou CPE za stejných podmínek (pH 7,0) a signál vitamínu B₉ byl posunut o cca +0,410 V, tedy k hodnotě +0,850 V [156].

Tabulka 3: Výsledky stanovení AAc na různých typech elektrod.

Metoda	Elektroda	Lineární rozsah [mol.L ⁻¹]	LOD [mol.L ⁻¹]	LOQ [mol.L ⁻¹]	Literatura
DPV	GCE	6,0.10 ⁻⁶ až 8,0.10 ⁻⁴	5,16.10 ⁻⁷	1,72.10 ⁻⁶	[154]
DPV	Pt	3,1.10 ⁻⁴ až 2,0.10 ⁻²	8,7.10 ⁻⁵	2,9.10 ⁻⁴	[155]
DPV	CPE	7,0.10 ⁻⁵ až 2,0.10 ⁻²	2,0.10 ⁻⁵	6,8.10 ⁻⁵	

DPV – diferenčně pulzní voltametrie, GCE – skelná uhlíková elektroda, Pt – platinová elektroda, CPE – uhlíková pastová elektroda, LOD – mez detekce, LOQ – mez stanovitelnosti.

Stanovení AAc pomocí CPE modifikované MWCNTs a brilantní modří (*brilliant cresyl blue* – BCB) bylo provedeno v naší studii (**příloha 9**). Modifikovaná CPE (BCB-MWCNTs/CPE) byla zhotovena z 0,5 g uhlíkového prášku CR-5 (Maziva Týn n. L., s.r.o, Česká republika) a 130 µL minerálního oleje (M5904, Sigma-Aldrich, Německo) s příměsí 1,0 % MWCNTs (40 – 60 nm, Shenzen Nano Tech Port Co., Čína) a 3,0 % BCB (Sigma-Aldrich, Česká republika). BCB v pastě zajišťuje zlepšení přenosu náboje, MWCNTs zvětšují povrch elektrody. Brilantní modř vykazuje v CV v BR pufru o pH 5,0 reverzibilní oxidačně redukční, difúzi řízenou reakci. V práci bylo také optimalizováno pH pracovního elektrolytu (BR pufru o pH 3,0, 5,0, 7,0 a 9,0 s 0,1 M KCl). Bylo vybráno prostředí BR pufru o pH 5,0 vzhledem k optimálnímu tvaru a pozici vlny v záznamu CV. AAc na BCB-MWCNTs/CPE v CV vykazuje oxidačně redukční odezvu s potenciálem anodického píku při +0,125 V a katodického při +0,075 V. V porovnání s nemodifikovanou CPE došlo k posunu oxidační vlny k negativnějším potenciálům ($E_{p,a}$ pro CPE +0,350 V). Pro stanovení obsahu AAc byla použita ampérometrická detekce. Metoda vykazovala lineární rozsah 1,0 – 350 µmol.L⁻¹ s mezí detekce 0,05 µmol.L⁻¹. Jako vzorek byl použit multivitaminový džus z běžné maloobchodní sítě v České republice a doplněk

stravy, rovněž běžně dostupný v lékárnách. Džus nebyl před analýzou nijak upravován, tableta vitamínu C byla pouze rozpuštěna ve 250 mL redestilované vody. Ampérometrickou detekcí na BCB-MWCNTs/CPE bylo dosaženo srovnatelných hodnot s HPLC-UV (džus: ampérometrie – $120,1 \pm 5,2 \text{ mg.L}^{-1}$, HPLC-UV – $120,5 \pm 4,7 \text{ mg.L}^{-1}$; tableta: ampérometrie – $25,8 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, HPLC-UV – $25,2 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Byla rovněž sledována stabilita elektrody. Při běžném skladování při laboratorní teplotě vykazovala elektroda téměř shodné hodnoty i po 45 dnech.

4.3 Přílohy ke kapitole 4

Příloha 4

Sýs M., Žabčíková S., Červenka L., Vytřas K., *Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination*, *Potravinářstvo*, 10 (1), p. 260 – 264, 2016, doi:10.5219/587.

Příloha 5

Sýs M., Žabčíková S., Červenka L., Vytřas K., *Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol*, *Potravinářstvo*, 11 (1), p. 96 – 105, 2017, doi:10.5219/713.

Příloha 6

Žabčíková S., Sýs M., Červenka L., Mikysek T., Vytřas K., *Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných tenzidy*, L. seminář o tenzidech a detergentech, sborník přednášek, str. 73 – 79, 2017, ISBN 978-80-7560-098-1.

Příloha 7

Žabčíková S., Mikysek T., Červenka L., Sýs M., *Electrochemical study and determination of all-trans-retinol at carbon paste electrode modified by surfactant*, *Food Technology and Biotechnology*, 56 (3), v tisku, 2018, doi:10.17113/ftb.56.03.18.5618.

Příloha 8

Žabčíková S., Nallbani A., Sýs M., Mikysek T., Červenka L., *Square wave voltammetry at carbon paste electrode modified with surfactant for alpha tocopheryl acetate determination in cosmetics*, *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12 (1), p. 135 – 142, 2018, doi:10.5219/881.

Příloha 9

Žabčíková S., Vu D.V., Červenka L., Tambor V, Vašatová M, *Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparation and fruit juice using modified carbon paste electrode*, *Potravinářstvo*, 10 (1), p. 255 – 259, 2016, doi:10.5219/586.

Příloha 4



ADSORPTIVE STRIPPING VOLTAMMETRY IN LIPOPHILIC VITAMINS DETERMINATION

Milan Sýs, Simona Žabčíková, Libor Červenka, Karel Vytřas

ABSTRACT

The aim of this contribution was to check if adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV) is suitable tool for sensitive simultaneous electrochemical detection of lipophilic vitamins. Retinol (vitamin A₁), cholecalciferol (vitamin D₃), α -tocopherol (vitamin E) and phyloquinone (vitamin K₁) were selected as representatives. All electrochemical measurements were performed in two separate steps due to the lipophilic character of the analytes. In the first step, an accumulation of lipophilic vitamin on the surface of glassy carbon electrode (GCE) was done by immersing working electrode into the aqueous-acetonitrile solutions (50%, v/v) of each vitamin (50.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) at 400 rpm for 5 min. In the second one, differential pulse voltammetry of accumulated vitamins was performed in 0.01 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer at potential step (E_{step}) 5 mV, potential of amplitude (E_{ampl}) 25 mV, interval time (t) 0.1 s and scan rate (ν) 50 mV.s⁻¹. It was observed that electrochemical behaviour of lipophilic vitamins adsorbed on surface of solid GCE in the aqueous electrolyte was very similar to those performed in organic/aqueous electrolyte in literature. Due to reversible electrochemical behaviour of vitamin K₁ (phyloquinone/phylohydroquinone redox couple), it was possible to detect all lipophilic vitamins only in one analysis. Observed values of peak potentials (E_p) were sufficiently different for their recognition which was confirmed by the analysis of real sample. The results obtained in this study showed that simultaneous determination of some lipophilic vitamins is possible requiring further optimization study. For this reason, it is necessary to understand this work as an initial step in simultaneous determination of lipophilic vitamins without application of any chromatographic technique.

Keywords: lipophilic vitamin; glassy carbon electrode; adsorptive voltammetry; margarine analysis

INTRODUCTION

It is known that lipophilic vitamins are nonpolar organic compounds essential for proper functioning of the human metabolism which have to be received through diet (Cockburn, 2003). Thus, their detection and quantification in different kinds of samples in a great importance in nutrition, medicine, cosmetics and food technology (Gonnet et al., 2010). Unfortunately, analysis of lipophilic vitamins is quite complicated and time consuming due to their lipophilic character. The main disadvantage is the use of organic solvents.

The determination of lipophilic vitamins is not practically possible without using chromatographic techniques, especially by high performance liquid chromatography (HPLC) followed by extraction of lipophilic vitamins into organic solvent. It is necessary to remind that HPLC analysis of fats may take up to several hours.

All lipophilic vitamins contain conjugated system of double bonds in their structures, therefore a normal-phased HPLC with combination of UV detection is common way of their determination (Kamal-Eldin et al., 2000). Moreover, they were also determined in human serum by reversed-phase HPLC with electrochemical detection (Wang et al., 2001).

Generally, lipophilic vitamins are classified in four main groups (Webster, 2012). In our experiment, the most

biologically active forms (all-trans-retinol; vitamin A₁, cholecalciferol; vitamin D₃, α -tocopherol, vitamin E and phyloquinone, vitamin K₁) were selected as standards to explore if an adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV) is suitable electrochemical method for their sensitive simultaneous detection in model sample and selected margarine.

Adsorptive stripping voltammetry (AdSV) is similar to anodic stripping voltammetry (ASV) and cathodic stripping voltammetry (CSV) with the preconcentration step being not controlled by electrolysis (Wang, 1990). In our case, the preconcentration step is controlled by adsorption of analytes on solid glassy carbon electrode (GCE). Their electrochemical detection was performed by differential pulse voltammetry (DPV) which is the most commonly used electrochemical technique for simultaneous determinations (Baranowska et al., 2008). For comparison, the declared contents of lipophilic vitamins in selected traditional Czech margarines are shown in Table 1. Contents of all present lipophilic vitamins were only copied from nutrition facts of corresponding labels. Additionally, it was observed that tested margarines always contained a mixture of several plant (palm, sunflower and rapeseed) oils whose volume ratios were not surprisingly listed.

Table 1 Declared contents of lipophilic vitamins in several traditional Czech margarines.

Margarines (types)	Vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Vitamin D ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Vitamin E (mg/100g)
Flora light	800	7.5	10
Flora gold	800	7.5	—
Flora original	800	7.5	14
Flora pro-active	800	7.5	11
Perla plus vitamíny	800	7.5	—
Perla tip	800	7.5	—
Rama classic	800	7.5	9.2
Stella	800	3.5	—

It is evident that concentration levels of present lipophilic vitamins are mutually very different (~10 mg E, ~1 mg A and ~0.01 mg D). Therefore, it can be assumed that simultaneous electrochemical determination of lipophilic vitamins in real samples, especially in margarines, remains a challenge for further scientific research.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Standards of lipophilic vitamins

Vitamin A₁ as retinol (crystalline), vitamin E as (+)- α -tocopherol (from vegetable oil; 1000 IU.g⁻¹), vitamin K₁ as phyloquinone (viscous liquid) and acetonitrile (ACN) of HPLC purity (99.8%) were purchased from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). Vitamin D₃ as cholecalciferol (40 × 10⁶ IU.g⁻¹; crystalline) was obtained from Merk (Darmstadt, Germany).

Instrumentation

All electrochemical measurements were carried out at conventional three-electrode system consisting solid GCE with surface diameter 2 mm from, Ag/AgCl and 3.0 mol.L⁻¹ KCl as salt bridge (reference) and platinum wire (auxiliary) electrode which were together connected to potentiostat Autolab PGSTAT101 from Metrohm (Prague, Czech Republic) which is also compatible with software Nova (Prague, Czech Republic).

Pretreatment of glassy carbon electrode

Surface of solid GCE was renovated by polishing pad with presence of wet Al₂O₃ powder for 30 s. After subsequent rinsing of the surface by distilled water, the GCE was ready for new electrochemical experiment.

Sample preparation

The sample preparation is consisted only by dissolving of 2 g margarine type “Perla plus vitamíny“ from UNILEVER ČR, spol. s r.o. (Prague, Czech Republic) in pure ACN and filled to the mark of 50 mL volumetric flask.

Procedure

Adsorptive stripping voltammetry of lipophilic vitamins was performed in two separate steps. In the first step, the analytes adsorption on GCE surface was done by immersing working electrode in aqueous-acetonitrile solutions (50% content of ACN) containing 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of each vitamin 10 min at 400 rpm. In second one, repetitive CV of accumulated lipophilic vitamins in 0.01 mol.L⁻¹

acetate (pH 4.5) buffer was done to examine their electrochemical behaviours at potential step (E_{step}) 5 mV, scan rate (ν) 50 mV.s⁻¹ and fivecycles repetition.

Analogically, DPV of accumulated vitamins (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of each vitamin in 25% ACN at 400 rpm for 10 min) was performed in 0.01 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer with deposition potential (E_{dep}) -0.6 V for 120s, potential step (E_{step}) 5 mV, potential of amplitude (E_{ampl}) 25 mV, interval time (t) 0.1 s and scan rate (ν) 50 mV.s⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Cyclic voltammetry of accumulated vitamins

Electrochemistry of retinol (vitamin A) film deposited on GCE surface

Vitamin A₁ deposited on surface GCE provided only one sensitive oxidation peak at +0.708 V whose current response dramatically decreased with the number of cycles. For demonstration, typical repetitive CV of vitamin A₁ accumulated at GCE in acetate buffer is shown in Figure 1.

Similar electrochemical behaviour was observed at GCE in a methanol/acetate (pH 5.0) buffer at scan rate 50 mV.s⁻¹ (Wring et al., 1988) which corresponds to irreversible electrochemical oxidation of retinol to the retinaldehyde with participation of two protons and electrons (Ziyatdinova et al., 2010).

However, it is important to note that a background

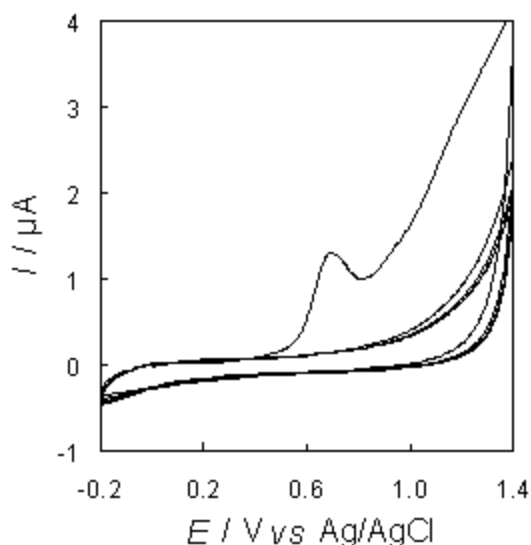


Figure 1 Repetitive cyclic voltammetry of vitamin A₁ (50.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) in 0.01 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer at $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

current increased after oxidation of vitamin A1, probably due to adsorption of the oxidized products. Unfortunately, this phenomenon can negatively affect an electrochemical detection of other lipophilic vitamins which could be oxidized at higher values of potential than present vitamin A1.

Electrochemistry of cholecalciferol (vitamin D₃) film deposited on GCE surface

Electrochemically similar behaviour as in previous situation was observed also for vitamin D₃ which also provided only one oxidation peak at +1.032 V which was not visible under following repetitions. According to obtained cyclic voltammogram shown in Figure 2, the oxidation process of cholecalciferol appeared to be irreversible. In fact, the same electrochemical behaviour has been obtained at GCE in a methanol/acetate (pH 6.0) buffer at scan rate 50 mV.s⁻¹ (Hart et al., 1992).

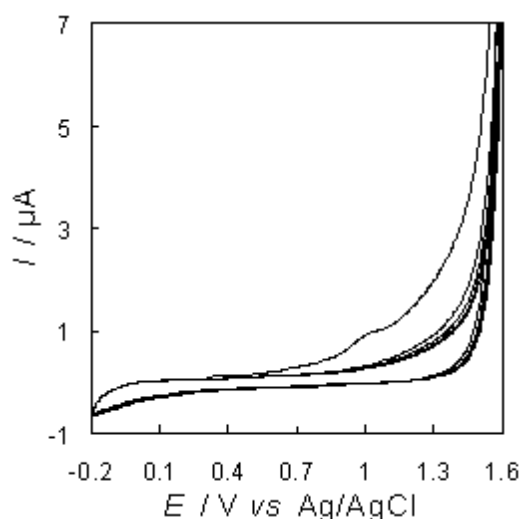


Figure 2 Repetitive cyclic voltammetry of vitamin D₃ (50.0 μmol.L⁻¹) in 0.01 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer at $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Electrochemistry of α -tocopherol (vitamin E) film deposited on GCE surface

Thin layer electrochemistry of α -tocopherol (α -TOH), known as the most active form of vitamin E in aqueous electrolytes was investigated resulting in formation of lipid multilayer (Yao et al., 2009) or modification of carbon paste (Kim and Kusuda, 1994). Electrochemical behaviour of α -TOH deposited on surface of solid GCE in aqueous electrolytes was also published by our research group (Sýs et al., 2016).

Electrochemistry of phylloquinone (vitamin K₁) film deposited on GCE surface

In comparison to previous measurements, cyclic voltammetry of vitamin K₁ always began with cathodic scan due to content of quinone unit in its structure (Wang et al., 1994). Thus, the electrochemical behaviour of vitamin K₁ was very similar to redox couple quinone/hydroquinone. According to Figure 3, the vitamin K₁ provided typical two reversible electrochemical peaks

at -0.325 and -0.006 V. Moreover, another sensitive cathodic peak was observed at -0.832 V.

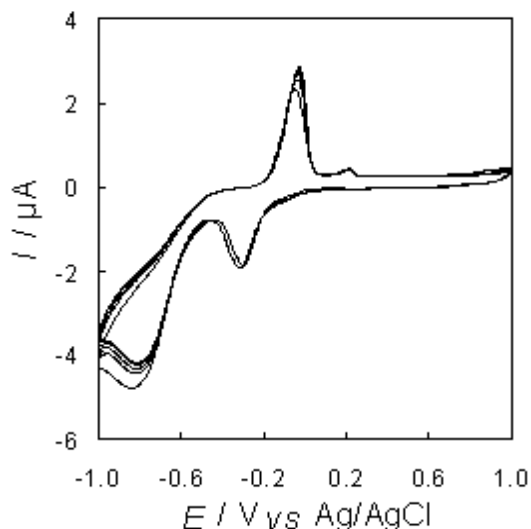


Figure 3 Repetitive cyclic voltammetry of vitamin K₁ (50.0 μmol.L⁻¹) in 0.01 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer at $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Simultaneous differential pulse voltammetry of accumulated vitamins

From the previous section, it states that only vitamin K₁ can not be electrochemically oxidized because it usually occurs in its oxidation form as naphthoquinone with long alkyl chain. Based on this finding, it was necessary to reduce the phyloquinone to phylohydroquinone with participation of two protons and electrons. Additional lipophilic vitamins accumulated together with phyloquinone on surface of working electrode were present in their corresponding reduction forms. Therefore, applying of deposition potential -0.6 V for 120 s did not cause any electrochemical changes of these vitamins (A₁, D₃ and E).

Only after electrochemical reduction of vitamin K₁, anodic DPV can be used for simultaneous electrochemical detection of all presented lipophilic vitamins in potential window from -0.6 to +1.4 V. The evidence that all selected lipophilic vitamins can be determined together in one analysis is demonstrated in Figure 4. Moreover, it shows that distance of individual voltammetric peak was satisfactory for their sufficient resolution without using any chromatographic technique due to sufficiently different values of the appropriate peak potentials.

It is very important to realize that the electrochemical method presented in this contribution has not been optimized yet. It can be assumed that whole optimization will be very time consuming because it is always based on the finding the optimal working conditions to obtain high sensitivity such as selection of suitable electrode material, organic solvent and many others.

For example, an amount of deposited analytes on solid electrode material is limited by surface area. Therefore, it is obvious that linearity range of developed analytical method will be very narrow and the sensitivity will be completely dependent on the time of accumulation. The

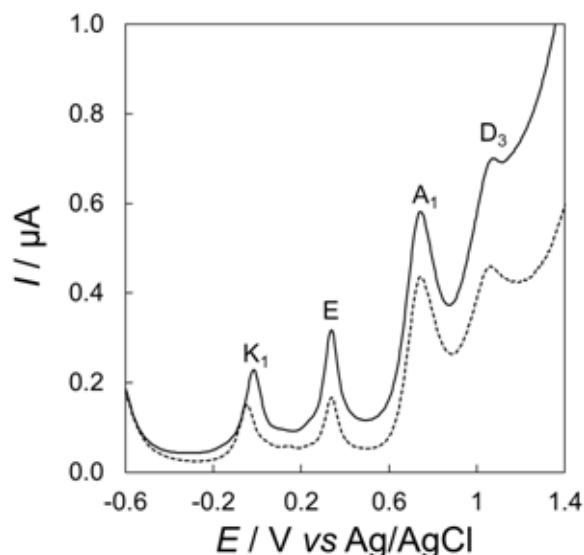


Figure 4 Simultaneous adsorptive stripping voltammetry of lipophilic vitamins deposited on GCE surface from their $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ solution containing 25% ACN at 400 rpm for 10 min; then detected by DPV in 0.01 mol.L^{-1} acetate (pH 4.5) buffer at $E_{\text{dep}} = -0.6 \text{ V}$ at 120 s, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 0.025 \text{ V}$, $\nu = 25 \text{ mV.s}^{-1}$ (dashed line) and $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ (solid line).

solution can be found in using of suitable kind of carbon paste electrode (CPE) which can be classified from physical point of view as a dispersion of solid carbon powder particles in a viscous lipophilic binder (Švancara et al., 1996). In this case, the amount of accumulated analyte is controlled by corresponding extraction equilibrium.

According to publication (Žabčíková and Červenka, 2015), carbon paste can be prepared from plant oils which are commonly used in technology of margarines. Thus, it can be another way how lipophilic vitamins also could be electrochemically detected.

Using carbon nanomaterials offers another possibility. Especially, carbon nanotubes (CNTs) immobilized on some carbon-based electrode material usually cause dramatical increasing of electrode surface due to their specific physical properties (Volder et al., 2013):

Analysis of margarine

Analysis of margarine (Perla plus vitamíny) was only based on qualitative determination of present lipophilic vitamins. Therefore, any sophisticated statistical treatment was not necessary to use. Values of peak potentials are usually presented as arithmetic mean (\bar{x}) of minimally five repetitions (n) and corresponding standard deviations (σ) were less than 2% due to polishing of electrode surface after each measurement.

In this case, 2.5 mL sample solution was added into the 7.5 mL pure water in order to obtain 25% ACN in total volume. After that, GCE was immersed into resulting solution and deposition occurred at 400 rpm for 20 min. Obtained voltammograms of accumulated analytes performed in acetate buffer is shown in Figure 5.

It is interesting that only vitamin K_1 and vitamin E were qualitatively determined in the sample of margarine, although these vitamins were not listed on the product label. An explanation lies in the basic ingredients of all margarines. From physical point of view, they can be defined as emulsions of water in edible plant oil which are natural resources of these lipophilic vitamins (Piironen et al., 1997). According to manufacturer, the analyzed margarine contains sunflower and rapeseed oils.

Mentioned rapeseed oil usually contains relatively high amounts of oleic and linoleic acids (Francáková et al., 2015) which are very important like lipophilic vitamins. It is maybe reason why these compounds beneficial for health are very often abused in commercials.

It is clear from Figure 5 that second peak at $+0.332 \text{ V}$ (anodic oxidation of vitamin E) is not symmetric like oxidation peak of vitamin K_1 at -0.080 V . It is necessary to remember that vitamin E is not chemical individual but group of eight isomers known as tocopherols (Gliszczynska-Świgłol et al., 2007) which have similar electrochemical properties. Therefore it is quite possible that not only α -TOH was present in the sample of the margarine.

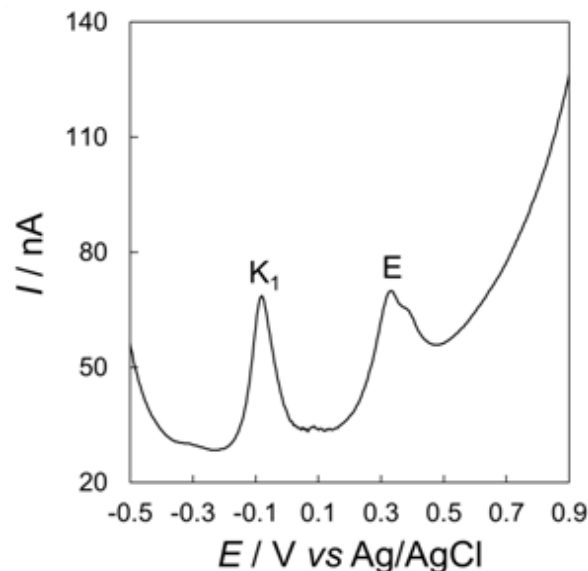


Figure 5 Qualitative determinations of lipophilic vitamins in margarine (Perla plus vitamíny) by adsorptive stripping voltammetry of at solid GCE.

CONCLUSION

According to our experimental results, it may be concluded that simultaneous qualitative determination of lipophilic vitamins is possible using adsorptive stripping differential pulse voltammetry. Unfortunately, it is clear that deposition of analytes on solid glassy carbon electrode and their following electrochemical detection does not provide satisfactory sensitivity, especially, in determination of vitamin D_3 . However, it can be assumed that the sensitivity to all lipophilic vitamins can be improved using carbon nanomaterials or heterogeneous carbon materials which are known as carbon pastes. It is necessary to understand this work as an initial step in simultaneous determination of lipophilic vitamins.

REFERENCES

- Baranowska, I., Markowski, P., Gerle, A., Baranowski, J. 2008. Determination of selected drugs in human urine by differential pulse voltammetry technique. *Bioelectrochemistry*, vol. 73, no. 1, p. 5-10. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bioelechem.2008.04.022>
- Cockburn, F. 2003. Role of infant dietary long-chain polyunsaturated fatty acids, liposoluble vitamins, cholesterol and lecithin on psychomotor development. *Acta Paediatrica Supplement*, vol. 92 no. s442, p. 19-33. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1651-2227.2003.tb00660.x>
- Frančáková, H., Ivanišová, E., Dráb, Š., Krajčovič, T., Tokár, M., Mareček, J., Musilová J. 2015. Composition of fatty acids in selected vegetable oils. *Potravinarstvo*, vol. 9, no. 1, p. 538-542. <http://dx.doi.org/doi:10.5219/556>
- Gliszczyńska-Świąło, A., Sikorska, E., Khmelinskii, I., Sikorski, M. 2007. Tocopherols content in edible plant oils. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 57, no. 4(A), p. 157-161.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F. 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, vol. 146, no. 3, p. 276-290. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.037>
- Hart, J. P., Norman, M. D., Christopher, J. L. 1992. Voltammetric behaviour of vitamins D₂ and D₃ at a glassy carbon electrode and their determination in pharmaceutical products by using liquid chromatography with amperometric detection. *Analyst*, vol. 117, no. 9, p. 1441-1445. <http://dx.doi.org/doi:10.1039/AN9921701441>
- Kamal-Eldin, A., Görgena, S., Pettersson, J., Lampi, A. M. 2000. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, no. 1-2, p. 217-227. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0021-9673\(99\)01346-1](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0021-9673(99)01346-1)
- Kim, O. S., Kusuda, K. 1994. Electrochemical behaviour of α -tocopherol in a thin film of Nujol, a model of adipose tissue. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 33, no. 1, p. 61-65. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/0302-4598\(94\)87033-0](http://dx.doi.org/doi:10.1016/0302-4598(94)87033-0)
- Piironen, V., Koivu, T., Tammissalo, O., Mattila, P. 1997. Determination of phyloquinone in oils, margarines and butter by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Food Chemistry*, vol. 59, no. 3, p. 473-480. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0308-8146\(96\)00288-9](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0308-8146(96)00288-9)
- Švancara, I., Hvizdalová, M., Vytřas, K., Kalcher, K., Novotný, R. 1996. A microscopic study on carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, vol. 8, no. 1, p. 61-65. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.1140080113>
- Sýs, M., Stočes, M., Metelka, R., Vytřas, K. 2016. Electrochemical properties of α -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture. *Monatshefte für Chemie*, vol. 147, p. 31-38. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s00706-015-1620-7>
- Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., Hart, A. J. 2013. Carbon nanotubes: Present and future commercial applications. *Science*, vol. 339, no. 6119, p. 535-539. <http://dx.doi.org/doi:10.1126/science.1222453>
- Wang, J. 1990. Recent advances in stripping analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, vol. 337, no. 5, p. 508-511. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00322854>
- Wang, L. H., Wang, J. F. 2001. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 25, no. 5-6, p. 785-793.
- Wang, L. Z., Ma, C. S., Zhang, X. L., Xu, L. 1994. Determination of vitamin K₃ by cathodic stripping voltammetry. *Microchemical Journal*, vol. 50, no. 1, p. 101-105. <http://dx.doi.org/doi:10.1006/mchj.1994.1064>
- Webster, R. D. 2012. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The Chemical Record*, vol. 12, no. 1, p. 188-200. <http://dx.doi.org/10.1002/tcr.201100005> PMID:22121121
- Wring, S. A., Hart, J. P., Knight, D. W. 1988. Voltammetric behaviour of all-trans-retinol (vitamin A₁) at a glassy carbon electrode and its determination in human serum using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*, vol. 113, no. 12, p. 1785-1789. <http://dx.doi.org/doi:10.1039/an9881301785>
- Yao, W. W., Peng, H. M., Webster, R. D. 2009. Electrochemistry of α -tocopherol (vitamin E) and α -tocopherol quinone films deposited on electrode surfaces in the presence and absence of lipid multilayers. *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, p. 21805-21814. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/jp9079124>
- Žabčiková, S., Červenka, L. 2015. Modified carbon paste electrode as a tool for the evaluation of oxidative stability of rapeseed oil. *Potravinarstvo*, vol. 9, no. 1, p. 347-351. <http://dx.doi.org/doi:10.5219/432>
- Ziyadinova, G., Giniyatova, E., Budnikov, H. 2010. Cyclic voltammetry of retinol in surfactant media and its application for the analysis of real samples. *Electroanalysis*, vol. 22, no. 22, p. 2708-2713. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.201000358>

Acknowledgments:

Financial support from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Project CZ.1.07/2.3.00/30.0021) is gratefully acknowledged.

Contact address:

Milan Sýs, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: milan.sys@upce.cz.

Simona Žabčiková, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: simona.zabcikova@student.upce.cz.

Libor Červenka, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.cervenka@upce.cz.

Karel Vytřas, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: karel.vytras@upce.cz.

Příloha 5



COMPARISON OF ADSORPTIVE WITH EXTRACTIVE STRIPPING VOLTAMMETRY IN ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF RETINOL

Milan Sýs, Simona Žabčíková, Libor Červenka, Karel Vytřas

ABSTRACT

Adsorptive stripping voltammetry (AdSV) of retinol at solid glassy carbon electrode (GCE), carbon paste electrode (CPE) covered by thin layer of multi-wall carbon nanotubes (CPE/MWCNTs) and carbon paste electrode covered by thin layer of single layer graphene (CPE/Graphene) was compared with an extractive stripping voltammetry (ExSV) into silicone oil (SO) as lipophilic binder of glassy carbon paste electrode (GCPE). All types of selected working electrodes were characterized by a scanning electron microscopy to determine overall morphology of electrode surfaces together with spatial arrangement of used carbon particles. The retinol, also known as vitamin A₁, was chosen as a model analyte because it is the most biologically active representative of retinoids which are classified as a significant group of lipophilic vitamins. Based on this comparison, it was observed that electrochemical method with high sensitivity (ExSV at GCPE) is generally characterized by shorter linear range of the calibration curve than in case of AdSV at CPE/MWCNTs or CPE/Graphene. Unlike AdSV at solid GCE, all other tested electrochemical methods could represent suitable analytical tools for monitoring of retinoids in different types of foodstuffs. Especially, content of retinol up to tenths milligrams can be easily determined using ExSV. Additionally, negative interference of chemical species present in real samples is minimal in comparison with direct voltammetric methods performed in supporting electrolytes based on organic solvents due to application of accumulation step in “ex-situ” mode.

Keywords: adsorptive voltammetry; carbon nanotubes; extractive voltammetry; glassy carbon; graphene; retinol

INTRODUCTION

In food analysis, stripping voltammetry in combination with some pulse electrochemical techniques may offer up ultratrace electroanalytical method comparable to the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Abdel-Galeil et al., 2014), especially in determination of heavy metals (Švancara et al., 2010).

According to different variants of deposition steps, analytical methods based on stripping voltammetry can be divided to several variants such as conventional stripping voltammetry with an electroplating step when the accumulation of an analyte on electrode surface is controlled by electrolysis (Hočevar et al., 2007) (i), adsorptive stripping voltammetry (AdSV) when the mentioned accumulation is realized by an adsorption of an analyte on electrode surface (Kalvoda and Kopanica, 1989) (ii), extractive stripping voltammetry (ExSV) where the analyte is extracted from a sample matrix into a paste liquid of a heterogeneous electrode (Wang and Freiha, 1984) (iii) stripping voltammetry based on specific reaction at chemically modified electrodes (Murray et al., 1987) (iv). From an electroanalytical point of view, it can be assumed that all these variants of stripping voltammetry

exist in two opposite modes; anodic (ASV) or cathodic stripping voltammetry (CSV).

But it is important to note that the above adsorption on the electrode surface is always preceded by extraction into the interior of the electrode material (adsorptive/extractive accumulation process). It is major reason why you can meet a term adsorptive/extractive stripping voltammetry in the scientific literature (Wang et al., 1985; Tuzhi et al., 1990; Cookeas et al., 1992).

As a further example of using the ExSV can be considered voltammetric determination of iodide where corresponding authors called the extraction of the iodide into a carbon paste electrode (CPE) based on tricresyl phosphate (TCP) as synergistic type of accumulation (Švancara et al., 1998).

In this case, it is very difficult to determine where an electrochemical reaction of extracted analyte takes place, mostly at the interface between selected paste liquid and an aqueous supporting electrolyte. The discipline dealing with this issue is known as so-called liquid/liquid interfaces electrochemistry (Samec, 2004).

In this contribution, comparison of AdSV at solid GCE, CPE covered by thin layer of multi-wall carbon nanotubes

(CPE/MWNTs) and CPE covered by thin layer of single layer graphene (CPE/Graphene) with ExSV at glassy carbon paste electrode (GCPE) containing silicone oil (SO) as paste binder in determination of retinol is presented.

The retinol has the highest biological activity of a series of carotenoids which belong to lipophilic vitamins (Goodman, 1984). They can be classified as fat-soluble chemical compounds essential for human health (Webster, 2012). Due to insolubility in aqueous solutions, their electrochemical determination by voltammetric techniques is rather complicated.

Direct voltammetric determination of selected lipophilic vitamins at solid glassy carbon electrode (GCE) in 0.05 mol.L⁻¹ lithium perchlorate in a methanol/benzene (2:1) mixture (Atuma et al., 1975), at a rotating GCE in methanolic solution using lithium perchlorate (Hernández Méndez et al., 1988), at CPE in aqueous-organic mixtures with presence of detergent Triton X-100 (Jaiswal et al., 2001), at GCE modified MWCNTs in 0.1 mol.L⁻¹ HClO₄ with acetonitrile (ACN) (Ziyatdinova et al., 2012) etc. has two main disadvantages, namely high consumption of organic solvents and relatively low sensitivity.

The first our contribution published in this scientific journal was focused on explanation of anodic AdSV application in simultaneous electrochemical detection of lipophilic vitamins in the margarine within one analysis. In this paper, it was unfortunately reported that the AdSV at bare GCE is not sensitive analytical method for determination of all lipophilic vitamins (Sýs et al., 2016), especially retinol (vitamin A₁) and cholecalciferol (vitamin D₃).

Based on this finding, the retinol as a model analyte was chosen to investigate whether the sensitivity in the electrochemical determination of lipophilic vitamins can be significantly increased by adsorption of selected carbon nanomaterials (CNs) characterized by high specific surface area, conductivity and lipophilic properties (Komarov and Mironov, 2004; Lu, et al., 2012) or by extraction into paste binder.

A reaction mechanism of retinol electrochemical oxidation has not been completely elucidated yet. The electrochemical oxidation of retinol with formation of retinal with participation of 2 e⁻ and 2 H⁺ was proposed based on observation only one oxidation peak at 0.85 V during cyclic voltammetry at GCE in 0.1 mol.L⁻¹ LiClO₄ in acetonitrile-ethanol media (Ziyatdinova et al., 2010).

However, this statement is incorrect because similar electrochemical behaviour was found for the esters of retinol which devoid a free hydroxyl group (Tan et al., 2014). According to electron density of retinyl propionate, it was predicted that electrochemical oxidation probably takes place on C3-position of cyclohexene ring with participation of 2 e⁻ and H⁺ (Masek et al., 2014).

MATERIAL AND METHODOLOGY

Chemicals and reagents

Synthetic retinol (crystalline) of purity ≥95%, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and 99.8% acetonitrile (ACN) were purchased from Sigma Aldrich (Praha, Czech Republic). A stock solution of 0.01 mol.L⁻¹ retinol was prepared by dissolving the appropriate amount of this

substance in pure ACN. Due to chemical instability of the retinol, this solution had to be stored in a freezer at -5 °C. Glacial acetic acid and sodium acetate from Merck (Darmstadt, Germany) together with ultrapure water ($\rho = 18.3 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; Milli-Q system, Millipore) were used for preparing 0.1 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer.

Sodium hydroxide, potassium hydroxide, potassium chloride, 65% nitric acid, 35% hydrochloric acid, 96% sulfuric acid from Lach Ner (Neratovice, Czech Republic) and sodium phosphate, potassium phosphate from PENTA (Prague, Czech Republic) were necessary for preparation of other supporting electrolytes which were tested in pH study.

Apparatus

All electrochemical measurements were carried out in a 50 mL glass cell at 25 °C. Conventional three-electrode system consisting always one of tested working electrodes, Ag/AgCl and 3.0 mol.L⁻¹ KCl as salt bridge (reference) and platinum wire (auxiliary) electrode which were together connected to potentiostat Autolab PGSTAT101 from Metrohm (Prague, Czech Republic) which is also compatible with software Nova version 1.11. Scanning electron microscopy (SEM) used for characterization of all tested working electrodes was performed at VEGA3 SB (TESCAN, Czech Republic).

Preparation of working electrodes

Pretreatment of glassy carbon electrode

Surface of solid GCE (diameter 2 mm) from already mentioned Metrohm (Prague, Czech Republic) was renovated on polishing pad with presence of wet Al₂O₃ powder (particle size 1.0 μm) for 30 s and subsequently placed in an ultrasonic bath for 5 minutes. After subsequent rinsing of the surface by distilled water, the GCE was ready for new electrochemical experiment.

Preparation of glassy carbon paste electrode

The GCPE was prepared by mixing of 0.3 g glassy carbon powder Sigradur-G (distribution of particle size 5 – 20 μm) from HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH (Maintingen, Germany) and 0.052 g silicone oil MV 8000 (SO) from Lučební závody (Kolín, Czech Republic) in ceramic mortar for 20 min. Resulting homogenous paste was pressed into the cavity (diameter 3 mm) of Teflon piston-like electrode holder. It is very important to note that the height of column in the cavity must be less than 2 cm due to difficult extrusion of glassy carbon paste.

Freshly made paste electrodes should not be employed generally in any experiments due to their rather unstable electrochemical behavior caused by an incomplete homogenization. Thus, it is recommended to leave both used types of paste electrodes (GCPE and conventional CPE) at the laboratory conditions for one day. Only after this self-homogenization process, paste electrodes are really suitable for following voltammetric measurements (Mikysek et al., 2009).

Preparation of conventional carbon paste electrode

Conventional CPE was prepared by the same way like previously mentioned GCPE; only different carbon powder (graphite) CR-2 type (particle size <2 μm) from Maziva

Týn nad Vltavou (Týn nad Vltavou, Czech Republic) was used. Unlike GCPE, resulting carbon paste based on graphite powder may occupy the entire cavity of the electrode holder. Extrusion of carbon paste can be carried out without problems due to shape of graphite particles resembling sheets.

Immobilization of selected carbon nanomaterials

Conventional CPE was covered by thin layer of graphene (resistivity $\leq 0.30 \Omega \text{ cm}$; specific surface area $400 - 1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) from ACS Material, LLC (Medford, USA) or MWCNTs (diameter $10 - 30 \text{ nm}$; length $5 - 15 \mu\text{m}$; specific surface area $40 - 300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) from Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd. (Shenzhen, China) by simple immobilization which is consisted by applying of $20 \mu\text{L}$ corresponding dispersion of the carbon nanomaterial (CN) in DMF ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) on the surface of the CPE at laboratory temperature for 24 hours.

It should be noted that before the immobilization of CNs, these two dispersions of MWCNTs without any pre-treatment and single layer graphene with high surface area had to be homogenised by ultrasound at laboratory temperature for 60 min (Sýs et al., 2015).

Procedure

AdSV or ExSV of retinol were performed in two separate steps. In the first step, the adsorption of analyte on GCE, CPE/MWCNTs and CPE/Graphene surfaces or its extraction into SO of GCPE were realized by immersing of selected working electrode in an aqueous-acetonitrile solutions (25% content of ACN) containing $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of the retinol at 400 rpm for 10 min. In second one, differential pulse voltammetry (DPV) of accumulated retinol was performed in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetate (pH 4.5) buffer from 0 to +1.4 V at potential step (E_{step}) 5 mV, potential of amplitude (E_{amp}) 25 mV, interval time (t) 0.1 s and scan rate (v) $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Otherwise, all changes in the experimental conditions described above are specified below, in the legends of the corresponding figures.

Statistical analysis

Evidently, one of the most important criterion of an analytical method is its sensitivity (Hallett, 1960). Generally, the sensitivity of every analytical method is given by a slope of corresponding calibration curve. From analytical point of view, each analytical method is characterized by other parameters such as linearity of calibration curve, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD).

This LOD is usually defined by the lowest value of an analyte concentration which can be reliably detected. It is usually assessed by linear regression of the calibration curve applying the following equation 1 (MacDougall and Crummett, 1980),

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{S} \quad (1)$$

where: the σ presents the standard deviation of the response and S is slope of the calibration curve. In a narrower sense, the standard deviation is usually calculated from the lowest signal responses obtained for five repetitions (n) minimally. This procedure is used

especially in voltammetric methods where the theoretical value of the LOD calculated from a baseline of background current response would not probably corresponded to reality.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterisation of working electrode surfaces

Nowadays, scanning electron microscopy (SEM) is already routine tools for characterisation of electrode surfaces morphology. Due to particle size of glassy carbon powder around $5 \mu\text{m}$, scale of magnification $50 \mu\text{m}$ was used. In Figure 1, SEM images of working electrode surfaces (CPE/MWCNTs; A, CPE/Graphene; B and GCPE; C) are shown (magnification scale bar of $50 \mu\text{m}$). At the first glance, it is evident that the structures of these electrode surfaces are significantly different.

Unlike the smooth surface of solid GCE (not shown SEM) and other working electrodes, the surface of CPE/MWCNTs is the least homogeneous. It can be assumed that the homogeneity of each surface structure depends on the arrangement of used carbon particles (nanotubes). For example, immobilized MWCNTs create irregular skeins of various sizes and multifaceted range of interconnection. Moreover, no functionalized MWCNTs by a pretreatment in mixture of strong inorganic acids (Sun et al., 2002; Kuzmany et al., 2004) are characterized by high lipophilicity which can cause significant increasing of retinol adsorption. On the other hand, it has to be clear unfortunately that mentioned weak homogeneity can have dominant effect on adsorption reproducibility, therefore significantly reduce sensitivity.

CPE/Graphene electrode

Surface of the CPE covered by thin layer of graphene reminds a structure of a coarse cloth probably due to mutual impaction of the graphene nanosheets having a typical planar configuration (Zhu et al., 2010). Overall, it can be stated that the surface is characterized by higher homogeneity than in the previous case of MWCNTs. It is thus not surprising that more satisfactory reproducibility of adsorption will be assumed.

Glassy carbon paste electrode

From the physical point of view, glassy carbon paste can be defined as a dispersion of conductive glassy carbon beads in lipophilic paste binder which is moreover non-conductive and viscous (Švancara et al., 1996).

Generally, an electric contact between graphite sheets of graphite powder in a CPE (not shown SEM) is better than between beads of glassy carbon in a GCPE because significant part of each particle of glassy carbon is covered by thin layer of the paste binder. For this reason, glassy carbon pastes are suitable (stable) electrode materials for electrochemical measurements in aqueous organic mixtures (Dejmkova et al., 2012; Sýs et al., 2016).

In fact, glassy carbon paste inside cavity of electrode holder is a column full of small beads where free spaces between glassy carbon particles are filled by sticky lipophilic binder. Consequently, there are not any changes in structure after each restoration and polishing of electrode surface which results in satisfactory reproducibility.

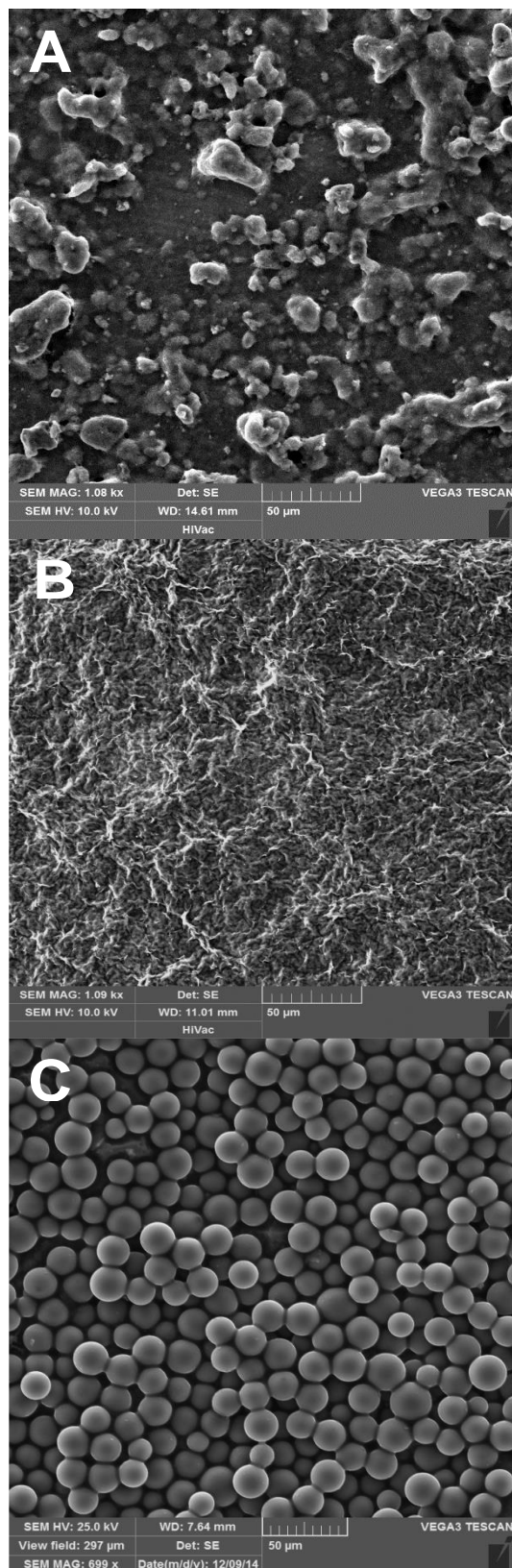


Figure 1 SEM images of CPE/MWCNTs (A), CPE/Graphene (B) and GCPE (C) surface structures. CPE/MWCNTs electrode.

Electrochemical behaviour of retinol

Retinol adsorbed on GCE surface in 0.1 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer provides two peaks at anodic potential (E_p^a) 0.680 and 1.075 V similarly like at the GCE in

methanolic (95%) 0.05 mol.L⁻¹ acetate (pH 5) buffer solution (Wring et al., 1988).

Surprisingly at other tested electrodes, the retinol provides three oxidation peaks as following: $E_{p1}^a = 0.750$ V; $E_{p2}^a = 0.970$ V; $E_{p3}^a = 1.330$ V at CPE/MWCNTs, $E_{p1}^a = 0.725$ V; $E_{p2}^a = 1.090$ V; $E_{p3}^a = 1.240$ V at CPE/Graphene and $E_{p1}^a = 0.670$ V; $E_{p2}^a = 1.080$ V; $E_{p3}^a = 1.230$ V at GCPE. In comparison with literature (Atuma et al., 1975), this phenomenon was also obtained by voltammetric measurements of a retinyl palmitate at GCE in a mixture of two organic solvents.

In all these cases, it was found that the most sensitive peak current response (I_p) was always observed for the first anodic peak (Figure 2). In this paper, values of I_p are expressed as current density (j) due to different surface area of working electrodes.

Optimization of the working conditions

From physical point of view, adsorption efficiency is predominantly determined by specific surface area of used nanomaterials. In contrast with the previous case, extraction efficiency is determined by an extraction equilibrium constant (K) affected by many factors such as selection of paste binder, selection of organic solvent miscible with water, their volumetric ratio (ϕ), their polarity represented by appropriate dielectric constants (ϵ_r), time of accumulation, speed of stirring, temperature, presence of salts etc.

From the previous paragraph it is evident that the overall optimization depends on finding optimal working conditions. In contrast with conventional stripping voltammetry where an analyte accumulation is controlled by electrolysis, AdSV together with ExSV represent to optimize time-consuming analytical methods.

Effect of carbon nanomaterials amount

In contrast with CNs functionalized by different kinds of functional groups (McAllister, et al, 2007), unmodified

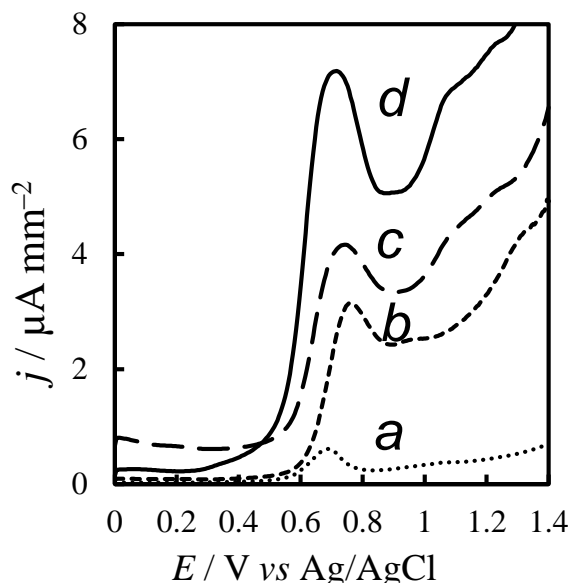


Figure 2 Voltammetric responses of 100 µmol.L⁻¹ retinol adsorbed on surfaces of GCE (a), CPE/MWCNTs (b), CPE/Graphene (c) and extracted into GCPE with 15% SO (d).

