

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra analytické chemie

Amperometrický biosenzor ke stanovení alkoholu
ve vzorcích lihovin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Jan Šrámek

VEDOUcí PRÁCE: prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.

KONZULTANT: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Šrámek**
Osobní číslo: **C17524**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Amperometrický biosensor ke stanovení ethanolu ve vzorcích vybraných lihových nápojů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Na základě informací získaných v dostupné literatuře vypracujte rešerši na téma "Dehydrogenázové amperometrické biosenzory ke stanovení alkoholu". Zaměřte se především na náležité vysvětlení principů funkce tohoto typu biosenzorů, používané konstrukce a konstrukční varianty, jejich typické analytické parametry, mechanická odolnost a životnost. Text teoretické části vhodně doplňte ilustračním materiálem (obrázky, schémata, tabulky).
2. Na základě navrženého postupu zhotovte v laboratorních podmínkách amperometrický biosensor tohoto typu, použitelný pro měření v režimu průtokové injekční analýzy (FIA). Tuto konfiguraci řádně otestujte na vybraných vzorcích lihových nápojů.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....

Šrámek Jan

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr. a Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování diplomové práce, vstřícnost při konzultacích, cenné rady a za čas, který mi věnovali. Poděkování patří též mé rodině a přítelkyni za jejich trpělivost a podporu.

Anotace

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a zkonstruovat amperometrický biosenzor určený ke stanovení ethanolu ve vybraných vzorcích nápojů s obsahem alkoholu. V teoretické části jsou detailně popsány jednotlivé komponenty utvářející výsledný biosenzor a možné postupy určené k jeho zhotovení. Následuje samostatná část věnovaná vybraným postupům ke stanovení ethanolu, ať už jde o tradiční alkoholové testy pro měření v terénu či o moderní laboratorní metody využívající sofistikovanou instrumentální techniku. Experimentální část se zabývá výběrem vhodného amperometrického převodníku a způsoby imobilizace jednotlivých součástí konfigurace testovaného biosenzoru, tj. enzymu, kofaktoru a mediátoru; to vše s následnou optimalizací klíčových pracovních podmínek a přístrojových parametrů. Konečná konfigurace pak byla ověřována na několika typech alkoholických nápojů, kdy získané údaje posloužily k definování možností biosenzoru a jeho uplatnění v analýze reálných vzorků.

Klíčová slova

Enzymatický biosenzor; ethanol; stanovení v lihovinách.

Annotation

The aim of this diploma thesis was to design and construct an amperometric biosensor intended for the determination of ethanol in selected samples containing alcohol. Theoretical part deals in detail with the main components of amperometric biosensors and especially those applicable to the ethanol sensing. Then, a special section is devoted to the manufacturing procedures of such biosensors, followed by a survey of traditional alcohol testers and modern instrumental methods for the determination of ethanol. In the experimental part, of main interest were amperometric transducers and the corresponding procedures for immobilization of enzyme, cofactor, and mediator, together with optimisation of the key experimental and instrumental parameters. The final configuration has been examined on various alcoholic beverages, allowing us to obtain a number of useful data for defining the overall performance of the biosensor with respect to its use in analysis of real samples.

Keywords

Enzyme biosensor; ethanol; determination; alcoholic beverages.

OBSAH

Seznam ilustrací a tabulek	9
Seznam použitých zkratk	10
1. Úvod.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
2. Biosenzorika: Úvod do problematiky	12
2.1 Definice a základní pojmy	12
2.2 Alkoholdehydrogenázové biosenzory	12
2.3 Základní charakterizace biosenzorů na bázi ADH.....	13
2.4 Alkoholdehydrogenáza	14
2.5 Imobilizace alkoholdehydrogenázy	15
2.5.1 Adsorpční a kovalentní imobilizace	16
2.5.2 Ostatní imobilizační techniky.....	17
2.6 Amperometrické transduktory	18
2.6.1 Uhlíkové pastové elektrody	19
2.6.2 Tištěné uhlíkové elektrody	20
2.6.3 Uhlíkové nanotrubičky	21
2.7 Průtoková injekční analýza	22
3. Přehled analytických metod ke stanovení ethanolu	24
3.1 Alkoholické nápoje a ethanol.....	24
3.1.1 Pivo a příbuzné nápoje	24
3.1.2 Vín a vinné nápoje	25
3.1.3 Destiláty a podobné lihoviny.....	26
3.2 Terénní testy na ethanol	28
3.3 Přehled metod pro identifikaci a stanovení ethanolu s využitím moderních instrumentálních technik. 30	
3.3.1 Plynová chromatografie.....	30
3.3.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a Ramanova spektroskopie ...	32
3.3.3 Další techniky a postupy	35
3.4 Přehled elektrochemických a elektroanalytických metod ke stanovení ethanolu	35
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4. Příprava a charakterizace amperometrického biosenzoru	40
4.1 Potřebné komponenty k přípravě amperometrického biosenzoru.....	40
4.2 Použité chemikálie	40

4.3 Použité alkoholické nápoje	40
4.4 Přístrojové vybavení.....	41
4.5 Použité instrumentální techniky	41
4.5.1 Použitý elektrolyt.....	41
4.5.2 Parametry cyklické voltametrie	41
4.5.3 Parametry průtokové injekční analýzy	41
4.5.4 Parametry Ramanovy spektroskopie	41
4.6 Výběr amperometrického převodníku.....	42
4.7 Způsob imobilizace	46
4.7.1 Množství Nafionu	48
4.7.2 Množství glutaraldehydu	48
4.7.3 Množství NAD ⁺	48
4.7.4 Množství ADH	49
4.8 Optimalizace pracovních podmínek.....	51
4.8.1 Optimalizace průtokové rychlosti.....	51
4.8.2 Optimalizace detekčního potenciálu.....	52
4.9 Charakteristika ADH biosenzoru	53
4.9.1 Životnost ADH biosenzoru.....	56
4.10 Interferenty	56
4.11 Analýza modelového vzorku.....	57
4.12 Analýza reálných vzorků.....	58
4.12.1 Analýza pomocí ADH biosenzoru.....	58
4.12.2 Analýza pomocí Ramanovy spektroskopie	62
5. Závěr	66
6. Literatura.....	68

Seznam ilustrací a tabulek

Obr. 1: Schematické znázornění principu ADH biosenzoru pro stanovení ethanolu.	14
Obr. 2: Imobilizační techniky.	16
Obr. 3: Způsob plnění uhlíkové pastové elektrody.	19
Obr. 4: Uhlíková tištěná elektroda.	20
Obr. 5: Výroba SPCE.	20
Obr. 6: Struktura SWCNT a MWCNT.	21
Obr. 7: Instrumentace průtokového injekčního analyzátoru.	23
Obr. 8: Pivo typu <i>ale</i> a světlý <i>ležák</i>	24
Obr. 9: Červené a bílé víno.	25
Obr. 10: Vodka – jedna z nejvíce prodávaných značek.	26
Obr. 11: Český rum alias „Tuzemák“.	27
Obr. 12: Detekční trubička na alkohol.	29
Obr. 13: Typický chromatogram vzorku whisky.	31
Obr. 14: Absorpční FTIR spektra několika druhů piva.	33
Obr. 15: Ukázka Ramanových spekter ethanolu a methanolu.	34
Obr. 16: Aparatura určená k oxidaci alkoholů.	35
Obr. 17: Cyklické voltamogramy během oxidace ethanolu v 0.1 M NaOH.	36
Obr. 18: Strukturální vzorec Meldolovy modři.	38
Obr. 19: Laboratorně připravený ADH biosenzor.	39
Obr. 20: SPCE/GR/RhO ₂	43
Obr. 21: Cyklické voltamogramy komerční SPCE, SPCE bez mediátoru a SPCE/RhO ₂	44
Obr. 22: Cyklické voltamogramy SPCEs/RhO ₂ v přítomnosti NAD ⁺	45
Obr. 23: Cyklické voltamogramy SPCE/GR/RhO ₂ v přítomnosti NAD ⁺ , ADH a EtOH.	46
Obr. 24: FIA amperogram roztoku 20% ethanolu naměřený ADH biosenzorem tvořeným mnohonásobným vrstvením a amperogram 3% ethanolového roztoku naměřený biosenzorem na bázi kompozitní směsi.	47
Obr. 25: Závislost proudové hodnoty na množství NAD ⁺	49
Obr. 26: Závislost proudové hodnoty na množství ADH.	50
Obr. 27: Kalibrační křivky obdržené při různých průtokových rychlostech.	52
Obr. 28: Kalibrační křivky obdržené při různých potenciálech detekce.	53
Obr. 29: Kalibrační závislost pro 2 až 10% ethanolové roztoky.	54
Obr. 30: Závislost proudové hodnoty píku na počtu měření získaná z FIA amperogramu 3% ethanolového roztoku.	55
Obr. 31: FIA amperogram získaný analýzou 5-50% roztoku ethanolu.	56
Obr. 32: FIA amperogram ethanolu a vybraných interferujících látek o stejné koncentraci.	57
Obr. 33: FIA amperogram 2x naředěného piva Primátor 24° a bílého vína Páava.	58
Obr. 34: FIA amperogram 2x naředěného nealkoholického piva Birell.	59
Obr. 35: FIA amperogram 2x naředěného rumu Liberté, vodky Božkov a domácí slivovice.	61
Obr. 36: Ramanova spektra vybraných komponent.	62
Obr. 37: Ramanova spektra 5-40% ethanolu.	63
Obr. 38: Ramanova spektra lihovin ředěných v poměru 1:1 a neředěného vína.	64
Obr. 39: Ramanovo spektrum piva Primátor 24°.	64
Tab. 1: Analytické parametry vybraných ADH biosenzorů určených pro stanovení ethanolu.	23
Tab. 2: Proudové hodnoty totožných biosenzorů získané FIA analýzou 10% ethanolu.	51
Tab. 3: Výsledky analýzy vybraných lihovin, piva a vína.	65

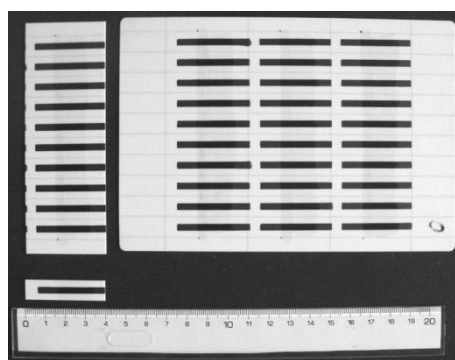
Seznam použitých zkratk

ADH	alkoholdehydrogenáza
AOX	alkoholoxigenáza
BAC	koncentrace alkoholu v krvi
BrAC	koncentrace alkoholu v dechu
CI	uhlíkový inkoust
CNTs	uhlíkové nanotrubičky
CPE	uhlíkové pastové elektrody
CV	cyklická voltametrie
<i>E</i>	detekční potenciál
FIA	průtoková injekční analýza
FR	průtoková rychlost
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GR	grafen
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
Med	mediátor
MWCNTs	vícetěnné uhlíkové nanotrubičky
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
PB	fosfátový pufr
PVA	polyvinylalkohol
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPCE	uhlíková tištěná elektroda
SWCNTs	jednotěnné uhlíkové nanotrubičky

1. Úvod

Elektroanalýza s tištěnými elektrodami je oborem, který svým způsobem využívá poslední generaci instrumentace na bázi moderních přístrojových sestav malých rozměrů a přenosných analyzátorů do terénu. V elektroanalytické skupině na katedře analytické chemie, FChT *Univerzity Pardubice*, se začaly poprvé testovat elektrody a senzory tohoto typu v druhé polovině devadesátých let minulého století, a to ve spolupráci s obdobným pracovištěm na *Karl-Franzens Universität* v rakouském Grazu, kde již byl k dispozici stroj pro malovýrobu tištěných elektrod, jeden z prvních svého druhu, který byl dostupný na běžném trhu.

Jednoduché elektrody o planární konfiguraci s nanesenou vrstvou vytvrzeného uhlíkového inkoustu (viz **obr.** vpravo) byly tištěny v malých šaržích na společné keramické desce, kdy jednotlivá čidla požadované velikosti byla mechanicky odlamována z předem nařezané podložky. Takto získané elektrody ve tvaru proužku začaly být testovány buď jako takové, (v podobě nosičů rtuťových filmů a později i povlaků bismutu), nebo jako elektrodový základ pro enzymatické biosenzory.



Obr.: Keramická deska s natištěnými uhlíkovými elektrodami, s jednou ze tří sérií (vlevo nahoře), jedním senzorem (vlevo dole) a měřítko (dole); podle *

Řada měření s tištěnými elektrodami tohoto typu a později i s modernějšími konfiguracemi, které již sdružovaly více elektrod v jednom korpusu a představovaly tak kompletní elektrodové cely, byla předmětem i několika diplomových prací. Jako příklady lze uvést potenciometrické senzory k indikaci HPO_4^{2-} a ClO_4^- , amperometrické (bio)senzory na peroxid vodíku, glukózu, hypoxanthin a biologické aminy, nebo amperometrická čidla pro měření v průtoku (detekce katecholů), popř. i v podobě imunosenzorů s využitím tzv. kvantových teček při výzkumu důležitých biologických reakcí a interakcí.

V rámci předložené diplomové práce je poprvé věnována pozornost stanovení ethanolu s cílem navrhnout optimální konfiguraci pro měření v průtoku a posléze základní metodu pro praktickou analýzu vzorků alkoholických nápojů, přičemž získané výsledky a pozorování je nutno chápat jako víceméně úvodní studii.

*) Švancara I. a kol.: Carbon paste electrodes and screen-printed sensors plated by mercury- and bismuth films in stripping voltammetry of heavy metals. *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A*; **2002**, 8, 19–33.

TEORETICKÁ ČÁST

2. Biosenzorika: Úvod do problematiky

2.1 Definice a základní pojmy

Biosenzor lze obecně charakterizovat jako sofistikované analytické zařízení, obsahující imobilizovaný biologický materiál (např. enzym, protein, nukleovou kyselinu) a fyzikálně-chemický převodník. V momentě, kdy dojde k interakci analytu s výše zmíněným biologickým materiálem, generuje se signál fyzikální či elektrochemické podoby, jenž se současně zaznamenává a následně vyhodnocuje [1,2]. Biosenzor poskytuje kvantitativní a semikvantitativní informace [3].

Podle typu převodníku rozlišujeme biosenzory optické, akustické, termické a elektrochemické. Vzhledem k tomu, že elektrochemické reakce přímo generují elektrický signál, jenž lze rovnou detekovat a vyhodnocovat, používají se elektrochemické biosenzory nejčastěji. Zbývající, výše uvedené biosenzory vyžadují různé převodníky signálu, které zvyšují pořizovací cenu. Tato práce se bude zabývat biosenzorem elektrochemickým [4].

Vesměř jakýkoliv biosenzor musí být vysoce selektivní, nezávislý na fyzikálních parametrech (pH, teplota) a znovu použitelný. Biosenzory nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích, zejména v potravinářském průmyslu, zdravotnictví a environmentální chemii [1,2].

Enzymatické biosenzory se těší veliké oblibě již několik desetiletí. Přestože existuje značné množství enzymů, pro tvorbu enzymatických biosenzorů se používají především enzymy ze skupin oxidáz a dehydrogenáz, které jsou nejstabilnější. Právě enzymatický biosenzor na bázi alkoholdehydrogenázy (*Alcohol Dehydrogenase*; ADH) je pak ústředním tématem této diplomové práce.

2.2 Alkoholdehydrogenázové biosenzory

ADH biosenzory se řadí do skupiny tzv. biokatalytických biosenzorů. Enzym ADH katalyzuje biochemickou reakci probíhající na analytu. Valná většina ADH biosenzorů vykazuje vysokou selektivitu a citlivost, široký lineární rozsah a nízké detekční limity. Mezi přednosti patří možnost miniaturizace, jednoduchá manipulace, relativně nízké náklady na zhotovení a především krátká doba analýzy [5,6].

Při konstrukci ADH biosenzoru je nesmírně důležité zvolit správný typ imobilizační techniky, mediátor a amperometrický transduktor. Výsledné biosenzory vykazují rozdílné elektrochemické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Při stanovení ethanolu mají lišící se ADH

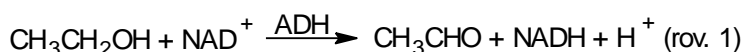
biosenzory odlišný limit detekce, lineární rozsah, citlivost a různorodý detekční potenciál. Rovněž budou po určité uplynuté době a počtu provedených analýz vykazovat rozdílnou aktivitu.

Z literatury bylo zjištěno, že biosenzor na bázi GCE/ADH/CA-TBO si po 20 dnech skladování uchová 50 % své počáteční aktivity [7] a biosenzor typu MWCNT/ADH/MB/GP si po provedení třísté analýzy udržuje přibližně 95% aktivitu [8]. Nesprávné skladování negativně ovlivňuje životnost biosenzoru. Doporučuje se skladování v chladném prostředí, nejlépe v lednici [9].

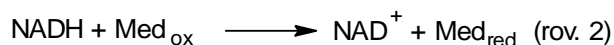
Ethanol bývá považován za nejčastěji konzumovanou návykovou látku vůbec, a proto je jeho stanovení neustálým předmětem zájmu, přičemž ADH biosenzor umožňuje snadné a rychlé stanovení ethanolu v krvi, krevním séru, moči, slinách a potu [3,6]. ADH biosenzor nachází uplatnění v potravinářském průmyslu, respektive pomocí biosenzoru lze elegantně kontrolovat průběh fermentačního procesu nebo stanovovat obsah ethanolu v alkoholických nápojích všeho druhu [6].

2.3 Základní charakterizace biosenzorů na bázi ADH

Princip funkce biosenzoru na bázi ADH lze popsat následovně: V prvním kroku ADH katalyzuje oxidaci ethanolu na acetaldehyd, a to za přítomnosti kofaktoru NAD^+ , který se redukuje na NADH (rov. 1). Bez přítomnosti kofaktoru by ADH nevykazovala jakoukoliv aktivitu a ethanol by nemohl být oxidován [10,11].



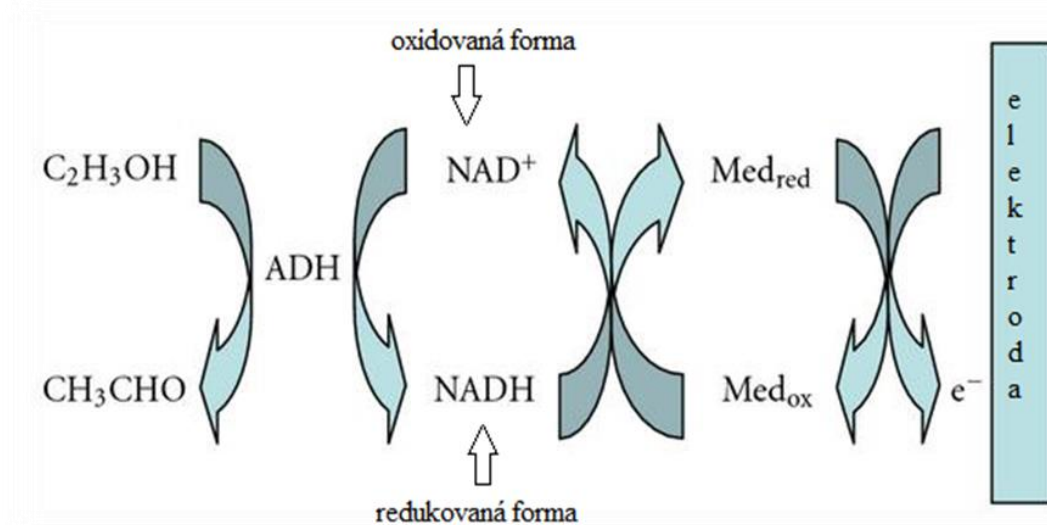
Ve druhém kroku dochází k elektrooxidaci redukované formy (NADH), viz rov. 2. Přímá elektrooxidace NADH na konvenčních elektrodách vyžaduje velice vysoké potenciály (+0,9 V) a dochází k nežádoucím vedlejším reakcím, zejména oxidacím dalších elektroaktivních látek přítomných ve vzorku. Navíc meziprodukty vytvořené během oxidačních reakcí často znečišťují elektrodu [8]. V důsledku toho se na povrch elektrodových materiálů imobilizuje redoxně aktivní látka, tzv. mediátor (*mediator*, Med), který katalyzuje elektrooxidaci NADH a sám podléhá redukcii.



