

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

Možnosti voltametrického stanovení hydroxokobalaminu s využitím  
bórem dopované diamantové elektrody

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Stýblová**  
Osobní číslo: **C20559**  
Studijní program: **N0711A130014 Udržitelný rozvoj v chemii a technologii**  
Téma práce: **Možnosti voltametrického stanovení hydroxokobalaminu s využitím bórem dopované diamantové elektrody**  
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši týkající se voltametrie se zaměřením na pevné pracovní elektrody. V této části se věnujte zejména bórem dopovaným diamantovým elektrodám (BDDE) a jejich aplikačním možnostem v analýze biologicky aktivních látek. Zpracujte problematiku elektrochemického chování hydroxokobalaminu (OH-CBL), jedné z forem vitamínu B12, a kobalaminů obecně. Pozornost zaměřte na možnosti jejich voltametrického stanovení.
2. V rámci experimentální části práce se věnujte studiu a popisu voltametrického chování OH-CBL na BDDE za různých podmínek. Experimentálně nalezněte optimální podmínky pro stanovení této látky. Zjistěte vliv potenciálních interferujících látek při voltametrické analýze.
3. Navržený postup nejprve ověřte při stanovení OH-CBL v modelových roztocích. Následně vypracovanou metodu aplikujte při analýze reálných vzorků (vitaminové preparáty, příp. biologické vzorky).
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Janíková, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství  
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství  
Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

## Prohlášení autora

Prohlašuji:

Práci s názvem „Možnosti voltametričkého stanovení hydroxokobalaminu s využitím bórem dopované diamantové elektrody“ 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2022

Bc. Iveta Stýblová v. r.

## **Poděkování**

Chtěla bych zde poděkovat vedoucí mé práce paní Ing. Lence Janíkové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a poskytnuté rady během zpracování této diplomové práce. Dále děkuji za konzultační podporu paní doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 20-01589S).

## **Anotace**

Tato diplomová práce se věnuje studiu voltametričkého chování hydroxokobalaminu, jednoho z derivátů vitamínu B<sub>12</sub>, na bórem dopované diamantové elektrodě a vývoji metody jeho stanovení. Teoretická část obsahuje stručné informace o voltametii konkrétně o její historii, běžně používaných voltametričských technikách a pracovních elektrodách. Další část je věnována vlastnostem kobalaminů a jejich voltametričkému chování. V experimentální části je popsána optimalizace podmínek stanovení s využitím diferenční pulzní voltametrie. Navržená metoda byla úspěšně použita ke stanovení hydroxokobalaminu v potravinových doplňcích stravy.

## **Klíčová slova**

Voltametrie, hydroxokobalamin, vitamín B<sub>12</sub>, bórem dopovaná diamantová elektroda, doplňky stravy.

## **Title**

Possibilities of voltammetric determination of hydroxocobalamin using boron doped diamond electrode

## **Annotation**

This diploma thesis deals with the study of voltammetric behavior of hydroxocobalamin, one derivative of the vitamin B<sub>12</sub> group, on a boron doped diamond electrode and it deals with the development of voltammetric method for its determination as well. The theoretical part contains brief information about voltammetry, specifically about its history, commonly used voltammetric techniques and working electrodes. The second part is devoted to the properties of cobalamins and their voltammetric behavior. In the experimental part, the optimization of parameters of differential pulse voltammetric technique was performed. The developed method was successfully employed for a determination of hydroxocobalamin in food supplements.

## **Keywords**

Voltammetry, hydroxocobalamin, vitamin B<sub>12</sub>, boron doped diamond electrode, food supplements.

# Obsah

Úvod.....	12
1.1 Voltametrie.....	13
1.1.1 Uspořádání elektrochemického článku .....	13
1.1.2 Polarizace elektrod .....	14
1.1.3 Voltametrické křivky .....	16
1.1.4 Voltametrické techniky .....	17
1.2 Pracovní elektrody ve voltametrii .....	21
1.2.1 Pracovní elektrody na bázi rtuti .....	21
1.2.2 Pevné a pastové pracovní elektrody .....	23
1.2.3 Bórem dopovaná diamantová elektroda.....	27
1.3 Kobalaminy (vitamín B <sub>12</sub> ).....	32
1.3.1 Hydroxokobalamin (B <sub>12a</sub> ) .....	34
1.3.2 Voltametrické chování kobalaminů .....	34
2 Experimentální část.....	40
2.1 Použité chemikálie .....	40
2.2 Přístrojové vybavení .....	40
2.3 Pracovní postupy .....	42
2.3.1 Voltametrická měření.....	42
2.3.2 Analýza potravinových doplňků stravy .....	43
3 Výsledky a diskuse.....	45
3.1 Vliv pH základního elektrolytu na voltametrického chování OH-CBL na BDDE .....	45
3.2. Vliv rychlosti polarizace na voltametrické chování OH-CBL na BDDE .....	52
3.4 Vývoj metody voltametrického stanovení OH-CBL na BDDE.....	55
3.4.1 Optimalizace parametrů DPV (oxidační pík 1).....	55
3.4.2 Optimalizace parametrů DPV (redukční pík RED) .....	58

3.4.3 Analýza modelových roztoků OH-CBL s využitím BDDE.....	62
3.4.4 Interferenční studie .....	65
3.5 Analýza vitamínových doplňků stravy .....	70
Závěr .....	73



## Seznam zkratk a značek

AA	kyselina askorbová (ascorbic acid)
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie (adsorptive stripping voltammetry)
Ado-CBL	deoxyadenosylkobalamin
AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda (silver solid amalgam electrode)
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie (anodic stripping voltammetry)
ATP	adenosintrifosfát
BA	kyselina barbiturová (barbituric acid)
BDDE	bórem dopovaná diamantová elektroda (boron doped diamond electrode)
BDDFE	bórem dopovaná diamantová filmová elektroda (boron doped diamond film electrode)
BiFE	bismutová filmová elektroda (bismuth film electrode)
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr (Britton-Robinson buffer)
C	kreatinin (creatinine)
CBL	kobalamin (cobalamin)
C-C	vazba uhlík-uhlík
CN <sup>-</sup>	kyanidy
CN-CBL	kyanokobalamin (cyanocobalamin)
CNS <sup>-</sup>	thiokyanatany
CNT	uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes)
CoA	koenzym A
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie (cathodic stripping voltammetry)
CuSAE	měděná pevná amalgámová elektroda (copper solid amalgam electrode)
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
CVD	chemická depozice z par (chemical vapor deposition)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DME	kapající rtuťová elektroda (dropping mercury electrode)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
$E$	potenciál, napětí [V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [V]
$E_{in}$	počáteční potenciál [V]

$E_{\text{fin}}$	konečný potenciál [V]
$E_{\text{p}}$	poloha (potenciál) píku [V]
$E_{\text{pol}}$	polarizační napětí [V]
$E_{\text{prac}}$	potenciál pracovní elektrody [V]
$E_{\text{ref}}$	potenciál referentní elektrody [V]
$E_{\text{switch}}$	potenciál obratu [V]
FA	kyselina listová (folic acid)
G	glukóza (glucose)
$\Delta G$	změna Gibbsovy energie [J]
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
HC	haptokorin (haptocorrin)
HMDE	visící rtuťová elektroda (hanging mercury drop electrode)
HoCySH	homocystein (homocysteine)
HPHT	vysoký tlak a vysoká teplota (high-pressure and high-temperature)
$I$	elektrický proud [A]
$I_{\text{c}}$	kapacitní (nabíjecí) proud [A]
$I-E$	závislost elektrického proudu na vkládaném napětí
IF	vnitřní faktor (intrinsic factor)
$I_{\text{p}}$	výška píku [A]
LD	limit/mez detekce (limit of detection) [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
LDR	lineární dynamický rozsah (linear dynamic range) [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
LQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification) [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
LSV	lineární voltametrie (linear sweep voltammetry)
m-AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem (mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode)
Me-CBL	metylkobalamin (methylcobalamin)
MeSAE	kovová pevná amalgámová elektroda (metal solid amalgam electrode)
MFE	rtuťová filmová elektroda (mercury film electrode)
MWNT	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes)
OH-CBL	hydroxokobalamin (hydroxocobalamin)
p-AgSAE	leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda (polished silver solid amalgam electrode)
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbons)

PBHQ	2,2'-(1,4-fenylendivinylen) bis-8-hydroxychinaldin
PGE	tužková grafitová elektroda (pencil graphite electrode)
PVDF	polyvinylidenfluorid
RED	redukční signál OH-CBL naměřený na BDDE
S	sacharóza (sucrose)
SbFE	antimonová filmová elektroda (antimony film electrode)
SCE	nasyčená kalomelová elektroda (saturated calomel electrode)
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda (static mercury drop electrode)
SV	rozpuštěcí voltametrie (stripping voltammetry)
SWNT	jednotěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes)
SWV	square wave voltametrie (square wave voltammetry)
U	močovina (urea)
UA	kyselina močová (uric acid)
TC	transkobalamin (transcobalamin)
TCI	transkobalamin I (transcobalamin I)
TCII	transkobalamin II (transcobalamin II)
ŽP	životní prostředí

## Úvod

Hydroxokobalamin (OH-CBL, vitamín B<sub>12a</sub>) řadíme do skupiny kobalaminů souhrnně označovaných jako vitamín B<sub>12</sub>. Kobalaminy jsou ve vodě rozpustné látky se základním skeletem tvořeným korinovým kruhem, v jehož středu se nachází centrální atom kobaltu. Dalšími zástupci této skupiny jsou kyanokobalamin, adenosylkobalamin a methylkobalamin. S nejstabilnější umělou formou kyanokobalaminem se nejčastěji setkáme v potravinových doplňcích. Zbylé dvě varianty jsou obvyklými přírodními formami, které slouží jako kofaktory enzymů. V organismu kobalaminy hrají důležitou roli pro správné fungování neurologických systémů a také přispívají k tvorbě červených krvinek. Zdrojem pro organismus je především konzumace živočišných potravin, jako jsou např. mléčné výrobky, maso, vejce nebo játra. Deficit může mít několik příčin od poruch vstřebávání v organismu až po nedostatečný příjem potravou. Nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> vede k makrocytóze krvinek, poruchám syntézy DNA nebo k neurologickým poruchám. Nedostatek se léčí podáváním vhodných vitamínových doplňků či medikamentů. Z hlediska terapeutického použití je nejvhodnější právě hydroxokobalamin, protože oproti kyanokobalaminu setrvává déle v těle pacienta. Nedostatek vitamínu B<sub>12</sub> se diagnostikuje z krevního séra, kde se nachází až v pikomolárních koncentracích. Pro správnou léčbu je nezbytné znát i množství vitamínu B<sub>12</sub> v podávaných přípravcích. K tomu je zapotřebí selektivní a vysoce citlivá metoda. Elektrochemické metody, konkrétně voltametrie, poskytují v tomto případě, oproti jiným analytickým metodám, jednoduchou a časově nenáročnou variantu. V počátcích byla používána především starší metoda polarografie, jejímž vynálezcem je prof. Heyrovský, která využívala kapající rtuťovou elektrodu jako pracovní elektrodu. V dnešní době stále dochází k rozvoji metod i používaných elektrod, kdy rtuťové elektrody jsou nahrazovány za elektrody z ušlechtilých kovů nebo elektrodami na bázi uhlíku. Příkladem je bórem dopovaný diamant, jehož výhodou jsou jak mechanické vlastnosti, možnosti úpravy povrchu, tak z hlediska elektrochemické analýzy široké potenciálové okno zahrnující kladné i záporné potenciály.

Většina dosud publikovaných článků týkající se voltametrického stanovení kobalaminů se věnovala především kyanokobalaminu. Z tohoto důvodu se tato diplomová práce zaměřila na studium voltametrického chování hydroxokobalaminu a jako pracovní elektroda byla zvolena bórem dopovaná diamantová elektroda jako perspektivní elektroanalytický nástroj. Kromě studia a popisu elektrochemického chování zmíněného analytu, bylo cílem této práce vyvinout jednoduchou a citlivou voltametrickou metodu stanovení.

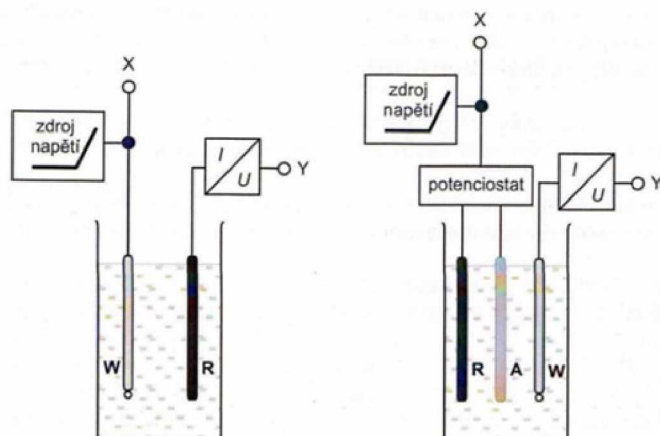
# 1 Teoretická část

## 1.1 Voltametrie

Voltametrie je jednou z hojně využívaných elektroanalytických metod. Za zakladatele je právem považován prof. Jaroslav Heyrovský. Za svůj objev oscilopolarografie získal v roce 1959 Nobelovu cenu v oblasti chemie. Profesor Heyrovský a jeho následovníci využívaly pro polarografické analýzy kapající rtuťovou elektrodu (DME). Tato elektroanalytická technika je označována jako polarografie a je předchůdkyní voltametrie. Pro voltametrii jsou charakteristické stacionární pracovní elektrody zejména ty na bázi kovů (Pt, Au) nebo uhlíku ale také visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), která úspěšně nahradila elektrodu kapající. Více o pracovních elektrodách bude popsáno v kapitole 1.2 [1, 2].

### 1.1.1 Uspořádání elektrochemického článku

Principem polarografických, resp. voltametrických měření je sledování vztahu mezi elektrickým proudem ( $I$ ) procházejícím pracovní elektrodou a elektrickým napětím ( $E$ ) vloženým z vnějšího zdroje. Voltametrická křivka je znázorněním této závislosti. Samotné měření probíhá prostřednictvím elektrochemického článku. Původně se využívalo dvouelektrodrového zapojení, které postupně nahradilo uspořádání tříelektrodrové. Dvouelektrodrové uspořádání zahrnuje pracovní elektrodu, na kterou se vkládá rostoucí napětí, a elektrodou referentní neboli srovnávací, u které je kontakt s analyzovaným roztokem zajištěn prostřednictvím solného můstku. Mezi nejpoužívanější typy referentních elektrod patří argentschloridová, kalomelová nebo merkurosulfátová. Tříelektrodrové uspořádání obsahuje kromě elektrody pracovní a referentní, ještě elektrodu pomocnou, která je nejčastěji na bázi Pt nebo C. Základní schéma elektrochemického článku s dvou a tříelektrodrovým uspořádáním pro voltametrická (polarografická) měření je zobrazeno na obrázku 1 [1, 3]. Problémem dvouelektrodrového uspořádání je nemožnost určit přesnou hodnotu potenciálu pracovní elektrody. Důvodem je ztráta vloženého napětí, která je způsobena odporem roztoku. Proto je dnes častěji užíváno zapojení tříelektrodrového, ve kterém je tento problém vyřešen právě pomocí elektrody pomocné. V tříelektrodrovém zapojení je tedy pracovní a pomocná elektroda dvojicí elektrod, kterými protéká proud. Z rozdílů potenciálů mezi pracovní a referentní elektrodou, která není zatížena elektrickým proudem, se vyhodnocuje potenciál pracovní elektrody [1, 3].



**Obrázek 1** Schéma zapojení dvoelektrodového a třielektrodového uspořádání [3],

*W* – pracovní elektroda (working electrode); *R* – referenční elektroda (reference electrode); *A* – pomocná elektroda (auxiliary electrode); *I* – elektrický proud [A]; *U* – vkládané napětí [V]

### 1.1.2 Polarizace elektrod

Pokud prochází elektrochemickým článkem proud, což vede k chemickým změnám v analyzovaném roztoku, dochází ke změnám v potenciálech elektrod. Elektrody, jejichž potenciál po průchodu proudem nabývá rozdílné hodnoty od rovnovážného stavu, označujeme jako polarizovatelné (typicky pracovní elektrody). Naopak elektrody, které nevykazují změny potenciálu, jsou charakterizovány jako nepolarizovatelné (charakteristické pro elektrody referenční). Elektroaktivní látky, které podléhají elektrodovým reakcím, označujeme jako depolarizátory, vzhledem k tomu, že míru depolarizace snižují či ji úplně eliminují [1, 4]. Celková polarizace je součtem dílčích polarizací, které se od sebe odlišují způsobem vzniku. Polarizace může probíhat třemi způsoby. Polarizace vzniklá přesunem depolarizátoru k elektrodě se nazývá koncentrační. Druhým typem je polarizace aktivační, která je spojená s transportem náboje. Zdrojem ohmické polarizace je odpor proudu protékajícím článkem. Tento typ polarizace je charakterizován ohmickým spádem, popsáním rovnicí (1) a výpočet výsledného napětí je zobrazen v rovnici (2), kde  $U$  je vkládané napětí,  $I$  je měřený elektrický proud,  $R$  je elektrický odpor,  $E_{\text{celk}}$  je výsledné napětí a  $E_{\text{pol}}$  vyjadřuje hodnotu polarizačního napětí [4].

$$U = I \cdot R \quad (1)$$

$$E_{\text{celk}} = U + E_{\text{pol}} \quad (2)$$

Polarizovatelná elektroda je typická tím, že se polarizuje i za průchodu nízkého proudu. Odečtením potenciálů polarizovatelné a nepolarizovatelné elektrody získáme hodnotu  $E_{pol}$  [5]. Pracovní elektroda může představovat anodu, tzn. kladně nabitou elektrodu, která bude přitahovat záporně nabitě ionty a bude na ní probíhat oxidace. Druhým případem je, že může být katodou, tzn. záporně nabitou elektrodou, která bude přitahovat kladné ionty a bude na ní probíhat redukce. Je zvykem, že anodický proud se označuje s kladným a katodický se záporným znaménkem. Jak je uvedeno výše, potenciál pracovní elektrody je vždy vztažen k potenciálu referenční elektrody. Na ose x se pak vynášá rozdíl těchto potenciálů, tzn. rozdíl potenciálu referenční, který je konstantní, a pracovní elektrody, který se mění ( $E_{ref} - E_{prac}$ ). Platí, že při rostoucím napětí klesá potenciál pracovní elektrody katody. V případě anody při rostoucím napětí má potenciál rostoucí charakter [3-5].

U voltametrie a polarografie platí, že množství analytu mimo dosah elektrod pokládáme za konstantní. Je to způsobeno tím, že většina dějů probíhá pouze u povrchu elektrod v tzv. elektrické dvojvrstvě, která vzniká na rozhraní elektroda-elektrolyt v důsledku elektrostatických interakcí. Elektrodivou dvojvrstvou si lze představit jako dvě vrstvy (jedna na straně elektrody a druhá na straně elektrolytu) orientovaných opačně nabitých částic [1, 4]. Sledované elektrodivé děje se skládají z dílčích procesů, jako je přesun analytu směrem k elektrodě, vznik produktu na elektrodě a přenos látky od elektrody zpět do roztoku. Látka je k elektrodivému mezifázi transportována třemi způsoby [1, 3-5]:

- Difuzí – Hnací silou difúze je rozdíl koncentrací v blízkosti elektrody. U povrchu elektrody klesne množství analytu vlivem probíhající elektrolýzy.
- Migrací – Migrace se týká částic s nábojem, které se transportují k elektrodě díky působení elektrického pole mezi dvěma elektrodami.
- Konvekci – Transport částic probíhá vlivem teplotního spádu nebo vlivem míchání roztoku [1, 3-5].

Proud procházející elektrodou, která je zapojena jako katoda, resp. anoda se nazývá katodický, resp. anodický a jeho hodnotu získáme, pokud sečteme migrační, konvekční a difúzní proud. Pro potřeby měření koncentrace elektroaktivní látky v roztoku je důležité, aby byla velikost migračního i konvekčního proudu neměnná a nedocházelo ke změnám souvisejícími se změnou koncentrace stanovované látky. Konvekci a migraci vyloučíme pomocí přidavku nosného elektrolytu, který je koncentrovanější než stanovovaná látka. Dojde tak k eliminaci migrace a převážná část náboje je transportována částicemi nosného elektrolytu. Konvekce je eliminována

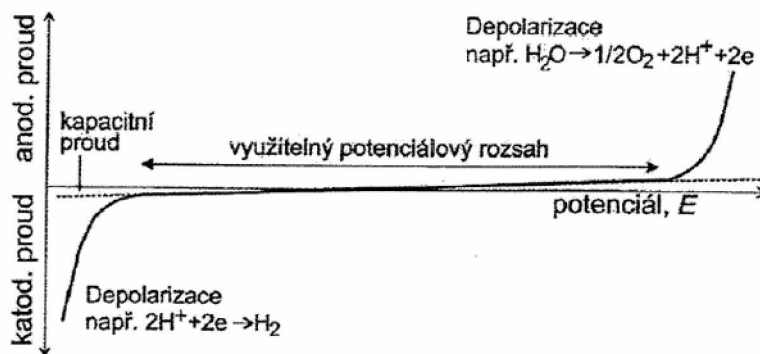
tím, že v roztoku neprobíhá míchání [1, 3, 5]. Odpor roztoku po odstranění vlivu migrace a konvekce významně poklesne. Pokud se látka vyloučí na povrchu elektrody dochází ke snížení její koncentrace v elektrolytu. Iniciací tohoto děje je vyšší hodnota potenciálu na pracovní elektrodě ve srovnání s hodnotou rozkladného potenciálu analytu. Jelikož bereme v úvahu pouze difúzní transport částic směrem k elektrodě, protékající proud nazýváme difúzní. Míra vylučování analytu je úměrná velikosti napětí, které na elektrodu vkládáme. Limitním difúzním proudem je nazývána hodnota proudu, při které již nedochází k vylučování analytu při nárůstu napětí. Je to způsobeno vyčerpáním veškerého analytu nacházejícího se u povrchu elektrody. Velikost limitního difúzního proudu odpovídá rychlosti difúze. Jeho hodnota se vypočte podle Ilkovičovy rovnice (3), např. v [3-6], kde  $I_D$  – difúzní proud,  $K$  – konstanta,  $z_i F$  - faradický člen (kde  $z_i$ -počet elektronů a  $F$  – Faradayova konstanta (96 485,3 C mol<sup>-1</sup>)),  $D_x$  – difúzní koeficient [m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>],  $m_{Hg}$  – hmotnostní průtok rtuti [m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>],  $t_k$  – doba kapky [s],  $c_i, c_{i0}$  – koncentrace v těsné blízkosti elektrody [mol L<sup>-1</sup>]. Vrstva, ve které probíhají změny koncentrací, označujeme jako Nernstovu difúzní vrstvu [4, 5].

$$I_D = K \cdot z_i F \cdot D_x^{1/2} \cdot m_{Hg}^{2/3} \cdot t_k^{1/6} \cdot (c_i - c_{i0}) \quad (3)$$

### 1.1.3 Voltametrické křivky

Záznam z voltametrické analýzy označujeme jako voltametrické (polarizační) křivky nebo také jako  $I$ - $E$  křivky. Pokud se nachází ve stanovovaném roztoku pouze elektrolyt, křivka má podobu znázorněnou na obrázku 2. Za těchto podmínek protéká elektrodou výhradně kapacitní proud ( $I_c$ ) a vytváří určitý signál. Jedná se o proud, jehož hodnota je závislá na koncentraci a složení elektrolytu. Je součástí „šumu“ tj. signálu, který není vytvářen stanovovanou látkou. Depolarizace nastává za krajních hodnot kladného a záporného potenciálu účinkem látek v elektrolytu. Další příčinou depolarizace v krajních hodnotách potenciálu je oxidace materiálu elektrody. Oblast použitelná pro účely stanovení analytů se nachází uprostřed křivky a nazývá se využitelný potenciálový rozsah. Materiál elektrody a druh elektrolytu mohou mít vliv na jeho velikost. Pokud je v roztoku analyt, dochází k jeho oxidaci nebo redukci na elektrodě. Jeho přídavek je vykreslen vlnou nebo píkem [1, 6].





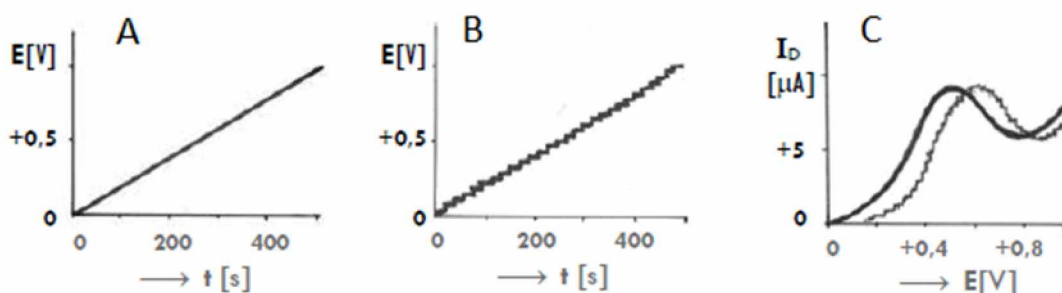
**Obrázek 2** Polarizační křivka pro roztok základního elektrolytu [6]

Elektroda je na začátku děje polarizovaná a proud elektrodou téměř neprotéká. Potom dojde k elektrolýze, která je iniciována dosažením rozkladného potenciálu stanovované látky. Proud protékající pracovní elektrodou stoupá do doby, kdy nabude hodnoty limitního difúzního proudu. V tento okamžik je veškerá látka nacházející u povrchu elektrody vyčerpána a při zvýšení potenciálu nedochází k dalšímu růstu hodnoty proudu. Půlvalnový potenciál ( $E_{1/2}$ ) je veličina, která slouží k popisu umístění vlny [1, 5]. V případě píku je parametr určující kvalitu hodnota potenciálu neboli poloha píku ( $E_p$ ) a výška píku ( $I_p$ ) charakterizuje koncentraci (kvantitu) analytu [1]. Katodická voltametrická křivka znázorňuje redukci analytu a analogicky anodická  $I-E$  křivka znázorňuje oxidaci sledované látky. Rozdílem mezi křivkami je způsob jejich vynášení. Pravidlem je, že horní oblast grafu patří katodickému proudu a dolní anodickému. Na pravé straně jsou negativní hodnoty potenciálů a levá strana patří potenciálům pozitivním [4, 5].

### 1.1.4 Voltametrické techniky

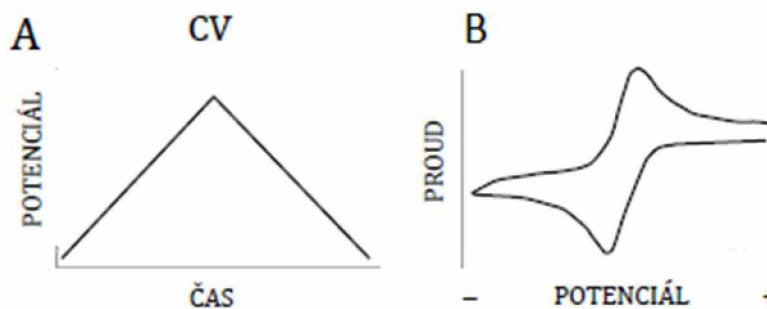
Výběrem vhodné voltametrické techniky lze zásadně ovlivnit výsledky samotné analýzy. Některé voltametrické metody jsou využitelné zejména pro popis elektrochemického chování studovaného analytu, jiné jsou spíše vhodné pro samotné stanovení dané elektroaktivní látky [1, 3-6]. V této kapitole je přehled metod, které jsou nejvíce využívány, což demonstruje i výběr některých z nich pro potřeby této diplomové práce. Základním rozdělením voltametrických metod je na techniky s lineárně rostoucím/klesajícím napětím, kdy nedochází k eliminaci  $I_c$ , který představuje hlavní složku tzv. šumu a na techniky pulzní, kdy je napětí vkládáno v pulzech a proud odečítáme ve specifickém čase (časech), čímž je složka  $I_c$  eliminována. Tímto procesem dochází ke zvýšení citlivosti voltametrické techniky [1, 3-6].

Základní metodou používanou pro voltametrická měření je tzv. lineární voltametrie (LSV). Jedná se o jednoduchou metodu, kdy se vkládá napětí v podobě potenciálové rampy, která má klesající nebo rostoucí průběh a lineární charakter. Rampa může být hladká nebo schodovitá (obrázek 3A a 3B) [1, 3-5]. Rychlost skenování se obvykle během analýzy nemění. LSV je vhodná metoda jak k určování koncentrace analytu, tak difúzních a rychlostních konstant [7]. Příklad křivek je zobrazen na obrázku 3C. Obvykle je citlivost této metody nižší než metod pulzních [1, 3-5].