MWCNTs and single layer graphene can be classified as suitable electrode materials for accumulation of fat-soluble vitamins by the adsorption due to their high lipophilicity.

During optimization of appropriate amount of MWCNTs and graphene immobilized on CPE surface, it was found that a presence of these CNs did not have any effect on shifting of E_{p1}^a which could be theoretically caused by their catalytic actions.

Oddly enough, it was observed that any presence of tested CNs caused statistically significant increasing of retinol current density due their high specific surface area. The highest value of the current density was observed at electrodes having $\sim 5.7 \mu\text{g}$ CNs immobilized on 1.0 mm^2 electrode surface. It is reason why $20 \mu\text{L}$ dispersion of these CNs ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) onto electrode surface with diameter 3 mm was used.

Effect of paste binder amount

Fundamentally, it is considered that selection of the optimum paste binder depends on an analyte polarity. One rule to remember is “like dissolves like”, which means that ionic or polar solutes (which have a charge or slight charge) will dissolve in similarly polar solvents.

Based on comparison of dielectric constants of common paste binders (paraffin oil (PO); 4.6 – 4.8; paraffin wax (PW); 2.1 – 2.5; polypropylene (PP); 1.5; silicone oil (SO); 2.2 – 2.9 and vaseline (VA); 2.2 – 2.9), it seems that GCPE prepared from mentioned PP should be the best choice but it is not, unfortunately. An explanation can be found in different electrochemical properties of unmodified carbon pastes (Švancara and Schachl, 1999).

According to previous experience (Sýs et al., 2016), silicone oil (SO) known as a traditional paste binder in preparation of GCPE was selected although more detailed study should be done. From Figure 3, it is clear that current density does not increase generally with the increasing of SO content in the GCPE. But, the highest values were obtained at GCPEs with 10% and 15% content of present paste binder.

Experimentally, it was found that the highest tolerated content of some paste binder is about 30% (Mikysek et al., 2009). Thus, it should be clear that any increasing of this content by extraction of retinol can cause significant deterioration of electrochemical characteristics, especially a substantial increase of ohmic resistance (R).

Effect of organic solvent amount

Selection of suitable organic solvent soluble in water and its content can dramatically affect the final efficiency of an accumulation step. An explanation why an ACN was chosen is relatively simple. In comparison with other eventual organic solvents, the ACN is totally miscible with water and it has high boiling point $82 \text{ }^\circ\text{C}$. Basically, it is necessary to prevent the evaporation of used organic solvent and thus to have constant working conditions during accumulation. During searching of optimum content of the ACN to determine retinol at GCE and GCPE it was found that 25% ACN content should be used to achieve optimum working conditions (Figure 4).

In this part of contribution, it is necessary to mentioned that always the the highest current response was obtained at 25% ACN, whether any content of silicone oil in GCPE and any amount of MWCNTs or single layer graphene

onto CPE surfaces was used. Theoretically, optimum amount of any organic solvent is defined by equilibrium distribution of certain analyte between two immiscible phases; working electrode and aqueous-organic mixture (Sýs and Vytřas, 2016).

Moreover, it was observed that any content of this organic solvent does not have any significant effect on negative increasing of background current response for solid electrode materials such as GCE and CPE covered by thin layer of carbon nanomaterials (not shown). However, it is necessary to remind that previous statement does not valid for carbon paste electrodes due to solubility of paste binders in organic solvents. The background current at GCPE with 15% SO increased with increasing of acetonitrile content.

Speed of stirring influence

The speed of stirring significantly affects the rate of retinol transport to an electrode surface where this analyte is adsorbed or can be further extracted into interior of the

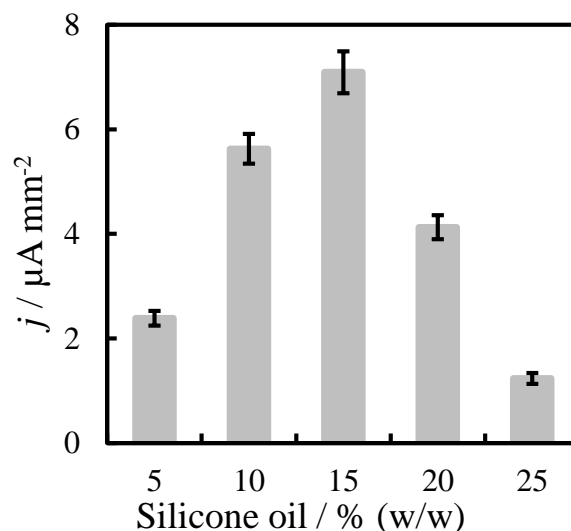


Figure 3 Dependence of retinol current density on content of paste binder.

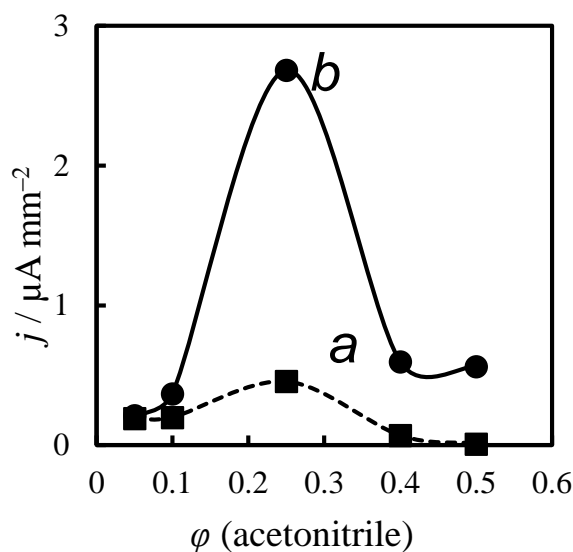


Figure 4 Dependency of current density obtained at solid GCE (a) and GCPE with 20% SO (b) on different ACN content used during accumulation step.

electrode material. In addition, the current density of voltammetric oxidation of the retinol is a linear function of its accumulated amount during adsorption or extraction. In this study, it was observed that values of speed of stirring higher than 400 rpm did not have any significant effect on the increasing of final current density. The value 400 rpm therefore was chosen as optimum.

Effect of accumulation time

The optimum time is defined as the time required to reach an equilibrium of retinol distributed between nonpolar electrode surface and used aqueous-organic mixture (“adsorption”) or also between nonpolar paste binder and previously mentioned mixture (“extraction”). Accumulation time is therefore the parameter which has fundamental effect on the sensitivity of studied variants of stripping voltammetry.

In both cases, it is possible to say with certainty that any significant increasing of the current density was not visible at values of the accumulation time higher than 15 min. However, it is important to state that 10 min is sufficient time to achieve the equilibrium for ExSV at GCPE with 15% SO content due to high relative standard deviation (RSD) about 8% which was calculated for 5 repetitions. In this case, values of retinol current density were statistically the same for 10 and 15 min of accumulation due to relatively high value of RSD. Thus, value 10 min was selected as optimum accumulation time.

Selection of suitable supporting electrolyte

Various supporting electrolytes such as 0.1 mol.L⁻¹ phosphate (pH 7.05) buffer, 0.1 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer, 0.1 mol.L⁻¹ KCl solution (pH 6.2), solutions of diluted inorganic acids like 0.05 mol.L⁻¹ H₂SO₄ (pH 1.13), 0.1 mol.L⁻¹ HCl (pH 1.02), 0.1 mol.L⁻¹ HNO₃ (pH 1.05) and alkaline solutions of 0.2 mol.L⁻¹ KOH (pH 13.4) or 0.1 mol.L⁻¹ NaOH (pH 12.3) were tested to achieve the

high sensitivity of final electrochemical methods. It was found that the best recognition of individual anodic peaks at potentials 0.395, 0.635 and 0.850 V was obtained at solid GCE using NaOH solution. Almost identical peak oxidation current responses of retinol were observed at 0.690 V (solid GCE) in solutions of strong inorganic acids. Corresponding peak potentials differed minimally (± 50 mV) according to types of used electrodes.

From analytical point of view, the highest current response of the first anodic peak was observed for 0.1 mol.L⁻¹ acetate (pH 4.5) buffer, and because of this, it was chosen as the optimum. By the way, direct voltammetric determination of retinol was previously performed in this acetate buffer (Wring et al., 1988; Filik et al., 2006). For demonstration, voltammograms of retinol obtained at solid GCE recorded in different selected supporting electrolytes are shown in Figure 5.

Comparison of AdSV with ExSV in retinol determination

Sensitivity of non-conventional voltammetric methods

Almost three times lower values of detection limits (LOD) were obtained at CPEs covered by thin layer of CNs than at solid GCE (see Table 1). Moreover, it is necessary to state that also linear range was three times prolonged at these modified working electrodes. Based on this finding, it can be concluded that an insignificant progress in the sensitivity of the AdSV was achieved using carbon nanomaterials.

Unlike solid GCE, relatively high values of background current were observed at GCPE, CPE/MWCNTs and CPE/Graphene. It is caused probably by presence of ACN at accumulation step. This phenomenon resulted in significantly high intercept values of calibration curves and therefore corresponding LODs cannot have lower values, unfortunately.

From all tested non-conventional electrochemical methods, the highest sensitivity in retinol determination was observed using ExSV at GCPE. However, it was determined that linearity of calibration curve was ranged only from 1.0 to 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ retinol. In comparison with the ExSV, linear ranges of appropriate calibration curves obtained at CPE/MWCNTs and CPE/Graphene were found from 10 to 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ retinol. For demonstration, calibration curve together with corresponding anodic voltammograms of retinol measured at the GCPE is shown in Figure 6.

Table 1 also shows interesting comparison of non-conventional voltammetric methods based on ex-situ accumulation step with other already developed voltammetric methods in retinol determination. Surprisingly, AdSV at different working electrodes and ExSV at GCPE presented in this contribution have significantly better analytical parameters than others.

Due to satisfactory sensitivity of ExSV, it can be predicted that electrochemical methods based on stripping voltammetry with synergistic type of accumulation could be alternative analytical method to reverse high-performance liquid chromatography (Hite, 2003) in determination of retinoids which are commonly used as food additives.

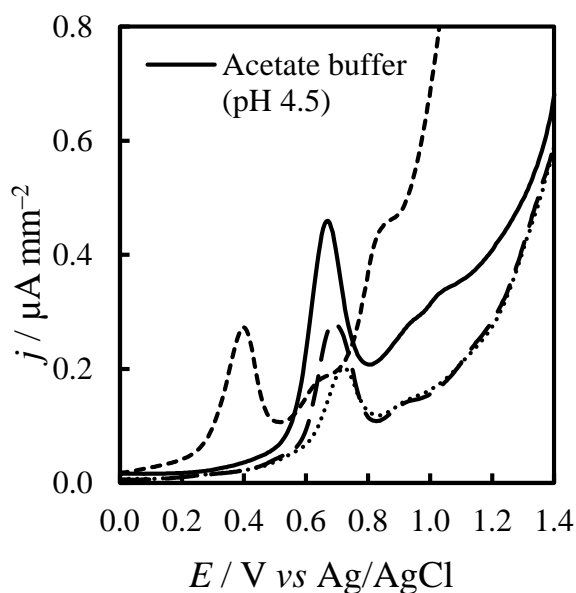


Figure 5 Voltammograms of 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ retinol adsorbed from 25% ACN on solid GCE surface at 400 rpm for 10 min and subsequently electrochemically oxidized in different strictly aqueous electrolytes.

Table 1 Comparison of non-conventional voltammetric methods.

Sensor	Method	Linear range (mol.L ⁻¹)	LOD (mol.L ⁻¹)	References
GCE	DPV	–	4.7 × 10 ⁻⁵	(Wang, 2000)
TFME	DPV	–	8.8 × 10 ⁻⁶	(Wang, 2000)
TFLE	DPV	–	4.7 × 10 ⁻⁶	(Wang, 2000)
PtE	LSV	8.2 × 10 ⁻⁵ to 1.1 × 10 ⁻³	–	(Budnikov et al., 2004)
GCE	LSV	9.7 × 10 ⁻⁵ to 2.3 × 10 ⁻³	4.8 × 10 ⁻⁵	(Budnikov et al., 2005)
GCE	CV	2.9 × 10 ⁻⁵ to 9.8 × 10 ⁻⁴	1.5 × 10 ⁻⁷	(Ziyatdinova et al., 2010)
GE/MWCNTs	CV	5.0 × 10 ⁻⁵ to 1.5 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ⁻⁵	(Ziyatdinova et al., 2012)
GCE/MWCNTs	SWV	5.0 × 10 ⁻⁶ to 2.0 × 10 ⁻⁴	8.0 × 10 ⁻⁷	(Filik et al., 2016)
GCE	AdSV	1.0 × 10 ⁻⁵ to 4.0 × 10 ⁻⁵	3.5 × 10 ⁻⁶	This paper
GCPE	ExSV	1.3 × 10 ⁻⁶ to 5.0 × 10 ⁻⁵	4.5 × 10 ⁻⁷	This paper
CPE/MWCNTs	AdSV	5.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻⁴	1.3 × 10 ⁻⁶	This paper
CPE/Graphene	AdSV	4.0 × 10 ⁻⁶ to 1.2 × 10 ⁻⁴	1.0 × 10 ⁻⁶	This paper

Note: CV; cyclic voltammetry, DPV; differential pulse voltammetry, GE/MWCNTs; multi-walled carbon nanotubes modified graphite electrode, LOD; limit of detection, LSV; linear sweep voltammetry, PtE; platinum disk electrode, SWV; square wave voltammetry, TFLE; thin-film lead deposited GCE, TFME and thin-film mercury deposited GCE.

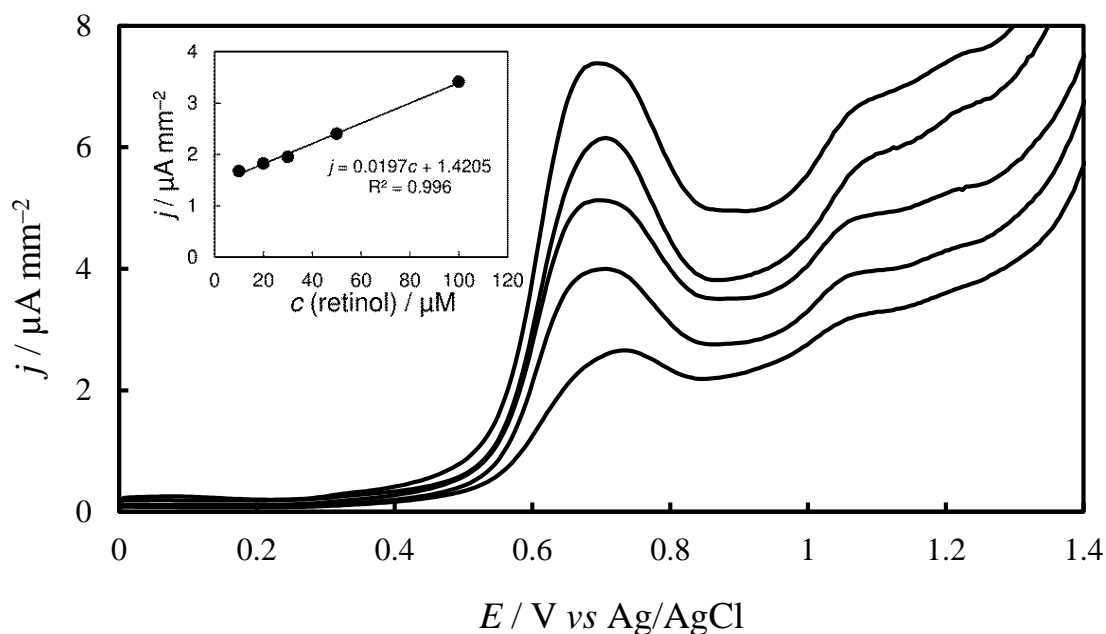


Figure 6 Voltammograms with corresponding calibration curve of retinol obtained at GCPE with 15% content of silicone oil.

Table 2 Reproducibility of accumulation steps for sensors applied in the AdSV and ExSV.

Sensor	E_p^a (V)	j ($\mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$)	j_{RSD} (%)
solid GCE	0.680	0.379	7.5
GCPE	0.670	4.516	8.2
CPE/MWCNTs	0.750	3.085	6.3
CPE/Graphene	0.725	3.447	4.9

Note: E_p^a ; anodic peak potential, j ; current density and RSD; relative standard deviation.

Especially, retinyl palmitate, known as synthetic vitamin A, is usually added to fortified a low fat milk more nutritious than they would be without the addition of vitamins that were removed.

The seasonal variation of retinol in cow's farm milk can be also monitored by ExSV (LOD = 0.128 mg.L⁻¹) because retinol content is about 1.0 mg per 1 L milk (Hodulová et al., 2015). Moreover, it seems that retinoids such as retinyl acetate and already mentioned retinyl palmitate could be also determined in cosmetic products (Ziyatdinova et al., 2010).

Reproducibility of retinol accumulation

Reproducibility of retinol accumulation by adsorption on GCE, CPE/MWCNTs and CPE/Graphene surfaces or extraction into the SO of GCPE was calculated for 5 repetitions. These experiments were performed always using freshly polished GCE, newly prepared CPEs covered by thin layer of CNs, renewed GCPE, standard solution of retinol as well. At laboratory conditions, the accumulation was performed by immersing of selected working electrode (open circuit) into 10 mL of 100 µmol.L⁻¹ retinol solution containing 25% ACN stirred at 400 rpm for 10 min.

From values shown in Table 2, it is evident that satisfactory reproducibility (RSD ≤5%) was obtained only at the GCE/Graphene. This finding can be explained by a homogeneous structure of graphene layer. Fortunately, values of RSD for other electrodes were not calculated higher than 9%.

CONCLUSION

Nowadays, all lipophilic vitamins and their synthetic analogs are determined dominantly by HPLC in foodstuffs. The reason is a possibility of their separation in within one analysis. However, it is necessary to state that this kind of analysis includes a lot of time consuming steps such as hydrolysis of lipophilic sample matrix, extraction of vitamins into an organic solvent and own separation.

In comparison to HPLC, ExSV at GCPE represents a simple analytical tool applicable in determination of lipophilic vitamins because these analytes can be directly extracted from sample matrixes or simple sample preparation is assumed. This non-conventional stripping voltammetry usually is not able to detect each form of certain vitamins (individual retinoids, tocopherols, cholecalciferols and phyloquinones) due to their close peak potentials and significant width of peaks. Anyway, individual groups of these vitamins could be easily determined as weight equivalents of their most biologically active forms.

Despite high specific surface area of MWCNTs or single layer graphene, it should be concluded that any used variant of AdSV is not such sensitive as ExSV at GCPE. Additionally, restoration of electrode surfaces with the immobilized carbon nanomaterials is practically impossible after each accumulation step. An improvement in the sensitivity and reproducibility of ExSV could be found in using GCPE containing the optimal portion of graphene which has higher specific surface area than MWCNTs. It is necessary to state that from scientific point of view, this possibility has not been tested yet.

REFERENCES

- Abdel-Galeil, M. M., Ghoneim, M. M., El-Desoky, H. S., Hattori, T., Matsuda, A. 2014. Anodic stripping voltammetry determination of lead ions using highly sensitive modified electrodes based on multi-walled carbon nanotube. *Journal of Chemistry and Biochemistry*, vol. 2, no. 2, p. 25-43. <http://dx.doi.org/doi:10.15640/jcb.v2n2a2>
- Atuma, S. S., Lundström, K., Lindquist, J. 1975. The electrochemical determination of vitamin A. Part II. Further voltammetric determination of vitamin A and initial work on the determination of vitamin D in the presence of vitamin A. *Analyst*, vol. 100, no. 1196, p. 827-834. <http://dx.doi.org/doi:10.1039/AN9750000827>
- Budnikov, G. K., Ziyatdinova, G. K., Gil'metdinova, D. M. 2004. Determination of some liposoluble antioxidants by coulometry and voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 59, no. 7, p. 654-658. <http://dx.doi.org/doi:10.1023/B:JANC.0000035278.20459.9e>
- Budnikov, G. K., Ziyatdinova, G. K., Gil'metdinova, D. M. 2005. Reactions of superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 60, no. 1, p. 49-52. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s10809-005-0012-2>
- Cookeas, E. G., Efstathiou, C. E. 1992. Preconcentration of organic compounds at a diphenyl ether graphite paste electrode and determination of vanillin by adsorptive-extractive stripping voltammetry. *Analyst*, vol. 117, no. 8, p. 1329-1334. <http://dx.doi.org/doi:10.1039/AN9921701329>
- Filik, H., Avan, A. A., Aydar S. 2016. Simultaneous electrochemical determination of α-tocopherol and retinol in micellar media by a poly(2,2'-(1,4 phenylenedivinylene)-bis-8-hydroxyquinaldine)-multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Analytical Letters*, vol. 49, no. 8, p. 1240-1257. <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2015.1094665>
- Dejmkova, H., Zima, J., Míka, J. 2012. Behavior of glassy carbon paste electrode in flowing methanolic solutions. *Electroanalysis*, vol. 24, no. 8, p. 1766-1770. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.201100598>
- Goodman, D. S. 1984. Vitamin A and retinoids in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, vol. 310, no. 16, p. 1023-1031. <http://dx.doi.org/doi:10.1056/NEJM198404193101605>
- Hallett, L. T. Editorial. 1960. Sensitivity of analytical methods. *Analytical Chemistry*, vol. 32, no. 9, 1057-1057. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac60165a605>
- Hernández Méndez, J., Sánchez Pérez, A., Delgado Zamarreño, M., Hernández García, M. L. 1988. Voltammetric determination of vitamin D₃ with a rotating glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 6, no. 6-8, p. 737-741. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/0731-7085\(88\)80085-2](http://dx.doi.org/doi:10.1016/0731-7085(88)80085-2)
- Hite, D. A. 2003. Determination of retinyl palmitate (vitamin A) in fortified fluid milk by liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, vol. 86, no. 2, p. 375-385. [PMid:12723921](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12723921/)
- Hočevar, S. B., Švancara, I., Ogorevc, B., Vyřas, K. 2007. Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis. *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 22, p. 8639-8643. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac070478m>
- Hodulová, L., Vorlová, L., Kostrhounová, R., Klimešová-Vyleťelová, M., Kuchčík, J. 2015. Interspecies and seasonal differences of retinol in dairy ruminant's milk. *Potravinárstvo*, vol. 9, no. 1, p. 201-205. <http://dx.doi.org/doi:10.5219/436>

- Jaiswal, P. V., Ijeri, V. S., Srivastava, A. K. 2001. Voltammetric behavior of α -tocopherol and its determination using surfactant + ethanol + water and surfactant + acetonitrile + water mixed solvent systems. *Analytica Chimica Acta*, vol. 441, no. 2, p. 201-206. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0003-2670\(01\)01119-9](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0003-2670(01)01119-9)
- Kalvoda, R., Kopanica, M. 1989. Adsorptive stripping voltammetry in trace analysis. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 61, no. 1, p. 97-112. <http://dx.doi.org/doi:10.1351/pac198961010097>
- Komarov, F. F., Mironov, A. M. 2004. Carbon nanotubes: Present and future. *Physics and Chemistry of Solid State*, vol. 5, no. 3, p. 411-429.
- Kuzmany, H., Kukovec, A., Simon, F., Holzweber, M., Kramberger, Ch., Pichler, T. 2004. Functionalization of carbon nanotubes. *Synthetic Metals*, vol. 141, no. 1-2, p.113-122. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.synthmet.2003.08.018>
- Lu, W., Soukiasian, P., Boeckl, J. 2012. Graphene: Fundamentals and functionalities. *MRS Bulletin*, vol. 37, no. 12, p. 1119-1124. <https://doi.org/10.1557/mrs.2012.279>
- Masek, A., Chrzescijanska, E., Zaborski, M. 2014. Voltammetric and FTIR spectroscopic studies of the oxidation of retinyl propionate at Pt electrode in non-aqueous media. *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 9, no. 12, p. 6809-6820.
- MacDougall, D., Crummett, W. B. 1980. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, vol. 52, no. 14, p. 2242-2249. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac50064a004>
- McAllister, M. J., Li, J. L., Adamson, D. H., Schniepp, H. C., Abdala, A. A., Liu, J., Herrera-Alonso, M., Milius, D. L., Car, R., Prud'homme, R. K., Aksay, I. A. 2007. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite. *Chemistry of Materials*, vol. 19, no. 18, p. 4396-4404. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/cm0630800>
- Mikysek, T., Švancara, I., Kalcher, K., Bartoš, M., Vytřas, K., Ludvík, J. 2009. New approaches to the characterization of carbon paste electrodes using the ohmic resistance effect and qualitative carbon paste indexes. *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 15, p. 6327-6333. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac9004937>
- Murray, R. W., Ewing, A. G., Durst, R. A. 1987. Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. *Analytical Chemistry*, vol. 59, no. 5, p. 379A-390A. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac00132a001>
- Samec, Z. 2004. Electrochemistry at the interface between two immiscible electrolyte solutions. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 76, no. 12, p. 2147-2180. <http://dx.doi.org/doi:10.1351/pac200476122147>
- Sun, Y. P., Fu, K., Lin, Y., Huang, W. 2002. Functionalized carbon nanotubes: Properties and applications. *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, no. 12, p. 1096-1104. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ar010160v>
- Sýs, M., Metelka, R., Mikysek, T., Vytřas, K. 2015. Improvement of enzyme carbon paste-based biosensor using carbon nanotubes for determination of water-soluble analogue of vitamin E. *Chemical Papers*, vol. 69, no. 1, p. 150-157. <http://dx.doi.org/doi:10.2478/s11696-014-0608-9>
- Sýs, M., Stočes, M., Metelka, R., Vytřas, K. 2016. Electrochemical properties of α -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture. *Monatshefte für Chemie*, vol. 147, p. 31-38. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s00706-015-1620-7>
- Sýs, M., Vytřas, K. 2016. Characterization of α -tocopherol extraction into a selected carbon paste binder. *Scientific Paper of the University of Pardubice Series A*, vol. 22, p. 35-44.
- Sýs, M., Žabčiková, S., Červenka, L., Vytřas, K. 2016. Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination. *Potravinárstvo*, vol. 10, no. 1, p. 260-264. <http://dx.doi.org/doi:10.5219/587>
- Švancara, I., Hvízdalová, M., Vytřas, K., Kalcher, K., Novotný, R. 1996. A microscopic study of carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, vol. 8, no. 1, p. 61-65. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.1140080113>
- Švancara, I., Konvalina, J., Schachl, K., Kalcher, K., Vytřas, K. 1988. Stripping voltammetric determination of iodide with synergistic accumulation at a carbon paste electrode. *Electroanalysis*, vol. 10, no. 6, p. 435-441.
- Švancara, I., Prior, Ch., Hočevar, S. B., Wang, J. 2010. A decade with bismuth-based electrodes in electroanalysis. *Electroanalysis*, vol. 22, no. 13, p. 1405-1420. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.200970017>
- Švancara, I., Schachl, K. 1999. The testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy*, vol. 93, p. 490-499.
- Tan, Y. D., Urbančok, D., Webster, R. D. 2014. Contrasting voltammetric behavior of different forms of vitamin A in aprotic organic solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 29, p. 8591-600. <http://dx.doi.org/10.1021/jp505456q>
- Tuzhi, P., Zhongping, Y., Rongshan, L. 1990. Adsorptive/extractive voltammetry for determining clozapine at carbon paste electrodes. *Chemical Journal of Chinese Universities*, vol. 11, no. 10, p. 1067-1071.
- Wang, J., Freiha, B. A. 1984. Extractive preconcentration of organic compounds at carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, vol. 56, no. 4, p. 849-852. <http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac00268a069>
- Wang, J., Freiha, B. A., Deshmukh, B. K. 1985. Adsorptive/extractive stripping voltammetry of phenothiazine compounds at carbon paste electrodes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 14, no. 4-6, p. 457-467. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/0302-4598\(85\)80018-0](http://dx.doi.org/doi:10.1016/0302-4598(85)80018-0)
- Wang, L. H. 2000. Simultaneous determination of retinal, retinol and retinoic acid (all-trans and 13-cis) in cosmetics and pharmaceuticals at electrodeposited metal electrodes. *Analytica Chimica Acta*, vol. 415, no 1-2, p. 193-200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00870-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00870-9)
- Webster, R. D. 2012. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The Chemical Record*, vol. 12, no. 1, p. 188-200. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/ocr.201100005>
- Wring, S. A., Hart, J. P., Knight, D. W. 1988. Voltammetric behaviour of all-trans-retinol (vitamin A1) at a glassy carbon electrode and its determination in human serum using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*, vol. 113, no. 12, p. 1785-1789. <http://dx.doi.org/doi:10.1039/AN9881301785>
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., Ruoff, R. S. 2010. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Advanced Materials*, vol. 22, no. 35, p. 3906-3924. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/adma.201001068>
- Ziyatdinova, G., Giniyatova, E., Budnikov, H. 2010. Cyclic voltammetry of retinol in surfactant media and its application for the analysis of real samples. *Electroanalysis*, vol. 22, no. 22, p. 2708-2713. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/elan.201000358>
- Ziyatdinova, G., Morozov, M., Budnikov, H. 2012. MWNT-modified electrodes for voltammetric determination

of lipophilic vitamins. *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 16, no. 7, p. 2441-2447. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s10008-011-1581-7>

Acknowledgments:

Financial support from Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2016-001) is gratefully acknowledged.

Contact address:

Milan Sýs, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: milan.sys@upce.cz

Simona Žabčíková, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: simona.zabcikova@student.upce.cz

Libor Červenka, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.cervenka@upce.cz

Karel Vytřas, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: karel.vytras@upce.cz

Příloha 6

ELEKROCHEMICKÉ VLASTNOSTI UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD MODIFIKOVANÝCH TENZIDY

Simona Žabčíková, Milan Sýs, Libor Červenka, Tomáš Mikysek a Karel Vytřas

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice
E-mail milan.sys@upce.cz

Souhrn

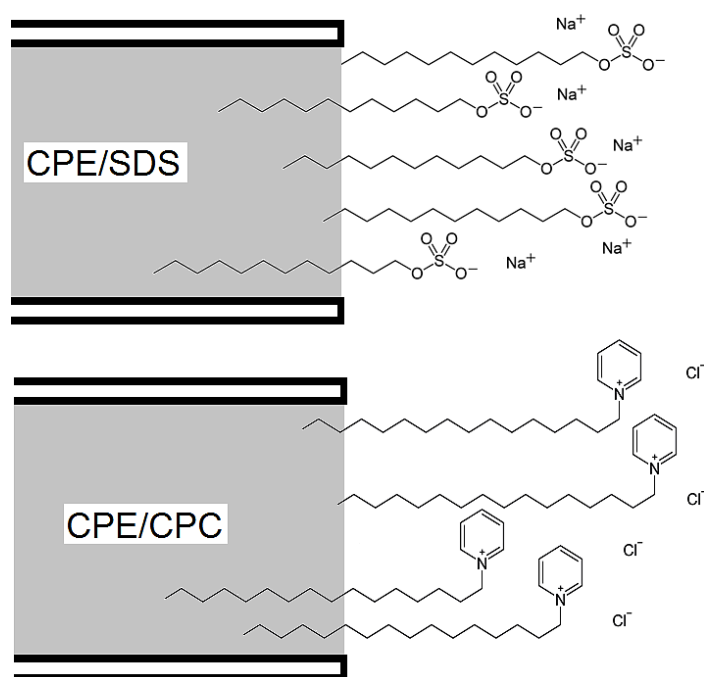
Tato vědecká práce je zaměřena na studium elektrochemických vlastností uhlíkových pastových elektrod modifikovaných povrchově aktivními látkami a jejich využití ve voltametričném stanovení lipofilních látek v kosmetických přípravcích, zejména v tucích rozpustných vitamínů s antioxidačními účinky, jež jsou používány jako konzervační látky. Dodecylsírán sodný a monohydrát hexadecylpyridinium chloridu byly použity jako možné modifikátory. Bylo zjištěno, že výběr a obsah použitého tenzidu u těchto heterogenních senzorů výrazně ovlivňuje elektrickou vodivost a mechanickou stabilitu v ryze organickém rozpouštědle, což hraje zásadní roli ve voltametričké detekci zmíněných vitamínů.

Úvod

Uhlíková pastová elektroda (“*Carbon paste electrode*“, CPE) byla v roce 1958 původně navržena Adamsem [1] pro voltametričká měření jako alternativa k tehdy velmi populární kapající rtuťové elektrodě využívané v polarografii. Původního záměru – zhotovit kapající elektrodu polarizovatelnou v oblasti kladných potenciálů – se sice nepodařilo dosáhnout, nicméně s rozvojem moderních voltametričkých technik, zejména zavedením rozpouštěcí (stripping) voltametrie postupně nacházela širší a širší uplatnění v oblasti elektroanalýzy obecně [2]. Z fyzikálního hlediska se jedná o disperzi uhlíkových částic (např. spektrografický uhlík, skelný uhlík, pyrolytický uhlík atp.) ve viskózním lipofilním pojivu (např. parafinovém či silikonovém oleji, vazelína, parafinovém vosku apod.); výslednou disperzi se nakonec naplní vhodné elektrodové těleso (držák) [3].

Jednoduchou modifikací (přimícháním dalších komponent, např. mediátorů v podobě prášků platinových kovů a oxidů kovů [4], enzymů [5], uhlíkových nanočástic [6],

tenzidů [7,8] apod.) lze dosáhnout rozdílně požadovaných vlastností. Elektrody modifikované aniontovým tenzidem, dodecylsíránem sodným (CPE/SDS), nebo kationtovým tenzidem, monohydrátem chloridu hexadecylpyridinia (CPE/CPC), představují specifické senzory (viz Obr. 1), které lze použít při voltametrických měření v ryze organických rozpouštědlech [2], lze je tedy eventuálně použít pro vývoj citlivých voltametrických metod určených ke stanovení lipofilních látek, jako jsou některá aditiva používaná v kosmetických přípravcích [9,10]. Těmito aditivy často bývají lipofilní vitamíny s antioxidačními vlastnostmi a jejich analogy (nejčastěji estery kyseliny octové, propionové či palmitové), které zabraňují nežádoucímu žluknutí tuků [11], a tak slouží jako konzervanty, neboť svojí přítomností prodlužují trvanlivost. Jako vzorové analyty byl zvolen jednak retinol acetát (vitamín A),



α -tokoferol (vitamín E); obě tyto sloučeniny mají silné antioxidační účinky [12]. V rámci předchozích studií bylo zjištěno, že α -tokoferol v nevodném prostředí poskytuje pouze jeden oxidační pík [13], zatímco u retinol acetátu byly pozorovány tři oxidační stupně [14]. Hodnoty potenciálů těchto tří oxidačních píků retinol acetátu jsou však v dostatečné vzdálenosti od proudové odezvy α -tokoferolu, lze je tudíž od sebe dobře odlišit.

Obrázek 1. Schématická struktura elektrodového povrchu uhlíkových pastových elektrod modifikovaných příslušným tenzidem.

Experimentální část

Použité chemikálie

Krystalický retinol acetát (vitamín A), (+)- α -tokoferol (vitamín E) z rostlinného oleje o koncentraci $1000 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$, dodecylsírán sodný, monohydrát chloridu hexadecylpyridinia, acetonitril (ACN) pro HPLC o čistotě 99.8% a bezvodý LiClO_4 byly pořízeny od společnosti Sigma Aldrich (Praha, Česká Republika). Prášek ze spektrografického uhlíku o velikosti částic menších než $5 \mu\text{m}$ z Graphite Týn, spol. s r.o. (Týnec nad Vltavou, Česká Republika) a

parafínový olej (PO) ze společnosti Merck (Darmstadt, Německo) byly použity pro přípravu pastových elektrod. Ostatní použité chemikálie měly požadovanou analytickou čistotu.

Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla prováděna v klasickém tříelektrodovém zapojení v 50 ml skleněné voltametrické cele při laboratorních podmínkách. Pracovní uhlíková pastová elektroda modifikovaná jedním z vybraných tenzidů, referenční chloridostříbrná elektroda se solným můstkem ze společnosti Metrohm (Praha, Česká Republika) a platinový plíšek jako pomocná elektroda byly společně zapojeny k potenciostatu Autolab PGSTAT101 kompatibilním s programem Nova verze 1.11 z výše zmíněné společnosti.

Příprava modifikovaných elektrod

Aby nedocházelo ke znehodnocení elektrodového materiálu vlivem přítomnosti organického rozpouštědla, musí uhlíková pasta obsahovat dostatečně velké množství povrchově aktivní látky. V našem případě bylo pro přípravu optimálního elektrodového materiálu použito 0,5 g grafitového prášku, 0,2 g parafínového oleje a 0,3 g SDS. Homogenizace byla provedena v keramické třecí misce po dobu 20 minut. Výsledná pasta byla poté napěchována do dutiny (průměr 3 mm) teflonového držáku opatřeného kovovým pístem, který zajišťuje elektrický kontakt. Obecně platí, že čerstvě připravené elektrody, zvláště modifikované, by neměly být používány v žádném experimentu, neboť dost často vykazují nestabilní elektrochemické chování. Tento negativní jev se přičítá k neúplné homogenizaci. Doporučuje se proto před měřením odložit pastové elektrody při laboratorních podmínkách minimálně po dobu jednoho dne. Po tomto procesu „*auto-homogenizace*“ elektrody teprve skutečně poskytují stabilní elektrochemické signály. V poslední řadě je nutno zmínit, že povrch pastové elektrody byl po každém měření obnovován vytlačněním malého množství pasty a následným leštěním o vlhký filtrační papír.

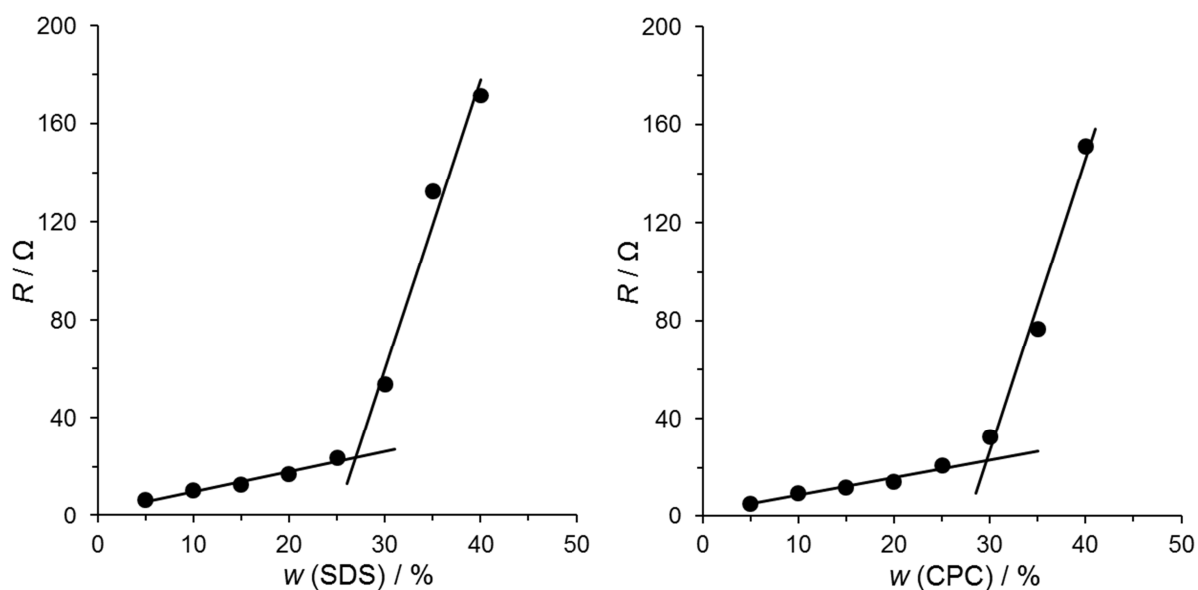
Postup měření

Veškerá měření lipofilních vitamínů musela být kvůli jejich nerozpustnosti ve vodě prováděna v $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku LiClO_4 v 99.8% ACN. Pro studium elektrochemického chování laboratorně připravených modifikovaných elektrod byla použita cyklická voltametrie (CV) pro potenciálové okno od -0.2 do $+1.2 \text{ V}$, při rychlosti skenování $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ s minimálně 5 cykly. Využití CPE/SDS a CPE/CPC v analýze kosmetických výrobků bylo ověřeno

pomocí square wave voltametrie (SWV) za běžných pracovních podmínek a to při potenciálovém skoku 2.5 mV, amplitudě 25 mV a frekvenci 40 Hz. Veškeré změny v parametrech použitých metod jsou případně uvedeny v legendách pod odpovídajícími obrázky.

Diskuse a závěry

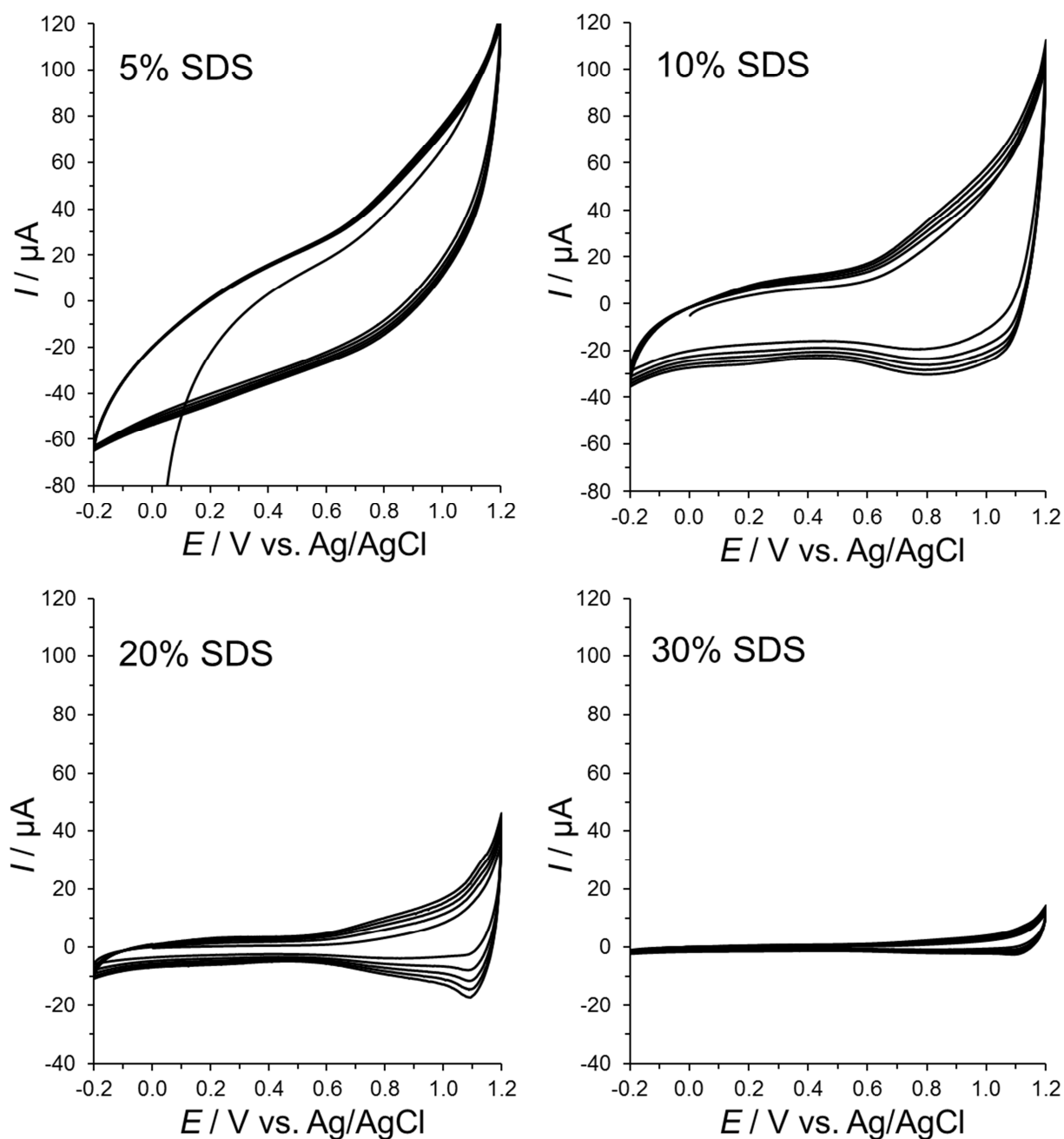
Tenzidy jako SDS a CPC jsou látky dobře rozpustné v pastovacích kapalinách (elektrické izolanty), neboť ve své molekulové struktuře obsahují dlouhé nevětvené alifatické řetězce o 12 a 16 uhlíků. Experimentálně bylo potvrzeno (viz. Obr. 2), že zvyšujícím se obsahem daného tenzidu se rovněž zvyšuje objem pastovací kapaliny, což má za následek významný nárůst vzdálenosti mezi jednotlivými uhlíkovými částicemi. Tuto skutečnost potvrzují i vlastnosti připravených past, jejíž viskozita klesá se zvyšujícím se obsahem povrchově aktivní látky. Získané závislosti ohmického odporu (R) na množství tenzidu v uhlíkové pastě se do značné míry podobají závislostem R na množství pastovací kapaliny [15].



Obrázek 2. Závislost ohmického odporu na množství přítomného tenzidu v uhlíkové pastě.

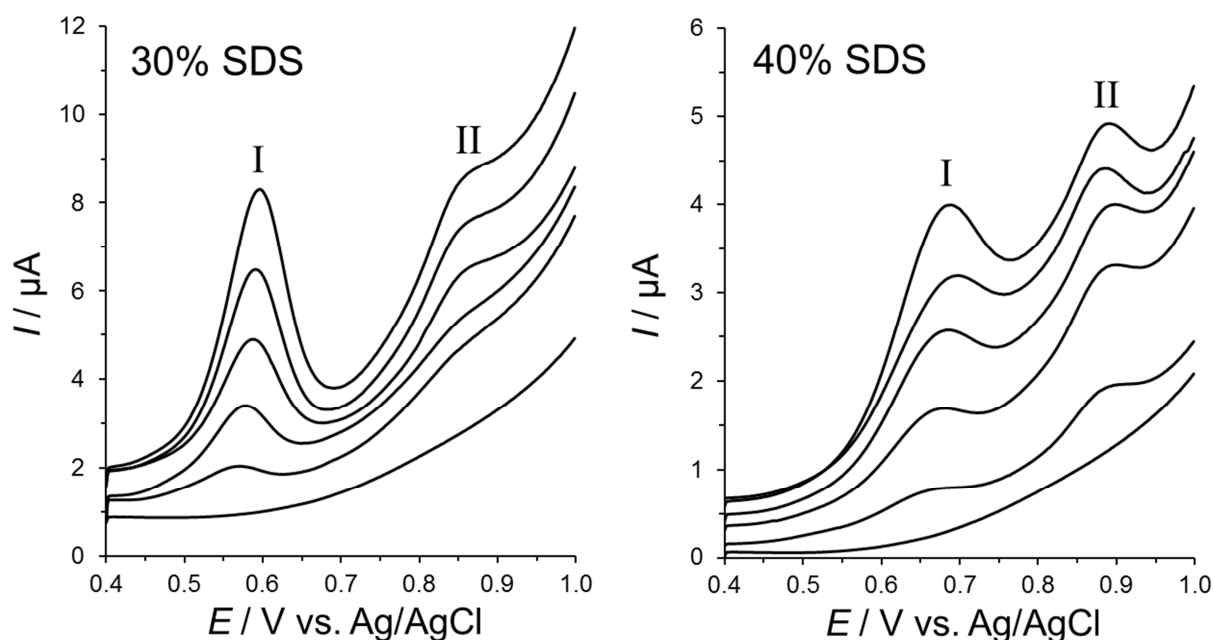
Z předchozího odstavce je zřejmé, že elektrická vodivost (G) klesá s rostoucím obsahem tenzidu, což také ovlivňuje velikost kapacitního proudu potřebného pro nabití poločlátku. Na první pohled lze tedy konstatovat, že modifikované elektrody s obsahem do cca 30 % tenzidu budou vykazovat požadované elektrochemické vlastnosti. Nicméně je nezbytné upozornit na skutečnost, že s klesajícím obsahem tenzidu dochází k vyššímu

působení organického činidla (elektrolyt) na přítomné uhlíkové částice, což může vést až k destrukci elektrodového materiálu. Na Obr. 3 jsou zobrazeny příslušné cyklické voltamogramy základního elektrolytu (0.1 mol·l⁻¹ LiClO₄ v 99.8% ACN) pro pět opakování. Jak je zřejmé na první pohled, se vzrůstajícím obsahem SDS klesá proudová odezva základní linie. Někteří si mohou povšimnout rádooby redukčního píku při potenciálu +1.1 V (nejvíce patrného pro CPE s 20% SDS), jehož proudová odezva se zvyšuje s každým cyklem. Tento parazitní pík je přisuzován přítomnosti vody v základním elektrolytu (>2%). Takto nízký obsah vody však nikterak neovlivňuje voltametrické stanovení vybraných analytů.



Obrázek 3. Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořizovaných na CPEs s různým obsahem SDS.