V důsledku toho dochází ke zvýšení rychlosti přenosu elektronu z aktivního centra enzymu na povrch elektrody. Na závěr se redukováný mediátor reoxiduje (rov. 3) a proud potřebný na tuto reoxidaci je přímo úměrný koncentraci ethanolu ve vzorku [10-12].



Pro názornost je princip ADH biosenzoru také znázorněn ve schématu na Obr. 1.



Obr. 1: Schematické znázornění principu ADH biosenzoru pro stanovení ethanolu (převzato z [13]).

Jako mediátory se nejčastěji používají katecholy, chinony, ferroceny, fenoxaziny, fenothiaziny, fenyldiaminy a nověji i vodivé polymery. Mediátor lze přidat do roztoku analytu nebo imobilizovat na povrch pracovní elektrody, ovšem vždy musí být v blízkosti enzymu. Mediátory vykazují za daných pracovních podmínek vysokou stabilitu a mají nižší redox potenciál než ostatní elektroaktivní látky obsažené ve vzorku [7,14].

K oxidaci NADH se jako mediátor často používá derivát fenothiazinu tzv. *Toluidinová modř O*. Vysoká rozpustnost tohoto mediátoru ve vodě se řeší vhodnou imobilizační technikou [7]. Dalšími známými mediátory jsou *Meldolova modř* [8], *Brilantní kresylová modř* [15] a *Nilská modř* [15].

2.4 Alkoholdehydrogenáza

ADH lze charakterizovat jako enzym závislý na nikotinamidadenindinukleotidu (kofaktor) a biosenzory na bázi tohoto enzymu vyžadují imobilizaci jak enzymu, tak právě i kofaktoru.

Nevratné zachycení nebo spojení kofaktoru s enzymem není žádoucí. Kofaktor by se měl nacházet v dostatečné blízkosti enzymu a při zahájení oxidace ethanolu aktivovat ADH [7,16].

ADH katalyzuje oxidaci především primárních alkoholů, přičemž reakční rychlost rapidně klesá s rostoucí velikostí molekuly. Tento enzym taktéž vykazuje malou aktivitu vůči některým sekundárním alkoholům a katalyzuje jejich oxidaci na příslušné ketony. ADH biosenzor není vhodný pro stanovení methanolu, jelikož ADH vůči němu nevykazuje prakticky žádnou aktivitu. V porovnání s enzymem alkoholoxidázou je ADH výhodnější, jelikož nezávisí na obsahu kyslíku a vykazuje větší specifitu [3,10,16,17].

Enzym ADH je přirozenou součástí eukaryotických mikroorganismů (rostliny, lidé) a prokaryotických buněk (kvasinky). K tvorbě ADH biosenzorů se nejhojněji používá kvasinková ADH (*Saccharomyces cerevisiae*), klasifikována jako EC 1.1.1.1 [18,19].

ADH se řadí mezi enzymy dobře rozpustné ve vodě; v 1 ml vody se rozpustí 1 mg ADH, za vzniku čirého až mírně zakaleného roztoku. ADH jako taková by měla být skladována při teplotě -20 °C [20].

Ve vyšších eukaryotických systémech se ADH obvykle vyskytuje jako dimerní molekula, zatímco prokaryotické organismy obsahují tetramerní molekulu ADH. Tetramerní molekula ADH se skládá ze 4 identických monomerů, kde každý z nich obsahuje 347 aminokyselinových zbytků a atom zinku, jenž má tetrahedrální koordinaci. Celková molární hmotnost kvasinkové ADH je 147 396 Da [21]. Pro správnou funkci biosenzoru se doporučuje používat purifikovanou ADH [3].

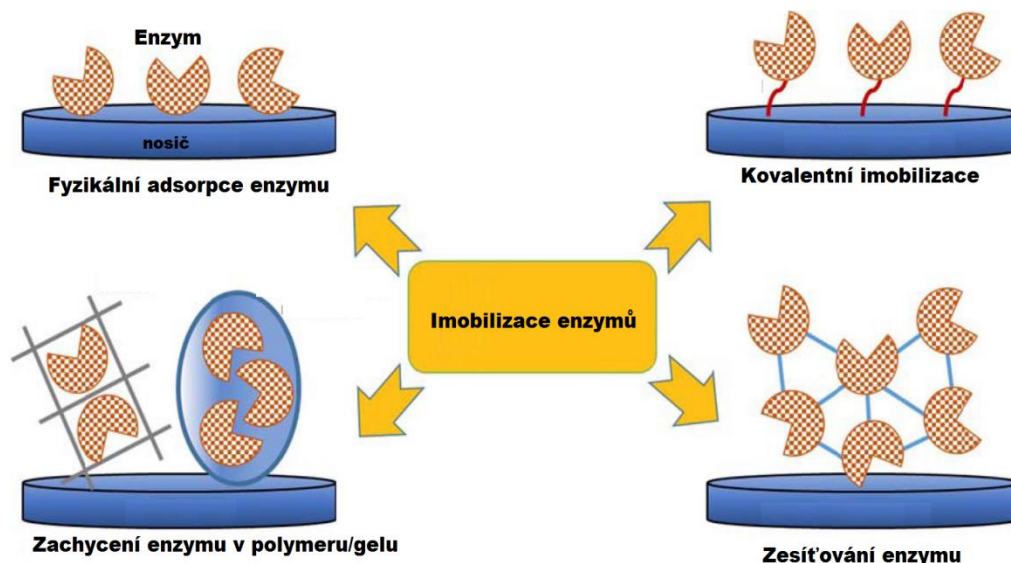
Optimální prostředí pro oxidaci ethanolu se nachází v rozmezí pH 8,6-9,0; přičemž maximální proudové odezvy se pak dosahuje při pH 8,5 [22]. Při nižších hodnotách již dochází k nežádoucí redukci acetaldehydu zpět na ethanol. Naopak při překročení horní hranice pH ztrácí ADH svoji aktivitu. Izoelektrický bod se nachází při pH 5,4 [10,22].

2.5 Imobilizace alkoholdehydrogenázy

Imobilizované enzymy lze definovat jako enzymy připojené ke specifickým nosičům. Při konstrukci ADH biosenzorů se imobilizací zajistí dokonalé spárování ADH s povrchem pracovní elektrody. Imobilizace ADH představuje nejdůležitější krok při konstrukci biosenzoru, jelikož nesprávné provedení negativně ovlivňuje chování biosenzoru [5,9].

V současnosti lze imobilizaci enzymů považovat za rutinní záležitost, neboť správně provedená imobilizace zvyšuje stabilitu enzymu a umožňuje opakované použití biosenzoru, čímž se výrazně minimalizují provozní náklady. Navíc biosenzor s imobilizovaným enzymem

lze používat v systémech pracujících v průtokovém režimu. Existuje několik imobilizačních technik, ovšem v praxi se nejčastěji používají techniky zobrazené na Obr. 2 [9,23].



Obr. 2: Imobilizační techniky (převzato z [9]).

K imobilizaci ADH se výhradně používají organicky modifikované silikáty, polyethylenglykol, koloidní zlato, vodivé polymery, redoxní polymery, vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky a oxidy některých kovů [5].

2.5.1 Adsorpční a kovalentní imobilizace

Imobilizace adsorpční dostává často označení jako nejjednodušší imobilizační metoda vůbec. Jedná se o nedestruktivní a ekonomický způsob imobilizace. Enzym se adsorbuje na povrch nosiče prostřednictvím elektrostatických van der Waalových sil nebo hydrofobních interakcí [9,23].

Principiálně lze adsorpční imobilizaci popsat následovně. Enzym ADH se rozpustí v příslušném rozpouštědle a vzniklý enzymatický roztok přichází do kontaktu s pracovní elektrodou. Po určité době se povrch elektrody omývá pufrům, čímž dojde k odstranění neadsorbovaných molekul enzymu [9]. Za největší nevýhodu této imobilizační techniky lze považovat nízkou stabilitu výsledných biosenzorů, neboť enzym je navázán na povrch elektrody slabými vazbami, které se při nedodržení pracovních podmínek (pH, teplota) snadno rozpadají [23]. K předejití tohoto problému se doporučuje provést preventivní zesíťování pomocí glutaraldehydu [16].

Za nejrozšířenější imobilizační techniku se často považuje kovalentní imobilizace. Vysoce stabilní kovalentní vazba vzniká mezi nukleofilní funkční skupinou enzymu ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$) přítomnou ve struktuře aminokyseliny (např. $-\text{SH}$ skupina cysteinu, $-\text{NH}_2$ skupina argininu) a aktivovaným povrchem elektrody [14,24]. Inertní povrch elektrody se před navázáním enzymu podrobí aktivaci. Během aktivační reakce vznikají elektrofilní skupiny, které reagují s již zmíněnými nukleofilními skupinami enzymu. Jako aktivační činidlo se nejčastěji používá glutaraldehyd nebo karbodiimid [9].

Kovalentní imobilizaci lze charakterizovat jako nákladnou a komplikovanou metodu, která vyžaduje velké množství enzymu a reakce se musí provádět za specifických pracovních podmínek. Ovšem výsledný biosenzor vykazuje dlouhou životnost [14,16].

ADH lze na povrch pracovní elektrody imobilizovat zprostředkováním kovalentní vazby mezi acetátem celulózy a *Toluidinovou modří O* [7]. Trichlortriazin lze považovat za velice účinný kovalentní modifikátor, který ochotně reaguje s $-\text{OH}$ skupinami přítomnými v exfoliovaném grafitu. Ten lze charakterizovat jako vysoce porézní a nízkohustotní materiál, připravený tepelným rozkladem grafitových interkalačních sloučenin [15]. Exfoliovaný grafit lze také modifikovat dopaminem, kdy dochází k reakci mezi $-\text{NH}_2$ skupinou dopaminu a $-\text{COOH}$ skupinou exfoliovaného grafitu, za vzniku amidické funkční skupiny. Následně se modifikovaný exfoliovaný grafit společně s ADH imobilizuje prostřednictvím interakce "sol-gel" na keramické uhlíkové elektrodě. V tomto případě sol-gel matrice vzniká z methyltrimethoxysilanu [9].

2.5.2 Ostatní imobilizační techniky

Reakce enzymu s bifunkčním činidlem dochází k tzv. zesítní enzymu. Během zesítní dochází ke tvorbě mezimolekulárních kovalentních vazeb. Mezi nejpoužívanější bifunkční činidla patří glutaraldehyd, glyoxal a hexamethylendiamin. ADH lze zesítnit samostatně nebo s přidávkem inertní bílkoviny, např. v přítomnosti hovězího sérového albuminu [25].

Za největší nevýhodu lze považovat pokles aktivity enzymu, v důsledku změny konformace a chemické změny aktivního místa enzymu během zesítní [25]. Přidáním výše zmíněné bílkoviny se zamezí právě tomuto nežádoucímu procesu [9].

Enzym lze zachytit v polymerním filmu, eventuálně v gelovém materiálu. Vzniklé polymerní či gelové matrice brání elektroaktivním interferujícím sloučeninám dosáhnout povrchu elektrody. K imobilizaci ADH se často používá polyvinylalkohol (PVA), avšak

využití surového PVA nepříznivě ovlivňuje průtokové parametry v reaktorech s kontinuálním prouděním, respektive zvyšuje zpětný tlak a zkresluje výtěžek reakce [26].

Nicméně výhodou polymerových vláken je možnost přeměny na tkaninový formát s různým stupněm pórovitosti. Dále PVA obsahuje sekundární -OH skupinu, která snadno podléhá funkcionalizačním reakcím (např. acylace). Změna pórovitosti a funkcionalizace -OH skupiny eliminuje výše zmíněné problémy a utváří z PVA vysoce atraktivní materiál pro imobilizaci ADH [26].

ADH lze také zachytit v Nafionu. Toto zachycení se používá především v momentě, kdy analyt obsahuje negativně nabitě interferenty. Bylo prokázáno, že Nafion působí jako účinná bariéra vůči aniontům [16].

Elektropolymerizací lze pohodlně imobilizovat ADH na povrch pracovní elektrody. Jedná se o jedнокrokovou metodu, kdy se na pracovní elektrodu ponořenou ve vodném roztoku enzymu a monomeru vkládá vhodné potenciály. Nejprve dochází k oxidaci monomeru za vzniku radikálového kationtu, který reaguje s neutrálním monomerem nebo jiným obdobným radikálem a vzniká dimer. Poté vytvořené dimerní molekuly podléhají kopulačním reakcím a na povrchu pracovní elektrody se formuje nerozpustný polymerní film. Molekuly enzymu obsažené ve vodném roztoku se zachycují uvnitř polymerního filmu, přičemž podle velikosti vkládaného potenciálu lze regulovat jeho tloušťku [9,25].

2.6 Amperometrické transduktory

Valná většina amperometrických analýz se provádí v tříelektrodeovém systému, tvořeného pracovní referenční a pomocnou elektrodou. Při práci s nízkými proudy postačí použít dvouelektrodeový systém neobsahující pomocnou elektrodu. V praxi se používá hlavně argentchloridová elektroda, zatímco dříve oblíbená kalomelová referenční elektroda již mnohem méně. Pomocná elektroda musí být elektrochemicky neaktivní a dobrým vodičem. Tyto vlastnosti splňuje platina a právě Pt drátek lze použít jako pomocnou elektrodu.

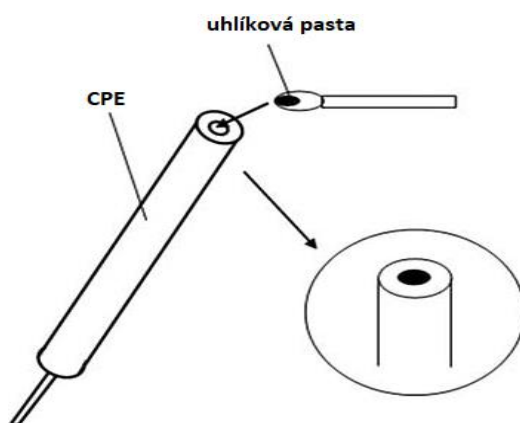
Obecně při návrhu nového typu biosenzoru je vždy potřeba zvážit jak vlastnosti samotného analytu, tak složitost matrice. U amperometrických biosenzorů se správnost výsledku odráží na typu pracovní elektrody, respektive na použitém materiálu k jejímu zhotovení [16]. Pracovní elektrodu lze považovat za jakési pomyslné jádro celého biosenzoru, jelikož na pracovní elektrodě je imobilizován enzym ADH a přenos elektronů se uskutečňuje na jejím povrchu. Na povrchu pracovní elektrody se udržuje konstantní potenciál a měří se protékající proud, přímo úměrný koncentraci ethanolu ve vzorku [16,27].

Z uhlíku se v průběhu posledních let stal jeden z nejvýznamnějších elektrodoých materiálů vůbec, a to zejména kvůli své chemické stabilitě, biologické kompatibilitě a vyhovujícím fyzikálně-chemickým vlastnostem [16]. Některé nové druhy (např. nanotrubičky a grafen) nabízejí navíc možnost využití vysoce účinných elektrokatalytických jevů i specifické vodivosti.

2.6.1 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda (*Carbon Paste Electrode; CPE*) se řadí do skupiny heterogenních elektrod, popř. senzorů. Standardní uhlíkovou pastu představuje dvousložková směs, skládající se z uhlíkového prášku a kapalného pojiva.

Uhlíková pasta definuje vlastnosti výsledné CPE, resp. typ použitého uhlíkového prášku či pojiva, způsob homogenizace, jejich vzájemný poměr a čistota. Po důkladném smíchání těchto dvou komponent se uhlíková pasta vnáší do elektrodoého pouzdra (viz schematické znázornění na Obr. 3) [28,29].



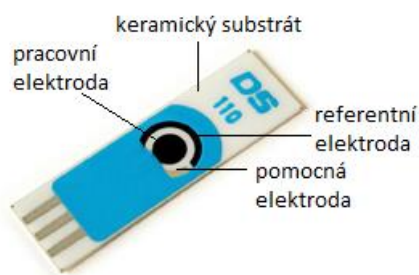
Obr. 3: Způsob plnění uhlíkové pastové elektrody (převzato z [30]).

Mezi největší pozitiva CPEs patří nízká pořizovací cena, široké potenciálové okno, nízké proudové pozadí, snadná příprava a především možnost modifikace [29]. Základní podmínkou každého pojiva je nemísitelnost s vodnými roztoky, nulová vodivost a chemická netečnost. Tyto vlastnosti splňují minerální a silikonové oleje [28].

Uhlík v pastě nejčastěji tvoří spektroskopický nebo přírodní (speciálně rafinovaný) grafitový prášek a nověji často i prášek ze skelného uhlíku. V poslední době jsou velmi populární také uhlíkové nanotrubičky [28], jimž je dále věnována samostatná kapitola.

2.6.2 Tištěné uhlíkové elektrody

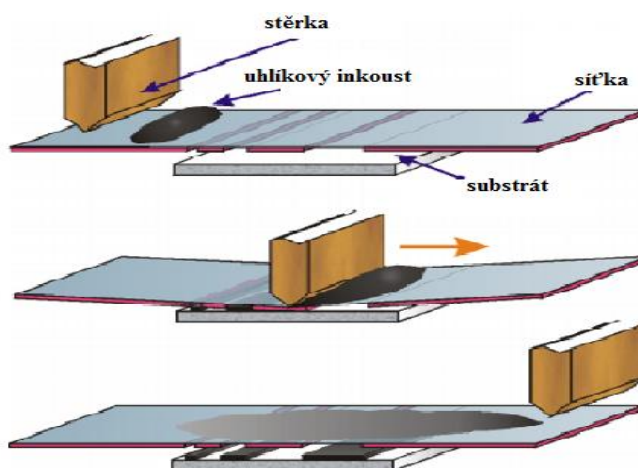
Sítotiskovou technologii lze označit za relativně moderní techniku, pomocí níž se vyrábějí miniaturizované, přenosné a vysoce citlivé elektrochemické senzory. Pracovní elektroda tištěných senzorů bývá často zhotovena z vodivého uhlíkového inkoustu, který představuje základní stavební kámen uhlíkových tištěných elektrod (*Screen-Printed Carbon Electrodes*; SPCEs). Obr. 4. zobrazuje komerčně dostupnou SPCE, kterou distribuuje španělská firma DropSens [31,32].



Obr. 4: Uhlíková tištěná elektroda (převzato z [33]).

Nemodifikovaný vodivý uhlíkový inkoust lze podobně jako uhlíkovou pastu označit za binární směs, rovněž obsahující uhlíkový prášek a pojivo. Nicméně pojivem bývá ve většině případů polymerní látka, rozpouštěná ve vhodném rozpouštědle. Zatímco u uhlíkových past se používají spíše olejovité látky [31,32].

Princip sítotisku detailně popisuje Obr. 5. V prvním kroku se uhlíkový inkoust nanáší na síťku. Po uvedení sítotisku do provozu tlačí stěrka inkoust ve směru pohybu a zároveň prohýbá síťku, přes kterou se protlačuje inkoust na substrát. Substráty bývají nejčastěji zhotoveny z keramických materiálů, plastu nebo ze skla [34].



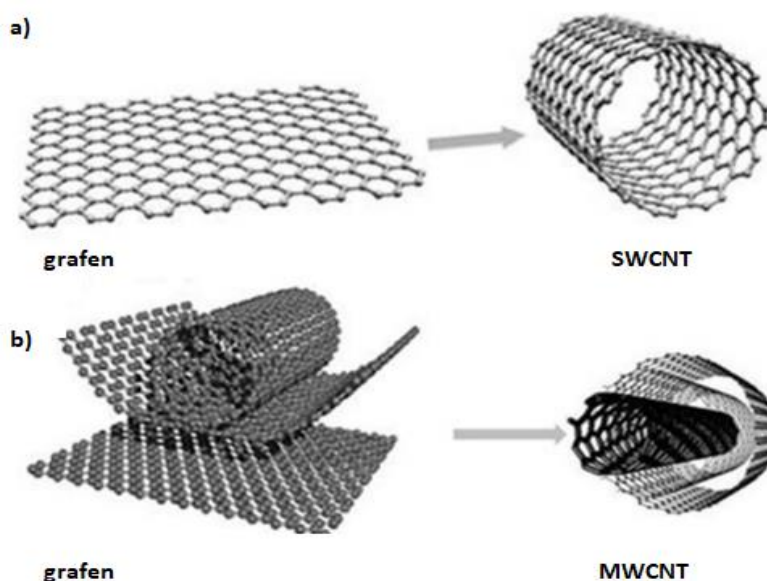
Obr. 5: Výroba SPCE (převzato z [34]).