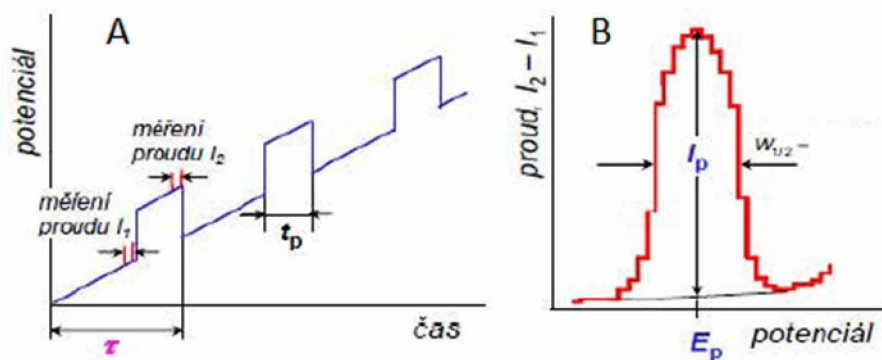
**Obrázek 3** Průběh časové závislosti vkládaného napětí (A, B) a výsledný záznam (voltametrická křivka) naměřený metodou LSV (C)[4]

Další základní a hojně využívanou technikou je cyklická voltametrie (CV). Její výhodou je její univerzálnost. Při studiu nové látky se obvykle CV používá mezi prvními z voltametrických technik [8]. Z křivek lze vyčíst informace o koncentraci vzorku. CV je také nástrojem k odhalení reverzibility, resp. ireverzibility dějů nebo mechanismu elektrodové reakce [1, 3-6, 9, 10]. Časová závislost vkládaného potenciálu má podobu trojúhelníku a je znázorněna na obrázku 4A. Na začátku analýzy se sledovaná látka redukuje nebo oxiduje a tím způsobí změnu hodnoty procházejícího proudu pracovní elektrodou. Koncentrace stanovené látky u povrchu elektrody časem klesá. Zbytek analytu se transportuje k elektrodě difúzí a poté hodnota proudu dosáhne svého maxima. Následně  $I$  klesá vlivem nízké koncentrace analytu a nedostačující difúzi. Měření dále pokračuje v opačném směru za změny polarizace elektrody. Výsledným záznamem jsou tedy dvě voltametrické křivky představující oxidaci i redukci sledované látky v roztoku. Příklad naměřených křivek je zobrazen na obrázku 4B [10].



**Obrázek 4** Průběh časové závislosti vkládaného napětí (A) a výsledný záznam (voltametrická křivka) naměřený metodou CV (B) [10]

Nejvýznamnější pulzní voltametrické techniky jsou diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a square wave voltametrie (SWV), které jsou obvykle výrazně citlivější oproti klasickým technikám (LSV, CV), díky eliminaci  $I_c$  [11]. Jako pracovní elektrody mohou být využívány jak rtuťové elektrody, tak i pevné nebo pastové elektrody. V případě kombinace metody DPV a pracovní DME postupně dochází k odkapávání kapek rtuťi a zároveň se při každé další kapce zvýší napětí mezi referenční a pracovní elektrodou. Obdélníkový napěťový impuls je aplikován před obnovením kapky a přírůstkem napětí. Vodorovná osa záznamu představuje vkládané napětí a svislá rozdíl (diferenci) dvou hodnot proudů ( $\Delta I$ ). Hodnota  $\Delta I$  se získá porovnáním naměřeného proudu před a po vložení obdélníkového pulzu (obrázek 5A). Výsledným záznamem je voltametrická křivka, kde signál poskytovaný analytem má tvar píku. Příklad je uvedený na obrázku 5B [1, 11, 12]. SWV je metoda kombinující výhody pulzních metod jako je citlivost a výhody CV, kterou je možnost sledování elektrodových dějů. Někdy je označována jako nejvyspělejší technika voltametrie. Potenciálová rampa má tvar schodiště a jsou zde vkládány pulzy obdélníkového tvaru. Na každý schod rampy jsou vloženy dva impulzy, které mají stejnou velikost ale opačný směr. Obvykle jsou pojmenovány jako dopředné a zpětné pulzy. Průběh elektrodové reakce je katodický i anodický. Při každém schodu probíhá jeden cyklus obdélníkového pulzu [13, 14]. Těsně na konci každého pulzu se zjišťují hodnoty proudů. Odečítají se od sebe hodnoty dopředného pulzu a hodnoty zpětného pulzu. Výsledný  $I$  je vyneseno do grafu proti hodnotě potenciálu schodišťové rampy. Záznam má tvar píku podobně jako u DPV [4, 14].



**Obrázek 5** Průběh časové závislosti vkládaného napětí (A) a výsledný záznam (voltamtrická křivka) naměřený metodou DPV (B)[4],

$\tau$  – (v případě DME) doba života jedné kapky [ms],  $t_p$  – doba trvání pulzu [ms],  $E_p$  – potenciál piku [mV],  $I_1$  – hodnota proudu před vložení obdélníkového pulzu [nA],  $I_2$  – hodnota proudu po vložení obdélníkového pulzu [nA],  $I_p$  – výška piku [nA],  $W_{1/2}$  – šířka piku v polovině výšky [mV]

Rozpouštěcí voltametrie (SV) je soubor metod, u kterých lze docílit nejnižších limitů detekce. Toho je dosaženo tím, že je zvýšena koncentrace stanovované látky na povrchu elektrody. SV je tedy vhodná zejména pro stopovou analýzu. Stanovení se skládá ze dvou kroků: zakoncentrování na elektrodě a rozpouštění. Dále budou popsány tři nejčastěji používané metody SV a to jsou: anodická stripovací voltametrie (ASV), katodická stripovací voltametrie (CSV) a adsorpční stripovací voltametrie (AdSV) [2, 15]. ASV je nejčastěji používaná metoda pro detekci stopových kovových prvků. Součástí instrumentace je rtuťová elektroda (nejčastěji HMDE), na jejímž povrchu dochází při vložení záporného potenciálu k zakoncentrování vzorku. Kov se redukuje nebo dochází k jeho imobilizaci a vzniká amalgám. Druhou fází je odstranění kovu z elektrody pomocí oxidace a ta probíhá za vložení kladného potenciálu. Každý pík vzniklý na polarizační křivce je svým potenciálem typický pro daný druh kovu [15, 16]. CSV je technika vhodná např. pro halogenidy, sulfidy nebo některé organické sloučeniny (kodein aj.). Podmínkou pro stanovení je tvorba nerozpustných solí na povrchu rtuťové elektrody [15]. Průběh zakoncentrování látky na elektrodě je oxidační povahy. Rtuť je oxidována na kation a vzniká nerozpustná rtuťnatá sůl. Proces je ukončen redukčním rozpouštěním. Rozpustnost solí rozhoduje o citlivosti metody [17]. Princip AdSV je obdobný jako u CSV a ASV. Ve fázi akumulace látky na elektrodě však metoda využívá adsorpci. Adsorpce může probíhat dvěma způsoby. Kromě přímé adsorpce může docházet ke vzniku komplexu reakcí kovu s vhodným činidlem. Komplex se následně adsorbuje na elektrodě [15,

18]. Jako pracovní elektroda je nejčastěji používána opět HMDE, ale lze použít i některé pevné elektrody (např. Pt). Pomocí AdSV již byly úspěšně stanoveny vybraná léčiva [19] nebo chemické karcinogeny [20].

## 1.2 Pracovní elektrody ve voltametrii

### 1.2.1 Pracovní elektrody na bázi rtuť

Rtuťové elektrody stály u zrodu polarografie a u následného rozvoje voltametrie. I v dnešní době mají tyto elektrody svou nezastupitelnou roli v elektroanalytické chemii vzhledem ke svým specifickým vlastnostem. Kapalná rtuť vykazuje homogenní a hladký povrch. Obnova povrchu umožňuje provádět analýzy opakovaně s vysokou mírou reprodukovatelnosti. Zásadou vysokého přepětí vodíku lze provádět analýzy i v oblastech velmi negativních potenciálů. Výhodou je také chemická inertnost rtuť. Rtuťové elektrody nabízejí značnou velikost signálu v poměru k šumu pozadí. Varianty na bázi kapalné rtuť, které budou popsány níže, zahrnují původní DME, pak novější statickou rtuťovou kapkovou elektrodu (SMDE) a v současné době nejvyužívanější HMDE. Další možností je i rtuťová filmová elektroda (MFE), která je tvořena tenkou vrstvou rtuť nanesenou na elektrodě nejčastěji z uhlíku [1, 19, 21]. Obavy budí především toxicita rtuťnatých solí, organických sloučenin rtuť a par elementární rtuť. Kapalná rtuť je vzhledem ke své nízké biologické dostupnosti málo toxická [22, 23]. Při práci se rtuťovými elektrodami vždy vzniká určité malé množství nebezpečného odpadu, se kterým je nutné odpovědně nakládat. I přes tuto překážku patří rtuťové elektrody k účinným nástrojům elektroanalýzy zejména pro stanovení látek, které podléhají elektrochemické redukci, jako jsou kovové ionty nebo organické látky. Oproti tomu pro stanovení oxidovatelných sloučenin jsou obvykle málo využitelné, jelikož jim v tom brání úzký anodický potenciálový rozsah [24-26].

DME byla vyvinuta prof. Heyrovským. Její konstrukce se skládá ze skleněné kapiláry, na kterou je napojena hlavice se rtuť. Na konci kapiláry vzniká kapka kulovitého tvaru. Pokud přesáhne určitou hmotnost, dojde k jejímu pádu do roztoku a proces se opakuje. Nevýhodou je nemožnost měnit časový rozsah, protože je ovládán životností kapky, a také velké množství spotřebované rtuť [27]. SMDE představuje částečné vylepšení DME. Do konstrukce je přidán automatický mechanismus odkapávání rtuť, který je ovládán ventilem. Eliminace problému s pasivací a dobrá reprodukovatelnost měření je výhodou obou elektrod. Za velmi účinnou pracovní elektrodu pro voltametrii je považována HMDE. Rozdíl oproti DME a SMDE spočívá

v obnově kapky, která probíhá jen mezi jednotlivými analýzami. Pasivace elektrody během analýzy zde může představovat určitý problém [1, 27]. Důležitými požadavky na HMDE jsou: stejná velikost kapek, spolehlivá konstrukce ventilu řídicího odkapávání rtuti a spolehlivý mechanismus udržení kapky na otvoru kapiláry [4, 28]. Hlavní složkou MFE, posledního typu pracovní elektrody na bázi rtuti, je tenký povlak Hg, který je nanesen na povrchu nosného substrátu. Podmínkou nosného materiálu je vodivost a smáčivost rtuť [29]. Základem je nejčastěji elektroda z uhlíku. Povlak je nanášen těsně před analýzou prostřednictvím elektrolytického rozkladu rtuťnaté soli. Tento typ elektrody nabízí větší poměr povrchu k objemu, větší mechanickou stabilitu a možnost dalších chemických i konfiguračních modifikací. Použití MFE je limitováno nižší přesností, náročností čištění a obnovy rtuťové vrstvy. Navíc jsou produkovány odpady na bázi roztoku toxických rtuťnatých solí [4, 30].

Do skupiny elektrod na bázi rtuti patří i amalgámové elektrody. Vznikly ve snaze omezit používání kapalné rtuti, kvůli obavám o bezpečnost. Navíc představují mechanicky robustnější nástroje než elektrody na bázi kapalné rtuti. Rozlišují se dva hlavní typy amalgámových elektrod. Prvním možností jsou amalgámy, kde složkou je kov, který vykazuje menší elektrochemickou aktivitu než samotná rtuť. Mezi takové kovy patří např. stříbro, zlato nebo iridium. Druhou variantu představuje amalgám, který je tvořen minimálně jedním kovem s vyšší elektrochemickou aktivitou. Příkladem je měď, bismut nebo olovo [31, 32]. Mezi kladné vlastnosti pevných amalgámových elektrod řadíme konstrukční jednoduchost a ekonomickou nenáročnost. Pro jejich výrobu je možné použít i zubní amalgám. Rtuť v zubním amalgámu se vyskytuje v podobě sloučeniny  $\text{Ag}_2\text{Hg}_3$ , ve které je rtuť velmi stabilní. Při použití mimo laboratoř tak nehrozí uvolňování rtuti do životního prostředí (ŽP) [33]. Čistější verzí zubních amalgámů je pevná kovová amalgámová elektroda (MeSAE), u které je základem pro výrobu jemný kovový prášek. Postup přípravy je poměrně jednoduchý. Spodní část skleněné trubičky je naplněna v rozmezí výšky 0,5-1 cm nejčastěji stříbrným, měděným, nebo jiným druhem kovového prášku. Trubičku je třeba doplnit o Pt drátek zajišťující kontakt a následně ji umístit do nádoby se rtuť. Veškerý kovový prášek přichází do kontaktu s rtuť a dochází k tunutí amalgámu, které trvá 10-12 hodin. V průběhu tunutí je dobré omezit kontakt se vzduchem [32, 34]. Experimenty potvrdily, že stříbrné pevné amalgámové elektrody (AgSAE) dokáží nahradit, nebo alespoň konkurovat rtuťovým elektrodám. Tato pracovní elektroda poskytuje obdobné elektrochemické vlastnosti při stanoveních jako HMDE. Výhodou AgSAE oproti kapkovým rtuťovým elektrodám je možnost modifikace jejich povrchu nebo práce v průtočných systémech. Použití AgSAE je široké a zahrnuje stanovení kationtů těžkých kovů

(např.  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ), aniontů (např. halogenidy,  $\text{CNS}^-$ ) nebo organických sloučenin (adenin, pesticidy, DNA, vitamíny, léčiva, nitrolátky), což je diskutováno např. v [32, 35-39]. Kvůli své specifické interakci se stanovovanou látkou je často využívána také měděná pevná amalgámová elektroda (CuSAE). Pro tuto elektrodu je typické, že během CSV produkuje  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Vhodný analyt představuje sloučenina tvořící s těmito ionty málo rozpustný komplex, který se nahromadí na povrchu elektrody. Měď způsobuje posun voltametričeského záznamu směrem k zápornějším potenciálům. Pomocí tohoto postupu lze provádět citlivá měření i při analýze hydrolyzované DNA a dalších látek [32, 40].

## 1.2.2 Pevné a pastové pracovní elektrody

Ke konstrukci pracovních stacionárních elektrod z pevných nebo pastových substrátů musí být volen materiál elektricky vodivý, chemicky stabilní a s rychlou kinetikou přenosu elektronů stanovované látky. Platina, zlato, bismut a uhlík v různých formách se používají nejčastěji. Aplikace pevných či pastových elektrod v praxi může vyžadovat komplikovanější experimenty než u elektrod rtuťových. Povrch může časem podléhat oxidačním nebo redukčním dějům. Elektrody na bázi uhlíku jsou zase náchylné na adsorpci nečistot z ovzduší. Kromě problémů s vlastním materiálem elektrody existují problémy s ději, které již v dřívějších analýzách na elektrodě proběhly označované jako paměť elektrody. Tyto skutečnosti mají vliv na reprodukovatelnost a výsledek měření. Proto je obvyklé před začátkem měření v rámci dne nebo před každou analýzou provádět předúpravy povrchu případně aktivaci elektrody. Tato příprava zahrnuje postupy čištění, které pokračují např. úpravou chemie povrchu. Čistit elektrody lze mechanicky prostřednictvím leštění, které zajišťuje jednoduché odstranění paměti elektrody. Dále lze elektrody vystavit elektrochemické polarizaci, nebo různým druhům tepelných úprav. U pastových elektrod je možné vytlačněním a odstraněním pasty vytvořit čistý povrch pro další analýzu. Vhodné je úpravy vybírat podle charakteru prostředí, ve kterém se bude měření probíhat [1, 41].

### 1.2.2.1 Pracovní elektrody na bázi uhlíku

Z pohledu struktury krystalové mřížky existují dvě základní struktury uhlíku diamantová a grafitová. Diamantová krystalová mřížka je tvořena uhlíkovými atomy propojenými do čtyřúhelníku. Vazby mezi všemi atomy jsou kovalentního charakteru, což je příčinou jeho vysoké tvrdosti. Vlastnosti dopovaných diamantových elektrod budou popsány později v kapitole 1.2.3. Stavba grafitu je odlišná. U něj se kovalentní vazby vyskytují pouze jako spojení mezi atomy uhlíku ve vrstvách tvořených z šestiúhelníků, které jsou k sobě poutány

pomocí van der Waalsových sil. Hybridizace uhlíku v grafitu je  $sp^2$ , zatímco u diamantu  $sp^3$ . Zvláštním případem jsou fullereny. Nejznámější je struktura propojení šestiúhelníků a pětiúhelníků z uhlíkových atomů, která je formována do tvaru koule. Obvykle je tento druh fullerenu tvořen 60 atomy uhlíku [32, 41, 42]. Formy uhlíku nejčastěji používané v elektrochemii zahrnují skelný uhlík, grafit, vlákna na bázi uhlíku nebo dopovaný diamant. Fullereny se používají spíše okrajově jako modifikátor elektrod na bázi skelného uhlíku, diskutováno např. v [43, 44]. Výhodou elektrod na bázi uhlíku jsou obvykle nízké pořizovací náklady, chemická inertnost a široký potenciálový rozsah zejména v anodické oblasti potenciálů. Chemické pochody na povrchu jsou daleko rozmanitější než v případě kovových elektrod. Je to způsobeno jejich mikrostrukturou, která je u každé formy uhlíku jiná. Důvodem je také to, že existuje více možností vazeb vznikajících na jejich povrchu. Uhlíkové elektrody jsou obecně vhodné pro stanovení látek podléhajících elektrochemické oxidaci [1, 4, 42].

Mezi významné uhlíkové elektrody můžeme zařadit elektrodu ze skelného uhlíku (GCE). Výchozí látkou pro výrobu je polymer polyakrylonitril, který je za zvýšeného tlaku v inertním prostředí tepelně karbonizován. Teplota se může pohybovat v rozmezí 1000 až 3000 °C. Ve výsledném složení figuruje pouze uhlík. Ostatní prvky jsou vlivem vysoké teploty odstraněny [42]. Výsledkem je nepravidelně uspořádaná síť grafitických pruhů. Druhou možností je příprava, kde výchozí látkou je polymerní prekurzor. Používány jsou v tomto případě nižší teploty okolo 700 až 900 °C. Tento typ skelného uhlíku nemá grafitický charakter a v jeho struktuře se mohou vyskytovat i jiné atomy než uhlíkové [42, 45]. Skelný uhlík je považován za nereaktivní. Jeho součástí jsou mikropóry. Čím vyšší teplota karbonizace, tím vzniká méně pórovitý materiál. Plyny a kapaliny nejsou schopny tímto materiálem procházet. Úprava elektrody před použitím zahrnuje obvykle leštění v kombinaci s čištěním pomocí rozpouštědla. Měření není vhodné provádět při vysokých anodických potenciálech, jelikož materiál elektrody podléhá oxidaci a snižuje se tak účinnost elektrody [46].

Velmi oblíbená je, díky širokému uplatnění v elektroanalytické chemii, také uhlíková pastová elektroda (CPE). První článek o CPE vyšel v padesátých letech 20. století a jeho autorem byl chemik Ralph Norman Adams. Jeho původním cílem bylo vytvořit elektrodu podobnou DME. Z důvodu vysoké viskozity uhlíkové pasty však cíle nebylo dosaženo a využití našla spíše jako alternativa elektrod na bázi ušlechtilých kovů [47-50]. CPE je směsí, která se skládá ze dvou hlavních složek. Elektrochemicky aktivní složkou je uhlíkový prášek o rozměrech částic řádově v  $\mu\text{m}$ . Nejpoužívanějším typem je spektroskopický grafit s částicemi o velikosti 5-20  $\mu\text{m}$ . Čistota a typ této složky ovlivňuje výsledné vlastnosti uhlíkové pasty.



Druhou složkou, která se neúčastní elektrochemických dějů, je tekuté pojivo. K tomuto účelu je vhodný např. silikonový olej, bromnaftalen nebo parafinový olej. Tyto viskózní tekutiny se nesmí rozpouštět v analyzovaných roztocích a musí mít nízkou tenzi par, která přispívá k jejich mechanické stabilitě. Ideální poměr komponent ve výsledné uhlíkové pastě je 1 g prášku na 0,4-0,5 mL pojiva. K přípravě past lze použít porcelánovou třecí misku [32, 47, 50]. Pro měření je z praktických důvodů nutné tyto pasty vložit do pevného obalu a tím vznikne kompletní CPE. Typů konstrukcí těchto obalů je více. Nejjednodušší konstrukcí je použití teflonové tyčinky nebo skleněné trubičky s drátkem zajišťující vodivý kontakt a otvorem pro plnění. Uhlíkovou pastu je však nutné v tomto případě pravidelně doplňovat a zároveň se postarat o obnovu povrchové vrstvy elektrody. Efektivnější z hlediska nároků na čas jsou konstrukce s otočným pístem, kdy je stará pasta vytlačována a následně odstraněna seříznutím. Díky tomu CPE nejsou náchylné k pasivaci [32, 48]. Mezi další výhody CPE se řadí především velký rozsah měření, zahrnující kladné i záporné potenciály a snadná modifikace, která se provádí buď povrchovou adsorpcí, nebo jednoduchým vpravením modifikátoru přímo do připravované pasty [49, 50].

Mezi novější typ uhlíkových elektrodoých materiálů patří uhlíkové nanotrubičky (CNT). Jedná se o trubičky s průměrem řádově v nm. Mají vysoký poměr délky k průměru. CNT se vyznačují vysokou elektrickou vodivostí a tepelnou a chemickou stabilitou. Jejich povrch má katalytické vlastnosti. Trubice jsou tvořeny grafenem, který se skládá z dvojrozměrné hexagonální struktury atomů uhlíku. Existují dva druhy nanotrubiček: 1) jedностěnné (SWNT) jejichž struktura obsahuje pouze jednu grafenovou vrstvu a 2) víceštěnné nanotrubičky (MWNT), které jsou tvořeny více vrstvami grafenu [41, 42, 51]. Obě varianty lze vyrobit pomocí obloukového výboje, laserové ablace nebo katalytickým růstem z plynné fáze. Zdrojem uhlíku u prvních dvou zmíněných metod výroby je pevný prekurzor, který je odpařován při teplotách přes 3000 °C. Principem katalytického růstu je tepelný nebo chemický rozklad uhlovodíků v plynné fázi za přítomnosti částic kovového katalyzátoru, na kterých dochází k růstu nanotrubiček. Teplota se pohybuje okolo 500 až 1000 °C. Jako plynný uhlovodík se používá acetylen nebo ethylen [41, 51]. Obvyklým katalyzátorem je železo, nikl nebo kobalt v podobě tenké kovové vrstvy. Vodivým substrátem může být křemík, zlato nebo platina. Způsobem konstrukce CNT je i obdoba CPE. Kdy jsou nanotrubičky dispergovány do minerálního oleje a výsledná pasta vložena do teflonového obalu. Pomocí CNT lze také modifikovat povrchy různých pracovních elektrod např. GCE [41]. Uplatnění elektrod modifikovaných CNT lze nalézt především v oblasti stanovení anorganických iontů, jako jsou  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , nebo organických látek, např. 4-nitrofenolu a dopaminu. Elektrody na bázi CNT

modifikované enzymy se používají např. pro stanovení glukózy a peroxidu vodíku. CNT byly využity také při detekci DNA nebo proteinů [4, 52, 53].

#### *1.2.2.2 Pracovní elektrody na bázi kovů*

Dvojití nejpoužívanějších elektrod na bázi ušlechtilých kovů je platina a zlato. Po aplikování správných elektrochemických podmínek se oba původně inertní kovy mění ve velice aktivní elektrody vyznačující se vysokou elektrickou vodivostí. Jejich výhodou je dobrá odolnost vůči mechanickým vlivům, nízké proudy pozadí a široké potenciálové okno. U obou elektrod se však vyskytují problémy v oblastech anodických potenciálů, a to tvorbou povrchových oxidů. Utvoření vrstvy oxidů způsobuje horší opakovatelnost měření. Oproti rtuťovým elektrodám je také rozsah v oblastech katodického potenciálu více omezen. Elektrody mají podobu drátku nebo malých disků [54]. Rozdíl mezi platinou a zlatem je, že platina se oproti zlatu vyznačuje rychlým průběhem elektrodových procesů. Je to způsobeno jejími katalytickými vlastnostmi. Použití zlaté elektrody je mnohdy upřednostňováno kvůli její odolnosti vůči katalytickým jedům a také kvůli menším problémům s tvorbou povrchových oxidů [1, 4].

Dalšími elektrodami na bázi kovů jsou bismutové elektrody, které byly vyvinuty opět s cílem nahradit elektrody s kapalnou rtuť. Poprvé byly představeny tyto elektrody v roce 2000 [55-57]. Bismut má některé podobné vlastnosti jako rtuť. Řadí se do skupiny těžkých kovů. Oba prvky mají i podobné atomové hmotnosti a nejsou příliš reaktivní. Rozdílem mezi rtuť a bismutem je jejich skupenství za standardních podmínek. Bismut se vyskytuje v pevné formě kovu, který má stříbrolesklý narůžovělý povrch, zatímco rtuť je za normálních podmínek kapalná. K důvodům, proč se Bi stal oblíbeným elektrodovým materiálem, patří kromě dobrých elektrochemických vlastností i skutečnost, že je netoxický jak v elementární formě, tak i ve formě solí a nepředstavuje zátěž pro ŽP. Před analýzou není nutné odstraňovat rozpuštěný kyslík z analyzovaného roztoku, protože tyto elektrody na něj nejsou, na rozdíl od rtuťových, citlivé. Jelikož rtuť je více ušlechtilá než bismut, potenciálový rozsah bismutových elektrod je naopak užší než u elektrod rtuťových [55]. Nejběžnější je bismutová filmová elektroda (BiFE). Skládá se z vodivého středu, který je galvanicky pokovován. Vodivý střed BiFE je tvořen různými druhy uhlíkových materiálů např. uhlíkovou pastou nebo dražším skelným uhlíkem. Výhodou skelného uhlíku je nízký proud pozadí. Základem může být také jednorázová sítotisková elektroda, pevný stříbrný amalgám nebo mikroelektrody určené k měření malých objemů analytů, které jsou tvořeny Au nebo Pt drátkem. Kationty bismutu se na povrchu

elektrody vylučují elektrochemicky a vzniká tak povrchový film. Typ provedeného galvanického pokovování ovlivňuje výsledné chování elektrody. Existují dva způsoby: pokovování: 1) ex situ (před samotnou analýzou mimo analyzovaný roztok) nebo 2) in situ (přímo v analyzovaném roztoku v přítomnosti  $\text{Bi}^{3+}$ ). Poslední možností je tvorba uhlíkové pasty s přídavkem  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , kdy vzniká pastová elektroda. Pro účel detekce organických analytů (např. pesticidů a azobarviv) se používají bismutové filmy nanesené na GCE nebo na měděné elektrodě a metodou je obvykle DPV, pastové elektrody lze použít např. pro stanovení herbicidů nebo nitrobenzenu [56, 58].

Antimonové filmové elektrody (SbFE) jsou velmi podobné elektrodám bismutovým a byly prvně popsány Hocevařem *a kol.* v [59] o sedm let později než BiFE. Vhodnou elektrodou k detekci těžkých kovů o nízkých koncentracích pomocí SV je mimo elektrod na bázi rtuti a BiFE právě i SbFE [59-61]. SbFE má obdobně jako BiFE relativně široký potenciálový rozsah zejména v katodické oblasti. Přípravují se obdobným postupem jako BiFE. Typickým znakem těchto elektrod je, že vzniká žádoucí záporné přepětí při genezi vodíku. SbFE poskytují mimo jiné slabý stripovací signál antimonu [60]. Odlišností SbFE je schopnost provozu při kyselějších pH než v případě BiFE. Dokáží pracovat i při nižším pH, než je hodnota 2 [59-61].

### 1.2.3 Bórem dopovaná diamantová elektroda

Užití diamantu jako elektrodového materiálu bylo poprvé zaznamenáno v roce 1983 japonskými vědci. Jednalo se o diamantovou elektrodu připravenou pomocí iontové implantace zinku [62]. V roce 1987 byly Pleskovem použity v oblasti fotoelektrochemie nedopované polovodičové diamantové elektrody [63]. Studii elektrochemických vlastností dříve bránila především nákladná výroba diamantu vyžadující vysoký tlak a teplotu (HPHT). Řešení však poskytla technologie tenkých diamantových filmů. Princip výrobního postupu spočívá v nanesení diamantového povlaku z plynné fáze za podtlaku na substrát [64].

Nedopovaný čistý diamant je materiálem, který představuje výjimečně tvrdou krystalickou formu uhlíku. Mezi vlastnosti, které jsou užitečné především v oblasti technických aplikací, můžeme zařadit jeho chemickou stabilitu, nízký koeficient tření, vysoký elektrický odpor, korozní odolnost a vysokou tepelnou vodivost. Z hlediska optiky se jedná o transparentní materiál. Diamant je používán např. ve výkonných elektronických přístrojích nebo jako povrch rezných nástrojů. Jeho transparentnost využívá řada elektrooptických zařízení. Pro elektroanalytické účely nelze samotný diamant použít, protože je nevodivý. Je nutné připravit

dopované diamantové elektrodové materiály za pomoci různých postupů, které zajišťují širokou škálu elektroanalytických aplikací [65].

Rozlišujeme čtyři základní typy diamantových dopovaných elektrod. Prvním typem je tenkovrstvá diamantová filmová elektroda, která může mít základ elektrody z materiálu jako je např. křemík, skelný uhlík, grafit nebo mohou být na bázi samopasivujících kovů (W, Ti, Ta). V případě kovového substrátu představuje problém přilnavost a přítomnost vodíku. Vodík je obsažen v plynu účastnícího se procesu nanášení vrstvy a může způsobit degradaci substrátu. Proto se aplikuje mezivrstva tvořená karbidem kovu, což představuje druhý typ diamantových dopovaných elektrod. Třetí a čtvrtou variantou jsou elektrody skládající se z diamantových částic dopovaných bórem, které jsou imobilizovány na substrátu. Záleží na tom, jestli se jedná o vodivý nebo nevodivý substrát. V případě vodivého substrátu je nutné diamantové částice od sebe navzájem chránit pasivační vrstvou, kterou může být např. perfluorovaná organická látka. S elektrodou je možné zacházet obdobně jako s tenkovrstvou diamantovou elektrodou na vodivých substrátech. Pokud je substrát nevodivý, jsou použity tenké substráty a diamantové částice jsou imobilizovány přímo na povrchu elektrody a fixovány např. PVDF folií [66-68]. Kromě základních existují ještě dvě varianty diamantových elektrod, a to vakuově žíhaný nebo hydrogenovaný nedopovaný diamant. V prvním případě se jedná o tenký nedopovaný film diamantu nanesený na substrátu, který je následně žíhán při teplotě vyšší než 1550 °C v prostředí vakua. Díky žíhání vznikne v diamantovém filmu uhlíková fáze, která je vodivá. Poslední variantou je původně nedopovaný hydrogenovaný diamant, který je dodatečně dopován povrchovými adsorbáty [66].