Z předchozích poznatků je možné tušit, že obsah použitého tenzidu ovlivňuje analytické parametry voltametrické metody. Zvýšený obsah tenzidu způsobuje výrazný posun potenciálu píku (E_p) k více pozitivním hodnotám. Dále byly pozorovány téměř dvakrát nižší proudové odezvy u α -tokoferolu (pík I při +0.593 V) i retinol acetátu (pík II při +0.861 V) pokud byl zvýšen obsah SDS o 10% (pík I při +0.683 V a pík II při +0.886 V). Na druhou stranu pík odpovídající anodické oxidaci retinol acetátu je mnohem zřetelnější při použití CPE s vyšším obsahem tenzidu (viz. Obr. 4).



Obrázek 4. Záznamy ze square wave voltametrie pro koncentrace 0, 20, 40, 60, 80 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ α -tokoferolu a retinol acetátu obdrženy na uhlíkových pastových elektrodách s různým obsahem dodecylsírany sodného.

V této studii bylo rovněž zjištěno, že ne každý tenzid lze jednoduše použít jako vhodný modifikátor. Například druhý testovaný tenzid CPC je naprosto nepoužitelný. Přestože závislosti ohmického odporu na množství tohoto tenzidu byly o něco lepší než pro SDS, při SWV na CPE s 30% obsahem CPC byla obdržena velmi vysoká proudová odezva základní linie ($\sim 50 \mu\text{A}$). Kvůli takto vysokým proudovým hodnotám pozadí bylo prakticky nemožné získat jakýkoliv anodický pík pro nízkou koncentraci analytů.

Závěrem lze konstatovat, že CPEs modifikované tenzidy mohou nalézt široké uplatnění v elektroanalýze kosmetických přípravků, neboť obsah těchto biologicky aktivních látek se pohybuje řádově v jednotkách až desítkách mg na 100 g vzorku. Výsledky této studie

bude zapotřebí ověřit na analýzách reálných vzorků a porovnat se standardními metodami založenými na kapalinové chromatografii [16].

Poděkování

Tato práce vznikla na základě finanční podpory Studentské grantové soutěže Univerzity Pardubice, projekt č. SGSFChT 2017/001.

Literatura

1. R. N. Adams: *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1576–1576.
2. I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytřas: *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2012.
3. I. Švancara, R. Metelka, K. Vytřas: Piston-driven carbon paste holders for electrochemical measurements. In: K. Vytřas, K. Kalcher (Eds) *Sensing in Electroanalysis*, pp. 7–18, University of Pardubice, Pardubice 2000.
4. P. Kotzian, P. Brazdilova, K. Kalcher, K. Vytřas: Mediators of electron transfer in amperometric enzyme biosensors. In: K. Vytřas, K. Kalcher (Eds) *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 2. pp 181–199, University of Pardubice, Pardubice 2007.
5. L. Gorton: *Electroanalysis*, 7 (1995) 23–45.
6. I. Švancara, R. Metelka, T. Mikysek, K. Vytřas: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A*, 23 (2017) 5–50.
7. K. Digua, J. M. Kauffmann, J. L. Delplancke: *Electroanalysis*, 6 (1994) 451–458.
8. K. Digua, J. M. Kauffmann, M. Khodari: *Electroanalysis*, 6 (1994) 459–462.
9. J. J. Thiele, S. N. Hsieh, S. Ekanayake-Mudiyanselage: *Dermatol Surg.*, 31 (2005) 805–813.
10. M. Ramos-e-Silva, D. M. Hexsel, M. S. Rutowitsch, M. Zechmeister: *Clin Dermatol.* 19 (2001) 460–466.
11. M. Sýs, B. Švecová, I. Švancara, R. Metelka: *Food Chem.*, 229 (2017) 621–627.
12. M. Sýs, S. Žabčíková, L. Červenka, K. Vytřas: *Potravinářstvo*, 10 (2016) 260–264.
13. M. Sýs, R. Metelka, M. Stočes, K. Vytřas: *Monatsh. Chem.* 147 (2016) 31–38.
14. F. L. Oliveira da Silva, L. Márcia da Silva Tinoco, L. A. M. Ferreira, A. R. Malagutti, G. Carneiro: *Electrochim. Acta*, 182 (2015) 929–934.
15. T. Mikysek, I. Švancara, K. Kalcher, M. Bartoš, K. Vytřas, J. Ludvík: *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6327–6333.
16. A. Nada, Y. S. Krishnaiah, A. A. Zaghoul, I. Khattab: *J. Cosmet. Sci.* 61 (2010) 353–365.

Příloha 7

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5618

original scientific paper

Electrochemical Study and Determination of All-*trans* Retinol at Carbon Paste Electrode Modified by Surfactant

Simona Žabčíková, Tomáš Mikysek, Libor Červenka and Milan Sýs*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, CZ-53210 Pardubice, Czech Republic

Received: November 22, 2017

Accepted: May 09, 2018

SUMMARY

Cyclic voltammetry of all-*trans* retinol (vitamin A₁) and its several esters in non-aqueous, aqueous organic mixture, and pure aqueous media has been used to investigate the oxidation mechanism. The oxidation was found to occur in several irreversible steps. The calculated highest electron density in retinoid molecules which is delocalized over carbon atoms of the five conjugated double bonds (C5-C14) points to part of the molecule involved in oxidation processes. The most sensitive oxidation peak (at +0.8 V vs. Ag/AgCl) was used for development of new direct voltammetric method based on differential pulse voltammetry for the retinol determination at surfactant modified carbon paste electrode (CPE/SDS) performed in acetonitrile containing 0.1 M LiClO₄. Within the characterisation, it was found that 30 % (by mass) of modifier (SDS - sodium dodecyl sulphate) exhibited optimal sensitivity and shape of voltammograms. In comparison of the CPE/SDS with commonly used glassy carbon electrode (GCE), significant progress in the retinol electroanalysis was achieved. The linear ranges for retinol determination were $1.5 \cdot 10^{-6} - 1.8 \cdot 10^{-4}$ M for CPE/SDS and $4.4 \cdot 10^{-6} - 7.0 \cdot 10^{-4}$ M for GCE with the detection limits of $1.3 \cdot 10^{-6}$ and $4.6 \cdot 10^{-7}$ M, respectively.

Key words: modified carbon paste electrode, differential pulse voltammetry, glassy carbon electrode, all-*trans* retinol, surfactant

*Corresponding author: Phone: +420466037068; Fax: +420466037279; E-mail: milan.sys@upce.cz

ORCID IDs: 0000-0003-2412-7308 (Žabčíková), 0000-0003-1793-9367 (Mikysek), 0000-0003-2316-8765 (Červenka), 0000-0002-3982-3659 (Sýs)

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

INTRODUCTION

Retinol, known as vitamin A₁, belongs to the group of fat-soluble vitamins generally classified as vitamin A (carotenoids), D (cholecalciferols), E (tocopherols), and K (naphthoquinones). Deficiency (avitaminosis) of vitamin A leads to the night blindness or keratinization of cells. It is often disease of children, especially occurring in the developing countries. On the other hand, its surplus (hypervitaminosis) can cause a poisoning, especially teratogenic properties were declared. However, it should be mentioned that the content of vitamin A in foodstuff and food supplements is very low (1,2). For that reason, the poisoning caused by overdosing is rare.

In a narrower sense, it belongs to group known as retinoids which are essential substances. Under general conditions, retinol is degraded by oxygen, high temperature or light exposure. The content of vitamin A in foodstuffs depends on good storage and packaging, thus the content of retinol can be an indicator of freshness of food or of the good storage conditions. Synthetic retinoids such as retinyl acetate and retinyl palmitate are usually used as food additives due to their higher stability (2,3).

From chemical point of view, retinol contains conjugated double bond system in its molecular structure. Hence, standard procedure of retinol determination is spectrophotometry in visible spectrum at 620 nm or in UV spectrum ranging from 310 to 325 nm, respectively. These properties allow nowadays routine UV detection in the liquid chromatography (4-6). Moreover, chromatographic methods utilizing diode array (7,8) or electrochemical detection were already described (9). Retinol can also be detected by capillary zone electrophoresis with laser-excited fluorescence detection, even directly in a blood sample (10). For all these methods, complex sample preparation is necessary, which is reflected by time consuming analysis, and economically demanding instrumentation.

Unlike this, direct conventional voltammetric methods offer certain alternative way how to eliminate already mentioned disadvantages (11-15). On the other hand, the main problem of retinol electrochemical determination represents its lipophilic character. Thus, all previously developed methods were performed at solid electrodes in organic solvents, aqueous-organic mixtures, or aqueous surfactant solutions (see Tab. 1).

Concerning the behaviour of common carbon paste electrodes in non-aqueous media, they suffer by low mechanical stability (16,17), hence their composition have to be changed by selection of (i) highly viscous paste binder, (ii) special carbonaceous material, namely glassy carbon powder, and (iii) surfactant modification. The latter one is type of carbon paste electrode introduced by R. N. Adams in 1965 (see ref. 18), where the regular

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

carbons paste was modified by 30 % (by mass) of sodium dodecyl sulphate (SDS). Generally, a presence of surfactants causes effective repelling of molecules of organic solvent from the electrode surface (19).

This contribution presents abovementioned surfactant modified carbon paste electrode (CPE/SDS) in voltammetric determination of all-*trans* retinol using 0.1 M LiClO₄ in 99.8 % acetonitrile as supporting electrolyte. Moreover, it offers comparison of CPE/SDS behaviour with regular glassy carbon electrode (GCE; see ref. 20) in determination of retinol by differential pulse voltammetry (DPV). Additionally, electrochemical studies of retinol and its esters (retinyl acetate and retinyl palmitate) in used supporting electrolytes were performed in order to confirm or disprove the previously proposed reaction mechanisms.

As another examples of using carbon-based electrodes in the monitoring of lipophilic vitamins, bare glassy carbon paste electrode applicable in an extractive stripping voltammetry of tocopherols (vitamin E) and CPE (or GCE) covered by thin layer of carbon nanomaterials can be considered (20-22).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Retinol, retinyl palmitate, retinyl acetate, 99.8 % acetonitrile (MeCN), LiClO₄, paraffin oil (PO), and sodium dodecyl sulphate (SDS) were purchased from Sigma Aldrich, Praha, Czech Republic. All these retinoids were crystalline of purity ≥ 95 %, and sodium dodecyl sulphate was ≥ 99 %. Carbon powder type CR-5 (particle size $< 5 \mu\text{m}$) for preparation of carbon paste electrode (CPE) was obtained from Maziva Týn nad Vltavou, Czech Republic. Powder of Al₂O₃ (particle size about $1 \mu\text{m}$) needed for polishing of GCE surface was obtained from Metrohm, Praha, Czech Republic. For the preparation of 0.1 M acetate buffer pH=4.5 were used the glacial acetic acid, sodium acetate from Merck, Darmstadt, Germany, and deionised water of $\rho = 18.3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ from Milli-Q system, Millipore distributed by the Merck.

Carbon paste electrode preparation and modification

CPE/SDS represent common carbon paste electrode modified by high content of surfactant. In our case, 0.5 g graphite powder, PO (20 %; by mass), and SDS (30 %; by mass) were homogenized for 20 minutes. Afterwards, final mixture was placed into the cavity (diameter 3 mm) of Teflon piston-driven holder from University of Pardubice, Czech Republic. Generally, freshly made CPEs, especially modified ones, need some time (usually one day) prior to their

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

employment in analysis due to so called “self-homogenization” phenomenon (23). After each measurement, the surface of paste electrode was renewed by polishing on a wet filter paper.

Pretreatment of glassy carbon electrode.

The surface of solid GCE (diameter 2 mm) was treated by polishing on wet pad with presence of Al_2O_3 powder (particle size about 1 μm) for 30 seconds before each measurement. After that the surface was rinsed by distilled water. All equipment necessary for pretreatment of GCE was form company Metrohm, Czech Republic.

Apparatus

Typical three electrode electrochemical setup consisting of CPE/SDS or GCE (working), Ag/AgCl/3.0 M KCl (reference), and Pt wire (auxiliary) electrode was connected to the Autolab PGSTAT101 from Metrohm Autolab B.V., The Netherlands, operated by s 1.11 software (24). For calculation of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies the DFT B3LYP 6-31G* method with Spartan'16 software (25,26) from Wavefunction, Inc., Irvine, U.S.A was used.

Procedure

Cyclic voltammetry (CV) was performed for study of electrochemical behaviour of retinoids at following conditions: from -0.2 to +1.2 V, step potential (E_{step}) 2.5 mV, scan rate (ν) 50 mV/s. Differential pulse voltammetry (DPV) of retinol at both types of working electrode was used under following conditions: the applied potential was from 0 to +1.2 V, potential step 5 mV, potential of amplitude (E_{ampl}) 25 mV, interval time (t_{int}) 0.1 s, equilibrium time (t_{eq}) 5 s, and scan rate 50 mV/s. All measurements were repeated minimally five times. If not stated, otherwise all changes in the experimental conditions are specified in the legends of the corresponding figures.

Validation of developed voltammetric method

The sensitivity is defined as the lowest detectable concentration of an analyte (limit of detection; LOD) and is given by a slope of corresponding calibration curve (k). From a practical point of view, limit of quantification (LOQ) is a more important parameter than the theoretical value of LOD because it usually represent the lowest value of the calibration curve. Values of LOQ and LOD were calculated according to the following equations 1 and 2

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

respectively, where σ is the standard deviation of the arithmetic means (\bar{x}) for minimally five voltammograms of 5.0 μM retinol.

$$\text{LOQ}=10\sigma/k \quad /1/$$

$$\text{LOD}=3\sigma/k \quad /2/$$

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical behaviour of retinoids

One of the aims of this work was to clarify the retinol oxidation mechanism because of discrepancies in literature. In 2010, it was published that the all-*trans* retinol is irreversibly oxidized at GCE in 0.1 M LiClO_4 water-ethanol media that corresponds to formation of retinal with participation of 2 e^- and 2 H^+ (13). Nevertheless, it is necessary to state that authors proposed this reaction mechanism of retinol electrochemical oxidation based on observation only one oxidation peak at +0.79 V (13). Later, electrochemical behaviour of several retinoids in CH_2Cl_2 containing 0.2 M Bu_4NPF_6 was studied using cyclic voltammetry at GCE, and it was found that retinal, retinoic acid, retinyl palmitate, and retinyl acetate are oxidized in similar manner as retinol. Hence, it can be considered that it is less probable oxidation of retinol to retinal because abovementioned retinoids do not contain free hydroxyl group (27). Meanwhile, Polish scientists studied electrochemical oxidation of retinyl propionate at Pt-electrode in the MeCN containing 0.1 M Bu_4NClO_4 . According to comparison of FTIR spectra and calculation of electron density, it was predicted that electrochemical oxidation probably takes place on C3-position of cyclohexene ring with participation of 2 e^- and H^+ (28).

In this contribution electrochemical behaviour of retinol, retinyl acetate, and retinyl palmitate in non-aqueous, aqueous-organic (50 % MeCN containing 0.1 M LiClO_4), and pure aqueous media (0.1 M acetate buffer pH=4.5) was studied by cyclic voltammetry in order to confirm or reverse the previous claims (12,13,28). Due to lipophilic character of all retinoids, measurements in the aqueous media were carried out in the adsorbed state (for details see ref. 29).

It was found from CV that all studied esters of retinol always provide only one oxidation peak at about +0.8 V in all tested media. Unlike this, retinol behaves like this only in adsorbed state at GCE in pure aqueous electrolytes (Fig. 1). In other cases, two oxidation peaks (see Fig. 2) were observed which has been already described (30).

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

>>Fig. 1 and Fig. 2<<

The mechanism of electrode reaction can be predicted based on quantum-chemical calculations. In the narrower sense, the distribution of the electron charges in certain molecule determines individual reaction centres because in general, molecular orbitals with an excess of electrons are more easily oxidized than those with a deficiency. The prediction of electrochemical behaviour of retinol and other retinoids can be therefore facilitated by theoretical calculation of HOMO LUMO. According to results obtained, it can be predicted that an electrochemical oxidation is delocalized over carbon atoms of the five conjugated double bonds (C5-C14), where the highest current density has been found. For comparison, electron density plots of retinol and retinyl acetate are shown in Fig. 3. $E(\text{HOMO})=5.0$ eV was obtained for both tested compounds. It is evident that hydroxy or ester functional group is not energy efficient for the electrochemical oxidation.

>>Fig. 3<<

Generally, it is known that the CV is not such sensitive technique as DPV and dominates rather in the study of electrochemical processes. Moreover, it is necessary to consider that in the CV, there may merge multiple peaks in one, whereas they can be clearly recognised in DPV. The oxidation of all tested retinoids at GCE was found to occur in three steps (measured to a potential value +1.2 V) and to be probably irreversible (see figures 4-6). These findings are consistent with previous electrochemical studies of retinoids (28,31), especially of all-*trans* retinoic acid (32). Oddly enough, when the potential window was extended to +1.6 V, other two oxidation processes were observed (see Fig. 4).

It has to be mentioned that broader peaks were usually observed at the CPE/SDS rather than at solid GCE. Moreover, third oxidation peak (III) was quite difficult to recognize due to electrolyte discharge (compare Fig. 5 with Fig. 6). Finally, it can be concluded that the all-*trans* retinol is not probably electrochemically oxidized to all-*trans* retinal. Thanks to delocalized electron system, it is not possible to determine with certainty which carbon of conjugate system is oxidized primary. Even so, Masek's proposal is considered to be the most approaching reality (28).

>>Fig. 4<<

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

Optimization of surfactant modified carbon paste electrode

Several modified CPEs/SDS containing always 20 % PO (by mass) and different amount of SDS were prepared to study the effect of used surfactant. During laboratory preparation of CPEs, it was observed that the pasting character of electrode material increases with higher content of SDS. Characterisation of CPEs was carried out by measurement of ohmic resistance (R). Under this study, it was found that higher presence of the modifier causes an increasing ohmic resistance as following: $\sim 6.5 \Omega$ for 5 %, $\sim 10.2 \Omega$ for 10 %, $\sim 16.8 \Omega$ for 20 %, and $\sim 53.7 \Omega$ for 30 % SDS content (by mass).

Despite the highest ohmic resistance observed, the CPE containing 30 % SDS appeared the most suitable choice due to obtaining the lowest background current response ($\sim 1 \mu\text{A}$). Explanation can be found in the mechanical stability of conventional carbon paste. In the presence of organic solvents, carbon particles are pulled out of the electrode material. The effect of organic solvent increases with decreasing surfactant content which leads to electric contact deterioration of carbon particles and a rise of background current $\sim 5.2 \mu\text{A}$; 10 % and $\sim 9.4 \mu\text{A}$; 5 % SDS content (by mass).

Electrochemical determination of retinol

From analytical point of view, it should be taken into account the fact that it is not possible to determine individual retinoids due to close values of oxidation potentials. For this reason, only the sum of all retinoids present in the sample can be expressed and determined as total content of vitamin A.

At the beginning, it was necessary to find optimum working conditions of used voltammetric technique. Standard values of DPV parameters $E_{\text{amp}}=25 \text{ mV}$, $E_{\text{step}}=5 \text{ mV}$, $t_{\text{int}}=0.1 \text{ s}$, and $v=50 \text{ mV/s}$ in voltammetric determination of retinol were chosen as optimum because any changes of mentioned values did not help to achieve significant increase of sensitivity (peak I) demonstrated in Fig. 4. Additionally, it was found that using of higher values of scan rate dramatically increased the noise of base line current response what can negatively affect the final analytical parameters (not shown).

A calibration graphs for both used working electrodes were constructed by the same way when aliquots of retinol stock solution (0.01 M retinol in pure MeCN) into voltammetric cell containing always 20 mL of 0.1 M LiClO_4 in 99.8 % MeCN as supporting electrolyte were gradually increased.

Nevertheless, it was found that linearity of calibration curve at CPE/SDS (equation 3) was ranged from 1.5 to 180 μM retinol with $R^2=0.9955$ (Fig. 5) what is more than three times

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

shorter than at solid GCE (equation 4) ranging from 4.4 to 700 μM retinol with $R^2=0.9953$ (Fig. 6). Almost three times lower value of detection limit (LOD) was obtained at CPE/SDS than at solid GCE.

$$I_p=0.0161c - 0.0026 \quad /3/$$

$$I_p=0.0083c - 0.0256 \quad /4/$$

>>Fig. 5 and Fig. 6<<

Generally, precision represents accordance between the real concentration of analyte and that found by an analytical method used. This analytical parameter is often verified using a model sample (recovery), declared amount, or by comparison with a reference method always based on another physicochemical principle. Volume 10 mL of 0.1 M LiClO_4 in 99.8 % MeCN with presence of 40 μM retinol was used for recovery study. This analysis was performed using standard addition method (not shown) where minimally four 10 μL additions of 0.01 M retinol were used. Herein, it is necessary to mention that the standard addition method can be used under the condition of a very low intercept of calibration curve (q) which the developed method fully meets.

Surprisingly, a little better recovery values were obtained in the assay obtained on the same surface than if it was constantly restored after each measurement. The recovery values 95.0 % obtained at CPE/SDS ($I_p=38\pm 1.5 \mu\text{M}$) and 94.3 % at GCE ($I_p=37.7\pm 1.9 \mu\text{M}$) with relative standard deviations of 3.9 % and 5.1 % were calculated, respectively.

For completeness of comparison, all conventional electrochemical methods for determination of vitamin A₁ developed since 1974 to the present are shown in Table 1. Type of electrode material, chosen electrochemical technique, composition of used electrolyte, linear range, and limit of detection are listed for each method. This important comparison shows that significant improvement in the analytical parameters has been achieved for both types of used electrodes. In all previous cases, so low detection limit was not achieved as at economically advantageous CPE/SDS. Only square wave voltammetric method at GCE modified by multi-wall carbon nanotubes polymer composite in Triton X-100 solution (15) provides nearly similar analytical parameters. It can be assumed that developed voltammetric method utilizing the CPE modified by SDS should find a wide application in the food analysis, especially for margarines (33), food supplements, fish oils, cosmetics (34), pharmaceutical products, etc. Matrix of these samples is usually completely soluble or at

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

least partially soluble in pure ACN. However, complicated and time-consuming sample preparation before each analysis should be taken into account in more complex foodstuffs.

>>Table 1<<

CONCLUSION

In this paper, the cyclic voltammetry of retinol with its esters using CPE/SDS as well as GCE in various types of media was performed and evaluated to clarify electrochemical reaction mechanism of retinol. Under this study, it was found that all tested retinoids are oxidized in several steps which correspond to oxidation in delocalized electron system of conjugated double bonds. Due to nearly identical values of peak potentials, the sum of all retinoids present in the sample can be determined only and expressed as total content of vitamin A. The obtained results of electroanalysis show that DPV at CPE/SDS performed in the non-aqueous media represents completely suitable electroanalytical method for direct voltammetric determination of retinol and provides similar electrochemical performance in comparison to commonly used glassy carbon electrode. Furthermore, it is necessary to state that in comparison with already developed conventional electroanalytical methods, the significantly better value of the detection limit was achieved. The data also confirm the fact that the presence of surfactant in CPE allows to use it in electrochemical measurements in pure organic solvents.

ACKNOWLEDGEMENTS

The support received from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, (project No. SGFChT 2017/001) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Palafox NA, Gamble MV, Dancheck B, Ricks OM, Briand K, Semba RD. Vitamin A deficiency, iron deficiency, and anemia among preschool children in the Republic of the Marshall Island Nutrition. 2003;19:405–8.
[https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)01104-8](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)01104-8)
2. Xue X, You J, He P. Simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in feed by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction. J Chromatogr Sci. 2008;46:345–50.

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

3. Gregory III JF. Vitamins. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editors. Fennema's Food Chemistry, fourth edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2007. pp. 454–60.
4. Barua AB, Furr HC, Olson JA, Van Breemen RB. Vitamin A and Carotenoids. In: De Leenheer AP, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, editors. Modern chromatographic analysis of vitamins, third edition, revised and expanded, vol. 84. New York, USA: Chromatographic science series, Marcel Dekker; 2000. pp. 1–69.
5. Paixa JA, Campos JM. Determination of fat soluble vitamins by reversed-phase HPLC coupled with UV detection: A Guide to the explanation of intrinsic variability. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2003;26:641–63.
<http://dx.doi.org/10.1081/JLC-120017913>
6. Blake Ch, editor. Vitamins and other nutrients. In: Horwitz W, Latimer Jr. GW, editors. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18th edition, 2005. Gaithersburg, Maryland, USA: 2007. pp. 45/1–124.
7. Barua AB, Kostic D, Olson JA. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. *J Chromatogr.* 1993;617:257–64.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80496-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80496-Q)
8. Chen L, Liu Z, Kang X, Zhou X, Zheng S, Gu Z. Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/clean-up. *Procedia Environ Sci.* 2011;8:588–95.
<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.091>
9. Zamarreño MMD, Perez AS, Rodriguez MS, Perez MCG, Mendez JH. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta.* 1996;43:1555–63.
[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01939-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01939-X)
10. Ma Y, Wu Z, Furr HC, Lammi-Keefe C, Craft NE. Fast minimicroassay of serum retinol (vitamin A) by capillary zone electrophoresis with laser-excited fluorescence detection. *J Chromatogr.* 1993;616:31–7.
11. Atuma SS, Lindquist J, Lundstrom K. The Electrochemical determination of Vitamin A, Part I. Voltammetric determination of Vitamin A in pharmaceutical preparations. *Analyst.* 1974;99:683–9.
<https://doi.org/10.1039/AN9749900683>

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

12. Budnikov GK, Ziyatdinova GK, Gil'metdinova DM. Determination of some liposoluble antioxidants by coulometry and voltammetry. *J Anal Chem.* 2004;59:654–8.

<https://doi.org/10.1023/B:JANC.0000035278.20459.9e>

13. Ziyatdinova G, Giniyatova E, Budnikov H. Cyclic voltammetry of retinol in surfactant media and its application for the analysis of real samples. *Electroanalysis.* 2010; 22:2708–13.

<https://doi.org/10.1002/elan.201000358>

14. Ziyatdinova G, Morozov M, Budnikov H. MWNT-modified electrodes for voltammetric determination of lipophilic vitamins. *J Solid State Electrochem.* 2012;16:2441–47.

<https://doi.org/10.1007/s10008-011-1581-7>

15. Filik H, Avan AA, Aydar S. Simultaneous electrochemical determination of α -tocopherol and retinol in micellar media by a poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene)-bis-8-hydroxyquinaldine)-multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Anal Lett.* 2016;49:1240–57.

<http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2015.1094665>

16. Švancara I, Ogorevc B, Hočevár SB, Vytřas K. Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Anal Sci.* 2002;18:301–5.

<http://doi.org/10.2116/analsci.18.301>

17. Švancara I, Vytřas K, Renger F, Smyth MR. Application of carbon paste electrodes in highly methanolic solutions. *Electrochim Acta.* 1992;37:1355–61.

[https://doi.org/10.1016/0013-4686\(92\)87007-M](https://doi.org/10.1016/0013-4686(92)87007-M)

18. Marcoux LS, Prater KB, Prater BG, Adams RN. A nonaqueous carbon paste electrode. *Anal Chem.* 1965;37:1446–7.

<https://doi.org/10.1021/ac60230a047>

19. Švancara I, Kalcher K, Walcarius A, Vytřas K. *Electroanalysis with carbon paste electrodes.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2012.

20. Sýs M, Metelka R, Stočes M, Vytřas K. Electrochemical properties of α -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture. *Monatshefte für Chemie* 2016; 147:31–38.

<https://doi.org/10.1007/s00706-015-1620-7>

21. Hart JP, Norman MD, Lacey ChJ. Voltammetric behaviour of vitamins D₂ and D₃ at a glassy carbon electrode and their determination in pharmaceutical products by using liquid chromatography with amperometric detection. *Analyst* 1992; 117:1441–1445.

<https://doi.org/10.1039/AN9921701441>

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

22. Sýs M, Metelka R, Mikysek T, Vytřas K. Improvement of enzyme carbon paste-based biosensor using carbon nanotubes for determination of water-soluble analogue of vitamin E. *Chemical Papers* 2015; 69:50–157.

<https://doi.org/10.2478/s11696-014-0608-9>

23. Kalcher K, Kauffmann JM, Wang J, Švancara I, Vytřas K, Neuhold C, et al. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A Review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis* 1995;7:5–22.

<https://doi.org/10.1002/elan.1140070103>

24. Spartan'16 software, Irvine, U.S.A. Wavefunction, Inc.; 2018. Available from: <https://www.wavefun.com/>.

25. Nova version 1.11, Utrecht, The Netherlands, Metrohm Autolab B.V.; 2014. Available from: http://www.ecochemie.nl/news/NOVA_1.11.html.

26. Kocábová J, Fiedler J, Degano I, Sokolová R. Oxidation mechanism of flavanone taxifolin. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation. *Electrochim Acta* 2016;187:358–363.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.077>

27. Tan YS, Urbančok D, Webster RD. Contrasting voltammetric behaviour of different forms of vitamin A in aprotic organic solvents. *J Phys Chem B* 2014;118:8591–600.

<https://dx.doi.org/10.1021/jp505456g>

28. Masek A., Chrzescijanska E, Zaborski M. Voltammetric and FTIR spectroscopic studies of the oxidation of retinyl propionate at Pt electrode in non-aqueous media. *Int J Electrochem Sci.* 2014;9:6809–20.

29. Sýs M, Žabčíková S, Červenka L, Vytřas K. Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination. *Potravinarstvo* 2016;10:260–4.

<https://dx.doi.org/10.5219/587>

30. Wring SA, Hart JP, Knight DW. Voltammetric behaviour of all-*trans*-retinol (vitamin A₁) at glassy carbon electrode and its high-performance liquid detection in human serum using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst* 1988;113:1785–9.

<https://dx.doi.org/10.1039/AN9881301785>

31. Sýs M, Žabčíková S, Červenka L, Vytřas K. Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol. *Potravinarstvo* 2017;11:96–105.

<https://dx.doi.org/10.5219/713>

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

32. Oliveira da Silva FL, Márcia da Silva Tinoco L, Ferreira LAM, Malagutti AR, Carneiro G. Determination of all-*trans* retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles by differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* 2015;182:929–34.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.10.018>

33. Sýs M, Švecová B, Švancara I, Metelka R. Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode. *Food Chem.* 2017;229:621-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.068>

34. Žabčíková S, Nallbani A, Sýs M, Mikysek T, Červenka L. Square wave voltammetry at carbon paste electrode modified with surfactant for alpha tocopheryl acetate determination in cosmetics. *Potravinarstvo* 2018;12:135-42.

<https://doi.org/10.5219/10.5219/881>

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

Figure Captions

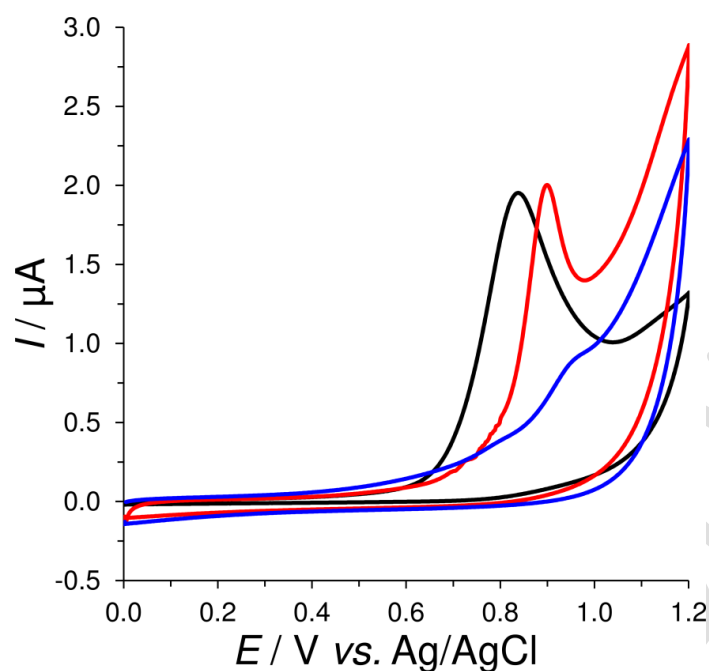


Fig. 1. CV of 0.5 mM retinol (*black*), retinyl acetate (*red*), and retinyl palmitate (*blue*) adsorbed on GCE surface from 30 % MeCN at 400 rpm for 10 min, then measured in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 at 100 mV/s.

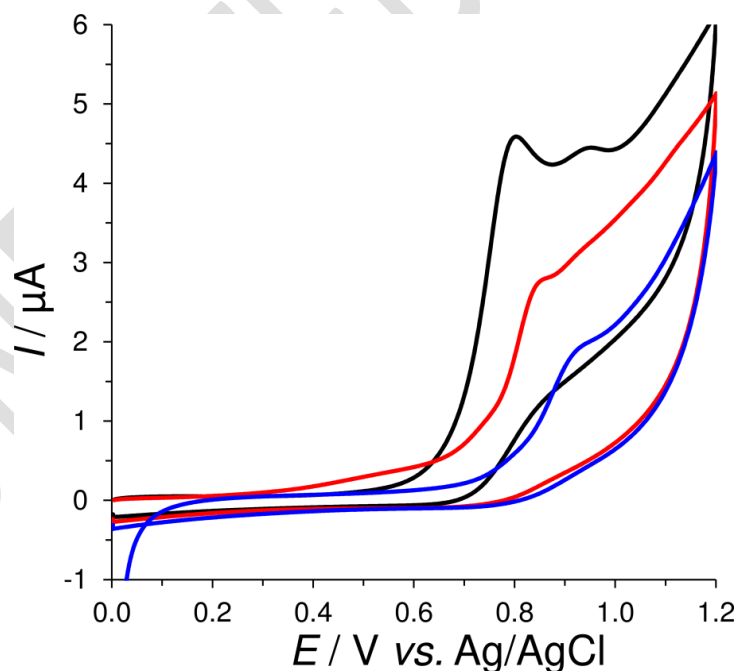


Fig. 2. CV of 0.5 mM retinol (*black*), retinyl acetate (*red*), and retinyl palmitate (*blue*) obtained at GCE in the mixture of pure MeCN and 0.1 M acetate buffer pH=4.5 (1:1) at 100 mV/s.

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

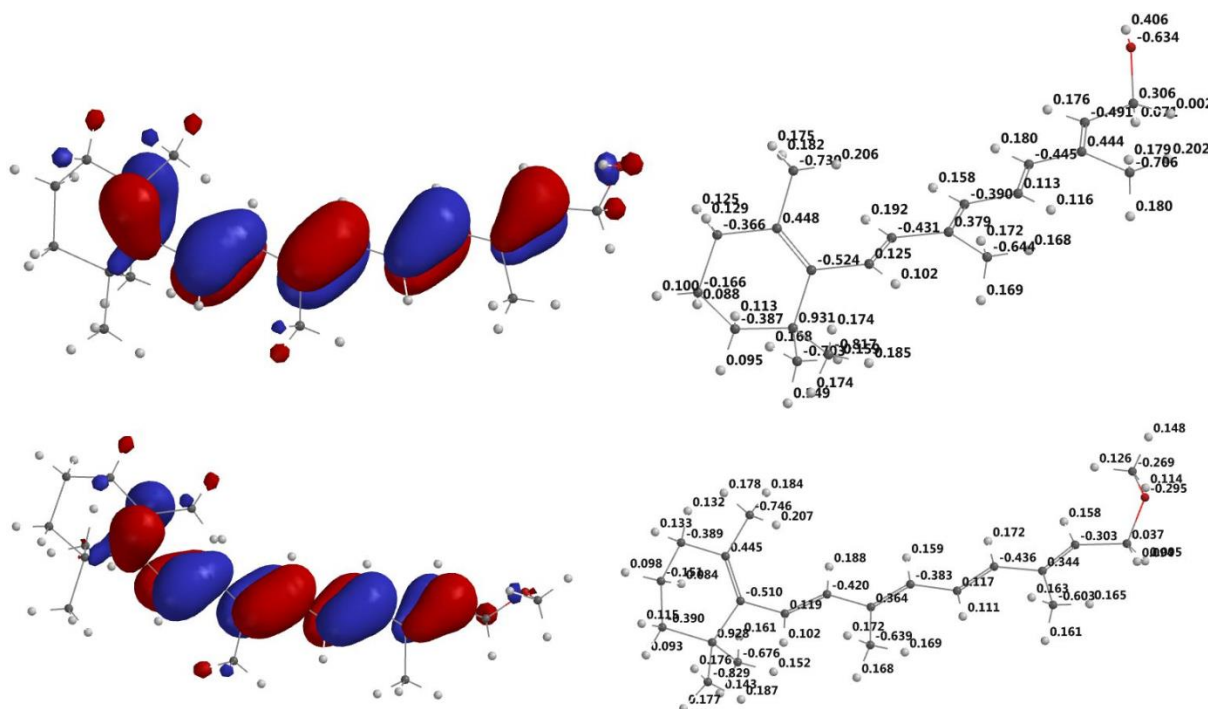


Fig. 3. HOMO distributions and electron density plots of retinol (top) and retinyl acetate (bottom).

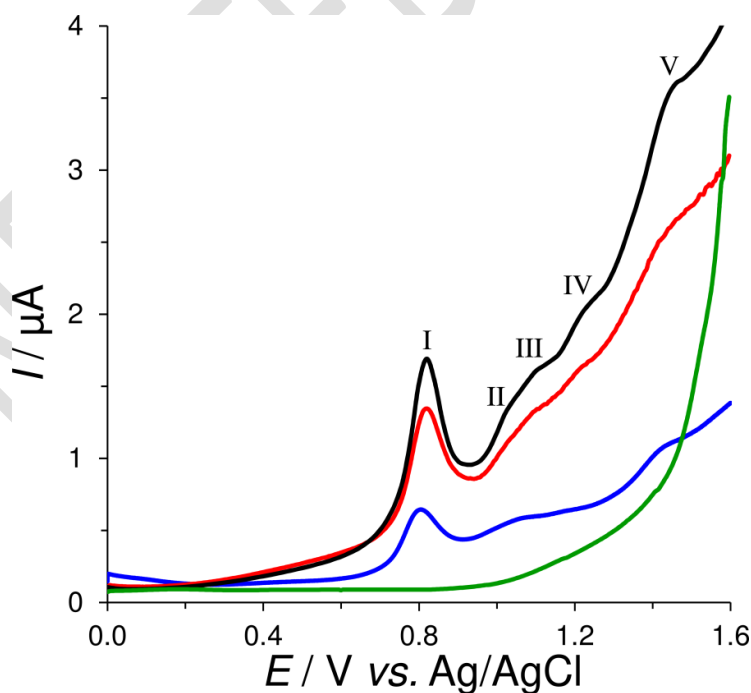


Fig. 4. DPV of 0 (green) and 0.5 mM retinyl acetate obtained at GCE in the 80 % MeCN containing 0.1 M LiClO₄ at 5 (blue), 50 (red) and 200 mV/s (black).

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

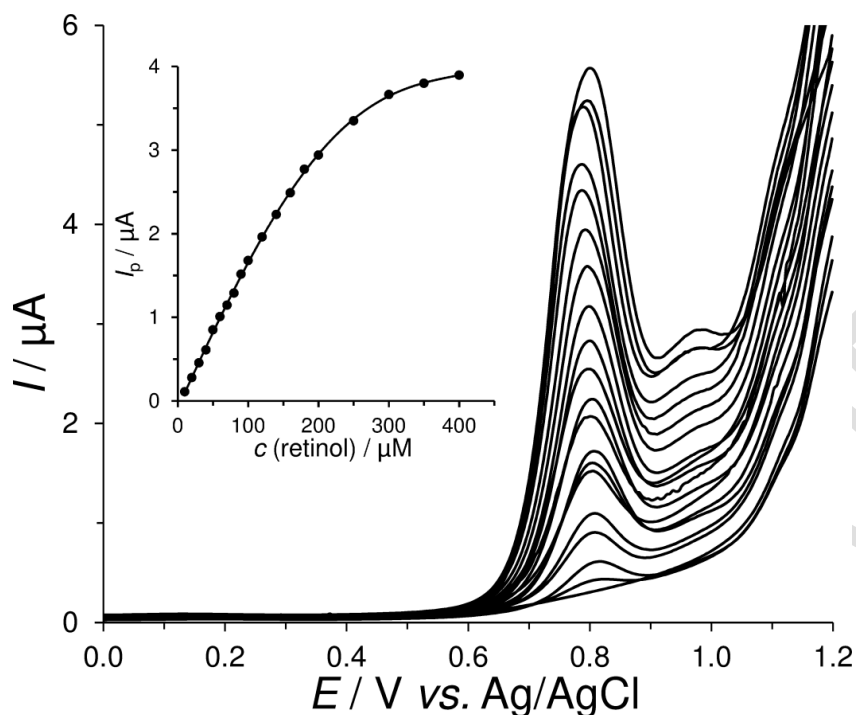


Fig. 5. DPV of 0-400 μM vitamin A₁ with appropriate calibration curve performed at CPE/SDS in 0.1 M LiClO₄ in 99.8 % MeCN.

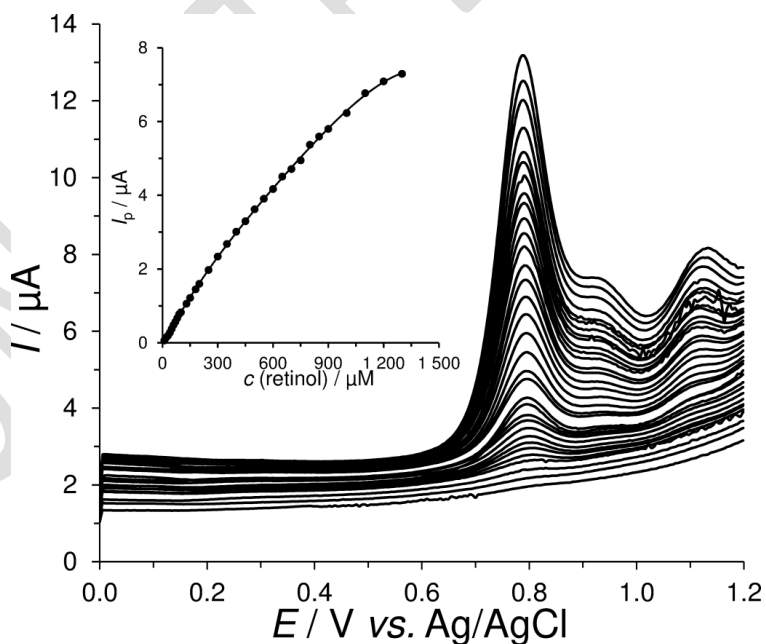


Fig. 6. DPV of 0-1.3 mM vitamin A₁ with appropriate calibration curve performed at solid GCE in 0.1 M LiClO₄ in 99.8 % MeCN.

Please note that this is an unedited version of the manuscript that has been accepted for publication. This version will undergo copyediting and typesetting before its final form for publication. We are providing this version as a service to our readers. The published version will differ from this one as a result of linguistic and technical corrections and layout editing.

Table Captions

Table 1. Comparison of conventional voltammetric methods for retinol determination.

Sensor	Method	Electrolyte	Linear range/M	LOD/M	Ref.
CPE/CW/SO	LSV	75 % EtOH/0.01 M H ₂ SO ₄	5.0·10 ⁻⁵ –1.0·10 ⁻³	–	11
PtE	LSV	0.1M HClO ₄ /MeCN	8.22·10 ⁻⁵ – 1.08·10 ⁻³	–	12
PtE	LSV	0.1M CH ₃ COONa/MeCN	7.54·10 ⁻⁴ – 1.66·10 ⁻³	–	13
GCE	CV	0.1 M LiClO ₄ /0.1mM SDS	2.94·10 ⁻⁵ – 9.80·10 ⁻⁴	1.5·10 ⁻⁵	13
GCE	LSV	0.1M HClO ₄ /MeCN	1.3·10 ⁻⁴ –1.2·10 ⁻³	9.5·10 ⁻⁵	14
GCE/MWCNTs	LSV	0.1M HClO ₄ /MeCN	6.5·10 ⁻⁵ –1.5·10 ⁻³	4.0·10 ⁻⁵	14
GCE/MWCNTs/P PH	SWV	Triton X-100	5.0·10 ⁻⁶ –2.0·10 ⁻⁴	8.0·10 ⁻⁷	15
GCE	DPV	0.1M LiClO ₄ /MeCN	4.4·10 ⁻⁶ –7.0·10 ⁻⁴	1.3·10 ⁻⁶	This paper
CPE/SDS	DPV	0.1M LiClO ₄ /MeCN	1.5·10 ⁻⁶ –1.8·10 ⁻⁴	4.6·10 ⁻⁷	This paper

Note: CV; cyclic voltammetry, CPE/SDS; carbon paste electrode modified by sodium dodecyl sulphate, DPV; differential pulse voltammetry, LSV; linear sweep voltammetry, SWV; square wave voltammetry, GCE/MWCNTs; multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode, LOD; limit of detection, PtE; stationary platinum electrode, CW; ceresin wax (5 %), SO; silicone oil, PPH; poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene)-bis-8-hydroxyquinoline).

Příloha 8

SQUARE WAVE VOLTAMMETRY AT CARBON PASTE ELECTRODE MODIFIED WITH SURFACTANT FOR ALPHA TOCOPHERYL ACETATE DETERMINATION IN COSMETICS

Simona Žabčíková, Arlinda Nallbani, Milan Sýs, Tomáš Mikysek, Libor Červenka

ABSTRACT

The aim of this study was describe electrochemical properties of a carbon paste electrode (CPE) bulk modified with 30% (w/w) surfactant sodium dodecyl sulphate (CPE/SDS) and demonstrates its application in the determination of α -tocopheryl acetate (α -TAc), known as vitamin E acetate, in selected cosmetic products, especially body creams. In addition to anionic SDS, cationic hexadecylpyridinium chloride monohydrate (CPC) was also tested as possible modifier. It was found that selection of surfactant type and its content significantly affect an electrical conductivity and mechanical stability of these heterogeneous electroanalytical sensors in pure organic solvents. Under this study, it was found that CPC is a totally inappropriate mediator due to very high backgroundcurrent. Together with other lipophilic vitamins characterized by antioxidant activity (dominantly retinoids), this completely synthetic substance is widely used as significant cosmetic additive due its preservative properties. Monitoring of its content in cosmetic products is usually performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. This standard analytical protocol is always burdened with the complex and time-consuming preparation of the sample before analysis. For that reason, robust and simple electroanalytical method based on anodic oxidation of the α -TAc at CPE/SDS by square wave voltammetry (SWV) performed in pure organic electrolyte (99.8% acetonitrile containing $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ LiClO}_4$) was developed. Moreover, simple dissolution of sample in supporting electrolyte using ultrasonic bath and subsequent filtering through a stacked filter included all the necessary procedures for sample preparation. The linear range from 0.1 to $1.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and limit of detection $37 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were found at pulse amplitude 10 mV and frequency 10 Hz as optimum. In analysis of selected cosmetics, the developed electroanalytical method was not validated using comparison with standard HPLC. At least, the recovery was verified by analysis of model sample and value 95.8% was calculated.

Keywords: carbon paste electrode; surfactant; tocopheryl acetate; square wave voltammetry; cosmetics

INTRODUCTION

The first description of the carbon paste electrode (CPE) was recorded in short communication (Adams, 1958). At first, it was thought as a voltammetric alternative to, in those times a very popular, dropping mercury electrode (DME) used in polarography. The attempt to construct a dropping electrode which can be polarized in an area of positive potentials has not been successful. However, the CPE has found a wider application in electroanalysis together with the progression of modern voltammetric techniques, especially with the development of stripping analysis (Švancara et al., 2012). From a physical point of view, CPE is a dispersion of carbon particles (spectrographic carbon, glassy carbon, pyrolytic carbon, etc.) in a viscous lipophilic binder (paraffin or silicone oil,

Vaseline, paraffin wax, etc.). After the precise homogenization, the resulting dispersion is pressed into Teflon cavity of electrode holder. A simple modification of the carbon paste (by mixing another components, e.g. mediators in the form of platinum and metal oxide powders (Labuda et al., 1998), enzymes (Gorton, 1995), carbon nanoparticles (Punbusayakul, 2012), surfactants (Digua et al., 1994), etc., can achieve different desired properties. Carbon paste electrodes modified with the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate (CPE/SDS) or the cationic surfactant hexadecylpyridinium chloride monohydrate (CPE/CPC) represent specific sensors which can be used for voltammetric measurements in pure organic solvents.

These electrodes can be utilized for sensitive determination of lipophilic vitamins with antioxidant

properties and their analogues (most often esters of acetic, propionic or palmitic acid) in many cosmetic products (Thiele and Hsieh, 2005; Ramos-e-Silva et al., 2001). These substances are able to prevent the rancidity. Thus they function as preservatives and prolong the expiration date (Sýs et al., 2017).

Retinol acetate (vitamin A) and α -tocopherol (vitamin E) have been already electrochemically studied and several voltammetric methods focusing on their voltammetric determination were described (Atuma et al., 1974; Wilson et al., 2006). Generally, both of these substances have strong antioxidant properties. In previous studies, it was found that α -tocopherol provides only one oxidation peak in a non-aqueous solution (Sýs et al., 2016). On the other hand, retinol acetate provides three oxidation steps under the same conditions (da Silva et al., 2015). Fortunately, potential values of these three oxidation peaks of the retinol acetate are sufficiently distant from the potential value of α -tocopherol peak. For that reason, the peaks of retinol acetate and α -tocopherol can be distinguished well. Nevertheless, it is necessary to mention that synthetic α -tocopheryl acetate (α -TAc) is more common additive in the cosmetic products than pure α -tocopherol due to its higher chemical stability.