2.6.3 Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky (*Carbon Nanotubes*; CNTs) se již záhy po objevu staly předmětem mnoha výzkumů a v posledních letech se těší veliké oblibě, a to především kvůli jedinečným vlastnostem, mezi které patří vyšší elektrická vodivost, nízká hmotnost, chemická inertnost, mechanická a termická stabilita. CNTs mají největší modul pružnosti ze všech známých materiálů vůbec. Z elektrochemických vlastností nelze opomenout vysokou povrchovou aktivitu, široké potenciálové okno a schopnost urychlovat přenos elektronu mezi elektrodou a elektroaktivní látkou. Konstelace těchto vlastností dělá z CNTs velice účelný elektrodový materiál [8,35,36].

Za největší nevýhodu CNTs bývá považována právě vysoká inertnost vůči organickým rozpouštědlům. Toto negativum limituje použití CNTs v mnoha odvětvích. Nicméně v současnosti se běžně provádí modifikace CNTs tzv. funkcionalizací. Většina takových metod je víceméně založena na rozplétání (původně) stočených trubic [37].

Grafen lze označit za základní stavební jednotku CNTs; ty se pak dle typu konstrukce dělí na jedностěnné uhlíkové nanotrubičky (*Single-Wall Carbon Nanotubes*; SWCNT) a víceštěnné uhlíkové nanotrubičky (*Multi-Wall Carbon Nanotubes*; MWCNT). SWCNTs (Obr. 6a) vznikají stočením grafenu do trubice. MWCNTs (6b) se skládají z několika stočených grafenových listů, soustředně vnořených do sebe. Směr a metoda použitá ke stočení grafenu má značný vliv na výsledné vlastnosti CNTs [35,36].



Obr. 6: Struktura SWCNT (a) a MWCNT (b) (převzato z [38]).

I dnes jsou CNTs stále populární a využívají se ke tvorbě elektrochemických senzorů, kde vystupují jako amperometrický transduktor a zároveň i imobilizační matrice, do které lze imobilizovat ADH. Imobilizaci lze provést například tzv. zesíťováním pomocí íglutaraldehydu a Meldolové modři, která katalyzuje oxidaci NADH, či užitím koloidního zlata společně s teflonem, který má roli nevodivého pojiva [8,39]. Jako pojivo lze použít chitosan, a to především díky své biokompatibilitě a dobrým adhezním vlastnostem, které zaručují rovnoměrné rozptýlení CNTs [40].

Tabulka 1 (na další straně) zobrazuje rozdílné typy ADH biosenzorů, vyhrazených pro kvantitativní stanovení ethanolu. Nicméně tyto biosenzory představují pouze část z celkového počtu konstruovaných ADH biosenzorů. Navíc se ustavičně testují a objevují nové modifikace pracovních elektrod a způsoby imobilizace ADH. Zlato či platinu lze rovněž použít jako materiál ke tvorbě amperometrických transduktorů [41]. Jak již bylo řečeno, téměř vždy je potřeba tyto elektrody modifikovat mediátorem, jelikož přímá oxidace NADH vyžaduje vysoké potenciálové hodnoty. Taktéž bez přítomnosti mediátoru podléhají oxidaci i ostatní elektroaktivní látky přítomné ve vzorku a dochází ke znečištění elektrody.

2.7 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (*Flow Injection Analysis, FIA*) je metoda založená na vstřikování kapalného vzorku do kontinuálního nosného toku. Vzorek se vstřikuje v přesně definovaných časových intervalech a známém objemu. Vstřikovaný vzorek tvoří zónu, která postupuje reakční cívkou směrem k detektoru, který nepřetržitě zaznamenává měřící veličinu [46]. Mísení vzorku probíhá na základě disperze a průtokový profil je laminární. Disperzi lze definovat jako poměr původní koncentrace (c_0) vstřikovaného vzorku a maximální detekované koncentrace (c_{\max}), viz rov. 4 [42].

$$D = c_0/c_{\max} \quad (\text{rov. 4})$$

Disperze roste se zvyšující se délkou reakční cívky, to vede ke snížení citlivosti a průtoku vzorku. Disperzi lze snížit navíjením reakční cívky.

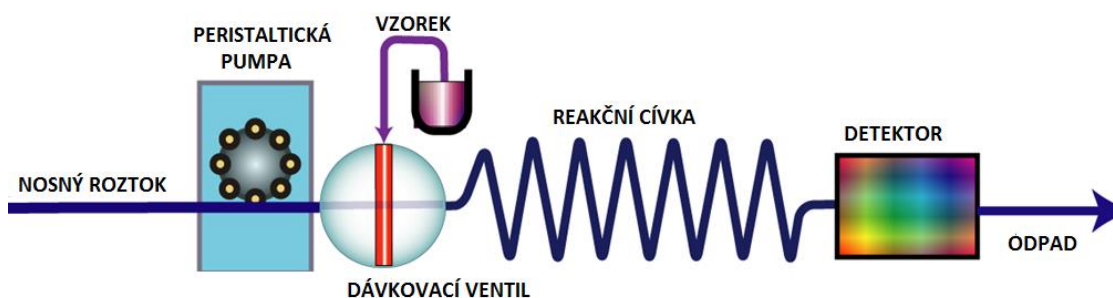
Tab. 1: Analytické parametry vybraných ADH biosenzorů určených pro stanovení ethanolu.

Elektrodový materiál	Lineární rozsah (mM)	Mez detekce (μM)	Odkaz
CPE/ADH/ZrO ₂	1-26	-	[5]
GCE/ADH/CA-TBO	0.01-0.4	5	[7]
GP/MWCNT/ADH/MB/	0.05-10	5	[8]
CCE/EG/ADH/dopamin	1-4	-	[9]
CCE/EG/ADH/BCB	1-13	-	[15]
CCE/EG/ADH/NB	1-22	-	[15]
SPCE/ADH/RhO ₂	326-2605	71.6	[17]
CPE/ADH/SiNBO/MB	0.01-10	8	[23]
MWCNT/ADH/Au _{coll} /teflon	0.02-1	4.7	[39]
MWCNT/ADH/teflon	0.1-1	32	[39]
GCE/MWCNT/ADH/chitosan	-	0.52	[40]
AuE/ADH/NiHCF	do 5	0.5	[41]
GCE/CNT/ADH/PVA	do 1.5	13	[73]
GCE/PVA/Ru(bpy) ₃ ²⁺ /ADH/sol-gel	0.025-50	10	[82]

Legenda: CPE; uhlíková pastová elektroda, GCE; elektroda ze skleněho uhlíku, CA; acetylcelulóza, TBO; toluidinová modř O, GP; grafitový prášek, MWCNT; vícevláknové uhlíkové nanotrubičky, MB; meldolova modř, CCE; keramická uhlíková elektroda, EG; exfoliovaný grafit, BCB; brilantní kresylová modř, NB; nilská modř, SPCE; uhlíková tisková elektroda, SiNBO; silikagel modifikovaný Nb₂O₅, Au_{coll}; koloidní zlato, AuE; zlatá elektroda, NiHCF; hexakyanoferrát nikelnatý, CNT; uhlíkové nanotrubičky, PVA; polyvinylalkohol.

Se vzrůstajícím objemem vzorku se zvyšuje výška píku, čímž se také zvyšuje citlivost. Souběžně s výškou píku roste i šířka píku, což vede ke snížení průchodnosti vzorku.

FIA analyzátor se skládá z peristaltické pumpy, dávkovacího ventilu, reakční cívky a detektoru, viz Obr. 7. Modernější přístroje obsahují autosampler.



Obr. 7: Instrumentace průtokového injekčního analyzátoru (převzato z [43]).

Mezi největší výhody FIA patří rychlá odezva (většinou méně než 1 minuta) s dobrou reprodukovatelností a vysokou vzorkovací frekvencí (100-300 vzorků za hodinu), menší spotřeba vzorku a reagensů, jednoduchá a relativně levná instrumentace [42].

Pomocí FIA lze pohodlně a rychle stanovit například koncentraci ethanolu, a to v celé řadě vzorků, včetně alkoholických nápojů. Nejčastěji se používá amperometrický transduktor na bázi SPCE, který má na své pracovní elektrodě imobilizovanou ADH, NAD^+ a mediátor. SPCE se umístí do průtočné cely, kde slouží jako amperometrický detektor. Vzorek obsahující ethanol se dávkuje šesticestným ventilem do reakční cívky a je unášen kontinuálním nosným tokem na detektor, kdy dochází ke generaci elektrického proudu, jenž se zaznamenává a následně vyhodnocuje.

3. Přehled analytických metod ke stanovení ethanolu

3.1 Alkoholické nápoje a ethanol

3.1.1 Pivo a příbuzné nápoje

Piva se nejčastěji rozdělují podle tří kritérií, a to dle barvy, stupňovitosti a způsobu kvašení. K výrobě piva se výhradně používají kvasinky rodu *Saccharomyces*. V praxi se používají dva kmeny těchto kvasnic, které pro přeměnu cukrů na alkohol vyžadují rozdílné pracovní podmínky, resp. odlišné teploty. Kvasnice spodního kvašení vyžadují teplotu 8-12 °C, zatímco kvasnice svrchního kvašení 15-25 °C. Spodně kvašené pivo (neboli "ležák") obsahuje zanedbatelné množství vedlejších látek, zatímco svrchně kvašené pivo ("ale") obsahuje významný podíl vonných látek (estery) a má typickou ovocnou až kořeněnou vůni. Oba zmíněné druhy zobrazuje Obr. 8 [44].



Obr. 8: Pivo typu ale a světlý ležák. Ilustrační foto (převzato z [45]).

S ía piva se ud áv á ve stupn íh, kdy 1 stupeň je přímo úměrný jednomu procentu extraktu původní mladiny, například „dvanáctka“ obsahuje 12 % extraktu mladiny. Piva se dle stupňovitosti nejčastěji dělí na lehké (max. 7 %), výčepní (8-10 %), ležák (11-12 %), speci áln í (min. 13 %) a portery (min. 18 %; viz [69]). Podle barvy lze pak pivo rozdělit na světlé, polotmavé a černé. U spodně kvašených piv platí, že čím černější barva tím sladší chuť, a to z důvodu použití karamelových sladů [44].

Je obecně známo, že pivo lze považovat za koloidní disperzn í syst ém, obsahuj í kromě ethanolu a vody značné množství dalších látek ovlivňující celkovou konzistenci a výslednou chuť piva. Nezanedbatelný vliv na chemické složení piva má však i druh použitého sladu a způsob sladování. Sacharidy obsažené v pivu vznikaj í enzymatickým rmutov áním sladu. V pivu lze detekovat frukt ózu, gluk ózu, malt ózu, maltotri ózu a dextriny. Pivo taktéž obsahuje některé polyfenolické sloučeniny, hořké látky pocházející z chmelu, barviva (melanoidy), glycerol, lipidy, heterocyklick ésloučeniny a vitamíny skupiny B [17,46].

3.1.2 V ína a vinn é n ápoje

V íno lze charakterizovat jako tradiční alkoholický nápoj, vyráběný kvašením hroznového moštu. Výroba vína začíná už na vinicích, kde se zralé hrozny vinn é révy sbíraj í a přepravuj í do v ýrobn y. B ílé hrozny se nejprve semelou a pot é putuj í do lisu, zat ímco modré hrozny se pouze drtí. U bílých vín se nechává kvasit mošt bez slupek, zatímco u červených vín kvas í mošt v přítomnosti slupek a tzv. třapin, které mu propůjčuj í charakteristickou červenou barvu. Po kvašení se zakalené víno čirí a filtruje. Následně se lahvuje, popřípadě zraje v sudech. Charakteristický vzhled červeného a bílého vína zobrazuje Obr. 9 [47-49].



Obr. 9: Červené a bílé víno. Ilustrační foto (převzato z [50]).

Víno lze označit za komplexní směs několika set sloučenin pocházející z hroznů, ať už se jedná o polysacharidy, polyfenolické sloučeniny, třísloviny, flavonoidy, vitamíny skupiny B a minerální látky jako Na, K, Ca, P, Mg, Fe a Mn. Obsah cukru v suchých vínech se pohybuje okolo 2 g/l. Množství výše zmíněných látek se v jednotlivých vínech liší, a proto lze každé víno považovat více či méně za jedinečné [48,49].

Červené a bílé víno se bude složením vždy znatelně lišit, například v červeném víně se nachází desetkrát více tříslovin a polyfenolických látek než v bílém. Celkové množství polyfenolických sloučenin v červeném víně se pohybuje v rozmezí 2000-6000 mg/l, vesměs se jedná o flavanoly, antokyaniny a resveratrol. Nicméně i vína stejné barvy mají odlišná složení, jelikož k výrobě se zpracovává vždy rozdílná odrůda révy rostoucí v odlišných klimatických podmínkách [48].

3.1.3 Destiláty a podobné lihoviny

Vodka, jakožto nejpopulárnější lihovinový nápoj v Rusku a Polsku, se vyrábí z ethanolu zemědělského původu, získávaného při kvašení brambor, obilovin nebo melasy. Prakticky lze použít libovolnou zemědělskou plodinu. Po kvašení se vyprodukovaný ethanol destiluje, aby se zajistila selektivní redukce organoleptických vlastností použité suroviny a vedlejších produktů vzniklých během kvašení. Vodka bývá častokrát považována za nejčistší alkohol vůbec, který každý výrobce destiluje do požadované a pro něj charakteristické podoby. Ilustrativní obrázek vodky znázorňuje Obr. 10 [51,52].



Obr. 10: Vodka – jedna z nejvíce prodávaných značek. Ilustrační foto (převzato z [53]).

Z chemického hlediska si vodku lze představit jako čistý destilovaný ethanol. Vodky, které se při výrobě destilují méněkrát, budou obsahovat více vedlejších látek charakterizující danou výrobní plodinu. To má za následek výraznější a osobitější chuť, i když takové vodky nebudou tak jemné jako ty, které byly destilovány

Dalším populárním destilátem je gin, který se produkuje především ve Velké Británii a Holandsku. Výroba ginu se může u jednotlivých producentů mírně lišit, ale většinou se vyrábí z ethanolu vzniklého při kvašení obilovin, který se destiluje v měděných destilačních kotlích. K vzniklému destilátu se vždy přidávají bobule jalovce a v některých případech i jiné rostlinné výtažky (např. pomerančová a citronová kůra, koriandr, lékořice, anýz...) a výsledná směs se opět destiluje [51,52]. V ginu lze identifikovat jalovcové monoterpeny, konkrétně nejhojněji zastoupený α -pinen a v menším množství myrcen, limonen a cymen [54].

Další známá lihovina, rum, se řadí mezi nejpopulárnější destiláty vůbec. Základní složkou každého rumu je cukrová třtina, ať už odpadní produkt vznikající při zpracování cukrové třtiny tzv. melasa nebo třtinová šťáva, popřípadě kombinace obou komponent. Nejčastěji se používá pouze melasa, ke které se přidávají kvasinky. Během kvašení dochází k přeměně cukrů na alkohol a dle typu použitých kvasinek i k produkci vedlejších látek s charakteristickou chutí jako například aldehydy či estery. Po kvašení se vzniklá kaše, obsahující zhruba 10 % alkoholu, destiluje a získává se čirá tekutina, která svojí typickou tmavou barvu nabývá až zráním v dřevěných sudech. Bývalý rum zraje v nerezových nádobách. V rumu se ve vyšších koncentracích vyskytují různé sloučeniny na bázi ethylesterů jako například ethylacetát, ethylpropanoát a ethylisobutyrát [52,55].

Na tomto místě je dlužno dodat, že tradiční český alkoholický nápoj, „tuzemský rum“ resp. „tuzemák“, který se vyrábí ze syntetického lihu, karamelu, rumové tresti a mezi nápoje typu rum nepatří. Tuzemský rum obsahuje větší množství ethylformiátu, který je podstatou výše zmíněné rumové tresti kvůli své typické rumové vůni. Obr. 11 zobrazuje tuzemský rum [51,55].



Obr. 11: Český rum alias „Tuzemák“.

Ilustrační foto (převzato z [56]).

Možná vůbec nejrozšířenější lihovina je "whisky" (resp. "whiskey"), původem ze Skotska a Irska, a právě tyto země jsou nejvýznamnějšími producenti tohoto destilátu. Obecně za whisky lze považovat jakoukoliv lihovinu připravenou z obilniny, která posléze dozrívá v dubových sudech. Nejpopulárnější skotská whisky se dělí na sladovou a obilnou. Sladová se připravuje z vody, ječmene a kvasinek. Ječmen se musí před kvašením sladovat, neboť obsahuje složitější škroby, které kvasinky nedokáží štěpit. Z tohoto důvodu se přidávají sladové amylázy, které rozkládají škrob na jednodušší cukry, jež jsou pro kvasinky mnohem stravitelnější [51,52].

Skotská whisky zraje minimálně tři roky v dubových sudech, a proto ve vyšší koncentraci lze detekovat látky absorbované ze dřeva. Při zpracování sladu vzniká mnoho fenolických sloučenin, zejména guajakol, eugenol a kresol [51,55]. Víceméně podobný proces podstupuje i obdobná írská whiskey.

3.2 Terénní testy na ethanol

Stupeň intoxikace ethanolem udává koncentrace alkoholu v krvi (*Blood Alcohol Concentration*, BAC). Ve většině zemí je 0.08 g alkoholu ve 100 ml krve považováno za hraniční hodnotu BAC, při které je řidič oprávněn řídit vozidlo. Nicméně Česká republika jako jedna z mála evropských zemí stále uplatňuje nulovou toleranci [57,58].

BAC lze stanovit invazivním a neinvazivním způsobem. Za invazivní způsob se považuje odběr krve, vykonávaný ve zdravotnických zařízeních. Mezi neinvazivní metody patří určování obsahu ethanolu v dechu, moči či slinách [57].

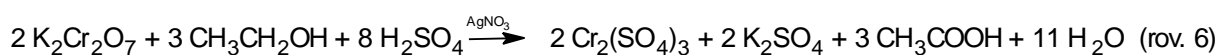
Stanovení BAC v dechu lze označit za levnou, rychlou a vysoce jednoduchou metodu, která se provádí pomocí tzv. alkoholových testerů. V momentě, kdy testovaná osoba vdechuje vzduch do testeru, měří se koncentrace alkoholu v dechu (*Breath Alcohol Concentration*, BrAC), která koreluje s BAC. Hodnota BrAC je zhruba 2000x nižší než u stejného objemu krve, tudíž při jakémkoli srovnání mezi oběma koncentracemi musí být BrAC násobena tzv. BBR (*Blood Breath Ratio*) faktorem, viz rov. 5 [57,58].

$$\text{BAC} = \text{BrAC} \times 2300 \quad (\text{rov. 5})$$

Alkoholový tester na bázi palivového článku lze v současnosti označit za nejhojněji používaný. Toto označení dostal především kvůli schopnosti stanovit BAC s vysokou přesností a navíc vykazuje vysokou specifitu vůči ethanolu, tudíž výslednou BAC neovlivňují

interferující látky obsažené ve vydechovaném vzduchu. Tester se skládá z kyselého elektrolytu, jenž se nachází mezi dvěma Pt elektrodami. Po vdechnutí vzduchu do náustku dochází k oxidaci molekul ethanolu na kyselinu octovou při současně produkci elektrického proudu. Produkovaný elektrický proud závisí na počtu volných elektronů vznikajících při oxidaci ethanolu. Zabudovaný mikroprocesor měří vznikající proud a stanovuje hodnotu BrAC, která se konvertuje na ekvivalentní hodnotu BAC [57].

V této kapitole nelze opomenout známé **detekční trubičky**, využívající klasické reakce na principu oxidace ethanolu dichromanem v kyselém prostředí, které jsou určeny pro semikvantitativní stanovení BAC. Testovaná osoba vdechuje vzduch do skleněné detekční trubičky, ve které je zatavena H_2SO_4 společně s $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a dochází k reakci, viz rov. 6.



Po vdechnutí vzduchu molekuly ethanolu ochotně reagují s oxidačním činidlem ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a dochází k oxidaci na kyselinu octovou při současně redukci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ na $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$. Redukci Cr^{VI} na Cr^{III} doprovází barevná změna z oranžové barvy na zelenou. Obr. 12 znázorňuje situaci, kdy jsou z balónku uvolňovány páry ethanolu (12a) a dochází ke zmíněné reakci a barevnému přechodu (12b).