Nejčastěji je diamant dopován bórem. Produkovaná elektroda je pak označovaná jako bórem dopovaná diamantová elektroda (BDDE). Důvodem je jeho nízká aktivační energie nosiče náboje, která má hodnotu 0,37 eV. Díky této vlastnosti efektivně zaujme původní místo atomu uhlíku. Diamantová elektroda dopovaná bórem je polovodičem typu p. V případě nízkého stupně dopování se z elektrody stává vnější polovodič a při vysokém stupni dopingu se materiál elektrody chová jako polokov. Dopování bóru probíhá za přídavku látky obsahující bór, např. diboran nebo trimethylboran do depozičního plynu během procesu přípravy diamantového filmu [66, 68, 69]. Existují i jiné možnosti využitelných dopujících prvků, které však poskytují vodivost typu n. Těmito prvky jsou například dusík, fosfor nebo síra. Pro porovnání je hodnota aktivačního náboje nosiče pro dusík 1,6-17 eV a v případě fosforu má hodnotu 0,6 eV. Nevýhodou síry je, že ji lze k dopování použít pouze za přítomnosti bóru [66, 67].

### 1.2.3.1 Příprava BDDE

Hlavními technikami výroby dopovaných diamantových materiálu je metoda HPHT a metoda nízkotlaké chemické depozice z par (CVD). V prvním případě se diamant vyrábí přeměnou grafitu. Vzhledem k hodnotě  $\Delta G = +2895 \text{ J}$  má tato reakce tendenci probíhat spíše opačným směrem, tedy ve směru vzniku grafitu. Grafitová forma je termodynamicky stabilnější než diamant. Řešením je zvýšení teploty, které urychluje průběh reakce. Docílíme tím posunu  $\Delta G$  do záporných oblastí. S nárůstem teploty musí růst i použitý tlak [70]. Grafit je zahříván při teplotách nad  $1800 \text{ }^\circ\text{C}$  a je aplikován tlak 3-5 GPa. Za podobných podmínek dochází i ke vzniku přírodních diamantů [68]. Druhou metodou je přípravy dopovaných diamantů je CVD. Plyn, obsahující vodík, dopující činidlo bóru (nejčastěji diboran ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ) nebo trimethylboran ( $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$ )) a jako zdroj uhlíku nejčastěji methan, se tepelně rozkládá. Principem je energetická aktivace molekul, kdy dochází ke štěpení methanu na methylové radikály a atomární vodík. Existují dva způsoby aktivace, kterými je technika mikrovlnného plazmatu nebo metoda horkého vlákna [71, 72]. Optimální obsah methanu ve směsi s vodíkem je 0,3-1 %. Dalšími důležitými faktory přípravy je tlak, který nabývá hodnot od 10 do 150 torr a teplota mezi  $700$  až  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ . V případě techniky mikrovlnného plazmatu jsou potřebné výkony o  $1000$  až  $1300 \text{ W}$  a při použití metody horkého vlákna je obvyklé dosažení teplot až  $2800 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z pohledu kvality lze metodou mikrovlnného plazmatu získat filmy čistší a bez defektů v jejich struktuře [71].

### 1.2.3.2 Vlastnosti BDDE

Pokud bychom porovnávali BDDE s elektrodami ze zlata, platiny nebo elektrodami na bázi  $\text{sp}^2$  hybridizovaného uhlíku nalezneme u BDDE několik výhod. První nespornou výhodou je široký potenciálový rozsah. Při použití elektrolytu  $0,1\text{M H}_2\text{SO}_4$  nabývá rozsah hodnot od  $-1,5 \text{ V}$  do  $+1,5 \text{ V}$  [72, 74]. Mezi další užitečné vlastnosti řadíme korozivní odolnost, biokompatibilitu a malou kapacitu elektrické dvojvrstvy, která způsobí to, že elektrodou prochází malý zbytkový proud a výskyt šumu je nízký. Elektroda nepodléhá pasivačním jevům. Brání tomu  $\text{sp}^3$  hybridizace, kvůli které nemá elektroda tendenci k adsorpci látek. Tyto elektrody jsou také mechanicky odolné, čehož lze využít v průtokových systémech nebo v terénních analýzách [73].

Z hlediska elektrochemie je důležitá i možnost terminace povrchu dopovaného diamantu, která má vliv na kinetiku transportu elektronů na fázovém rozhraní mezi roztokem a elektrodou. Povrch elektrody, vyrobené metodou CVD za přítomnosti vodíkové atmosféry je

pokryt obvykle monovrstvou vodíku. Diamant terminovaný vodíkem je v roztoku stabilní a hydrofobní. Na vzduchu je však při delším časovém úseku nestabilní a dochází k terminaci povrchu kyslíkem. Terminace kyslíkem je vystavení povrchu kyslíkovému plazmatu nebo var v silně kyselém prostředí. Způsobit to může i aplikace silně anodických potenciálů jako předúprava elektrody v oblasti rozkladu vody. Elektroda se stává hydrofilní a dojde ke změnám jejich vlastností [71, 73]. Příkladem je širší potenciálové okno a stabilita na vzduchu. Povrch lze převést zpět na terminovaný vodíkem katodickou předúpravou. Z hlediska selektivity a citlivosti závisí druh terminace povrchu zejména na analytu a podmínkách analýzy [74].

Dalším faktorem, který zásadně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti elektrody je obsah bóru. Jak už bylo výše zmíněno, diamant se s rostoucí koncentrací bóru mění z izolantu přes polovodiče typu p až na látku chovající se jako polokov. V literatuře se lze setkat se třemi způsoby vyjádření koncentrace bóru. Pokud se jedná o bór v plynné fázi používají se procenta (%) nebo poměr mezi atomy bóru a uhlíku (B/C) v jednotkách ppm. V případě pevného povrchu se koncentrace udává počtem atomů na  $\text{cm}^3$  [74-76]. Aby byla možná aplikace elektrody k elektroanalytickým účelům musí být minimální koncentrace větší než  $10^{20}$  atomů boru na  $\text{cm}^3$ . Vyjádření pomocí poměru B/C se často aplikuje při výrobě metodou CVD. Obvykle doporučená koncentrace je 1000 až 20 000 ppm. Platí, že zvýšení poměru B/C s sebou nese změnu elektrochemických vlastností elektrody. Materiál elektrody má vyšší elektrickou vodivost a tím i citlivost. Méně výhodné je však užší potenciálové okno a větší množství nediamantových uhlíkových kontaminantů. Dalším dopadem je vyšší aktivita v redoxních systémech [74, 75].

Důležitou charakteristikou BDDE, která souvisí s výše diskutovanými faktory, je obsah nediamantové složky neboli uhlíku s hybridizací  $\text{sp}^2$ . Hlavním ukazatelem je poměr mezi  $\text{sp}^3/\text{sp}^2$  uhlíkem. Uhlík s  $\text{sp}^2$  hybridizací má za následek několik změn v elektrochemickém chování elektrody. Transport elektronů je rychlejší než u diamantového uhlíku. Povrch  $\text{sp}^2$  uhlíku má tendenci se oxidovat reakcí s vodou a kyslíkem a výsledkem toho je menší potenciálový rozsah a nárůst rušivého proudu pozadí. Vyšší obsah  $\text{sp}^2$  uhlíku také způsobuje vyšší smáčivost povrchu a nebezpečí usazení nečistot [74, 75, 77].

V současné době existují i postupy zvýšení citlivosti nebo selektivity pracovních elektrod na bázi BDDE. Používá se především povrchová modifikace nanočásticemi kovu, nanouhlíkovými materiály, polymery nebo také enzymy. Nevýhodu těchto elektrod ve srovnání

s klasickou BDDE může být náročnější příprava k měření, omezený rozsah potenciálového okna rozpouštěním modifikátoru nebo nižší reprodukovatelnost [78, 79].

### *1.2.3.3 Aplikační možnosti BDDE v analýze vitamínů*

BDDE představuje velmi široce aplikovatelný nástroj voltametrické analýzy, o čemž svědčí velké množství publikací z posledních 20 let. Souhrny aplikací BDDE lze nalézt v přehledových člancích, např. [67, 78-80]. Obecně lze říci, že na rozdíl od výše uvedených pracovních elektrod, BDDE lze využívat jak pro stanovení oxidovatelných látek, tak pro stanovení redukovatelných analytů. Pro představu širší uplatnění je možné uvést, že BDDE je, zásluhou již zmíněných příznivých elektrochemických vlastností, používaná jak pro detekce kovových iontů, tak pro analýzu organických bioaktivních látek na bázi léčiv, DNA, pesticidů nebo dalších polutantů ŽP (PAH, fenoly) často s vysokou citlivostí [78, 79]. V případě léčiv, je BDDE používána k farmakokinetickým analýzám, kde jsou matricí vzorku biologické tekutiny jako je moč nebo krevní plazma [78-80]. Vzhledem k zaměření této diplomové práce uvádím přehled aplikačních možností BDDE jako pracovní elektrody v elektrochemické analýze vitamínů.

Mezi vitamíny, které byly v minulosti stanovované pomocí BDDE a jsou rozpustné ve vodě, patří pyridoxin (vitamín B<sub>6</sub>) který byl detekován voltametricky pomocí nemodifikované BDDE ve farmaceutických vzorcích a vzorcích moči [81], nebo také ve směsi s dopaminem pomocí porézní BDDE v lidském séru [82]. Ve farmaceutickém přípravku byl rovněž pomocí různých voltametrických technik stanoven riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>) [83], kyanokobalamin (vitamín B<sub>12</sub>) [84] nebo kyselina listová (vitamín B<sub>9</sub>) [85, 86]. Možnosti stanovení kyanokobalaminu na BDDE bude více diskutováno v kapitole 1.3.2. Niacin (vitamín B<sub>3</sub>) byl detekován ve vzorcích kávy pomocí analytické průtokové soustavy zahrnující nízkotlakou chromatografii v kombinaci s amperometrickým stanovením využívající nemodifikovanou BDDE [87]. Publikace týkající se analýzy kyseliny askorbové (vitamín C, AA) zahrnovaly několik stanovení ve směsi s paracetamolem např. voltametrické stanovení na nemodifikované BDDE [88], voltametrickou detekci s BDDE modifikovanou Nafionem (fluorovaný kopolymer) a filmy na bázi olova [89] nebo detekci prostřednictvím chronoamperometrie [90]. Dále bylo diskutováno stanovení AA např. v [91, 92]. V článku [92] bylo studováno kromě AA elektrochemické chování více bioaktivních látek např. dopaminu a byl zkoumán vliv terminace povrchu BDDE na jejich odezvu. Zástupcem analyzovaných vitamínů, které jsou rozpustné v tucích je cholekalciferol (vitamín D<sub>3</sub>) [93], jehož detekce probíhala rovněž voltametricky ve

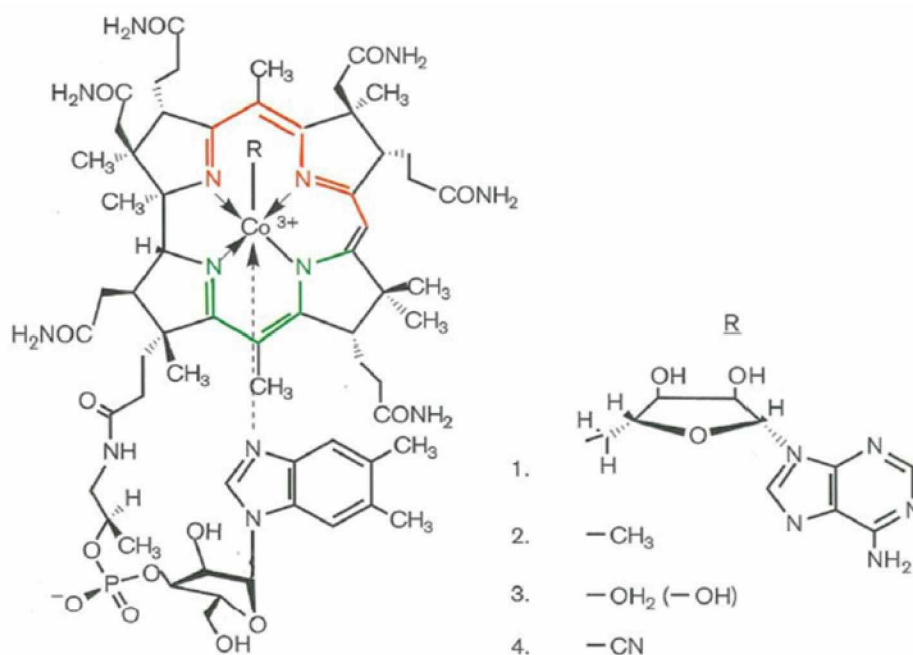
farmaceutických přípravcích. Do této skupiny patří také tokoferol (vitamín E) [94], u kterého se studie zaměřovala především na možnosti simultánního stanovení jeho přirozených izomerů na nemodifikované BDDE [94]. Z tohoto přehledu je zřejmé, že BDDE představuje robustní nástroj elektrochemické analýzy vitamínů, a proto lze předpokládat, že bude aplikovatelná i pro studium elektrochemického chování hydroxokobalaminu (derivát vitamínu B<sub>12</sub>, OH-CBL) a zejména pak pro vývoj jeho voltametrického stanovení.

### 1.3 Kobalaminy (vitamín B<sub>12</sub>)

Kobalaminy (CBL) představují skupinu látek, která je označovaná jako vitamín B<sub>12</sub>. Hlavní motivací k jejich objevu bylo hledání léčby na záhadný typ anémie později označované jako perniciózní anémie, kterou popsal britský lékař Thomas Addison v roce 1855 [95-97]. CBL jsou v literatuře také nazývány jako korinoidy, jelikož patří mezi deriváty sloučeniny korinu. Jako korin je označován centrální kruhový skelet, který je analogií porfyrinového kruhu a je složený ze čtyř pyrolových jader s čtyřmi dusíky na vnitřní straně. Od porfirinu se odlišuje vazbou C-C, která spojuje dva pyrolové kruhy. Ostatní jsou vázány přes methylenové uhlíkové můstky. K dusíkům je pevně vázán centrální atom kobaltu, ke kterému je axiálně připojen proměnlivý ligand (R). Struktura molekuly CBL je zobrazena na obrázku 6 [95-98].

V přírodě je nejvíce zastoupenou formou deoxyadenosylkobalamin (Ado-CBL). Hlavním místem výskytu Ado-CBL jsou mitochondrie eukaryot. Methylkobalamin (Me-CBL) je další přirozeně se vyskytující formou, se kterou se můžeme setkat v lidské plazmě nebo cytosolu. Každá z přirozeně se vyskytujících forem slouží jako kofaktor pro určité enzymy. V případě Ado-CBL se jedná o enzym methylmalonyl CoA mutázu, která zajišťuje syntézu látek jako jsou sukcinyl-CoA, což je látka účastnící se cyklu kyseliny citronové. Tento cyklus je podstatný pro biodegradaci mastných kyselin, které mají lichý uhlíkový řetězec. Pro enzym methionin syntázu je kofaktorem forma Me-CBL, účastní se tak přeměny homocysteinu (HoCySH) na methionin. Methionin má vliv např. na správnou syntézu DNA nebo proteinů [96, 97, 99, 100]. K farmakologickým účelům se nejčastěji používá kyanokobalamin (CN-CBL), jelikož se jedná o nejstabilnější formu. Působením světla a za účasti kyanidu přechází všechny ostatní formy na CN-CBL. V potravinových suplementech se však lze setkat i s OH-CBL nebo Me-CBL [96, 97]. Kromě potravinových doplňků je jediným zdrojem vitamínu B<sub>12</sub> pro lidský organismus potrava živočišného původu (játra, mléčné výrobky, korýši). Doporučená denní dávka pro člověka staršího 14 let je 2,4 µg [95, 96].





**Obrázek 6** Strukturní vzorec kobalaminu (CBL) a jeho formy dle ligandu (R) [98],

*R(1)-deoxyadenosylkobalamin (Ado-CBL), R(2)-methylkobalamin (Me-CBL), R(3)-hydroxokobalamin (OH-CBL), R(4)-kyanokobalamin (CN-CBL)*

Z hlediska fyzikálních vlastností se jedná o pevnou látku v podobě červených někdy červenooranžových jehličkovitých krystalů. Při procesu sušení v přítomnosti vzduchu se v krystalech váže 10–12 % vody. Teplota rozkladu je cca 210 °C. Nejběžnějším rozpouštědlem je voda nebo jiná polární rozpouštědla jako např. nižších alkoholy nebo kyselina octová. V nepolárních rozpouštědlech jako jsou uhlovodíky, ether nebo aceton se kobalaminy nerozpouští [97, 101].

Podmínkou vstřebávání CBL v organismu je účast několika proteinů, které zajišťují extracelulární transport. CBL vázaný ve stravě se vlivem žaludečních šťáv uvolňuje a váže se na protein haptokorin (HC), který pochází ze slin. Proces pokračuje ve dvanáctníku, kde dochází k rozkladu komplexu s HC pomocí enzymu trypsinu a střevních proteáz a CBL se váže na vnitřní faktor (IF). Komplex IF s CBL je odolný vůči enzymatickému rozkladu. Producentem glykoproteinu IF jsou parietální buňky žaludku. Cílovým místem absorpce jsou erytrocyty v ileu (tenké střevo), kde je CBL přenesen do buňky pomocí receptoru cubamu, jehož součástí je protein cubilin, který zajišťuje internalizaci komplexu IF s CBL. Absorpce CBL je závislá na množství IF a receptorů v ileu. Po vstupu do erytrocytu dochází k uvolnění CBL do krve, kde tvoří komplexy s plazmatickými proteiny. Prvním z nich je plazmatický HC,

(dříve TCI), který váže až 70-80 % cirkulujícího CBL. Tento komplex je nedostupný pro většinu buněk a cestou jeho odstranění z oběhu jsou játra a následně žluč. Druhým proteinem je transkobalamin (TC), (dříve TCII), který nese 20-30 % cirkulujícího CBL. CBL vázaný na TC zajišťuje distribuci CBL do buněk a tvorbu zásob v ledvinách [95-97, 99, 102, 103].

Nedostatek CBL se může vyskytovat u vegetariánů a veganů, v důsledku nedostatečného příjmu ze stravy, ale je také častý u starších lidí, kteří trpí sníženou žaludeční sekrecí. Může být také způsoben snížením absorpce potravinového CBL, kterým je např. autoimunitní perniciózní anémie, u které dochází k narušení parietálních buněk, které mají za úkol produkci IF. Nedostatek CBL má za následek zvýšení hladiny HoCySH, což vede k poruchám syntézy DNA nebo k makrocytóze krvinek [100, 104]. Dalšími důsledkem nedostatku CBL je pokles syntézy myelinu, což vede k neurologickým poruchám [105]. Je narušen citrátový cyklus a dochází k poruše degradace mastných kyselin a hromadění kyseliny methylmalonové [92, 96]. Je také ovlivněna krvetvorba a syntéza aminokyselin [106].

### 1.3.1 Hydroxokobalamin (B<sub>12a</sub>)

OH-CBL je forma CBL, která je výchozí látkou při vzniku aktivních Ado-CBL a Me-CBL. Tato forma se využívá jako injekční antianemický medikament při léčbě deficitu CBL např. vlivem perniciózní anémie. Hraje velmi významnou roli jako antidotum při otravách kyanidy (CN<sup>-</sup>) nebo může být použit k léčbě Leberovy dědičné nemoci, která způsobuje neuropatii zřetelného nervu [107]. Výhodou OH-CBL oproti CN-CBL je vyšší afinita k receptorům transportních plazmatických proteinů a tím i delší doba působení [108]. CN<sup>-</sup> je nekompetitivní blokátor cytochrom c oxidázy, který způsobuje buněčnou hypoxii a narušuje vznik ATP. Mezi vážné příznaky patří selhání ledvin, hypotenze, bradyarytmie, kóma až smrt [107, 109]. Z hlediska vedlejších účinků se jeví jako vhodné antidotum právě sloučenina OH-CBL, kdy dochází k substituci hydroxylové skupiny za CN<sup>-</sup> a výsledný CN-CBL je vyloučen močí. V Evropě je jako antidotum používán od roku 1980, setkáme se s ním pod obchodním názvem Cyanokit, který je jako přípravek schválený mimo jiné Evropskou agenturou pro léčivé přípravky [109, 110].

### 1.3.2 Voltametrické chování kobalaminů

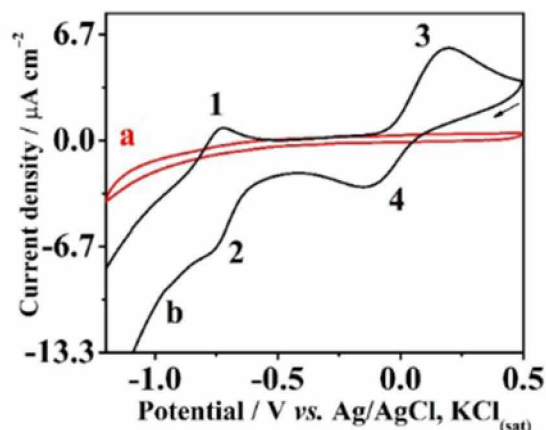
Počátky elektrochemických studií využívaly zejména polarografické techniky a jejich pozornost byla zaměřena jak na různé formy CBL, tak na oxidační stavy kobaltu. Jako zkratky CBL v pořadí oxidačních stavů (III), (II), (I) byly dříve používány B<sub>12a</sub>, B<sub>12r</sub> a B<sub>12s</sub> [111].

Příkladem raných studií je práce [112], kdy autoři Jaselskis a Diehl zkoumali polarografické chování systému obsahující vitamíny B<sub>12a</sub> a B<sub>12r</sub>. V prostředí o koncentraci 0,1M síranu draselného byly naměřeny dva redukční píky odpovídající přenosu jednoho e<sup>-</sup>, první při potenciálu -0,04 V a druhý při -0,96 V oproti nasycené kalomelové elektrodě (SCE). Obě přítomné formy se tedy redukovaly o jeden oxidační stupeň. Při negativnějších potenciálech okolo -1,5 V poskytoval sledovaný systém třetí vlnu, u které není znám přesný princip vzniku a nejspíše se jedná o katalytickou vlnu H<sub>2</sub> [112]. V další studii [113] se autor ABD-L-Nabey věnoval odlišnému chování vitamínu B<sub>12</sub> ve vodném prostředí a prostředí voda-alkohol. Bylo např. zjištěno, že při použití vodného roztoku LiCl o koncentraci 0,1 mol L<sup>-1</sup> byly naměřeny dva signály. První pík byl způsoben dvouelektronovou redukcí z oxidačního stavu (III) na (I) při -1,05 V (oproti referentní elektrodě SCE). Druhý signál při -1,6 V byl po ověření přidávkem HCl opět přisuzován redukcí H<sup>+</sup>. Ve směsi alkoholu a vody při určitých % alkoholové složky docházelo k rozdělení předního signálu. Dvouelektronový přechod zahrnoval dvě reakce a vlivem inhibice adsorpce CBL způsobenou alkoholy docházelo ke zpomalení druhé reakce a posunu E<sub>p</sub> [113]. Polarografie byla využita i v případě výzkumu Hogenkampa a Holmese [114], který byl zaměřen na charakter ligandů CBL a kobinamidů. Autoři zjistili, že posun výsledných polarografických signálů ke kladnějším potenciálům mohl být způsoben vysokou nukleofilitou ligandů (-CN, -OH, -Me). V případě vazby v horní pozici β byl pro ně typický jeden signál, způsobený přechodem přes dva oxidační stavy. Zato v případě aquakyanokobinamidu a kyanoaquakobinamidu, které měly substituent vázaný i v α pozici, byly zjištěny dvě redukční vlny, každá pro jeden přijatý e<sup>-</sup> [114]. Dále se Schmidt a Swolford ve své publikaci [115] zabývali problematikou adsorpce CBL a redukováných forem CBL s využitím CV a použitím rtuťových elektrod. Studovaným dějem byla opět redukce, kdy autoři došli k poznatku, že forma B<sub>12a</sub> se redukuje přes dva jednoelektronové děje. Také byla zkoumána souvislost mezi redukcí a katalytickým signálem H<sub>2</sub> [115]. Voltametrickou katodickou adsorpční stripovací analýzu prováděl Sawamoto v práci [116]. Stanovil rozsah potenciálu -0,3 V až -1,5 V pro nasycenou kalomelovou elektrodu (SCE), při kterém dochází k adsorpci CBL. Jako ideální elektrolyt zvolil 0,3M octan amonný. Zkoumal vliv rychlosti polarizace a optimalizoval podmínky stanovení, kdy dospěl k zjištění, že při 50 mV·s<sup>-1</sup> CN-CBL poskytoval jednu vlnu při -1,6 V. Tato vlna byla využita ke zkoumání voltametrického stanovení CN-CBL, jelikož se shodovala s potenciálem katalytické odezvy vodíku, ke které přispívá redukce této látky. Při působení akumulčního potenciálu -1,45 V po dobu 5 minut a teplotě 35 °C bylo dosaženo limitu detekce (LD) 2×10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> [116].

Kromě rtuťových elektrod bylo studováno elektrochemické chování CBL pomocí uhlíkových elektrod. Příkladem je studie autora Filika a skupiny výzkumníků [117], ve které byla použita GCE modifikovaná pomocí poly(2,2'-(1,4-fenylendivinylen) bis-8-hydroxychinaldin (poly(PBHQ)-GCE) a elektroda modifikovaná kromě poly(PBHQ) ještě i pomocí MWCNT (poly(PBHQ)/MWCNT-GCE) ke studii redukčního chování CN-CBL pomocí CV i SWV. Jako vzorky byly použity farmaceutické přípravky ve formě tablet a potravinářské výrobky konkrétně mléko nebo ovesné vločky. Na poslední uvedené pracovní elektrodě bylo dosaženo lineárního dynamického rozsahu (LDR) pro CN-CBL přes dva koncentrační řády (od  $1 \times 10^{-7}$  do  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) a nízkého LD ( $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>). Simultánní stanovení směsi vitamínů B<sub>9</sub> a B<sub>12</sub> bylo prováděno autorem Shishehborem v práci [118] na CPE modifikované MWCNT v kombinaci s 4-hydroxy-2-(trifenolfosfoniem)fenolátem. Analyzovanými vzorky byly farmaceutické přípravky a aplikovanou voltametrickou metodou byla DPV. Jednalo se o jednu z mála studií věnované oxidaci vitamínu B<sub>12</sub>. Zjištěn byl LDR pro samotný B<sub>12</sub> od  $6,2 \times 10^{-6}$  do  $75 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Dalším příkladem uhlíkových elektrod použitých ke stanovení vitamínu B<sub>12</sub> byly jednorázové tužkové grafitové elektrody (PGE). Věnoval se jim Pala a kol. v publikaci [119], kde byla použita metoda SWV a jako pracovní elektroda sloužila PGE modifikovaná peptidovými nanotrubičkami. Byla získána data vykazující lineární závislost koncentrace vitamínu B<sub>12</sub> v rozsahu  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> až  $9,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> s LD  $9,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Za účelem detekce vitamínu B<sub>12</sub> je možná i aplikace zlatých elektrod, což bylo diskutováno např. v [120], kdy Parvin a kol. využili ke stanovení CN-CBL ze vzorků potravin zlatou elektrodu modifikovanou směsí polypyrolu a dendrimeru triazinu, jehož součástí byly magnetické nanočástice. Použit byl Brittonův-Robinsonův (BRB) pufr a aplikovanou metodou byla CV a DPV. Velikost LDR s využitím elektrochemické redukce byla stanovena od  $2,5 \times 10^{-9}$  do  $5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> a bylo dosaženo nízkého LD ( $9,1 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>) [120].

Stanovení vitamínu B<sub>12</sub>, konkrétně formy CN-CBL, je popsáno ve dvou publikacích i s využitím BDDE [84, 121]. Pereira *a kol.* v článku [84] popsali stanovení CN-CBL v tabletách. Autoři studovali elektroanalytické chování redoxního páru Co(I/II) pomocí CV. Pro zlepšení odezvy bylo použito vložení katodického potenciálu  $-2$  V po dobu 30 s v 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následně byly naměřeny dva oxidační píky při potenciálech  $-0,74$  V (pík 1) a  $+0,18$  V (pík 3) a dva redukční signály při  $-0,12$  V (pík 4) a  $-0,75$  V (pík 2). Potenciály zaznamenaných signálů jsou uvedeny vs. potenciál referentní argentchloridové elektrody nasycené roztokem KCl (Ag/AgCl/KCl(sat.)) a naměřené cyklické voltamogramy jsou zobrazeny na obrázku 7. Křivky

byly měřeny od počátečního potenciálu ( $E_{in}$ )  $-1,25$  V až k potenciálu obratu ( $E_{switch}$ ) s hodnotou  $+0,5$  V. Konečný potenciál ( $E_{fin}$ ) odpovídal  $E_{in}$ . Při oxidacích se Co(I) a Co(II) oxidoval o jeden oxidační stupeň. Pro redukce platilo, že Co(II) a Co(III) přecházel zpět na Co(I) a Co(II). Po následné optimalizaci byla použita SWV, elektrolyt o pH 10 a v tomto prostředí byl naměřen LDR od  $2,5 \times 10^{-7}$  do  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> a nízký LD o hodnotě  $8,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> [84].