This substance is usually determined by standard high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV or electrochemical detection (Wang and Wang, 2001; Almeida et al., 2009; Nada et al., 2010). The HPLC with fluorescence detection has been used for determination of tocopherol acetate in nutritional supplements (Iwase, 2000), vegetable oils (Yang et al., 2018), dairy products (Sunarič et al., 2017) infant formulas, breakfast cereals, multivitamin juices, and isotonic beverages (Balz et al., 1993). The α -TAc is also used as an internal standard in liquid chromatography for the determination of its analogues (Hewavitharana et al., 2004). Rodas Mendoza et al. (2003) applied HPLC on reverse phases to determine retinyl acetate and tocopheryl acetate in infant formulas.

The aim of this work is presented simple electrochemical method based on anodic oxidation of α -TAc utilizing the square wave voltammetry at CPE modified by ionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) performed in a non-aqueous medium. Except for individual optimization steps, an electrochemical behaviour of the α -TAc is also included.

Scientific hypothesis

Sodium dodecyl sulphate represents common surfactant which is widely used as CPE modifier. Within scientific hypothesis, it was necessary to verify the fact that anionic surfactants are better choice than cationic surfactants. In this case, CPC was used as suitable example. Generally, organic compounds carry a certain charge depending on the pH of the medium used. It is known that value of acetonitrile (ACN) pH decreases with higher content of water (Barbosa and Sanz-Nebot, 1992). Therefore, it can be assumed that 99.8% ACN represents weak acidic medium.

A determination of the electrical charge of α -TAc (ester) in such a medium can be very difficult because it does not contain any well dissociating functional groups in its molecular structure. It should be evident that only one of

this surfactant can be useful due to electrostatic interactions.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Chemicals and reagents

All the reagents such as α -tocopheryl acetate, acetonitrile (ACN) suitable for HPLC of purity 99.8 %, and anhydrous LiClO_4 were purchased from Sigma-Aldrich, spol.sr.o. (Prague, Czech Republic). Spectrographic carbon powder with a particle size $>5 \mu\text{m}$ from Graphite Týn, s. r. o. (Týnec nad Vltavou, Czech Republic), paraffin oil (PO) from Merck (Darmstadt, Germany), and surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) with cetylpyridinium chloride (CPC) from mentioned Sigma-Aldrich were used for preparation appropriate modified CPEs. Other chemicals were of the required analytical purity.

Electrochemical setup

A three electrode system consisting of modified CPE (working), $\text{Ag}/\text{AgCl}/3.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$ (reference) from Methrom, Prague, Czech Republic, and platinum wire (counter electrode) connected to Autolab PGSTAT 101 compatible with software Nova 1.11 from the above company was used for all electrochemical measurements.

Preparation of modified carbon paste electrode

To prevent a damage of the electrode material by presence of an organic solvent, the CPE has to contain a sufficient quantity of surfactant (Digua et al., 1994). In our case, 0.5 g of the carbon powder, 0.2 g of the paraffin oil and 0.3 g of the SDS were used for the preparation of working electrode (CPE/SDS). All the components were homogenized in a ceramic mortar for 20 min. The resulting homogeneous paste was packed into the Teflon piston holder (2 mm inner diameter). Generally, fresh electrodes, especially modified ones, should not be used for any measurement due to their unstable characteristics. This negative phenomenon is attributed to the incomplete homogenization of all components. Therefore, it is recommended to allow the CPE to rest at laboratory conditions for one day. After this time, the auto-homogenization process is completed and the electrode can be used for analysis. It is known that surface of CPE can be regenerated by renewing and polishing using wet filter paper before each measurement. Surprisingly, it was found that this procedure is not necessary in our case.

Procedure

All experiments were carried out in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ in 99.8% ACN as supporting electrolyte. The cyclic voltammetry (CV) was used for study of α -TAc electrochemical behaviour at CPE/SDS. Conditions of CV were as follows: potential range from -0.4 to $+1.6 \text{ V}$, scan rate $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, minimally 5 repetitive cycles. Analysis of cosmetic products was done by square wave voltammetry (SWV) with potential window from 0 to $+1.6 \text{ V}$, at potential step 5 mV, potential amplitude 10 mV and frequency 10 Hz. A volume of 10 mL $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \alpha$ -TAc in pure ACN without content of salt was prepared as stock solution. Measurement of calibration curve was done by addition of appropriate volume of this stock solution into 10 mL of supporting electrolyte. All changes in parameters

of CV or SWV are mentioned in legends under corresponding figures.

Analysis of cosmetics

Several cosmetic products, especially body creams (hand cream Diamonds and Pearls from Oriflame; Sweden, refreshing cleansing milk from Nivea; Germany, and suntan cream with protective factor UVA + UVB 30 from Astrid Cosmetics; Czech Republic), commonly available in the Czech stores were selected for analysis. Usually, 5 g of sample were dissolved in 50 mL volumetric flask using supporting electrolyte and ultrasonicated for 30 min at 25°C. The resulting sample solution had to be filtered through a stacked filter. After that 1 mL of resulting filtrate was added into 9 mL of supporting electrolyte and analysed by standard addition method (at least three additions of 200 µL α -TAc stock solution in pure ACN only). Each sample analysis was minimally three times repeated ($n = 3$). To verify the accuracy of the results obtained, the RSD values were compared with calculated value of significance level $\alpha = 0.05$.

Generally, body/hand creams can be classified as complex mixture developed by producers. In a narrower sense, they represent emulsions of water in several oils which are completely soluble in used electrolyte. For that reason, all complicated steps needed in the HPLC as standard reference method are not necessary.

For the desired rheological properties, they usually contain many accompanying substances such as glycerin, caprylic/capric triglyceride, cetyl alcohol, dimethicone, stearyl alcohol, glyceryl stearate, several emulsifiers etc. Most of these substances are not electroactive so they cannot interfere the determination.

Statistic analysis

Aritmetic mean (\bar{x}) and standard deviation (σ) of minimally five repetitives ($N = 5$), and slop of linear calibration curve (k) represent data which are necessary for the calculation of important parameters (limit of detection; LOD, limit of quantification; LOQ, accuracy, and correctness) of each developed analytical method. Values of LOQ and LOD were calculated according to follow equations $LOQ = 10\sigma/k$ and $LOD = 3\sigma/k$, respectively, where σ is the standard deviation of five repetitive measurements of the concentration for lowest concentration of calibration curve (MacDougall and Crummett, 1980).

There is necessary to mentioned that only three examples of body/hand cream were analysed. Due to the low number of samples (N), standard reference method was not applied. For that reason, any statistical methods for comparison of obtained results such as ANOVA or t-test were not needed. A precision of developed voltammetric method was validated using recovery (%) of model sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterisation of surfactant modified electrodes

Surfactants as SDS and CPC contain a long non-branched aliphatic chains with 12 or 16 carbons in their structure, respectively. Therefore, they are well soluble in lipophilic pasting liquid like PO which behaves like electric insulators. It was experimentally confirmed that an increasing content of surfactant caused significant

reduction of carbon paste viscosity (η). Evidently, distance between each carbon particle increased due to increasing of pasting liquid volume. The dependency of ohmic resistance (R) on the content of surfactant in CPE is very similar to curves contributed to R on the volume of pasting liquid (Mikysek et al., 2009). Generally, increasing content of any electric isolant in each electrode material usually worse electrochemical properties, especially capacitance current current which is needed to charging of working electrode.

However, it was found that presence of organic solvents has much more influence because carbon particles are more exposed to ACN with decreasing content of surfactant. It can be stated that modified CPEs with content of surfactant low than 30 % provided satisfactory electrochemical properties.

Under repetitive CV of pure $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ in 99.8% ACN, it was observed that an increasing content of SDS significantly decreases the current response of base line. Peak current (I_p) of clearly visible reduction peak at voltage (E_p) +1.1 V obtained at CPE with 20% SDS (w/w) increased with each repetition (not shown). This parasitic peak is probably attributed to the presence of water (2%; v/v) in the basic electrolyte. Lower contents of water did not have any significant effect on shapes of voltammograms.

Selection of a suitable surfactant

Two different kinds of surfactants were tested, namely anionic SDS and cationic CPC. Although CPEs modified by monohydrate of CPC provided better electrical conductivity (G), extremely high background current response has been observed at SWV (not shown). An explanation can be the isolation of the electrode surface that is essentially represents a capacitor. For that reason, the CPC cannot be used as suitable modifier of CPE for the determination of lipophilic compounds in cosmetic products. Unlike this, satisfactory base line current responses ($>0.5 \mu\text{A}$) at CPEs with 30 and 40% content of SDS (R from 90 to 100 Ω) were observed.

In addition, evidently better plotting of peak shape (more narrow) was obtained at CPE with 40% SDS than those with a lower content. Nevertheless, higher content than 30% SDS caused dramatically decreasing of peak current (sensitivity). For that reason value 30% SDS was chosen as optimum.

The scientific hypothesis in the previously mentioned paragraph was confirmed. A surface of CPE/SDS is evidently negatively charged due to presence of HSO_3 functional group in the chosen weak acidic medium (99.8% ACN). Unlike this, the α -TAc is a neutral form of vitamin E (pH 6-8) which has the role of base in the acidic media and its repulsion from the electrode surface can not become like in the case of CPE/CPC.

Electrochemical behaviour of α -tocopheryl acetate

Electrochemical behaviour of α -TAc in an organic medium at CPE/SDS was studied by cyclic voltametry with potential window from -0.4 to +1.6 V. Only one oxidation peak at +1.35 V (none in reverse scan) was observed (see Figure 1). Herein, it is necessary to state that this voltage is only approximate value because exact determination is quite difficult in the base line escape.

From chemical point of view, the α -TAc is a synthetic analogue of α -tocopherol (α -TOH) which is known as the most biologically active form vitamin E (Sýs et al., 2017). As ester of acetic acid and α -TOH, it lacks a free hydroxy group in its structure which can be involved in an electrochemical reaction (Sýs et al., 2016). Moreover, the ester functional group is not electron-rich for anodic oxidation as the delocalized electron system of benzene ring. It should be remembered that all tocopherols are oxidized by radical mechanisms in non-aqueous media (Wilson et al., 2006). The oxidation of the α -TAc at CPE/SDS occurs in one electron step and is probably irreversible. Mikheeva and Anisimova (2007) supposed that possible formation of the intermediate and its subsequent chemical conversion to the final products is proceeded.

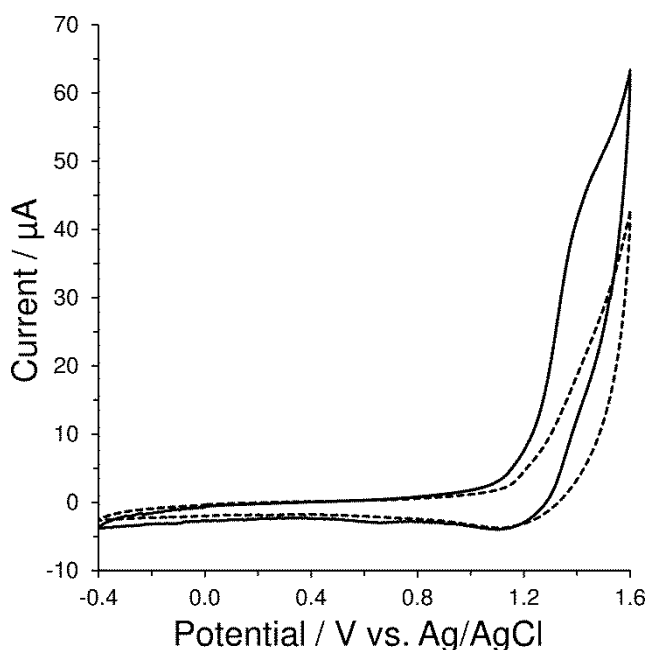


Figure 1 CV of 0 (dashed line) and $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -tocopheryl acetate at CPE/SDS (solid line) performed in 99.8% ACN containing $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiClO_4 at $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Optimization of square wave voltammetry

At the beginning, it was necessary to find optimum working conditions of used pulse voltammetric technique. In the case of the SWV, the sensitivity is affected by two main parameters, namely potential amplitude (E_{amp}) and frequency (f). It is generally known that height of peak current usually increases with higher values of these parameters (see Figures 2 and 3). Setting of amplitude higher than 10 mV and frequency 10 Hz significantly worsened the shape of corresponding voltammograms and thus determination their peak heights. For that reason, these values were chosen as optimum. For demonstration, typical voltammetric record with corresponding calibration curve is shown in Figure 4. Thanks to the extremely high base line current from +1.15 V, it was not possible to achieve lower value of detection limit than $17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. All other important analytical parameters together with comparison with already described electroanalytical methods are included in the Table 1. It appears that the

developed voltammetric method does not provide such sensitivity as those based on utilization of glassy carbon electrode (GCE). From scientific point of view, this paper represents the first more detailed work where particular type of CPE was used in the monitoring of α -TAc.

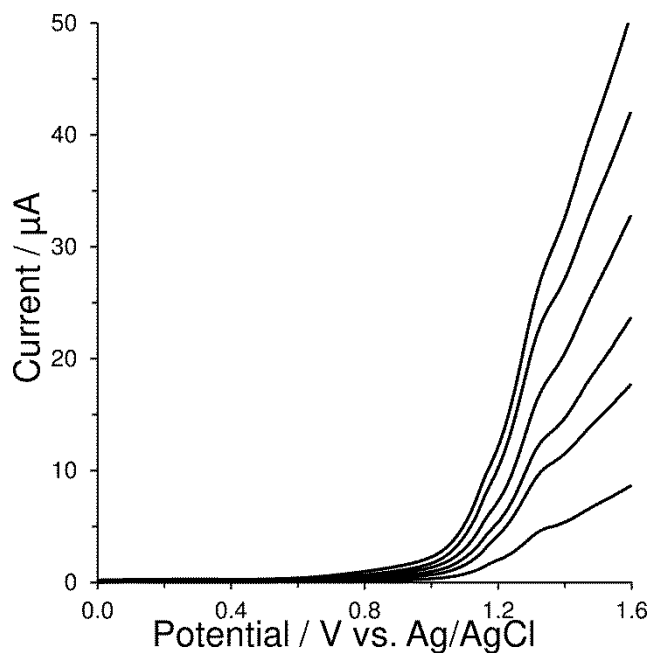


Figure 2 SWV of $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -tocopheryl acetate at CPE/SDS (solid line) performed in 99.8% ACN containing $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiClO_4 at potential amplitudes 5, 10, 15, 20, 25, 30 mV, and frequency 10 Hz.

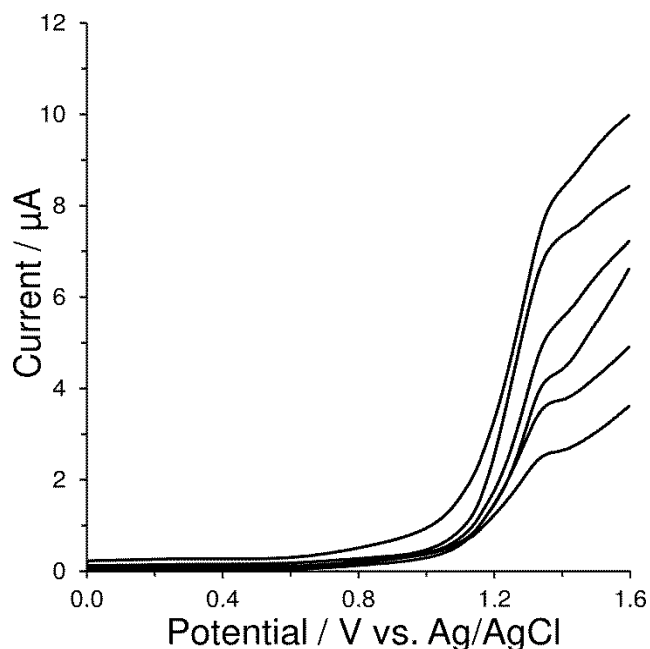


Figure 3 SWV of $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -tocopheryl acetate at CPE/SDS (solid line) performed in 99.8% ACN containing $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiClO_4 at potential amplitude 25 mV, frequencies 5, 10, 20, 30, 40, and 50 Hz.

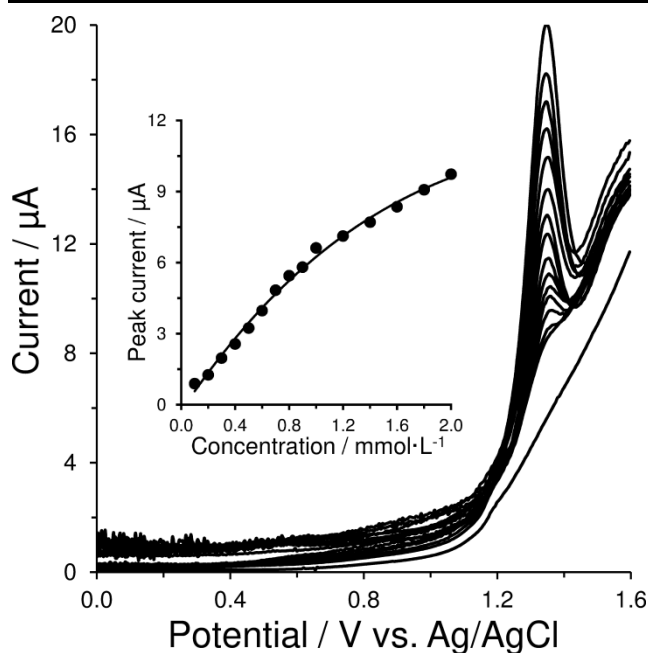


Figure 4 Voltammograms for 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, and 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -tocopheryl acetate with corresponding calibration curve (inserted one) obtained at CPE/SDS. Measured by SWV at $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 10 \text{ mV}$, and $f = 10 \text{ Hz}$.

Analysis of cosmetics products

From chemical point of view, all body/hand creams are always classified as complex emulsion which can be defined as a mixture of oily and watery liquids (the main components). Emulsifiers, fragrances, preservatives can be considered as secondary components (Moravkova and Filip, 2013). The preparation of samples for electroanalysis depends on their solubility in organic solvents.

Within this work, three typical examples of cosmetic products were selected for analysis by developed voltammetric method. Herein, it is necessary to mention that presence of the α -TAc in all selected samples is declared by producers. Unfortunately, its content is not listed on the products label. It is no wonder that this information is not known because the exact composition of body/hand creams is often subject to the production secret.

Generally, content of α -tocopheryl acetate in cosmetics products usually occurs up to four concentration ranges. The lowest amount from 0.0001 to 25% (w/w) can be found in bath products and bath products like shampoos. Values lower than 0.3% are typical for deodorants, hair products, and after-shave lotion. In the body/hand creams from 0.001 to 25%, suntan gels and creams from 0.05 to 1%, makeup liquids, eye shadows, lipsticks, and face powders from 0.02 to 0.8% represent common values (Thiele and Hsieh, 2005).

Common body/hand creams were well soluble in used supporting electrolyte except of suntan cream, probably due to high content of nonpolar components. Therefore, it has to be counted with a certain error of determination.

With respect to analytical method selectivity, it should be stated that other accompanying substances, especially esters of all-*trans* retinol (Tan et al., 2014) may not be oxidized together with the α -TAc at 1.32 V because

oxidation of retinyl acetate and retinyl palmitate occur at voltages 0.85 and 1.05 V, respectively. Moreover, their presence was not declared by the manufacturers.

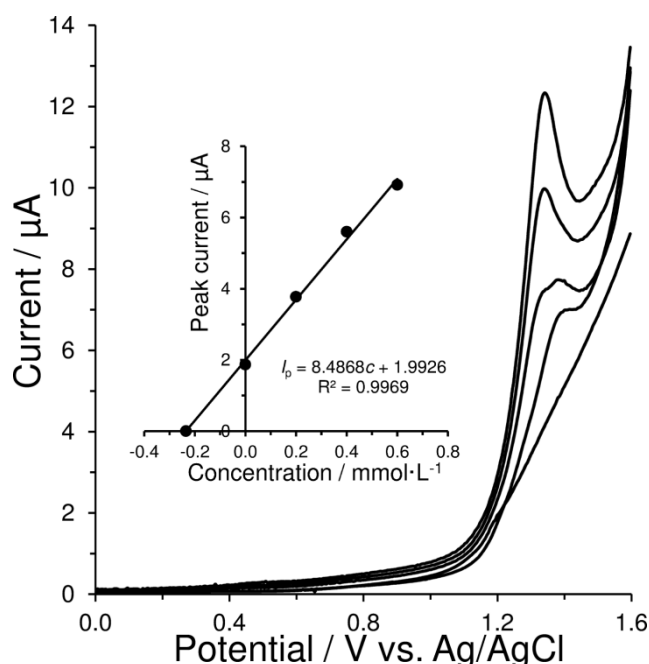


Figure 5 Analysis of refreshing cleansing milk from company Nivea (Germany) by standard addition method.

Figure 5 and Figure 6 show typical voltammograms obtained during analysis of refreshing cleansing milk using standard addition method. Three additions 200 μL of 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -TAc into 10 mL of usually ten times diluted sample solution were performed. Calculated contents of α -TAc in creams are shown in Table 2. The content ranged from 0.5 to 2% for these samples which is in line with commonly found quantities. Nevertheless, it is necessary to mention that verification of developed method was done only by calculation of the recovery 95.8% using analysis of model sample.

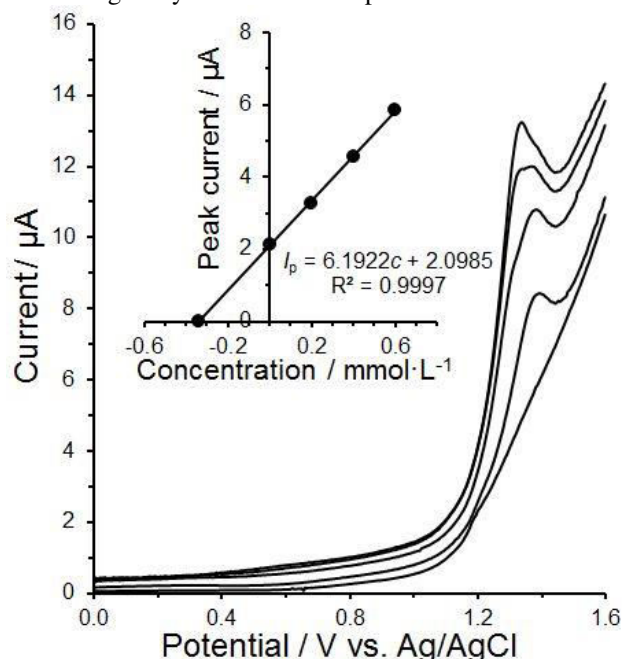


Figure 6 Analysis of hand cream company Oriflame (Sweden) by standard addition method.

Table 1 Comparison of conventional voltammetric methods developed for determination of α -tocopheryl acetate.

Sensor	Technique	Supporting electrolyte	Linear range ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	References
mPtE	LSV	0.1 mol·L ⁻¹ NaClO ₄	90 to 2300	27	(Michalkiewicz et al., 2004)
mPtE	DPV	0.1 mol·L ⁻¹ NaClO ₄	70 to 2200	21	(Michalkiewicz et al., 2004)
mPtE	SWV	0.1 mol·L ⁻¹ NaClO ₄	60 to 2100	18	(Michalkiewicz et al., 2004)
GCE	DPV	0.1 mol·L ⁻¹ NaClO ₄ in ACN	—	0.74	(Mikheeva and Anisimova, 2007)
GCE	DPV	0.1 mol·L ⁻¹ BRB (pH 2.8)	0.11 to 8.46	0.03	(Hassan et al., 2008)
CPE/SDS	SWV	0.1 mol·L ⁻¹ LiClO ₄ in ACN	100 to 1200	37	(Present work)

ACN; acetonitrile; BRB; Britton-Robinson buffer, CPE/SDS; carbon paste electrode modified by sodium dodecyl sulfate, DPV; differential pulse voltammetry, GCE; glassy carbon electrode, LSV; linear sweep voltammetry, LOD; limit of detection, mPtE; microdisc platinum electrode, SWV; square wave voltammetry.

Table 2 Analysis of selected cosmetic products.

Sample	Distributor	SWV (g per 100 g)	Declared amount (g per 100 g)	Recovery (%)
Model	—	0.23 ±0.02	0.24	95.8
Refreshing cleansing milk	Nivea, Germany	0.56 ±0.04	—	—
Hand cream	Oriflame, Sweden	1.60 ±0.08	—	—
Suntan cream	Astrid, Czech Republic	2.22 ±0.14	—	—

Note: Values given as arithmetic means with corresponding standard deviations for three analyses. SWV; square wave voltammetry.

CONCLUSION

Herein, it can be concluded that CPE modified by 30% (w/w) ionic surfactant SDS represents a sophisticated voltammetric sensor suitable for simple and rapid determination of vitamin E acetate in cosmetic products. Unlike very complicated sample preparation in the HPLC as standard reference method usually consisting many consecutive steps (saponification, extraction into organic solvent, and itself separation), only dissolution in the supporting electrolyte and subsequent filtration represented the all steps necessary in the electroanalysis. The developed method provides sufficient sensitivity (LOD = 17 mg·L⁻¹) for routine analysis of cosmetics because lipophilic vitamins are present in quantity of units to tens of milligrams per 100 g of sample.

REFERENCES

Adams, R. N. 1958. Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 9, p. 1576-1576. <https://doi.org/10.1021/ac60141a600>

Almeida, M. M., Alves, J. M., Patto, D. C. S., Lima, C. R. R. C., Quenca-Guillen, J. S., Santoro, M. I. R. M., Kedor.Hackmann, E. R. M. 2009. Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC. *Journal of Cosmetic Science*, vol. 31, no. 6, p. 445-450. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00514.x>

Atuma, S. S., Lindquist, J., Lundström, K. 1974. The electrochemical determination of vitamin. A part I. Voltammetric determination of vitamin A in pharmaceutical

preparations. *Analyst*, vol. 99, no. 1183, p. 683-689. <https://doi.org/10.1039/an9749900683>

Balz, M. K., Schulte, E., Their, H. P. 1993. Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate, tocopherols and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 95, no. 6, p. 215-220. <https://doi.org/10.1002/lipi.19930950603>

Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. 1992. pH measurements in acetonitrile-water mixtures by use of a glass electrode. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, vol. 10, no. 10-12, p. 1047-1051. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80117-R](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80117-R)

Da Silva, F. L. O., Da Silva Tinoco, L. M., Ferreira, L. A. M., Malagutti, A. R., Carneiro, G. 2015. Determination of all-trans retinoic acid loaded in solid liquid nanoparticles by differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, vol. 182, p. 929-934. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.10.018>

Digua, K., Kauffmann, J. M., Delplancke, J. L. 1994. Surfactant modified carbon paste electrode: Part 1: Electrochemical and microscopic characterization. *Electroanalysis*, vol. 6, no. 5-6, p. 451-458. <https://doi.org/10.1002/elan.1140060515>

Digua, K., Kauffmann, J. M., Khodari, M. 1994. Surfactant modified carbon paste electrode: Part 2: Analytical performances. *Electroanalysis*, vol. 6, no. 5-6, p. 459-462. <https://doi.org/10.1002/elan.1140060516>

Gorton, L. 1995. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*, vol. 7, no. 1, p. 23-45. <https://doi.org/10.1002/elan.1140070104>

- Hassan, E. M., Khamis, E. F., El-Kimary, E. I., Barary, M. A. 2008. Development of a differential pulse voltammetric method for the determination of Silymarin/Vitamin E, p. acetate mixture in pharmaceuticals. *Talanta*, vol. 74, p. 773-778. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.07.006>
- Hewavitharana, A. K., Lanari, M. C., Becu, C. 2004. Simultaneous determination of vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, vol. 1025, no. 2, p. 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.052>
- Iwase, H. 2000. Determination of tocopherol acetate in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, no. 1-2, p. 243-249. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00058-3)
- Labuda, J., Meister, A., Gläser, P., Werner, G. 1998. Metal oxide-modified carbon paste electrodes and microelectrodes for the detection of amino acids and their application to capillary electrophoresis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 360, no. 6, p. 654-658. <https://doi.org/10.1007/s002160050775>
- MacDougall, D., Crummett, W. B. 1980. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, vol. 52, no. 14, p. 2242-2249. <https://doi.org/10.1021/ac50064a004>
- Michalkiewicz, S., Pryciak, M., Malyszko, J., Oszczudlowski, J. 2004. Voltammetric determination of α -tocopheryl acetate in pharmaceutical dosage form. *Electroanalysis*, vol. 16, no. 11, p. 961-965. <https://doi.org/10.1002/elan.200302893>
- Mikheeva, E. V., Anisimova, L. S. 2007. Voltammetric determination of vitamin E (α -tocopherol acetate) in multicomponent vitaminized mixtures. *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 62, no. 4, p. 373-376. <https://doi.org/10.1134/S1061934807040144>
- Mikysek, T., Švancara, I., Kalcher, K., Bartoš, M., Vytřas, K., Ludvík, J. 2009. New approaches to the characterization of carbon paste electrodes using the ohmic resistance effect and qualitative carbon paste indexes. *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 15, p. 6327-6333. <https://doi.org/10.1021/ac9004937>
- Moravkova, T., Filip, P. 2013. The influence of emulsifier on rheological and sensory properties of cosmetic lotions. *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2013, no. 1, p. 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/168503>
- Nada, A., Krishnaiah, Y. S., Zaghoul, A. A., Khattab, I. 2010. Analysis of vitamin E in commercial cosmetic preparations by HPLC. *Journal of Cosmetic Science*, vol. 61, no. 5, p. 353-365. [PMid:20939975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20939975/)
- Punbusayakul, N. 2012. Carbon nanotubes architectures in electroanalysis. *Procedia Engineering*, vol. 32, no. 1, p. 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1327>
- Ramos- E Silva, M., Hessel, D. M., Rutowitsch, M. S., Zechmeister, M. 2001. Hydroxy acids and retinoids in cosmetics. *Clinics in Dermatology*, vol. 19, no. 4, p. 460-466. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(01\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(01)00189-4)
- Rodas Mendoza, B., Morera Pons, S., Castellote Bargalló, A. I., López-Sabater, M. C. 2003. Rapid determination by reverse-phase high-performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, vol. 1018, no. 2, p. 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.018>
- Sunarič, S., Lalič, J., Spasič, A. 2017. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate in dairy products, plant milks and health supplements by using SPE and HPLC method. *Food Analytical Methods*, vol. 10, no. 12, p. 3880-3901. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0943-x>
- Sýs, M., Metelka, R., Stočes, M., Vytřas, K. 2016. Electrochemical properties of α -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture. *Monatshefte für Chemie*, vol. 147, no. 1, p. 31-38. <https://doi.org/10.1007/s00706-015-1620-7>
- Sýs, M., Švecová, B., Švancara, I., Metelka, R. 2017. Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with glassy carbon paste electrode. *Food Chemistry*, vol. 229, p. 621-627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.068>
- Sýs, M., Žabčiková, S., Červenka, L., Vytřas, K. 2016. Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination. *Potravinarstvo*, vol. 10, no. 1, p. 260-264. <https://doi.org/10.5219/587>
- Tan, Y. S., Urbančok, D., Webster, R. D. 2014. Contrasting voltammetric behaviour of different forms of vitamin A in aprotic organic solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 29, p. 8591-8600. <https://doi.org/10.1021/jp505456g>
- Thiele J. J., Hsieh, S. N., Ekanayake-Mudiyanselage, S. 2005. Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatologic Surgery*, vol. 31, no. 1, p. 805-813. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31724>
- Wang, L. H., Wang, J. F. 2001. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 25, no. 5-6, p. 785-793. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00381-8)
- Wilson, G. J., Lin, Ch. Y., Webster, R. D. 2006. Significant differences in the electrochemical behavior of the α -, β -, γ -, and δ -tocopherols (vitamin E). *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 23, p. 11540-11548. <https://doi.org/10.1021/jp0604802>
- Yang, Y., Lu, D., Yin, S., Yang, D., Chen, Y., Li, Y., Sun, Ch. 2018. A convenient ultrasound-assisted saponification for the simultaneous determination of vitamin E isomers in vegetable oil by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, (in editing) <http://doi.org/10.1002/jssc.201701393>

Acknowledgments:

The authors grateful to the CEEPUS CIII-CZ-0212-08-1415 network for mobility funding and Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2018-001) for financial support.

Contact address:

Simona Žabčiková, University of Pardubice, Faculty of chemical-technology, Department of Analytical chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: simona.zabcikova@student.upce.cz

Arlinda Nallbani, University of Prishtina, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Department of Chemistry, Str. Mother Teresa, Prishtina 10 000, Republic of Kosovo, E-mail: arlinda_nallbani@hotmail.com

Milan Sýs, University of Pardubice, Faculty of chemical-technology, Department of Analytical chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: milan.sys@upce.cz

Tomáš Mikysek, University of Pardubice, Faculty of chemical-technology, Department of Analytical chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: tomas.mikysek@upce.cz

Libor Červenka, University of Pardubice, Faculty of chemical-technology, Department of Analytical chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.cervenka@upce.cz

Příloha 9



DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN PHARMACEUTICAL PREPARATION AND FRUIT JUICE USING MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE

Simona Žabčíková, Dai Long Vu, Libor Červenka, Vojtěch Tambor, Martina Vašatová

ABSTRACT

Ascorbic acid is a key substance in the human metabolism and the rapid and accurate determination in food is of a great interest. Ascorbic acid is an electroactive compound, however poorly responded on the bare carbon paste electrodes. In this paper, brilliant cresyl blue and multi-walled carbon nanotubes were used for the modification of carbon paste electrode. Brilliant cresyl blue acts as a mediator improving the transition of electrons, whereas multiwalled carbon nanotubes increased the surface of the electrode. Both brilliant cresyl blue and multiwalled carbon nanotubes were added directly to the composite material. The electrochemical behavior of modified electrode was determined in electrolyte at various pH, and the effect of the scan rate was also performed. It was shown that the electrochemical process on the surface of the modified carbon paste electrode was diffusion-controlled. The resulted modified carbon paste electrode showed a good electrocatalytic activity towards the oxidation of ascorbic acid at a reduced overpotential of +100 mV decreasing the risk of interferences. A linear response of the ascorbic acid oxidation current measured by the amperometry in the range of 0.1 – 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was obtained applying the sensor for the standard solution. The limit of detection and limit of quantification was found to be 0.05 and 0.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The novel method was applied for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical vitamin preparation and fruit juice, and the results were in good agreement with the standard HPLC method. The presented modification of carbon paste electrode is suitable for the fast, sensitive and very accurate determination of ascorbic acid in fruit juices and pharmaceutical preparation.

Keywords: ascorbic acid; carbon nanotubes; amperometry; brilliant cresyl blue

INTRODUCTION

Ascorbic acid (AA) is a significant vitamin in the diet of humans which prevents scurvy and takes part in several biological reactions (Oguntibeju 2008). In recent studies, it has been found that ascorbic acid may be used as a supporting agent for the treatment of cancer (Du et al., 2012) and seems to be interesting in research of Alzheimer's disease (Bowman 2012). However, AA cannot be synthesized by humans and must be supplied from various natural and prepared foods, drugs and physiological fluids, fruit juices, soft drinks and vegetables. For that reason, the determination of AA is very important for biological and agro-industry. At present, vitamin C is determined using widely different techniques including colorimetric and titrimetric measurement, UV spectrophotometry, as well as fluorimetric, chromatographic and other spectroscopic methods (Ötles and Karabrahimoglu, 2012). The most common method for analysis of vitamin C is HPLC which is more accurate, selective and sensitive than other methods mentioned above. However, HPLC methods require specific equipments which are very expensive, difficult in monitoring and generally time-consuming. A need has arisen for a fast, sensitive and inexpensive method for the detection of AA. Recently, a portable strip used for the rapid determination of ascorbic acid has been described (Kudrnáčová a Kouřimská, 2015). The electrochemical

determination is one of the approaches as was described in literature (Skrovankova et al., 2015; Pisoschi et al., 2014). Research and development in amperometric sensors for the determination of AA based on the carbon paste composite material have gained increasing importance in the last few years for their advantageous properties as analytical tools, namely the easy of application, lower cost, providing direct, sensitive and fast detection of AA, in comparison with well-established, lab-based methods (Weng et al., 2013; Li et al., 2011; Huang et al., 2014; Heli and Sattarahmedy 2015; Chang et al., 2014). The carbon paste electrodes have attractive advantages, such as simple preparation, low-cost implementation, renewability, low background current, and wide potential window (Švancara et al., 2012). Carbon nanotubes (CNTs) modified CPE have been applied in many studies due to the unique properties of CNTs such as large active surface area, high electronic conductivity, anti-fouling capability and their ability to reduce over potential (Jacobs et al., 2010; Huang et al., 2014; Bijad et al., 2014).

Brilliant cresyl blue (BCB) is a cationic quinone-imide dye with a planar and rigid structure which has been proven to possess promising properties as a redox catalyst. BCB can adsorb strongly on the electrode surfaces and these chemically modified electrodes have been used for the determination of various organic compounds (Lin et al., 2012; Ding et al., 2016; Shaikh et al., 2013). The

reduction of BCB by ascorbic acid has been described (Ulusoy et al., 2011) therefore we chose this organic dye as a suitable redox mediator for amperometric determination of ascorbic acid.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Reagents and equipment

All the reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic). Deionized water was used in this study ($G \leq 0.055 \mu\text{S}$). Dissolved oxygen was removed from all the solutions by purging with argon for 5 min (purity 99.99%, Linde Technoplyn, Prague, Czech Republic).

A solution of ascorbic acid ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) was daily prepared in deionized water and was kept in a dark bottle during the experiments. Britton Robinson (0.04 M, B-R) buffer solution containing 0.1 M KCl was used as a supporting electrolyte.

A three electrode system consisting of CPEs (working), Ag/AgCl/3.0 M KCl (reference) and platinum wire (counter electrode) connected to PalmSens (Ivium Technologies, Netherland) was used for electrochemical measurement. The surfaces of CPE were regenerated by renewing and polishing them on wet filter paper before each measurement.

Preparation of CPE

Both bare and modified electrodes were prepared by mixing of 0.5 g of graphite powder 5.5 – 7.0 μm (CR-5, Maziva Týn n. L., s.r.o., Czech Republic) with 130 μL of mineral oil (M5904, Sigma-Aldrich, Germany). The modified CPE electrode contained 1.0% of multiwalled carbon nanotubes (40 – 60 nm, Shenzhen NanoTech Port Co., China) (MWCNTs), and 3.0% of brilliant cresyl blue powder (BCB). The resulting paste was packed into the Teflon piston holder (3.0 mm inner diameter) (Švancara and Metelka 2000). The resistance of the composite material was always $\leq 15.0 \Omega$.

Electrochemical procedure

The effect of modifiers in carbon paste was investigated using cyclic voltammetry in 0.04 M Britton-Robinson buffer solution (B-R) at the pH 5.0 containing 0.1 M KCl at a scan rate of 50 mV.s^{-1} in the range of potentials from -400 mV to +1000 mV. The influence of pH between 3.0 and 9.0 was also investigated at the scan rate of 50 mV.s^{-1} in the same potential window. In order to study the effect of the scan rate on the peak potentials and peak currents, the cyclic voltammograms of the BCB-MWCNTs/CPE were recorded at different scan rates in the potentials ranged from -300 to 800 mV in B-R buffer solution at the pH 5.0 containing 0.1 M KCl.

The amperometric detection of ascorbic acid based on its electrocatalytic oxidation was studied by using BCB-MWCNTs/CPE. Aliquots of a stock solution of AA were added to the supporting electrolyte solution (B-R buffer solution at the pH 5.0 plus 0.1M KCl) after the background current reached a steady state value at an applied potential +100 mV.

Sample preparation

The proposed method was applied for the determination of AA in pharmaceutical sample (tablet, Celaskon 250 mg,

Zentiva, Czech Republic) and fruit juice sample (Toma Juice Multivitamin, Pepsico CZ s.r.o., Czech Republic). The tablet (15 mg) was dissolved in deionized water, transferred to a 250 mL volumetric flask, and then was diluted by deionized water until the mark. Juice sample was used directly without any treatment. The amount of ascorbic acid was also determined using HPLC/UV (LC-10AD, Shimadzu Co., Japan) equipped with column LiChrospher RP-18e ($250 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). A mixture of 250 μL of dilute sample and 50 μL of internal standard (isoascorbic acid in metaphosphoric acid) was vigorously shaken following by centrifugation (13.000 rpm, 5 min). The supernatant (5 μL) was injected into the mobile phase (sodium phosphate/phosphoric acid, pH 2.0, flow rate 1 mL.min^{-1}) with detection wavelength at 263 nm. Student's t-test was used for determination of statistical differences between results at the probability level $p = 0.05$ (Origin Pro v. 9, OriginLab Corp., USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical behavior of BCB-MWCNTs/CPE

As can be seen from Figure 1, an anodic and cathodic peak was observed at +125 mV and +75 mV, respectively. The formal potential of the redox process was +100 mV, and a peak-to-peak separation was +50 mV. The reverse-to-forward current peak ration was approximately unity, which reflects the reversible electrochemical behavior of BCB.

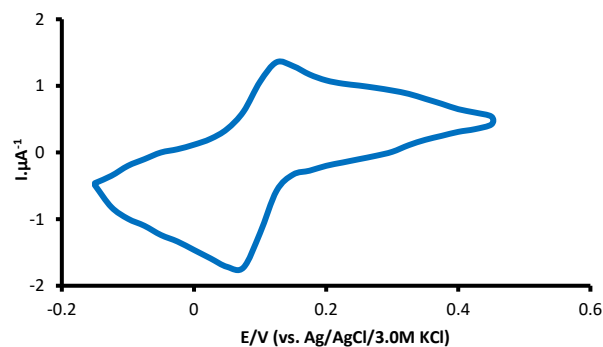


Figure 1 Cyclic voltammograms of BCB-MWCNTs/CPE in the absence of ascorbic acid in B-R buffer solution (pH 5.0) containing 0.1M KCl at the scan rate 50 mV.s^{-1} . Potential range from -150 to +450 mV, potential step 25 mV.

The electrochemical behavior of BCB-MWCNTs/CPE was investigated by recording of cyclic voltammograms in a B-R buffer solution at the pH 3.0 containing 0.1M KCl at various scan rates. The anodic (I_{pa}) and cathodic (I_{pc}) peak currents were proportional to the scan rates (v) in the range from 10 to 100 mV.s^{-1} . The equations and the regression coefficients were found to be: $I_{pa} = 0.11v^{1/2} + 0.02$ ($R^2 = 0.998$) and $I_{pc} = -0.11v^{1/2} + 0.04$ ($R^2 = 0.994$), respectively.

These results indicate that the electrochemical process on the BCB-MWCNTs/CPE is diffusion-controlled. The shifting of the potentials was not observed between 10 and 100 mV.s^{-1} .

In order to study the effect of pH on the electrochemical behavior of BCB-MWCNTs/CPE, B-R buffer with the pH ranged from 3.0 to 9.0 as a supporting electrolyte was used

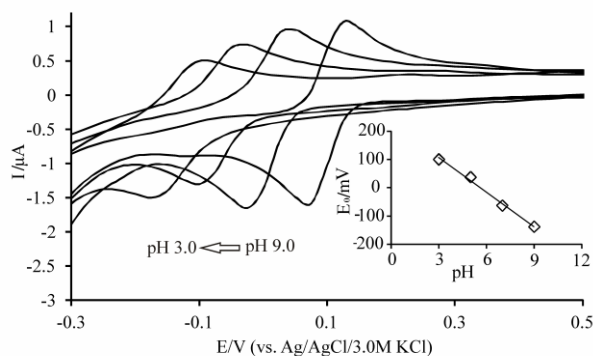


Figure 2 Cyclic voltammograms of BCB-MWCNTs/CPE in B-R buffer solutions (pH 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0) containing 0.1M KCl, scan rate $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, potential range from -500 to $+900$ mV. Inset: Effect of formal potential (E_0) of BCB-MWCNTs/CPE on the pH.

for determination of cyclic voltammograms of BCB-MWCNTs/CPE at the scan rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. It was seen that the pH significantly influenced the behavior of BCB-MWCNTs/CPE, since the shape and the position of the peak for redox pair was better in acidic conditions (3.0 and 5.0) in comparison with those obtained in the pH 7.0 and 9.0 (Figure 2).

The inset in Fig. 2 shows the formal potential (E^0) of the BCB-MWCNTs/CPE plotted against pH in the range from 3.0 to 9.0. It shows a slope $-40.63 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$, which is close to that given by the Nernstian equation for equal number of electrons and protons transfer process. Moreover, the both oxidation and reduction currents proportionally decreased with increasing pH. The electrochemical behavior has been documented in electrodeposited BSB film on the surface of multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode (Lin et al., 2012).

Ascorbic acid oxidation at BCB-MWCNTs/CPE

Cyclic voltammograms of BCB-MWCNTs/CPE were recorded both in the absence and presence of ascorbic acid in order to study the electrocatalytic activity of modify electrode towards AA oxidation. As shown in Figure 3,

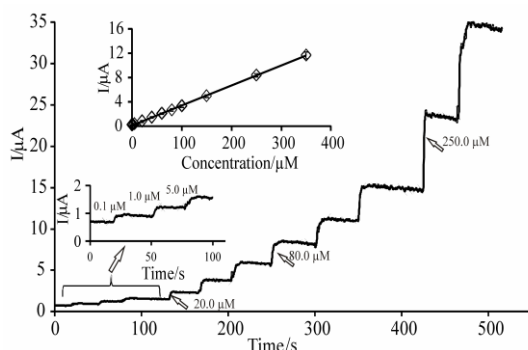


Figure 4 Amperometric current-time curves of AA with various concentrations (μM) using BCB-MWCNTs/CPE. Inlet: the plot of maximum oxidation current vs. concentration of AA. B-R buffer solution at pH 5.0, constant potential $+100$ mV, stirring speed 400 rpm. The vertical bars represent standard deviation ($n = 6$).

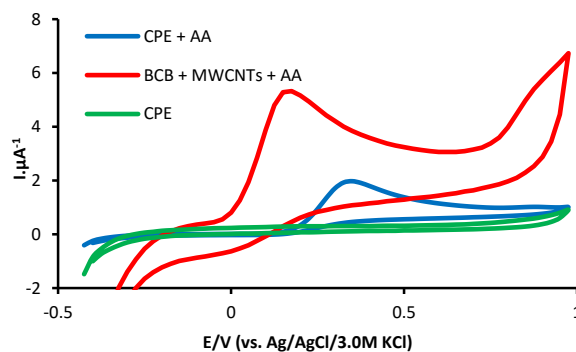


Figure 3 Cyclic voltammograms of BCB-MWCNTs/CPE and CPE in the presence of $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of ascorbic acid in B-R buffer (pH 5.0) containing 0.1M KCl, scan rate $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, potential step 25 mV. Bare CPE (green) in buffer solution served as control.

anodic and cathodic peaks were obtained at $+125$ and 75 mV, respectively. Oxidation of AA in the bare CPE and BCB-MWCNTs/CPE gave peak potentials at about 350 and 150 mV, respectively. The overpotential for AA oxidation was found to shift by about 200 mV.

The modification of CPE by each modifier separately was also investigated. The oxidation peak potential of AA using CPE with 1.0% of MWCNTs shifted to more negative potentials by about $+50$ mV with increasing ($p < 0.05$) of oxidation current of AA to $3.06 \pm 0.02 \mu\text{A}$ in comparison with that obtained in bare CPE ($2.13 \pm 0.02 \mu\text{A}$). On the other hand, the separate addition of 3.0% of BCB to CPE resulted in similar oxidation current of AA ($2.91 \pm 0.05 \mu\text{A}$) but more progressive shift of the peak potential to $+175$ mV was observed. It confirms that MWCNTs just increased the electroactive surface area of the CPE electrode (with slight increase of overpotential) whereas BCB acts as a redox mediator. This result clearly indicates that BCB-MWCNTs/CPE in B-R buffer solution (pH 5.0) containing 0.1M KCl exhibited a significant supporting electrocatalytic activity towards AA oxidation. In the study of Zhang et al., (2013), the film of poly(bromocresol purple) at glassy carbon electrode also showed good electrocatalytic effect towards AA oxidation with reduced the oxidation overpotential for about 240 mV with increasing current. In view of oxidation current and the targeted analyte (AA), pH 5.0 was chosen as the best buffer since it offered a relatively high oxidation current and a low oxidation potential.

Various values of applied potential from -50 to $+400$ mV were used for the amperometric detection of AA. The oxidation current of AA exhibited steep increase from -50 to 100 mV. An applied potential is considered suitable when it offers relatively high oxidation current and low oxidation peak potential. The applied potential $+100$ mV was chosen for the amperometric determination of AA at BCB-MWCNTs/CPE since it gave the highest current ($4.86 \pm 0.01 \mu\text{A}$) compared with that obtained from the lower applied potentials. Besides, using low applied potential can avoid the interferences of some compounds from the matrices. Figure 4 shows the current-time curves for the amperometric responses at various concentration of AA.

Table 1 Comparison of carbon paste electrode (CPE) based electrochemical sensors for amperometric determination of ascorbic acid.

Electrode modification	Applied potential (mV)	LOD ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Dynamic range ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Reference
AF-MWCNT/EPI ¹	+420	4.1	NA	Huang et al., 2014
Gold decorated SiO ₂ @PANI ² core-shell microsphere	+400	3.8	150.0-8000.0	Weng et al., 2013
Graphene doped CPE	+310	0.07	0.1-106.0	Li et al., 2011
Graphene oxide CoHCF ³ nanocomposite	+430	0.29	2.5-62.5	Heli and Sattarahmady 2015
trans-PEPACC ⁴	+450	2.27	0-550	Chang et al., 2014
BCB/MWCNT ⁵	+100	0.05	0.1-350.0	This work

¹ amino-functionalized multi-walled carbon nanotube electroactive polyamide, ² polyaniline, ³ cobalt hexacyanoferrate. ⁴ photoactive and electroactive azo-based polyimide/amino-functionalized multiwalled carbon nanotubes, ⁵ brilliant cresyl blue/multi-walled carbon nanotube.