Obr. 12: Detekční trubička na alkohol. Před (a) a po (b) použití (převzato z [59]).

S rostoucí BAC roste intenzita zeleného zbarvení a délka vznikajícího zeleného sloupce. Dle barevné změny lze rozhodnout, zdali je testovaná osoba pod vlivem alkoholu či nikoliv. Některé detekční trubičky obsahují navíc AgNO_3 , který funguje jako katalyzátor [57,60].

BAC lze rovněž stanovit pomocí infračerveného analyzátoru, tzv. intoxylizeru. Tato technika se často používá na policejních stanicích, a to především kvůli extrémní přesnosti a vysoké specifitě.

Jako zdroj záření se výhradně používá křemenová lampa generující širokopásmové infračervené paprsky o různých vlnových délkách. Paprsky prochází kyvetou a následně jsou skrze čočku fokusovány na rotující filtrační kolo, jež obsahuje úzkopásmové filtry specifické pro vlnové délky ethanolových vazeb (C–O, C–C, C–H, O–H). Světlo procházející filtrem bývá detekováno fotonásobičem, kdy dochází k vytváření elektrických impulsů, které zabudovaný mikroprocesor interpretuje a na základě absorpce infračerveného záření potom určuje i výslednou hodnotu BAC [57,60].

3.3 Přehled metod pro identifikaci a stanovení ethanolu s využitím moderních instrumentálních technik

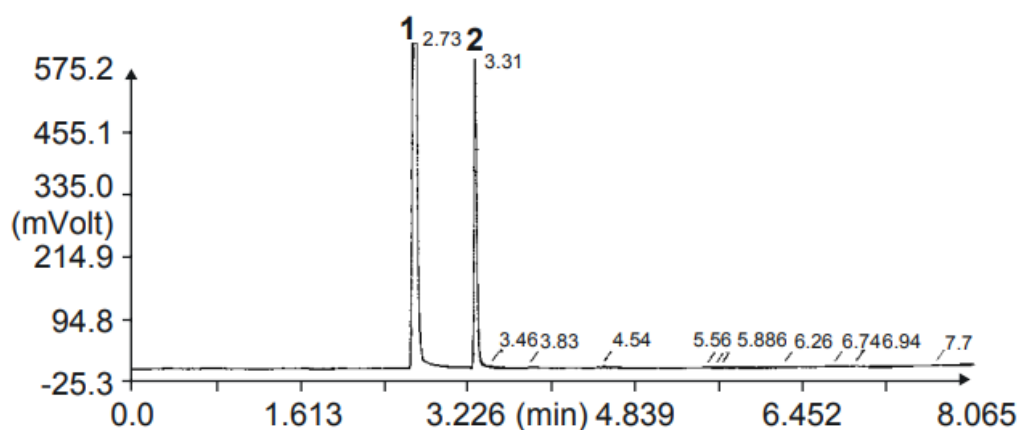
Pro stanovení ethanolu a jiných alifatických alkoholů byla dosud vyvinuta řada analytických metod, z nichž hned několik se hojně používá v praxi. Mezi nejčastěji využívané patří ty, jež využívají chromatografické techniky, ať už je to plynová či vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Nověji se ke stanovení používá i kapilární elektroforéza, refraktometrie a spektroskopická měření, jmenovitě infračervená spektrometrie a příbuzná Ramanova spektroskopie. Za jistou nevýhodu všech výše uvedených metod lze považovat vysoké pořizovací ceny přístrojů, jejich složitější konstrukce a někdy i značně zdlouhavé analýzy, neboť v některých případech je třeba přecistit či zakoncentrovat vzorek [51].

3.3.1 Plynová chromatografie

Pro analýzu alkoholických nápojů lze plynovou chromatografií (*Gas Chromatography*, GC) označit za vysoce sofistikovanou a zřejmě i nejefektivnější metodu. Ethanol a alkoholy obecně vystupují jako těkavé komponenty a právě pro analýzu takových látek je GC první volbou. Tato separační technika vyniká vysokým rozlišením a je i dostatečně citlivá, což umožňuje během jedné analýzy identifikovat větší množství složek přítomných v analyzovaném vzorku [51]. Důležitým faktorem, jenž ovlivňuje přesnost a správnost měření je výběr vhodné separační kolony a stacionární fáze.

Obecně platí, že stacionární fáze by měla mít obdobné vlastnosti jako analyt, tudíž pro stanovení ethanolu v alkoholických nápojích by se měla používat stacionární fáze polárního charakteru. Typickým příkladem separační kolony pro analýzu ethanolu a jiných alkoholů je vysokoporézní polární mikrokolona značky CPWax o délce 30 m a průměru 0.5 mm, tyto rozměry výrazně zvyšují citlivost dané separace.

Za největší výhodu této kolony lze považovat vysokou odolnost vůči vodě, resp. vodným roztokům. Analýza alkoholických nápojů se většinou provádí metodou vnitřního standardu, kdy se ke vzorku přidává známý objem tzv. vnitřního standardu, při stanovení ethanolu v alkoholických nápojích se nejhojněji používá acetonitril, jelikož se nevyskytuje v žádném typu alkoholického nápoje. Za použití výše zmíněné kolony se jako mobilní fáze používá čistý dusík, jenž unáší vzorek s vnitřním standardem skrze stacionární fázi na plamenově-ionizační detektor. Principiálně eluovaná molekula ethanolu hořív plamenu a vznikají ionty mění ionizační proud vodíkového plamínku. Záznam z plynové chromatografie, naměřený za výše zmíněných podmínek separace a detekce zobrazuje Obr. 13, kdy pík 1 odpovídá ethanolu ve whisky a pík 2 acetonitrilu, zbylé (neočíslované) mnohonásobně menší píky odpovídají ostatním alkoholům a interferentům přítomným v analyzované whisky [61].



Obr. 13: Typický chromatogram vzorku whisky. Exp. podmínky: GC-FID, separační kolona – CPWax 58 CB, nosný plyn – dusík (převzato z [61]).

V situaci, kdy alkoholický nápoj obsahuje výrazné množství jiných alkoholů lze použít srovnávací metodu, kdy se připraví modelová směs obsahující očekávané alkoholy o známé koncentraci. Po proměření modelové směsi a vzorku lze na základě porovnání retenčních časů složek modelové směsi a vzorku identifikovat jednotlivé alkoholy a z ploch píků vypočítat jejich obsah.

Další možností ke stanovení ethanolu v alkoholických nápojích je metoda, při které se stanovuje ethanol a voda. Pro detekci vody se výhradně používá tepelně-vodivostní detektor, popř. ionizační detektor, jenž produkuje energii vyšší než 12,6 eV (ionizační energie vody). Jako separační kolona se používá mikrokolona modifikovaná vhodnou iontovou kapalinou, tzn. polární sloučeninou s vysokou afinitou vůči molekulám obsahující vodíkovou vazbu.

Často se používají iontové kapaliny na bázi polyethylenglykolu obsahující imidazolový kruh. Pro dosažení komplexnějších výsledků měření se GC spojuje s hmotnostním spektrometrem ve funkci detektoru. V ýhodou kombinace GC-MS je rychlá identifikace jednotlivých složek alkoholického nápoje, na základě srovnání naměřeného hmotnostního spektra s knihovnou spekter [62,63].

Při použití GC-MS se komponenty alkoholického nápoje separují výhradně na mikrokolónách se stacionární fází na bázi polyethylenglykolu. Převod neutrálních molekul analytu na nabitě částice se provádí elektronovou ionizací. K separaci vzniklých iontů na základě m/z dochází nejčastěji v tradičním kvadrupólovém analyzátoru, jenž bývá pro analýzu alkoholických nápojů ve většině případů zcela dostačující. Pro získání hmotnostního spektra s vyšším rozlišením a tudíž s vyšší vypovídací schopností se kvadrupólový analyzátor často nahrazuje za analyzátor doby letu [63,64].

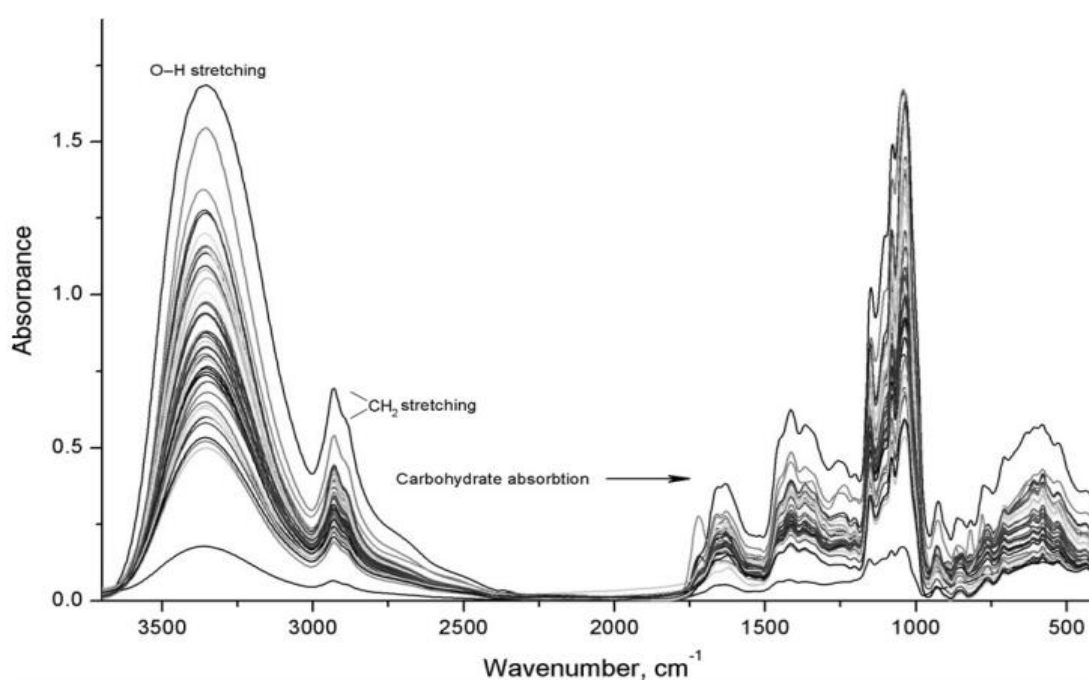
3.3.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a Ramanova spektroskopie

Nespornou výhodou spektroskopických metod je to, že vzorky lze analyzovat bez jakýchkoliv předchozích úprav a v některých případech dokonce i v původním obalu / láhvi, což platí i pro vzorky s obsahem ethanolu a jiných alkoholů v lihovinách [65]. Ke stanovení ethanolu se nejčastěji používají infračervené spektroskopické metody, kam patří i příbuzná Ramanova spektroskopie. Na popularitě nabývají přenosné Ramanovy spektrometry, které snižují pořizovací cenu v porovnání s obvyklými laboratorními sestavami a umožňují provádět analýzy v terénu [65,66].

V poslední době při analýze lihovin jednoznačně převládá infračervená spektroskopie FTIR (z angl. Fourier Transform InfraRed), což je de facto interferometrie s Fourierovou transformací a citlivým IČ-detektorem. V současnosti se využívá i vícesložková analýza s použitím FTIR spektrometrů, speciálně vyvinutých i pro analýzu alkoholických nápojů, umožňující simultánní analýzu více než deseti sloučenin obsažených např. ve víně, pivu a lihovinách; samotná analýza je hotova do 2 min. U lihovin není vyžadována předpříprava a lze je analyzovat přímo. Nápoje obsahující CO_2 musí být před samotnou analýzou odplyněny. Po analýze se celý systém automaticky proplachuje vestavěným čistícím systémem [64,65].

Za použití FTIR spektrometru určeného výhradně pro analýzu alkoholických nápojů bývá ve většině případů skenovaná celá nebo vybraná část střední IČ oblasti (rozsah vlnočtů v intervalu hodnot 500–5000 cm^{-1}) [67].

K analýze alkoholických nápojů se používají výhradně dva typy FTIR spektrometrů lišící se typem detektoru. Prvním typem je FTIR spektrometr obsahující vysoce citlivý detektor na bázi modifikovaného triglycin sulfátu a křemíkovou destičku, na kterou se dává vzorek. Po nadávkování vzorku je destička automaticky transportována do optické oblasti přístroje, čímž započne proces měření. Výsledný změřený záznam (tzv. interferogram) podléhá složité matematické operaci, Fourierově transformaci. Modelové absorpční spektrum naměřené FTIR spektrometrem v tomto režimu nabízí Obr. 14 [67,68].



Obr. 14: Absorpční FTIR spektra několika druhů pív (převzato z [68]).

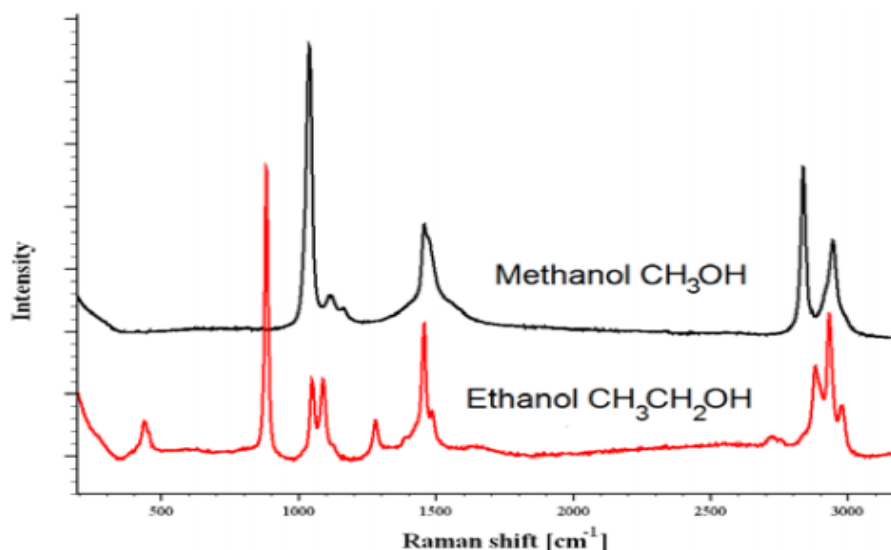
Druhou skupinu FTIR spektrometrů určenou k analýze alkoholických nápojů tvoří interferometry s detektorem na bázi telluridu rtuti a kadmia. Takovýto spektrometr pracuje v tzv. odrazovém režimu, kdy dochází k odrazu paprsku na rozhraní vzorku a krystalu. Pro stanovení alkoholů se nejčastěji používá krystal utvořený ze selenovího, arsenovího a germaniovího skla. Některé speciální interferometry tohoto typu dokáží ze vzorkového spektra eliminovat spektrální oblasti odpovídající absorpci vody, což výrazně ulehčuje následnou interpretaci [68].

Ramanova spektroskopie, což je technika úzce příbuzná s IČ-spektrometrií, vešla do širšího povědomí během tzv. methanolové aféry v roce 2012, kdy na území České republiky

došlo k sérii otrav způsobených pančováním lihovin technickým methanolem. Celá událost, která nabyla nevyvalých rozměrů, vyvrcholila prohibicí zakazující prodej veškerých lihovin s vyšším obsahem alkoholu než 20 %. Ramanova spektroskopie rovněž umožňuje provádět měření skrze transparentní obalové materiály, což je znatelná výhoda oproti technikám GC/FID a GC/MS [69].

Pro analýzu alkoholických nápojů se používají zejména dva typy Ramanových spektrometrů lišící se zdrojem záření. Lze použít argonový či NIR diodový laser o vhodných vlnových délkách a výstupním výkonu. Obecně platí, že přesnější výsledky přináší spektrometr s NIR diodovým laserem při vlnové délce 785 nm a výkonu 300 mW [69].

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze v příslušné lihovině rozlišit nejrůznější alkoholy. Prvně se proměří jednotlivé očekávané alkoholy a zaznamenávají se naměřená spektra. Po proměření vzorku se provádí konfrontace se standardy, buď naměřenými, nebo i předem uloženými v digitální databázi. Hledají se totožné pásy, jež odpovídají jednotlivým alkoholům a které lze navzájem porovnávat. Na ukázkou Obr. 15 zobrazuje spektrum pro směs ethanolu a methanolu, z něhož je patrný charakteristický pás pro ethanol při tzv. Ramanově posunu 880 cm^{-1} a pro methanol při 1035 cm^{-1} [63,69].



Obr. 15: Ukázková Ramanových spekter ethanolu a methanolu (převzato z [63]).

Nicméně Ramanovu spektroskopii nelze použít k analýze všech alkoholických nápojů, neboť bylo zjištěno, že uhlovodíky přítomné ve vzorcích whisky či ginu výrazně přispívají k intenzitě C–H pásů a tak na molekule ethanolu dochází pouze k částečnému rozptylu záření (viz např. [63]).

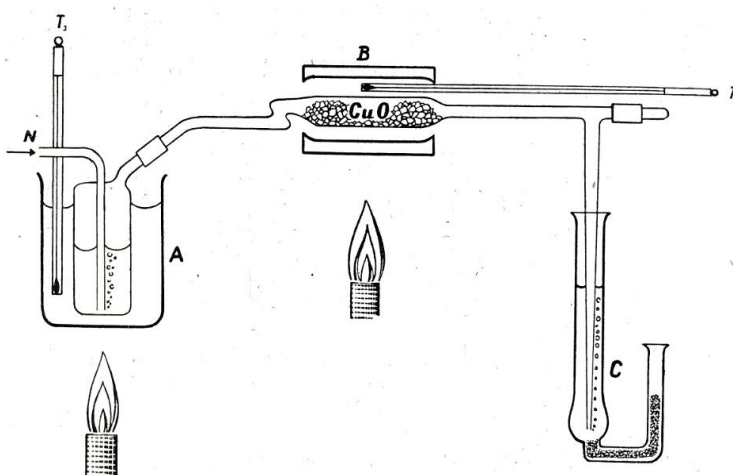
3.3.3 Další techniky a postupy

Mezi dnes již klasické techniky se řadí denzimetrické metody. U nich vlastní měření předchází destilační krok, umožňující izolaci přítomného ethanolu, jehož zastoupení ve vzorku se následně zjistí pomocí pyknometru nebo elektrického denzimetru. Za značnou nevýhodu této metody lze považovat časovou a pracovní náročnost [65,70].

V práci [71] byla navržena fluorimetrická enzymatická metoda pro stanovení ethanolu v alkoholických nápojích. Tato metoda je založena na schopnosti ADH vnitřně fluoreskovat. Vnitřní fluorescence je způsobena aminokyselinovými zbytky obsaženými v molekule ADH (především tyrosin a tryptofan). V momentě, kdy byl k roztoku obsahující ADH přidán kofaktor NAD^+ a vzorek, došlo k významnému poklesu vnitřní fluorescence. Z tohoto poklesu se následně vypočítává obsah ethanolu v alkoholickém nápoji [71].

3.4 Přehled elektrochemických a elektroanalytických metod ke stanovení ethanolu

V této části nelze opomenout dnes již raritní, avšak na svou dobu vysoce efektivní techniku, jež navrhli Heyrovský a Šorm. Příslušný postup vychází z oxidace ethanolu na acetaldehyd a methanolu na formaldehyd ve speciální aparatuře; viz Obr. 16 [72].

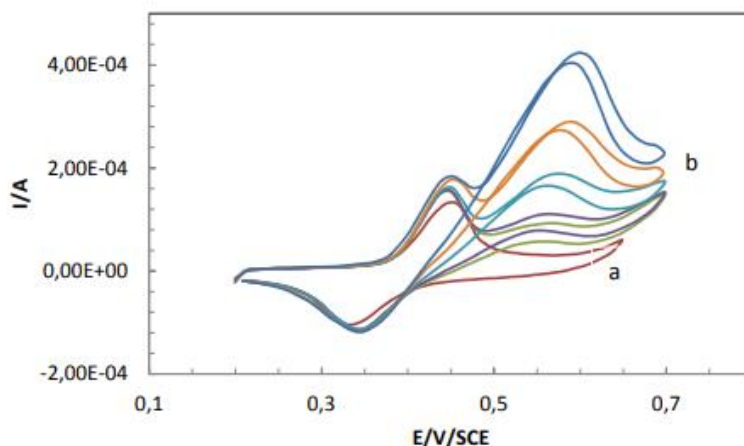


Obr. 16: Aparatura určená k oxidaci alkoholů (převzato z [72]).

