

Bc. Jan Šrámek

Amperometrický biosenzor ke stanovení alkoholu ve vzorcích lihovin

Předkládaná diplomová práce se zabývá konstrukcí a použitím amperometrického biosenzoru ke stanovení ethanolu ve vybraných alkoholických nápojích. Biosenzor využívá enzymatické oxidace ethanolu alkoholdehydrogenázou v přítomnosti kofaktoru NAD^+ a oxidu rhodičitého jako mediátoru přenosu elektronů. V teoretické části autor shrnuje problematiku amperometrických biosenzorů a zvláště se zaměřuje na způsoby imobilizace enzymu a elektrodové materiály. Závěrem jsou představeny různé analytické metody ke stanovení ethanolu a jsou uvedeny příklady některých senzorů pro elektrochemickou analýzu ethanolu. V praktické části diplomant testoval různé konfigurace biosenzoru, optimalizoval zastoupení jednotlivých složek na povrchu tištěné elektrody a pracovní parametry průtokové injekční analýzy (FIA). Po charakterizaci navrženého biosenzoru poté provedl analýzu modelového vzorku a vzorků vybraných alkoholických nápojů a výsledky analýz srovnal s měřeními pomocí Ramanovy spektrometrie.

Diplomová práce je sepsána přehledně a jasně, je citováno 83 zdrojů převážně vědeckých článků v zahraničních odborných časopisech. Jednotlivé experimentální kroky na sebe logicky navazují a jsou podrobně diskutovány. Text prošel pečlivou korekturou, objevuje se pouze několik překlepů a chyb. Přípomínky a dotazy jsou uvedeny chronologicky níže (tučně jsou označeny body pro diskuzi):

- **Úvod a závěr: problematika přímého i enzymatického elektrochemického stanovení ethanolu na různých elektrodách včetně uhlíkových tištěných byla na KACh řešena již dříve v rámci několika diplomových a dizertačních prací (např. dizertační práce P. Kotziana (2007) a V. Polana (2015), diplomové práce D. Jirkovské (2011) a D. Sehovcové (2012)), nelze tedy tvrdit, že předkládaná diplomová práce se této problematice věnuje poprvé. Chybí tak srovnání výsledků diplomové práce s předchozími pracemi.**
- Str. 17: glutaraldehyd se pro aktivaci elektrody (kdy mimo jiné dochází k vytvoření dodatečných funkčních skupin na povrchu elektrody) nepoužívá, slouží pouze k tzv. zesíťování.
- Kap. 2.6, 1. odst.: „chloridostříbrná elektroda“ místo „argentchloridová elektroda“.
- Obr. 4, str. 20: v popiscích obrázku jsou zaměněny pomocná a referentní elektroda.
- Kap. 2.6.2, 2. odst.: samotný uhlíkový inkoust pro tisk elektrod obsahuje obvykle více složek než jen pojivo a uhlíkový prášek. Tyto látky zajišťují např. vhodné tiskové vlastnosti, přilnavost k substrátu atd., nebývá to tedy binární směs, ale komplexní heterogenní systém.
- Obr. 5, str. 20: v popisu obrázku má být „těrka“ místo „stěrka“. „Sítka“ je vlastně sítotisková šablona.
- Str. 21, 2. odst.: funkcionalizace uhlíkových nanotrubiček se neprovádí „rozplétáním (původně) stočených trubic“, to by potom nebyly nanotrubičky, ale různé formy grafenu. Funkcionalizací různými exo- a endogenními technikami se zavádějí funkční skupiny přímo na povrch nebo dovnitř nanotrubiček bez porušení jejich tvaru.
- Kap. 2.7, str. 22: pojem „reakční cívka“ u popisu FIA se používá spíše v případech, kdy analyt v toku reaguje s vhodným činidlem za vzniku komplexu, který lze

spektrofotometricky sledovat. U FIA s elektrochemickými senzory reakční děj většinou probíhá až na pracovní elektrodě v detektoru.

- Str. 31, 1. odst.: formulace „...vznikající ionty mění ionizační proud vodíkového plamínku.“ není vhodná, ve FID detektoru se mění ionizační proud mezi dvěma elektrodami.
- Str. 37, 3. odst.: do přehledu elektrochemických metod pro stanovení ethanolu by autor mohl doplnit také příklad elektrochemického biosenzoru s alkoholoxidázou, který využívá detekci peroxidu vodíku, vytvářeného při enzymatické reakci.
- Kap. 4.1, str. 40: pro úplnost by bylo dobré uvést typ použitého uhlíkového inkoustu a aktivitu ADH.
- Kap. 4.5, str. 41: autor se vůbec nezmiňuje o použité instrumentaci pro měření s využitím FIA.
- Str. 43, 2. odst. a dále v textu: „standardní“ místo „standartní“.
- Obr. 22, str. 44-45: interpretace voltamogramů elektrod s mediátorem RhO₂ v přítomnosti NAD⁺ je poněkud zavádějící. Uvedené tvrzení o nevhodnosti použití uhlíkového inkoustu z důvodu vysokého pozadí je pravdivé, pokud by se navazující měření prováděla technikami s časovou změnou potenciálu (např. DPV, SWV). Při amperometrické detekci ve FIA je ale potenciál konstantní a vyšší proudové pozadí nevadí, pokud nemá vliv na citlivost. Na voltamogramu s uhlíkovým inkoustem (SPCE/CI/RhO₂) je vidět, že oxidační signál je minimálně 2x větší než u modifikace grafenem nebo nanotrubičkami, a proto by i tato modifikace měla být dále testována.
- Str. 47, 1. odst.: struktura karbonylové skupiny není správná, na uhlíku není další dvojná vazba.
- Obr. 24, str. 47: autor vyhodnotil jako lepší imobilizaci všech složek biosenzoru ve formě kompozitní směsi (vše v jednom), přitom po vrstvení jednotlivých komponent jsou měřené signály až 3x vyšší. Nebylo by vhodnější ponechat takto připravený sensor delší dobu k důkladnému vyplavení nenavázaného nebo slabě vázaného enzymu a získat tak daleko vyšší citlivost stanovení? Nebo bylo v tomto uspořádání pozorováno neustálé snižování signálu i v delším horizontu než 1800 s?
- Tab. 2 (str. 51) a 3 (str. 65): hodnoty v tabulce jsou uvedeny s průměrnou nebo směrodatnou odchylkou? Použití průměrné odchylky při vyhodnocení analytických měření není až tak obvyklé.
- Obr. 32, str. 57: při pohledu na vysokou odezvu navrženého biosenzoru na ethylacetát se nabízí otázka, zda by senzor nemohl být použit pro citlivou detekci této látky např. v potravinách, kde by naopak obsažené alkoholy příliš nerušily?
- Obr. 35, str. 61: odezvy pro vodku Božkov ukazují na obsah ethanolu kolem 15 %, je tomu skutečně tak?

Diplomant Bc. Jan Šrámek splnil zadání diplomové práce, diplomovou práci doporučuji k obhajobě a vzhledem k výše uvedenému ji hodnotím stupněm

B.

V Pardubicích 31. května 2019

Ing. Radovan Metelka, Ph.D.