Table 2 Ascorbic acid content (mg.L^{-1}) in real sample using BCB-MWCNTs/CPE and standard HPLC method ($n = 20$).

Sample	Amperometric method	HPLC method
Juice	120.1 \pm 5.2*	120.5 \pm 4.7
Tablet	25.8 \pm 0.5	25.2 \pm 0.4

* standard deviation

A linear relationship between the AA concentration and the peak oxidation current was obtained over the concentration range $1 \times 10^{-7} - 3.5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 4, inset) with equation:

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 0.033 \times c (\mu\text{mol.L}^{-1}) + 0.166 (R^2 = 0.993)$$

The repeatability of the method was investigated by amperometric measurements of $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ and $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ of AA ($n = 20$) and the relative standard deviation (RSD) was found to be 4.5% and 5.2%, respectively. The limit of detection (LOD) using the equation $\text{LOD} = 3s_b/m$, where s_b is the standard deviation of the blank response and m is the slope of the calibration plot, was found to be $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. The limit of quantification (LOQ) using the equation $\text{LOQ} = 10s_b/m$ was found to be $1.5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ (signal/noise = 10). Various modified carbon paste electrodes used for ascorbic acid determination were compared (Table 1). Among amperometric sensors based on CPE, our modification allowed the detection of AA at lower applied potential avoiding the interference species. BCB-MWCNTs/CPE electrochemical sensor is proven to be extremely sensitive, simple renewable and easy in preparation and storage. After 45 days of storage at room temperature, the amperometric responses of AA at the concentration of $5.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ was not significantly ($p > 0.05$) different in comparison with those obtained using the freshly prepared electrode. The low detection limit is an advantageous character of BCB-MWCNTs/CPE compared with the most CPE modified electrodes mentioned in Table 1. BCB-MWCNTs/CPE is also applicable for the analysis of AA in fruit juices and pharmaceutical preparations. As described in Table 2, the contents of AA in real samples did not differ from those determined by HPLC method.

CONCLUSION

This study demonstrated that BCB-MWCNTs/CPE showed significant electrocatalytic activity towards the oxidation of AA. It was observed that the oxidation peak potential of AA shifted from +375 mV at CPE to +100 mV at BCB-MWCNTs/CPE together with increasing of the oxidation current. The electrocatalytic activity of BCB-MWCNTs/CPE was investigated to detect AA by amperometry with a good linearity and sensitivity. We may conclude that BCB-MWCNTs/CPE represents a steady electrode material for electrocatalytic oxidation of AA.

REFERENCES

- Bijad, M., Karimi-Malch, M., Khalilzadeh, M. A. 2013. Application of ZNO/CNTs nanocomposite ionic liquid paste electrode as a sensitive voltammetric sensor for determination of ascorbic acid in food samples. *Food Analytical Methods*, vol. 6, p. 1639-1647. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-013-9585-9>
- Bowman, G. L. 2012. Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: a current review and future direction. *Biofactors*, vol. 38, no. 2, p. 114-122. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1002> PMID:22419527
- Chang, K. C., Chu, C. M., Chang, C. H., Cheng, H. T., Hsu, S. C., Lan, C. C., Chen, H. H., Peng, Y. Y., Yeh, J. M. 2014. Photoisomerization of electroactive polyimide/multiwalled carbon nanotube composites on the effect of electrochemical sensing for ascorbic acid. *Polymer International*, vol. 64, no. 3, p. 373-382. <http://dx.doi.org/10.1002/pi.4797>
- Ding, M., Yhou, Y., Liang, X., Zou, H., Wang, Z., Wang, M., Ma, J. 2016. An Electrochemical Sensor Based On Graphene/Poly(Brilliant Cresyl Blue) Nanocomposite For Determination Of Epinephrine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 763, p. 25-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.040>
- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R. 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, vol. 1826, no. 2, p. 443-457.
- Heli, H., Sattarahmady N. 2015. Amperometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical formulations by a reduced graphene oxide-cobalt hexacyanoferrate nanocomposite. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 14, no. 2, p. 453-463. PMID:25901152
- Huang, T. C., Yeh, L. C., Huang, H. Y., Nian, Z. Y., Yeh, Y. C., Chou, Y. C., Yeh, J. M., Tsai, M. H. 2014. The use of a

carbon paste electrode mixed with multiwalled carbon nanotube/electroactive polyamide composites as an electrode for sensing ascorbic acid. *Polymer Chemistry*, vol. 5, p. 630-637. <http://dx.doi.org/10.1039/C3PY00787A>

Jacobs, C. B., Peairs, M. J., Venton, B. J. 2010. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta*, vol. 662, no. 2, p. 105-127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.009>
PMid:20171310

Kudrnáčová, E., Kouřimská L. 2015. Qualitative parameters of non-traditional types of vegetables – determination of nitrates and ascorbic acid content. *Potravinářstvo*, vol. 9, no. 1, p. 237-241. <http://dx.doi.org/10.5219/466>

Li, F., Li, J., Feng, Y., Yang, L., Du, Z. 2011. Electrochemical behavior of graphene doped carbon paste electrode and its application for sensitive determination of ascorbic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 157, no. 1, p. 110-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.03.033>

Lin, K. C., Huang, J. Y., Chen, S. M. 2012. Poly(brilliant cresyl blue) electrodeposited in multi-walled carbon nanotubes modified electrode and its application for persulfate determination. *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 7, p. 9161-9173.

Oguntibeju, O. O. 2008. The biochemical, physiological and therapeutic roles of ascorbic acid. *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 25, p.4700-4705.

Ötleş, S., Karabrahimoglu, S. 2012. Analysis of vitamins for health, pharmaceutical, and food sciences. In Ötleş, S. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 211-230. ISBN: 978-1-4398-1552-6.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., Fafaneata, C. 2014. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, vol. 121, p. 443-460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.127>

Shaikh, A. A., Saha, S. K., Bakshi, P. K., Hussain, A., Ahammad, A. J. S. 2013. Poly(Brilliant Cresyl Blue)-Modified Electrode For Highly Sensitive And Simultaneous Determination Of Hydroquinone And Catechol. *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 160, no. 4, p. B37-B42. <http://dx.doi.org/10.1149/2.008304jes>

Skrovankova, S., Mlcek, J., Sochor, J., Baron, M., Kynicky, J., Jurikova, T. 2015. Determination of ascorbic acid by electrochemical techniques and other methods. *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 10, p. 2421-2431.

Švancara, I., Kalcher, K., Walcarius, A., Vytras, K. 2012. *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. BOCA RATON, FL: CRC Press. ISBN: 978-1-4398-3019-2.

Švancara, I., Metelka, R. 2000. Piston-driven carbon paste holders for electrochemical measurements. In Vytrás, K., Kalcher, K. *Sensing in Electroanalysis*, vol. 1. Pardubice: University of Pardubice, p. 7- 8. ISBN: 80-7194-831-4.

Ulusoy, H. I., Gürkan, R., Akçay, M. 2011. Kinetic spectrophotometric determination of trace copper(II) ions by their catalytic effect on the reduction of brilliant cresyl blue by ascorbic acid. *Turkish Journal of Chemistry*, vol. 35, p. 599-612.

Weng, C. J., Chen, Y. L., Chien, C. L., Hsu, S. C., Jhuo, Y. S., Yeh, J. M., Dai, C. F. 2013. Preparation of gold decorated SiO₂@polyaniline core-shell microspheres and application as a sensor for ascorbic acid. *Electrochimica Acta*, vol. 95, p. 162-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.150>

Zhang, R., Liu, S., Wang, L., Yang, G. 2013. Electroanalysis of ascorbic acid using poly(bromocresol purple) film modified glassy carbon electrode. *Measurement*, vol. 46, no. 3, p. 1089-1093. <http://dx.doi.org/10.1016/j.measurement.2012.11.007>

Acknowledgments:

This work was supported by the financial support of the Student Grant (no. SG01/2016) of the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice.

Contact address:

Simona Žabčiková, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: simona.zabcikova@student.upce.cz.

Libor Červenka, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.cervenka@upce.cz.

Dai Long Vu, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: longvu1182@gmail.com.

Vojtěch Tambor, Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, E-mail: vojtech.tambor@fnhk.cz.

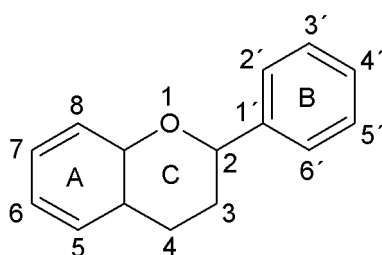
Martina Vašatová, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, E-mail: martina.vasatova@fnhk.cz.

5 Využití CPE v dalších oblastech analýzy potravin

5.1 Flavonoidy

Flavonoidy, organické fenolické látky rostlin, se tvoří z aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a soli kyseliny malonové. Základní strukturou flavonoidů je flavonové jádro obsahující celkem patnáct uhlíků tvořené třemi kruhy označovanými A, B a C, přičemž kruhy A a B jsou aromatické, kruh C je heterocyklický (obrázek 13). Atomy vodíku ve všech třech kruzích lze nahradit třemi hlavními substituenty, hydroxylovou skupinou (-OH), acylem (-OR) nebo cukrem, kdy vznikne glykosid. Flavonoidy se dělí (v závislosti na funkčních substituentech flavonového jádra, na stupni hydroxylace, konjugace či polymerace) na flavony, flavanony, flavonoly, flavanonoly, isoflavony, katechin a antokyany. Flavonoidy se přirozeně vyskytují v rostlinách, včetně ovoce a zeleniny, v semenech, oříšcích, koření, bylinkách, luštěninách či klíčcích. Jsou zodpovědné za zbarvení rostlin do odstínů oranžova, červena a žluta. Lze je nalézt také v čaji, pivu, vínu či bylinných nápojích. Flavonoidy jsou z hlediska lidské výživy zajímavé převážně pro své antioxidační vlastnosti, nicméně prokazatelně působí také protizánětlivě či antivirově, protialergicky, přispívají také k pevnosti krevních kapilár, vykazují chelatační vlastnosti. Denní příjem flavonoidů se pohybuje kolem 1–2 g a jsou přijímány převážně prostřednictvím ovoce a zeleniny [157-160]. Vzhledem k jejich příznivému účinku na zdraví je flavonoidům věnována velká pozornost ve farmaceutickém průmyslu. Pomocí flavonoidů jsou obohacovány různé potraviny či doplňky stravy, které napomáhají v boji proti diabetu, kardiovaskulárním onemocněním, rakovině, případně příznakům menopauzy [161]. Flavonoidy bývají ze vzorků extrahovány rozpouštědlem s následnou extrakcí pevnou fází (SPE), lze použít také extrakci kapalina-kapalina nebo Soxhletovu extrakci [161, 162]. Pro kvalitativní stanovení flavonoidů lze použít tenkovrstvou chromatografii [163]. Pro stanovení celkového obsahu flavonoidů v methanolickém nebo ethanolickém extraktu vzorku lze použít také kolorimetrickou metodu, kdy dochází ke vzniku komplexu flavonoidu s chloridem hlinitým [164]. Pro kvantitativní stanovení flavonoidů se nejčastěji využívá chromatografických metod (např. UHPLC-MS/MS [165], LC-DAD [166], HPLC-UV [167], HPLC-ED [168], micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) [169], GC-MS [170], dvourozměrná GC (GC × GC) [171]), lze použít také kapilární elektroforézy (CE) [172]. Flavonoidy snadno podléhají oxidačně-redukčním reakcím s nízkou hodnotou aktivační energie, přičemž snadněji podléhají oxidaci, čímž dojde k jejich znehodnocení [160]. Oxidačně redukční reakce flavonoidů je využíváno v jejich elektrochemickém stanovení. Mezi elektrochemické metody využívané pro stanovení

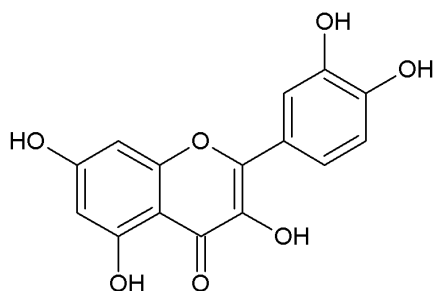
flavonoidů patří coulometrie [173], voltmetrie [174, 175], ale také elektrochemická detekce v chromatografii [176] či biosenzory. Elektroaktivita flavonoidů je spjata s kruhy A a především B a přítomnými fenolickými skupinami. Dalším důvodem elektroaktivity flavonoidů může být delokalizace elektronů ovlivňující radikálové meziprodukty, čímž může docházet ke vzniku několika elektrodoých reakcí. Obecně lze říci, že čím nižší je hodnota potenciálu píku, tím vyšší je schopnost poskytovat elektron do reakce, a čím vyšší je hodnota proudu píku, tím vyšší je rychlost nebo počet přenesených elektronů. Flavonoidy s nižšími hodnotami E_p (např. myricetin +0,300 V, kvercetin +0,330 V, rutin +0,400 V) jsou silnějšími antioxidanty než flavonoidy s vyššími hodnotami E_p [177].



Obrázek 13: Obecná struktura flavonoidů.

5.1.1 Kvercetin

Kvercetin, 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-4H-chromen-4-on (obrázek 14), aglykon rutinu, je nejlépe popsáným flavonoidem. Patří do skupiny flavonolů, jeho nejvyšší obsah lze nalézt v ovoci (jablka, bobulovité plody) a zelenině (brokolice, cibule, petržel). Vyskytuje se převážně ve formě glykosidu (s rhamnosou kvercitrin, isokvercitrin, s rutinovou rutin), který je lépe vstřebatelný [178]. Kvercetin (Q) je přijímán potravou či potravinovými doplňky, následně je absorbován v gastrointestinálním traktu a metabolizován v tenkém i tlustém střevě, játrech a ledvinách pomocí mikroorganismů a enzymů. Kvercetin má nejsilnější antioxidační účinky ze všech flavonoidů, je schopen neutralizovat peroxonitrové a hydroxylové radikály. Působí také antifibroticky, protinádorově, protizánětlivě či antibakteriálně, chrání před projevy osteoporózy, pozitivně působí na kardiovaskulární systém [159, 179-181]. Společně s katechiny přítomnými v čaji je kvercetin schopen regenerovat α -tokoferoxylový radikál na α -tokoferol [157]. V literatuře byl popsán také tzv. kvercetinový paradox, což znamená, že Q má výrazné antioxidační vlastnosti, nicméně v průběhu těchto reakcí vzniká potenciálně škodlivý meziprodukt, kvercetin-chinon [180].



Obrázek 14: Struktura kvercetinu.

Metody stanovení kvercetinu

Pro stanovení Q lze použít metody navržené obecně pro stanovení flavonoidů. Jmenovitě se jedná např. o HPLC s hmotnostní, elektrochemickou nebo UV detekcí, GC-MS, atd. [162, 182-184]. Pro stanovení kvercetinu lze také využít elektrochemických metod. Mechanismus elektrochemické oxidace kvercetinu může probíhat na všech pěti přítomných –OH skupinách. V závislosti na pH a typu prostředí a na pracovní elektrodě lze pozorovat jeden až čtyři oxidační píky v oblastech potenciálů +0,150 V, +0,300 V, +0,600 V a +0,800 V, přičemž první dva oxidační píky jsou nejlépe viditelné v kyselé a neutrální oblasti pH, zbylé dva se objevují pouze jako nepatrné vlny a v alkalické oblasti pH zcela zmizí. Reverzibilní chování prvního z píků je přisuzováno katecholu na kruhu B, kdy se jedná o reakci dvou elektronů a dvou protonů. Ireverzibilní chování druhého píku odpovídá hydroxylové skupině v poloze 3 na kruhu C. Zbylé dva píky jsou výsledkem reverzibilních reakcí hydroxylových skupin v polohách 5 a 7 kruhu A. Výsledný oxidační produkt kvercetinu je schopen se sorbovat na povrch elektrody a tak znepřístupnit její povrch pro další reakci [174]. Kvercetin a jeho tři glykosidy byly identifikovány v extraktu z cibule metodou cyklické voltametrie s využitím GCE v prostředí 0,1 M octanového pufru o pH 5,5 [185]. He et al. zkoumali elektrochemické chování kvercetinu na uhlíkové pastové elektrodě a elektrodě z nanotubic v prostředí octanového pufru o pH 5,5 metodou CV a DPV s prekoncentračním krokem. Došli k závěru, že oxidace Q je dvouelektronový proces s proudovou odezvou v oblasti nízkých potenciálů, kdy významnou roli v proudovém výtěžku hraje právě prekoncentrační krok [186]. K podobným závěrům došli také Jin et al. s použitím grafitové diskové elektrody [187]. Ve studii Aguila-Sánchez et al. byly porovnávány metody stanovení kvercetinu v tabletách Ginkgo biloby pomocí HPLC-ED s elektrochemickou metodou diferenčně pulzní voltametrie. DPV byla provedena ve standardním tříelektrodovém uspořádání, kdy jako pracovní elektrody bylo využito uhlíkového vlákna, uhlíkového vlákna modifikovaného Nafionem nebo uhlíkové pastové elektrody s příměsí polyvinylchloridu

(C-PVC). Odezva kvercetinů byla zaznamenána v oblasti potenciálů +0,430 V až +0,467 V v prostředí 0,1 M methanolického roztoku NaClO₄, přičemž elektroda C-PVC poskytovala nejostřejší píky. Meze detekce pro jednotlivé elektrody byly 6 ng.mL⁻¹ pro uhlíkové vlákno a C-PVC a 3 ng.mL⁻¹ pro uhlíkové vlákno modifikované Nafionem. Elektroda C-PVC se jevila jako nejlepší vzhledem k nejširšímu koncentračnímu lineárnímu rozsahu 96–300 ng.mL⁻¹. HPLC-ED vykazovala LOD 0,5 μg.mL⁻¹ a koncentrační rozsah 10–270 μg.mL⁻¹. Výhodou přímého elektrochemického stanovení kvercetinů ve vzorku je mimo jiné snadná úprava vzorku, kdy na rozdíl od HPLC metody je možné vynechání hydrolyzačního kroku [188, 189]. Uhlíková pastová elektroda s elektrochemicky modifikovaným povrchem byla využita při stanovení Q ve vzorcích čaje a doplňků stravy. Po jednoduché úpravě vzorků a povrchu elektrody (aplikací potenciálu +1,500 V po dobu 2 minut v prostředí 1 M NaOH) byl kvercetin adsorbován na povrch pracovní elektrody (při potenciálu 0 V po dobu 300 s v prostředí BR pufru o pH 3,0) a jeho obsah stanoven metodou SWV. Q poskytoval oxidační pík v oblasti potenciálu +0,450 V s LOD 1,6.10⁻³ μM [190]. Pro stanovení Q v reálných i modelových vzorcích bylo testováno i několik dalších, převážně modifikovaných uhlíkových elektrod, jejichž příklady jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled dalších druhů uhlíkových elektrod pro stanovení kvercetinů.

Typ pracovní elektrody	Literatura
PtNPs/PEDOT-MeOH/GCE	[191]
MIP/MIL-101(Cr)/MoS ₂ /GCE	[192]
LFONR-MWCNT/CPE	[193]
B-CDMCPE	[194]
MIP/GO/GC	[195]
3D-rGA/CILE	[196]
SWCNTs-SCPE	[175]

PtNPs/PEDOT-MeOH/GCE – skelná uhlíková elektroda modifikovaná nanokompozitem platiny; MIP/MIL-101(Cr)/MoS₂/GCE – skelná uhlíková elektroda modifikovaná polypyrolem a organokovovými materiály obsahujícími chrom a disulfid molybdeny; LFONR-MWCNT/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná iontoměničím obsahujícím železo; B-CDMCPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná β-cykloextrinem; MIP/GO/GC – skelná uhlíková elektroda modifikovaná grafenem a polypyrolem; 3D-rGA/CILE – uhlíková elektroda s iontovou kapalinou modifikovaná redukováním grafenem; SWCNTs-SCPE – tištěná uhlíková elektroda modifikovaná SWCNTs.

V naší studii (**příloha 10**) byl Q stanovován ve vzorcích běžně dostupných džusů metodou anodické stripping diferenčně pulzní voltametrie (ASDPV) s použitím pentilkové

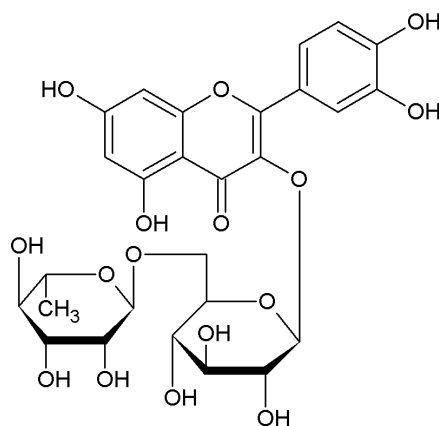
uhlíkové elektrody (PGE). Výhodou tohoto typu elektrody je velice levné pořízení a jednoduchá instrumentace (viz kapitola 2.3). Samotná tuha byla před vlastním měřením podrobena elektrochemické úpravě povrchu aplikací potenciálu +1,450 V po dobu 60 s v prostředí 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 s 0,1 M KCl. Tato modifikace, použitelná také pro další typy uhlíkových elektrod, slouží k oxidaci povrchové vrstvy uhlíku elektrodového materiálu, který se tak stává hydrofilnějším, odpuzuje lipofilní molekuly pojiva a obnažuje hydrofilní povrch neoxidovaného uhlíku. Výsledný hydrofilizovaný povrch PGE je více podobný kompaktním uhlíkovým materiálům, jako např. skelný uhlík, a má lepší sorpční a kinetické vlastnosti, čímž dochází ke zvýšení reverzibility elektrodového děje. Vzhledem k poznatkům v literatuře, kdy kvercetin vykazoval quasireverzibilní oxidačně redukční reakci, byla tato úprava elektrody žádoucí [186, 197].

V práci byla provedena optimalizace rychlosti skenování, pH nosného elektrolytu, akumulčního potenciálu a času. Elektrochemické chování Q na PGE bylo zkoumáno pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 7,0 při různých skenovacích rychlostech (10, 20, 40, 70 a 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Proudové odezvy kvercetinu v oblasti potenciálu +0,370 V lineárně rostly se zvyšující se rychlostí skenování, z čehož lze usuzovat, že elektrodová reakce je závislá na adsorpci látky na povrchu elektrody (**příloha 10**, obrázek 2). Při optimalizaci pH elektrolytu bylo zjištěno, že ovlivňuje jak výsledný potenciál píku, tak velikost proudové odezvy Q. K optimalizaci pH metodou ASDPV byla použita upravená PGE v prostředí BR pufru o pH 2,0–8,0. Potenciál píku Q se se zvyšujícím se pH posouval směrem k negativnějším hodnotám, proudová odezva Q byla zaznamenána nejvyšší v oblasti pH 3,0 při potenciálu +0,370 V. Při pH 8 a vyšší nebyl oxidační pík kvercetinu zaznamenán. Potenciál a doba jeho aplikace na PGE pro akumulaci analytu na povrchu předem upravené PGE byl také optimalizován. Nejvyšší proudová odezva kvercetinu ($23,917 \pm 1,04 \mu\text{A}$) byla zaznamenána pro akumulční potenciál 0,1 V (testovány byly potenciály -0,1, 0, 0,1, 0,2 a 0,3 V) aplikovaném na PGE po dobu 120 s v prostředí BR pufru o pH 3. Při tomto potenciálu byla také optimalizována doba jeho působení. Hodnota proudu se lineárně zvyšovala do doby akumulace 120 s. Při delší době nebyla zaznamenána vyšší hodnota I_p , pravděpodobně z důvodu obsazení celého povrchu PGE analytem a tedy ztrátě schopnosti sorbovat na povrch další analyt. Podle naměřených dat byla tedy vybrána akumulční doba analytu 120 s, kdy byla zaznamenána nejvyšší hodnota I_p ($23,917 \pm 1,17 \mu\text{A}$). Pro stanovení kvercetinu byly jako vzorky použity extrakty džusů z černého rybízu a brusinek. Vzorek byl připraven odstředěním po dobu 20 minut při $2650 \times g$ (Nüve, Ankara, Turecko) s následnou extrakcí supernatantu tuhou fází (kolonky Strata®, C18-E, 55 μm , 70 Å; Phenomenex, Torrance, CA, USA) do 2 ml

methanolu. Pro měření bylo odebíráno 50 μL extraktu do nosného elektrolytu (0,1 M BR pufr o pH 3,0) v elektrodové měřící cele. Tato úprava vzorku před vlastní analýzou je nezbytná vzhledem k přítomnosti sedliny a barevných látek ve vzorcích, které zapříčiňují výrazné zvýšení pozadí proudu a tak zhoršení proudové odezvy Q a její odečet. Pro stanovení obsahu Q ve vzorcích byla použita metoda kalibrační křivky. Lineární rozsah metody byl 0,001 až $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ s LOD $3,0 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. V porovnání s jinými voltametrickými stanoveními Q s využitím jiných typů elektrod bylo dosaženo dobrých výsledků. Přestože např. při použití GCE modifikované grafenem bylo dosaženo většího lineárního rozsahu, je tato metoda stále výhodná svou jednoduchostí, cenou a rychlostí přípravy pracovní elektrody.

5.1.2 Rutin

Molekula rutinu (obrázek 15) (3,3',4',5,7- pentahydroxyflavon-3-ramnoglukosid) se skládá z kvercetinu a disacharidu rutinovy v poloze 3, jedná se o glykosid kvercetinu [198, 199]. Patří mezi flavonoly, přirozeně se vyskytuje v ovoci, bramborách, cibuli, rajčatech, v pohance, bylinných nápojích a čajích. Rutin (R) je doporučován pro diabetiky, funguje jako inhibitor absorpce sacharidů ve střevech, stimuluje tvorbu inzulínu, zvyšuje vstřebávání cukrů do tkání [200, 201]. Má schopnost vázat hydroxylový, peroxylový a superoxidový radikál [202], působí protirakovinně [203], antimikrobiálně [204]. Významný účinek prokázal rutin jako antitrombotikum [205]. Denní příjem rutinu se pohybuje v závislosti na stravovacích návycích mezi 1,5–70 mg/kg váhy za den [206, 207]. Pro fortifikaci potravin a potravinářských doplňků rutinem byla navržena metoda zapouzdření do fosfatidylcholinu pro usnadnění rozpustnosti a biologické dostupnosti [202].



Obrázek 15: Struktura rutinu.

Metody stanovení rutinu

Stanovení rutinu lze provést několika metodami, podobně jako ostatní flavonoidy (kolorimetrická metoda s chloridem hlinitým [208], vysoko účinná tenkovrstvá chromatografie HPTLC [209], HPLC-DAD [210], HPLC-UV [211], UHPLC-ESI-MS/MS [212], a další). Pro elektrochemické stanovení rutinu bylo také navrženo několik metod s využitím různých typů elektrod a jejich modifikací. Byla navržena metoda stanovení rutinu pomocí SWV s použitím tištěné uhlíkové elektrody modifikované grafenem a zlatými nanočásticemi (GPH-AuNP/CSPE). Rutin na této elektrodě vykazoval v prostředí octanového pufru o pH 5,0 v CV quasireverzibilní dvouelektronovou oxidačně redukční reakci řízenou adsorpcí s potenciálem oxidačního píku +0,440 V a redukčního +0,220 V, což odpovídá reakci katecholu na kruhu B [213]. Podobného principu modifikace bylo využito ve studii Niu et al. V tomto případě byl zlatými nanočásticemi s grafenem modifikován povrch akupunkturní jehly z nerezové oceli. V prostředí fosfátového pufru o pH 5,5 byla metodou CV zaznamenána oxidačně redukční reakce s potenciály píků +0,379 V a +0,313 V. Výsledky obou výše zmíněných metod jsou si velice podobné a shodují se s navrhovaným mechanismem reakce rutinu na uhlíkových elektrodách [214]. Další z testovaných elektrod byla elektroda zlatá, modifikovaná SWCNTs. V prostředí 0,1 M fosfátového pufru o pH 5,0 vykazoval rutin na SWCNTs/Au elektrodě v CV rovněž adsorpcí řízené quasireverzibilní chování ($2 e^-/2 H^+$) s anodickým píkem v oblasti +0,375 V a katodickým při potenciálu +0,328 V. Vlastní stanovení obsahu rutinu v potravinových doplňcích bylo provedeno metodou SWV s adsorpcí analytu na povrch SWCNTs/Au elektrody po dobu 210 s při 0 V. Metoda vykazovala lineární rozsah $2,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ až $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ s LOD $1,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ [215]. Skelná uhlíková elektroda, jako jedna z nejčastěji používaných uhlíkových elektrod, byla pro stanovení rutinu také testována. V prostředí fosfátového pufru o pH 6,0 metodou DPV byl registrován pík rutinu při +0,300 V, podobně jako v předchozích studiích na jiných typech elektrod [216]. Uhlíkové pastové elektrody byly pro stanovení rutinu také využity. Standardní CPE byla použita pro stanovení rutinu metodou AdDPV, kdy v prostředí BR pufru o pH 5,0 byly detekovány oxidační píky rutinu v oblasti +0,380 V [217]. Mezi relativně časté modifikace CPE pro stanovení rutinu patří modifikace pomocí iontové kapaliny (IL/CPE). Rutin na CPE s 1-amyl-3-methylimidazolium bromidem v prostředí BR pufru o pH 3,29 poskytoval v CV oxidační pík při +0,502 V a redukční při potenciálu +0,447 V. V porovnání se standardní CPE byly proudové výtěžky mnohem vyšší, a to i v případě SWV, což naznačuje urychlení přenosu náboje na IL/CPE. Metoda byla aplikována pro stanovení rutinu metodou SWV v potravinových

doplňcích s lineárním rozsahem koncentrací $4,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ až $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ s LOD $1,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ [218]. Velice podobných výsledků bylo dosaženo ve studii Sun et al. Zde byla pro modifikaci CPE použita iontová kapalina na bázi pyridinia, která v CV v prostředí 0,1 M fosfátového pufru o pH 2,5 poskytovala oxidační pík rutinu při potenciálu +0,512 V a redukční při 0,448 V. Lineární rozsah této metody byl stanoven v rozmezí $5,0 \cdot 10^{-7}$ až $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ s LOD $3,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ [219].

V naší studii (**příloha 11**) zaměřené na stanovení rutinu byla použita CPE modifikovaná silikagelem (SG) pro zvětšení povrchu elektrody. Pro zhodnocení chování elektrody byla použita metoda CV s podmínkami $E_{\text{start}} = 0,0 \text{ V}$, $E_{\text{zvr}} = +1,0 \text{ V}$, $E_{\text{end}} = -0,1 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $sr = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, pro stanovení rutinu pak SWV ($E_{\text{start}} = -0,1 \text{ V}$, $E_{\text{end}} = +0,7 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $sr = 25 \text{ mV.s}^{-1}$, $f = 1 \text{ Hz}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$). Obsah silikagelu v pastě byl optimalizován. Metodou CV bylo testováno chování CPE s obsahem 0, 5, 10, 15, 20 a 25 % SG. Na základě nejvyšších proudových výtěžků pro rutin byla pro další měření vybrána CPE s obsahem SG 15 %. Pro optimalizaci metody bylo dále použito několika elektrolytů, jmenovitě 0,1 M HCl a řada BR pufrů o pH 1,0 až 10,0. Po statistickém vyhodnocení naměřených dat (dvoufaktorová analýza rozptylu ANOVA) byla pro další měření vybrána jako nejvhodnější elektrolyt 0,1 M HCl a to proto, že vybraná CPE s 15 % SG poskytovala v tomto prostředí nejvyšší proudové odezvy rutinu (CV: oxidační pík při +0,545 V, redukční pík při +0,500 V, SW: oxidační pík v oblasti potenciálu +0,530 V). Z výsledků měření CV i SWV je také patrné, že s rostoucím pH se snižovaly proudové výtěžky a potenciál ox.-red. píků rutinu se posunoval směrem k zápornějším hodnotám. Lineární závislost potenciálů píků na pH elektrolytu naznačuje, že poměr vyměňovaných protonů a elektronů v reakci byl 1:1, což odpovídá již dříve navrženému mechanismu elektrodové reakce rutinu ($2 \text{ e}^-/2 \text{ H}^+$). Vzhledem ke skutečnosti, že rutin je glykosidem kvercetinu, a také s přihlédnutím k faktu, že oba tyto flavonoidy bývají v reálných vzorcích přítomny společně, bylo provedeno zhodnocení interference Q na stanovení R. Kvercetin v prostředí 0,1 M HCl s využitím CPE modifikované silikagelem poskytoval pík ve stejné oblasti potenciálů, tedy kolem +0,500 V, jako rutin. Pro stanovení rutinu v přítomnosti kvercetinu bylo proto použito jako elektrolytu BR pufru. Proudové odezvy rutinu na CPE/15SG v prostředí BR pufru byly nejvyšší při pH 2 a 3, přičemž rozdíly mezi nimi nebyly statisticky významné. V měření interferencí Q bylo nicméně použito BR pufru o pH 3, a to z toho důvodu, že rutin v tomto prostředí poskytoval strmější lineární závislost v porovnání s BR pufrům o pH 2 (**příloha 11**, obrázek 4). Interference Q na stanovení rutinu byla měřena metodou SWV vždy s konstantním obsahem rutinu $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. V prostředí BR pufru o pH 3 poskytoval rutin

oxidační pík při +0,480 V, kvercetin pak oxidační pík při +0,395 V. V případě, že byly v roztoku přítomny obě látky, docházelo ke spojení obou píků v jeden se dvěma oxidačními vrcholy, které byly oba posunuty k zápornějším hodnotám v porovnání s E_p čistých látek. Statistickým vyhodnocením závislostí kalibračních přímek rutinu v přítomnosti různého obsahu kvercetinu bylo zjištěno, že již přítomnost $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ Q ovlivňuje stanovení R. Toto se projevilo na snížení meze detekce, kvantifikace i na směrnících přímek. Závěrem lze říci, že přestože oba vybrané flavonoidy samostatně poskytovaly ve vhodně zvoleném prostředí na CPE/SG píky s rozdílnými E_p , byly-li ve vzorku přítomny oba, vzájemně se ovlivňovaly a ztěžovaly odečet I_p i E_p pro jednotlivé analyty (**příloha 11**, obrázek 8). Z tohoto důvodu se CPE/SG nejeví jako vhodný nástroj pro stanovení R v přítomnosti Q.

5.2 Stanovení oxidační stability jedlých tuků a olejů

Řepkový olej je vyráběn z rostliny brukve řepky olejky (*Brassica napus L.*). Tato rostlina zaujímá významnou část zemědělské produkce nejen v České republice (394 tis. ha pro rok 2017 [220]). Celorepubliková produkce řepky olejky není zpracována pro potravinářské účely, významná část je určena pro výrobu biopaliv a pro vývoz do zemí EU. Nicméně většina všech pěstovaných olejnatých plodin je zpracována pro výrobu oleje, přičemž asi jedna šestina celkové produkce je určena jako krmivo nebo pro další setí či pro jiné účely [221-223]. Semena řepky obsahují asi 45 % oleje, který je získáván převážně lisováním, lze však použít také extrakčních technik. Metoda extrakce oleje z olejnatých semen ovlivňuje nejen vlastnosti a složení finálního produktu, ale také zbylých pokrutin, které jsou používány jako krmivo. Krmné pokrutiny pak ovlivňují další produkty, jako je maso nebo mléko [223-225]. Olejnatá semena lze dlouhodobě skladovat při vlhkosti do 7,5 %. Základem získávání rostlinných olejů ze semen olejnatých rostlin je obecně čištění semen od různých příměsí pomocí série sít, odsávačů, odkamenačů a magnetů, loupání, následná extrakce oleje ze semen a rafinace extraktu. Řepkový olej je třetím nejvíce vyráběným jedlým olejem. Vyznačuje se svým složením, má nejvýhodnější poměr ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, nejnižší obsah nasycených mastných kyselin v porovnání s ostatními rostlinnými oleji a nejvyšší obsah fenolických látek [226]. Rostlinné oleje snadno podléhají oxidaci, jejímž produktem jsou aromatické sloučeniny, které dodávají oleji nepříjemnou chuť a vůni, a radikály. Tento oxidační proces je označován jako žluknutí. Rychlost oxidace olejů je závislá na druhu a složení oleje, skladovacích a výrobních podmínkách (teplota, přístup vzduchu a světla), obsahu antioxidačních látek a kovových iontů, ale také na metodě získávání oleje ze semen. Za náchylnost k oxidaci jsou v olejích zodpovědné mastné kyseliny (MK) vázané do triacylglycerolů (TAG). MK jsou rozkládány na produkty, které narušují jak senzoryckou, tak nutriční hodnotu oleje. Samotný proces oxidace TAG probíhá štěpením dvojných vazeb MK za vzniku primárních produktů – hydroxyperoxidů, bez chuti či zápachu. Tyto primární produkty oxidace jsou však nestabilní, vznikají tak sekundární produkty. Sekundární produkty oxidace TAG jsou aldehydy, ketony, estery, alkoholy a další. Hydroxyperoxydy vznikají autooxidací, fotooxidací nebo enzymaticky. Mechanismus těchto typů oxidací je podobný, liší se druhem vznikajících radikálů.

Pro zhodnocení stupně oxidace oleje lze použít několika metod, jmenovitě senzoryckou analýzu, která je považována za nejdůležitější, stanovení hodnoty peroxidového a p-anisidinového čísla nebo hodnoty Totox. Peroxidové číslo (PV) udává obsah peroxidu ve

vzorku, tedy primárních produktů oxidace, a tak poukazuje na stupeň oxidace oleje. Principem stanovení PV je rozpuštění vzorku tuku v chloroformu s přidavkem kyseliny octové a nadbytku jodidu draselného s následnou titrací vzniklého jodu odměrným roztokem thiosíranu sodného. p-anisidinové číslo (AV) naopak udává obsah aldehydů, sekundárních produktů oxidace, které reagují s anisidinem za vzniku barevných produktů, jejichž absorbance je měřena při 350 nm. Hodnota AV je důležitým ukazatelem pro zhodnocení celkové kvality a průběhu výroby a distribuce oleje a to z toho důvodu, že sekundární oxidační produkty jsou jen těžce odstranitelné. Hodnota Totox je vypočítána podle rovnice $AV + 2 PV$ a udává celkový oxidační stav oleje. Čím nižší je tato hodnota, tím kvalitnější je olej. Primární produkty oxidace lipidů lze detekovat také polarograficky, chemiluminiscenčně či pomocí HPLC. Sekundární oxidační produkty jsou často stanovovány pomocí HPLC s UV detekcí po derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Pro stanovení obsahu těkavých sekundárních oxidačních produktů lze použít také GC [227-229]. Výše uvedené metody vyjadřují aktuální stupeň oxidace tuků. Pro zhodnocení oxidační stability tuků v čase je potřeba měřit charakteristické oxidační produkty v různých časových intervalech za různých teplot. Původní test oxidační stability oleje je založen na skladování oleje při $63 \pm 0,5$ °C v otevřené nádobě a průběžné sensorické kontrole a stanovení PV. Nevýhodou je doba testu od 4 do 8 dní. Další metodou pro stanovení oxidační stability je metoda AOM (*Active Oxygen Method*), která je založená na probublávání oleje vzduchem při teplotě 98 °C a jako ukazatel oxidace je měřena hodnota PV. Na podobném principu funguje pro tyto účely často využívaný přístroj Rancimat od firmy Methrom. Metoda je založena na řízené oxidaci oleje urychlené zvýšenou teplotou a přístupem vzduchu ke vzorku s následnou detekcí sekundárních těkavých produktů oxidace. Tyto těkavé látky jsou hromaděny v zásobníku destilované vody, čímž dojde ke změně její vodivosti. Nevýhodou je právě urychlení oxidace, která tak neprobíhá naprosto stejně jako v případě standardního skladování oleje. Metodou Rancimat bylo např. zjištěno, že řepkový olej by měl být stabilní 200 dní při 20 °C. Pro stanovení oxidační stability je Rancimat často využíván [227, 230-232]. Měření spekter v blízké a vzdálené infračervené oblasti s detekcí specifických pásů hydroxyperoxidů lze také použít pro zhodnocení oxidační stability olejů [233, 234]. V posledních letech se rozvíjí testování metod založených na HPLC pro detekci oxidačních produktů [235]. Nevýhodou chromatografických technik je vedle jejich ekonomické a časové náročnosti také fakt, že v průběhu oxidace olejů dochází ke vzniku velkého množství různých produktů, jejichž chromatografické píky často splývají. Vzhledem

k množství produktů je pro zhodnocení oxidace často využíváno také instrumentální analytických technik ve spojení s chemometrií [236, 237].

Relativní novinkou v analýze těkavých látek v různých odvětvích včetně potravinářského průmyslu je použití tzv. elektronických nosů (EN) a jazyků (ET). Elektronické nosy a jazyky jsou ve své podstatě souborem elektrických a chemických senzorů, které individuálně měří různé vlastnosti (vodivost, proud, odpor, apod.) těkavých sloučenin a jednotlivé výsledky poté společně zpracuje matematickými a statistickými metodami. Elektronické jazyky jsou podobné EN, hlavním rozdílem je skupenství vzorku. Jak již názvy metod napovídají, pro EN jsou vzorky v plynné fázi, kdežto pro ET ve fázi kapalné. ET je kalibrován na pět základních chutí, které každá vykazují specifické složení. Dalším rozdílem mezi EN a ET je složení senzorů. ET mohou obsahovat senzory voltametrické či potenciometrické, dále lze využít konduktometrických, piezoelektrických a dalších. Pomocí EN byla například zkoumána kvalita semen řepky v průběhu skladování [238]. EN byl také aplikován pro určení zeměpisného původu, pro zhodnocení kvality a detekci falšování olejů, a v neposlední řadě také pro detekci sekundárních oxidačních produktů. Elektronické nosy pravděpodobně nenahradí běžné analytické metody používané pro zhodnocení kvality a oxidační stability olejů. Mohou se nicméně v budoucnu stát nástrojem pro předběžné zhodnocení jistých parametrů a tím snížit náklady na analytická stanovení v laboratořích tak, že by byly analyzovány jen ty vzorky olejů, u kterých by bylo podezření na nežádoucí změny [239]. Potenciometrický ET byl aplikován pro detekci fenolických a těkavých látek v olivových olejích, případně pro prokázání falšování nebo detekce tepelného či mikrovlnného záhřevu [240-244]. Voltametrický ET byl použit pro identifikaci a rozlišení druhů olejů. Jako pracovní byla použita platinová mikroelektroda. CV byla provedena přímo ve vzorku oleje s přidavkem fosfoniových iontových kapalin pro zlepšení vodivosti. Pro jednotlivé oleje byly zhodnoceny oblasti CV jako „otisku prstu“ a statisticky vyhodnoceny. Z analýzy vyplývá, že tuto metodu lze použít pro klasifikaci a zjištění původu olejů [245].

Elektrochemické metody nalézají využití při analýze olejů převážně pro detekci a stanovení obsahu syntetických i přírodních antioxidačních a fenolických látek v nich obsažených [246-254]. Okrajově je možné použití Clarkovy kyslíkové elektrody pro stanovení rozpuštěného kyslíku [255]. V literatuře lze však zřídka nelézt studie týkající se detekce a stanovení primárních oxidačních produktů degradace olejů. Adhoum et al. (2008) aplikovali skelnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou pruskou modří pro detekci hydroperoxidů ve vzorcích rostlinných olejů. Metoda je alternativou k titračnímu stanovení peroxidového čísla [256]. SWV byla použita pro určení typu oleje a zhodnocení

jeho oxidačního stavu. Pro tyto účely byla testována zlatá a platinová disková elektroda v prostředí 0,1 M NaOH a CH₃COOH. Po optimalizaci podmínek úpravy a typu elektrody, podmínek SWV a vhodného elektrolytu, byly výsledky podrobeny statistické analýze. Jako vzorky byly testovány různé řepkové, slunečnicové, sójové a kukuřičné olej. Druhové rozlišení olejů nebylo navrhovanou metodou doporučeno, pouze rozlišení oxidovaných a neoxidovaných vzorků [257]. Jedlé rostlinné oleje byly využity jako pojivo CPE ve studii Apetrei et al. (2005) [258]. Autoři se pokusili rozlišit jednotlivé druhy olivových olejů a odlišit olivový olej od slunečnicového. V práci bylo využito metody CV a SWV a experimenty byly provedeny v prostředí 0,1 M HCl. Tento elektrolyt byl vybrán vzhledem k nejvyšším proudovým výtěžkům. Bylo zjištěno, že takto lze rozlišit olivový olej od slunečnicového díky přítomnosti oxidačního píku v oblasti potenciálu +0,600 V. Odpovídající redukční pík byl v CV zaznamenán v oblasti +0,230 V. Potenciály píků se lišily v závislosti na použitém elektrolytu (HCl, H₂SO₄, KCl, MgCl₂, PBS pH 4,0, LiClO₄, KClO₄) a jsou přisuzovány přítomnosti velkého množství fenolických látek v olivových olejích. Z výsledků SWV bylo také možné určit, zda se jedná o olivový olej extra panenský, panenský, dezodorizovaný panenský nebo rafinovaný. Metoda CV s GCE byla použita pro stanovení „otisku prstu“ olivových, slunečnicových a kukuřičných olejů. Vzorek byl rozpuštěn v dichlormethanu a analyzován v prostředí 0,1 M LiClO₄ v EtOH. Pomocí chemometrického zpracování naměřených dat lze rozlišit příměsi v olejích, pomocí samotné CV lze jednoduše rozlišit extra panenský olivový olej od ostatních díky vysokému obsahu fenolických látek [259]. Elektrochemickými metodami (CV, SWV nebo ET) bylo možné odhalit obsah cizího oleje okolo 2 %.

Stanovení oxidační stability řepkového oleje metodou CV s použitím CPE jsme se věnovali v naší práci (**příloha 12**). Metoda je založena na modifikaci CPE samotným vzorkem oleje, podobně jako ve studii Apetrei et al. (2005) [258]. Elektroda byla připravena smícháním 0,5 g uhlíkového prášku (CR-5, Maziva Týn n. L. s. r. o., Česká republika) se 140 µL vzorku řepkového oleje. Jako vzorky byly použity tři druhy oleje. Dva vzorky byly standardně komerčně dostupné, zakoupené v maloobchodní síti (Billa spol. s r. o., Praha; Lidl Holding s.r.o., Praha, Česká republika). Třetí vzorek byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich spol. s.r.o. (Praha, Česká republika) a není určen pro lidskou spotřebu. Po otevření bylo z každého vzorku odebráno 150 mL do skleněné kádinky a vzorek oleje byl ponechán stát při laboratorní teplotě za přístupu vzduchu a denního světla po dobu 40 dní. Po 0, 7, 28 a 40 dnech bylo u každého vzorku provedeno stanovení peroxidového a p-anisidinového čísla, z jejichž výsledků byla poté vypočtena hodnota Totox. Rovněž byla

z každého ze vzorků připravena uhlíková pasta a provedeno měření CV (příloha 12, obrázek 2). Pro elektrochemické stanovení bylo optimalizováno pH elektrolytu (0,1 M HCl a 0,4 M BR pufr o pH 3,0, 7,05 a 10,05). Podmínky CV byly $E_{\text{start}} = 0 \text{ V}$, $E_{v1} = -0,200 \text{ V}$, $E_{v2} = 1,0 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 25,0 \text{ mV}$. Anodické oxidační vlny se vyskytovaly v oblasti potenciálů +0,575 V až +0,600 V, katodické redukční vlny v oblasti +0,400 V do +0,425 V. Je známo, že se zvyšujícím se pH dochází k výraznému posunu signálů různých fenolických látek. Bylo pozorováno vymizení oxidačně redukční odezvy při pH vyšším než 3,0. Z tohoto důvodu byla pro další měření zvolena jako elektrolyt 0,1 M HCl o pH 1,0. Toto bylo také náznakem toho, že oxidačně redukční odezvy nebyly výsledkem pouze reakcí fenolických látek přítomných ve vzorku. Se zvyšující se dobou oxidace vzorků se zvyšovaly proudové odezvy oxidačně redukčních reakcí na CPE. Získaná data byla poté statisticky vyhodnocena s použitím programu Origin Pro software s použitím Spearmanova korelačního koeficientu (r). Pro proudové odezvy a hodnoty AV nebyla zjištěna žádná závislost. Toto souvisí s faktem, že AV udává hodnotu sekundárních produktů oxidace, jejichž obsah se mění s časem, a je tedy ukazatelem momentálního stupně oxidace oleje. Pro hodnoty PV pro jednotlivé vzorky v průběhu času a odpovídající proudové odezvy anodických a katodických oxidačně redukčních vln byly nalezeny jisté korelace, nicméně ne nijak významné (hodnoty pro I_a : $r = 0,321$, $p = 0,508$, pro I_c : $r = 0,412$, $p = 0,516$). Pro hodnoty Totox vypočtené z PV a AV a odpovídající data ze záznamů CV byla nalezena pozitivní korelace (pro I_a $r = 0,894$ a $p < 0,001$, pro I_c je $r = 0,914$ a $p < 0,001$). Pozorované posuny hodnot potenciálů pík nevykazovaly žádnou korelaci. Přestože byly nalezeny souvislosti mezi hodnotou Totox a I_p , nebylo možné je matematicky popsat a aplikovat na všechny vzorky řepkového oleje. Z tohoto důvodu byla data vyhodnocena pro každý vzorek zvlášť, přičemž každý jeden z nich vykazoval lineární korelaci jak pro Totox a I_a , tak pro I_c .

5.3 Přílohy ke kapitole 5

Příloha 10

Vu DV., Žabčíková S., Červenka L., Ertek B., Dilgin Y., *Sensitive voltammetric determination of natural flavonoid quercetin on a disposable graphite lead*, Food Technology and Biotechnology, 53 (4), p. 379 – 384, 2015, doi: 10.17113/ftb.53.04.15.4176.