Tekutina obsahující alkohol se vpraví do promývačky, která se umístí do kádinky s vodou (A) a teplota lázně se udržuje při $70\text{ }^\circ\text{C}$. Následně jsou páry alkoholu unášeny proudem dusíku skrz CuO (B), vyhřátý na $230\text{--}250\text{ }^\circ\text{C}$ a oxidují alkohol na příslušné aldehydy, jež jsou zachycovány v nádobce s roztokem $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C), v němž se pak polarograficky stanovují. Při dodržení daných podmínek je vlna acetaldehydu vždy 5x vyšší než vlna formaldehydu [72].

Nicméně většina elektrochemických metod sloužících ke stanovení ethanolu je založena na různorodých modifikacích pracovních elektrod. Existuje nespočet publikací zabývajících se touto problematikou, kdy se vesměs testuje jeden typ modifikace aplikovaný na různé elektrody (mimo jiné: GCE [73], CPE [5], SPCE [17]...) a porovnávají se výsledné vlastnosti, nejčastěji pomocí cyklické voltametrie. V porovnání výše zmíněnými metodami a postupy využívající pokročilou instrumentaci bývají elektrochemické metody jednoduché, rychlé a až řádově levnější.

Například elektrodu ze skelného uhlíku (GCE) lze modifikovat oxidy niklu, které katalyzují elektrooxidaci alkoholů. Modifikace se provádí ve dvou následných krocích, kdy nejprve proběhne elektrodepozice niklu na povrch GCE z pokovovací lázně o složení $\text{NiCl}_2 + \text{H}_3\text{BO}_3$. Ve druhém kroku se vyloučený kovový depozit anodicky oxiduje v NaOH a voltamogram, zaznamenaný v tomto kroku, je charakterizován anodickým a katodickým píkem, patřící redoxnímu páru $\text{NiOOH}/\text{Ni}(\text{OH})_2$. Takto připravenou elektrodu lze použít pro katalytické stanovení ethanolu, ale také 2-propanolu a 1-butanolu [74,75]. Stanovení ethanolu tímto způsobem znázorňují cyklické voltamogramy na Obr. 17.

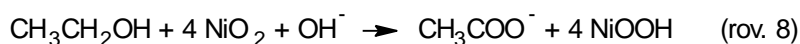
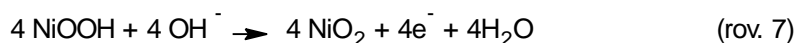


Obr. 17: Cyklické voltamogramy během oxidace ethanolu v 0.1 M NaOH (převzato z [75]).

V nepřítomnosti ethanolu lze zaznamenat anodický a katodický pík $\text{NiOOH}/\text{Ni}(\text{OH})_2$ (křivka **a**), který se během stanovení ztelně nemění. Na nemodifikované GCE není ethanol elektroaktivní, ovšem stává se oxidovatelný na modifikované GCE (**b**).

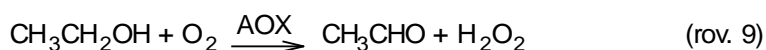
Druhý anodický pík křivky "**b**" odpovídá NiO_2 a zvyšuje se s rostoucí koncentrací ethanolu, zatímco první anodický pík zůstává téměř konstantní, jelikož $\text{Ni}(\text{OH})_2$ se neúčastní oxidace ethanolu [74,75].

Na základě tohoto zjištění byl navržen mechanismus, kde NiO₂ katalyzuje oxidaci ethanolu. Vychází se z toho, že množství NiOOH spotřebovaného na formaci NiO₂ (rov. 7) je přímo úměrné množství NiOOH vzniklého při redukci NiO₂ za současné oxidaci ethanolu (rov. 8) [74,75].



V průběhu posledních let se však stále více uplatňují enzymem modifikované elektrody, kdy stanovení ethanolu umožní enzym ADH a jeho (bio)katalytická funkce při oxidaci molekuly CH₃CH₂OH [12].

Nicméně v této části nelze opomenout možnost tvorby biosenzoru na bázi enzymu alkoholoxidázy (*Alcohol Oxygenase*; AOX). V době, kdy ještě nebyl rozšířen trend tištěných a pastových elektrod, se hojně produkovaly biosenzory tvořené kyslíkovou elektrodou. Právě kyslíková elektroda modifikovaná enzymem AOX sloužila a v některých případech stále slouží jako cenný nástroj pro určení obsahu ethanolu v alkoholických nápojích. Kyslíková elektroda obsahuje polopropustnou membránu, skrze kterou difunduje kyslík. Na tuto membránu se imobilizuje enzym AOX, který během oxidace ethanolu spotřebovává kyslík. Při kontaktu s alkoholickým nápojem probíhá oxidace ethanolu dle rovnice číslo 9. Principiálně se měří úbytek proudu, jenž je přímo úměrný koncentraci ethanolu [12,76].



Preferovanější a sofistikovanější způsob tvorby biosenzoru využívá společné uskupení enzymu ADH se svým kofaktorem NAD⁺ a ve většině případů i s přidavkem mediátoru. Vesměš takto konstruované biosenzory využívají elektrochemické vlastnosti kofaktoru, kdy se při oxidaci ethanolu současně produkuje jeho redukovaná forma a proud potřebný na její reoxidaci je přímo úměrný koncentraci ethanolu v alkoholickém nápoji [12].

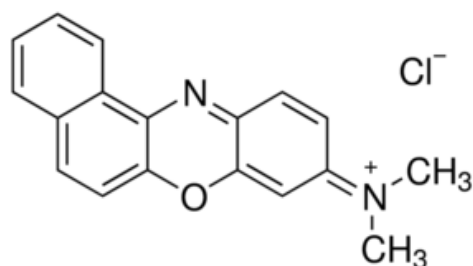
V druhé polovině XX. století, kdy se na povrch dostávaly první zprávy týkající se uspokojivých elektrochemických vlastností kofaktoru (schopnost elektrooxidace), se začaly hromadně produkovat různě modifikované alkoholdehydrogenázové biosenzory sloužící k amperometrickému stanovení ethanolu v různých vzorcích, vč. alkoholických nápojů [77].

Prvně konstruované ADH biosenzory vykazovaly nízkou citlivost a nelineární odezvu, neboť prováděné způsoby imobilizace nebyly dostatečně efektivní. Na tu dobu nejúspěšnější imobilizační technika spočívala v zachycení ADH a NAD⁺ na povrchu celulózové membrány.

Nízká citlivost výsledného biosenzoru se řešila přidáváním enzymu či kofaktoru do analyzovaného vzorku [77].

V významný pokrok nastal v roce 1974, kdy byla v práci [78] molekula NAD^+ společně s ADH navázána na tzv. nosič utvořený z polyethyleniminu a dextranu, což umožnilo neomezenou interakci mezi kofaktorem a enzymem, čímž došlo k výraznému zvýšení citlivosti. Taktéž bylo zjištěno, že po přidání mediátoru (derivát fenazinu) dochází k urychlení přenosu elektronů mezi elektrodou a analytem a rovněž reoxidace NADH vyžaduje nižší potenciálové hodnoty. Po tomto zjištění se začaly konstruovat ADH biosenzory podobné těm dnešním, kdy nejzásadnější typy jsou uvedeny níže [77,78].

Vysoce selektivní amperometrický ADH biosenzor byl popsán v práci [79], kde ke konstrukci biosenzoru byla použita SPCE s pracovní elektrodou modifikovanou ADH, NAD^+ a Meldolovou modří rozpuštěnou v Nafionu. Imobilizace byla provedena za použití glutaraldehydu, kdy došlo k vytvoření mezimolekulární kovalentní vazby mezi karbonylovou skupinou glutaraldehydu a volnou aminoskupinou NAD^+ a ADH [79]. Strukturální vzorec Meldolovy modří zobrazuje Obr. 18.



Obr. 18: Strukturální vzorec Meldolovy modří (převzato z [80]).

V této práci bylo zjištěno, že Meldolova modř katalyzuje oxidaci NADH na NAD^+ při velmi nízkém potenciálu (-0,17 V vs SCE), což zabraňuje možné oxidaci dalších elektroaktivních látek přítomných ve vzorku, v tomto případě krevním séru. Na základě zjištěných informací lze Meldolovu modř považovat za vysoce účinný mediátor. Za použití takto připraveného biosenzoru byl měřen obsah ethanolu v krevním séru člověka pod vlivem alkoholu. Z výsledků měření byla zjištěna koncentrace ethanolu odpovídající hodnotě 0.79 ± 0.02 mmol/l [79]. Na základě zjištěných informací lze konstatovat, že takto citlivý a selektivní ADH biosenzor by mohl najít uplatnění při analýze nízkoalkoholových nápojů se složitější maticí, popřípadě pro stanovení možného ethanolu v nealkoholických pivech.

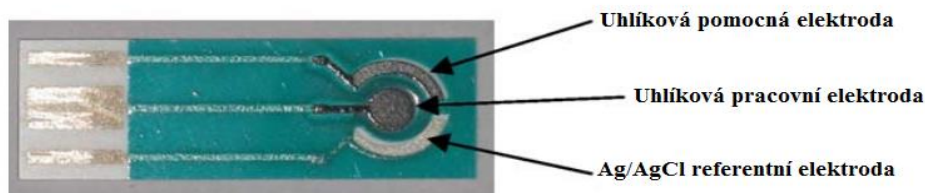
V další práci [81] byl konstruován amperometrický ADH biosenzor vhodný pro stanovení ethanolu ve vzorcích o velmi malých objemech (až do 5 μl). Sítotiskovou metodou byla na očištěný keramický substrát tištěna směs tvořená uhlíkovými vícestěnnými

nanotubicemi, zlatými nanočásticemi a Nafionem. Takto vytvořená pracovní elektroda byla překryta ADH, NAD^+ a Meldolovou modří. Měření jednotlivých vzorků bylo prováděno za použití chronoamperometrie, kdy byl s dostatečnou přesností stanoven ethanol v krevním séru. Nicméně se předpokládá funkčnost ve všech typech vzorků obsahujících ethanol [81].

Ve většině publikací zabývajících se ADH biosenzorem byl pro konstrukci použit elektrodový materiál na bázi uhlíku. To potvrzuje fakt, že z uhlíku se v průběhu posledních let stal jeden z nejvýznamnějších elektrodových materiálů vůbec. Nicméně v některých pracích byly použity i konvenční elektrody. Např. ve vědecké práci [41] byl ADH imobilizován na zlatou elektrodu, jejíž povrch byl modifikován filmem z $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. Imobilizace ADH a NAD^+ byla prováděna zesíťováním za použití glutaraldehydu s přidavkem inertní bílkoviny (hovězí sérový albumin), a to z důvodu zvýšení aktivity enzymu [41].

Trendem poslední doby jsou vysoce citlivé ADH biosenzory založené na elektrogenované chemiluminiscenci. Chemiluminiscenční činidlo ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) a ADH lze imobilizovat do sol-gel hybridního filmu. Do tohoto filmu se také přidává kopolymer polyvinylalkohol s 4-vinylpyridem a Nafionem, za účelem udržení aktivity enzymu ADH a imobilizaci $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [82].

Jiným příkladem je biosenzor na bázi SPCE/ADH/ RhO_2 , popsáný v práci [83]. Základem elektrody zhotovené s fotiskovou technologií byl keramický substrát s natištěnou směsí uhlíkového inkoustu a RhO_2 . Po vytvrzení byl na povrch pracovní elektrody nanesen enzym společně s kofaktorem a elektroda byla následně ponořena do roztoku *m*-fenylendiaminu, glutaraldehydu, NAD^+ , fosfátového pufru a byla provedena elektropolymerizace. V režimu FIA při detekčním potenciálu +0,35 V a průtokové rychlosti 0,5 ml/min byly pak analyzovány vzorky vodky a whisky [83]. Obr. 19 zobrazuje možný typ laboratorně připraveného ADH biosenzoru na bázi SPCE, kdy základem je keramická destička, na kterou se sítotiskovou technologií tisknou jednotlivé elektrody.



Obr. 19: Laboratorně připravený ADH biosenzor (převzato z [81]).

Právě posledně zmíněná konfigurace byla inspirací i východiskem ke studii provedené v rámci této diplomové práce, přičemž většina podmínek a parametrů byla přizpůsobena našim konkrétním potřebám a použité instrumentaci.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Příprava a charakterizace amperometrického biosenzoru

4.1 Potřebné komponenty k přípravě amperometrického biosenzoru

Uhlíkový inkoust	Gwent Group, Pontypool, Velká Británie
Grafen	ACS Material, LLC, Medford, USA
Vícestěnné uhlíkové nanotrubičky	Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd. Shenzhen, Čína
Dimethylformamid	Penta, Chrudim, ČR
RhO ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Alkoholdehydrogenáza z <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Nikotinamid adenin dinukleotid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Nafion	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Komerční tiskovaná uhlíková elektroda – DS-150	DropSens, Llanera, Španělsko

4.2 Použité chemikálie

Ethanol, 96%	Lach-Ner, Neratovice, ČR
Methanol, >99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Propanol, >99%	Penta, Chrudim, ČR
Octan ethylnatý, >99%	Penta, Chrudim, ČR
KH ₂ PO ₄	Spolana, Neratovice, ČR
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	J.T.Baker, Deventer, Nizozemsko
NaOH	J.T.Baker, Deventer, Nizozemsko
H ₃ PO ₄ , 85%	Penta, Chrudim, ČR

4.3 Použité alkoholické nápoje

Bílé víno Pálava	Znovín Znojmo, ČR
Pivo Primátor 24 °	Pivovar Primátor, Náchod, ČR
Nealkoholické pivo Birell	Pivovar Radegast, Nošovice, ČR
Vodka Božkov	Stock Plzeň, Plzeň, ČR
Rum Liberté	Saint Lucia Distillery, Lidl, ČR
Domácí slivovice	

4.4 Příkladové vybavení

pH metr	inoLab pH 720
Potenciostat	Autolab – PGSTAT12
Pracovní elektroda	tištěná uhlíková elektroda (SPCE)
Referenční elektroda	argentchloridová (Ag/AgCl/3.0 M KCl)
Pomocná elektroda	platinový drátek (PtE)
Přenosný Ramanův spektrometr	Mira DS

4.5 Použité instrumentální techniky

Cyklická voltametrie (CV)
Průtoková injekční analýza (FIA)
Ramanova spektroskopie

4.5.1 Použitý elektrolyt

0.1 M fosfátový pufr o pH 8.5, připravený z $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a KH_2PO_4

4.5.2 Parametry cyklické voltametrie

Potenciálový rozsah	od -0,4 V do +1,2 V
Potenciálový skok	2,5 mV
Skenovací rychlost	10 mV/s
Počet cyklů	2

4.5.3 Parametry průtokové injekční analýzy

Průtoková rychlost	1,6 ml/min
Detekční potenciál	0,2 V

4.5.4 Parametry Ramanovy spektroskopie

Energie laseru	50 mW
Integrační čas	1 s
Počet skenů	5

4.6 Výběr amperometrického převodníku

Na úvod je důležité zmínit, že v této experimentální části byl na základě publikované vědecké práce [83] použit biosenzor typu SPCE/ADH/RhO₂. Nicméně dílčí podmínky a parametry byly přizpůsobeny našim potřebám.

Prvotním úkolem bylo navrhnout typ amperometrického převodníku modifikovaného RhO₂, respektive zvolit vhodný elektrodový materiál utvářející pracovní elektrodu daného převodníku. Testovány byly 3 amperometrické převodníky lišící se složením pracovní elektrody.

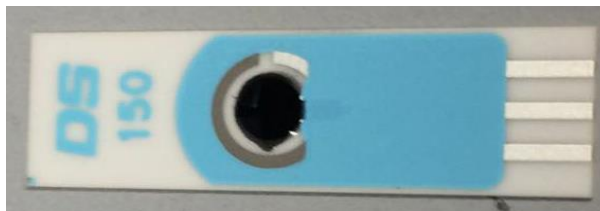
K tvorbě pracovní elektrody byly použity materiály na bázi uhlíku, jmenovitě grafen (*Graphene*, GR), vícevrstevné uhlíkové nanotrubicе (*Multi-Wall Carbon Nanotubes*; MWCNTs) a uhlíkový inkoust (*Carbon Ink*, CI). Elektrodový materiál lze v tomto případě označit za binární směs tvořenou z jedné výše zmíněné uhlíkové komponenty a mediátoru (RhO₂). Uhlíková část vždy tvořila 95 % (w/w) celkového elektrodového materiálu a mediátor zbylých 5 % (w/w).

K elektrodovému materiálu na bázi GR a MWCNTs bylo přidáno rozpouštědlo, respektive 5 ml dimethylformamidu a vzniklá disperze byla ponechána po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Naopak k elektrodovému materiálu na bázi CI nebylo přidáno rozpouštědlo. Po smíchání CI a mediátoru byla vzniklá pastovitá směs také vložena na 10 minut do ultrazvuku. Takto připravené elektrodové materiály byly skladovány v lednici a před použitím byly vždy po dobu 5 minut ponechány v ultrazvuku.

Pracovní elektroda daného převodníku se připravovala pipetáží uhlíkového elektrodového materiálu na nosnou podložku komerčně dostupné uhlíkové tištěné elektrody (*Screen Printed Carbon Electrode*, SPCE) obsahující mimo jiné už vytištěnou referentní a pomocnou elektrodu. K výrobě amperometrického převodníku byla použita elektroda DS-150, produkovaná španělskou společností DropSens. Testována byla i elektroda DS-110, ovšem povrch této SPCE byl v porovnání s DS-150 více smáčivý a pro přípravu převodníku méně vhodný.

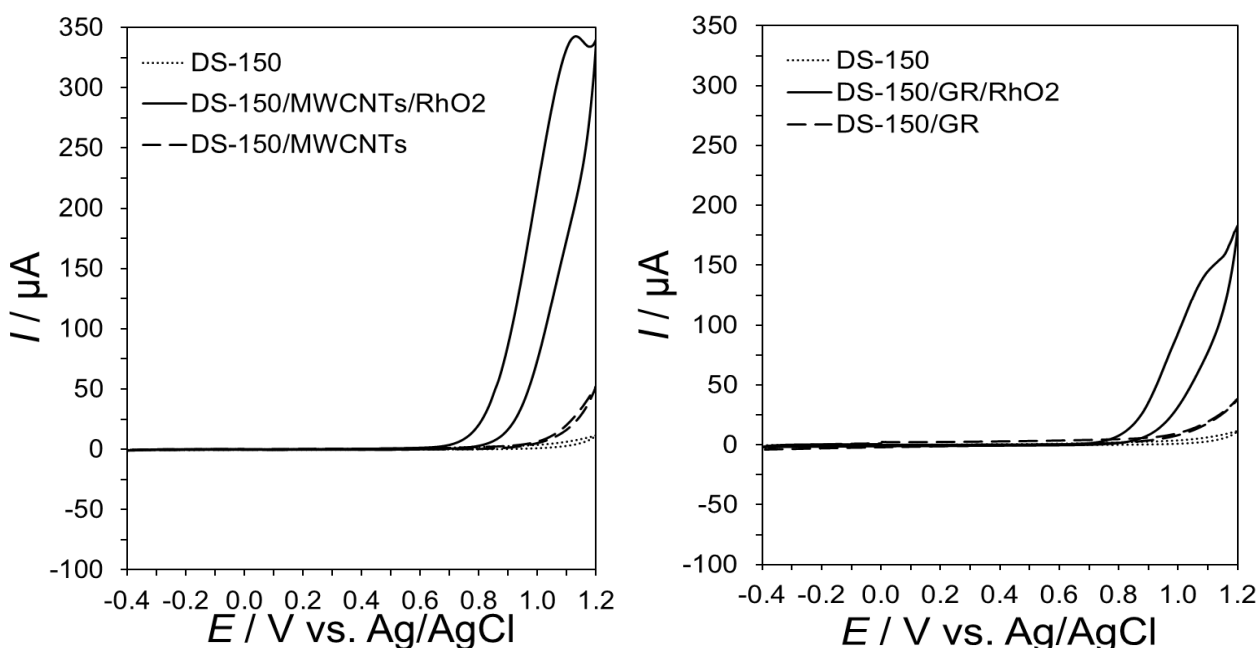
Postup přípravy amperometrického převodníku lze popsat následovně. Povrch původní pracovní elektrody byl překryt výše zmíněným elektrodovým materiálem, který se nanášel pipetáží (v případě CI nerezovou kopistou) takovým způsobem, aby povrch původní pracovní elektrody byl zcela překryt, ovšem nemůže přesahovat na referentní či pomocnou elektrodu. V případě SPCE na bázi GR/RhO₂ a MWCNTs/RhO₂ se pipetovalo 2 krát po 5 μl daného elektrodového materiálu, kdy druhá dávka byla pipetována vždy po zaschnutí dávky první.