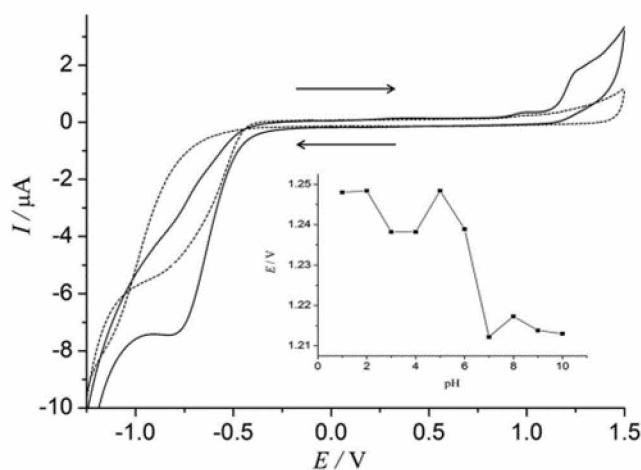


**Obrázek 7** Cyklický voltamogram vitamínu B<sub>12</sub> (CN-CBL) o koncentraci  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> v prostředí BRB (pH 5) zaznamenaná na BDDE, parametry: katodické předčištění:  $t = 30$  s,  $E = 2$  V,  $0,1$  M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  $E_{in} = E_{fin} = -1,25$  V;  $E_{switch} = 0,5$  V;  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>; **a** – křivka elektrolytu, **b** – křivka po přidavku CN-CBL [84]

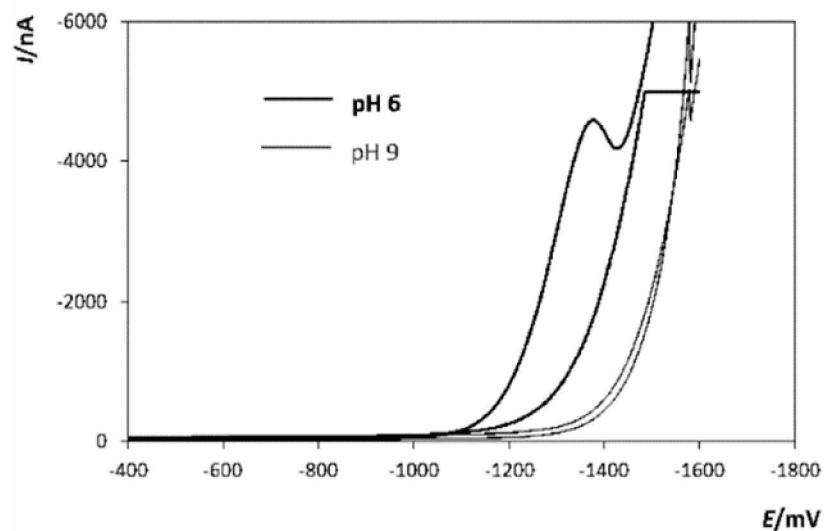
Druhá studie [121] týkající se voltametrické analýzy CN-CBL na BDDE se zabývala pouze jeho oxidačním chováním. Byla použita CV a analyt poskytoval jeden redukční ( $E_p = -0,8$  V vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) a dva oxidační signály při potenciálech  $+1$  V a  $+1,2$  V. Cyklický voltamogram je zobrazen na obrázku 8. Pro detekci byla aplikována SWV a elektrolytem byl BRB pufr o pH 2. BDDE byla před použitím upravena vložení anodického potenciálu  $+2$  V po dobu 180 s. Za těchto podmínek byla zjištěna linearita ve dvou koncentračních rozsazích  $2 \times 10^{-6}$ – $1,1 \times 10^{-5}$ , resp.  $1,1 \times 10^{-5}$ – $3,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Získaný LD byl roven  $7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Analyzovány byly vzorky moči s přidavkem CN-CBL [122].

Jedinou studií voltametrického chování přímo OH-CBL je publikace [37], kde jako pracovní elektroda byla aplikována AgSAE. Byly použity dvě modifikace a to: leštěná (p-AgSAE) a rtuťovým meniskem modifikovaná AgSAE (m-AgSAE). Výsledky byly porovnávány s hodnotami naměřenými na HMDE. Pomocí CV byl zkoumán vliv pH základního elektrolytu na voltametrické chování OH-CBL. Bylo zjištěno, že OH-CBL

poskytuje vždy jeden redukční pík ve slabě kyselém až neutrálním prostředí (BRB o pH 4-7) na p-AgSAE, v prostředí slabě kyselém až alkalickém (BRB o pH 4-9) na m-AgSAE a v případě HMDE bylo možné naměřit sledovaný signál v prostředí slabě kyselém až silně alkalickém (BRB o pH 5-12). Ani u jedné z elektrod nebyl zaznamenán oxidační pík. Cyklický voltamogram naměřený pomocí p-AgSAE v prostředí o pH 6 a pH 9 je zobrazen na obrázku 9. Vlivem pH se  $E_p$  redukčního píku příliš neměnilo a vyskytoval se v rozmezí potenciálů  $-1297$  mV až  $-1375$  mV (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)). Po optimalizaci parametrů DPV bylo dosaženo nízkých hodnot LD na nanomolární úrovni, konkrétně  $3,3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> pro p-AgSAE a  $1,5 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> m-AgSAE. S využitím navržené metody byl obsah OH-CBL stanoven ve vitamínovém přípravku [37].



**Obrázek 8** Cyklické voltamogramy před přidavkem (tečkovaná čára) a po přidavku (plná čára) vitamínu B<sub>12</sub> (CN-CBL) o koncentraci  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> v prostředí BRB (pH 2) zaznamenané na BDDE. Vložená závislost potenciálu pozitivněji položeného oxidačního píku na pH základního elektrolytu. Parametry: anodické předčištění:  $t = 180$  s,  $E = +2$  V, 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  $E_{in} = E_{fin} = -1,5$  V;  $E_{switch} = +1,5$  V;  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup> [121]



**Obrázek 9** Cyklické voltamogramy vitamínu  $B_{12a}$  (OH-CBL) o koncentraci  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na p-AgSAE, v prostředí BRB o pH 6 a 9, parametry:  $E_{in} = 0 \text{ mV}$ ;  $E_{fin} = -1600 \text{ mV}$ ;  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$  [37]

Z uvedeného přehledu je zřejmé, že skupina kobalaminů představuje elektrochemicky aktivní látky. Je patrné, že největší pozornost je věnována formě CN-CBL. Elektrochemické chování ostatních forem není dostatečně prozkoumané. Cílem této diplomové práce je popsat elektrochemické chování derivátu OH-CBL a navrhnout jednoduchou a přesnou metodu jeho stanovení s využitím pracovní elektrody na bázi BDD.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

V průběhu veškerých měření byly za účelem přípravy standardních roztoků a elektrolytů použity vždy chemikálie čistoty p. a. pokud není uvedeno jinak. Jako základní elektrolyt byl zvolen 0,1M roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Roztok byl připravován ředěním zásobního 1M roztoku, který byl získán ředěním zásobní 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Penta-Švec, Praha). BRB byl využit při studii vlivu pH základního elektrolytu na elektrochemické chování OH-CBL. BRB se skládal z kyselé a alkalické složky. Množství těchto složek se řídilo požadovanou hodnotou pH, která byla měřena pomocí pH metru. Alkalická složka tohoto pufru je tvořena 0,2M roztokem NaOH připraveným rozpuštěním navážky pevného NaOH (Penta-Švec Praha). Kyselá složka je tvořena směsí tří 0,04M roztoků kyselin, které byly připraveny ředěním 85 %  $\text{H}_2\text{PO}_4$  a 99 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a v případě  $\text{H}_3\text{BO}_3$  rozpuštěním pevné látky (vše Penta-Švec Praha). Dalším testovaným elektrolytem byla 0,1M  $\text{HNO}_3$ , 0,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , amoniakální (pH 9) a boritý pufr (pH 10). Kyseliny byly připraveny ze zásobních roztoků (Penta-Švec Praha). Boritý pufr představoval směs 0,05M roztoku  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  a 0,1M NaOH obojí z pevných chemikálií (Penta-Švec Praha). Amoniakální pufr byl směsí  $\text{NH}_3$  a  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Penta-Švec Praha).

Standardní roztok studované látky o koncentraci  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  byl připravován ze standardu  $\text{B}_{12a}$  hydrochlorid (Sigma-Aldrich, CAS: 59461-30-2, Hydroxocobalamin hydrochloride). Za účelem interferenčních analýz byly použity roztoky látek vyskytujících se v moči, a to močoviny (U), kyseliny močové (UA), kyseliny listové (FA), sacharózy (S), kyseliny askorbové (AA), kreatininu (C), glukózy (G) a kyseliny barbiturové (BA). Koncentrace standardních roztoků byla  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  až na výjimku nižší koncentrace u kyseliny močové ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Standardy byly od firmy (Sigma-Aldrich) s výjimkami močoviny (Lachema o. p. Brno) a sacharózy (Penta). Při interferenčních studiích byly využity také standardní roztoky vitamínů, a to vitamínu  $\text{B}_{12}$  – kyanokobalaminu, H – biotinu,  $\text{B}_6$  – pyridoxinu,  $\text{B}_1$  – thiaminu,  $\text{B}_5$  – kyseliny pantothenové a  $\text{B}_3$  – nikotinamidu o koncentraci  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $\text{B}_2$  – riboflavinu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Veškeré standardy vitamínů byly od Sigma-Aldrich a byly čistoty nejméně 98 %.

### 2.2 Přístrojové vybavení

Všechna voltametrická měření byla provedena pomocí Eco-Tribo Polarografu PC ETP (EcoTrend Plus s. r. o., Praha, Česká republika), jehož součástí byla voltametrická nádobka



s tříelektrodovým uspořádáním (obrázek 10). Zařízení bylo ovládáno přes PC rozhraní pomocí softwaru Polar 5.1. Používaný elektrochemický článek se skládal z pracovní elektrody, kterou byla komerční BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie), z referentní Ag/AgCl/KCl(sat.) a pomocné elektrody ve formě platinového drátku (Monokrystaly s.r.o., Turnov, Česká republika). Teplota v laboratoři během měření byla  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Při pH studii byl za účelem přípravy BRB pufru o různé koncentraci použit stolní pH metr Fisher Scientific AB 150 (Fisher Scientific, Česká republika). K navažování pevných chemikálií a standardů sloužily analytické váhy KERN ALS 120-4N (Kern a Sohn, Německo). K odměřování kapalin byly použity skleněné pipety s balónkem nebo odměrné válce a za účelem dávkování malých objemů řádově v  $\mu\text{L}$  byly aplikovány automatické mikropipety. Při přípravě roztoků v případě horšího rozpouštění pevných látek byla odměrná baňka s roztokem vložena do ultrazvukové lázně Bandelin Sonorex (Schalltec GmbH, Německo).



**Obrázek 10** Eco-Tribo Polarograf PC ETP se zapojeným tříelektrodovým elektrochemickým článkem

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Voltametrická měření

Voltametrické chování OH-CBL bylo sledováno při různých hodnotách pH v BRB pufru a v dalších elektrolytech ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , amoniakálním nebo boritém pufru) pomocí metody CV. Pro každé pH byly zaznamenány výšky ( $I_p$ ) a potenciály naměřených píků ( $E_p$ ). Pro tuto studii byl rozsah potenciálů volen s ohledem na měnící se potenciálové okno v důsledku změny pH prostředí. Pro všechna měření byla aplikována rychlost polarizace  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Pro všechny další experimenty byl jako základní elektrolyt zvolen roztok  $0,1\text{M H}_2\text{SO}_4$ . Metoda CV byla také využita pro sledování vlivu rychlosti polarizace na výšky jednotlivých signálů. V tomto případě bylo využito následujících parametrů:  $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = -1200 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{switch}} = +2200 \text{ mV}$ ,  $\nu = 10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$ . V tomto případě byly vyhodnoceny  $I_p$  zaznamenaných píků.

Druhou použitou metodou byla DVP, která sloužila k vývoji metody stanovení OH-CBL. Používaným elektrolytem byla  $0,1\text{M H}_2\text{SO}_4$ . V rámci optimalizace metody byly testovány vlivy parametrů jako je rychlost polarizace ( $\nu$ ), počáteční potenciál ( $E_{\text{in}}$ ) a šířka a výška pulzu. Nalezené optimální parametry jak v případě studie pro oxidační signál, tak v případě redukčního píku jsou uvedeny v tabulce 1. U všech měření jak u CV, tak u DPV byl použit stejný objem elektrolytu, a to  $10 \text{ mL}$ .

*Tabulka 1 Optimální parametry aplikované pro stanovení OH-CBL pomocí DPV*

	$E_{\text{in}}$	$E_{\text{fin}}$	$\nu$	Výška pulzu	Šířka pulzu
	[mV]	[mV]	[mV s <sup>-1</sup> ]	[mV]	[ms]
<b>Oxidace</b>	-400	+2300	30	65	20
<b>Redukce</b>	+2000	-1500	80	-65	40

Vyhodnocení signálu OH-CBL obvykle probíhalo vytvořením základní linie, která spojovala konec a začátek píku a stanovením maxima píku spuštěním kolmé přímky na základní linii. V případě redukčního signálu naměřeného CV bylo, vzhledem k tvaru a poloze píku, nutné použít pro vyhodnocení rovné čáry (tečny) v bodě počátku píku a na ní spuštěnou kolmicí v maximu sledované odezvy byla zjištěna výška signálu. Pro snazší vyhodnocení byla u DPV využita metoda odečtení základního elektrolytu. Veškeré grafy byly vytvořeny v programu MS

Excel 2010 (Microsoft, USA). Pro tvorbu rovnic k lineárním závislostem byl využit software OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, USA). Pro výpočet LD a meze stanovitelnosti (LQ) sloužily rovnice 4 a 5, kde  $S_B$  je směrodatná odchylka úseku a  $k$  odpovídá směrnici kalibrační přímky.

$$LD = \frac{3 \times S_B}{k} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_B}{k} \quad (5)$$

V rámci interferenční studie byl sledován vliv 15 možných interferujících látek, které se mohou vyskytovat spolu s OH-CBL v biologických vzorcích (moč) a/nebo ve vitamínových přípravcích. Pro analýzu byla zvolena metoda DPV s výše uvedenými optimalizovanými parametry, jak pro oxidační, tak pro redukční signál. Postup experimentu byl následující. Na začátku se změřil roztok elektrolytu a poté přidavek OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (pro oxidační signál) a koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (pro redukční signál). Dále byly postupně pipetovány přídavky potenciálně interferující látky v daných poměrech. U látek vyskytujících se v moči byly těmito poměry 1:1; 1:10 a 1:100 (tzn. koncentrace interferentu byla pro oxidaci:  $2,5 \times 10^{-6}$ ,  $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , pro redukci:  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) a v případě vitamínů byly zvoleny poměry 1:0,1; 1:1 a 1:10 (tzn. koncentrace interferentu byla pro oxidaci:  $2,5 \times 10^{-7}$ ,  $2,5 \times 10^{-6}$  a  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a pro redukci:  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Po každém přidavku byl naměřen voltametrický záznam a vyhodnocena výška signálu OH-CBL.

### 2.3.2 Analýza potravinových doplňků stravy

Pro analýzu byly zvoleny dva přípravky s obsahem OH-CBL (obrázek 11). Prvním z nich byl tekutý vitamín B<sub>12</sub> (hydroxokobalamin) od výrobce Metabolics (Eastcott, Velká Británie). Výrobek o objemu 100 mL obsahoval 1351 kapek. Výrobce bylo deklarováno, že v jedné kapce se nachází 98 µg OH-CBL. Koncentrace OH-CBL v přípravku tedy odpovídala  $9,83 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . K analýze byl využit přímo koncentrovaný vzorek a do polarografické nádoby bylo dávkováno 10 µL. Analýza probíhala pomocí metody standardního přidavku. Vždy byly ke vzorku ve voltametrické nádobce přidány minimálně dva přídavky o objemu 10 µL a koncentraci  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Analýza byla opakována 5krát. Druhým vybraným potravinovým doplňkem byly tablety vitamínu B<sub>12</sub> (hydroxokobalamin) od výrobce Cytoplan (Hanley Swan, Velká Británie). V tomto případě bylo výrobcem uvedeno, že každá tableta

obsahuje 1000  $\mu\text{g}$  OH-CBL. Příprava vzorku k analýze probíhala rozmělněním 10 tablet v třecí misce za vzniku jemného prášku, který byl následně převeden do 100mL odměrné baňky a rozpuštěn v destilované vodě. Pro lepší rozpouštění bylo nutné roztok vložit do ultrazvukové lázně po dobu 25 minut. Zbývající nerozpuštěný pevný podíl byl odfiltrován pomocí nálevky přes skládaný filtr. Nakonec byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. U takto připraveného roztoku byla vypočtena koncentrace OH-CBL o hodnotě  $7,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Opět byla využita metoda standardního přídatku. Přidávaný objem standardu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  byl 13,5  $\mu\text{L}$ . Obdobně jako u tekutého přípravku bylo provedeno 5 opakovaných měření. Z 5 naměřených hodnot byla následně pro oba přípravky vypočítána průměrná hodnota, interval spolehlivosti, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD<sub>5</sub>).



**Obrázek 11** Analyzované vzorky: tekutý vitaminový přípravek Vitamin B12 (Hydroxocobalamin) od společnosti Metabolics a vitaminový doplněk stravy ve formě tablet Vitamin B12 od firmy Cytoplán

## 3 Výsledky a diskuse

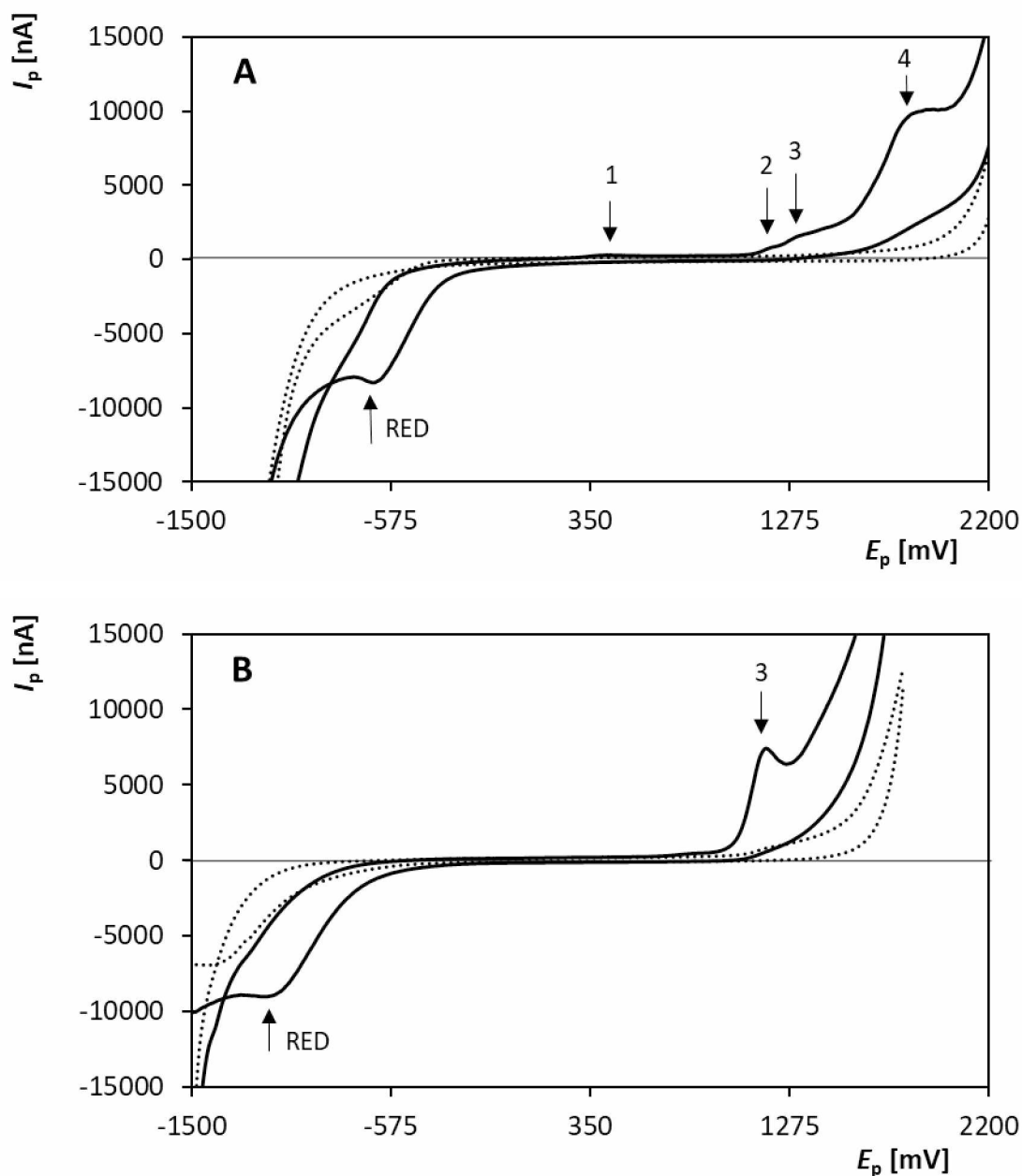
### 3.1 Vliv pH základního elektrolytu na voltametrického chování OH-CBL na BDDE

Cílem této práce bylo zejména nalezení vhodných podmínek pro stanovení OH-CBL a studium jeho voltametrického chování na BDDE. Obecně lze říci, že elektrochemie kobalaminů je velmi bohatá a byla studována již od 50. let 20. století s využitím nejprve DME a poté i celé řady stacionárních pracovních elektrod, jak již bylo popsáno podrobněji v kapitole 1.3.2. V současné době je největší pozornost věnována nejvíce používanému derivátu CN-CBL, jehož voltametrickému chování a/nebo stanovení se věnovali autoři v řadě publikací [84, 116-122] včetně popisu stanovení na BDDE [84, 121]. Ze studia odborné literatury je patrné, že většina sledovaných elektrodoých reakcí se odehrává na centrálním atomu kobaltu a bylo potvrzeno, že jednotlivé substituenty ovlivňují průběh elektrodoých reakcí v důsledku různé nukleofility [114]. Ve většině studií byla sledována redukce kobaltu v oxidačním stavu Co(III) nebo Co(II) na Co(II), resp. Co(I) [37, 84, 112-117, 119-121]. Přenosy elektronu při změně oxidačního stavu Co byly významně ovlivněny charakterem pracovní elektrody (např. na elektrodách z kapalné rtuti docházelo k adsorpci vznikajících meziproductů, což ovlivňovalo průběh elektrodoých reakcí) [111, 112, 115, 116], typem základního elektrolytu (pH, složení) [111-114], ale i přítomností, pozicí a/nebo charakterem ligand/u [111, 114]. Na rtuťových elektrodách byla, kromě polarografických signálů redukce centrálního prvku kobaltu, zaznamenána i negativně situovaná katodická vlna vodíku, což bylo diskutováno např. v [112, 113]. Co se týká anodického chování, autoři popisovali registrované signály jako oxidace probíhající opět na centrálním atomu Co a to z oxidačního stavu Co(I), resp. Co(II) na oxidační stav Co(II), resp. Co(III) [84, 120, 121]. Ze stručného přehledu uvedeného výše je patrné, že elektrochemie kobalaminů je poměrně složitá a je ovlivňována celou řadou faktorů. Jedním z nich je i pH prostředí, ve kterém probíhají sledované reakce. Z literatury bylo zjištěno, že OH-CBL se v kyselých prostředích ( $\text{pH} \leq 3$ ) vyskytuje převážně jako nabitá molekula označovaná aquakobalamin ( $\text{OH}_2\text{-CBL}$ ), která představuje konjugovanou kyselinu k OH-CBL. S narůstajícím pH prostředí převládá forma OH-CBL, která pak dominuje v alkalickém prostředí [114, 123]. To potvrzuje i hodnota  $\text{pK}_a = 7,8$  systému  $\text{OH}_2/\text{OH-CBL}$  [124].

První experimenty této práce byly zaměřeny na pH základního elektrolytu, které zásadně ovlivňuje voltametrické chování elektrochemicky aktivních látek. Proto bylo chování OH-CBL monitorováno v širokém rozsahu pH. Současně byla provedena volba média, v němž

budou následující analýzy probíhat. Jako vhodný pro tento typ experimentů je BRB pufr, který je možné připravit v rozmezí hodnot pH 2-12. Pro hodnoty pH pod 2 byly použity následující roztoky kyselin: 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1M HNO<sub>3</sub>. Pro experimenty v alkalickém prostředí bylo využito navíc amoniakálního (pH 9) a boritého pufru (pH 10). Použitou metodou byla CV s rychlostí polarizace 100 mV s<sup>-1</sup> a koncentrace OH-CBL byla pro všechna měření 5×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. Všechny potenciály zaznamenaných signálů jsou uváděny vs. referentní Ag/AgCl/KCl (sat.) elektroda.

V rámci této studie bylo zjištěno, že OH-CBL poskytuje v kyselém prostředí (pH ≤ 3) 4 signály. Jako příklad může sloužit cyklický voltamogram naměřený v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (obrázek 12A). Pro přehlednost byly oxidační signály označeny číslicemi v pořadí výskytu (1-4). V prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se vyskytovaly při potenciálech  $E_{p1} = +412$  mV,  $E_{p2} = +1181$  mV,  $E_{p3} = +1304$  mV a  $E_{p4} = +1837$  mV. Z obrázku 12A je zřejmé, že odezvy 2 a 3 byly špatně vyvinuté a tvořily spíše jeden signál se dvěma vrcholy navíc těsně naléhaly na odezvu 4. S narůstající hodnotou pH klesal i počet naměřených signálů. V prostředí o pH 4 byly detekovány pouze píky 1, 3 a 4 ( $E_{p1} = +203$  mV,  $E_{p3} = +1484$  mV a  $E_{p4} = +1802$  mV). V elektrolytech o pH 8-11 bylo možné pozorovat již jen jediný anodický signál (pík 3) okolo potenciálu +1200 mV. Příkladem může být cyklický voltamogram naměřený v prostředí BRB o pH 10 znázorněný na obrázku 12B. Kromě anodických signálů byl zaznamenan i jeden pík redukční, označen zkratkou RED, který bylo možné pozorovat ve všech použitých základních elektrolytech, což dokládají i křivky na obrázcích 12A pro kyselá a 12B pro alkalická prostředí.