Příloha 11

Žabčíková S., Sýs M., Červenka L., Benešová-Balvínová M., *Stanovení rutinu s využitím uhlíkové pastové elektrody modifikované silikagelem*, Sborník příspěvků z Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII., Ovčárna pod Pradědem, str. 157 - 165, 2017, ISBN 978-80-7560-005-9.

Příloha 12

Žabčíková S., Červenka L., *Modified carbon paste electrode as a tool for the evaluation of oxidative stability of rapeseed oil*, Potravinářstvo, 9 (1), p. 347 – 351, 2015, doi:10.5219/432.

Příloha 10

Sensitive Voltammetric Determination of Natural Flavonoid Quercetin on a Disposable Graphite Lead

Dai Long Vu¹, Simona Žabčíková¹, Libor Červenka^{1*}, Bensu Ertek² and Yusuf Dilgin²

¹University of Pardubice, Studentska 573, CZ-53210 Pardubice, Czech Republic

²Canakkale Onsekiz Mart University, Mart University 18, TR-17100 Canakkale, Turkey

Received: March 18, 2015

Accepted: July 8, 2015

Summary

In this paper, a pencil graphite electrode was pretreated using chronoamperometry technique in phosphate buffer solution (pH=7.0) for sensitive determination of quercetin. Oxidation of quercetin was investigated using pretreated pencil graphite electrode and anodic stripping differential pulse voltammetry. Under optimal conditions, the anodic current of quercetin exhibited linear response to its concentration in the range from 0.001 to 1.5 $\mu\text{mol/L}$ with the limit of detection of $0.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/L}$. The proposed method was successfully applied for the determination of quercetin in cranberry and blackcurrant juices with recovery rate from 93.2 to 94.7 %. Solid-phase extraction was found to be necessary prior to voltammetric determination of quercetin in fruit juice samples using pretreated pencil graphite electrode.

Key words: pencil graphite electrode, voltammetry, quercetin, fruit juices

Introduction

Quercetin is one of the flavonoids of great importance due to its strong antioxidant effect that can be attributed to the high numbers of hydroxyl functional groups and to its conjugated orbitals by which quercetin is able to donate electrons or hydrogens (1). Besides their important biological roles in plant pigmentation, flavonoids possess anticancer, antiviral and anti-inflammatory properties, which are the consequence of their affinity to proteins and their antioxidant properties. They are well known for their antioxidant abilities and hold promise for preventing age-related diseases, including heart disease and cancer (2,3). These health-related effects make the determination of quercetin of great importance. Separation methods predominate as an analytical tool for determination and quantification of flavonoids including liquid chromatography, thin-layer chromatography and electrophoresis (4) together with gas chromatography (5), spectroscopic (6) and electrochemical methods (7). Compared with these methods, electrochemical techniques have

some advantages such as high sensitivity, accuracy, simplicity, low costs and the possibility of miniaturisation. Among electroanalytical techniques, voltammetry is the most frequently used for the determination of readily oxidized species in food and pharmaceutical preparations (8). Various kinds of electrode materials, including platinum (9–11), gold (12), glassy carbon (13–18), carbon paste (19–27) or graphene oxide-based (28–30) electrodes, have been successfully used for the study of the electrochemical behaviour of quercetin. Some of them have been proposed for determination of quercetin in real food and beverage samples such as fruits, fruit juices and tea samples (20–31).

Quercetin is well known for its use as a redox mediator in carbon-based electrodes to enhance the electrocatalytic oxidation of some organic compounds such as dopamine (31), tyramine (32) or NADH (33). When compared with other carbon-based electrodes, pencil graphite electrodes have some advantages such as high electrochemical reactivity, commercial availability, good mechanical

*Corresponding author: Phone: +420 466 037 718; Fax: +420 466 037 068; E-mail: libor.cervenka@upce.cz

rigidity, disposability, renewability, low cost, low technology and ease of modification. Due to these useful and important characteristics, scientists have focused on the usage of pencil graphite electrodes for phenolic compound analysis (34–37). In this paper, we describe a simple and rapid method for the determination of quercetin using a pretreated pencil graphite electrode.

Materials and Methods

Reagents and equipment

All the reagents including quercetin (99.9 % purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Deionised water was used in this study ($G \leq 0.055 \mu\text{S}$). If necessary, dissolved oxygen was removed from the solutions by purging them with argon for 15 min (purity 99.99 %; Linde Technoplyn, Prague, Czech Republic).

A solution of quercetin (10^{-3} mol/L) was freshly prepared with absolute ethanol and kept in a dark bottle during the experiments. Britton-Robinson buffer (BRB; 0.1 M) solution was used as supporting electrolyte. A three-electrode system consisting of pencil graphite working electrode, Ag/AgCl/3.0 M KCl reference electrode and platinum wire (counter electrode) connected to a potentiostat (PalmSens, Ivium Technologies, Utrecht, The Netherlands) was used for electrochemical measurement. Pencil graphite lead with a diameter of 0.5 mm was obtained from A. W. Faber Castell, Prague, Czech Republic. A mechanical pencil (Rotring, Hamburg, Germany) was used as a holder for graphite lead in this study. Electrical contact was obtained by wrapping a metallic wire around the metallic part of the holder. For each individual measurement, a new graphite lead (fresh surface) was used with total of 10 mm of length immersed into the working solution. The term 'disposable' reflects the ability of the graphite lead to be used for one definite voltammetric measurement (regardless of the number of cycles) until the fouling of the lead surface occurs.

The preparation of the pretreated pencil graphite electrode

Pretreated pencil graphite electrodes were prepared by a chronoamperometric technique described in our previous study (37). The surface of pencil graphite electrode was pretreated by applying a potential of 1.45 V for 60 s in the supporting electrolyte (0.1 mol/L of phosphate buffer solution containing 0.1 mol/L of KCl, pH=7.0). After the pretreatment, the pencil graphite electrodes were used for the determination of quercetin using anodic stripping differential pulse voltammetry (ASDPV; potential range: 0–0.8 V, potential step: 25 mV, potential pulse: 25 mV, pulse time: 0.05 s, and scan rate: 100 mV/s). The effect of pH, accumulation potential and accumulation time were optimised. All of the pencil graphite electrodes were treated directly before each measurement.

Sample preparation

Blackcurrant and cranberry juices were purchased on the local market and stored at refrigerated temperature prior to analysis. The preparation of the sample consisted

of centrifugation at $2650 \times g$ (Nüve, Ankara, Turkey) for 20 min followed by solid-phase extraction of 10 mL of the supernatant using solid-phase extraction columns Strata® C18-E (55 μm , 70 Å; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The target analyte was collected in 2 mL of methanol, then 50- μL aliquot was added to supporting electrolyte and measured. Any statistical differences were computed using a Student's *t*-test at the probability level $p=0.05$ (OriginPro v. 9; OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Results and Discussion

The effect of pretreatment on the oxidation of quercetin

The responses of quercetin oxidation on the pretreated and bare pencil graphite electrode obtained using ASDPV technique in a BRB at pH=3.0 were compared. As can be seen in Fig. 1, the oxidation peak was obtained at the potential of 0.375 V using both pretreated pencil graphite electrode ($(24.07 \pm 0.25) \mu\text{A}$) and bare pencil graphite electrode ($(10.03 \pm 0.12) \mu\text{A}$) in the presence of 1.2 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin ($p < 0.01$). Since the highest signal of quercetin oxidation was observed on the pretreated pencil graphite electrode, it was used in further experimental procedures. The oxidation of 3',4'-dihydroxybenzoic moiety occurs at the potential of 0.375 V, as was confirmed in other studies (9,13,18,20,27).

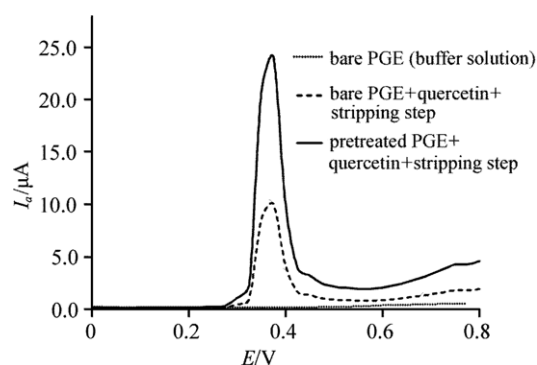


Fig. 1. Anodic stripping differential pulse voltammetry curves of 1.2 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin using bare pencil graphite electrode (PGE) and pretreated PGE in Britton-Robinson buffer (pH=3.0) accumulated at 0.1 V for 120 s (potential range from 0.0 to 0.8 V, potential step 25 mV, potential pulse 25 mV, pulse time 0.05 s and scan rate 100 mV/s). Bare PGE response in buffer solution served as control

The effect of the scan rate on the oxidation of quercetin

The electrochemical behaviour of pretreated pencil graphite electrode was investigated by recording differential pulse voltammetry in a BRB solution (pH=7.0) at various scan rates in the presence of 10^{-5} mol/L of quercetin. As indicated in Fig. 2, the oxidation currents increased linearly with the scan rate (Fig. 2, inset a), giving the following equation:

$$I_a = 0.012v + 0.059 \quad (R^2 = 0.996) \quad /1/$$

where I_a is the oxidation current (μA), v is the scan rate (mV/s) and R^2 represents the coefficient of determination.

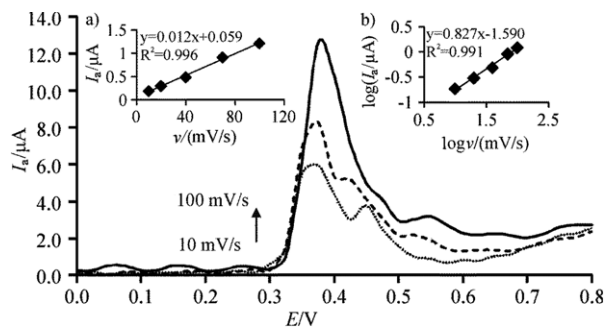


Fig. 2. Differential pulse voltammetry at various scan rates (from 10 to 100 mV/s) in the presence of 1.0 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin in Britton-Robinson buffer at pH=7.0. Inset: a) the oxidation current of quercetin at various scan rates, b) the plot of $\log I_a$ vs. $\log v$, where I_a is oxidation current (μA) and v is the scan rate (mV/s). Potential range from 0.0 to 0.8 V, potential step 25 mV, potential pulse 25 mV, pulse time 0.05 s

This finding indicates that the electrochemical process of quercetin on pretreated pencil graphite electrode was surface controlled. Also, a plot of the logarithm of the peak current (μA) vs. the logarithm of the scan rate (mV/s) was examined. This relationship was found to be linear with a slope of 0.827 (Fig. 2, inset b). The value of the slope is close to the theoretical value of 1.0 of the adsorbed compound (38). Moreover, another oxidation peak at 0.450 V appeared at low scan rates (up to 50 mV/s) using both bare and pretreated pencil graphite electrodes (Fig. 2). Sokolová *et al.* (13) claimed that the second oxidation peak probably belongs to the oxidation product formed at the potential of the first oxidation wave using glassy carbon electrode; however, their experiment was performed under strict anaerobic conditions. On the contrary, Brett and Ghica (9) suggested that the oxidation of the hydroxyl group at position 3 at the ring C gave the second oxidation wave at more positive potential. A very small peak was explained by the formation of an intermolecular hydrogen bond of the hydroxyl group (C-3) with the oxygen at position 4 at ring C. This claim was also supported in a study of structural elucidation of the quercetin degradation products in ethanol-water solution (17).

The effect of some parameters on the determination of quercetin by ASDPV

The pH, accumulation potential and accumulation time have important effects on the determination of quercetin using ASDPV. As can be seen in Fig. 3, the pH influenced both the oxidation potential and the oxidation current. The oxidation potential shifted in the negative direction with increasing pH from 2.0 to 7.0, giving the following equation (Fig. 3, inset):

$$E_a = -68.571 \cdot \text{pH} + 583.570 \quad (R^2 = 0.997) \quad /2/$$

The shifting of the anodic potential with increasing pH at the rate of 68.6 mV per pH unit generally supports a reaction mechanism which involves equal number of protons and electrons. Oxidation of quercetin did not appear at pH ≥ 8.0 . It was found that the oxidation peak currents of quercetin on pretreated pencil graphite electrode gradually increased with the decrease of pH values, indicating the higher enhancement effect of pretreated pencil

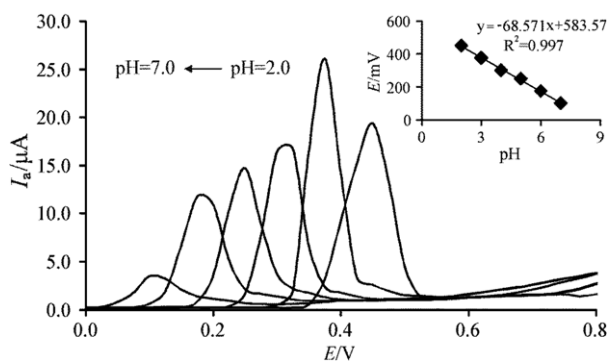


Fig. 3. Anodic stripping differential pulse voltammetry curves of 1.0 $\mu\text{mol/L}$ of quercetin using pretreated pencil graphite electrode at various pH. Accumulation potential 0.1 V, accumulation time 120 s (potential range from 0.0 to 0.8 V, potential step 25 mV, potential pulse 25 mV, pulse time 0.05 s and scan rate 100 mV/s). Inset: the effect of pH on the oxidation potential of quercetin

graphite electrode in more acidic conditions. However, the oxidation current of quercetin decreased after reaching the highest value at pH=3.0. The oxidation current depended on both accumulation potential and accumulation time (data not shown). Therefore, the optimum conditions were chosen as: supporting electrolyte BRB at pH=3.0, accumulation potential of 0.1 V and accumulation time of 120 s.

The enhancement of the electrochemical activity of pencil graphite electrode towards quercetin can be attributed to the increased formation of oxygen-containing groups, such as carbonyl and carboxyl on the graphite lead surface during the treatment (39). Quercetin as a molecule containing several hydroxyl groups bound to the aromatic rings (Fig. 4) acts as a weak acid.

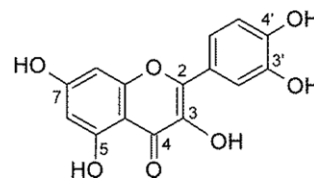


Fig. 4. The structure of quercetin

The value of $\text{p}K_a = 5.9$ was reported in the solution under argon atmosphere (40). We assume that specific interactions among oxygen-containing groups at the surface of the electrode and hydroxyl groups of quercetin occurred under acidic conditions. With increasing pH, oxygen-containing groups in pencil lead were deprotonated and anionic forms of quercetin (QH^- and Q^{2-}) (13) were formed, leading to repulsion of negatively charged quercetin from the negatively charged surface. The same mechanism of interaction between tannic acid and the pretreated pencil graphite electrode was described in our previous study (37).

As can be seen in Fig. 5, the oxidation current of quercetin is proportional to its concentration in the range from 0.001 to 1.5 $\mu\text{mol/L}$ with the calibration curve (Fig. 5, inset) calculated with the following equation:

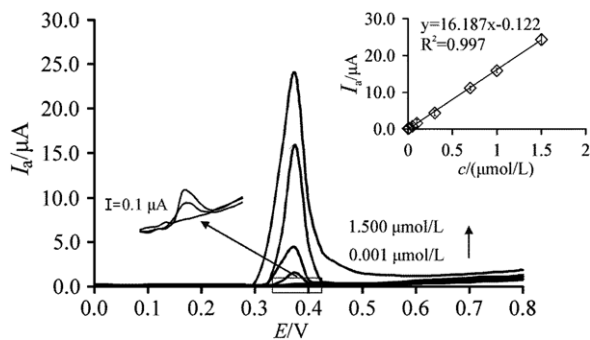


Fig. 5. Anodic stripping differential pulse voltammetry curves of various concentrations (from 0.001 to 1.500 $\mu\text{mol/L}$) of quercetin on pretreatment pencil graphite electrode in Britton-Robinson buffer at $\text{pH}=3.0$ after deposition at the potential of 0.1 V for 120 s. Potential range from 0.0 to 0.8 V, potential step 25 mV, potential pulse 25 mV, pulse time 0.05 s and scan rate 100 mV/s. Inset: the plot of oxidation current *vs.* concentration of quercetin

$$I_a = 16.187c - 0.122 \quad (R^2 = 0.997) \quad /3/$$

where I_a is the oxidation current (μA) and c is the molar concentration ($\mu\text{mol/L}$). The limit of detection (LOD) was calculated using the equation:

$$\text{LOD} = 3s_b/m \quad /4/$$

where s_b is the standard deviation of the blank response and m is the slope of the calibration plot of $0.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/L}$. Limit of quantification (LOQ) was $10^{-3} \mu\text{mol/L}$ (signal to

noise ratio of 10). The repeatability of the method was investigated by the measurements of 50, 100 and 1200 nmol/L of quercetin ($N=15$) and the relative standard deviation (RSD) was found to be 3.9, 4.2 and 4.5 %, respectively. The linearity ranges and calculated LOD obtained from the pretreated pencil graphite electrode were compared with other methods. As can be seen in Table 1, two papers proposed methods for the determination of quercetin with LOD close to $\mu\text{mol/L}$ using modified graphene oxide as an electrode material (29,30). Although the linear dynamic range was found to be better when using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide (29), the preparation of graphene oxide is time-consuming procedure requiring strong oxidative compounds. The broadest working concentration range for determination of quercetin has been obtained in a study of Gupta *et al.* (24) with ionic liquid carbon paste electrode modified with the nanocomposite mixture of carbon nanotubes and nickel oxide. Even though the pencil graphite electrode is very cheap, extremely sensitive, and simple renewable tool for electrochemical determination of quercetin, it offers excellent results referenced in the above-mentioned studies.

Interference studies

The influence of potentially interfering species on the detection of quercetin was investigated. The criterion used for determining the presence of interference was the peak current change of 5 % or greater at 10^{-6} mol/L of

Table 1. Comparison of the efficiency of some modified electrodes used in the electrocatalysis of quercetin in real samples

Electrode	c (linear dynamic range)	c (limit of detection)	Sample (reference)
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	
Au/MPA/CSH	0.5–12.2	n.d.	n.d. (12)
Pt-PDA@SiO ₂ /GCE	0.05–0.383	0.016	tea, apple, onion (17)
PVP-CPV	0.5–5.5	0.17	pharmaceutical (19)
CNTPE	0.1–1.0	0.03	blood serum (20)
Nafion/MWCNT/GPE	10.0–910.0	6.0/5.7	dry/frozen fruit (21)
Ac-Si/CPE	5.0–100.0*	*3.53	tea (22)
CNTPE-Cu	n.d.	0.543	apple juice (23)
ILs/NiO/CNT/CPE	0.08–400	0.03	onion, apple (24)
DNA-CPE	n.d.	0.0385	n.d. (25)
CPE/alumina	n.d.	0.001	tea (26)
MIP/GO/GC	0.60–15.0	0.048	fruit juices (28)
GCE/GO	0.006–10.000	0.0036	onion, apple (29)
AgNPs-AETGO	0.01–5.00	0.003	grape wine (30)
p-AMT/PGE	0.1–6.0*	2.2	n.d. (35)
Pre-PGE	0.001–1.5	0.0003	fruit juices (this study)

Au/MPA/CSH=gold electrode modified with 3-mercaptopropionic acid/L-cysteine, Pt-PDA@SiO₂/GCE=glassy carbon electrode modified with platinum-polydopamine-coated silica nanocomposite, PVP-CPV=poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon paste electrode, CNTPE=carbon nanotube-nujol paste electrode, Nafion/MWCNT/GPE=multiwalled carbon nanotube graphite paste electrode, Ac-Si/CPE=activated silica-gel carbon paste electrode, CNTPE/Cu=carbon nanotube paste electrode modified with copper nanoparticles, ILs/NiO/CNT/CPE=NiO carbon nanotube nanocomposite modified ionic liquid carbon paste electrode, DNA-CPE=carbon paste electrode modified with DNA, CPE/alumina=carbon paste electrode modified with alumina microfibres, MIP/GO/GC= molecularly imprinted polymer-incorporated graphene oxide-modified electrode with polypyrrole, GCE/GO=graphene oxide-modified glassy carbon electrode, AgNPs-AETGO=2-aminoethanethiol functionalized graphene oxide with silver nanoparticles, p-AMT/PGE=polymerized 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole pencil graphite electrode, Pre-PGE=pretreated pencil graphite electrode; n.d.=not determined; *originally expressed in $\mu\text{g/L}$

quercetin. It was found that 200-fold increase of concentration of K^+ and Na^+ , 100-fold of glucose, 80-fold of tartaric acid, 70-fold of rutin, 60-fold of oxalic acid, 50-fold of citric acid, 40-fold of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ni^{2+} , 30-fold of ascorbic acid and Cr^{3+} , 25-fold of Fe^{3+} and Zn^{2+} and 15-fold of Cd^{2+} and Cu^{2+} did not interfere with the analysis of quercetin using pretreated pencil graphite electrode.

Analytical application

The proposed method was applied to determine the presence of quercetin in cranberry and blackcurrant juices with the results shown in Table 2.

Table 2. Determination of quercetin in fruit juice samples and the recovery data ($N=8$)

Sample	$c(\text{spiked})$ mg/L	$c(\text{found})$ mg/L	Recovery %
Cranberry	0.00	0.59±0.11	n.d.
	0.34	0.92±0.08	94.72
Blackcurrant	0.00	0.16±0.05	n.d.
	0.34	0.48±0.10	93.24

n.d.=not determined

It was necessary to include cleaning steps because of the solid contents in both samples. The presence of colourful antocyanins in cranberry and blackcurrant juices significantly increased the background currents, thus decreasing the sensitivity of the pretreated pencil graphite electrode in this study (data not shown). The solid-phase extraction procedure successfully cleaned the sample from antocyanins and allowed to determine the presence of quercetin with a good recovery in the range of 93.24–94.72 %.

Conclusions

In this study the electrochemical determination of quercetin on the surface of pretreated pencil graphite electrode by anodic stripping differential pulse voltammetry has been investigated for the first time. It was shown that the pretreatment procedure remarkably enhanced the oxidation peak current of quercetin compared with that using bare pencil graphite electrode. Under optimal conditions, the anodic peak current is linearly proportional to the concentration of quercetin at a wide concentration range and at very low limit of detection in comparison with other studies. The electrode is proved to be of high sensitivity and reproducibility. The working electrode used in this study can be purchased in local market at the minimum cost and requires minor modification in phosphate buffer to be an excellent tool for voltammetric determination of quercetin. The method was successfully applied to the fruit juices; however, the cleaning and extraction steps are necessary for good recovery.

References

1. Biesaga M, Pyrzynska K. Analytical procedures for determination of quercetin and its glycosides in plant material. *Crit Rev Anal Chem.* 2009;39:95–107. <http://dx.doi.org/10.1080/10408340902820718>

2. Islam MA, Schmidt RW, Gunaseelan S, Sanches A. An update on the cardiovascular effects of quercetin, a plant flavonoid. *Curr Nutr Food Sci.* 2014;10:36–48. <http://dx.doi.org/10.2174/157340131001140328115216>
3. Thennarasu A. Quercetin in health and disease. *Res J Pharm Technol.* 2013;6:1397–9.
4. Dmitrienko SG, Kudrinskaya VA, Apyari VV. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J Anal Chem.* 2012;67:340–53. <http://dx.doi.org/10.1134/S106193481204003X>
5. Nolvachai Y, Marriott PJ. GC for flavonoids analysis: past, current and prospective trends. *J Sep Sci.* 2013;36:20–36. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200846>
6. Martelo-Vidal MJ, Vázquez M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Anal Methods.* 2014;158:28–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.080>
7. Gil ES, Couto RO. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Braz J Pharmacog.* 2013;23:542–58. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000031>
8. Gupta VK, Jain R, Radhapyari K, Jadon N, Agarwal S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals – a review. *Anal Biochem.* 2011;408:179–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.09.027>
9. Brett AMO, Ghica ME. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis.* 2003;15:1745–50. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200302800>
10. Andreescu S, Andreescu D, Sadik OA. A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes. *Electrochem Comm.* 2003;5:681–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2481\(03\)00166-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2481(03)00166-8)
11. Pierozynski B, Zielinska D. Electrooxidation of quercetin at polycrystalline Pt electrode. *Int J Electrochem Sci.* 2010;5:1507–15.
12. de Oliveira FCM, Serrano SHP. Electrochemically active L-cysteine gold modified electrodes. *Electrochem Acta.* 2014;125:566–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.01.079>
13. Sokolová R, Ramešová Š, Degano I, Hromadová M, Gál M, Žabka J. The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chem Comm.* 2012;48:3433–5. <http://dx.doi.org/10.1039/C2CC18018A>
14. Fu Y, Lin Y, Chen T, Wang L. Study on the polyfurfural film modified glassy carbon electrode and its application in polyphenols determination. *J Electroanal Chem.* 2012;687:25–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.09.040>
15. Jin JH, Kwon C, Park W, Kim S, Jung S. Electrochemical characterization of a glassy carbon electrode modified with microbial succinoglycan monomers and multi-wall carbon nanotubes for the detection of quercetin in an aqueous electrolyte. *J Electroanal Chem.* 2008;623:142–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.07.002>
16. Medvidović-Kosanović M, Šeruga M, Jakobek L, Novak I. Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. *Croat Chem Acta.* 2010;83:197–207.
17. Manokaran J, Muruganatham R, Muthukrishnaraj A, Balasubramanian N. Platinum-polydopamine @SiO₂ nanocomposite modified electrode for the electrochemical determination of quercetin. *Electrochim Acta.* 2015;168:16–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.016>
18. Zhou A, Kikandi S, Sadik OA. Electrochemical degradation of quercetin: isolation and structural elucidation of the degradation products. *Electrochem Comm.* 2007;9:2246–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2007.06.026>
19. Piovesan JV, Spinelli A. Determination of quercetin in a pharmaceutical sample by square-wave voltammetry using

- a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. *J Braz Chem Soc.* 2014;25:517–25.
<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140019>
20. He JB, Lin XQ, Pan J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. *Electroanalysis.* 2005;17:1681–6.
<http://dx.doi.org/10.1002/elan.200503274>
 21. Zhu QG, Sujari ANA, Ghani SA. Nafion-MWCNT composite modified graphite paste for the analysis of quercetin in fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Sensor Actuat B: Chem.* 2013;177:103–10.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.112>
 22. Chen X, Li Q, Yu S, Lin B, Wu K. Activated silica gel based carbon paste electrodes exhibit signal enhancement for quercetin. *Electrochim Acta.* 2012;81:106–11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.063>
 23. Oliveira AC, Mascaro LH. Evaluation of carbon nanotube paste electrode modified with copper nanoparticles and its application to determination of quercetin. *Int J Electrochem Sci.* 2011;6:804–18.
 24. Gupta VK, Golestani F, Ahamdzadeh S, Karimi-Maleh H, Fazli G, Khosravi S. NiO/CNTs nanocomposite modified ionic liquid carbon paste electrode as a voltammetric sensor for determination of quercetin. *Int J Electrochem Sci.* 2015;10:3657–67.
 25. Satpati AK, Sahoo S, Dey MK, Reddy AVR, Mukhurjee T. Electrochemical and spectroelectrochemical investigations of quercetin on unmodified and DNA-modified carbon paste electrode and its determination using voltammetry. *Anal Methods.* 2011;3:1344–50.
<http://dx.doi.org/10.1039/clay05026e>
 26. Li Y, Huang W. Electrode modified with porous alumina microfibres as a highly sensitive electrochemical sensor for quercetin. *Anal Methods.* 2015;7:2537–41.
<http://dx.doi.org/10.1039/c5ay00206k>
 27. Xiao P, Zhao F, Zeng B. Voltammetric determination of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode. *Microchem J.* 2007;85:244–9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2006.06.004>
 28. Sun S, Zhang M, Li Y, He X. A molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for electrochemical detection of quercetin. *Sensors.* 2013;13:5493–506.
<http://dx.doi.org/10.3390/s130505493>
 29. Arvand M, Anvari M. A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of quercetin in foods. *J Iran Chem Soc.* 2013;10:841–9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13738-013-0219-3>
 30. Yola ML, Gupta VK, Eren T, Şen AE, Atar N. A novel electro analytical nanosensor based on graphene oxide/silver nanoparticles for simultaneous determination of quercetin and morin. *Electrochim Acta.* 2014;120:204–11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.086>
 31. Chen PY, Vittal R, Nien PC, Ho KC. Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, quercetin, and nafion. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:3504–9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.003>
 32. Raof JB, Ojani R, Amiri-Aref M, Baghayeri M. Electrodeposition of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode as a novel and efficient voltammetric sensor for simultaneous determination of levodopa, uric acid and tyramine. *Sensor Actuat B: Chem.* 2012;166:167:508–18.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.096>
 33. Dilgin Y, Kızılkaya B, Dilgin DG, Gokcel HI, Gorton L. Electrocatalytic oxidation of NADH using a pencil graphite electrode modified with quercetin. *Colloid Surface B.* 2013;102:816–21.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.030>
 34. Buratti S, Scampicchio M, Giovanelli G, Mannino S. A low-cost and low-tech electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions. *Talanta.* 2008;75:312–6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.014>
 35. Muti M, Gençdağ K, Nacak FM, Aslan A. Electrochemical polymerized 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole modified single use sensors for detection of quercetin. *Colloid Surface B.* 2013;106:181–6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.018>
 36. Gong ZQ, Sujari ANA, Ab Ghani S. Electrochemical fabrication, characterization and application of carboxylic multi-walled carbon nanotube modified composite pencil graphite electrode. *Electrochim Acta.* 2012;65:257–65.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.01.057>
 37. Vu DI, Ertek B, Dilgin Y, Ěervenka L. Voltammetric determination of tannic acid in beverages using pencil graphite electrode. *Czech J Food Sci.* 2015;33:72–6.
<http://dx.doi.org/10.17221/221/2014-CJFS>
 38. Öztürk F, Taşdemir IH, Erdoğan DA, Erk N, Kiliç E. A new voltammetric method for the determination of lercanidipine in biological samples. *Acta Chim Slov.* 2011;58:830–9.
 39. Alipour E, Majidi MR, Saadatirad A, Golabi SM, Alizadeh AM. Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode. *Electrochim Acta.* 2013;91:36–42.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.079>
 40. Ramešová Š, Sokolová R, Degano I, Bulíčková J, Žabka J, Gál M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402:975–82.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5504-3>

Příloha 11

STANOVENÍ RUTINU S VYUŽITÍM UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY MODIFIKOVANÉ SILIKAGELEM

Simona Žabčíková, Milan Sýs, Libor Červenka a Marie Benešová-Balvínová

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 95, 532 10 Pardubice*

Abstract

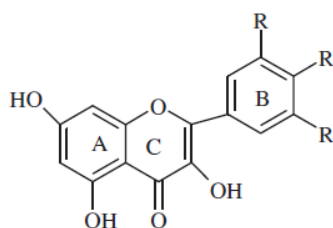
Carbon paste electrode modified with 15 % wt. of silicagel was prepared for determination of rutin. The electrochemical behavior of rutin in electrolytes with different pH and appropriate assay condition were investigated using cyclic voltammetry. The effect of the presence of quercetin on the determination of rutin in model sample was evaluated. Square-wave voltammetry was used for quantification of rutin in model sample.

Souhrn

Byla připravena uhlíková pastová elektroda modifikovaná 15 % hm. silikagelu pro stanovení rutinu. Bylo zkoumáno elektrochemické chování rutinu v prostředí o různém pH a také vhodné podmínky stanovení. V práci byl také posuzován vliv přítomnosti kvercetinu na stanovení rutinu ve vzorku. Pro měření charakterizace byla použita metoda cyklické voltametrie, pro vlastní měření pak metoda square-wave voltametrie.

1. Úvod

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující organické sloučeniny. Jsou to přírodní barviva, rostliny je syntetizují z fenylalaninu, dávají barvu např. květům. Patří mezi přírodní antioxidanty, akceptory volných radikálů. Bylo identifikováno více než 4000 flavonoidních látek, které se liší strukturou, stupněm hydroxylace, funkčními substituenty, konjugací nebo stupněm polymerace, a dělí se na antokyany, flavony, flavonony, flavonoly, isoflavony a katechiny. Každý flavonoid obsahuje tři aromatická jádra označována jako A, B, a C (Obrázek 1) [1,2]. Rutin a kvercetin patří mezi jedny z nejrozšířenějších flavonoidů, řadí se mezi flavonoly, žluté pigmenty [3]. Vzhledem k tomu, že molekula rutinu se skládá z kvercetinu a disacharidu rutinose, vyskytují se tyto dva flavonoidy většinou v matrici vzorku společně, nicméně mohou navzájem rušit stanovení každého z nich. Rutin má široký rozsah fyziologických účinků na lidský organismus. Působí protizánětlivě, protinádorově,



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidů

antibakteriálně, zvyšuje propustnost krevních vlásečnic a pomáhá k léčbě poškození žil a cév. Kvercetin má podobné účinky jako rutin [4]. Ke stanovení flavonoidů bylo vyvinuto mnoho metod. Patří mezi ně např. kapilární elektroforéza [4], vysoko-účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS) [5], chromatografie v tenké vrstvě [6], UV-VIS spektrofotometrie [3,7] a další. Bylo také vyvinuto několik elektrochemických metod pro stanovení rutinu a flavonoidů. Ensafi et al. využívali ke stanovení rutinu ve farmaceutických sloučeninách a čaji adsorptivní stripping voltametrii (AdSV) s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) [8]. Malagutti et al. použili tuhou uhlíkovo-polyuretanovou kompozitní elektrodu (RCPE) při voltametričních měřeních ke stanovení rutinu v čaji [9]. Lin et al. ke stanovení rutinu využívali uhlíkové pastové elektrody v kombinaci s vícestěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (CPE/MWCN) [10]. Rutin a kvercetin poskytuje elektrochemickou odezvu také na obyčejné uhlíkové pastové elektrodě (CPE) [11]. V naší studii elektrochemického chování rutinu byla jako pracovní elektroda používána uhlíková pastová elektroda s 15% hm. silikagelu. Silikagel byl do pasty přidáván pro zvětšení pracovního povrchu elektrody a tím zvýšení citlivosti měření. Obecně se uhlíkové pastové elektrody skládají z uhlíkového prášku o velikosti částic řádově v nm, a z vhodného pojiva, obvykle minerálního nebo silikonového oleje. Tyto dvě komponenty jsou smíchány v třecí misce a vzniklá homogenní pasta je vpravena do teflonového držáku s pístem. Výhodou uhlíkových elektrod je obnovitelný a snadno modifikovatelný pracovní povrch, široké potenciálové okno použití a nízké pozadí proudu. Naopak nevýhodou je pomalejší přenos elektronů při elektrodové reakci [12].

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Standardní roztoky rutinu a kvercetinu o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Německo) byly připraveny rozpuštěním navážky látky v metanolu (Sigma-Aldrich, Německo). Základní elektrolyty, HCl o koncentraci 1 a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, a série Britton-

Robinsonových pufrů, byly připraveny z běžných chemikálií (Sigma-Aldrich, Německo). Pro přípravu všech roztoků byla použita redestilovaná voda (Milli-Q systém, Millipore, Francie).

2.2. Instrumentace

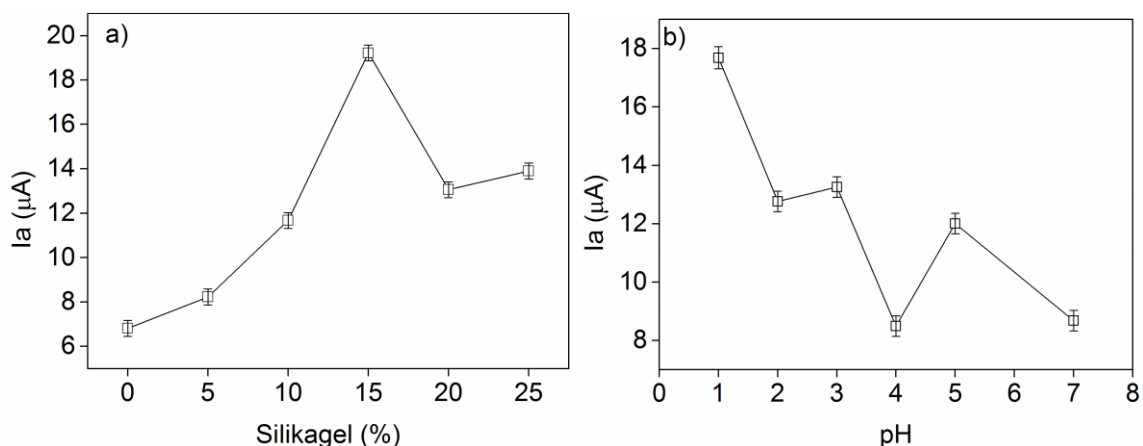
Všechna elektrochemická měření byla provedena s použitím elektrochemického rozhraní PalmSens (Ivium Technologies, Nizozemí). Bylo použito tříelektrodového zapojení s CPE nebo uhlíkovou pastovou elektrodou s 15% silikagelu (CPE/15% SG) (uhlík 5,5 – 7,0 μm , CR-5, Maziva Týn n. L., s.r.o., Česká republika; minerální olej M5904, Sigma-Aldrich, Německo; Silicagel (5-25 μm , 60 Å), Sigma-Aldrich, Německo) jako pracovní elektrodou, platinovým drátkem jako pomocnou a chloridostříbrnou elektrodou ($\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{KCl}$ (3,0 mol.l⁻¹)) jako referentní.

2.3. Cyklická a square-wave voltametrie (CV a SWV)

Experimenty byly prováděny v roztocích výše zmíněných elektrolytů s různou koncentrací rutinu, popřípadě kvercetin. U většiny měření byly použity podmínky cyklické voltametrie: počáteční potenciál 0,0 V vs. ref., potenciál zvratu +1,0 V, konečný potenciál -0,1 V, potenciálový skok 5 mV, rychlost skenu 50 mV.s⁻¹. U square-wave voltametrie bylo využíváno podmínek: počáteční potenciál -0,1 V, konečný potenciál +0,7 V, potenciálový skok 5 mV, rychlost skenu 25 mV.s⁻¹, frekvence 1 Hz, amplituda pulzu 25 mV.

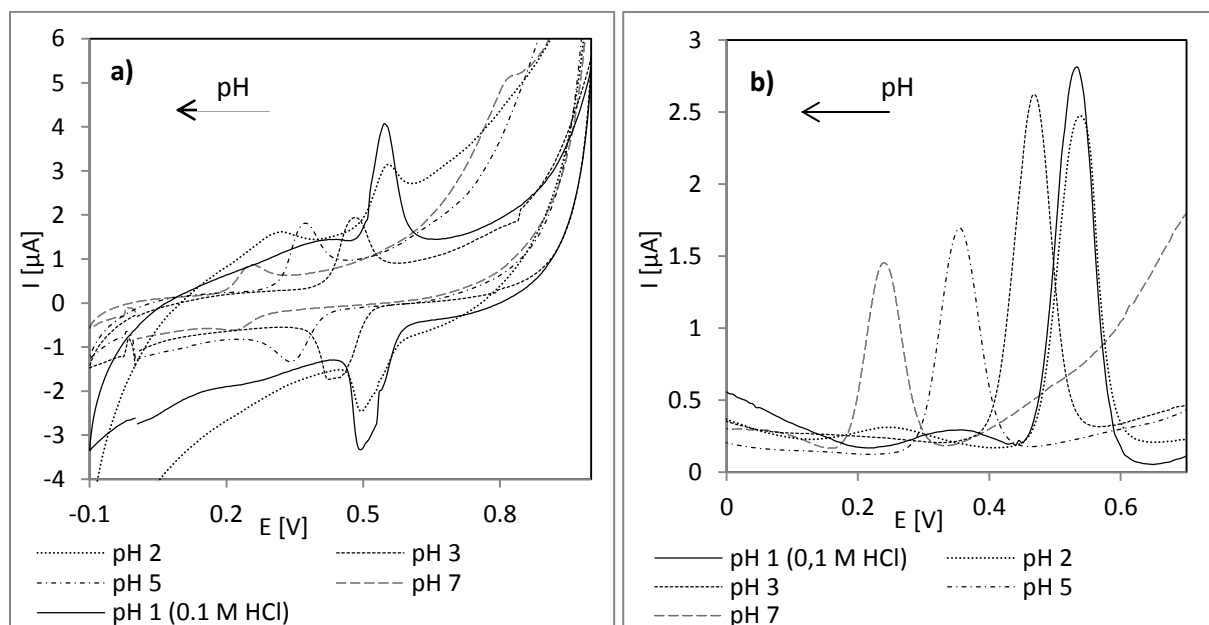
3. Výsledky a diskuze

Pomocí cyklické voltametrie bylo studováno elektrochemické chování rutinu v prostředí různých elektrolytů (0,1 M HCl a série Britton-Robinsonových pufrů) s použitím uhlíkových pastových elektrod (CPE) s různým obsahem silikagelu. Ze závislosti velikostí oxidačních proudů bylo provedeno jejich statistické vyhodnocení dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA), kde byly obsah silikagelu v pastě a pH elektrolytu použity jako faktory ovlivňující velikost oxidačního proudu (Obrázek 2). Je patrné, že CPE s obsahem 15% hm. silikagelu poskytuje nejvyšší signál v porovnání s ostatními použitými elektrodami, a to nezávisle na elektrolytu použitému k měření (Obrázek 2a). Z elektrolytů byly nejvyšší signály zaznamenány v případě použití 0,1 M HCl (pH 1,0), v elektrolytech o pH 2,0 a 3,0 byl rozdíl v proudových odezvách elektrod statisticky nevýznamné ($p > 0.05$) (Obrázek 2b). Oba sledované faktory měly výrazný vliv ($p < 0.001$) na velikost proudové odezvy elektrody v roztoku obsahující rutin, navíc existuje i významná interakce mezi obsahem silikagelu a použitým pH pracovního elektrolytu ($p < 0.001$).



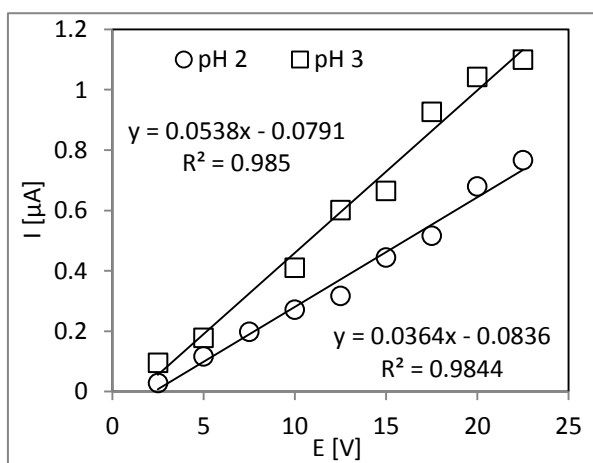
Obrázek 2: Statistické vyhodnocení závislostí velikostí proudů oxidačních a redukčních proudových vln a) Závislost obsahu silikagelu v pastě, b) Závislost pH elektrolytu (dvoufaktorová ANOVA (n = 10))

Na obrázku 3a jsou znázorněny záznamy měření pomocí metody cyklické voltametrie. Je patrné, že s rostoucím pH se signál rutinu posunuje k zápornějším potenciálům a zároveň se snižuje proudová výška. Totéž lze pozorovat při použití square-wave voltametrie (SWV) (Obrázek 3b).

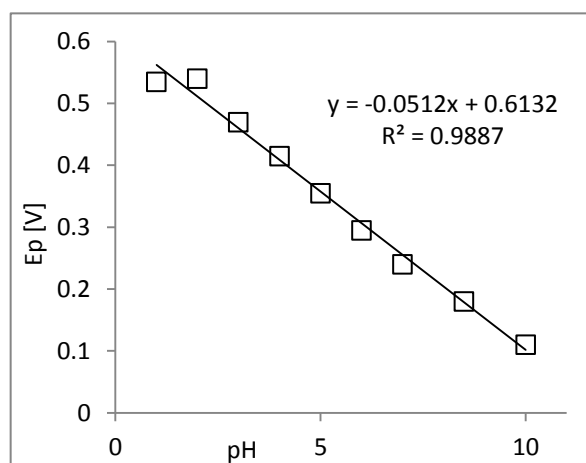


Obrázek 3: Vybrané záznamy a) rutinu na CPE/15% SG, CV; b) rutinu na CPE/15% SG, SWV: $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru/0,1M HCl, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenů 5. Parametry SWV: $E_{\text{beg}} = -0,1 \text{ V}$, $E_{\text{end}} = 0,7 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 0,005 \text{ V}$, $E_{\text{amp}} = 0,05 \text{ V}$, frekvence: 1 Hz.

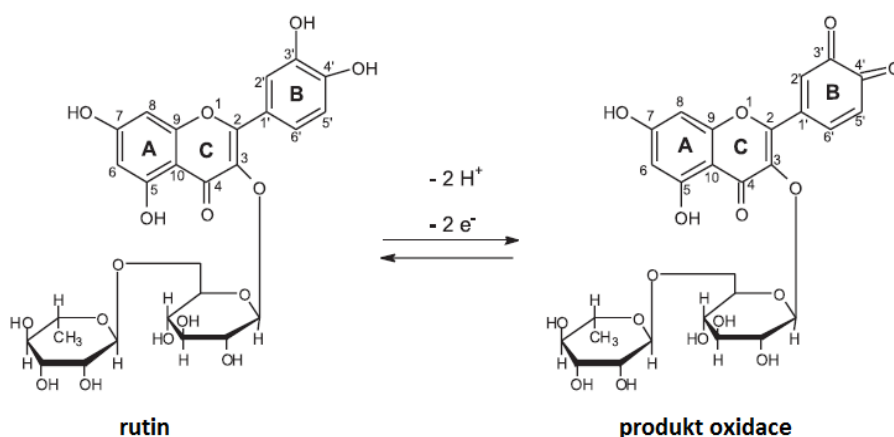
Bylo zjištěno, že elektroda modifikovaná 15% silikagelu poskytuje v prostředí 0,1 M HCl oxidační proudovou vlnu v oblasti cca +0,48 V. V této oblasti potenciálů dochází také k oxidaci kvercetinu, v jehož přítomnosti se tyto signály překryjí a nelze je rozlišit. Tato vlna také ruší stanovení rutinu. Z tohoto důvodu bylo dále k měření používáno Britton-Robinsonova pufru. Ze statistického vyhodnocení vyplývá pH 2 a 3 srovnatelné, nicméně bylo zvoleno pH 3, a to vzhledem ke směrnici kalibračních závislostí oxidačních vln rutinu v tomto elektrolytu (Obrázek 4). Z kalibrační závislosti pH elektrolytu na potenciálu oxidační vlny (Obrázek 5) lze usuzovat, že při elektrodové reakci je poměr vyměňovaných protonů a elektronů roven 1:1. Tato domněnka je v souladu s mechanismem reakce navrženým v literatuře (Obrázek 6).



Obrázek 4: Kalibrační přímky rutinu v Britton-Robinsonově pufru pH 2 a pH 3. $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry SWV: E_{beg} : - 0,1 V, E_{end} : 0,7 V, E_{step} : 0,005 V, E_{amp} : 0,05 V, frekvence: 1 Hz.

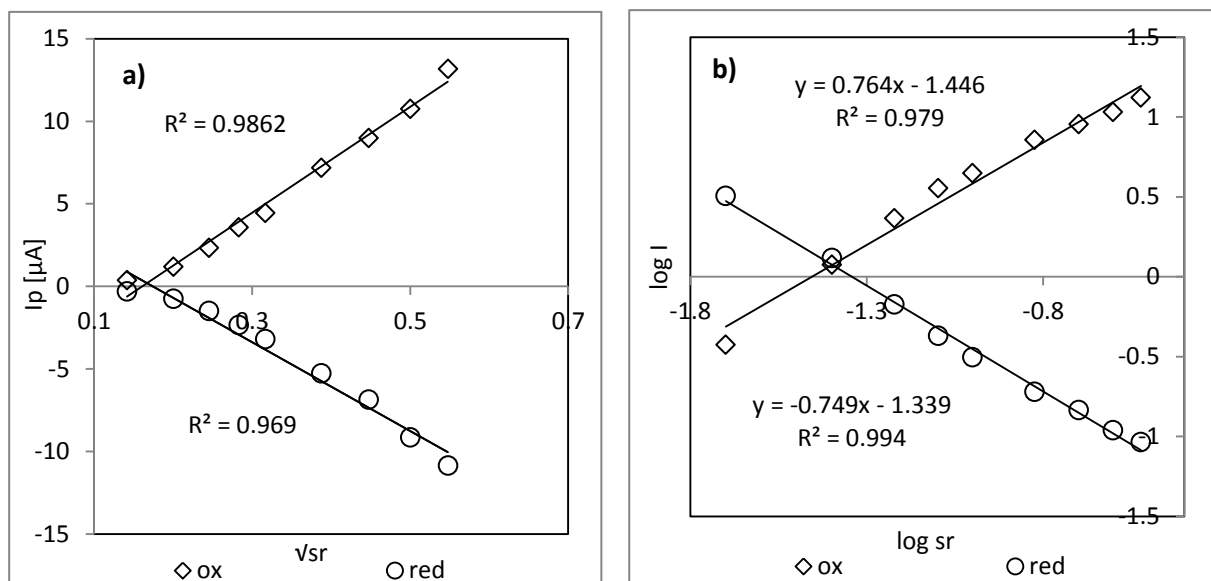


Obrázek 5: Kalibrační závislost pH elektrolytu na potenciálu oxidační vlny rutinu. $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru/0,1M HCl, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenu 5.