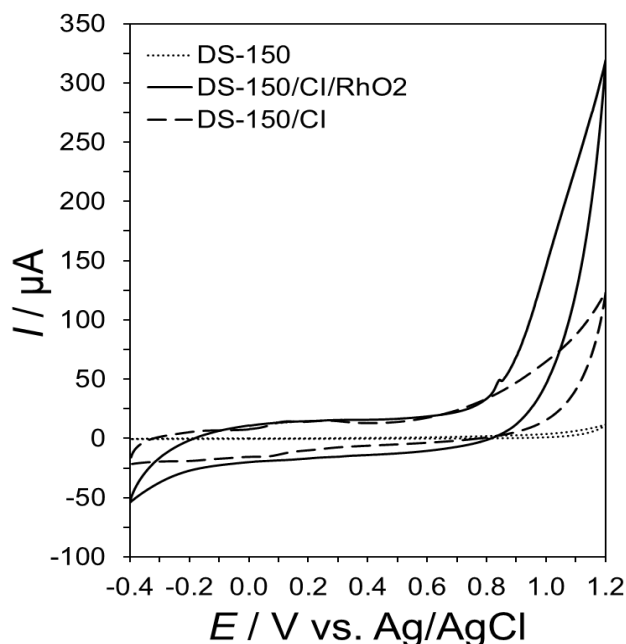
V případě SPCE na bázi Cl/RhO_2 se inkoust nanášel pomocí kopisty, vždy v takovém množství, aby zcela překrylo původní pracovní elektrodu. Takto zhotovené SPCEs byly připraveny k měření až po důkladném zaschnutí pracovní elektrody. Obr. 20 zobrazuje čerstvě připravenou SPCE na bázi GR/RhO_2 .



Obr. 20: SPCE/ GR/RhO_2 .

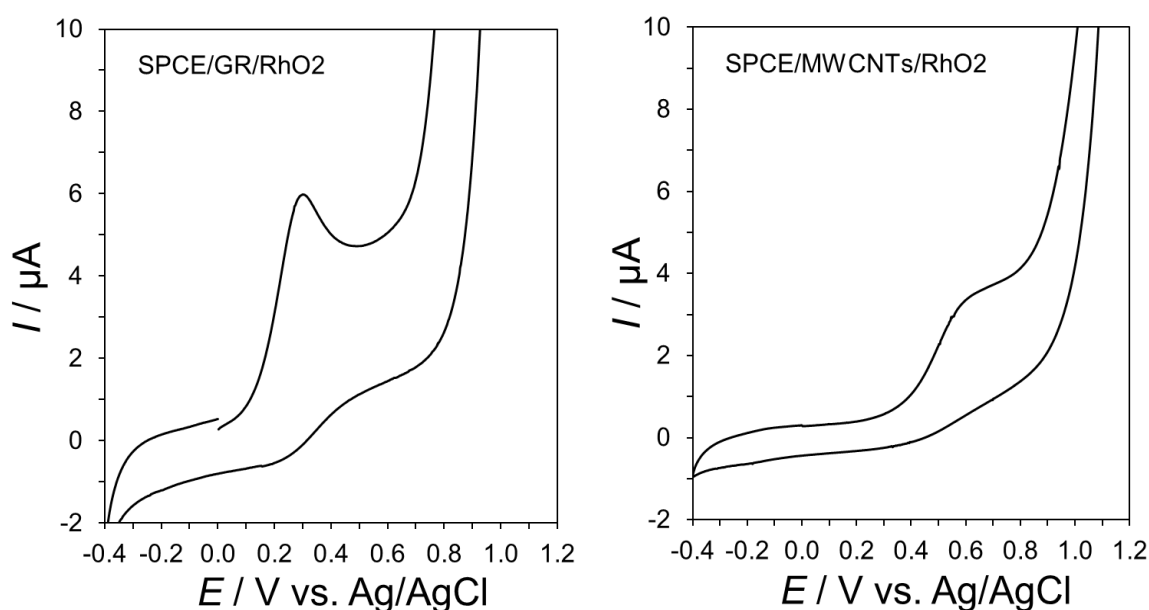
Připravené SPCEs na bázi GR/RhO_2 , $\text{MWCNTs}/\text{RhO}_2$ a Cl/RhO_2 byly následně charakterizovány pomocí cyklické voltametrie (*Cyclic Voltametry, CV*). Cílem této analýzy bylo zjistit, který převodník nejlépe interaguje s mediátorem – RhO_2 . Analyzována byla komerční SPCE, ta sloužila jako standard a také jednotlivé SPCEs bez mediátoru, aby byla patrná změna způsobená mediátorem. Měření bylo prováděno za použití 0.1 M fosfátového pufru (*Phosphate Buffer, PB*) o pH 8.5, tvořeného $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a KH_2PO_4 , kdy výsledné pH bylo upraveno pomocí NaOH či H_3PO_4 . Na povrch pracovní elektrody bylo pipetováno 40 μl PB a výsledné cyklické voltamogramy zobrazuje Obr. 21, kdy tečkovaná křivka znázorňuje standardní SPCE, čárkovaná křivka SPCE bez mediátoru a plná křivka SPCE s mediátorem.

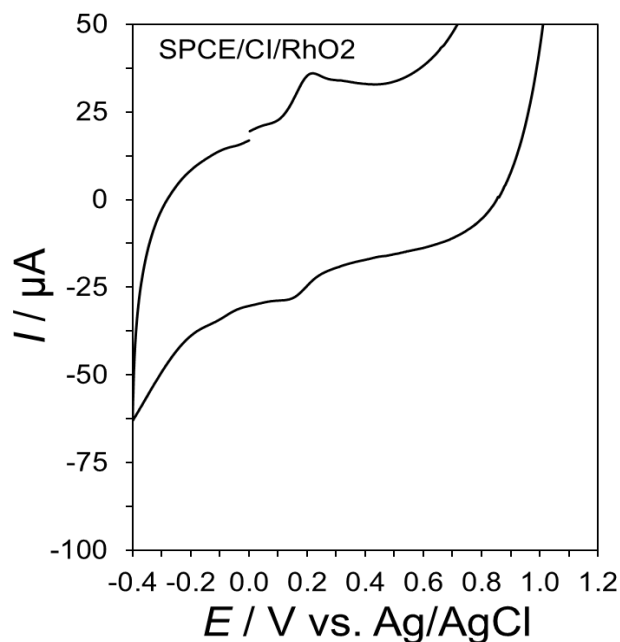




Obr. 21: Cyklické voltamogramy komerční SPCE (tečkovaná křivka), SPCE bez mediátoru (čárkovaná křivka), SPCE/RhO₂ (plná křivka). Parametry CV: Potenciálový rozsah -0,4 až 1,2 V vs. Ag/AgCl, potenciálový skok 2,5 mV, rychlost skenu 10 mV/s.

Z cyklických voltamogramů bylo zjištěno, že proudové hodnoty anodického píku se pro SPCE obsahující mediátor vždy mnohonásobně zvětšily v porovnání s SPCE bez mediátoru. S mediátorem nejlépe interagují MWCNTs, respektive anodický pík měl nejvyšší proudový výtěžek. GR s mediátorem interaguje o něco méně a CI se jeví jako nejméně vhodný, a to z důvodu vysokého proudového pozadí. Následně byla pomocí CV testována schopnost interakce SPCE/RhO₂ s nikotinamid adenin dinukleotidem (NAD⁺), kdy na povrch pracovní elektrody bylo pipetováno 40 μl NAD⁺ o koncentraci 0,35 μg/μl. Výsledné cyklické voltamogramy jednotlivých SPCEs zobrazuje Obr. 22.

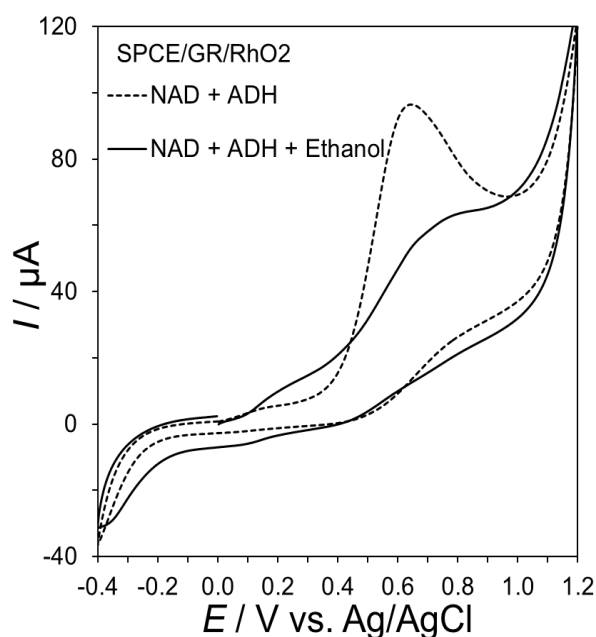




Obr. 22: Cyklické voltamogramy SPCEs/RhO₂ v přítomnosti NAD⁺. Parametry CV: Potenciálový rozsah -0,4 až 1,2 V vs. Ag/AgCl, potenciálový skok 2,5 mV, rychlost skenu 10 mV/s.

Z cyklických voltamogramů je zřejmá elektroaktivita přítomného kofaktoru, kdy největších proudových hodnot bylo dosaženo za použití SPCE/GR/RhO₂. Oproti tomu SPCE/MWCNTs/RhO₂ interaguje s NAD⁺ o poznání méně a anodický pík není již tak vyvinutý. Tímto měřením se taktéž potvrdil fakt, že CI vykazuje vysoké proudové pozadí a není vhodným materiálem pro konstrukci amperometrického převodníku. Zatímco GR, především kvůli výborné interakci s NAD⁺ se ze tří testovaných elektrodových materiálů hodí k přípravě amperometrického transduktoru nejvíce.

Na základě tohoto zjištění byla SPCE/GR/RhO₂ testována pomocí CV v přítomnosti enzymu ADH, NAD⁺ a roztoku 10% ethanolu. Na pracovní elektrodu bylo napipetováno 45 μl NAD⁺ o koncentraci 0,35 μg/μl a 5 μl ADH o koncentraci 25 μg/μl. Pokud měl cyklický voltamogram patřičný charakter (čárkovaná křivka) bylo na povrch pracovní elektrody napipetováno 45 μl roztoku 10% ethanolu a naměřený cyklický voltamogram zobrazuje Obr. 23.



Obr. 23: Cyklické voltamogramy SPCE/GR/RhO₂ v přítomnosti NAD⁺, ADH a EtOH. Parametry CV: Potenciálový rozsah -0,4 až 1,2 V vs. Ag/AgCl, potenciálový skok 2,5 mV, rychlost skenu 10 mV/s.

Z cyklického voltamogramu (viz Obr. 23) je patrné, že po přidání 10% roztoku ethanolu (plná křivka) dochází, v porovnání s voltametrickou křivkou enzymu a kofaktoru (čárkovaná křivka), k mírnému proudovému nárůstu při potenciálu 0,2 až 0,4 V. Potenciál nacházející se v tomto intervalu by měl být použit v průtokové injekční analýze (*Flow Injection Analysis*, FIA) pro detekci ethanolu.

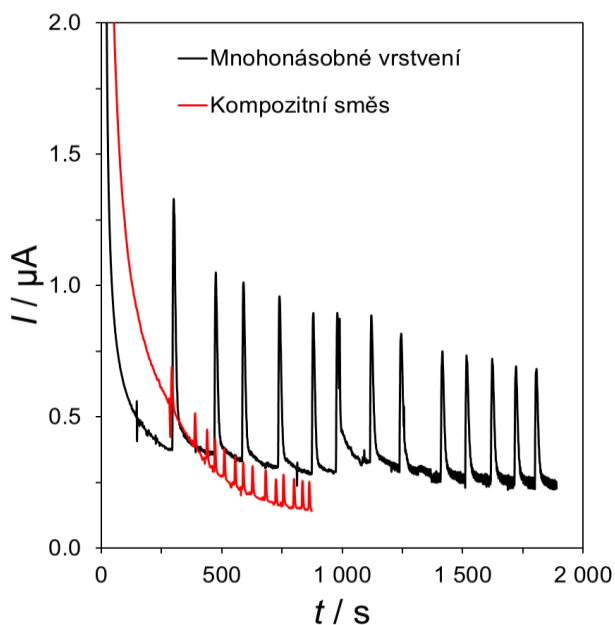
Principiálně lze FIA s amperometrickou detekcí popsat následovně. Amperometrický biosenzor na bázi SPCE/GR/ADH/NAD⁺/RhO₂ umístěný v průtočné cele slouží jako detektor. Vzorek obsahující ethanol se dávkuje skrze dávkovací smyčku šesticestného ventilu a dále je unášen do průtokové cely, která obsahuje mnou navržený biosenzor.

4.7 Způsob imobilizace

Pro správnou funkci amperometrického alkoholdehydrogenázového biosenzoru je nesmírně důležité imobilizovat enzym společně s kofaktorem tak, aby v průběhu analýzy nedocházelo k jejich ztrátám vymýváním. Nesprávně provedená imobilizace negativně ovlivňuje chování biosenzoru, výrazně snižuje životnost a neumožňuje jeho použití v systémech pracujících s kontinuálním tokem, neboť dochází k souvislému vyplavování jednotlivých komponent.

V této práci byl enzym a kofaktor imobilizován pomocí cross-linkru glutaraldehydu a polymeru Nafionu. V momentě, kdy se na povrch pracovní elektrody obsahující ADH, NAD⁺ a RhO₂ nanese glutaraldehyd, dochází k tzv. zesítnění, při kterém se tvoří

mezimolekulární kovalentní vazby mezi karbonylovou ($=C=O$) skupinou glutaraldehydu a volnou aminoskupinou NAD^+ a ADH ($-R-NH_2$). Takto vzniklé aglomeráty mají mnohonásobně vyšší objem než samotné komponenty, což zaručuje silnější zadržení ve struktuře polymeru. Imobilizace byla prováděna dvojím způsobem, jmenovitě mnohonásobným vrstvením nebo vytvořením kompozitního materiálu. Na SPCE/GR/RhO₂ bylo pipetováno 10 μ L NAD^+ o koncentraci 0,35 μ g/ μ l a 10 μ l ADH o koncentraci 25 μ g/ μ l. ADH se pipetovala až po důkladném zaschnutí NAD^+ . Následně bylo na povrch pracovní elektrody pipetováno 10 μ l 1% Nafionu a po důkladném zaschnutí 10 μ l 1% glutaraldehydu. Tento způsob imobilizace nebyl dostatečně efektivní a docházelo k nepřetržitému vyplavování jednotlivých komponent, viz Obr. 24. Na základě tohoto zjištění byl navrhnout nový způsob imobilizace, při kterém byla vytvořena tzv. kompozitní směs, kdy se všechny komponenty (GR, RhO₂, ADH, NAD^+ , Nafion a glutaraldehyd) smíchaly dohromady a vzniklá pastovitá směs byla po dobu 30 minut ponechána v ultrazvuku. Taktéž bylo zjištěno, že reakce mezi glutaraldehydem a enzymem trvá minimálně 2 hodiny a na základě tohoto zjištění byla připravená kompozitní směs ponechána po dobu 24 hodin v mrazáku. Tento způsob imobilizace byl vysoce účinný a biosenzor vykazoval vysokou stabilitu a nedocházelo k vyplavování jednotlivých komponent.



Obr. 24: FIA amperogram roztoku 20% ethanolu naměřený ADH biosenzorem tvořeného mnohonásobným vrstvením (červená křivka) a amperogram 3% ethanolového roztoku naměřený biosenzorem na bázi kompozitní směsi (černá křivka). Parametry FIA: Průtoková rychlost 1 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

Z Obr. 24 je patrné, že SPCE modifikovaná postupným pipetováním elektrodového materiálu, ADH, NAD⁺ a následné imobilizaci nevykazovala vysokou stabilitu a docházelo k souvislému vyplavování jednotlivých komponent, což lze potvrdit stálým poklesem proudových hodnot pro 20% ethanolový roztok (černá křivka). Oproti tomu SPCE, u které byla pracovní elektroda připravena pipetáží výše zmíněného kompozitního materiálu vykazovala vysokou stabilitu a jednotlivé komponenty se nevyplavovaly, což lze potvrdit získáním téměř totožných proudových hodnot získaných při FIA analýze roztoku 3% ethanolu.

4.7.1 Množství Nafionu

Při konstrukci biovrstvy bylo nezbytné optimalizovat obsah Nafionu tak, aby byl enzym pevně zakotven, ale zároveň nebyla významně snížena citlivost výsledného analytického zařízení. Při hledání optimálního množství Nafionu byly konstruovány biosenzory obsahující rozdílné množství Nafionu a vždy totožné množství zbylých komponent, respektive 19 µg grafenu a 1 µg RhO₂, 3 µl 1% glutaraldehydu, 10 µl ADH o koncentraci 25 µg/µl a 10 µl NAD⁺ o koncentraci 0,35 µg/µl. Optimalizace byla provedena pro pipetáže 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl a 30 µl 1% Nafionu. Po porovnání naměřených amperogramů 20% ethanolového roztoku při detekčním potenciálu +0,1 V bylo zjištěno, že SPCE s 15 µl 1% Nafionu vykazovala nejvyšší citlivost.

4.7.2 Množství glutaraldehydu

Pro optimalizaci množství glutaraldehydu bylo připraveno 6 SPCEs, kdy pracovní elektroda byla tvořena 19 µg grafenu a 1 µg RhO₂, 10 µl ADH o koncentraci 25 µg/µl, 10 µl NAD⁺ o koncentraci 0,35 µg/µl a již optimalizovaným množstvím 1% Nafionu (15 µl) a rozdílným množstvím 1% glutaraldehydu. Optimalizace byla uskutečněna pro 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl a 30 µl 1% glutaraldehydu. Na takovýchto SPCEs byla provedena analýza roztoku 20% ethanolu pomocí FIA při +0,1 V. Po porovnání naměřených amperogramů bylo zjištěno, že SPCE s 5 µl 1% glutaraldehydu vykazovala nejvyšší citlivost.

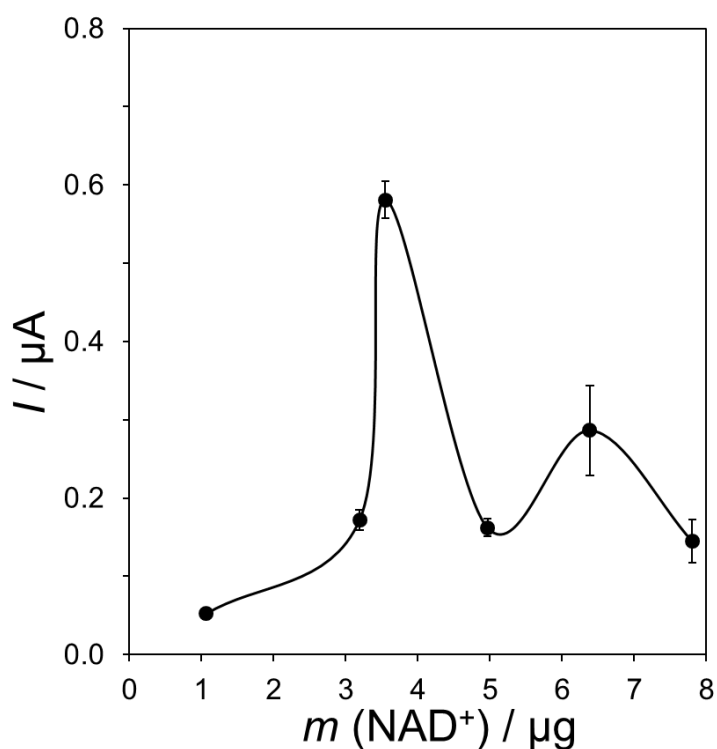
4.7.3 Množství NAD⁺

K optimalizaci množství NAD⁺ byl použit zásobní roztok o koncentraci 0,35 µg/µl, ze kterého byly utvořeny kompozitní směsi obsahující 3 µl, 9 µl, 10 µl, 14 µl, 18 µl a 22 µl NAD⁺. Každá tato směs mimo jiné obsahovala 19 µg grafenu a 1 µg RhO₂, 10 µl ADH o koncentraci 25 µg/µl a již optimalizované množství 1% Nafionu (15 µl) a 1% glutaraldehydu (5 µl).