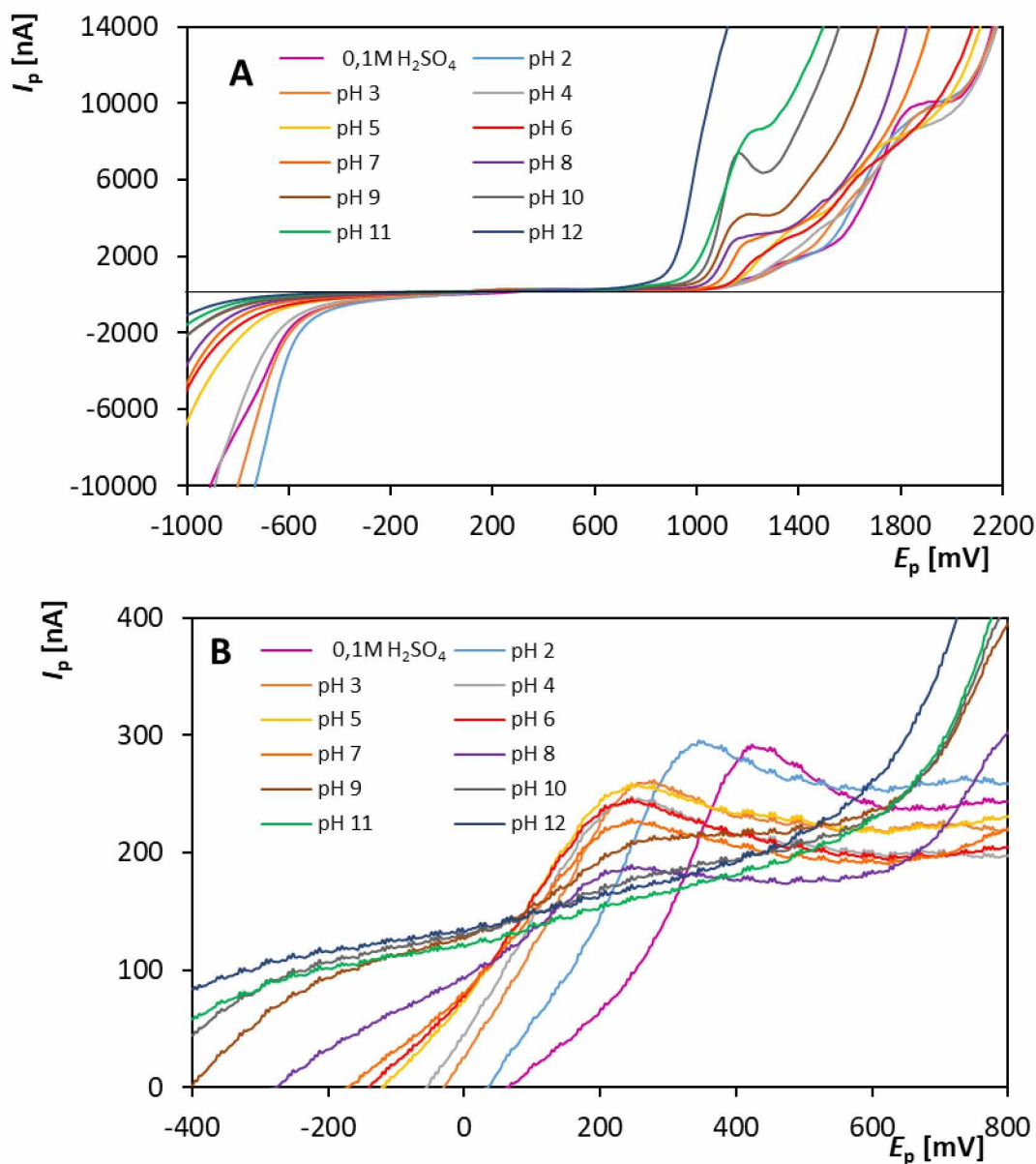
**Obrázek 12** Cyklické voltamogramy bez přidavku (přerušovaná čára) a po přidavku OH-CBL (plná čára) o koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí (A) - 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , parametry:  $E_{in} = E_{fin} = -1000 \text{ mV}$ ,  $E_{switch} = +2200 \text{ mV}$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$  a (B) - BRB (pH 10), parametry:  $E_{in} = E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ,  $E_{switch} = +1800 \text{ mV}$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Detailněji je studovaná závislost na pH základního elektrolytu znázorněna na obrázcích 13 a 14 pro oxidační odezvy a na obrázku 15 pro pík RED. Obrázek 13A představuje naměřené anodické části cyklických voltamogramů v elektrolytech v rozmezí pH 2 až 12 (BRB 2-12) a v prostředí 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a na obrázku 13B je pak zobrazen detail těchto křivek pro oblast signálu 1. Z uvedených křivek je patrné, že pík 1 byl nejvyšší v prostředích silně kyselých (pH

$\leq 2$ ) a s rostoucí hodnotou jeho výška klesala. V alkalickém prostředí tento pík nebyl zaznamenán vůbec. Toto dokládá i graf 14A, kde je uvedena závislost  $I_{p1}$  na pH základního elektrolytu. Nejvyšší odezva píku 1 byla pozorována v prostředí o  $\text{pH} \leq 1$ . Byly testovány 3 elektrolyty na bázi anorganických kyselin (0,1M  $\text{HNO}_3$ , 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a vyšší hodnoty  $I_p$  bylo dosaženo v prostředí kyseliny sírové. Při srovnání dvou různě koncentrovaných elektrolytů na bázi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bylo zjištěno, že hodnota  $I_p$  sledovaného signálu byla vyšší při použití  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o nižší koncentraci. Z grafu 13B je navíc patrné, že tento signál byl v prostředí 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dobře vyvinutý a snadno vyhodnotitelný, proto byl zvolen pro další experimenty. Naopak odezvy 2 a 4 byly vzhledem ke své poloze nepříliš dobře vyhodnotitelné a nebyly perspektivní z hlediska analytické využitelnosti. Závislosti jejich výšek na pH prostředí jsou uvedeny na obrázku 14B. Signál 3 detekovaný v prostředích o  $\text{pH} \leq 7$  byl, vzhledem ke své poloze a přítomnosti signálů 2 a 4, obtížně vyhodnotitelný. Výška této oxidační odezvy rostla s rostoucím pH prostředí, což dokládá i grafická závislost 14B. Nejvyšší hodnota  $I_{p3}$  byla dosažena v prostředích BRB o pH 10 a 11. Tvar této odezvy a její vyhodnotitelnost byly výrazně lepší v prostředí o pH 10, což opět dokládá i obrázek 13A. V rámci tohoto experimentu byl testován i amoniakální pufr o pH 9 a boritý pufr o pH 10. I v těchto prostředích bylo možné detekovat 1 anodický signál (odezva 3), ale v porovnání s BRB o pH 10 byla zaznamenaná odezva špatně vyvinutá (křivky nejsou pro přehlednost zobrazeny). Proto bylo prostředí BRB o pH 10 vyhodnoceno jako nejlepší pro monitoring OH-CBL v alkalickém prostředí. Vzhledem k omezenému rozsahu této diplomové práce bylo dále studováno pouze kyselé prostředí zejména kvůli možnosti detekce signálu 1, který nebyl ovlivněn rozkladem základního elektrolytu, byl dostatečně vyvinutý a bylo možné ho snadno vyhodnotit. Proto lze předpokládat, že bude vhodný k analytickému využití.

Pro všechny zaznamenané odezvy byla vyhodnocena i závislost jejich polohy na pH prostředí (obrázek 14C). Pík 1 se s rostoucím pH mírně posouval k negativnějším potenciálům, u odezvy 2 nebyl zaznamenán téměř žádný posun se změnou pH, signál 3 nevykazoval žádný jednoznačný trend se změnou pH prostředí a odezva 4 v prostředích o pH 1-3 téměř neměnila svoji polohu a v elektrolytech o pH 4-6 se posouvala stejně jako pík 1 k negativnějším potenciálům.

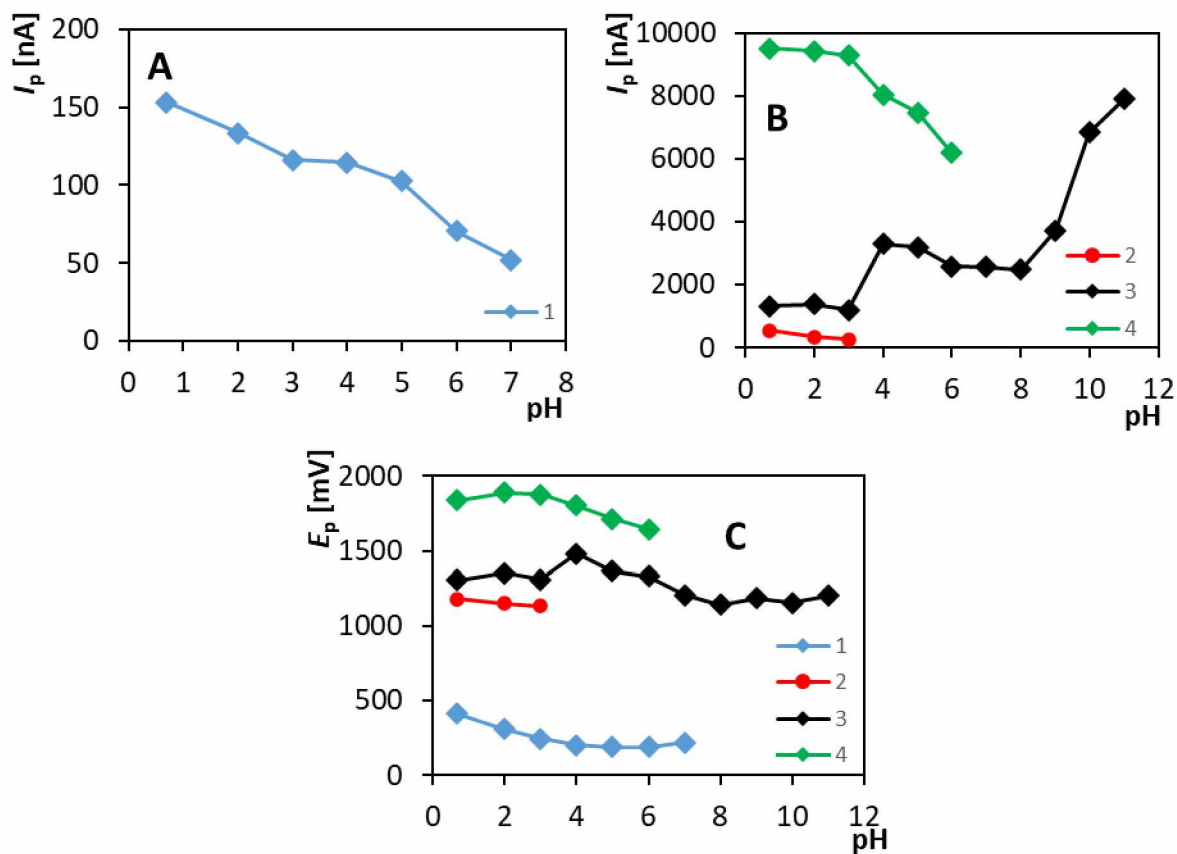




**Obrázek 13** Anodické části cyklických voltamogramů OH-CBL o koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2-12 a 0,1M  $H_2SO_4$  (A) zobrazené v celém měřeném potenciálovém rozsahu a (B) zobrazené pro potenciálovou oblast signálu 1, parametry:  $E_{in} = E_{fin} = -1000 \text{ mV}$  (0,1M  $H_2SO_4$ ) až  $-1500 \text{ mV}$  (pH 12),  $E_{switch} = +2200 \text{ mV}$  (0,1M  $H_2SO_4$ ) až  $+1250 \text{ mV}$  (pH 12),  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

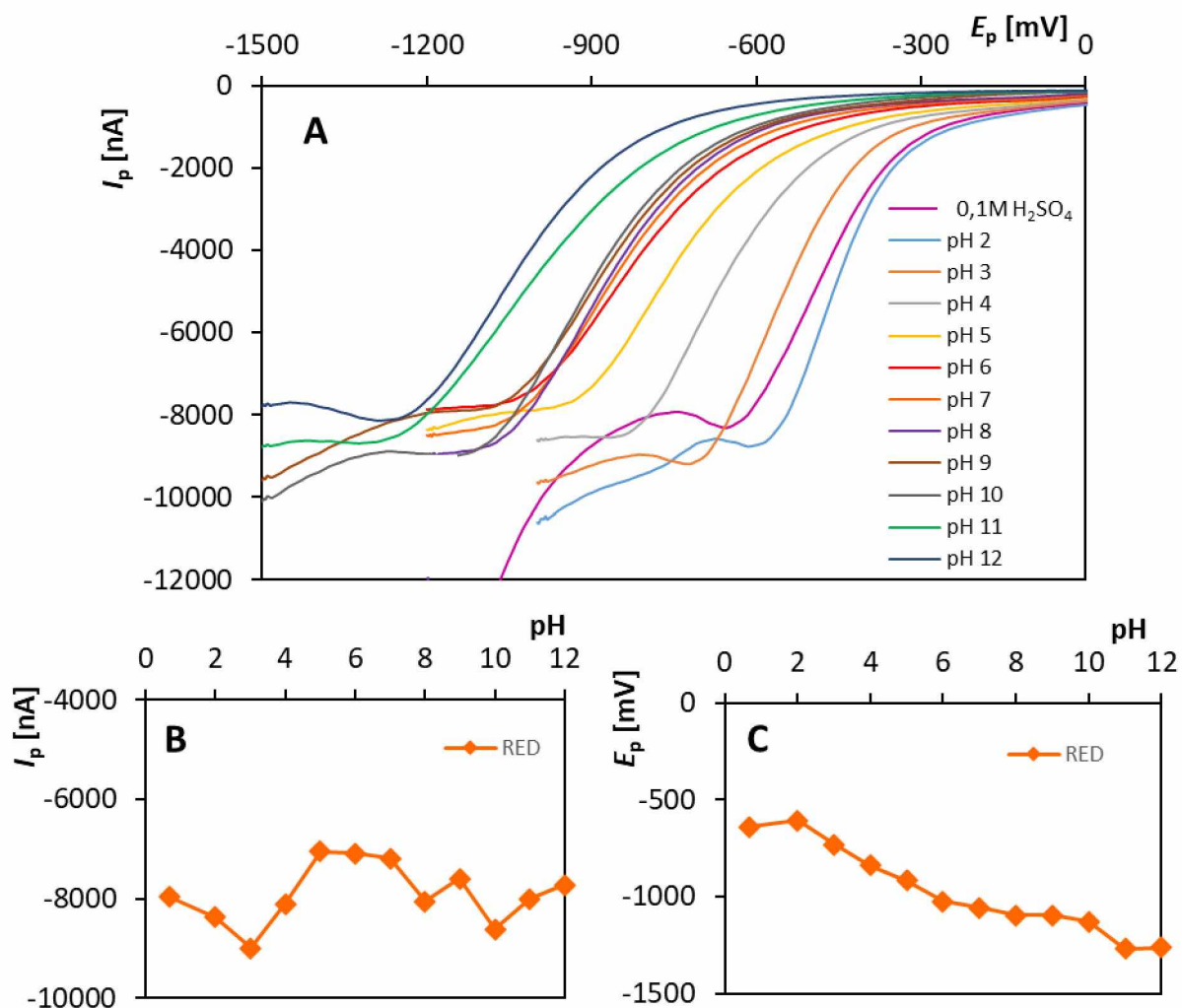
Na obrázku 15 jsou zobrazeny katodické části cyklických voltamogramů naměřené po přidavku  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v prostředí BRB o pH 2-12 a 0,1M  $H_2SO_4$ . Z naměřených křivek bylo zřejmé, že po přidavku analytu bylo možné zaznamenat 1 redukční odezvu, a to ve všech testovaných elektrolytech. Výška tohoto signálu se výrazněji neměnila, ale za nejvyšší lze považovat katodický signál v prostředí o pH 3 (obrázek 15B). Poloha signálu RED se od prostředí 0,1M  $H_2SO_4$  do pH 2 mírně posouvala k pozitivnějším potenciálům a od hodnoty

pH 2 docházelo s narůstajícími hodnotami pH k posunu k negativnějším potenciálům (obrázek 15C).



**Obrázek 14** Vliv pH základního elektrolytu (BRB o pH 2-12 a 0,1M  $H_2SO_4$ ) na (A) – výšku signálu 1, (B) – výšku signálů 2, 3 a 4, (C) – polohu signálů 1-4, parametry uvedené v popisku obrázku 13

Vzhledem k omezenému rozsahu této práce byla pro další studium zvolena jako základní elektrolyt 0,1M  $H_2SO_4$ . Z hlediska analytického využití byl jako perspektivní, na základě charakteristik uvedených výše, vybrán oxidační pík 1. Vzhledem k tomu, že bylo možné v tomto prostředí detekovat i redukční signál, což je v případě BDDE nepříliš časté, byla část následujících experimentů věnována možnosti využití i této odezvy.



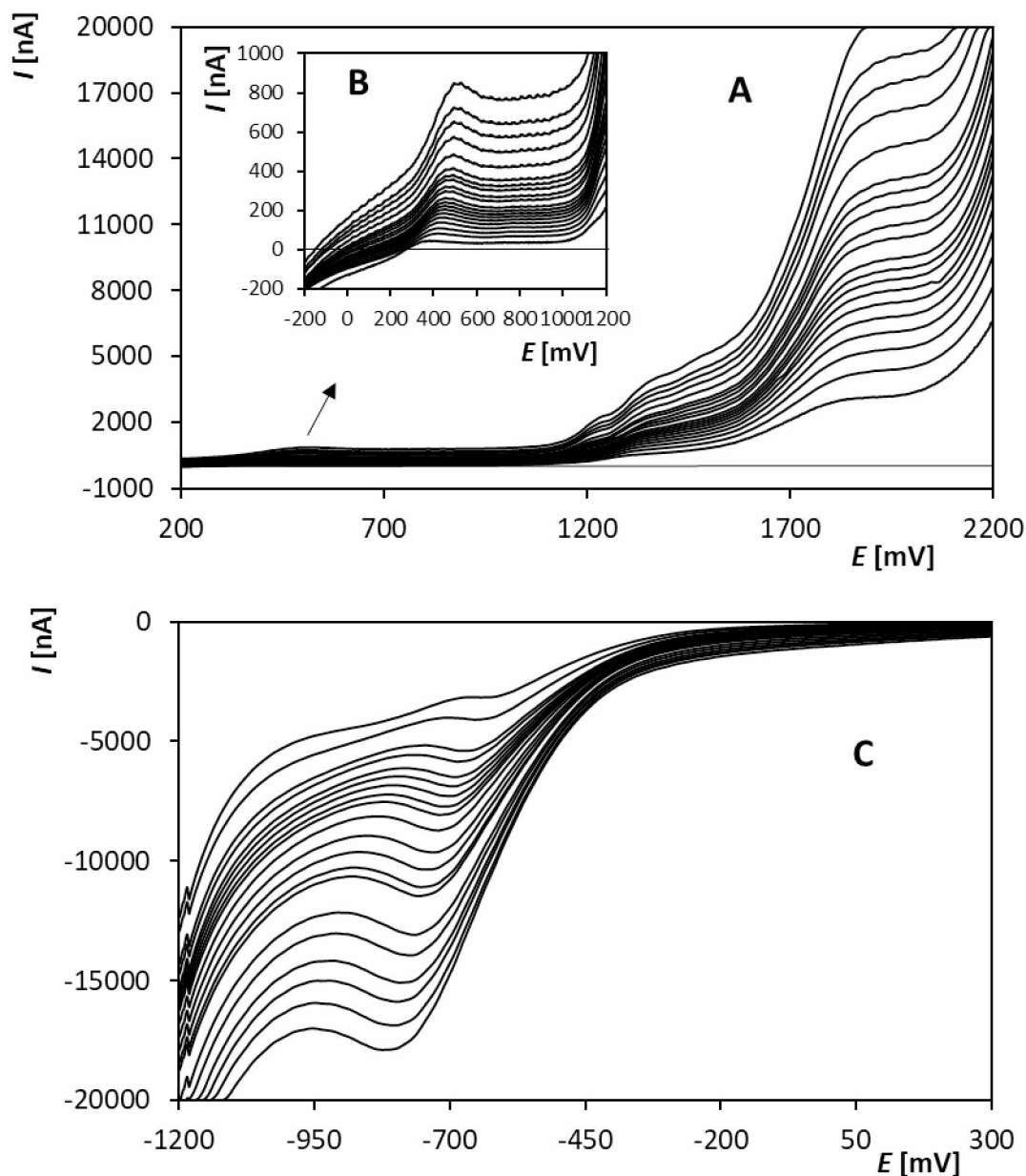
**Obrázek 15 (A)** – Katodické části cyklických voltamogramů OH-CBL o koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2-12 a 0,1M  $H_2SO_4$ ; Vliv pH základního elektrolytu (BRB o pH 2-12 a 0,1M  $H_2SO_4$ ) na (B) – výšku a (C) – polohu signálu RED, parametry uvedené v popisku obrázku 13

Po studiu odborné literatury a ve srovnání s dosaženými výsledky, lze předpokládat, že mechanismus sledovaných anodických reakcí (tzn. signálů 1 a 3) se bude týkat oxidace centrálního atomu kobaltu a pík 1 bude představovat přechod z oxidačního stavu Co(I) na Co(II) a signál 3 by měl odpovídat oxidaci Co(II) na Co(III). Neúčast protonu na tomto ději potvrzují i závislosti zobrazené na obrázku 14C. Je zřejmé, že nedochází k lineárnímu posunu sledovaných signálů s hodnotou pH základního elektrolytu. Lineární posun je charakteristický právě pro zapojení protonu(ů) do elektrodové reakce. Obdobné výsledky byly naměřeny i pro voltametrické chování CN-CBL na BDDE v publikacích [84, 121]. V případě signálu RED lze usuzovat na redukci centrálního prvku kobaltu. I zde, lze s ohledem na již publikovaná data pro voltametrickou studii chování CN-CBL na BBDE [84, 121], předpokládat redukci  $Co(III) \rightarrow$

Co(II). Vzhledem k poloze oxidačních signálů a redukční odezvy lze hovořit o ireverzibilní elektrodové reakci, což následně potvrdily i výsledky získané ze studie vlivu rychlosti polarizace na sledované signály, kdy docházelo se zvyšující se hodnotou rychlosti polarizace k posunu sledovaných píků (více v kapitole 3.2), což je charakteristické právě pro ireverzibilní systémy.

### 3.2. Vliv rychlosti polarizace na voltametrické chování OH-CBL na BDDE

V dalších experimentech byl zkoumán vliv rychlosti polarizace na voltametrické odezvy OH-CBL v kyselém prostředí (0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Cílem těchto měření je charakterizace řídicích dějů elektrodových reakcí. Použitou metodou byla opět CV a rychlosti byly aplikovány v rozsahu 10-500 mV s<sup>-1</sup>. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 16. Pro přehlednost byly grafy rozděleny na anodickou (obrázek 16A a detail pro oblast píku 1 na obrázku 16B) a katodickou část (obrázek 16C). Z obrázku 16 je patrné, že sledované signály, tzn. oxidační odezvy 1 a 3 a redukční pík RED, se zvyšují s rostoucí rychlostí polarizace. Na obrázku 17A-C jsou vyneseny závislosti  $I_p$  na  $v$ , ze kterých je zřejmé, že tento nárůst nevykazuje lineární trend ani u jedné ze sledovaných odezev. Z této skutečnosti lze usuzovat, že probíhající děje nebudou řízeny adsorpcí. Na druhou stranu závislosti výšek jednotlivých signálů vykazovaly lineární průběh s druhou odmocninou rychlosti polarizace ( $v^{1/2}$ ), což je patrné z grafů 17D-F, které jsou popsány rovnicemi (6) pro pík 1, (7) pro odezvu 3 a (8) pro signál RED. U píku 3 a RED je závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  lineární v celém testovaném rozsahu  $v$ , což svědčí o tom, že řídicím dějem je difúze. Potvrzením tohoto závěru je i hodnota směrnice závislosti  $\log(I_p)$  na  $\log(v)$  (obrázek 17H a 17CH, rovnice (10) a (11)). Pro oxidační signál 3 má směrnice uvedené logaritmické závislosti hodnotu  $(0,466 \pm 0,005)$  a pro pík RED se rovná  $(0,453 \pm 0,008)$ . Tyto hodnoty se blíží teoretické hodnotě 0,5, která je charakteristická pro elektrodové děje řízené difúzí. Difúze je typickým řídicím dějem při použití pracovních BDD elektrod vzhledem k nízké afinitě pracovního povrchu. V případě píku 1 byla závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (rovnice 6, obrázek 17D) lineární v užším rozsahu  $v$  (30-350 mV s<sup>-1</sup>). Směrnice pro logaritmickou závislost (obrázek 17G) má pro pík 1 hodnotu  $(0,384 \pm 0,012)$ , což je patrné z rovnice (9). Z toho vyplývá, že difúze není jediným řídicím dějem a bude zde hrát roli i kinetika. Podle obrázku 16 lze konstatovat, že u oxidace dochází s rostoucí rychlostí polarizace k posunu signálů směrem ke kladnějším potenciálům a v případě redukční části se signály posunují směrem k zápornějším  $E$ .



**Obrázek 16** Voltametrické křivky po přidavku OH-CBL o koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1M \text{ H}_2\text{SO}_4$  při různých rychlostech polarizace; **(A)** – anodická část cyklických voltamogramů; **(B)** – detail křivek pro oblast píku 1; **(C)** – katodická část cyklických voltamogramů; parametry:  $E_{in} = E_{fin} = -1200 \text{ mV}$ ;  $E_{switch} = +2200 \text{ mV}$ ,  $\nu = 10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$

$$I_p [\text{nA}] = (9,085 \pm 0,280) \left( \nu \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right)^{1/2} + (29,182 \pm 3,299), r^2 = 0,9929 \quad (6)$$

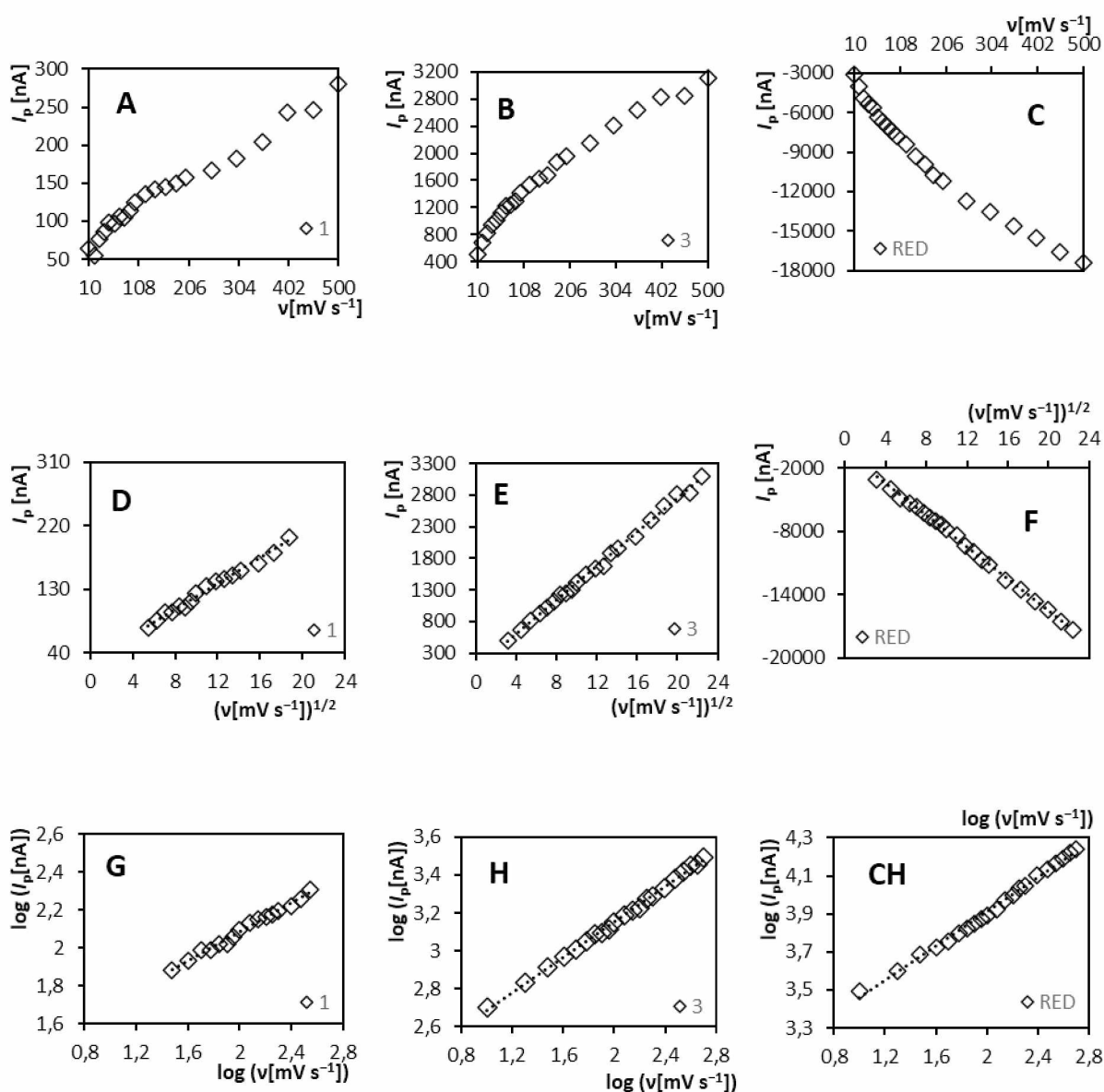
$$I_p [\text{nA}] = (134,379 \pm 1,548) \left( \nu \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right)^{1/2} + (64,965 \pm 20,265), r^2 = 0,9987 \quad (7)$$

$$I_p[\text{nA}] = (-754,856 \pm 6,979) \left( v \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right)^{1/2} + (-471,011 \pm 91,377), r^2 = 0,9991 \quad (8)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,384 \pm 0,012) \log \left( v \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right) + (1,316 \pm 0,024), r^2 = 0,9932 \quad (9)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,466 \pm 0,005) \log \left( v \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right) + (2,220 \pm 0,011), r^2 = 0,9988 \quad (10)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,453 \pm 0,008) \log \left( v \left[ \frac{\text{mV}}{\text{s}} \right] \right) + (3,004 \pm 0,016), r^2 = 0,9991 \quad (11)$$



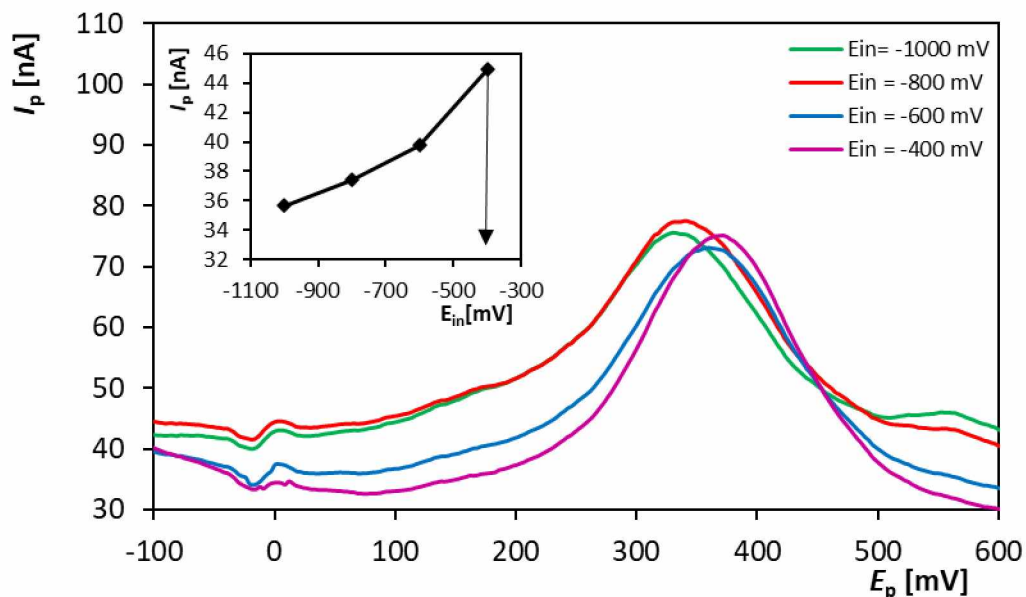
**Obrázek 17** Závislosti  $I_p$  na  $v$  pro signál 1 (A), 3 (B) a RED (C); Závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro signál 1 (D), 3 (E) a RED (F); Závislosti  $\log(I_p)$  na  $\log(v)$  pro signál 1 (G), 3 (H) a RED (CH), parametry uvedené v popisku obrázku 16

### 3.4 Vývoj metody voltametrického stanovení OH-CBL na BDDE

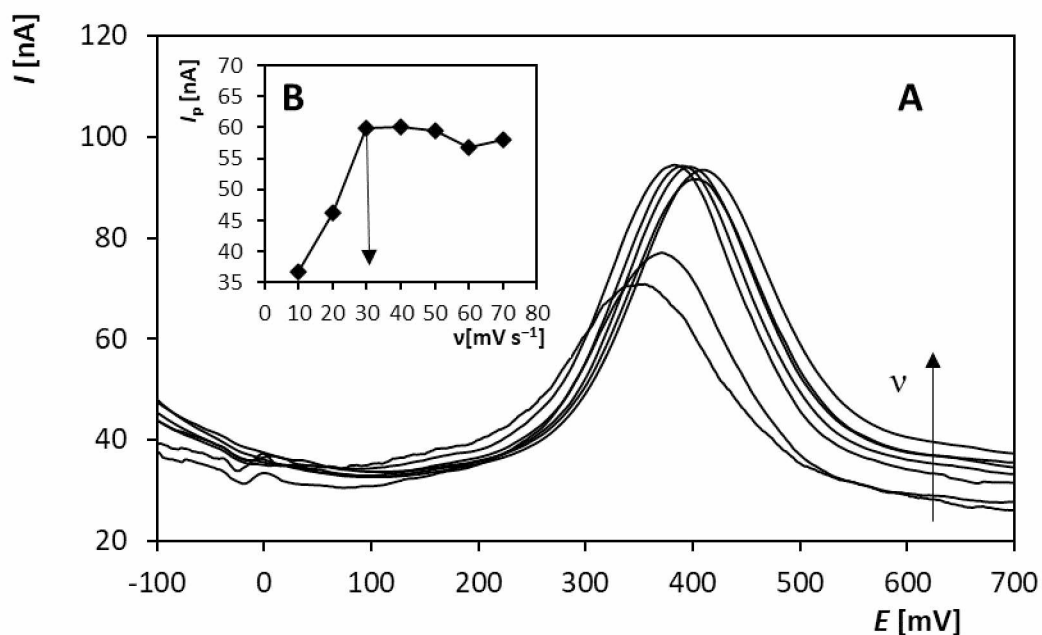
#### 3.4.1 Optimalizace parametrů DPV (oxidační pík 1)

Na počátku všech měření byl testován vliv předúpravy pracovního povrchu. Aplikací ani jednoho z postupů (anodické předčištění  $E_p = +2000$  V a  $t = 30$  s, *resp.* katodické předčištění  $E_p = -2000$  V a  $t = 30$  s v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nedošlo ke zvýšení  $I_p$  OH-CBL naopak byl pozorován pokles píku a jeho horší opakovatelnost, a proto nadále nebyl žádný výše zmíněný postup aplikován. Naopak se ukázalo, že pracovní elektroda vykazovala velmi dobré výsledky (výška píku, opakovatelnost měření) bez jakékoliv předúpravy povrchu, což bylo výhodné zejména z hlediska doby analýzy. V rámci vývoje metody voltametrického stanovení OH-CBL na BDDE byla provedena optimalizace následujících parametrů:  $E_{in}$ ,  $\nu$ , výška a šířka pulzu. Měření probíhala v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Použitá koncentrace OH-CBL byla pro celou optimalizaci  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Prvním krokem bylo sledování odezvy OH-CBL v závislosti na různých  $E_{in}$ . Ostatní aplikované parametry se neměnily a byly následující:  $E_{fin} = +2300$  mV,  $\nu = 20$  mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 80 ms.  $E_{in}$  byl měněn v rozsahu od -1000 mV do -400 mV po 200 mV. Pro další měření byl vybrán  $E_{in} = -400$  mV, jelikož OH-CBL za těchto podmínek poskytoval nejvyšší hodnotu  $I_p$ , jak vyplývá z obrázku 18. Vyšší hodnoty počátečního potenciálu nebylo možné aplikovat vzhledem k šířce a poloze sledovaného píku ( $E_p = +380$  mV).