Obrázek 6: Schéma elektrodové reakce rutinu [13]

Linearita závislosti odmocniny skenovací rychlosti na proudové odezvě pro oxidační i redukční signál rutinu v BR pufru o pH 3 naznačuje, že proces je řízený difúzí (Obrázek 7a). Nicméně, závislosti logaritmu skenovací rychlosti na logaritmu proudové odezvy oxidačních i redukčních vln rutinu, respektive směrnice těchto kalibračních přímk, poukazují na skutečnost, že proces je sice řízen převážně difúzí, nicméně je také částečně ovlivňován adsorpcí analytu na povrch pracovní elektrody (Obrázek 7b).

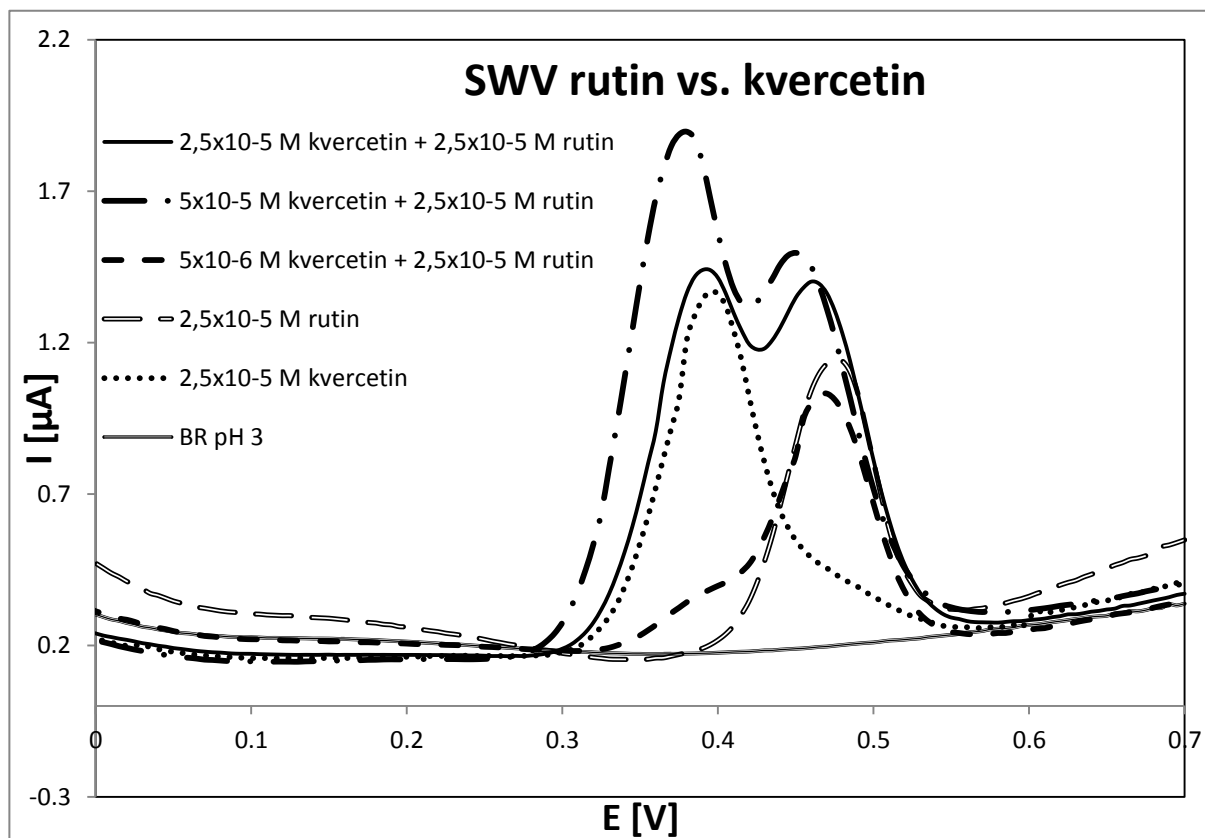


Obrázek 7: a) Závislost odmocniny skenovací rychlosti na proudové odezvě, b) závislost logaritmu skenovací rychlosti na logaritmu proudové odezvy. $c_{\text{rutin}} = 5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenů 5.

Na obrázku 8 jsou znázorněny square-wave voltamogramy rutinu a kvercetin u a jejich směsi v různém poměru. Při měření byla vždy konstantní daná koncentrace rutinu a byl porovnáván vliv množství přítomného kvercetin u na odezvu rutinu. Samotný kvercetin poskytuje oxidační signál při potenciálu +0,395 V (-----), rutin při +0,480 V (- - -). V případě přítomnosti obou těchto flavonoidů v měřící cele dochází k posunu potenciálového maxima rutinu k zápornějším hodnotám, proudové odezvy pak odpovídají množství látek přítomných ve vzorku.

Z tabulky I vyplývá, že již přítomnost $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ kvercetin u v B-R pufru o pH 3 při měření CPE/15% SG snižuje citlivost elektrody na rutin, zároveň se snižuje mez detekce a kvantifikace. Pravděpodobně se jedná o jev v rámci statistické chyby měření. Se vzrůstající koncentrací kvercetin u se snižuje směrnice přímk. Z výsledků měření za přítomnosti jak

kvercetinů tak rutinů lze usuzovat, že kvercetin do jisté míry ovlivňuje stanovení rutinů pomocí CPE/15% SG.



Obrázek 8: Square-wave voltamogramy rutinů a kvercetinů ve směsi: $c_{\text{rutin}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$), pomocná el.: platinový drátek. E_{beg} : 0 V, E_{end} : 0,7 V, E_{step} : 0,005 V, E_{amp} : 0,05 V, frekvence: 1 Hz.

Tabulka I: Porovnání rovnic přímek z kalibračních závislostí, mezi detekce a kvantifikace při měření za přítomnosti kvercetinů i rutinů: mez detekce a kvantifikace - statistické vyhodnocení závislosti množství kvercetinů v BR pufru o pH 3 na odezvu rutinů v SWV, F-test (\circ), $P < 0,001$, $c_{\text{rutin}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Složení vzorku	Rovnice přímky	Korelační koeficient	Mez detekce [μM]	Mez kvantifikace [μM]
$c_{\text{kvercetin}} = 0 \text{ mol.L}^{-1}$	$y = 0,0441x - 0,0869$	0,9593	-	-
$c_{\text{kvercetin}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	$y = 0,0325x - 0,0543$	0,9976	1,48	2,21
$c_{\text{kvercetin}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	$y = 0,0272x - 0,0843$	0,9258	8,24	12,36
$c_{\text{kvercetin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	$y = 0,022x - 0,0996$	0,9136	13,39	20,08

4. Závěr

Uhlíková pastová elektroda modifikovaná 15 % silikagelu je citlivá na přítomnost rutinu i kvercetin. Kvercetin a rutin jsou ovšem obvykle v matrici reálného vzorku přítomny společně a odstranění veškerého kvercetin je téměř nemožné. Vzhledem k této skutečnosti lze říci, že využití uhlíkové pastové elektrody modifikované 15 % silikagelu je pro stanovení rutinu v reálných vzorcích nevhodné.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Univerzity Pardubice (projekt SGSFChT č. 2015001).

5. Literatura

- [1] Masek A., Zaborski M., Chrzescijanska E.: *Food Chemistry* 127 (2011) 699 – 704
- [2] Volikakis G.J., Efstathiou C.E.: *Talanta* 51 (2000) 775 – 785
- [3] Hassan H.N.A., Barsoum B.N., Habib I.H.I.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20 (1999) 315 - 320
- [4] Chen G., Zhang H., Ye J.: *Analytica Chimica Acta* 423 (2000) 69 – 76
- [5] Bojarowicz H., Marszał M.P., Wnuk M., Goryński K., Buciński A.: *Analytical letters* 44 (2011) 1728 – 1737
- [6] Trineeva O.V., Safonova I.I., Safonova E.F., Slivkin A.I.: *Pharmaceutical Chemistry Journal* 48(2) (2014) 48 – 52
- [7] Xu H., Li Y., Tang H., Liu Ch., Wu Q.: *Analytical Letters* 43 (2010) 893 – 904
- [8] Ensafi A.A., Hajian R.: *Electroanalysis* 18(6) (2006) 579 – 585
- [9] Malagutti A.R., Zuin V.G., Cavalheiro É.T.G., Mazo L.H.: *Electroanalysis* 18(10) (2006) 1028 – 1034
- [10] Lin X.Q., He J.B., Zha Z.G.: *Sensors and Actuators B* 119 (2006) 608 – 614
- [11] Zoulis N. E., Efstathiou C.E.: *Analytica Chimica Acta* 320 (1996) 255 – 261
- [12] Švancara I., Kalcher K., Walcarius A., Vytřas K.: *Electroanalysis with carbon paste electrodes*, CRC Press (2012), ISBN 9781439830192
- [13] X. dos Santos S., Mazo L.H., Cavalheiro É.T.G.: *J. Braz. Chem. Soc.* 19(8) (2008) 1600 - 1606

Příloha 12

MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE AS A TOOL FOR THE EVALUATION OF OXIDATIVE STABILITY OF RAPESEED OIL

Simona Žabčiková, Libor Červenka

ABSTRACT

Carbon paste electrode was used for evaluation of oxidative stability of rapeseed oil samples using cyclic voltammetry in 0.1 mol.L⁻¹ HCl as a supporting electrolyte. Rapeseed oil samples were exposed to daylight and oxygen in open glass baker at the laboratory condition in order to obtain oils with accelerated primary and secondary products of oxidation. The oxidation status was determined by peroxide value and p-anisidine value. Total oxidative stability was expressed as TOTOX index. The edible oils were used for preparation (modification) of the carbon paste composite material followed by the cyclic voltammetric measurement. Peroxide values significantly increased whereas p-anisidine value rather fluctuated during 40 days of storage in all the samples. Cyclic voltammograms showed anodic current peaks at 575 – 600 mV and cathodic current peaks at 400 – 425 mV. The oxidation and reduction waves diminished at pH ≥3.0 suggesting not only phenolic compounds contributed to the electrochemical characteristic of oil samples. The peroxide value or p-anisidine value did not correlate with oxidation or reduction peak currents at the potential 575 – 600 mV and 400 – 425 mV, respectively. Both cathodic and anodic currents increased with increasing TOTOX index exhibiting positive correlation with high Spearman correlation coefficient ($r = 0.894$ and $r = 0.914$ for anodic and cathodic current, respectively). Linear relationship was found for each sample individually. A caution has to be done when interpreting results since the correlation seems to be of oil sample specific. Nevertheless, the modified carbon paste electrode with rapeseed oil represents a suitable and alternative tool for determination of the oxidative state of edible oils without use of organic solvents.

Keywords: edible oil; peroxide value; cyclic voltammetry; carbon paste electrode

INTRODUCTION

Plant seed oils represent the significant source of fatty acids, sterols and other biologically active substances for human nutrition (McKevith, 2005). Rapeseed oil belongs to the most frequently used vegetable oil in European Union countries. Global rapeseed production gradually increased over the past 20 years with the EU being the principal consumer (including biodiesel production) (Carré and Pouzet, 2014).

Rapeseed oil composition varies among the cultivars of *Brassica* sp. but it is well known that oleic, linoleic and α -linolenic acids dominated together with other health-promoting compounds such as glucosinolates (progoitrin, gluconapin), tocoferols and phenolics (Pawlowicz et al., 2013; Zheng et al., 2014; Szterk et al., 2010). Phenolic substances also have protective effect against oxidative changes in the edible oils. The oxidation mechanism of the edible oils is very complex, and is influenced by the fatty acid composition, oil processing, energy of heat or light, the type and the concentration of oxygen and transition metals, pigments and antioxidants. The oxidation of the edible oils decreases their nutritional quality and sensory acceptance by the formation of aldehydes, carboxylic acids, alcohols and hydrocarbons as the secondary oxidation products (Choe and Min 2006). Therefore, the

knowledge of the oxidative status is crucial during manufacturing and storage of plant seed oils.

The analytical methods are divided in those determining the primary oxidation products (hydroperoxides) and the secondary ones. The versatile methods for determination of hydroperoxides and secondary oxidation products are peroxide value (PV) and p-anisidine value (p-AV), respectively. A comprehensive reviews upon the other methods for measurement of oxidation rancidity have been recently published (Gromadzka and Wardencki, 2011; Pignitter and Somoza, 2012) including UV/VIS, infrared and Raman spectroscopy, chromatography, nuclear magnetic resonance, scanning calorimetric techniques or luminescent method. Compared with those methods above, electrochemical techniques have some advantages such as high sensitivity, accuracy, simplicity, low expense and the possibility of miniaturization. The changes of electrical conductivity during the reaction of KI and hydroperoxides (Yang et al., 2014) or an optical transmission/capacitance bridge based on the reaction of moisture during heating of the edible oils (Shelke and More, 2013) represent interesting approaches to the evaluation of rancidity. Potentiometric determination of PV and p-AV in the edible oils with triiodide-selective membrane has been proposed for flow injection technique (Saad et al., 2006; Saad et

al., 2007) and Adhoumad and Monser (2008) described direct measurement of hydroperoxides using Prussian-blue modified glassy carbon electrode. Electrochemical characteristics of the edible oils were also used for the determination of the origin or adulteration of the seed oils using chemometric treatment of the data (Gambarra-Neto et al., 2009; Oliveri et al., 2009, Apetrei et al., 2005).

Gambarra-Neto et al., (2009) classified various kinds of edible oils and unsuccessfully attempted to distinguish expired and non-expired oil samples using square wave voltammetry and platinum- and gold-disk electrodes. Oliveri et al., (2009) used Pt-microelectrode in mixture of the edible oil with ionic liquid and evaluated the whole shape of cyclic voltammograms. Our research was inspired by Apetrei et al., (2005) who used different olive oils as a binder material for preparation of carbon paste electrode for their subsequent discrimination. Among all the carbon electrodes, carbon paste electrode (CPE) is an appealing and widely used electrode material in the fields of electrochemistry, electroanalysis, etc. due to its attractive advantages, such as simple preparation, low-cost implementation, renewability, low background current, and wide potential window (Švancara et al., 2012). The aim of this study was to evaluate the rapeseed oils oxidation status measuring their electrochemical characteristics by cyclic voltammetry using the carbon paste electrode.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Reagents and equipment

All the reagents were purchased in Sigma-Aldrich spol. s r. o. (Prague, Czech Republic). Deionized water was used in this study ($G \leq 0.055 \mu\text{S}$).

A three-electrode system consisting of CPEs (working), Ag/AgCl/3.0 M KCl (reference) and platinum wire (counter electrode) connected to PalmSens (Ivium Technologies, Eindhoven, The Netherlands) was used for electrochemical measurement. The surfaces of CPE were regenerated by renewing and polishing them on wet filter paper before each measurement.

Preparation of CPE

The carbon paste composite material was prepared by mixing of 0.5 g graphite powder $5.5 \mu\text{m} - 7.0 \mu\text{m}$ (CR-5, Maziva Týn n. L. s. r. o., Czech Republic) with 140 μL of rapeseed oil sample in a ceramic mortar. The resulting paste was packed into the teflon piston holder (3.0 mm inner diameter) (Švancara and Metelka, 2000). The resistance of the composite material was always $\leq 15.0 \Omega$. The cyclic voltammetry (CV) was performed with CPE, where RO1-RO3 was used as a binder liquid in 0.1 mol.L⁻¹ HCl at a scan rate 100 mV.s⁻¹ (potential range from -200 to +1000 mV, potential step 25.0 mV) or in 0.4 mol.L⁻¹ Britton-Robinson buffer at the pH 3.0, 7.05 and 10.05 if necessary.

Sample preparation

Two refined rapeseed (RO1, RO2) oils under private label were obtained from local market (Billa spol. s r. o., Prague and Lidl Holding s.r.o., Prague, Czech Republic), RO3 (*Brassica rapa*) sample was purchased in Sigma

Aldrich spol. s.r.o. (Prague, Czech Republic). The oil samples were stored in refrigerator until use.

After opening the original package of the oil, 75 mL of each sample was put into the 150 mL glass baker and was allowed to expose to daylight and oxygen at laboratory condition ($23.0 \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$) for 40 days. The geometry of the liquid in baker was 65 mm \times 35 mm (diameter \times height). A portion of each oil sample was taken off at 0, 7th, 14th, 28th and 40th day of storage for determination of PV (AOAC 2007; Method 965.33), p-AV (IUPAC 1992; Method 2.504) and CPE preparation. Total oxidation value (TOTOX) was calculated as follows (Cao et al., 2014):

$$\text{TOTOX} = 2 \times \text{PV} + \text{p-AV}$$

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Origin Pro software (OriginLab Corp., MA, USA) on the probability level $p < 0.05$. Relationship among electrochemical characteristics of oil samples and oxidation values was evaluated using Spearman correlation coefficient (r). Comparison of the dataset was performed using analysis of variance. The chemical and electrochemical analysis was performed at six replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Peroxide value and p-anisidine value were determined for three rapeseed oil samples during storage in open baker at ambient temperature exposing to daylight for 40 days. As can be seen from Table 1, the initial PVs for RO1 and RO2 samples are below the required level ($< 10.0 \text{ mmol.kg}^{-1}$) for refined vegetable oils recommended in International Food Standard by Codex Alimentarius (IFS 1999).

The sample RO3 is not primarily designed for human consumption but for analytical purposes. The exposition of rapeseed oil samples to daylight and oxygen resulted in increase of PV during 40 days of storage. It was previously published that the light is more important in ¹O₂ oxidation than temperature (Choe and Min, 2006) forming the hydroperoxides, which are slowly decomposed to the secondary oxidation products. It is in agreement with our results where PVs gradually increased until the end of experiments whereas p-AV showed fluctuations in all the samples.

A typical cyclic voltammogram of the CPE modified with RO1 sample is depicted in Figure 1. An anodic wave appeared at the potential range from +575 to +600 mV followed by the cathodic wave from +400 to +425 mV at the pH 1.0 in the reverse scan. Apetrei et al., (2005) stated that some phenolic compounds were oxidized and reduced when they examined olive oils modified CPE. However, electrochemical studies of various phenolic compounds using CPEs described the shifting of the redox potentials to negative region with increasing pH (Švancara et al., 2012).

In our study, the redox waves disappeared even at pH 3.0. We may imply that phenolics naturally occurred in rapeseed oils did not act electrochemically at the experimental conditions described above.

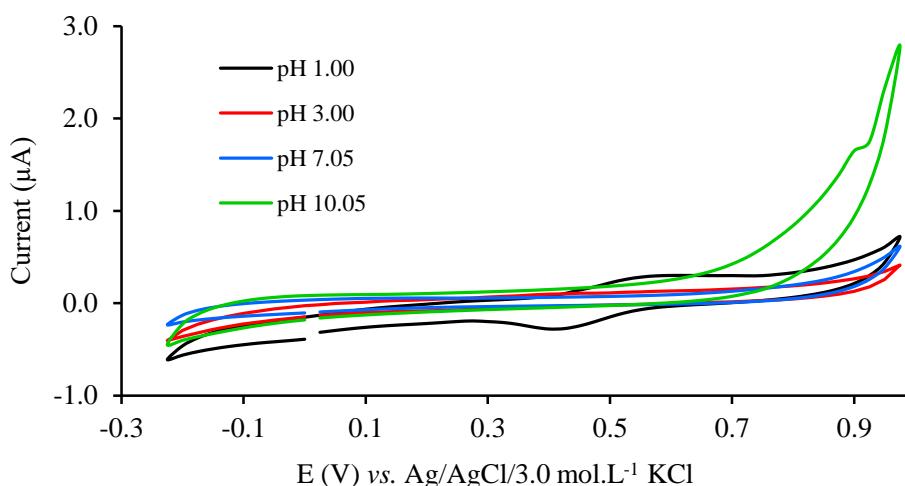


Figure 1 Cyclic voltammogram of carbon paste electrode modified with rapeseed oil (RO1) at different pH. Scan rate $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ and potential step 25.0 mV .

Table 1 Changes in peroxide value and p-anisidine value during the autooxidation of rapeseed oils (RO1-RO3)** at $23 \text{ }^\circ\text{C}$ exposed to sunlight ($n = 6$).

Storage time Days	Peroxide value $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1} \pm \text{SD}^*$			p-Anisidine value $\pm \text{SD}^*$		
	RO1	RO2	RO3	RO1	RO2	RO3
0	^a 4.35 ± 0.72	^a 1.82 ± 0.23	^a 25.50 ± 1.31	^b 2.41 ± 0.43	^{cd} 3.11 ± 0.12	^c 6.33 ± 0.25
7	^a 5.42 ± 0.63	^b 9.21 ± 0.20	^b 35.62 ± 1.45	^a 1.30 ± 0.21	^{ad} 2.70 ± 0.11	^b 5.81 ± 0.36
14	^b 9.53 ± 0.54	^c 11.55 ± 0.19	^b 42.11 ± 1.26	^c 3.51 ± 0.09	^{bc} 3.34 ± 0.16	^b 5.23 ± 0.21
28	^c 15.91 ± 1.00	^d 16.50 ± 0.91	^d 68.90 ± 0.36	^e 5.34 ± 0.15	^b 3.62 ± 0.23	^a 2.64 ± 0.30
40	^d 41.90 ± 1.75	^f 47.22 ± 0.16	^f 105.71 ± 0.45	^c 3.85 ± 0.35	^b 3.71 ± 0.30	^c 6.84 ± 0.42

Different small letters (a-f) in superscript indicate statistical differences in columns ($p < 0.05$).

* Values are presented as mean $\pm \text{SD}$ of duplicate samples obtained from three individual trials.

** RO1 (Rapeseedoil 1, Billa spol. s r. o., Prague, Czech Republic), RO2 (Rapeseed oil 2, Lidl Holding s.r.o., Prague, Czech Republic), RO3 (Sigma Aldrich spol. s r. o., Prague, Czech Republic).

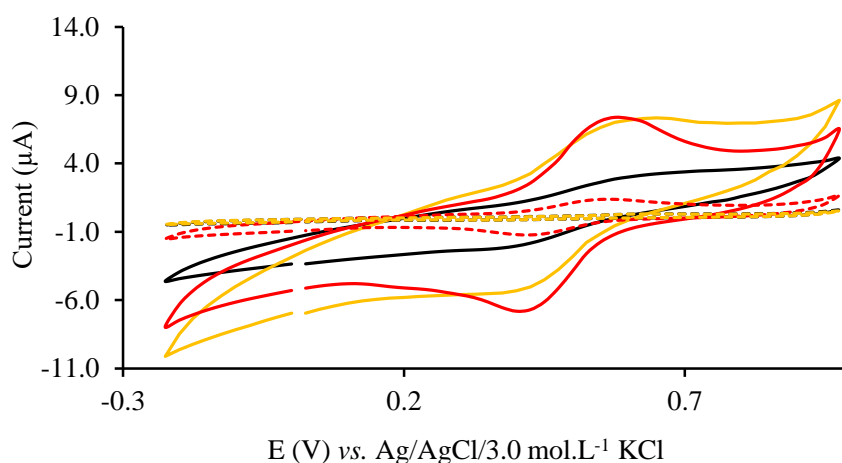


Figure 2 Cyclic voltammogram of carbon paste electrode modified with rapeseed oil samples RO1 (black line), RO2 (yellow line) and RO3 (red line) in initial oxidation state (dotted lines) and after 40 days (solid lines) of storage exposed to daylight and oxygen at $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Scan rate $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, potential step 25.0 mV , pH 1.0.

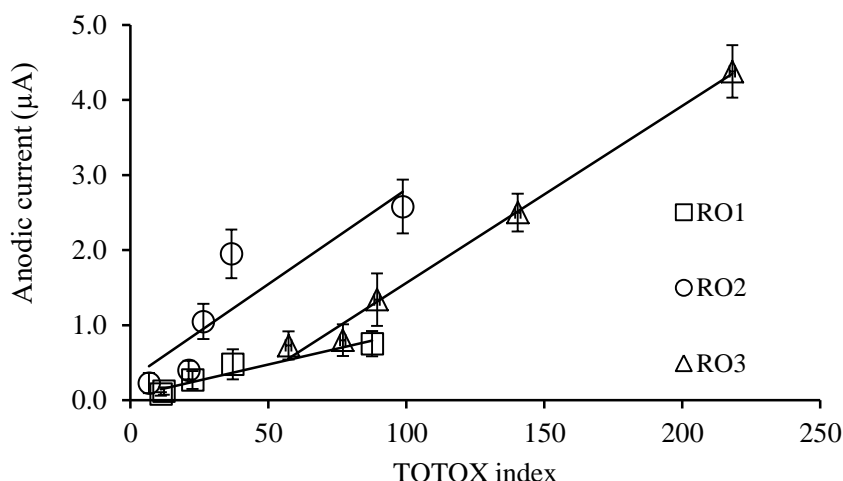


Figure 3 Linear regression of oxidation current of CPE modified with rapeseed oil samples upon TOTOX index. Mean \pm SD ($n=6$). RO1 (Rapeseed oil 1, Billa spol. s r. o., Prague, Czech Republic), RO2 (Rapeseed oil 2, Lidl Holding s.r.o., Prague, Czech Republic), RO3 (Sigma Aldrich spol. s r. o., Prague, Czech Republic).

The same type of working electrode may give different results at similar conditions. For instance, **Oliveri et al., (2009)** analyzed the whole CV curves using Pt-microelectrode for discrimination of edible oils and found no specific oxidation and reduction wave. On the other hand, **Garbarra-Neto et al., (2009)** used Pt-discelectrode for the same purpose, and used currents appearing in cathodic potential region specific for fatty acids detection for chemometric analysis. When performing cyclic voltammetry with CPEs prepared with rapeseed oils in different oxidation state, an increase of the both oxidation and reduction currents appeared (Figure 2). An attempt to find correlation between peroxide value and oxidation (I_a) and reduction (I_c) current was performed resulting in Spearman correlation coefficients $r = 0.321$ ($p = 0.508$) and $r = 0.412$ ($p = 0.516$) for I_a and I_c , respectively. Correlations of some edible oil quality parameters have been studied in some research papers.

Zheng et al., (2014) found negative linear correlation between the canolol content in rapeseed oils and PV and p-anisidine values. The concentration of nonpolar carbonyl compounds correlated with the TOTOX index in vegetable oils (**Cao et al., 2014**). Statistically significant positive correlation of the current and TOTOX index for all the samples was found in our study giving $r = 0.894$ ($p = 7.125 \cdot 10^{-6}$) and $r = 0.914$ ($p = 1.841 \cdot 10^{-6}$) for I_a and I_c , respectively. No correlation was found between the current and p-AV in this study. The TOTOX index is used to estimate total oxidative deterioration of oils combining the amounts of primary oxidation products (hydroperoxides) with secondary oxidation products (principally alkenals and alkadienals) (**Cao et al., 2014**). In addition, **Apetrei et al., (2005)** found strong correlation between anodic potential of the virgin olive oil and specific absorbance at 232 nm and 270 nm (showing the amount of polar compounds with conjugated multiply bonds), free fatty acid content, and peroxide value. In our study, the shift of both positive and negative potential values was observed but correlation was not confirmed.

Despite the strong correlation between TOTOX index and anodic or cathodic current, it was unable to mathematically describe such relationship for prediction purposes for all the samples. Therefore, we tried to evaluate each sample independently. The results presented in Figure 3 show the linear relationship between anodic peak current and TOTOX value for each of the rapeseed oil sample with r^2 to be 0.915 ($p = 0.007$), 0.730 ($p = 0.041$) and 0.989 ($p = 3.394 \cdot 10^{-4}$) for RO1, RO2 and RO3, respectively. The same linear correlation was found between TOTOX value and cathodic current with the calculated values r^2 to be 0.971 ($p = 0.014$), 0.819 ($p = 0.022$) and 0.979 ($p = 8.510 \cdot 10^{-4}$) for RO1, RO2 and RO3, respectively.

CONCLUSION

Rapeseed oil used as a binder liquid instead of mineral oils for the preparation of CPE is an alternative tool for determination of its oxidative stability. Despite the positive correlation between electrochemical characteristics of the binder liquid and the TOTOX index, one should be cautious interpreting results. We proved that each oil sample has different linear relationship of both anodic or cathodic currents, and oxidation quality parameters (TOTOX, p-AV). This behavior is probably rapeseed oil specific and should not be generalized. Nevertheless, the results of our research introduced a novel and a different approach for determination of oxidation stability of edible oils.

REFERENCES

- Adhoum, N., Monser, L. 2008. Electrochemical sensor for hydroperoxides determination based on Prussian blue film modified electrode. *Sensor. Actuator. B*, vol. 133, p. 588-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.03.039>
- AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. GAITHERSBURG, MD, USA: AOAC International, Official Method 965.33. ISBN: 0-935584-78-1.
- Apetrei, C., Rodríguez-Méndez, M. L., de Saja, J. A. 2005. Modified carbon paste electrodes for discrimination of

- vegetable oils. *Sensor. Actuator. B*, vol. 111-112, p. 403-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.041>
- Cao, J., Deng, L., Zhu, X. M., Fan., Y., Hu, J. N., Li. J., Deng, Z. Y. 2014. Novel approach to evaluate the oxidation state of vegetable oils using characteristic oxidation indicators. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, p. 12545-12552. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5047656>
- Carré, P., Pouzet, A. 2014. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL*, vol. 21, no. 1, D102. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2013054>
- Gambarra-Neto, F. F., Marino, G., Araújo, M. C. U., Galvão, R. K. H., Pontes, M. J. C., de Medeiros, E. P., Lima, R. S. 2009. Classification of edible vegetable oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis. *Talanta*, vol. 77, p. 1660-1666. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.003>
- Gromadzka, J., Wardencki, W. 2011. Trends in edible vegetable oils analysis. Part B. Application of different analytical techniques. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, vol. 61, no. 2, p. 89-99. <http://dx.doi.org/10.2478/v10222-011-0009-5>
- Choe, E., Min, D. B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, vol. 5, no. 4, p. 169-186. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- IFS, 1999. Codex standarad for named vegetable oils. [online] Codex stan 210-1999 [cit. 2015-02-6]. Available at: http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/336/CXS_210e.pdf
- IUPAC, 1992. Standard methods for the analysis of oils, fats, and derivatives. 7th ed. OXFORD, GB: Blackwell Scientific, Official Method 2.504. ISBN:0-632-03337-1.
- McKeivith, B. 2005. Nutritional aspects of oilseeds. *Nutr. Bull.*, vol. 30, no. 1, p. 13-26. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-3010.2005.00472.x/abstract;jsessionid=11510D4615C35652C548858484C7C535.f01t04>
- Oliveri, P., Baldo, A., Daniele, S., Forina, M. 2009. Development of a voltammetric electronic tongue for discrimination of edible oils. *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, p. 1135-1143. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3070-8>
- Pawłowicz, R., Gromadzka, J., Tynek, M., Tylingo, R., Wardencki, W., Karlovits, G. 2013. The influence of the UV irradiation on degradation of virgin rapeseed oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 115, p. 648-658. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201200126>
- Pignitter, M., Somoza, V. 2012. Critical evaluation of methods for the measurement of oxidative rancidity in vegetable oils. *J. Food Drug. Anal.*, vol. 20, no. 4, p. 772-777. <http://dx.doi.org/10.6227/jfda.2012200305>
- Saad, B., Wai, W. T., Lim, B. P., Saleh, M. I. 2006. Flow injection determination of peroxide value in edible oils using triiodide detector. *Anal. Chim. Acta*, vol. 565, p. 261-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.039>
- Saad, B., Wai, W. T., Lim, B. P., Saleh, M. I. 2007. Flow injection determination of anisidine value in palm oil samples using a triiodide potentiometric detector. *Anal. Chim. Acta*, vol. 591, p. 248-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.067>
- Shelke, A. V., More, P. S. 2013. Synthesis and analysis of optical transmission/capacitance bridge system for oil deterioration identification. *Int. J. Instrument. Sci.*, vol. 2, no. 2, p. 41-45. <http://dx.doi.org/10.5923/j.instrument.20130202.04>
- Szterk, A., Roszko, M., Sosińska, E., Derewiaka D., Lewicki, P. P. 2010. Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 87, p. 637-645. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-009-1539-4>
- Švancara, I., Kalcher, K., Walcarius, A., Vytras, K. 2012. *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. BOCA RATON, FL: CRC Press. ISBN: 978-1-4398-3019-2.
- Švancara, I., Metelka, R. 2000. Piston-driven carbon paste holders for electrochemical measurements. In Vytřas, K., Kalcher, K. *Sensing in Electroanalysis*, vol. 1. Pardubice: University of Pardubice, p. 7 – 8. ISBN:80-7194-831-4.
- Yang, Y., Li, Q., Yu, X., Chen, X., Wang, Y. 2014. A novel method for determining peroxide value of edible oils using electrical conductivity. *Food Control*, vol. 39, p. 198-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.017>
- Zheng, C., Yang, M., Zhou, Q., Liu, C. S., Huang, F. H. 2014. Changes in the content of calanol and total phenolics, oxidative stability of rapeseed oil during accelerated storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 116, p. 1675-1684. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.20130229>

Contact address:

Simona Žabčiková, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: simona.zabcikova@student.upce.cz

Libor Červenka, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.cervenka@upce.cz.

6 Závěr

V práci bylo testováno několik druhů uhlíkových elektrod, jmenovitě skelná uhlíková elektroda, uhlíková pastová a skelná elektroda a jejich různé modifikace, a pentilková uhlíková elektroda. Bylo vyvinuto několik metod pro stanovení vybraných analytů převážně v matricích potravin. Byly optimalizovány elektrochemické metody s využitím výše zmíněných elektrod pro stanovení akrylamidu, vybraných vitamínů, flavonoidů, a také využití CPE pro zhodnocení oxidační stability jedlých olejů.

Pro stanovení akrylamidu bylo vyvinuto několik metod, jejichž hlavním záměrem je vyvarovat se použití toxické rtuti. Bohužel, právě rtuťové elektrody jsou pro stanovení akrylamidu nejvhodnější vzhledem k vysokým potenciálům, při kterých je akrylamid redukován. Tyto metody jsou však pro použití v potravinářství nežádoucí. Vzhledem k nemožnosti použití nemodifikovaných uhlíkových elektrod při tak vysokých potenciálech měření, jako elektrody rtuťové, je nutné elektrody modifikovat, případně použít reakcí akrylamidu s dalšími látkami v roztoku, a tak umožnit jeho stanovení. Byly testovány reakce akrylamidu s taurinem a molekulami DNA, které spolu s AA tvoří elektrochemicky detekovatelné adukty. Dále bylo testování využití reakcí akrylamidu s kvercetinem nebo glycinem, s kationty přechodných kovů, např. s Ni^{2+} nebo Co^{2+} , a modifikace CPE pomocí přimíchání RuO_2 do uhlíkové pasty. V případě reakcí taurinu nebo DNA s AA nebylo dosaženo výsledků, jež by umožnily tyto látky použít pro jeho stanovení. Metoda využívající reakce akrylamidu s kvercetinem nebo glycinem vykazovala velice nízkou citlivost ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), proto nemohla být aplikována na reálné vzorky. Při použití reakce AA s Ni^{2+} nebyl zaznamenán žádný vliv akrylamidu na detekované proudy. Naproti tomu reakce AA s Co^{2+} poskytovala uspokojivé výsledky, nicméně metoda nemohla být aplikována na reálné vzorky, pravděpodobně v důsledku reakce kobaltnatých iontů s Carrezovými činidly použitými při úpravě vzorku. V práci se povedlo úspěšně optimalizovat jedinou metodu, a to použití CPE modifikované RuO_2 . Tato metoda vykazovala mez detekce $0,94 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ s návratností stanovení 97,9 %, a byla úspěšně aplikována na reálné vzorky bramborových lupínků.

Dále bylo vyvinuto několik metod pro elektrochemické stanovení vitamínů rozpustných v tucích. Pro jejich stanovení byly testovány metody rozpouštěcí voltametrie na pevných i pastových uhlíkových elektrodách, kdy první, akumulární krok, byl proveden ve směsném vodně-organickém rozpouštědle a samotná detekce pak v čistě vodném prostředí. Metoda adsorptivní rozpouštěcí voltametrie byla úspěšně aplikována na stanovení všech lipofilních vitamínů v margarínu v jedné analýze. Dále byla porovnávána metoda AdSV na

skelné uhlíkové elektrodě a na pastových elektrodách s modifikovaným povrchem s extraktivní rozpouštěcí voltametrií na skelné uhlíkové pastové elektrodě. Bylo zjištěno, že ExSV do nitra uhlíkové pasty je neúčinnější metodou pro stanovení vitamínu A s mezí detekce $4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Vzhledem k nerozpustnosti lipofilních vitamínů ve vodných roztocích a také nemožnosti použít pastové elektrody v organickém prostředí, byly pro stanovení lipofilních vitamínů testovány elektrody Adamsovy, tedy CPE modifikované tenzidy. Pro stanovení byla po optimalizaci vybrána elektroda se 30 % dodecylsíranu sodného. Tato elektroda byla úspěšně použita ve stanovení retinoidů a vitamínu E. V reálných vzorcích kosmetických přípravků byl pomocí CPE/30SDS stanoven obsah α -tokoferyl acetátu, který je využíván pro jejich fortifikaci. Přestože mez detekce byla pouze $17,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, metodu lze aplikovat pro stanovení α -TAc v kosmetice vzhledem k jeho relativně vysokým koncentracím. Vitamín C byl stanovován ve vzorku džusu a doplňku stravy s využitím CPE modifikované brilantní modří. Mez detekce byla stanovena na $0,05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Poslední kapitola práce je věnována dalšímu využití uhlíkových elektrod v analýze potravin, kdy jako analyty byly zvoleny flavonoidy kvercetin a rutin. Kvercetin byl úspěšně stanoven ve vzorcích džusů pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie v kombinaci s DPV, kdy mez detekce metody byla $0,0003 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Pro stanovení rutinu byla testována CPE modifikovaná silikagelem. Vzhledem k faktu, že rutin je v podstatě glykosidem kvercetinu, se tyto látky v reálných vzorcích vyskytují vedle sebe. Proto byla provedena studie interference kvercetinu na stanovení rutinu, kdy bylo prokázáno, že jsou-li v roztoku vzorku přítomny obě látky, jejich píky se slíjí v jeden a nelze je od sebe elektrochemicky rozlišit. Z tohoto důvodu nebyla CPE/SG aplikována na reálné vzorky.

Pro zhodnocení oxidační stability řepkového oleje byla použita uhlíková pastová elektroda, kdy pro její zhotovení byl místo tradiční pastové kapaliny použit olej v různých stádiích oxidace. Bylo dosaženo uspokojivých výsledků a lze tedy konstatovat, že CPE může být pro tyto účely použita.

Některé metody stanovení v této práci nebyly úspěšné, nicméně pro velkou část z nich je pravděpodobně možné dosáhnout lepších výsledků při použití jiné modifikace elektrody nebo úpravy vzorku před analýzou. Například při stanovení akrylamidu pomocí komplexu s Co^{2+} by bylo možné využít pro úpravu vzorku jiné metody nevyužívající Carrezova činidla, rovněž vhodná úprava vzorku by mohla vylepšit citlivost metody stanovení α -TAc v kosmetických výrobcích. Při stanovení lipofilních vitamínů s využitím ExSV na pastové elektrodě by bylo možné pro zlepšení reprodukovatelnosti použít modifikací povrchu

elektrody zajišťující větší homogenitu a stálost povrchu, například potažením vrstvou grafenu, apod.

7 Literatura

1. Barek, J., F. Opekar, and K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*. 2005, Praha: Karolinum. 188.
2. Sýs, M., S. Žabčíková, L. Červenka, and K. Vytřas, *Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol*. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2017, 11 (1), p. 96-105.
3. Švancara, I., K. Kalcher, A. Walcarius, and K. Vytřas, *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. 2012, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
4. Alkire, R.C., P.N. Bartlett, and J. Lipkowski, *Electrochemistry of Carbon Electrodes*. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 2015, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
5. Švancara, I. and R. Metelka, *Piston-driven carbon paste holders for electrochemical measurements*. *Sensing in Electroanalysis*, 2000, 1, p. 7-18.
6. Mikysek, T., I. Švancara, K. Kalcher, M. Bartoš, K. Vytřas, and J. Ludvík, *New approaches to the characterization of carbon paste electrodes using the ohmic resistance effect and qualitative carbon paste indexes*. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (15), p. 6327-6333.
7. Švancara, I., K. Vytřas, K. Kalcher, A. Walcarius, and J. Wang, *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*, 2009, 21 (1), p. 7-28.
8. Švancara, I., M. Hvizdalová, K. Vytřas, K. Kalcher, and R. Novotný, *A microscopic study on carbon paste electrodes*. *Electroanalysis*, 1996, 8 (1), p. 61-65.
9. Švancara, I., A. Walcarius, K. Kalcher, and K. Vytřas, *Carbon paste electrodes in the new millennium*. *Central European Journal of Chemistry*, 2009, 7 (4), p. 598-656.
10. Vytřas, K., I. Švancara, and R. Metelka, *Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2009, 74 (10), p. 1021-1033.
11. Wang, J., Ü. Anik Kirgöz, J.-W. Mo, J. Lu, A. Nasser Kawde, and A. Muck, *Glassy carbon paste electrodes*. *Electrochemistry Communications*, 2001, 3 (4), p. 203-208.
12. Van der Linden, W.E. and J.W. Dieker, *Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry*. *Analytica Chimica Acta*, 1980, 119 (1), p. 1-24.
13. Kitagawa, T. and S. Tsimhima, *Simple preparation of glassy carbon electrode*. *BUNSEKI KAGAKU*, 1971, 20 (10), p. 1328-1330.

14. Zittel, H.E. and F.J. Miller, *A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry*. Analytical Chemistry, 1965, 37 (2), p. 200-203.
15. Bond, A.M., P.J. Mahon, J. Schiewe, and V. Vicente-Beckett, *An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry*. Analytica Chimica Acta, 1997, 345 (1), p. 67-74.
16. Wang, J., A.N. Kawde, and E. Sahlin, *Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA*. Analyst, 2000, 125 (1), p. 5-7.
17. Wang, J. and A.-N. Kawde, *Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization*. Analytica Chimica Acta, 2001, 431 (2), p. 219-224.
18. Purushothama, H.T., Y.A. Nayaka, M.M. Vinay, P. Manjunatha, R.O. Yathisha, and K.V. Basavarajappa, *Pencil graphite electrode as electrochemical sensor for the voltammetric determination of chlorpromazine*. Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 2018.
19. Marcoux, L.S., K.B. Prater, B.G. Prater, and R.N. Adams, *A nonaqueous carbon paste electrode*. Analytical Chemistry, 1965, 37 (11), p. 1446-1447.
20. Albahadily, F.N. and H.A. Mottola, *Improved Response of Carbon-Paste Electrodes for Electrochemical Detection in Flow Systems by Pretreatment with Surfactants*. Analytical Chemistry, 1987, 59 (7), p. 958-962.
21. Ziyatdinova, G., E. Giniyatova, and H. Budnikov, *Cyclic Voltammetry of Retinol in Surfactant Media and Its Application for the Analysis of Real Samples*. Electroanalysis, 2010, 22 (22), p. 2708-2713.
22. Digua, K., J.M. Kauffmann, and J.L. Delplancke, *Surfactant modified carbon paste electrode: Part I: Electrochemical and microscopic characterization*. Electroanalysis, 1994, 6 (5-6), p. 451-458.
23. Kienen, V., W.F. Costa, J.V. Visentainer, N.E. Souza, and C.C. Oliveira, *Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement*. Talanta, 2008, 75 (1), p. 141-146.
24. Friedman, M., *Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (16), p. 4504-4526.
25. *2-Propenamide*. NIST WebBook Chemie. 2017 [cited 10.7.2018]; Available from: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=79-06-1>.

26. Ciesarová, Z., *Minimálizácia obsahu akrylamidu v potravinách*. Chemické listy, 2005, 99, p. 483 - 491.
27. Smith, E.A., S.L. Prues, and F.W. Oehme, *Environmental Degradation of Polyacrylamides. 1. Effects of Artificial Environmental Conditions: Temperature, Light, and pH*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 35 (2), p. 121-135.
28. Adams, A., S. Hamdani, F.V. Lancker, S. Mějri, and N. De Kimpe, *Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles*. Food Research International, 2010, 43 (5), p. 1517-1522.
29. *Acrylamide - safety information*. Sigma-Aldrich. 2017 [cited 12.9.2017]; Available from:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/A8887?lang=en®ion=CZ&gclid=CJGequSBvMUCFczHtAodaCQA8w>.
30. Stadler, R.H. and G. Scholz, *Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control*. Nutrition Reviews, 2004, 62 (12), p. 449-67.
31. Castle, L., M.-J. Campos, and J. Gilbert, *Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography—mass spectrometry*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 54 (4), p. 549-555.
32. Ignatov, O.V., S.M. Rogatcheva, S.V. Kozulin, and N.A. Khorkina, *Acrylamide and acrylic acid determination using respiratory activity of microbial cells*. Biosensors and Bioelectronics, 1997, 12 (2), p. 105-111.
33. Wang, C.-C. and C.-M. Lee, *Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolated from acrylonitrile–butadiene–styrene resin manufactured wastewater treatment system*. Chemosphere, 2001, 44 (5), p. 1047-1053.
34. Garland, T.O. and M.W.H. Patterson, *Six Cases Of Acrylamide Poisoning*. The British Medical Journal, 1967, 4 (5572), p. 134-138.
35. Hagmar, L., M. Törnqvist, C. Nordander, I. Rosén, M. Bruze, A. Kautiainen, A.-L. Magnusson, B. Malmberg, P. Aprea, F. Granath, and A. Axmon, *Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose*. Scand J Work Environ Health, 2001, 24 (4), p. 219 - 226.
36. Panel, C.I.R.E., *Amended final report on the safety assessment of polyacrylamide and acrylamide residues in cosmetics*. International Journal Of Toxicology, 2005, 24 Suppl 2, p. 21-50.

37. Duarte-Salles, T., S. Hans von, B. Granum, K.B. Gützkow, P. Rydberg, M. Törnqvist, M.A. Mendez, G. Brunborg, A.L. Brantsæter, H.M. Meltzer, J. Alexander, and M. Haugen, *Dietary Acrylamide Intake during Pregnancy and Fetal Growth--Results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)*. *Environmental Health Perspectives* (Online), 2013, 121 (3), p. 374.
38. Erkekoglu, P. and T. Baydar, *Acrylamide neurotoxicity*. *Nutritional Neuroscience*, 2014, 17 (2), p. 49-57.
39. Pan, X., X. Guo, F. Xiong, G. Cheng, Q. Lu, and H. Yan, *Acrylamide increases dopamine levels by affecting dopamine transport and metabolism related genes in the striatal dopaminergic system*. *Toxicology Letters*, 2015, 236 (1), p. 60-68.
40. Kim, T.H., S. Shin, K.B. Kim, W.S. Seo, J.C. Shin, J.H. Choi, K.-Y. Weon, S.H. Joo, S.W. Jeong, and B.S. Shin, *Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study*. *Talanta*, 2015, 131 (0), p. 46-54.
41. Sumner, S.C.J., T.R. Fennell, T.A. Moore, B. Chanas, F. Gonzalez, and B.I. Ghanayem, *Role of Cytochrome P450 2E1 in the Metabolism of Acrylamide and Acrylonitrile in Mice*. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, 12 (11), p. 1110-1116.
42. Fujii, A., H. Matsumoto, and H. Yamamoto, *Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurite outgrowth*. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1996, 27 (6), p. 995-1000.
43. Tareke, E., P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, and M. Törnqvist, *Acrylamide: A Cooking Carcinogen?* *Chemical Research in Toxicology*, 2000, 13 (6), p. 517-522.
44. Rosen, J. and K.-E. Hellenas, *Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Analyst*, 2002, 127 (7), p. 880-882.
45. Stadler, R.H., I. Blank, N. Varga, R. Fabien, J. Hau, P.A. Guy, R. Marie-Claude, and S. Riediker, *Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products*. *Nature*, 2002, 419 (6906), p. 449-50.
46. Knol, J.J., W.A.M. van Loon, J.P.H. Linssen, A.-L. Ruck, M.A.J.S. van Boekel, and A.G.J. Voragen, *Toward a Kinetic Model for Acrylamide Formation in a Glucose–Asparagine Reaction System*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53 (15), p. 6133-6139.
47. Zyzak, D.V., R.A. Sanders, M. Stojanovic, D.H. Tallmadge, B.L. Eberhart, D.K. Ewald, D.C. Gruber, T.R. Morsch, M.A. Strothers, G.P. Rizzi, and M.D. Villagran,

- Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (16), p. 4782-4787.
48. Ahn, J.S., L. Castle, D.B. Clarke, A.S. Lloyd, M.R. Philo, and D.R. Speck, *Verification of the findings of acrylamide in heated foods*. Food Additives And Contaminants, 2002, 19 (12), p. 1116-1124.
49. *Doporučení komise ze dne 10. 1. 2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách (Text s významem pro EHP)*. Evropská komise, D.J. 2011; Available from: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/recommendation_1001201_1_acrylamide_food_cs.pdf.
50. *Nařízení Komise (EU) č. 2017/2158 ze dne 20. listopadu 2017, kterým se stanoví zmírňující opatření a porovnávací hodnoty pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách, L304*. 2017 [cited 18.6.2018]; 24-44]. Available from: <http://www.foodnet.cz/soubor.php?id=19904&kontrola=bdbd564e4fb2ab8bfb99b21f6f37622b>.
51. Wenzl, T., M.B. De La Calle, and E. Anklam, *Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review*. Food Additives And Contaminants, 2003, 20 (10), p. 885-902.
52. Oracz, J., E. Nebesny, and D. Żyżelewicz, *New trends in quantification of acrylamide in food products*. Talanta, 2011, 86 (0), p. 23-34.
53. Lagalante, A.F. and M.A. Felter, *Silylation of Acrylamide for Analysis by Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography/Ion-Trap Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52 (12), p. 3744-3748.
54. Yamazaki, K., S. Isagawa, N. Kibune, and T. Urushiyama, *A method for the determination of acrylamide in a broad variety of processed foods by GC–MS using xanthyrol derivatization*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011, 29 (5), p. 705-715.
55. Lim, H.-H. and H.-S. Shin, *Ultra trace level determinations of acrylamide in surface and drinking water by GC–MS after derivatization with xanthyrol*. Journal of Separation Science, 2013, 36 (18), p. 3059-3066.
56. Notardonato, I., P. Avino, A. Centola, G. Cinelli, and M. Russo, *Validation of a novel derivatization method for GC–ECD determination of acrylamide in food*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405 (18), p. 6137-6141.
57. Nielsen, N.J., K. Granby, R.V. Hedegaard, and L.H. Skibsted, *A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of*

- acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread*. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 557 (1–2), p. 211-220.
58. Zhang, Y., Y. Ren, J. Jiao, D. Li, and Y. Zhang, *Ultra High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Analysis of Asparagine, Sugars, and Acrylamide in Maillard Reactions*. *Analytical Chemistry*, 2011, 83 (9), p. 3297-3304.
59. Motwani, H.V. and M. Törnqvist, *Quantitative analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry of glycidamide using the cob(I)alamin trapping method: Validation and application to in vitro metabolism of acrylamide*. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218 (28), p. 4389-4394.
60. Casella, I.G., M. Pierri, and M. Contursi, *Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection*. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1107 (1–2), p. 198-203.
61. Ayvaz, H., M. Plans, K.M. Riedl, S.J. Schwartz, and L.E. Rodriguez-Saona, *Application of infrared microspectroscopy and chemometric analysis for screening the acrylamide content in potato chips*. *Analytical Methods*, 2013, 5 (8), p. 2020-2027.
62. Ayvaz, H. and L.E. Rodriguez-Saona, *Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips*. *Food Chemistry*, 2015, 174 (0), p. 154-162.
63. Bermudo, E., O. Núñez, L. Puignou, and M.T. Galceran, *Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120 (1–2), p. 199-204.
64. Wu, J., L. Luo, Z.-L. Xiao, J.-Y. Yang, Y.-M. Sun, H.-T. Lei, Y.-D. Shen, H. Wang, and Z.-L. Xu, *Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Acrylamide in Food Samples*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42 (8), p. 1149-1154.
65. Preston, A., T. Fodey, and C. Elliott, *Development of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 608 (2), p. 178-185.
66. Zhou, S., C. Zhang, D. Wang, and M. Zhao, *Antigen synthetic strategy and immunoassay development for detection of acrylamide in foods*. *Analyst*, 2008, 133 (7), p. 903-909.