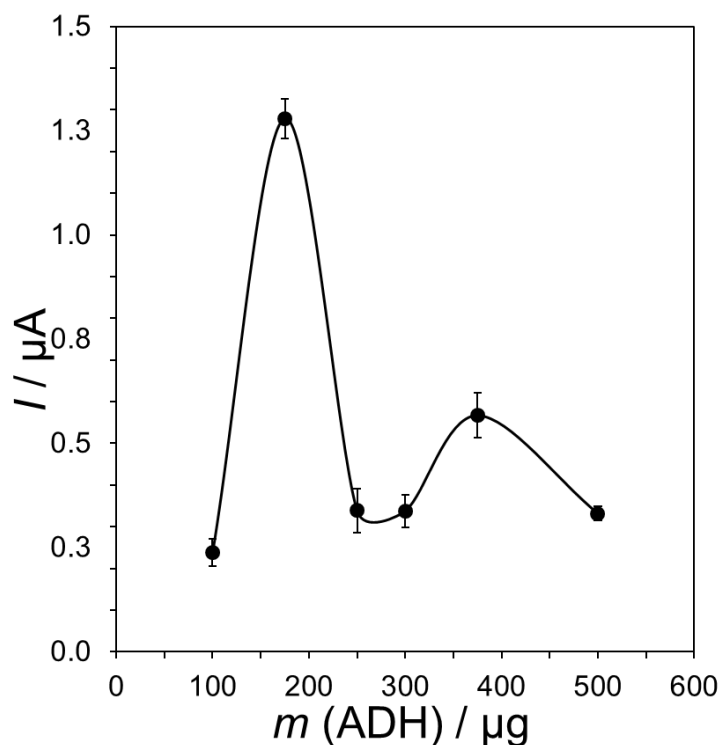
Po napipetování kompozitní směsi na nosnou podložku SPCE byla na těchto šesti elektrodách provedena analýza roztoku 20% ethanolu pomocí FIA s amperometrickou detekcí při +0,1 V. Po porovnání naměřených amperogramů bylo zjištěno, že SPCE s 10 μl (3,5 μg) NAD^+ vykazovala nejvyšší citlivost. Toto tvrzení dokazuje Obr. 25, který zobrazuje závislost proudové hodnoty na množství NAD^+ . Proudové hodnoty byly získány zprůměrováním šesti nástřiků roztoku 20% ethanolu.

4.7.4 Množství ADH

K optimalizaci ADH bylo zkonstruováno 6 SPCEs, kdy pracovní elektroda byla tvořena 4 μl , 7 μl , 10 μl , 12 μl , 15 μl a 20 μl ADH o koncentraci 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a optimalizovaným množstvím NAD^+ , 1% Nafionu (15 μl) a 1% glutaraldehydu (5 μl). Následně byla na těchto 6 SPCEs provedena analýza 20% ethanolového roztoku pomocí FIA s amperometrickou detekcí při +0,1 V. Po porovnání naměřených amperogramů bylo zjištěno, že SPCE se 7 μl (175 μg) ADH o koncentraci 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vykazovala nejvyšší citlivost (viz Obr. 26).



Obr. 25: Závislost proudové hodnoty na množství NAD^+ , utvořená z FIA amperogramu z skaného analýzou 20% ethanolového roztoku za použití SPCE/GR/ADH/RhO₂ lišící se množstvím NAD^+ . Parametry FIA: Průtoková rychlost 1 ml/min, detekční potenciál 0,1 V.



Obr. 26: Závislost proudové hodnoty na množství ADH, utvořená z FIA amperogramu z škaného analýzou 20% ethanolového roztoku za použití SPCE/GR/ADH/RhO₂ lišící se množstvím ADH. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1 ml/min, detekční potenciál 0,1 V.

Z předchozích kapitol lze usoudit, že optimální podmínky pro přípravu alkoholdehydrogenázového biosenzoru jsou následující (500 μl disperze pro tvorbu kompozitního biosenzoru): 1 mg GR, 50 μg RhO₂, 8,75 mg ADH, 175 μg NAD⁺, 375 μl 1% glutaraldehydu a 125 μl 1% Nafionu. Vzniklá disperze (30 min v ultrazvukové lázni) byla ponechána v mrazáku po dobu 24 hodin. Poté stačilo 10 μl této disperze nanášet na pracovní plochu komerční SPCE. Po hodině, kdy došlo k odpaření rozpouštědel, byl ADH biosenzor zcela připraven pro měření.

Před vlastní analýzou bylo nezbytné povrch kompozitního biosenzoru opláchnout, aby se vyplavily nedokonale zabudované komponenty. Byla připravena série 5 biosenzorů pro posouzení, zda je možné připravit výše uvedeným postupem identické biosenzory. Z Tab. 2 je patrné, že pouze 3 biosenzory z celkového počtu vykazují téměř obdobnou odezvu vůči roztoku 10% ethanolu. Tento fakt lze vysvětlit následovně. Kompozitní materiál, jenž se pipetuje na nosnou podložku SPCE nemá v celém objemu vždy stejné složení, neboť nikdy nelze docílit rovnoměrné dispergace jednotlivých komponent.

Tab. 2: Proudové hodnoty totožných biosenzorů získané FIA analýzou 10% ethanolu.

n (ADH biosensor)	I_p (μA)
1	0,25 \pm 0.01
2	0,42 \pm 0.01
3	0,26 \pm 0.01
4	0,23 \pm 0.02
5	0,34 \pm 0.01

Hodnoty uvedeny jako průměr \pm průměrná odchylka pro 10 opakování.

4.8 Optimalizace pracovních podmínek

Samotná příprava biosenzoru znamená jenom jeden z mnoha kroků potřebných k vývoji celé analytické metody. Špatně zvolené pracovní podmínky mohou negativně ovlivňovat výsledky měření. Rychlost průtoku nosného elektrolytu a pracovní potenciál představují nejdůležitější parametry pro FIA s amperometrickou detekcí, které je nutné optimalizovat.

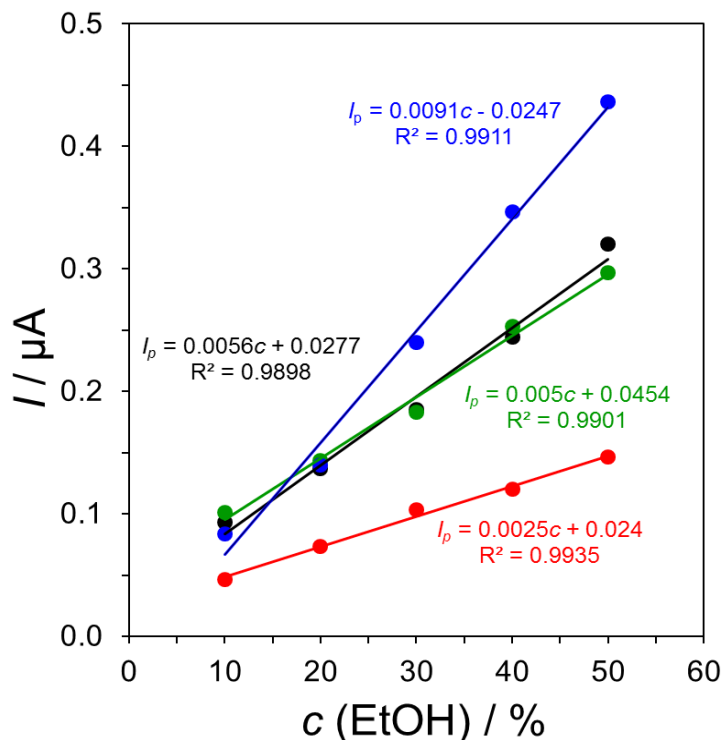
Volbou průtokové rychlosti (*Flow Rate*, FR) lze ovlivnit citlivost dané metody, kdy při nižší FR dosahuje metoda vyšší citlivosti, neboť reakce probíhající na pracovní elektrodě vyžaduje ke svému průběhu určitý čas. Oproti tomu detekční potenciál výrazně ovlivňuje selektivitu dané metody, kdy s narůstajícím potenciálem dochází ke zvýšení odezvy a současně ke snížení selektivity, což má za následek oxidaci dalších elektroaktivních látek přítomných ve vzorku.

4.8.1 Optimalizace průtokové rychlosti

Na SPCE/GR/ADH/RhO₂ byla provedena analýza 10%, 20%, 30%, 40% a 50% roztoku ethanolu při různé FR, kdy jednotlivé roztoky byly připraveny z 96% zásobního roztoku, jenž byl ředěn PB. Takto připravené roztoky byly analyzovány pomocí FIA s amperometrickou detekcí při +0,1 V ve 0.1 M PB o pH 8.5 s dávkovací smyčkou o objemu 200 μl , a to při následující FR – 0,4 ml/min, 0,6 ml/min, 0,8 ml/min, 1 ml/min, 1,2 ml/min, 1,4 ml/min, 1,6 ml/min a 2 ml/min.

Každý kalibrační roztok byl změřen nejméně třikrát. Odečtené proudové hodnoty se zprůměrovaly a sestavila se závislost proudových hodnot na koncentraci při různých FRs, jež zobrazuje Obr. 27. Pro lepší přehlednost byly vybrány jen některé FRs, nicméně nejvyšší citlivost a nejnižší šum byl dosažen při FR 1,6 ml/min, což odpovídá 31,6 otáčkám za minutu.

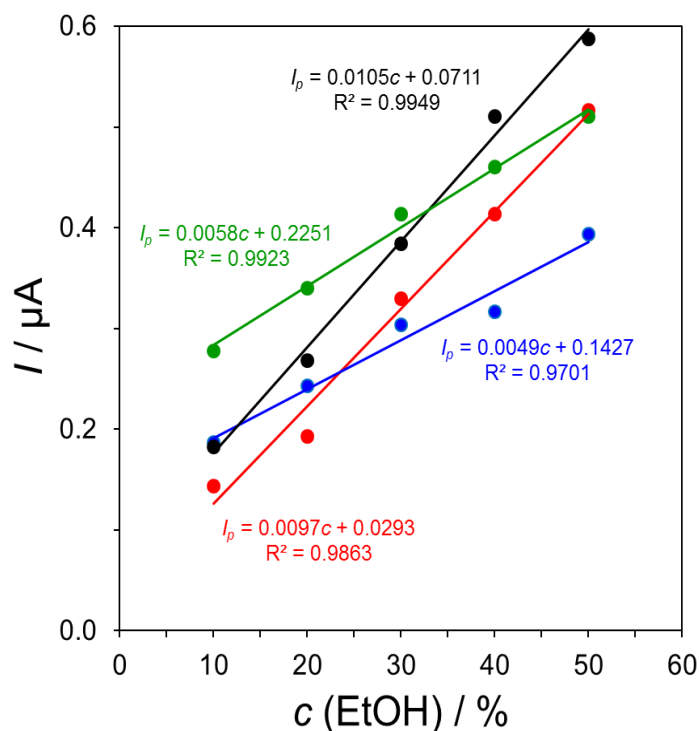
Obecně lze konstatovat, že takto malé změny FR mají na výsledek měření spíše zanedbatelný vliv a naměřené proudové hodnoty si jsou velice blízké, a to především při nižších ethanolových koncentracích. Toto tvrzení lze potvrdit získáním téměř stejných proudových hodnot při FR 0,8 ml/min (černá přímka) a 1,4 ml/min (zelená přímka).



Obr. 27: Kalibrační křivky obdržené při různých průtokových rychlostech, jmenovitě 0,4 ml/min (červená), 0,8 ml/min (černá), 1,4 ml/min (zelená) a 1,6 ml/min (modrá přímka). Experiment byl naměřen v prostředí 0.1 M PB o pH 8.5 s dávkovací smyčkou o objemu 200 µl při potenciálu detekce +0,1 V.

4.8.2 Optimalizace detekčního potenciálu

Na SPCE/GR/ADH/RhO₂ byla provedena analýza 10%, 20%, 30%, 40% a 50% ethanolového roztoku pomocí FIA s amperometrickou detekcí při FR 1,6 ml/min v 0.1 M PB o pH 8.5 s dávkovací smyčkou o objemu 200 µl, a to při následujících detekčních potenciálech 0,1 V, 0,2 V, 0,3 V, 0,4 V a 0,5 V. Měření bylo prováděno stejným způsobem jako v předchozím případě. Z Obr. 28 je patrné, že nejvyšší citlivosti (směrnice přímky) bylo dosaženo při potenciálu +0,2 V (černá přímka). Nicméně podobně jako v předchozí kapitole, i zde se proudové hodnoty se změnou potenciálu liší pouze nepatrně.



Obr. 28: Kalibrační křivky obdržené při různých potenciálech detekce, a to při 0,1 V (zelená), 0,2 V (černá), 0,3 V (modrá), 0,4 V (červená přímka). Experiment byl naměřen v prostředí 0,1 M PB o pH 8,5 s dávkovací smyčkou o objemu 200 μl při průtokové rychlosti 1,6 ml/min.

4.9 Charakteristika ADH biosenzoru

Před použitím biosenzoru v praxi je třeba charakterizovat a určit analytické parametry, jako je mez detekce a stanovitelnosti, přesnost, správnost a životnost. Výše zmíněné parametry byly určovány pomocí navrženého ADH biosenzoru za optimálních pracovních podmínek. Mez detekce (*Limit of Detection*, LOD) lze charakterizovat jako nejnižší možnou koncentraci, kterou lze detekovat, nikoliv stanovit. LOD je nutno chápat jako teoretickou hodnotu, která by se v optimálním případě měla podobat hodnotě skutečné. LOD lze spočítat ze vztahu zobrazující rovnice číslo 9.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{směrodatná odchylka}}{\text{směrnice přímky}} \quad (\text{rov. 9})$$

Mez stanovitelnosti (*Limit of Quantification*, LOQ) lze charakterizovat jako nejnižší možnou koncentraci, kterou lze stanovit. LOQ se nejčastěji vypočítává ze vztahu zobrazující rovnice číslo 10.

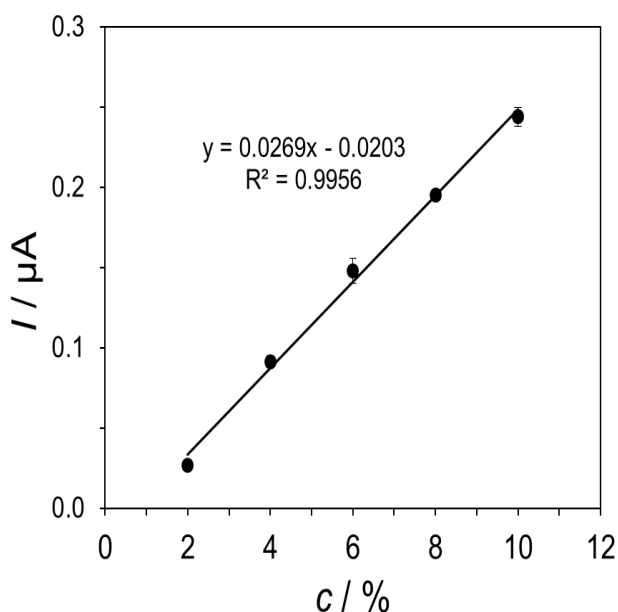
$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{směrodatná odchylka}}{\text{směrnice přímky}} \quad (\text{rov. 10})$$

Přesnost metody lze vyjádřit na základě relativní směrodatné odchylky (RSD), většinou udávané v %. Vztah pro výpočet zobrazuje rov. 11. Obecně platí, že čím menší hodnota RSD, tím přesnější výsledek měření.

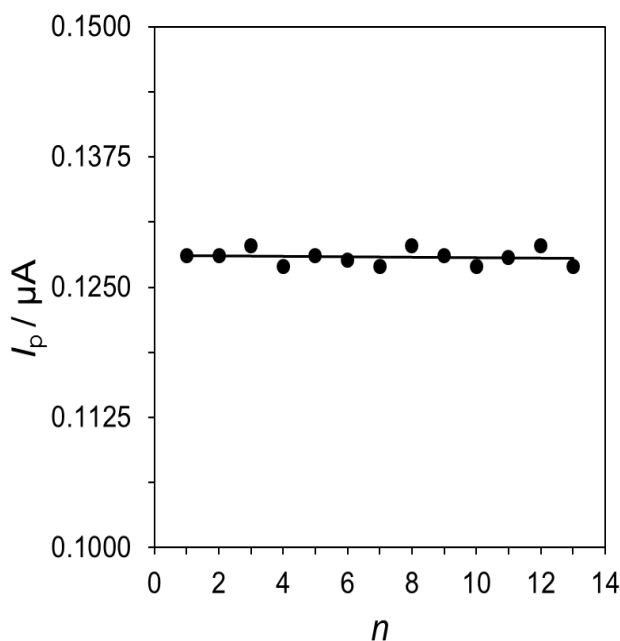
$$\text{RSD} = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{aritmetický průměr}} \times 100 \quad (\text{rov. 11})$$

Pro výpočet LOD, LOQ a RSD byla sestrojena kalibrační křivka zobrazená na Obr. 29, jež byla utvořena z amperogramu naměřeného pomocí FIA s amperometrickou detekcí kdy byly analyzovány 2%, 4%, 6%, 8% a 10% roztoky ethanolu. S každým roztokem byla provedena série pěti měření a odečtené hodnoty byly zprůměrovány a vyneseny do kalibrační křivky.

Pro výpočet výše uvedených hodnot byla použita směrnice (k) kalibrační křivky pro nízké koncentrace ethanolu 0.0269 $\mu\text{A}/\%$. Směrodatná odchylka šumu nebyla pro výpočet použita, neboť by byly dosaženy nereálně nízké koncentrace ethanolu. Z tohoto důvodu byla pro výpočet použita směrodatná odchylka obdržena z třinácti opakovaných měření pro 3% koncentraci ethanolu, viz Obr. 30. Z výše uvedených vztahů byly spočteny hodnoty LOD 0,33 % a LOQ 1,12 % ethanolu. Zde si dovoluji podotknout, že mnou připravený biosenzor není schopen určit velmi nízký obsah ethanolu například v krvi, a tudíž nelze jej využít v klinické analýze.



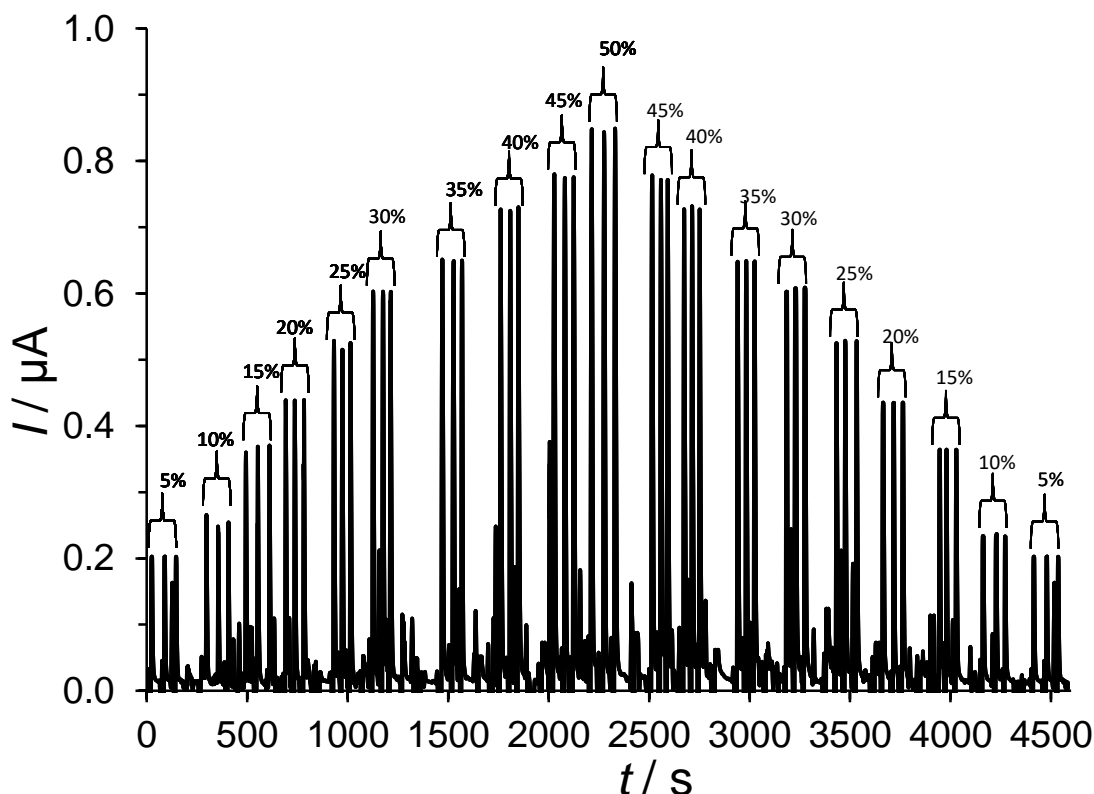
Obr. 29: Kalibrační závislost pro 2 až 10% ethanolové roztoky. Parametry FIA: průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.