Druhým testovaným parametrem byla rychlost polarizace. Byl testován rozsah  $\nu = 10$ -70 mV s<sup>-1</sup> s intervalem 10 mV s<sup>-1</sup>. Na obrázku 19A jsou zobrazeny výsledné DP voltamogramy a na obrázku 19B je vynesena závislost  $I_p$  na  $\nu$ . Ze získaných voltametrických křivek a ze závislosti na obrázku 19B je patrné, že v úseku  $\nu = 10$ -30 mV s<sup>-1</sup> docházelo s rostoucí hodnotou  $\nu$  k nárůstu výšky sledovaného píku. V úseku  $\nu = 30$ -50 mV s<sup>-1</sup> byla pozorována stagnace a s dalším navýšením rychlosti polarizace byl sledován mírný pokles. Při vyšších  $\nu$  docházelo k mírnému posunu píku k pozitivnějším potenciálům. Vzhledem k uvedeným výsledkům byla pro další měření zvolena  $\nu = 30$  mV s<sup>-1</sup>.



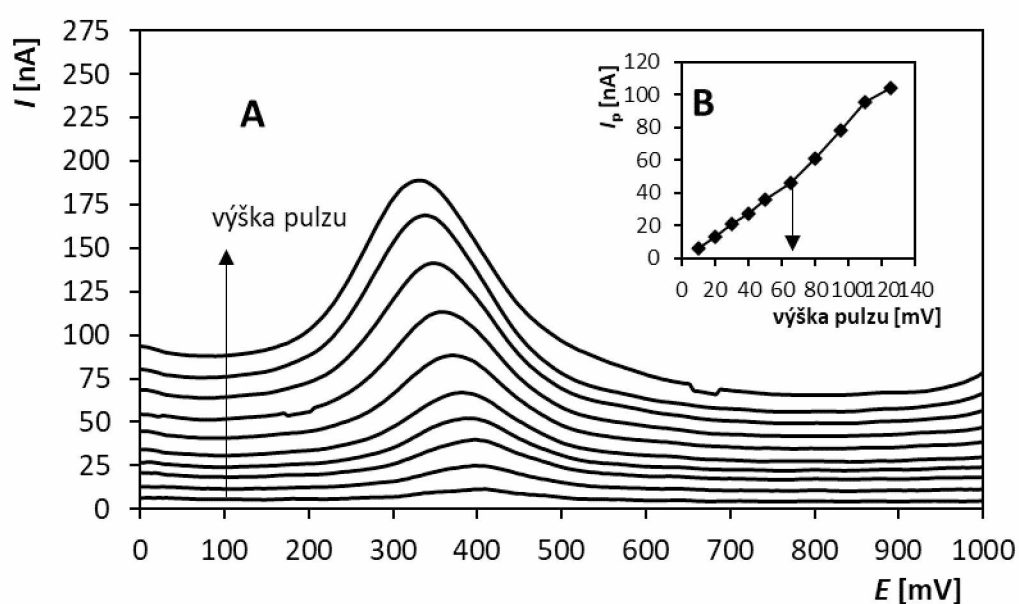
**Obrázek 18** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých  $E_{in}$  (A); Závislost  $I_p$  na  $E_{in}$  (B), parametry:  $E_{in} = -1000$  až  $-400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2300 \text{ mV}$ ,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $50 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $80 \text{ ms}$



**Obrázek 19** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých rychlostech polarizace (A); Závislost  $I_p$  na  $v$  (B), parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2300 \text{ mV}$ ,  $v = 10-70 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $50 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $80 \text{ ms}$



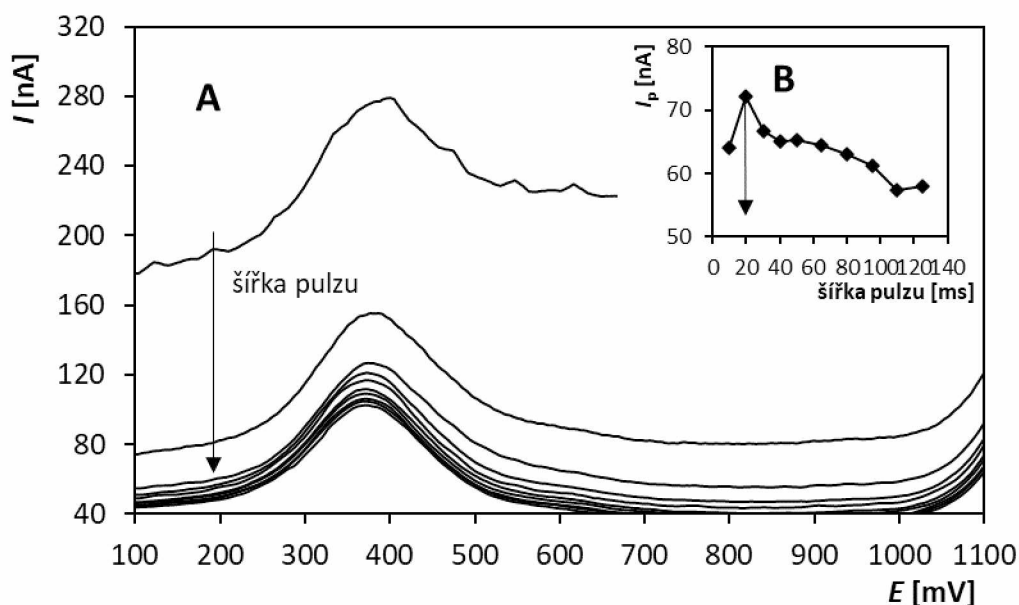
Třetím parametrem, který byl optimalizován, byly výška pulzu. V rámci experimentu byla měněna v rozsahu hodnot 10-125 mV. Všechny použité parametry jsou uvedeny v popisku obrázku 20, kdy obrázek 20A zobrazuje DP voltamogramy OH-CBL naměřené při různých hodnotách sledovaného parametru a obrázek 20B vloženou závislost  $I_p$  na výšce pulzu. Z obrázku 20 je zřejmé, že s rostoucí výškou pulzu rostla i hodnota  $I_p$ . Současně s rostoucí výškou pulzu dochází k posunu píku směrem k negativnějším potenciálům. Pro další měření byla nastavena střední výška pulzu a to hodnota 65 mV, jelikož při vyšších hodnotách docházelo k rozšiřování píku.



**Obrázek 20** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých výškách pulzu (A); Závislost  $I_p$  na výšce pulzu (B), parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2300 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu = 10-125 mV, šířka pulzu = 80 ms

Posledním sledovaným parametrem byla šířka pulzu. DP voltamogramy byly měřeny při již dříve optimalizovaných parametrech a za měnící se šířky pulzu v rozsahu 10-125 ms. Výsledné DP voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 21A s vloženou závislostí  $I_p$  na šířce pulzu (obrázek 21B). Z obrázků je zřejmé, že s rostoucí šířkou pulzu  $I_p$  klesá. Nejvyšší hodnota  $I_p$  je naměřena při 20 ms a proto byla tato hodnota šířky pulzu zvolena pro všechna další měření. Nakonec byla s optimalizovanými parametry provedena opakovaná měření OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Bylo provedeno celkem 11 scanů a výsledná RSD byla rovna

1,26 %. Tato nízká hodnota potvrzuje, že s využitím uvedených parametrů bez předčištění pracovního povrchu je dosahováno stabilní reprodukovatelné odezvy, což je zásadní z hlediska možné analytické aplikace.



**Obrázek 21** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých šířkách pulzu (A); Závislost  $I_p$  na šířce pulzu (B), parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2300 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $10\text{-}125 \text{ ms}$

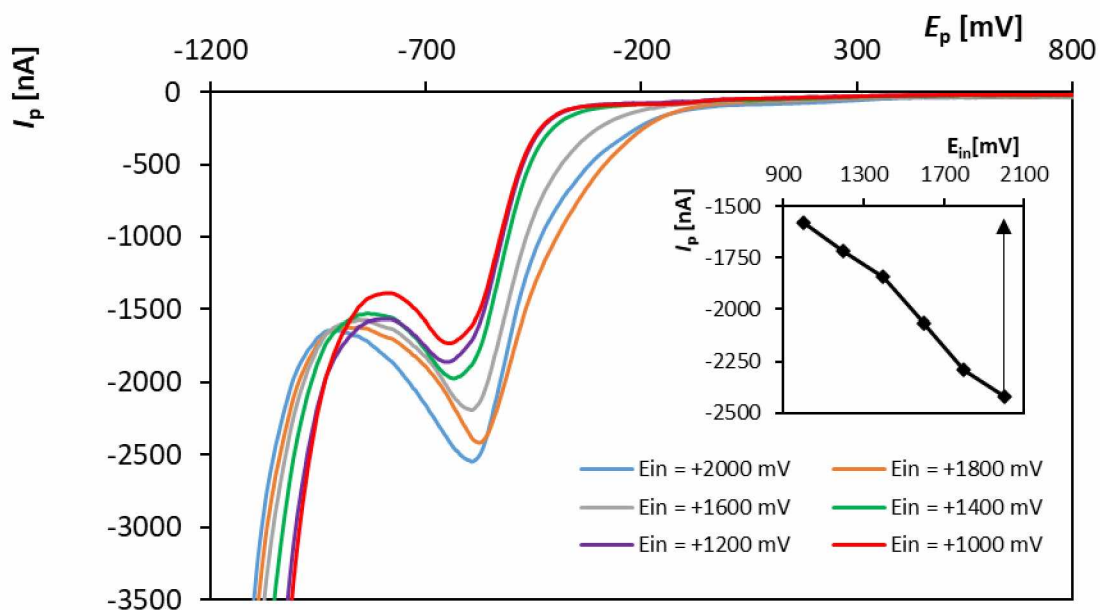
### 3.4.2 Optimalizace parametrů DPV (redukční pík RED)

Pro možné analytické využití byla kromě oxidační odezvy OH-CBL zvolena také odezva redukční, pro kterou bylo rovněž nutné optimalizovat parametry, kterými byly opět:  $E_{in}$ ,  $v$ , výška a šířka pulzu. Použitým základním elektrolytem byla  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  a koncentrace OH-CBL byla  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Na počátku experimentů bylo zjištěno, že za daných podmínek, bez aplikace předčištění povrchu, dochází, na rozdíl od experimentů v anodické oblasti, k postupnému poklesu sledovaného signálu a nedochází k ustálení výšky sledovaného signálu ani s narůstajícím počtem opakovaných měření. Proto byly testovány 3 způsoby možného čištění před každým měřením: 1) anodické ( $E = +2000 \text{ mV}$ ,  $t = 30 \text{ s}$ ), 2) katodické ( $E = -1500 \text{ mV}$ ,  $t = 30 \text{ s}$ ) a 3) potenciálové „skoky“ (20 „skoků“ mezi potenciály  $+2000 \text{ mV}$  a  $-1500 \text{ mV}$ ). Za podmínek anodického čištění byl pozorován obdobný pokles jako v případě bez regenerace. Signál OH-CBL byl sice dobře vyvinutý s hodnotou  $I_p$  v rozmezí hodnot od

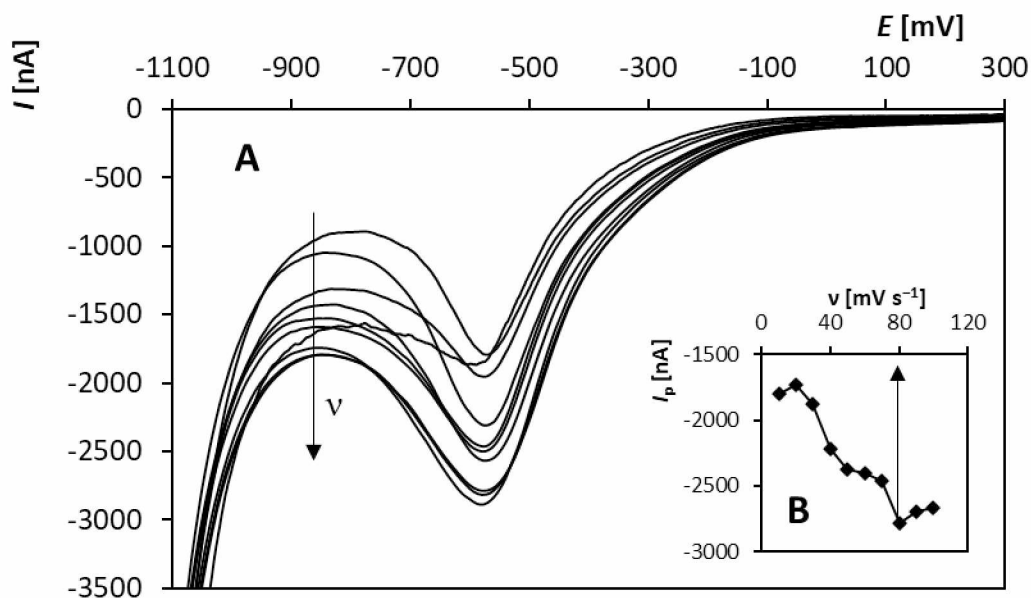
-3842 nA (1. scan) do -3545 nA (11. scan), ale vykazoval stabilní pokles při opakovaných měřeních. V případě aplikace katodického potenciálu došlo k poklesu výšky sledované odezvy zhruba o polovinu. Hodnota  $I_p$  se pohybovala v rozmezí od maximální hodnoty -1973 nA (3. scan) do minimální naměřené hodnoty -1799 nA (10. scan). Výška píku RED se v tomto případě nesnižovala s rostoucím počtem měření, ale měnila se bez patrného trendu a ani při dalších opakovaných měřeních nedošlo k dosažení stabilní výšky sledované odezvy. Posledním testovaným způsobem čištění povrchu bylo tzv. cyklování, kdy bylo před každým měřením vloženo 20 potenciálových „skoků“ mezi hodnotami +2000 mV a -1500 mV. Tento způsob regenerace povrchu se ukázal jako nejvýhodnější, protože při opakovaném měření bylo dosaženo stabilní a poměrně vysoké odezvy ( $\bar{I}_p$  z 11 opakovaných měření (-3145,6±30,2) nA). Bylo dosaženo velmi dobré opakovatelnosti, což potvrzuje i hodnota RSD = 1,45 % vypočítaná z 11 opakovaných měření.

Proces výběru vhodných parametrů voltametrické analýzy byl stejný jako v případě anodického signálu. První sledovaným parametrem byl opět  $E_{in}$ , jehož vliv byl sledován v rozsahu od +2000 mV do +400 mV. Použitými parametry při měření byly:  $E_{fin} = -1500$  mV,  $v = 30$  mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu = -65 mV, šířka pulzu = 20 ms. Pro další měření byl vybrán  $E_{in} = +2000$  mV, jelikož OH-CBL za těchto podmínek poskytoval nejvyšší hodnotu  $I_p$ . Posouvání hodnoty  $E_{in}$  směrem k negativnějším potenciálům způsobovalo pokles a deformaci sledovaného signálu (obrázek 22).

Dalším zkoumaným parametrem byla  $v$ . V rámci tohoto experimentu byl použit potenciálový rozsah od +2000 mV do -1500 mV. Další parametry metody byly stejné jako v předchozím experimentu s výjimkou  $v$ , která byla sledována v rozsahu 10-100 mV s<sup>-1</sup>. Naměřené DP voltamogramy jsou zobrazeny na obrázku 23A a závislost  $I_p$  na  $v$  je znázorněna na obrázku 23B. Z této závislosti je zřejmé, že ve dvou úsecích 10-20 mV s<sup>-1</sup> a 80-100 mV s<sup>-1</sup> s rostoucí  $v$  výška monitorovaného píku klesala. Naopak rostoucí průběh měla v intervalu od 20 mV s<sup>-1</sup> do 80 mV s<sup>-1</sup>, kdy nejvyšším bodem byla právě krajní hodnota 80 mV s<sup>-1</sup>, která byla zvolena pro další měření.

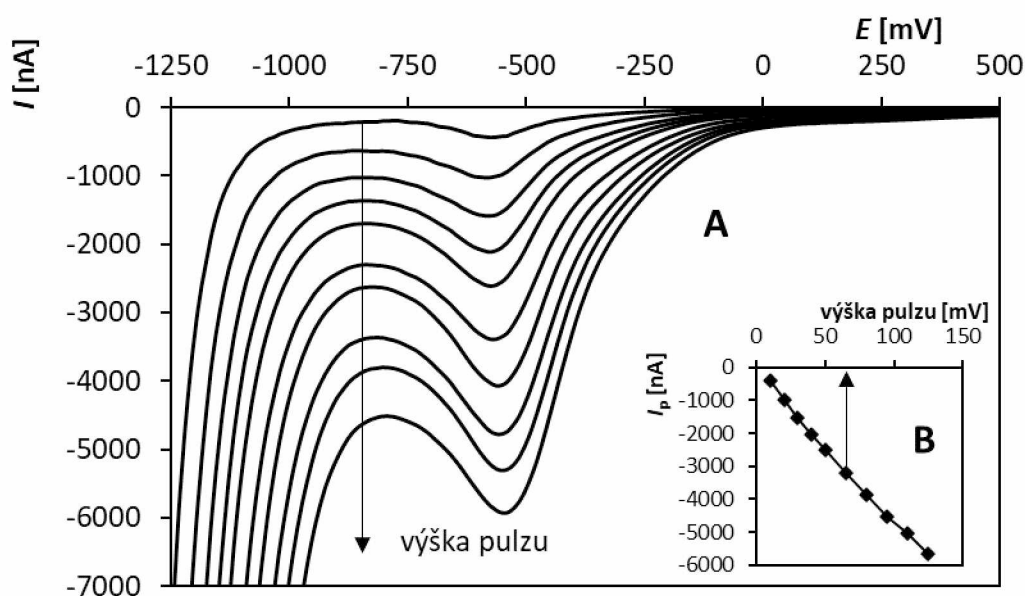


**Obrázek 22** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých  $E_{in}$  (A); Závislost  $I_p$  na  $E_{in}$  (B); parametry:  $E_{in} = +2000$  až  $+1000 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $-65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $20 \text{ ms}$

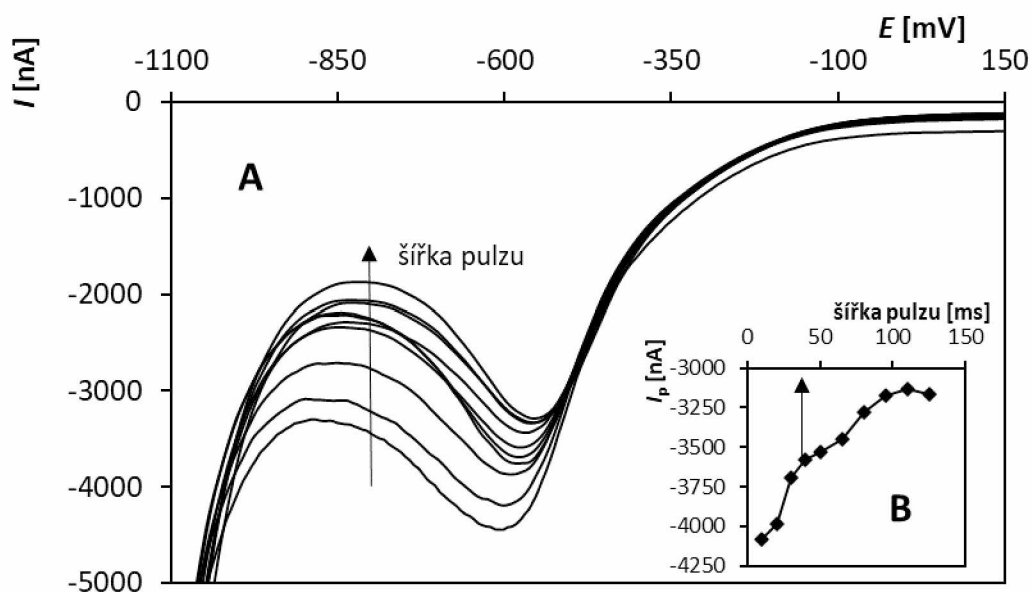


**Obrázek 23** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých rychlostech polarizace (A); Závislost  $I_p$  na  $v$  (B); parametry:  $E_{in} = +2000 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ;  $v = 10-100 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $-65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $20 \text{ ms}$

Dále byl sledován vliv výšky aplikovaných pulzů v rozsahu  $-10$  až  $-125$  mV a jejich šířky v rozsahu 10-125 ms. Z křivek na obrázku 24A a ze závislosti  $I_p$  na výšce pulzu na vloženém grafu v tomto obrázku vyplývá, že s rostoucí výškou pulzu roste i výška sledovaného signálu a zároveň dochází k mírnému posunu píku směrem k pozitivnějším potenciálům. Obdobně jako u oxidace byla zvolena hodnota výšky pulzu  $-65$  mV. Důvodem je opět rozšíření a horší vyhodnotitelnost píku při vyšších hodnotách. Na obrázku 25A jsou zobrazeny DP voltamogramy naměřené při různých hodnotách šířky vkládaných pulzů. Pro další měření byla zvolena střední hodnota 40 ms, kdy byl signál RED dostatečně vysoký a dobře vyhodnotitelný. Závěrem byla provedena opět opakovaná měření, kdy bylo provedeno celkem 11 opakovaných scanů OH-CBL o koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Vypočítaná RSD se rovnala 1,27 %, což potvrzuje, že za zvolených parametrů je sledovaná redukční odezva OH-CBL stabilní.



**Obrázek 24** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> při různých výškách pulzu (A); Závislost  $I_p$  na výšce pulzu (B); parametry:  $E_{in} = +2000$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV;  $v = 80$  mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu =  $-10$  až  $-125$  mV, šířka pulzu = 20 ms



**Obrázek 25** DP voltamogramy OH-CBL o koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  při různých šířkách pulzu (A); Závislost  $I_p$  na šířce pulzu (B); parametry:  $E_{in} = +2000 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ;  $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $-65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $10\text{-}125 \text{ ms}$

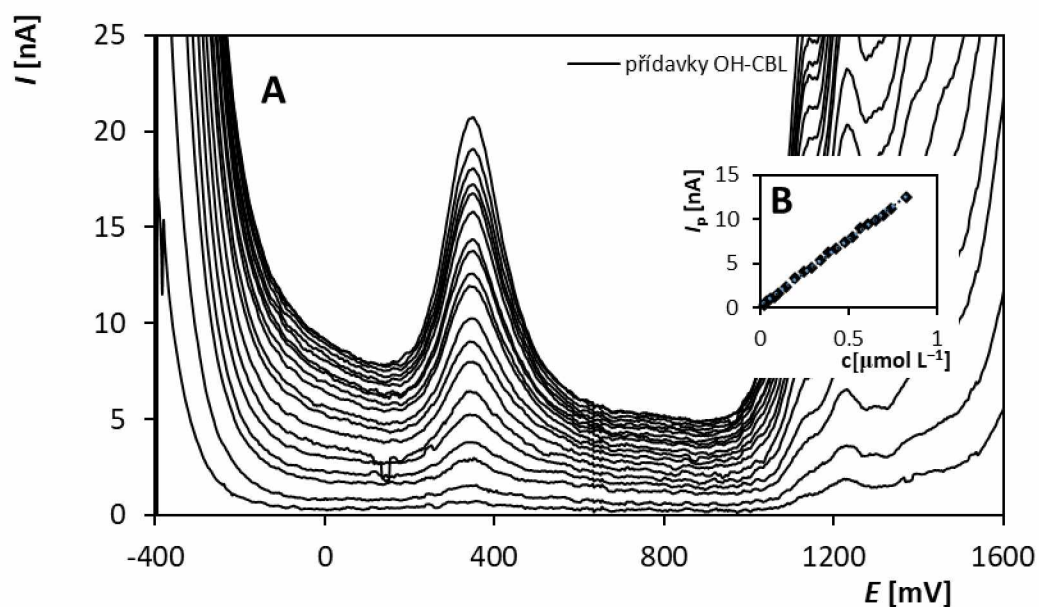
### 3.4.3 Analýza modelových roztoků OH-CBL s využitím BDDE

Aplikovatelnost navržené metody DPV byla testována nejdříve na modelových roztocích obsahujících známé množství OH-CBL. Nejprve byl sledován průběh koncentračních závislostí pro oba sledované píky za zvolených podmínek analýzy (experimentálně vybrané hodnoty parametrů DPV a elektrolyt  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ). Pro sledované signály byl opakovaně změřen koncentrační rozsah alespoň přes 1 koncentrační řád od nejnižší hodnoty koncentrace, při které byl daný signál spolehlivě vyhodnotitelný až do takové koncentrace, kdy byl pozorován patrný nárůst sledovaného píku. V případě anodického píku to bylo rozmezí od  $2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  do  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  a v případě redukčního píku RED byl měřen rozsah od  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  do  $6,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Parametry použité při měřeních jsou uvedeny v popisících obrázcích. Obrázky také obsahují vložené závislosti  $I_p$  na  $c(\text{OH-CBL})$  v  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . V případě oxidačního píku 1 bylo  $I_p$  vyhodnocováno pomocí metody odečtení základního elektrolytu. Závislost  $I_p$  na koncentraci OH-CBL byla u oxidačního píku lineární v téměř v celém sledovaném rozsahu (od  $2 \times 10^{-8}$  do  $8,25 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , obrázek 26), což představuje lineární dynamický rozsah (LDR), a je popsána rovnicí (12). S využitím hodnot směrnice a směrodatné odchylky úseku této závislosti byly stanoveny hodnoty  $\text{LD} = 1,32 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  a  $\text{LQ} = 4,39 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Závislost  $I_p$  na koncentraci OH-CBL nevykazovala u redukčního signálu