67. Žabčáková, S., L. Červenka, and M. Sýs. *Přehled elektroanalytických přístupů stanovení akrylamidu*. in *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XX*. 2018. Ovčárna pod Pradědem: Univerzita Pardubice, Pardubice.
68. MacWilliams, D.C., D.C. Kaufman, and B.F. Waling, *Polarographic and Spectrophotometric Determination of Acrylamide in Acrylamide Polymers and Copolymers*. *Analytical Chemistry*, 1965, 37 (12), p. 1546-1552.
69. Betso, S.R. and J.D. McLean, *Determination of acrylamide monomer by differential pulse polarography*. *Analytical Chemistry*, 1976, 48 (4), p. 766-770.
70. Niaz, A., Sirajuddin, A. Shah, M.I. Bhangar, M. Saeed, M.K. Jamali, and M.B. Arain, *A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution*. *Talanta*, 2008, 74 (5), p. 1608-1614.
71. Silva, N., D. Gil, A. Karmali, and M. Matos, *Biosensor for acrylamide based on an ion-selective electrode using whole cells of Pseudomonas aeruginosa containing amidase activity*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2009, 27 (2), p. 143-151.
72. Stobiecka, A., H. Radecka, and J. Radecki, *Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22 (9–10), p. 2165-2170.
73. Krajewska, A., J. Radecki, and H. Radecka, *A Voltammetric Biosensor Based on Glassy Carbon Electrodes Modified with Single-Walled Carbon Nanotubes/Hemoglobin for Detection of Acrylamide in Water Extracts from Potato Crisps*. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2008, 8 (9), p. 5832-5844.
74. Batra, B., S. Lata, M. Sharma, and C.S. Pundir, *An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film*. *Analytical Biochemistry*, 2013, 433 (2), p. 210-217.
75. Huang, S., S. Lu, C. Huang, J. Sheng, L. Zhang, W. Su, and Q. Xiao, *An electrochemical biosensor based on single-stranded DNA modified gold electrode for acrylamide determination*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 224, p. 22-30.
76. Li, D., Y. Xu, L. Zhang, and H. Tong, *A label-free electrochemical biosensor for acrylamide based on DNA immobilized on graphene oxide-modified glassy carbon electrode*. *International Journal of Electrochemical science*, 2014, 9, p. 7217-7227.
77. Zargar, B., N.R. Sahraie, and F. Khoshnam, *Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips*. *Analytical Letters*, 2009, 42 (10), p. 1407-1417.

78. Veselá, H. and E. Šucman, *Determination of acrylamide in food using adsorption stripping voltammetry*. Czech Journal of Food Sciences, 2013, 31 (4), p. 401-406.
79. Ahmed, S., N. Kishikawa, K. Ohyama, T. Imazato, Y. Ueki, and N. Kuroda, *Selective chemiluminescence method for monitoring of vitamin K homologues in rheumatoid arthritis patients*. Talanta, 2011, 85 (1), p. 230-236.
80. Kleefisch, G., C. Kreutz, J. Bargon, G. Silva, and C. Schalley, *Quartz Microbalance Sensor for the Detection of Acrylamide*. Sensors, 2004, 4 (9), p. 136.
81. Krajewska, A., M. Smet, W. Dehaen, and H. Radecka, *Tetralactam-modified gold electrodes for amperometric detection of acrylic acid*. Supramolecular Chemistry, 2009, 21 (6), p. 520-531.
82. Garabagiu, S. and G. Mihailescu, *Simple hemoglobin–gold nanoparticles modified electrode for the amperometric detection of acrylamide*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011, 659 (2), p. 196-200.
83. Varmira, K., O. Abdi, M.-B. Gholivand, H.C. Goicoechea, and A.R. Jalalvand, *Intellectual modifying a bare glassy carbon electrode to fabricate a novel and ultrasensitive electrochemical biosensor: Application to determination of acrylamide in food samples*. Talanta, 2018, 176, p. 509-517.
84. Hao, R., X. Leng, and H. Jing, *Acrylamide–taurine adducts formation as a key mechanism for taurine’s inhibitory effect on acrylamide formation*. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46 (6), p. 1282-1288.
85. Shin, D.-C., C.-T. Kim, Y.-C. Lee, W.-J. Choi, Y.-J. Na, and K.-W. Lee, *Reduction of acrylamide by taurine in aqueous and potato chip model systems*. Food Research International, 2010, 43 (5), p. 1356-1360.
86. Liu, Y., P. Wang, F. Chen, Y. Yuan, Y. Zhu, H. Yan, and X. Hu, *Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination*. Food Chemistry, 2015, 186, p. 46-53.
87. Brett, A.M.O. and M.-E. Ghica, *Electrochemical Oxidation of Quercetin*. Electroanalysis, 2003, 15 (22), p. 1745-1750.
88. Zamora, R., R.M. Delgado, and F.J. Hidalgo, *Model Reactions of Acrylamide with Selected Amino Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (3), p. 1708-1713.
89. Girma, K.B., V. Lorenz, S. Blaurock, and F.T. Edelman, *Coordination chemistry of acrylamide*. Coordination Chemistry Reviews, 2005, 249 (11), p. 1283-1293.

90. Veselá, H. and E. Šucman, *Determination of acrylamide in dry feedstuff for dogs and cats*. Acta Veterinaria Brno, 2013, 82 (2), p. 203-208.
91. Ganjali, M.R., M.R. Pourjavid, M. Rezapour, T. Poursaberi, A. Daftari, and M. Salavati-Niasari, *Ruthenium(III) Schiff's Base Complex as Novel Chloride Selective Membrane Sensor*. Electroanalysis, 2004, 16 (11), p. 922-927.
92. Horányi, G. and E.M. Rizmayer, *A study of the adsorption of chloride ions at ruthenium electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1984, 181 (1), p. 199-208.
93. Damodaran, S., K.L. Parkin, and O.R. Fennema, *Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition*. 2007: CRC Press.
94. Hite, D.A., *Determination of Retinyl Palmitate (Vitamin A) in Fortified Fluid Milk by Liquid Chromatography: Collaborative Study*. Journal of AOAC International, 2003, 86 (2), p. 375-385.
95. Palafox, N.A., M.V. Gamble, B. Dancheck, M.O. Ricks, K. Briand, and R.D. Semba, *Vitamin A deficiency, iron deficiency, and anemia among preschool children in the Republic of the Marshall Islands*. Nutrition, 2003, 19 (5), p. 405-408.
96. Ma, Y., Z. Wu, H.C. Furr, C. Lammi-Keefe, and N.E. Craft, *Fast minimicroassay of serum retinol (vitamin A) by capillary zone electrophoresis with laser-excited fluorescence detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1993, 616 (1), p. 31-37.
97. Ross, S.A., P.J. McCaffery, U.C. Drager, and L.M. De Luca, *Retinoids in Embryonal Development*. Physiological Reviews, 2000, 80 (3), p. 1021-1054.
98. Horwitz, W. and G.W. Latimer, *Official methods of analysis of AOAC International*. 2007, Gaithersburg, Md.: AOAC International.
99. Barua, A.B., D. Kostic, and J.A. Olson, *New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1993, 617 (2), p. 257-264.
100. Chen, L., Z. Liu, X. Kang, X. Zhou, S. Zheng, and Z. Gu. *Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/ clean-up*. in *Procedia Environmental Sciences*. 2011.

101. Küçükbay, F.Z. and I. Karaca, *Simultaneous determination of water and fat-soluble vitamins in pekmez samples by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection*. Asian Journal of Chemistry, 2010, 22 (5), p. 4083-4091.
102. Atuma, S.S., K. Lundstrom, and J. Lindquist, *The electrochemical determination of vitamin A. Part II. Further voltammetric determination of vitamin A and initial work on the determination of vitamin D in the presence of vitamin A*. Analyst, 1975, 100 (1196), p. 827-834.
103. Sýs, M., S. Žabčíková, L. Červenka, and K. Vytřas, *Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination*. Potravinárstvo, 2016, 10 (1), p. 260-264.
104. Atuma, S.S., J. Lindquist, and K. Lundstrom, *The electrochemical determination of vitamin A. Part I. Voltammetric determination of vitamin A in pharmaceutical preparations*. Analyst, 1974, 99 (1183), p. 683-689.
105. Mayes, T., J.M. Anadio, and P.F. Sturm, *Prevalence of Vitamin D Deficiency in Pediatric Patients With Scoliosis Preparing for Spinal Surgery*. Spine Deformity, 2017, 5 (6), p. 369-373.
106. Duffy, S.K., J.V. O'Doherty, G. Rajauria, L.C. Clarke, K.D. Cashman, A. Hayes, M.N. O'Grady, J.P. Kerry, and A.K. Kelly, *Cholecalciferol supplementation of heifer diets increases beef vitamin D concentration and improves beef tenderness*. Meat Science, 2017, 134 (Supplement C), p. 103-110.
107. Jakobsen, J. and P. Knuthsen, *Stability of vitamin D in foodstuffs during cooking*. Food Chemistry, 2014, 148 (Supplement C), p. 170-175.
108. *Bezpečnost potravin A-Z*. Ministerstvo zemědělství. 2012; Available from: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92153.aspx>.
109. Milešević, J., L. Samaniego, M. Kiely, M. Glibetić, M. Roe, and P. Finglas, *Specialized food composition dataset for vitamin D content in foods based on European standards: Application to dietary intake assessment*. Food Chemistry, 2018, 240 (Supplement C), p. 544-549.
110. Nikooyeh, B. and T.R. Neyestani, *Poor vitamin D status increases the risk of anemia in school children: National Food and Nutrition Surveillance*. Nutrition, 2017.
111. Pereira-Santos, M., G. Queiroz Carvalho, R. David Couto, D. Barbosa dos Santos, and A. Marlucia Oliveira, *Vitamin D deficiency and associated factors among pregnant women of a sunny city in Northeast of Brazil*. Clinical Nutrition ESPEN, 2017.

112. Hasanvand, E., M. Fathi, A. Bassiri, M. Javanmard, and R. Abbaszadeh, *Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization*. Food and Bioproducts Processing, 2015, 96, p. 264-277.
113. Atef, S.H., *Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2017.
114. van den Ouweland, J.M.W., *Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016, 84 (Part B), p. 117-130.
115. Farrell, C.-J. and M. Herrmann, *Determination of vitamin D and its metabolites*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 27 (5), p. 675-688.
116. Mena-Bravo, A., C. Ferreiro-Vera, F. Priego-Capote, M.A. Maestro, A. Mouriño, J.M. Quesada-Gómez, and M.D. Luque de Castro, *Quantitative analytical method to evaluate the metabolism of vitamin D*. Clinica Chimica Acta, 2015, 442 (Supplement C), p. 6-12.
117. Gomes, F.P., P.N. Shaw, and A.K. Hewavitharana, *Determination of four sulfated vitamin D compounds in human biological fluids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2016, 1009-1010 (Supplement C), p. 80-86.
118. Kwak, B.-M., I.-S. Jeong, M.-S. Lee, J.-H. Ahn, and J.-S. Park, *Rapid determination of vitamin D₃ in milk-based infant formulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2014, 165 (Supplement C), p. 569-574.
119. Gomes, F.P., P.N. Shaw, K. Whitfield, and A.K. Hewavitharana, *Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2015, 891 (Supplement C), p. 211-220.
120. Atuma, S.S. and J. Lindquist, *Voltammetric determination of tocopherols by use of a newly developed carbon paste electrode*. Analyst, 1973, 98 (1173), p. 886-894.
121. Eitenmiller, R.R. and J. Lee, *Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis*. 2004: CRC Press.
122. Ulatowski, L.M. and D. Manor, *Vitamin E and neurodegeneration*. Neurobiology of Disease, 2015, 84 (Supplement C), p. 78-83.
123. Cooper, J.D.H., R. Thadwal, and M.J. Cooper, *Determination of vitamin E in human plasma by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997, 690 (1), p. 355-358.

124. Vilasoa-Martínez, M., C. Calaza-Ramos, J. López-Hernández, M.A. Lage-Yusty, P.P. Losada, and A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, *Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high performance liquid chromatography in shell of Chionoecetes opilio*. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 617 (1), p. 225-229.
125. Woollard, D.C., A. Bensch, H. Indyk, and A. McMahon, *Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC: Use of internal standardisation*. *Food Chemistry*, 2016, 197 (Part A), p. 457-465.
126. Viñas, P., M. Pastor-Belda, N. Campillo, M. Bravo-Bravo, and M. Hernández-Córdoba, *Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 94 (Supplement C), p. 173-179.
127. Kamao, M., Y. Suhara, N. Tsugawa, and T. Okano, *Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards*. *Journal of Chromatography B*, 2005, 816 (1), p. 41-48.
128. Ziyatdinova, G., M. Morozov, and H. Budnikov, *MWNT-modified electrodes for voltammetric determination of lipophilic vitamins*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2012, 16 (7), p. 2441-2447.
129. Budnikov, G.K., G.K. Ziyatdinova, and D.M. Gil'metdinova, *Determination of Some Liposoluble Antioxidants by Coulometry and Voltammetry*. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 59 (7), p. 654-658.
130. Tan, Y.S., D. Urbančok, and R.D. Webster, *Contrasting Voltammetric Behavior of Different Forms of Vitamin A in Aprotic Organic Solvents*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118 (29), p. 8591-8600.
131. Webster, R.D., *Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents*. *The Chemical Record*, 2012, 12 (1), p. 188-200.
132. Masek, A., E. Chrzescijanska, and M. Zaborski, *Voltammetric and FTIR spectroscopic studies of the oxidation of retinyl propionate at Pt electrode in non-aqueous media*. *International Journal of Electrochemical science*, 2014, 9 (12), p. 6809-6820.
133. Wring, S.A., J.P. Hart, and D.W. Knight, *Voltammetric behaviour of all-trans-retinol (vitamin A1) at a glassy carbon electrode and its determination in human serum using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *Analyst*, 1988, 113 (12), p. 1785-1789.

134. Méndez, J.H., A.S. Pérez, M.D. Zamarreño, and M.L.H. Garcia, *Voltammetric determination of vitamin D3 with a rotating glassy carbon electrode*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1988, 6 (6), p. 737-741.
135. Hart, J.P., M.D. Norman, and C.J. Lacey, *Voltammetric behaviour of vitamins D2 and D3 at a glassy carbon electrode and their determination in pharmaceutical products by using liquid chromatography with amperometric detection*. Analyst, 1992, 117 (9), p. 1441-1445.
136. Chan, Y.Y., Y. Yue, and R.D. Webster, *Voltammetric Studies on Vitamins D2 and D3 in Organic Solvents*. Electrochimica Acta, 2014, 138, p. 400-409.
137. Sýs, M., R. Metelka, M. Stočes, and K. Vytřas, *Electrochemical properties of α -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture*. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2016, 147 (1), p. 31-38.
138. Yao, W.W., H.M. Peng, R.D. Webster, and P.M.W. Gill, *Variable Scan Rate Cyclic Voltammetry and Theoretical Studies on Tocopherol (Vitamin E) Model Compounds*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112 (22), p. 6847-6855.
139. Giacomelli, C., F.C. Giacomelli, L.O. Alves, A.K. Timbola, and A. Spinelli, *Electrochemistry of vitamin E hydro-alcoholic solutions*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2004, 15 (5), p. 748-755.
140. Tan, Y.S., S. Chen, W.M. Hong, J.M. Kan, E.S.H. Kwek, S.Y. Lim, Z.H. Lim, M.E. Tessensohn, Y. Zhang, and R.D. Webster, *The role of low levels of water in the electrochemical oxidation of α -tocopherol (vitamin E) and other phenols in acetonitrile*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011, 13, p. 12745-12754.
141. Litescu, S.-C. and G.-L. Radu, *Estimation of the antioxidative properties of tocopherols – an electrochemical approach*. European Food Research and Technology, 2000, 211 (3), p. 218-221.
142. Robledo, S.N., V.G.L. Zachetti, M.A. Zon, and H. Fernández, *Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultramicrosensors combined with chemometric tools*. Talanta, 2013, 116, p. 964-971.
143. Coatanea, M., A. Darchen, and D. Hauchard, *Electroanalysis at ultramicroelectrodes of oils and fats: Application to the determination of Vitamin E*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2001, 76 (1), p. 539-544.
144. Galeano Diaz, T., I. Durán Merás, A. Guiberteau Cabanillas, and M.F. Alexandre Franco, *Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least*

- squares calibration: analysis in vegetable oil samples.* Analytica Chimica Acta, 2004, 511 (2), p. 231-238.
145. Mikheeva, E.V. and L.S. Anisimova, *Voltammetric determination of vitamin E (α -Tocopherol acetate) in multicomponent vitaminized mixtures.* Journal of Analytical Chemistry, 2007, 62 (4), p. 373-376.
 146. Sýs, M., B. Švecová, I. Švancara, and R. Metelka, *Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode.* Food Chemistry, 2017, 229, p. 621-627.
 147. Ly, S.Y., *Voltammetric analysis of DL- α -tocopherol with a paste electrode.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88 (7), p. 1272-1276.
 148. Jaiswal, P.V., V.S. Ijeri, and A.K. Srivastava, *Voltammetric behavior of α -tocopherol and its determination using surfactant+ethanol+water and surfactant+acetonitrile+water mixed solvent systems.* Analytica Chimica Acta, 2001, 441 (2), p. 201-206.
 149. Takamura, K. and Y. Hayakawa, *Electrosorption of vitamin K2 studied by cyclic voltammetry in aqueous methanol.* Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1974, 49 (1), p. 133-140.
 150. Hart, J.P. and A. Catterall, *Electrosorption of vitamin K1 at mercury and its determination at submicrogram levels by differential pulse voltammetry at a hanging mercury electrode.* Analytica Chimica Acta, 1981, 128, p. 245-250.
 151. Herbig, A.-L. and C.M.G.C. Renard, *Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix.* Food Chemistry, 2017, 220 (Supplement C), p. 444-451.
 152. Mazurek, A. and J. Jamroz, *Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food.* Food Chemistry, 2015, 173 (Supplement C), p. 543-550.
 153. Spínola, V., E.J. Llorent-Martínez, and P.C. Castilho, *Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation.* Journal of Chromatography A, 2014, 1369 (Supplement C), p. 2-17.
 154. Yilmaz, S., M. Sadikoglu, G. Saglikoglu, S. Yagmur, and G. Askin, *Determination of ascorbic acid in tablet dosage forms and some fruit juices by DPV.* International Journal Of Electrochemical Science, 2008, 3, p. 1534-1542.

155. Pisoschi, A.M., A. Pop, G.P. Negulescu, and A. Pisoschi, *Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes*. *Molecules*, 2011, 16, p. 1349-1365.
156. Khaleghi, F., Z. Arab, V.K. Gupta, M.R. Ganjali, P. Norouzi, N. Atar, and M.L. Yola, *Fabrication of novel electrochemical sensor for determination of vitamin C in the presence of vitamin B9 in food and pharmaceutical samples*. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 221 (Supplement C), p. 666-672.
157. Pietta, P.-G., *Flavonoids as Antioxidants*. *Journal of Natural Products*, 2000, 63 (7), p. 1035-1042.
158. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20 (7), p. 933-956.
159. Di Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Izzo, and F. Capasso, *Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. *Life Sciences*, 1999, 65 (4), p. 337-353.
160. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96 (2), p. 67-202.
161. Szultka, M., B. Buszewski, K. Papaj, W. Szeja, and A. Rusin, *Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 47, p. 47-67.
162. Pilařová, V., K. Plachká, L. Chrenková, I. Najmanová, P. Mladěnka, F. Švec, O. Novák, and L. Nováková, *Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2018, 185, p. 71-79.
163. Stalikas, C.D., *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*. *Journal of Separation Science*, 2007, 30 (18), p. 3268-3295.
164. Naczk, M. and F. Shahidi, *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41 (5), p. 1523-1542.
165. Baranowska, I. and S. Bajkacz, *A new UHPLC-MS/MS method for the determination of flavonoids in supplements and DPPH-UHPLC-UV method for the evaluation of the radical scavenging activity of flavonoids*. *Food Chemistry*, 2018, 256, p. 333-341.
166. Corell, L., S. Armenta, F.A. Esteve-Turrillas, and M. de la Guardia, *Flavonoid determination in onion, chili and leek by hard cap espresso extraction and liquid*

- chromatography with diode array detection*. Microchemical Journal, 2018, 140, p. 74-79.
167. Lee, J., D.-G. Lee, J.P. Rodriguez, J.Y. Park, E.J. Cho, S.D. Jacinto, and S. Lee, *Determination of flavonoids in Acer okamotoanum and their aldose reductase inhibitory activities*. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2018, 59 (1), p. 131-137.
168. Kilinc, E., *Significance of Chromatographic and Voltammetric Data for the Classification of Green Teas in Türkiye: A Principle Component Analysis Approach*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008, 32 (2), p. 221-241.
169. Gomes, A.F., M. Ganzera, S. Schwaiger, H. Stuppner, M. Halabalaki, M.P. Almeida, M.F. Leite, J.G. Amaral, and J.M. David, *Simultaneous determination of iridoids, phenylpropanoids and flavonoids in Lippia alba extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Microchemical Journal, 2018, 138, p. 494-500.
170. Magiera, S., C. Uhlschmied, M. Rainer, C.W. Huck, I. Baranowska, and G.K. Bonn, *GC-MS method for the simultaneous determination of β -blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 56 (1), p. 93-102.
171. Gao, X., S.J. Williams, O.L. Woodman, and P.J. Marriott, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time-of-flight mass spectra of flavonoids and chalcones*. Journal of Chromatography A, 2010, 1217 (52), p. 8317-8326.
172. Lee, I.S.L., M.C. Boyce, and M.C. Breadmore, *Extraction and on-line concentration of flavonoids in Brassica oleracea by capillary electrophoresis using large volume sample stacking*. Food Chemistry, 2012, 133 (1), p. 205-211.
173. Peyrat-Maillard, M.N., S. Bonnely, and C. Berset, *Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection*. Talanta, 2000, 51 (4), p. 709-716.
174. Oliveira, B.A.M. and G. Mariana-Emilia, *Electrochemical Oxidation of Quercetin*. Electroanalysis, 2003, 15 (22), p. 1745-1750.
175. Newair, E.F., P.A. Kilmartin, and F. Garcia, *Square wave voltammetric analysis of polyphenol content and antioxidant capacity of red wines using glassy carbon and disposable carbon nanotubes modified screen-printed electrodes*. European Food Research and Technology, 2018.

176. Romani, A., M. Minunni, N. Mulinacci, P. Pinelli, F.F. Vincieri, M. Del Carlo, and M. Mascini, *Comparison among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48 (4), p. 1197-1203.
177. Gil, E.S. and R.O. Couto, *Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2013, 23 (3), p. 542-558.
178. Hollman, P.C.H., J.M.P. van Trijp, M.N.C.P. Buysman, M.S. v.d. Gaag, M.J.B. Mengelers, J.H.M. de Vries, and M.B. Katan, *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. FEBS Letters, 1997, 418 (1), p. 152-156.
179. Nijveldt, R.J., E. van Nood, D.E. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, and P.A. van Leeuwen, *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 74 (4), p. 418-425.
180. Boots, A.W., G.R.M.M. Haenen, and A. Bast, *Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical*. European Journal of Pharmacology, 2008, 585 (2), p. 325-337.
181. Guardia, T., A.E. Rotelli, A.O. Juarez, and L.E. Pelzer, *Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*. Il Farmaco, 2001, 56 (9), p. 683-687.
182. Häkkinen, S.H., S.O. Kärenlampi, I.M. Heinonen, H.M. Mykkänen, and A.R. Törrönen, *Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47 (6), p. 2274-2279.
183. Manach, C., C. Morand, V. Crespy, C. Demigné, O. Texier, F. Régéat, and C. Rémésy, *Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties*. FEBS Letters, 1998, 426 (3), p. 331-336.
184. Watson, D.G. and A.R. Pitt, *Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12 (4), p. 153-156.
185. Zielińska, D., L. Nagels, and M.K. Piskula, *Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods*. Analytica Chimica Acta, 2008, 617 (1), p. 22-31.

186. He, J.B., X.Q. Lin, and J. Pan, *Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: A comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry*. *Electroanalysis*, 2005, 17 (18), p. 1681-1686.
187. Jin, G.-P., J.-B. He, Z.-B. Rui, and F.-S. Meng, *Electrochemical behavior and adsorptive stripping voltammetric determination of quercetin at multi-wall carbon nanotubes-modified paraffin-impregnated graphite disk electrode*. *Electrochimica Acta*, 2006, 51 (21), p. 4341-4346.
188. Dávila, M.M., M.P. Elizalde, J. Mattusch, and R. Wennrich, *Study of the composite electrodes carbon-polyvinyl chloride and carbon-polyvinyl chloride/Nafion by ex situ and in situ methods*. *Electrochimica Acta*, 2001, 46 (20), p. 3189-3197.
189. Aguilar-Sánchez, R., F. Áhuatl-García, M.M. Dávila-Jiménez, M.P. Elizalde-González, and M.R.G. Guevara-Villa, *Chromatographic and electrochemical determination of quercetin and kaempferol in phytopharmaceuticals*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38 (2), p. 239-249.
190. Pliuta, K., A. Chebotarev, A. Koicheva, K. Bevziuk, and D. Snigur, *Development of a novel voltammetric sensor for the determination of quercetin on an electrochemically pretreated carbon-paste electrode*. *Analytical Methods*, 2018, 10 (12), p. 1472-1479.
191. Yao, Y.-Y., L. Zhang, Z.-F. Wang, J.-K. Xu, and Y.-P. Wen, *Electrochemical determination of quercetin by self-assembled platinum nanoparticles/poly(hydroxymethylated-3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite modified glassy carbon electrode*. *Chinese Chemical Letters*, 2014, 25 (4), p. 505-510.
192. Zhang, W., L. Zong, G. Geng, Y. Li, and Y. Zhang, *Enhancing determination of quercetin in honey samples through electrochemical sensors based on highly porous polypyrrole coupled with nanohybrid modified GCE*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 257, p. 1099-1109.
193. Rajabi, H. and M. Noroozifar, *Modified Graphite Paste Electrode with Lewatit FO36 Nanoresin/Multi-Walled Carbon Nanotubes for Determination of Quercetin*. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2018, 54 (3), p. 234-242.
194. Reddaiah, K., T.M. Reddy, P. Raghu, and B.E. Kumara Swamy, *Electrochemical determination of quercetin at β -cyclodextrin modified chemical sensor: A voltammetric study*. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, 2012, 4 (2), p. 122-134.

195. Sun, S., M. Zhang, Y. Li, and X. He, *A molecularly imprinted polymer with incorporated Graphene oxide for electrochemical determination of quercetin*. Sensors (Switzerland), 2013, 13 (5), p. 5493-5506.
196. Niu, X., X. Li, W. Chen, W. Weng, C. Yin, R. Dong, W. Sun, and G. Li, *Three-dimensional reduced graphene oxide aerogel modified electrode for the sensitive quercetin sensing and its application*. Materials Science and Engineering C, 2018, 89, p. 230-236.
197. Vu, D.L., B. Ertek, Y. Dilgin, and L. Červenka, *Voltammetric determination of tannic acid in beverages using pencil graphite electrode*. Czech Journal of Food Sciences, 2015, 33 (1), p. 72-76.
198. Formica, J.V. and W. Regelson, *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. Food and Chemical Toxicology, 1995, 33 (12), p. 1061-1080.
199. Ganeshpurkar, A. and A.K. Saluja, *The Pharmacological Potential of Rutin*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2017, 25 (2), p. 149-164.
200. Ghorbani, A., *Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96, p. 305-312.
201. Dubey, S., A. Ganeshpurkar, A. Ganeshpurkar, D. Bansal, and N. Dubey, *Glycolytic enzyme inhibitory and antiglycation potential of rutin*. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 3 (2), p. 158-162.
202. Babazadeh, A., B. Ghanbarzadeh, and H. Hamishehkar, *Phosphatidylcholine-rutin complex as a potential nanocarrier for food applications*. Journal of Functional Foods, 2017, 33, p. 134-141.
203. ben Sghaier, M., A. Pagano, M. Mousslim, Y. Ammari, H. Kovacic, and J. Luis, *Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 84, p. 1972-1978.
204. Gullón, B., T.A. Lú-Chau, M.T. Moreira, J.M. Lema, and G. Eibes, *Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability*. Trends in Food Science & Technology, 2017, 67, p. 220-235.
205. Choi, J.-H., D.-W. Kim, S.-E. Park, H.-J. Lee, K.-M. Kim, K.-J. Kim, M.-K. Kim, S.-J. Kim, and S. Kim, *Anti-thrombotic effect of rutin isolated from Dendropanax morbifera Leveille*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120 (2), p. 181-186.

206. Kreft, S., M. Knapp, and I. Kreft, *Extraction of Rutin from Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47 (11), p. 4649-4652.
207. Nakamura, Y., S. Ishimitsu, and Y. Tonogai, *Effects of Quercetin and Rutin on Serum and Hepatic Lipid Concentrations, Fecal Steroid Excretion and Serum Antioxidant Properties*. JOURNAL OF HEALTH SCIENCE, 2000, 46 (4), p. 229-240.
208. Chang, C.-C., M.-H. Yang, H.-M. Wen, and J.-C. Chern, *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*. Journal of Food and Drug Analysis, 2002, 10 (3), p. 178-182.
209. Alam, P., M.F. Alajmi, A.H. Arbab, M.K. Parvez, N.A. Siddiqui, S.I. Alqasoumi, A.J. Al-Rehaily, M.S. Al-Dosari, and O.A. Basudan, *Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves of different Acacia species grown in Saudi Arabia*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2017, 25 (5), p. 715-723.
210. Mesquita, E. and M. Monteiro, *Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice*. Food Research International, 2018, 106, p. 54-63.
211. Attia, T.Z., *Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid mixture in their pure forms and combined dosage form*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 169, p. 82-86.
212. Zhou, C., Z. Xie, Z. Lei, Y. Huang, and G. Wei, *Simultaneous identification and determination of flavonoids in Dendrobium officinale*. Chemistry Central Journal, 2018, 12 (1), p. 40.
213. Apetrei, I.M. and C. Apetrei, *A modified nanostructured graphene-gold nanoparticle carbon screen-printed electrode for the sensitive voltammetric detection of rutin*. Measurement, 2018, 114, p. 37-43.
214. Niu, X., Z. Wen, X. Li, W. Zhao, X. Li, Y. Huang, Q. Li, G. Li, and W. Sun, *Fabrication of graphene and gold nanoparticle modified acupuncture needle electrode and its application in rutin analysis*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255, p. 471-477.
215. Zeng, B., S. Wei, F. Xiao, and F. Zhao, *Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 115 (1), p. 240-246.

216. Magarelli, G., L.H.C. Lima, J.G. da Silva, J.R. SouzaDe, and C.S.P. de Castro, *Rutin and total isoflavone determination in soybean at different growth stages by using voltammetric methods*. *Microchemical Journal*, 2014, 117, p. 149-155.
217. Zoulis, N.E. and C.E. Efstathiou, *Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids*. *Analytica Chimica Acta*, 1996, 320 (2), p. 255-261.
218. Zhang, Y. and J. Zheng, *Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode*. *Talanta*, 2008, 77 (1), p. 325-330.
219. Sun, W., M. Yang, Y. Li, Q. Jiang, S. Liu, and K. Jiao, *Electrochemical behavior and determination of rutin on a pyridinium-based ionic liquid modified carbon paste electrode*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48 (5), p. 1326-1331.
220. Česká republika od roku 1898 v číslech - 2017, *Zemědělství a lesnictví, Tab.09.01 Vybrané ukazatele zemědělství (1989-2017)*. ČSÚ. 2018 [cited 2018]; Available from: <https://www.czso.cz/csu/czso/ceska-republika-od-roku-1989-v-cislech-2017-dsf60agmth#09>.
221. Lewandowski, I., J. Weger, A. van Hooijdonk, K. Havlickova, J. van Dam, and A. Faaij, *The potential biomass for energy production in the Czech Republic*. *Biomass and Bioenergy*, 2006, 30 (5), p. 405-421.
222. Kondili, E.M. and J.K. Kaldellis, *Biofuel implementation in East Europe: Current status and future prospects*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2007, 11 (9), p. 2137-2151.
223. Kasprzak, M.M., J.G.M. Houdijk, O.A. Olukosi, H. Appleyard, S.P.J. Kightley, P. Carre, and J. Wiseman, *The influence of oil extraction process of different rapeseed varieties on the ileal digestibility of crude protein and amino acids in broiler chickens*. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 227, p. 68-74.
224. Hoffmann, A., S. Görlich, H. Steingass, H. Terry, M. Schollenberger, K. Hartung, and R. Mosenthin, *Milk production and milk fatty acids in dairy cows fed crushed rapeseed or rapeseed oil*. *Livestock Science*, 2016, 190, p. 31-34.
225. Kachel-Jakubowska, M., A. Kraszkiwicz, E. Lorencowicz, M. Koszel, and A. Przywara, *Effects of Thermal Treatment of Seeds on Quality and Oxidative Stability of Oils*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2015, 7, p. 255-259.

226. Konuskan, D.B., M. Arslan, and A. Oksuz, *Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018.
227. Matthäus, B., 6 - *Oxidation of edible oils*, in *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. 2010, Woodhead Publishing, p. 183-238.
228. Tsiaka, T., D.C. Christodouleas, and A.C. Calokerinos, *Development of a chemiluminescent method for the evaluation of total hydroperoxide content of edible oils*. Food Research International, 2013, 54 (2), p. 2069-2074.
229. Bezzi, S., S. Loupassaki, C. Petrakis, P. Kefalas, and A. Calokerinos, *Evaluation of peroxide value of olive oil and antioxidant activity by luminol chemiluminescence*. Talanta, 2008, 77 (2), p. 642-646.
230. Yang, M., C. Zheng, Q. Zhou, F. Huang, C. Liu, and H. Wang, *Minor components and oxidative stability of cold-pressed oil from rapeseed cultivars in China*. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 29 (1), p. 1-9.
231. Szydłowska-Czeraniak, A., G. Karlovits, G. Hellner, and E. Szyk, *Effect of enzymatic and hydrothermal treatments of rapeseeds on quality of the pressed rapeseed oils: part II. Oil yield and oxidative stability*. Process Biochemistry, 2010, 45 (2), p. 247-258.
232. Laddomada, B., G. Colella, M. Tufariello, M. Durante, M. Angiuli, G. Salvetti, and G. Mita, *Application of a simplified calorimetric assay for the evaluation of extra virgin olive oil quality*. Food Research International, 2013, 54 (2), p. 2062-2068.
233. Gonzaga, F.B. and C. Pasquini, *A new method for determination of the oxidative stability of edible oils at frying temperatures using near infrared emission spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 2006, 570 (1), p. 129-135.
234. Vieira, F.S. and C. Pasquini, *Near infrared emission photometer for measuring the oxidative stability of edible oils*. Analytica Chimica Acta, 2013, 796, p. 101-107.
235. Velasco, J., A. Morales-Barroso, M.V. Ruiz-Méndez, and G. Márquez-Ruiz, *Quantitative determination of major oxidation products in edible oils by direct NP-HPLC-DAD analysis*. Journal of Chromatography A, 2018, 1547, p. 62-70.
236. Wójcicki, K., I. Khmelinskii, M. Sikorski, and E. Sikorska, *Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils*. Food Chemistry, 2015, 187, p. 416-423.

237. Zhang, W., N. Li, Y. Feng, S. Su, T. Li, and B. Liang, *A unique quantitative method of acid value of edible oils and studying the impact of heating on edible oils by UV-Vis spectrometry*. Food Chemistry, 2015, 185, p. 326-332.
238. Gancarz, M., J. Wawrzyniak, M. Gawrysiak-Witulska, D. Wiącek, A. Nawrocka, M. Tadla, and R. Rusinek, *Application of electronic nose with MOS sensors to prediction of rapeseed quality*. Measurement, 2017, 103, p. 227-234.
239. Majchrzak, T., W. Wojnowski, T. Dymerski, J. Gębicki, and J. Namieśnik, *Electronic noses in classification and quality control of edible oils: A review*. Food Chemistry, 2018, 246, p. 192-201.
240. Borges, T.H., A.M. Peres, L.G. Dias, I. Seiquer, and J.A. Pereira, *Application of a potentiometric electronic tongue for assessing phenolic and volatile profiles of Arbequina extra virgin olive oils*. LWT, 2018, 93, p. 150-157.
241. Rodrigues, N., L.G. Dias, A.C.A. Veloso, J.A. Pereira, and A.M. Peres, *Monitoring olive oils quality and oxidative resistance during storage using an electronic tongue*. LWT, 2016, 73, p. 683-692.
242. Dias, L.G., A. Fernandes, A.C.A. Veloso, A.A.S.C. Machado, J.A. Pereira, and A.M. Peres, *Single-cultivar extra virgin olive oil classification using a potentiometric electronic tongue*. Food Chemistry, 2014, 160, p. 321-329.
243. Harzalli, U., N. Rodrigues, A.C.A. Veloso, L.G. Dias, J.A. Pereira, S. Oueslati, and A.M. Peres, *A taste sensor device for unmasking admixing of rancid or winey-vinegary olive oil to extra virgin olive oil*. Computers and Electronics in Agriculture, 2018, 144, p. 222-231.
244. Prata, R., J. Pereira, A., N. Rodrigues, L. Dias, G., A.C.A. Veloso, S. Casal, A. Peres, M., and N. M., *Olive Oil Total Phenolic Contents and Sensory Sensations Trends during Oven and Microwave Heating Processes and Their Discrimination Using an Electronic Tongue*. Journal of Food Quality, 2018, 2018, p. 10.
245. Oliveri, P., M.A. Baldo, S. Daniele, and M. Forina, *Development of a voltammetric electronic tongue for discrimination of edible oils*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395 (4), p. 1135-1143.
246. Lin, X., Y. Ni, and S. Kokot, *Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants*. Analytica Chimica Acta, 2013, 765, p. 54-62.

247. Tomášková, M., J. Chýlková, V. Jehlička, T. Navrátil, I. Švancara, and R. Šelešovská, *Simultaneous determination of BHT and BHA in mineral and synthetic oils using linear scan voltammetry with a gold disc electrode*. *Fuel*, 2014, 123, p. 107-112.
248. Gulaboski, R., V. Mirčeski, and S. Mitrev, *Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils*. *Food Chemistry*, 2013, 138 (1), p. 116-121.
249. Capannesi, C., I. Palchetti, M. Mascini, and A. Parenti, *Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils*. *Food Chemistry*, 2000, 71 (4), p. 553-562.
250. McBride, H.D. and D.H. Evans, *Rapid voltammetric method for the estimation of tocopherols and antioxidants in oils and fats*. *Analytical Chemistry*, 1973, 45 (3), p. 446-449.
251. Vikraman, A.E., Z. Rasheed, L. Rajith, L.A. Lonappan, and G.K. Krishnapillai, *MWCNT-Modified Gold Electrode Sensor for the Determination of Propyl Gallate in Vegetable Oils*. *Food Analytical Methods*, 2013, 6 (3), p. 775-780.
252. Ceballos, C. and H. Fernández, *Synthetic antioxidants determination in lard and vegetable oils by the use of voltammetric methods on disk ultramicroelectrodes*. *Food Research International*, 2000, 33 (5), p. 357-365.
253. Clough, A.E., *The determination of tocopherols in vegetable oils by square-wave voltammetry*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1992, 69 (5), p. 456-460.
254. Li, S.-G., W.-T. Xue, and H. Zhang, *Voltammetric Behavior and Determination of Tocopherol in Vegetable Oils at a Polypyrrole Modified Electrode*. *Electroanalysis*, 2006, 18 (23), p. 2337-2342.
255. Hu, M. and C. Jacobsen, *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. 2016, AOCS Press.
256. Adhoum, N. and L. Monser, *Electrochemical sensor for hydroperoxides determination based on Prussian blue film modified electrode*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 133 (2), p. 588-592.
257. Gambarra-Neto, F.F., G. Marino, M.C.U. Araújo, R.K.H. Galvão, M.J.C. Pontes, E.P.d. Medeiros, and R.S. Lima, *Classification of edible vegetable oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis*. *Talanta*, 2009, 77 (5), p. 1660-1666.

258. Apetrei, C., M.L. Rodríguez-Méndez, and J.A. de Saja, *Modified carbon paste electrodes for discrimination of vegetable oils*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 111-112, p. 403-409.
259. Tsopelas, F., D. Konstantopoulos, and A.T. Kakoulidou, *Voltammetric fingerprinting of oils and its combination with chemometrics for the detection of extra virgin olive oil adulteration*. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1015, p. 8-19.

8 Seznam publikací

Publikace v zahraničních a mezinárodních recenzovaných časopisech (časopisy s IF):

DL. Vu, S. Žabčíková, L. Červenka, B. Ertek, Y. Dilgin: Sensitive voltammetric determination of natural flavonoid quercetin on a disposable graphite lead, *Food Technology and Biotechnology*, 53 (4), p.: 379 – 384, 2015, doi: 10.17113/ftb.53.04.15.4176.

L. Červenka, L. Hloušková, S. Žabčíková: Moisture adsorption isotherms and thermodynamic properties of green and roasted Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), *Food Bioscience*, 12, p.: 122 – 127, 2015, doi: 10.1016/j.fbio.2015.10.001.

M. Pejchalová, S. Žabčíková, L. Šilhová, D. Šilha, I. Brožková, M. Hašlová: Presence of *Arcobacter* species in pet cats and dogs in the Czech Republic, *Veterinární medicína*, 61 (8), p.: 449 – 455, 2016, doi: 10.17221/273/2015-VETMED.

S. Žabčíková, T. Mikysek, L. Červenka, M. Sýs: Electrochemical study and determination of all-*trans* retinol at carbon paste electrode modified by surfactant, *Food Technology and Biotechnology*, 56 (3), 2018, doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5618, v tisku.

Publikace v ostatních vědeckých recenzovaných časopisech:

L. Červenka, S. Žabčíková, L. Křivská: Determination of acrylamide using ruthenium dioxide modified carbon paste electrode, *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology*, 21, p.: 21 - 29, ISBN 978-80-7395-898-5.

S. Žabčíková, L. Červenka: Modified carbon paste electrode as a tool for the evaluation of oxidative stability of rapeseed oil, *Potravinářstvo*, 9 (1), p.: 347 – 351, 2015, doi:10.5219/432.

S. Žabčíková, DL. Vu, L. Červenka, V. Tambor, M. Vašatová: Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparation and fruit juice using modified carbon paste electrode, *Potravinářstvo*, 10 (1), p.: 255 – 259, 2016, doi:10.5219/586.

S. Žabčíková, P. Kučerová, L. Červenka: Quercetin or glycine reaction products with acrylamide: A quantitative approach to acrylamide detection using a pencil graphite electrode, Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology, 22, p.: 15 - 22, ISBN 978-80-7560-015-8.

M. Sýs, S. Žabčíková, L. Červenka, K. Vytřas: Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination, Potravinárstvo, 10 (1), p.: 260 – 264, 2016, doi:10.5219/587.

M. Sýs, S. Žabčíková, L. Červenka, K. Vytřas: Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol, Potravinárstvo, 11 (1), p.: 96 – 105, 2017, doi:10.5219/713.

S. Žabčíková, A. Nallbani, M. Sýs, T. Mikysek, L. Červenka: Square wave voltammetry at carbon paste electrode modified with surfactant for alpha tocopheryl acetate determination in cosmetics, Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences, 12 (1), p.: 135 – 142, 2018, doi:10.5219/881.

Přednášky na konferencích v zahraničí

S. Žabčíková, M. Sýs, L. Červenka: Optimization of retinol extraction into the carbon paste electrode from milk samples, YISAC, Benátky, Itálie, 28. – 30. 6. 2017.

Postery na konferencích v zahraničí

S. Žabčíková, L. Červenka: Modified carbon paste electrode as a tool for the evaluation of the oxidative stability of rapeseed oil, Bezpečnosť a kontrola potravín, Smolenice, Slovensko, 26. – 27. 3. 2015.

S. Žabčíková, DL. Vu, L. Červenka, V. Tambor, M. Vašatová: Determination on ascorbic acid in pharmaceutical preparation and fruit juice using modified carbon paste electrode, Bezpečnosť a kontrola potravín, Piešťany, Slovensko, 6. – 8. 4. 2016.

S. Žabčíková, L. Křivská, M. Sýs, L. Červenka: Using of complex reactions in voltammetric determination of acrylamide, Bezpečnosť a kontrola potravín, Piešťany, Slovensko, 30. – 31. 3. 2017.

S. Žabčíková, A. Nallbani, M. Sýs, T. Mikysek, L. Červenka: Square wave voltammetry at carbon paste electrode modified with surfactant for alpha tocopheryl acetate determination in cosmetics, *Bezpečnosť a kontrola potravín*, Piešťany, Slovensko, 21. – 23. 3. 2018.

Přednášky na domácích konferencích

S. Žabčíková, L. Šilhová, M. Pejchalová: Výskyt bakterií rodu *Arcobacter* u domácích mazlíčků – koček a psů, *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVI.*, Ovčárna pod Pradědem, 9. - 11. 4. 2014, sborník str. 145 – 152, ISBN 978-80-7395-821-3.

S. Žabčíková, L. Červenka, T. Tyemnyák: Nutriční hodnocení tavených sýrů, *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII.*, Ovčárna pod Pradědem, 8. – 10. 4. 2015, sborník str. 159 – 167, ISBN 978-80-7395-926-5.

S. Žabčíková, M. Sýs, L. Červenka, M. Benešová: Stanovení rutinu s využitím uhlíkové pastové elektrody modifikované silikagelem, *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII.*, Ovčárna pod Pradědem, 30. – 1. 4. 2016, sborník str. 159 – 167, ISBN 978-80-7560-005-9.

S. Žabčíková, L. Červenka, M. Sýs: Přehled elektroanalytických přístupů stanovení akrylamidu, *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII.*, Ovčárna pod Pradědem, Česká republika, 25. – 27. 4. 2018, sborník v tisku, ISBN 978-80-7560-154-4.

Ostatní příspěvky ve sbornících konferencí

L. Červenka, M. Sýs, S. Žabčíková, DL. Vu, K. Vytřas: Využití uhlíkové pastové elektrody pro studium přilnavosti bakterie *Staphylococcus epidermidis*, *Bezpečnosť a kontrola potravín*, Zborník prác z XII. medzinárodnej vedecké konferencie, Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, p.: 54 – 58, 2015, ISBN 978-80-552-1314-9.

S. Žabčíková, L. Červenka, M. Sýs, L. Křivská: Využití komplexotvorných reakcí pro voltametrické stanovení akrylamidu, *Bezpečnosť a kontrola potravín*, Zborník prác z XIV. medzinárodnej vedecké konferencie, Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, p.: 296 – 299, 2017, ISBN 978-80-552-1649-2.

S. Žabčíková, M. Sýs, L. Červenka, T. Mikysek, K. Vytřas: Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných tenzidy, L. seminář o tenzidech a detergentech, sborník přednášek, p.: 73 - 79, 2017, ISBN 978-80-7560-098-1.