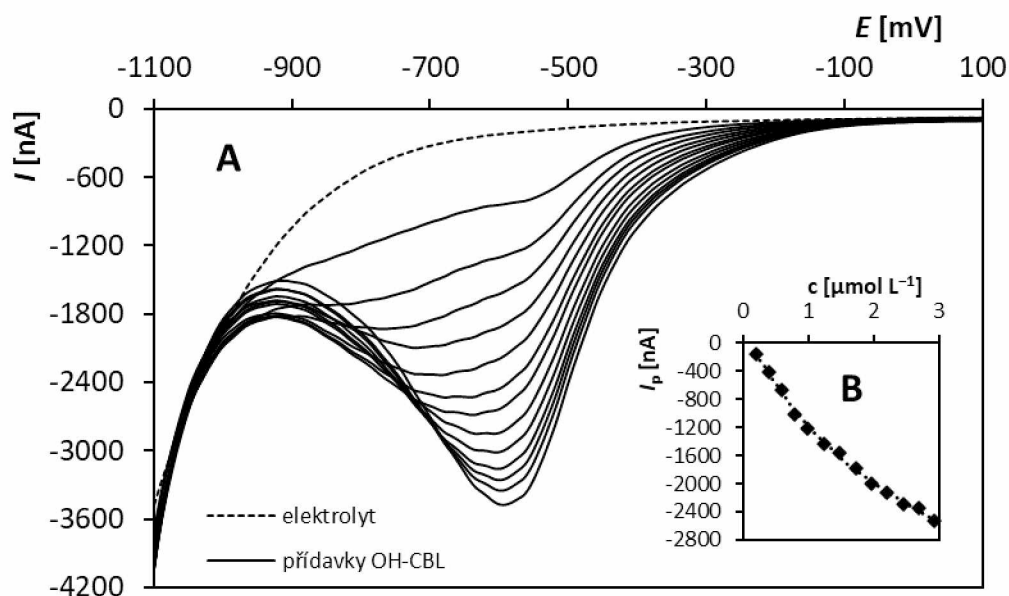
lineární, ale polynomičtý charakter. V koncentračním rozsahu od  $1,99 \times 10^{-7}$  do  $2,91 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ho lze charakterizovat rovnicí (13) a naměřené křivky s odpovídající koncentrační závislostí jsou zobrazeny na obrázku 27.

$$I_p[\text{nA}] = (1,509 \pm 147963,9)(c[\text{mol L}^{-1}]) + (0,142 \pm 0,066), r^2 = 0,998 \quad (12)$$

$$I_p[\text{nA}] = (193,56 \pm 21,49)(c[\text{mol L}^{-1}])^2 - (1447,1 \pm 68,3)(c[\text{mol L}^{-1}]) + (94,86 \pm 44,86), r^2 = 0,996 \quad (13)$$



**Obrázek 26** Anodické DP voltamogramy OH-CBL zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  při různých koncentracích, křivky po odečtení elektrolytu (A); Závislost  $I_p$  na  $c$  (B), parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2300 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms



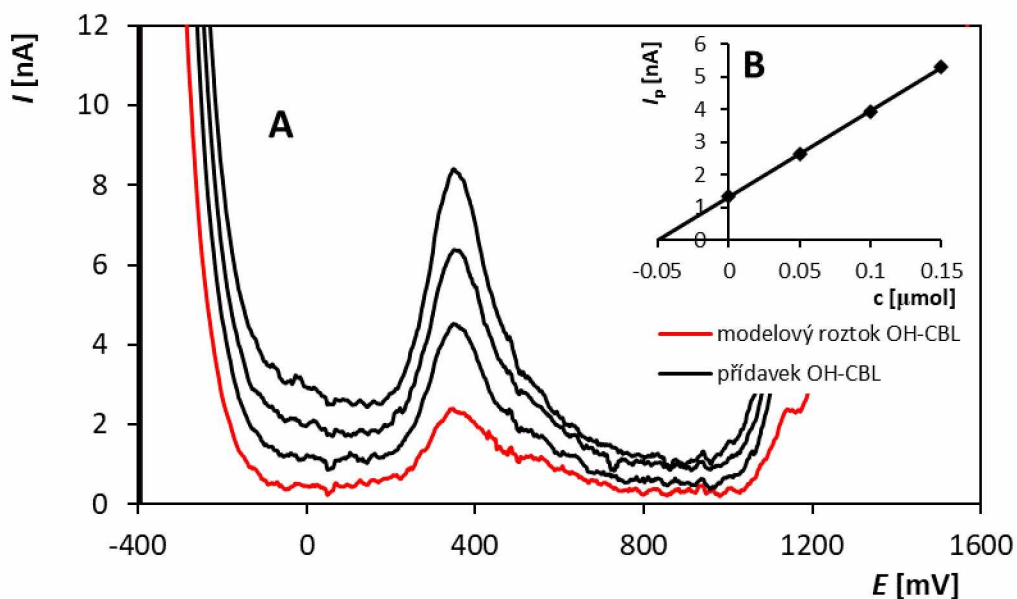
**Obrázek 27** Katodické DP voltamogramy OH-CBL zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> při různých koncentracích (A); Závislost I<sub>p</sub> na c (B), parametry: E<sub>in</sub> = +2000 mV, E<sub>fin</sub> = -1500 mV; v = 80 mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu = -65 mV, šířka pulzu = 40 ms

Vzhledem k lineárnímu průběhu závislosti výšky anodického píku 1 na koncentraci OH-CBL byla provedena opakovaná stanovení tohoto analytu v modelových roztocích o dvou koncentracích, kterými byly 5×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> a 1×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Použitou metodou byl standardní přídavek. Ke vzorku byly vždy přidány 3 přídavky standardního roztoku. Byla použita opět DPV s optimalizovanými parametry. Pro každou koncentraci bylo stanovení 5krát opakováno. Příklad naměřených voltamogramů pro stanovení OH-CBL o předpokládané koncentraci 5×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> je zobrazen na obrázku 28. Výsledky statistických parametrů jsou pro obě stanovené koncentrace (1×10<sup>-7</sup> a 5×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>) shrnuty v tabulce 2. Z těchto hodnot vyplývá, že v obou případech bylo dosaženo správných výsledků a velmi dobré opakovatelnosti stanovení. Důkazem je hodnota RSD<sub>5</sub>, která byla v obou případech menší než 3 % a výtěžnost stanovení, která se pohybovala od 99,6 do 101,4 %, resp. od 100,0 do 103,0 %.

**Tabulka 2** Výsledky opakovaného stanovení OH-CBL v modelových roztocích

Předpokládaná c [mol L <sup>-1</sup> ]	Stanovená c [mol L <sup>-1</sup> ]	RSD <sub>5</sub> [%]	Výtěžnost [%]
5×10 <sup>-8</sup>	(5,026 ± 0,044) × 10 <sup>-8</sup>	1,33	99,64-101,4
1×10 <sup>-7</sup>	(1,015 ± 0,015) × 10 <sup>-7</sup>	2,21	100,0-103,0





**Obrázek 28** Stanovení OH-CBL metodou standardního přídavku s využitím DPV a BDDE v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; křivky po odečtení elektrolytu (A), parametry:  $E_{in} = -400\text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2000\text{ mV}$ ;  $v = 30\text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms; grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B)

### 3.4.4 Interferenční studie

Cílem experimentů v této části práce bylo zjistit, zda látky, které se mohou vyskytovat ve vzorcích spolu s OH-CBL, ovlivňují jeho stanovení. Byl sledován vliv látek vyskytujících se v moči a vitamínů, které mohou být spolu s OH-CBL součástí vitamínových preparátů. Analýza probíhala postupem uvedeným v kapitole 2.3.1. Tato studie byla opět provedena, jak pro anodickou, tak pro katodickou odezvu s cílem zjistit, který signál je pro analýzu reálných vzorků s obsahem OH-CBL výhodnější. Měření opět probíhala v 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> metodou DPV s optimalizovanými parametry. Koncentrace OH-CBL byla v případě oxidace  $2,5 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$  a v případě redukce  $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ . Možné interferenty byly přidávány v poměrech 1:1, 1:10, resp. 1:100 v případě látek předpokládaných v moči a 1:0,1, 1:1, resp. 1:10 pro skupinu vitamínů. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 3 a 4. Hodnoty v tabulce představují % odchylku výšky sledovaného píku 1 po přídavku interferentu. Hranice, nad kterou se látka považovala za interferující, byla 5 %.

Z tabulky 3 je zřejmé, že v případě močoviny, kyseliny močové, a glukózy nedocházelo k výraznému ovlivnění sledovaného oxidačního píku za daných podmínek. Přítomnost

sacharózy a kreatininu i ve větších koncentracích ovlivňovala sledovanou odezvu jen nepatrně (maximální nárůst o 7,20 % v případě S a 6,63 % v případě C). Za významného interferujícího činitele lze označit kyselinu listovou (FA), která způsobovala pokles sledované odezvy o téměř 15 % již při stejné koncentraci, jako byla koncentrace analytu. S narůstající koncentrací FA docházelo k poklesu výšky píku 1, což bylo způsobeno voltametrickou odezvou samotné FA, která poskytovala za daných podmínek tři signály, které díky svojí poloze ovlivňovaly i sledovaný oxidační pík (obrázek 29). Také kyselina barbiturová (BA) poskytovala voltametrickou odezvu při blízkém potenciálu jako OH-CBL, což bylo patrné ale až při vyšších koncentracích. V tomto případě se jednalo o koncentraci 100× vyšší, než byla koncentrace analytu. Co se týká monitorované redukční odezvy, pouze dvě posuzované látky neměly na její výšku nebo tvar žádný vliv ani při vyšších koncentracích, a to konkrétně kreatin a glukóza (tabulka 3). Ostatní látky vykazovaly buď relativně malý vliv při všech sledovaných koncentračních poměrech (U a UA) nebo jen při vyšších hladinách (AA a BA). Za významné interferenty, lze stejně jako v případě oxidačního signálu, považovat FA a BA.

**Tabulka 3** Výsledky interferenční studie pro voltametrickou analýzu OH-CBL v přítomnosti vybraných látek vyskytujících se v moči

Interferent	Oxidace			Redukce		
	COH-CBL: Cinterferent – moč			COH-CBL: Cinterferent – moč		
	1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100
U	-1,65	-2,93	-1,73	<b>-6,06</b>	<b>-7,19</b>	<b>-13,41</b>
UA	+3,11	+2,53	---	<b>-5,73</b>	<b>-8,34</b>	---
FA	<b>-14,77</b>	<b>-31,16</b>	<b>-57,11</b>	-4,25	<b>-40,93</b>	<b>-95,53</b>
S	<b>+7,20</b>	<b>-5,04</b>	<b>-7,06</b>	-4,22	<b>-11,08</b>	<b>-8,50</b>
AA	+2,64	<b>+9,77</b>	<b>+10,83</b>	-3,69	-4,24	<b>-6,53</b>
C	<b>+6,63</b>	+1,24	+1,11	+0,44	+0,39	-0,47
G	+1,05	+0,14	-1,89	-4,01	<b>-5,02</b>	<b>-5,40</b>
BA	-0,25	+3,64	<b>+190,71</b>	-2,24	-4,85	<b>-25,51</b>

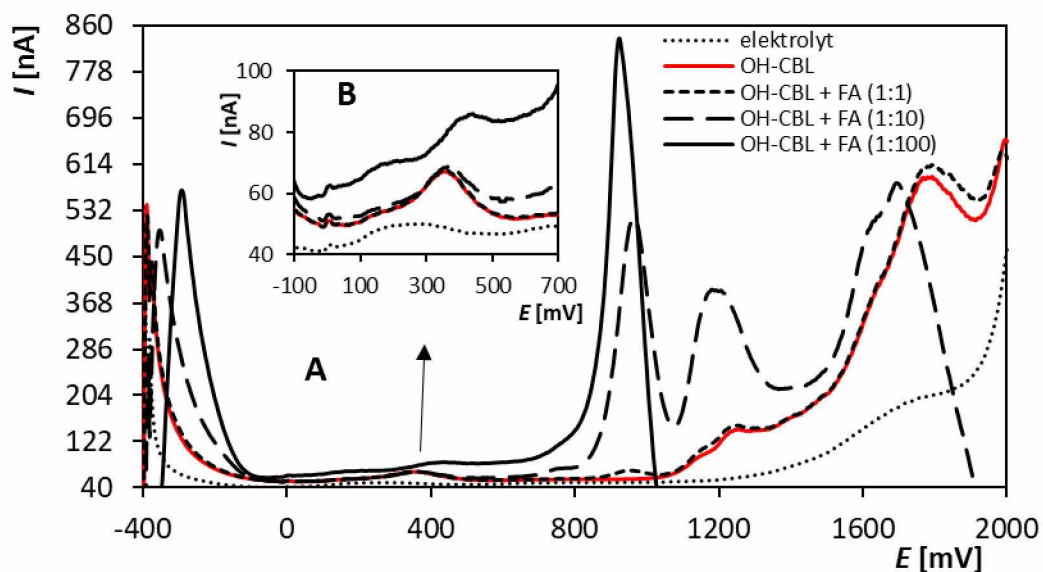
U – močovina; UA – kyselina močová; FA – kyselina listová; S – sacharóza, AA – kyselina askorbová; C – kreatinin; G – glukóza; BA – kyselina barbiturová

FA (obrázek 30) poskytovala redukční signál, což ovlivňovalo sledovaný pík již při 10× vyšší koncentraci, kdy byl pozorován pokles o téměř 41 %. BA způsobovala snížení redukčního signálu OH-CBL při jejím 100násobném nadbytku.

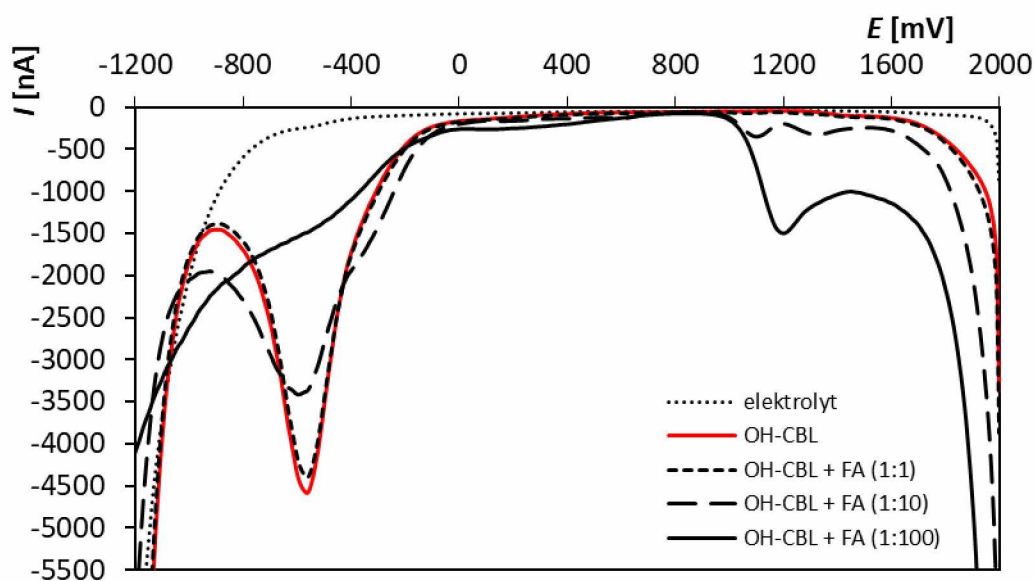
Další skupinou sledovaných biomolekul byly vitamíny rozpustné ve vodě, které mohou být spolu OH-CBL přítomny ve vitamínových přípravcích. Získané hodnoty jsou shrnuty v tabulce 4. Z tabulky je zřejmé, že pouze biotin (vitamín H) neovlivňoval ani jednu ze sledovaných odezvy na všech sledovaných koncentračních hladinách. Vitamíny B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> a B<sub>6</sub> také ovlivňovaly sledované signály relativně málo a maximální změna výšky signálu se pohybovala pod 15 %. Přítomnost vitamínu B<sub>2</sub> (obrázek 31), zejména při vyšších koncentracích, způsobovala větší pokles v případě anodické odezvy, což bylo dáno odezvou vitamínu B<sub>2</sub> nacházející se těsně před stanovovaným píkem. Největším problémem se však ukázala přítomnost CN-CBL, který poskytoval obdobné odezvy jako OH-CBL, což je patrné z narůstající odezvy oxidačního signálu (obrázek 32). V případě redukce CN-CBL způsoboval při 10násobném nadbytku výrazné snížení měřeného signálu z důvodu vzniku druhého redukčního signálu (obrázek 33).

**Tabulka 4** Výsledky interferenční studie pro voltametrickou analýzu OH-CBL v přítomnosti vybraných látek vyskytujících se ve vitamínových přípravcích

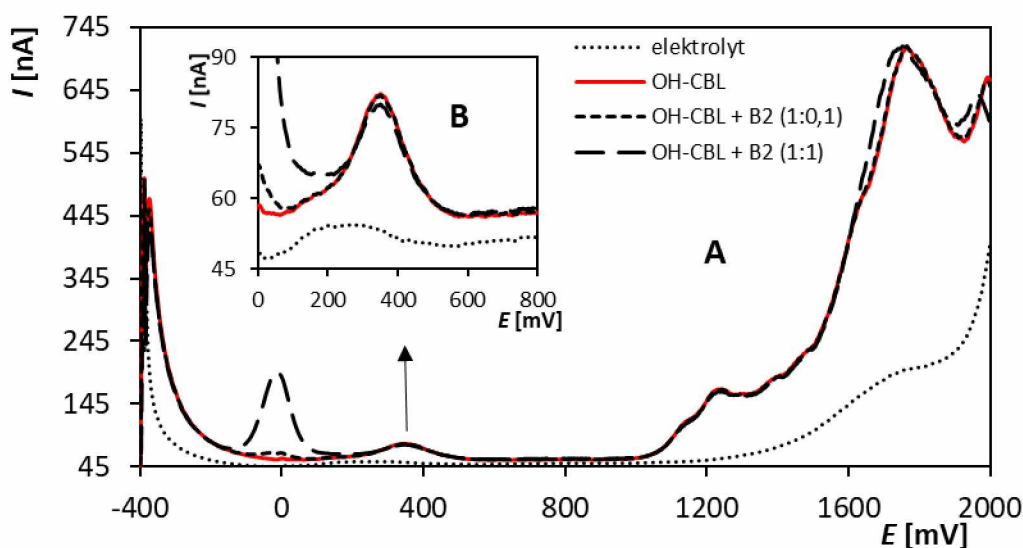
Interferent (vitamín)	Oxidace			Redukce		
	COH-CBL: C <sub>interferent</sub> – vitamín			COH-CBL: C <sub>interferent</sub> – vitamín		
	1:0,1	1:1	1:10	1:0,1	1:1	1:10
B <sub>12</sub>	+9,51	+23,57	+101,49	-2,13	-16,15	-36,01
H	-4,12	-0,29	+1,63	-1,27	-3,84	-3,92
B <sub>6</sub>	+6,1	+3,23	+2,29	+0,11	-1,45	-5,54
B <sub>1</sub>	-0,88	-12,78	-29,64	-1,84	-4,34	-10,65
B <sub>5</sub>	+0,22	-5,27	-1,97	-4,4	-7,73	-9,66
B <sub>3</sub>	-7,48	-3,56	-9,85	-3,08	-8,56	-14,6
B <sub>2</sub>	-2,26	-17,97	---	+1,3	-1,19	---



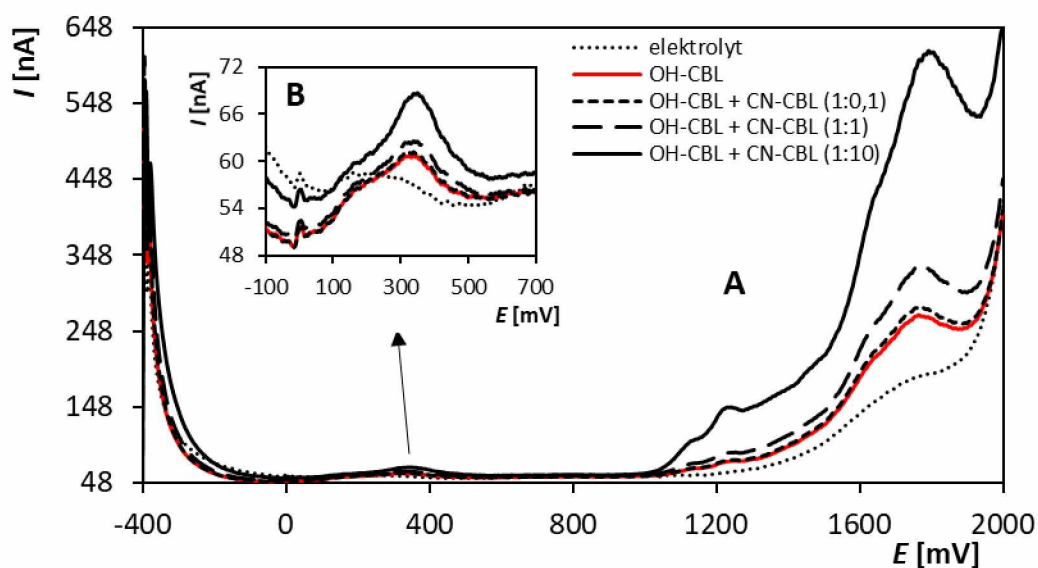
**Obrázek 29** Anodické DP voltamogramy  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v přítomnosti FA (kyseliny listové) zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ , parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2000 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $20 \text{ ms}$  (A), detail křivek pro oblast píku 1 (B)



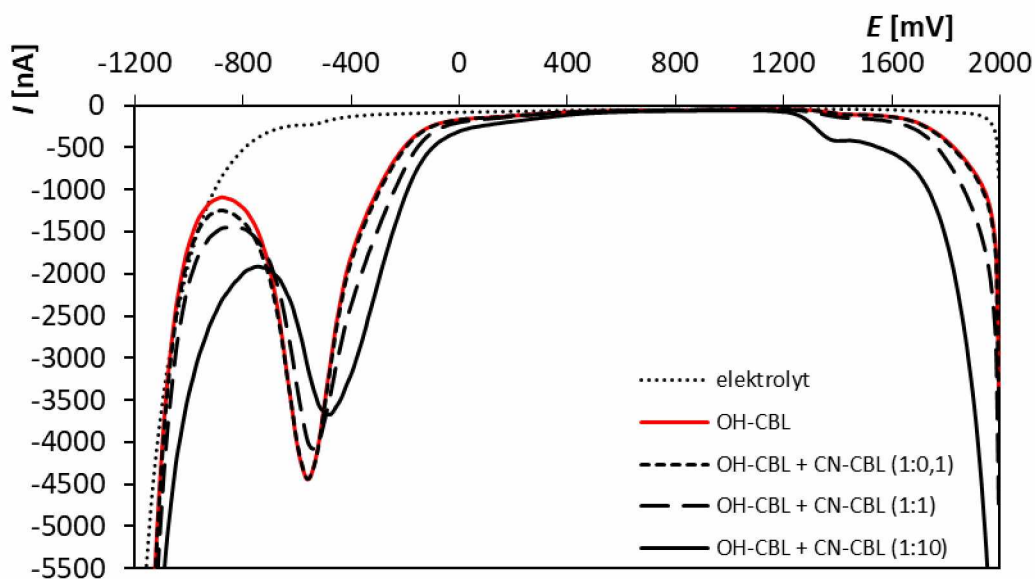
**Obrázek 30** Katodické DP voltamogramy  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v přítomnosti FA (kyseliny listové) zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ , parametry:  $E_{in} = +2000 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ;  $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $-65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $40 \text{ ms}$



**Obrázek 31** Anodické DP voltamogramy  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v přítomnosti vitamínu B<sub>2</sub> (Riboflavinu) zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2000 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms (A), detail křivek pro oblast píku 1 (B)



**Obrázek 32** Anodické DP voltamogramy  $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v přítomnosti CN-CBL (kyanokobalamini) zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, parametry:  $E_{in} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = +2000 \text{ mV}$ ;  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms (A), detail křivek pro oblast píku 1 (B)



**Obrázek 33** Katodické DP voltamogramy  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  OH-CBL v přítomnosti vitamínu CN-CBL (kyanokobalaminu) zaznamenané na BDDE v prostředí  $0,1\text{M H}_2\text{SO}_4$ , parametry:  $E_{in} = +2000 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$ ;  $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ , výška pulzu =  $-65 \text{ mV}$ , šířka pulzu =  $40 \text{ ms}$

### 3.5 Analýza vitamínových doplňků stravy

V rámci závěrečných experimentů byla vypracovaná metoda využita i pro analýzu reálných vzorků s obsahem OH-CBL. Převážná část vitamínových přípravků dostupných v ČR obsahuje formu CN-CBL, i když forma OH-CBL poskytuje vyšší afinitu k receptorům transportních plazmatických proteinů a tím i delší dobu působení [108]. Po důkladném průzkumu trhu byly zvoleny 2 volně dostupné přípravky s obsahem OH-CBL. Jednalo se o tekutý přípravek Vitamín B<sub>12</sub> (hydroxokobalamin) od výrobce Metabolics (Eastcott, Velká Británie) s deklarovaným obsahem OH-CBL  $98 \mu\text{g}$  v 1 kapce a tablety vitamínu B<sub>12</sub> (hydroxokobalamin) od výrobce Cytoplan (Hanley Swan, Velká Británie) s obsahem  $1000 \mu\text{g}$  v 1 tabletě. Způsob přípravy vzorku k měření byl popsán v kapitole 2.3.2.

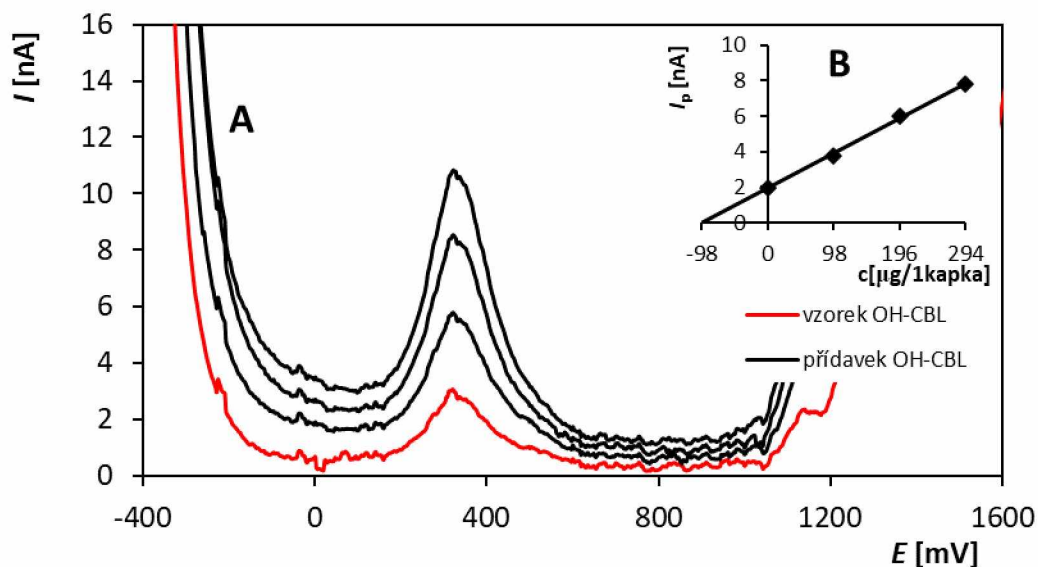
Pro samotné stanovení OH-CBL byla na základě výsledků předchozích experimentů zvolena anodická odezva 1. Byla vhodná pro detekci nižších koncentrací OH-CBL než odezva katodická, která navíc vykazovala nelineární průběh nárůstu výšky píku s koncentrací. Navíc vzhledem k výsledkům interferenční studie lze říci, že metoda využívající katodickou odezvu poskytuje obdobnou selektivitu jako metoda navržená pro sledování oxidace OH-CBL. Měření probíhalo v prostředí  $0,1\text{M H}_2\text{SO}_4$  na BDDE při optimalizovaných parametrech. Použitou metodou stanovení byla metoda standardního přídatku. Pro každý doplněk stravy bylo

provedeno 5 opakovaných stanovení. Na níže zobrazených obrázcích je uveden příklad naměřených voltamogramů pro analýzu tekutého přídatku (obrázek 34) a pro stanovení v OH-CBL v tabletách (obrázek 35). Výpočtem byly získány následující statistické údaje: interval spolehlivosti, RSD<sub>5</sub> a výtěžnost (tabulka 5). Z těchto hodnot je patrné, že výsledky stanovené navrženou metodou jsou v relativně dobré shodě s deklarovanými hodnotami. Hodnoty obsahu OH-CBL jsou o cca 3-10 % vyšší než deklaruje výrobce, což může být způsobeno složitější maticí a náročnější úpravou vzorků a případně i vyšším obsahem OH-CBL přímo v analyzovaném doplňku stravy, což by bylo nutné ověřit další analytickou technikou. Vyšší hodnoty RSD (5,13 %, resp. 6,05 %) jsou pravděpodobně způsobeny komplikovanější maticí vzorků, ale i tak je zřejmé, že výsledky stanovení jsou dobře opakovatelné. Vzhledem k dosaženým výsledkům lze říci, že experimentálně vyvinutá metoda stanovení představuje přesný, citlivý a jednoduchý nástroj pro stanovení OH-CBL ve vitamínových přípravcích.

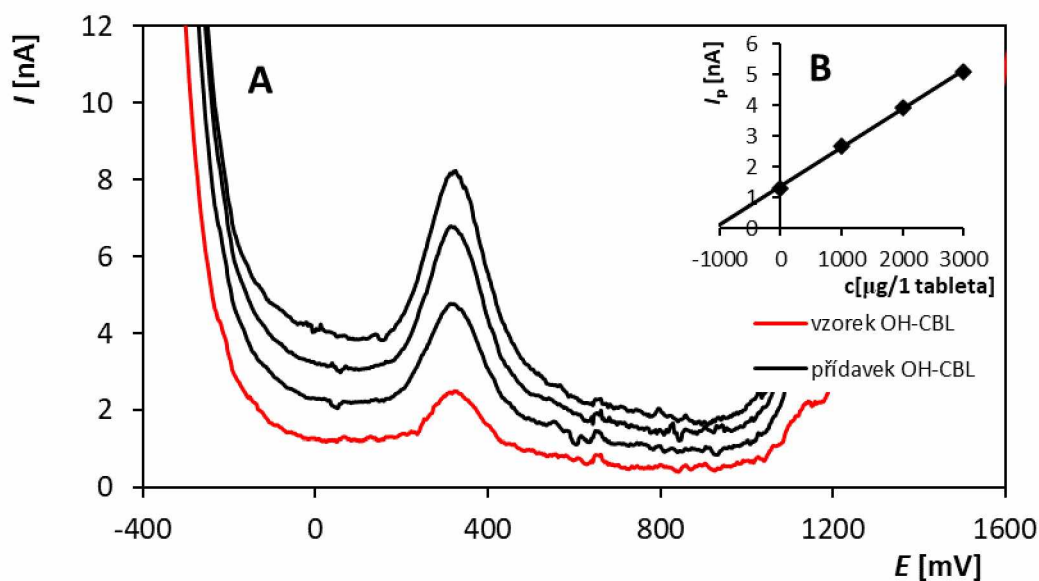
*Tabulka 5 Výsledky analýzy OH-CBL v potravinových doplňcích stravy*

	<b>Deklarovaná <i>c</i></b>	<b>Stanovená <i>c</i></b>	<b>RSD<sub>5</sub></b>	<b>Výtěžnost*</b>
	<b>[µg/1 kapka]</b>	<b>[µg/1 kapka]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>
<b>Tekutý přípravek</b>	98,00	101,95 ± 4,09	6,05	99,9-108,2
	<b>Deklarovaná <i>c</i></b>	<b>Stanovená <i>c</i></b>	<b>RSD<sub>5</sub></b>	<b>Výtěžnost*</b>
	<b>[µg/1 tableta]</b>	<b>[µg/1 tableta]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>
<b>Tablety</b>	1000	1062,29 ± 36,00	5,13	102,6-109,8

\* Výtěžnost je vztažena k obsahu OH-CBL deklarovanému výrobcem.



**Obrázek 34** Stanovení OH-CBL v tekutém vitamínovém přípravku Vitamin B12 (Hydroxocobalamin) metodou standardního přídavku s využitím DPV a BDDE v prostředí 0,1M  $H_2SO_4$ , křivky po odečtení elektrolytu (A); parametry:  $E_{in} = -400$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV;  $v = 30$  mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms, grafické vyhodnocení stanovení OH-CBL (B)



**Obrázek 35** Stanovení OH-CBL ve vitamínovém přípravku Vitamin B12 od firmy Cytoplan, metodou standardního přídavku s využitím DPV a BDDE v prostředí 0,1M  $H_2SO_4$ , křivky po odečtení elektrolytu (A); parametry:  $E_{in} = -400$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV;  $v = 30$  mV s<sup>-1</sup>, výška pulzu = 65 mV, šířka pulzu = 20 ms, grafické vyhodnocení stanovení OH-CBL (B)



## Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem voltametričkého chování hydroxokobalaminu (OH-CBL) a vývojem metody jeho stanovení na bórem dopované diamantové elektrodě (BDDE). První část experimentů byla zaměřena na vliv pH základního elektrolytu na voltametričké chování OH-CBL. Bylo zjištěno, že v kyselém prostředí OH-CBL poskytoval celkem 4 odezvy, ale pouze jedna z nich (signál 1) byla vhodná, vzhledem k poloze a vyhodnotitelnosti, k možnému analytickému využití. S rostoucím pH klesal počet zaznamenaných signálů a v alkalickém prostředí byl naměřen pouze 1 oxidační signál – odezva 3, který lze také uvažovat pro analytické účely vzhledem ke své výšce a dobré vyhodnotitelnosti. Redukční signál (RED) se vyskytoval v celém analyzovaném rozsahu pH. I tato odezva byla vybrána pro další studium vzhledem k možné analytické aplikaci. Na základě studie vlivu pH prostředí na jednotlivé odezvy, bylo jako základní elektrolyt pro všechny další experimenty zvoleno prostředí 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V tomto prostředí byly signály 1 a RED dobře vyvinuté. Ze závislosti  $I_p$  na rychlosti polarizace v kyselém prostředí bylo zjištěno, že signály 3 a RED byly řízeny difúzí a signál 1 byl kromě difúze ovlivněn i kinetikou.

Druhá část experimentů se věnovala vývoji metody stanovení OH-CBL. Byla použita metoda DPV, jejíž parametry ( $E_{in}$ ,  $v$ , výška a šířka pulzu) byly optimalizovány jak pro oxidační, tak pro redukční odezvu. Pouze v případě redukce bylo nutné použít předčištění před každým měřením, protože bez adekvátního postupu regenerace pracovního povrchu byl pozorován systematický pokles sledovaného signálu. Jako vhodné se ukázala aplikace 20 tzv. potenciálových skoků mezi potenciály +2000 mV a -1500 mV. Metoda stanovení OH-CBL, která využívala oxidační odezvu (pík 1), byla nakonec vybrána pro další testování. Bylo to dané zejména tím, že pík 1 rostl lineárně s rostoucí koncentrací, naopak pík RED vykazoval polynomický průběh koncentrační závislosti. Navíc interferenční studie, která byla provedena vzhledem k možnosti využití studovaného postupu i ve vzorcích se složitější maticí, prokázala velmi obdobnou selektivitu jak při použití píku 1 tak při využití signálu RED. Navržená technika využívající oxidaci OH-CBL v kyselém prostředí poskytovala široký lineární dynamický rozsah od  $2 \times 10^{-8}$  do  $8,25 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> a nízké hodnoty statistických parametrů (LD =  $1,32 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> a LQ =  $4,39 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>). Aplikovatelnost navrženého postupu byla potvrzena i opakovaným stanovením OH-CBL v modelových roztocích o 2 různých koncentracích s dobrou opakovatelností (RSD<sub>5</sub> ≤ 2,2 %). Dále byly analyzovány i dva vzorky vitamínových preparátů obsahující OH-CBL s opakovatelnými výsledky (RSD<sub>5</sub> ≤ 6,1 %).

Závěrem lze říci, že metoda stanovení navržená v této práci představuje velmi citlivý, jednoduchý, rychlý a levný analytický nástroj pro stanovení OH-CBL a může být použita i pro rutinní analýzy. Navíc materiál použité pracovní elektrody – bórem dopovaný diamant splňuje požadavky tzv. zelené analytické chemie.

## Použitá literatura

- [1] BAREK J.: OPEKAR F., ŠTULÍK K.: Elektroanalytická chemie, Praha: Univerzita Karlova v Praze – nakladatelství Karolinum, (2005), 187 s. ISBN 80-246-1146-5
- [2] BAREK J.: Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii. Chemické listy, (1997), 91.12: 1038-1042
- [3] ZÁRUBA a kol.: Analytická chemie (1. díl), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, (2016), 224 s. ISBN 978-80-7080-950-1
- [4] ŠVANCARA I.: Elektroanalýza, Univerzita Pardubice – Fakulta chemicko-technologická, (2019), 262 s. ISBN 978-80-7560-247-3
- [5] KLOUDA P.: Moderní analytické metody, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, (2003), 132 s. ISBN: 80-86369-07-2
- [6] OPEKAR F. a kol.: Základní analytická chemie, 1 vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze – nakladatelství Karolinum, (2003), 201 s. ISBN 80-246-0553-8
- [7] UCHIDA Y., KÄTELHÖN E., COMPTON R. G.: Linear sweep voltammetry with non-triangular waveforms at a microdisc electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, (2018), 823: 465-473
- [8] KISSINGER P. T., HEINEMAN W. R.: Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education, (1983), 60.9: 702
- [9] MABBOTT G. A.: An introduction to cyclic voltammetry, Journal of Chemical Education, (1983), 60.9: 697
- [10] VACEK J., OSTATNÁ V.: Bioelektrochemie, 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, (2020), 169 s. ISBN 978-80-244-5763-5
- [11] KŘÍŽENECKÁ S., SYNEK V.: Základy analytické chemie. (2014) [online]. [cit. 2022-21-01]. Dostupné z: [http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e\\_final\\_tisk.pdf](http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e_final_tisk.pdf)
- [12] SCHOLZ F.: Electroanalytical methods Guide to Experiments and Applications, 2 vyd. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), 366 s. ISBN 978-3-642-02914-1
- [13] MIRCESKI V., GULABOSKI R.: Recent achievements in square-wave voltammetry (a review). Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, (2014), 33.1: 1-12

- [14] MIRCESKI V., GULABOSKI R., LOVRIC M., BOGESKI I., KAPPL R., HOTH M.: Square-wave voltammetry: A review on the recent progress. *Electroanalysis*, (2013), 25.11: 2411-2422
- [15] SETTLE F. A.: *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR, (1997), 728 s. ISBN 0-13-177338-0
- [16] NGAMCHUEA K., BATCHELOR-MCAULEY CH., COMPTON R. G.: Anodic stripping voltammetry of silver in the absence of electrolytes: Theory and experiment. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2018), 830: 122-130
- [17] SCHOLZ F.: *Voltammetric techniques of analysis: the essentials*. ChemTexts, (2015), 1.4: 1-24
- [18] KALVODA R., KOPANICA M. Adsorptive stripping voltammetry in trace analysis. *Pure and Applied Chemistry*, (1989), 61.1: 97-112
- [19] OZKAN S.A.: *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*, Springer, (2015), ISBN 978-3-662-47138-8
- [20] BAREK J., PECKOVÁ K., VYSKOČIL V.: Adsorptive stripping voltammetry of environmental carcinogens. *Current Analytical Chemistry*, (2008), 4.3: 242-249
- [21] BAREK J., FOGG A. G., MUCK A., ZIMA J.: Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical Reviews of Analytical Chemistry* 31, (2001), 291-309
- [22] LANGFORD, N. J.; FERNER, R. E. Toxicity of mercury. *Journal of Human Hypertension*, (1999), 13.10: 651-656
- [23] KENŠOVÁ R., HYNEK D., ADAM V., KIZEK R.: Působení rtuti na živé organismy. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 3, (2014), 38-41, ISBN: 2336-3940
- [24] BAREK J., PECKOVÁ K.: Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za chemii, *Chemické Listy*, (2009), 103: 889-893
- [25] ARIÑO C., SERRANO N., DÍAZ-CRUZ J. M., ESTEBAN M.: Voltammetric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review. *Analytica Chimica Acta*, (2017), 990: 11-53

- [26] ZUMAN P.: Electrolysis with a dropping mercury electrode: J. Heyrovsky's contribution to electrochemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (2001), 31.4: 281-289
- [27] BARD A.J., FAULKNER L.R.: *Electrochemical methods fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, (2001), ISBN 0-471-04372-9
- [28] MONCELLI M. R., BECUCCI L.: A novel model of the hanging mercury drop electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (1997), 433.1-2: 91-96
- [29] YOSYPCHUK B., FOJTA M., BAREK J.: Preparation and properties of mercury film electrodes on solid amalgam surface. *Electroanalysis*, (2010), 22.17-18: 1967-1973
- [30] ECONOMOU, A.; FIELDEN, P. R. Mercury film electrodes: developments, trends and potentialities for electroanalysis. *Analyst*, (2003), 128.3: 205-213
- [31] YOSYPCHUK B., BAREK J.: Vlastnosti pevných a pastových amalgámových elektrod odlišné od kovových rtuťových elektrod. *Chemické Listy*, (2009), 103.4: 284-290
- [32] BAREK J. a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii, Pražské analytické centrum inovací (PACI)*, Praha, (2006), ISBN 978-80-86238-16-6
- [33] MIKKELSEN Ø., SCHRØDER K. H.: Amalgam electrodes for electroanalysis. *Electroanalysis*, (2003), 15.8: 679-687
- [34] NOVOTNÝ L., YOSYPCHUK B.: Pevné stříbrné amalgámové elektrody. *Chemické Listy* 94, (2000), 1118-1120
- [35] YOSYPCHUK B., NAVRÁTIL T., LUKINA A., PECKOVÁ K.: Solid amalgam composite electrode as a new sensor for the determination of biologically active compounds. *Chemia Analytyczna*, (2007), 52.6: 897-910
- [36] ŠELEŠOVSKÁ R., BANDŽUCHOVÁ L., NAVRÁTIL T., CHÝLKOVÁ J.: Voltammetric determination of leucovorin using silver solid amalgam electrode. *Electrochimica Acta*, (2012), 60: 375-383
- [37] BANDŽUCHOVÁ L., ŠELEŠOVSKÁ R., NAVRÁTIL T., CHÝLKOVÁ J.: Silver solid amalgam electrode as a tool for monitoring the electrochemical reduction of hydroxocobalamin. *Electroanalysis*, (2013), 25.1: 213-222

- [38] BANDŽUCHOVÁ L., ŠELEŠOVSKÁ R., NAVRÁTIL T., CHÝLKOVÁ J.: Sensitive voltammetric method for determination of herbicide triasulfuron using silver solid amalgam electrode. *Electrochimica Acta*, 2013, 113: 1-8
- [39] JIRANEK I., PECKOVÁ K., KRÁLOVÁ Z., MOREIRA J. C., BAREK J.: The use of silver solid amalgam electrode for voltammetric and amperometric determination of nitroquinolines. *Electrochimica Acta*, (2009), 54.7: 1939-1947
- [40] YOSYPCHUK B., NOVOTNÝ L.: Copper solid amalgam electrodes. *Electroanalysis*, (2003), 15.2: 121-125
- [41] SWAIN G. M.: Solid electrode materials: pretreatment and activation. In: *Handbook of electrochemistry*. Elsevier, (2007), p. 111-153
- [42] MCCREERY R. L.: Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical reviews*, (2008), 108.7: 2646-2687
- [43] GOYAL R. N., GUPTA V. K., SANGAL A., BACHHETIN.: Voltammetric determination of uric acid at a fullerene-C60-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, (2005), 17.24: 2217-2223.
- [44] SHETTI N. P., MALODE S. J., NANDIBEWOOR S. T.: Electrochemical behavior of an antiviral drug acyclovir at fullerene-C60-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, (2012), 88: 76-83.
- [45] YOUNGMI Y. I., WEINBERG G., PRENZEL M., GREINER M., HEUMANN S., BECKER S., SCHLÖGL R.: Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode. *Catalysis Today*, (2017), 295: 32-40
- [46] DEKANSKI A., STEVANOVIĆ J., STEVANOVIĆ R., NIKOLIĆ B. Ž., JOVANOVIĆ V. M.: Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. *Carbon*, (2001), 39.8: 1195-1205
- [47] ŠVANCARA I., VYTRÁS K., KALCHER K., WALCARIUS A., WANG J.: Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis*, (2009), 21.1: 7-28
- [48] VYTRÁS K., ŠVANCARA I., METELKA R.: Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, (2009), 74.10: 1021-1033

- [49] ŠVANCARA I., KALCHER K., WALCARIUS A., VYTRÁS K.: Electroanalysis with carbon paste electrodes. Crc Press, (2012), ISBN 978-1-4398-3019-2
- [50] KALCHER K.: Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis*, (1990), 2.6: 419-433
- [51] POPOV V. N.: Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, (2004), 43.3: 61-102
- [52] TROJANOWICZ M.: Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2006), 25.5: 480-489
- [53] MERKOČI A.: Carbon nanotubes in analytical sciences. *Microchimica Acta*, (2006), 152.3: 157-174
- [54] USLU B., OZKAN S. A.: Solid electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, (2007), 10.7: 495-513
- [55] ŠVANCARA I., VYTRÁS K.: Elektroanalýza s bismutovými elektrodami. *Chemické listy*, (2006), 100.2: 90-113
- [56] LEZI N., VYSKOČIL V., ECONOMOU A., BAREK J.: Electroanalysis of organic compounds at bismuth electrodes: a short review. *Sensing in Electroanalysis*. vol. 7 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás; Eds.), (2012), ISBN 978-80-7395-564-9
- [57] JOVANOVSKI V., HOCEVAR S. B., OGOREVC B.: Bismuth electrodes in contemporary electroanalysis. *Current Opinion in Electrochemistry*, (2017), 3.1: 114-122
- [58] ECONOMOU A.: Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2005), 24.4: 334-340
- [59] HOCEVAR S. B., ŠVANCARA I., OGOREVC B., VYTRÁS K.: Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis. *Analytical Chemistry*, (2007), 79.22: 8639-8643
- [60] SERRANO N., DÍAZ-CRUZ J. M., ARIÑO C., ESTEBAN M.: Antimony-based electrodes for analytical determinations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2016), 77: 203-213

- [61] GUZSVÁNY V., NAKAJIMA H., SOH N., NAKANO K., IMATO T.: Antimony-film electrode for the determination of trace metals by sequential-injection analysis/anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, (2010), 658.1: 12-17
- [62] FUJISHIMA A., EINAGA Y., RAO T. N., TRYK D. A.: *Diamond electrochemistry*, Elsevier B.V., Amsterdam, (2005), ISBN 0-444-51908-4
- [63] PLESKOV Y. V., SAKHAROVA A. Ya., KROTOVA M. D., BOUILOV L. L., SPITSYN B. V.: Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, (1987), 228.1-2: 19-27.
- [64] PLESKOV Y. V.: Electrochemistry of diamond: A review. *Russian Journal of Electrochemistry*, (2002), 38.12: 1275-1291
- [65] SWAIN G. M., RAMESHAM R.: The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Analytical Chemistry*, (1993), 65.4: 345-351
- [66] KRAFT A.: Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. *Int. Journal of Electrochemical Science* (2007), 2.5: 355-385
- [67] LUONG J. H. T., MALE K. B., GLENNON J. D.: Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, (2009), 134.10: 1965-1979
- [68] NIDHEESH P. V., DIVYAPRIYA G., OTURAN N., TRELLU K., OTURAN M. A.: Environmental applications of boron-doped diamond electrodes: 1. Applications in water and wastewater treatment. *ChemElectroChem*, (2019), 6.8: 2124-2142
- [69] YANG N., YU S., MACPHERSON J. V., EINAGA Y., ZHAO H., ZHAO G., SWAIN G. M., JIANG X.: Conductive diamond: synthesis, properties, and electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, (2019), 48.1: 157-204
- [70] FERRO S.: Synthesis of diamond. *Journal of Materials Chemistry*, (2002), 12.10: 2843-2855
- [71] ZAVÁZALOVÁ J., BAREK J., PECKOVÁ K.: Boron doped diamond electrodes in voltammetry: New designs and applications (an overview). *Sensing in Electroanalysis*. (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.). (2013/2014), Volume 8., 2014



- [72] SRIKANTH V. V. S. S., SAMPATH KUMAR P., KUMAR V. B.: A brief review on the in situ synthesis of boron-doped diamond thin films. *International Journal of Electrochemistry*, (2012), 2012
- [73] VYSKOČIL V., DAŇHEL A., FISHER J., NOVOTNÝ V., DEÝLOVÁ D., MUSILOVÁ-KARAOVÁ J., MAIXNEROVÁ L., PECKOVÁ K., BAREK J.: Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické Listy*, (2010), 104.12: 1181-1195
- [74] REHACEK V., HOTOVY I., MARTON M., MIKOLASEK M., MICHNIAK P., VINCZE A., KROMKA A., VOJS M.: Voltammetric characterization of boron-doped diamond electrodes for electroanalytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2020), 862: 114020
- [75] MUZYKA K., SUN J., FERREJA H. T., LAN Y., ZHANG W., XU G.: Boron-doped diamond: Current progress and challenges in view of electroanalytical applications. *Analytical Methods*, (2019), 11.4: 397-414
- [76] MACPHERSON J. V.: A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2015), 17.5: 2935-2949
- [77] GARCIA-SEGURA S., DOS SANTOS E. V., MARTÍNEZ-HUITLE C. A.: Role of  $sp^3/sp^2$  ratio on the electrocatalytic properties of boron-doped diamond electrodes: a mini review. *Electrochemistry Communications*, (2015), 59: 52-55
- [78] KONDO T.: Recent electroanalytical applications of boron-doped diamond electrodes. *Current Opinion in Electrochemistry*, (2022), 32: 100891
- [79] MUSILOVÁ J., BAREK J., PECKOVÁ, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické Listy*, (2009), 103.6: 469-478
- [80] BALUCHOVÁ S., DAŇHEL A., DEJMKOVÁ H., OSTATNÁ V., FOJTA M., SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ K.: Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules—A review. *Analytica Chimica Acta*, (2019), 1077: 30-66
- [81] KUZMANOVIĆ D., KHAN M., MEHMETI E., NAZIR R., AMAIZAH N. R. R., STANKOVIĆ M.: Determination of pyridoxine (vitamin B6) in pharmaceuticals and urine

- samples using unmodified boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, (2016), 64: 184-189
- [82] LI Y., LI H., LI M., LI C., SUN D., YANG B.: Porous boron-doped diamond electrode for detection of dopamine and pyridoxine in human serum. *Electrochimica Acta*, (2017), 258: 744-753
- [83] STANKOVIĆ D. M., KUZMANOVIĆ D., MEHMETI E., KALCHER K.: Sensitive and selective determination of riboflavin (vitamin B2) based on boron-doped diamond electrode. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, (2016), 147.6: 995-1000
- [84] PEREIRA D. F., SANTANA E. R., PIOVESAN J.V., SPINELLI A.: A novel electrochemical strategy for determination of vitamin B12 by Co (I/II) redox pair monitoring with boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, (2020), 105: 107793.
- [85] YARDIM Y., ŞENTÜRK Z.: Electrochemical Behavior of Folic Acid at A Boron-Doped Diamond Electrode: Its Adsorptive Stripping Voltammetric Determination in Tablets. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2014), 11.1
- [86] CINKOVÁ K., ŠVORC L., ŠATKOVSKÁ P., VOJS M., MICHNIAK P., MARTON M.: Simple and rapid quantification of folic acid in pharmaceutical tablets using a cathodically pretreated highly boron-doped polycrystalline diamond electrode. *Analytical Letters*, (2016), 49.1: 107-121
- [87] SANTOS J. R., RANGEL A. O. S. S.: Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee. *Food Chemistry*, (2015), 187: 152-158
- [88] RADOVAN C., COFAN C., CINGHITA D.: Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid at an Unmodified Boron-Doped Diamond Electrode by Differential Pulse Voltammetry in Buffered Media. *Electroanalysis*, (2008), 20.12: 1346-1353
- [89] TYSZCZUK-ROTKO K., BĘCZKOWSKA I., WÓJCIAK-KOSIOR M., SOWA I.: Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and ascorbic acid using a boron-doped diamond electrode modified with Nafion and lead films. *Talanta*, (2014), 129: 384-391

- [90] COFAN C., RADOVAN C.: Simultaneous chronoamperometric sensing of ascorbic acid and acetaminophen at a boron-doped diamond electrode. *Sensors*, (2008), 8.6: 3952-3969
- [91] SÁLUSOVÁ I., CINKOVÁ K., BRŤKOVÁ B., VOJS M., MARTON M., ŠVORC L.: Electrochemical and analytical performance of boron-doped diamond electrode for determination of ascorbic acid. *Acta Chimica Slovaca*, (2017), 10.1: 21
- [92] TRYK, D. A., TACHIBANA H., INOUE H., FUJISHIMA A.: Boron-doped diamond electrodes: The role of surface termination in the oxidation of dopamine and ascorbic acid. *Diamond and Related Materials*, (2007), 16.4-7: 881-887
- [93] ĐUROVIĆ A., STOJANOVIĆ Z., KRAVIĆ S., KOS J., RICHTERA R.: Electrochemical determination of Vitamin D3 in pharmaceutical products by using boron doped diamond electrode. *Electroanalysis*, (2020), 32.4: 741-748
- [94] JASHARI G. KASTRATI G., KORECKÁ L., METELKA R., SÝS M., ASHRAFI A. M.: Electrochemical Behaviour of Tocopherols: Possibilities of Their Simultaneous Voltammetric Detection. *Applied Sciences*, (2021), 11.17: 8095
- [95] RUCKER R. B., SUTTIE J. W., MCCORMICK D. B., MACHLIN L. J.: *Handbook of vitamins*, third edition, Marcel Dekker AG, (2001), 616 s. ISBN 0-8247-0428-2
- [96] ZEMPLENI J., RUCKER R. B., MCCORMICK D. B., SUTTIE J. W.: *Handbook of vitamins*, fourth edition, CRC Press, (2013), 608 s. ISBN 0-8493-4022-5
- [97] FRIEDRICH W.: *Vitamins*. Walter de Gruyter, (2013), 1058 s. ISBN 3-11-010244-7
- [98] BANERJEE R.: The Yin-Yang of cobalamin biochemistry. *Chemistry & Biology*, (1997), 4.3: 175-186
- [99] FROESE D. S., FOWLER B., BAUMGARTNER M. R.: Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, (2019), 42.4: 673-685
- [100] WOLTERS M., STRÖHLE A., HAHN A.: Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Preventive Medicine*, (2004), 39.6: 1256-1266
- [101] BONNETT R.: The Chemistry of the Vitamin B12 Group. *Chemical Reviews*, (1963), 63.6: 573-605

- [102] QUADROS E. V.: Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of Haematology*, (2010), 148.2: 195-204
- [103] OBEID R., FEDOSOV S. N., NEXO E.: Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano-and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Molecular Nutrition & Food Research*, (2015), 59.7: 1364-1372
- [104] DALI-YOUCHEF, N., ANDRÈS E.: An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM: An International Journal of Medicine*, (2009), 102.1: 17-28
- [105] BRIANI CH., TORRE CH. D., CITTON V., MANARA R., POMPANIN S., BINOTTO G., ADAMI F.: Cobalamin deficiency: clinical picture and radiological findings. *Nutrients*, (2013), 5.11: 4521-4539
- [106] CASSILETH B.: Vitamin B12. *Oncology (Williston Park)*. (2010), 24(12):1176. PMID: 21141702
- [107] AHANGAR E. R., ANNAMARAJU P.: Hydroxocobalamin. (2021) [online]. [cit. 24.3.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557632/>
- [108] HALL C. A., BEGLEY J. A., GREEN-COLLIGAN P. D.: The availability of therapeutic hydroxocobalamin to cells. *Blood*, (1984), 63(2):335-41
- [109] PURVIS M. V., ROOKS H., YOUNG LEE J., LONGERICH S., KAHN S.A.: Prehospital hydroxocobalamin for inhalation injury and cyanide toxicity in the United States-analysis of a database and survey of ems providers. *Annals of Burns and Fire Disasters*, (2017), 30.2: 126
- [110] EUROPEAN MEDICINE AGENCY: Souhrn zprávy EPAR určený pro veřejnost. Cyanokit hydroxocobalaminum. (2015) [online]. [cit 23.3.2022]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/cyanokit-epar-summary-public\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/cyanokit-epar-summary-public_cs.pdf)
- [111] LEXA D., SAVEANT J. M.: The electrochemistry of vitamin B12. *Accounts of Chemical Research*, (1983), 16.7: 235-243
- [112] JASELSKIS B., DIEHL H.: The polarography of vitamins B12r and B12a. *Journal of the American Chemical Society*, (1954), 76.17: 4345-4348

- [113] ABD-EL-NABEY B. A.: Polarography of vitamin B12 in aqueous solutions and in water-alcohol mixtures. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, (1974), 53.2: 317-324
- [114] HOGENKAMP H. PC, HOLMES S.: Polarography of cobalamins and cobinamides. *Biochemistry*, (1970), 9.9: 1886-1892
- [115] SCHMIDT C. L., SWOFFORD H. S.: Electrochemical investigation of surface phenomena at a mercury electrode in vitamin B12a solution. *Analytical Chemistry*, (1979), 51.12: 2026-2033
- [116] SAWAMOTO H.: Cathodic adsorption stripping analysis of vitamin B12. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, (1985), 195.2: 395-404
- [117] FILIK H., AVAN A. A., AYDAR S.: Electrochemical determination of vitamin B-12 in food samples by poly (2, 2'-(1, 4-phenylenedivinylene) bis-8 hydroxyquinoline)/multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. *Food Analytical Methods*, (2016), 9.8: 2251-2260
- [118] SHISHEHBORE M. R.: Simultaneous voltammetric determination of vitamin B9 and B12 using a hydroquinone derivative multi-wall carbon nanotubes paste electrode. *Oriental Journal of Chemistry*, (2013), 29.2: 597
- [119] PALA B. B., VURAL T., KURALAY F., ÇIRAK T., BOLAT G., ABACI S., BAKI DENKBAŞ E.: Disposable pencil graphite electrode modified with peptide nanotubes for Vitamin B12 analysis. *Applied Surface Science*, (2014), 303: 37-45
- [120] PARVIN M. H., AZIZI E., ARJOMANDI J., YONG LEE J.: Highly sensitive and selective electrochemical sensor for detection of vitamin B12 using an Au/PPy/FMNPs@TD-modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2018), 261: 335-344
- [121] STANKOVIĆ D. M., KUZMANOVIĆ D., MANOJLOVIĆ D., KALCHER K., ROGLIĆG.: Electroanalytical approach for vitamin B12 quantification based on its oxidation at boron doped diamond electrode. *Journal of The Electrochemical Society*, (2016), 163.7: B348
- [122] ANTHERJANAM S., SARASWATHYAMMA B., KRISHNAN R. G., GOPAKUMAR G. M.: Electrochemical sensors as a versatile tool for the quantitative analysis of Vitamin B12. *Chemical Papers*, (2021), 75.7: 2981-2995

- [123] OBEID R., FEDOSOV S.N., NEXO E.: Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano – and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Molecular nutrition & food research*, (2015), 59.7: 1364-1372
- [124] JEONG J., HA T.S., KIM J.: Protection of aqua/hydroxocobalamin from reduced glutathione by B<sub>12</sub> trafficking chaperone. *BMB Reports*, (2011), 44.3:170-175