Obr. 30: Závislost proudové hodnoty píku na počtu měření získaná z FIA amperogramu 3% ethanolového roztoku. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

Naměřené proudové hodnoty z Obr. 29 byly zprůměrovány a $\bar{x}=0,1298 \mu A$. Vypočítána byla také směrodatná odchylka, která byla rovna hodnotě $0,003 \mu A$. Z těchto dvou hodnot byla vypočítána přesnost vyvinuté metody, kterou lze charakterizovat shodou opakovatelných měření za konstantních pracovních podmínek. Přesnost byla matematicky vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka o hodnotě 2,36 %. Pokud bereme v úvahu hladinu významnosti (α) 95%, lze s čistým svědomím konstatovat, že vyvinutá metoda je velmi přesná.

Dále byla proměřena kalibrační závislost pro vyšší koncentrace od 10 do 50 % ethanolu a v téže analýze sestupně od 50 do 10 % (viz Obr. 31) o $R^2=0.9961$ a 0.9847 . Vyšší koncentrace se neproměřovaly, neboť většina lihovin (vzorků) nemá vyšší obsah. Byly dosaženy téměř totožné směrnice přímk 0.0150 a $0.0145 \mu A/\%$, což svědčí o dobré robustnosti ADH biosenzoru. Nicméně hodnoty směrnic jsou významně nižší než v případě směrnic pro nízké koncentrace ethanolu ($0.027 \mu A/\%$). Tento poznatek poukazuje na skutečnost, že je nutné si dávat pozor, v jakých koncentračních rozsazích bude prováděna reálná analýza. Dále z vysokých hodnot úseků (q) rovnic kalibračních přímk (0.1091 a $0.1256 \mu A$) vyplývá, že nelze použít metodu standardního přídatku k určení obsahu ethanolu v reálných vzorcích.



Obr. 31: FIA amperogram z škaný analýzou 5-50% roztoku ethanolu. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

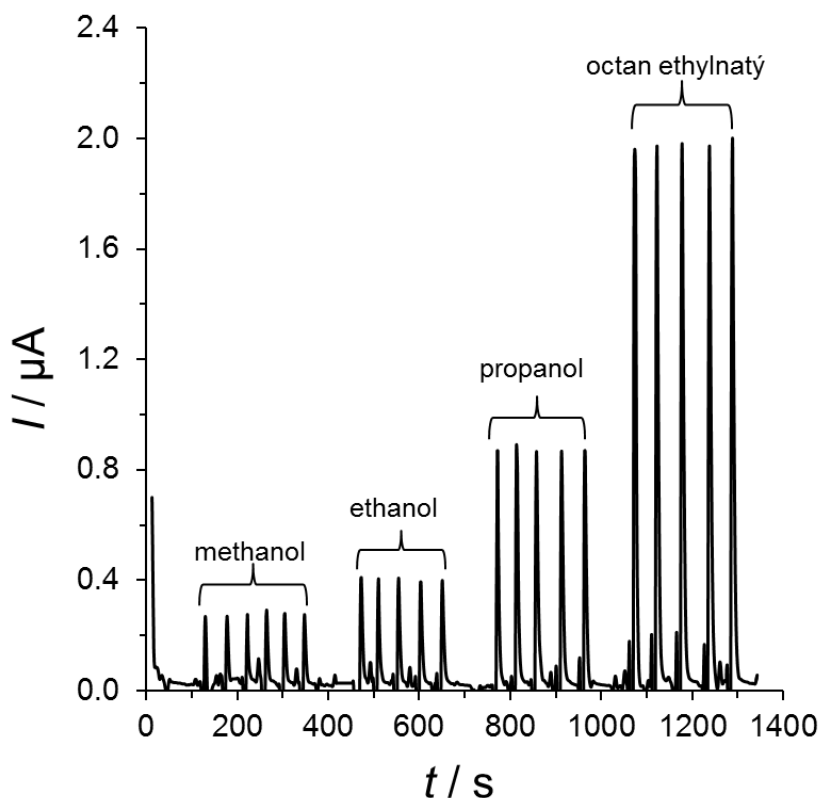
4.9.1 Životnost ADH biosenzoru

Z opakovaných měření v průběhu jednoho dne bylo dokázáno, že ADH biosenzor si po analýze trvající 75 minut udržel stále stejnou aktivitu, což lze potvrdit téměř totožnými proudovými hodnotami pro 5% ethanolové roztoky (2,9% RSD). Délka životnosti ADH biosenzoru činí při správném používání a skladování 2-4 dny. Během této doby lze biosenzor vystavit souvislému celodennímu měření. ADH biosenzory musí být skladovány při teplotě -20°C , neboť bylo zjištěno, že při vyšší teplotě ztrácí biosenzor svoji citlivost, což lze přisuzovat k degradaci enzymu či jiné složky.

4.10 Interferenty

Za použití FIA s amperometrickou detekcí byly na ADH biosenzoru analyzovány možné interferující látky, jež se v malém množství vyskytují ve většině alkoholických nápojů, jmenovitě methanol, propanol a octan ethylnatý. Ze 100% zásobních roztoků byly připraveny 10% roztoky, a to ředěním PB o pH 8.5. Následně byly tyto roztoky dávkovány skrze

dávkovací smyčku o objemu 200 μl a s každým roztokem byla provedena série pěti měření a výsledný amperogram znázorňuje Obr. 32.



Obr. 32: FIA amperogram ethanolu a vybraných interferujících látek o stejné koncentraci. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

Z Obr. 32 je zřejmé, že veškeré testované látky významně interferují stanovení ethanolu, neboť poskytují pozitivní proudovou odezvu. Z tohoto zjištění vyplývá, že ADH nelze považovat za selektivní biosenzor. Za základní příčinu lze považovat enzym ADH, který katalyzuje oxidaci téměř všech alifatických alkoholů [10,17].

4.11 Analýza modelového vzorku

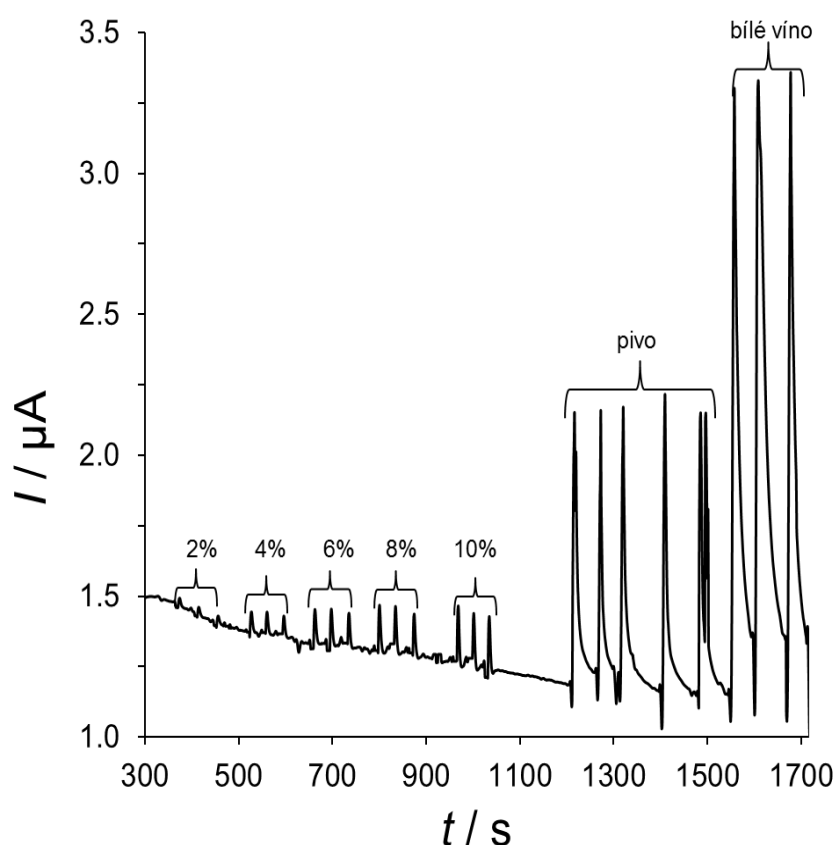
Optimalizovaným ADH biosenzorem byl analyzován modelový vzorek obsahující 24 % ethanolu, jenž byl připraven ředěním 96% ethanolového zásobního roztoku pomocí PB. Analýza byla provedena metodou kalibrační křivky, kdy byly připraveny a následně za použití FIA s amperometrickou detekcí analyzovány standardní roztoky obsahující 5 až 50 % ethanolu ($I_p=0.015c+0.1091$ s $R^2=0.9961$). Na stejném ADH biosenzoru byla za použití FIA s amperometrickou detekcí uskutečněna analýza modelového vzorku, se kterým byla provedena série deseti měření, kdy průměrná odezva signálu dosahovala hodnoty 0,498 μA .

Po dosažení této hodnoty do rovnice přímky bylo zjištěno, že modelový vzorek obsahoval $25,93 \pm 1,24$ % ethanolu, což je hodnota o 1,93 % vyšší než hodnota skutečná. Výťažnost metody byla spočtena na 108 %. Na základě této skutečnosti je možné konstatovat, že ADH biosenzor poskytuje správné výsledky, pokud není přítomna žádná interferující látka.

4.12 Analýza reálných vzorků

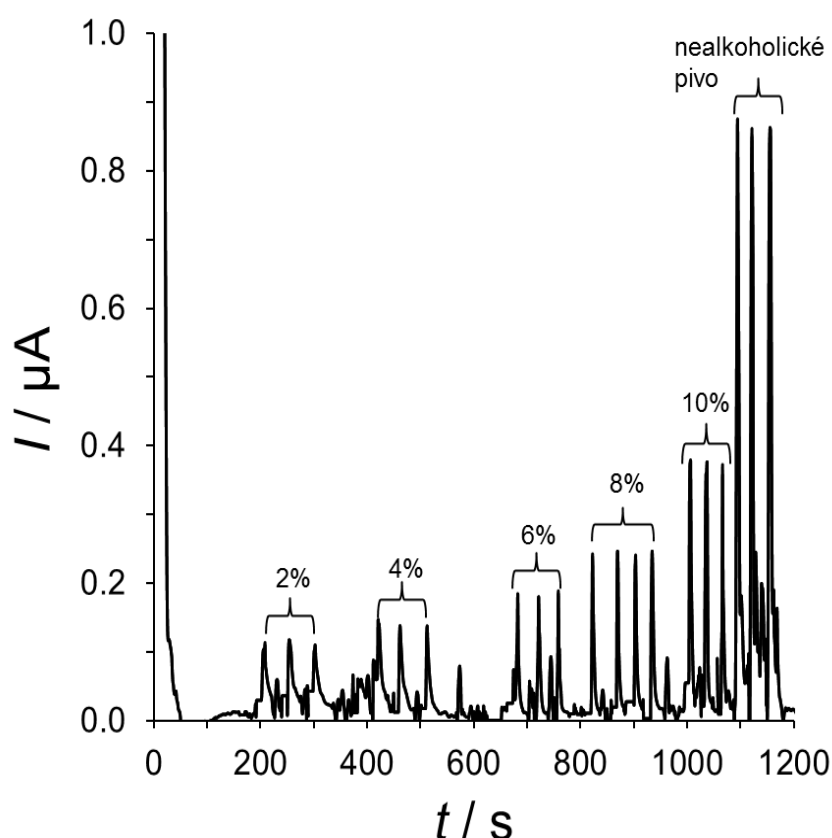
4.12.1 Analýza pomocí ADH biosenzoru

Na závěr byly analyzovány vybrané reálné vzorky alkoholických nápojů, jmenovitě pivo, bílé víno, rum, vodka a domácí slivovice. Tyto vzorky byly zakoupeny z místních obchodů či darované domácími producenty. Vzorky piva a bílého vína byly naředěny v poměru 1:1. Takto zředěné roztoky byly odvdušněny pomocí ultrazvukové lázně. Celá analýza byla prováděna v rámci jednoho měření, kdy se nejprve změřily kalibrační roztoky (každý minimálně třikrát) od 2-10% roztoku ethanolu a poté se dávkovaly již upravené vzorky piva a bílého vína. Výsledný amperogram ilustruje Obr. 33.



Obr. 33: FIA amperogram 2x naředěného piva Primátor 24° a bílého vína Pálava. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

Z výše uvedeného záznamu vyplývá, že vzorek piva i vína poskytoval mnohonásobně vyšší proudovou odezvu v porovnání s roztoky kalibrační řady. Prvotní domněnkou bylo, že pivo i víno obsahují vyjma ethanolu další množství elektroaktivních interferujících látek, které mohou být také oxidovány. Na základě této domněnky byla provedena analýza nealkoholického piva značky Birell, které obsahuje maximálně 0,5 % alkoholu. Měření bylo prováděno obdobným způsobem jako při analýze piva a vína a výsledný amperogram zobrazuje Obr. 34.

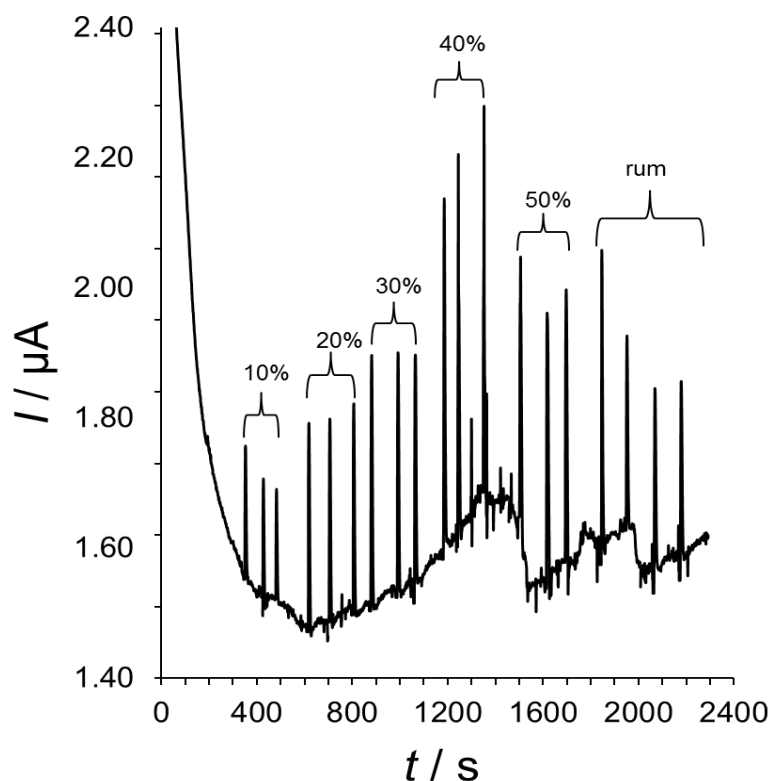


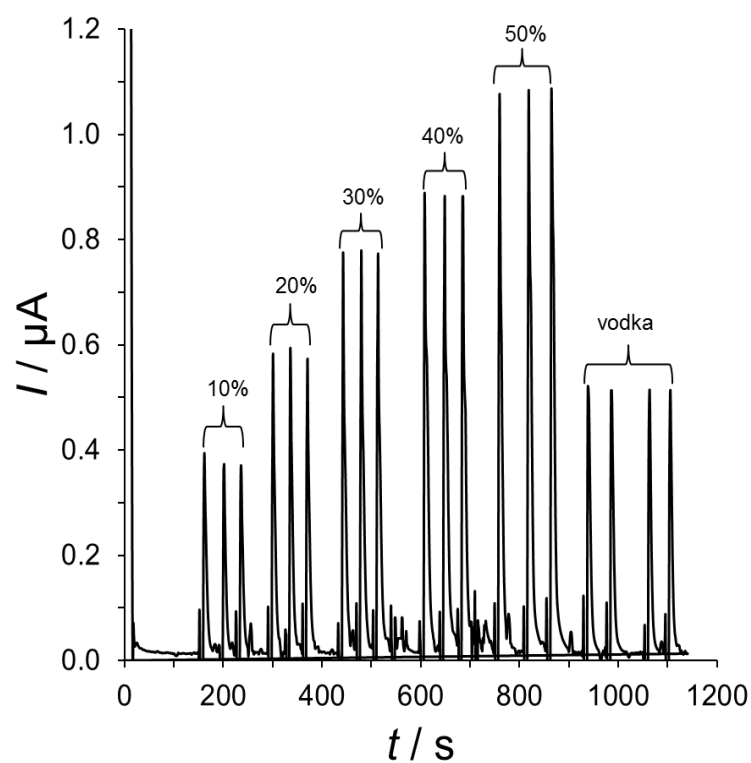
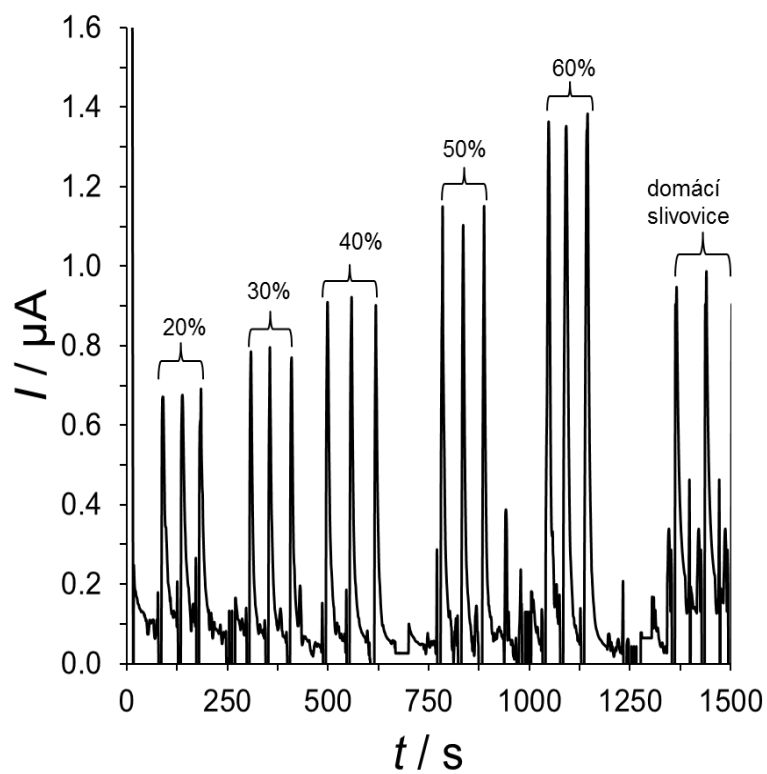
Obr. 34: FIA amperogram 2x naředěného nealkoholického piva Birell. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

Na základě tohoto měření byla potvrzena domněnka, že ADH biosenzor je pro stanovení obsahu ethanolu ve vínu a pivu nevhodný, jelikož zřejmě dochází k oxidaci doprovodných látek. V pivu to mohou být například polyfenolické sloučeniny, melanoidy, hořčiny pocházející z chmelu, vitamíny skupiny B a různé heterocyklické sloučeniny. Oproti tomu víno vyjma ethanolu obsahuje například různé polysacharidy, trísloviny, flavonoidy a ve velké míře polyfenolické sloučeniny [17,46,49].

Následně byly analyzovány lihoviny, jež mají v porovnání s pivem a vínem jednodušší matrici a většinou obsahují v dominantním množství pouze ethanol a vodu. Analýza se prováděla obdobným způsobem jako u piva a vína, kdy byly měřeny kalibrační roztoky obsahující 10-60 % ethanolu a s každým roztokem byla provedena série tří měření. Poté byly analyzovány vzorky, jmenovitě rum, vodka a domácí slivovice, jež byly připraveny ředěním PB v poměru 1:1 a následně po dobu 30 minut ponechány v ultrazvuku. Jednotlivé naměřené FIA amperogramy zobrazuje Obr. 35. Po dosažení zprůměrovaných proudových hodnot do příslušných kalibračních křivek byly vypočteny obsahy ethanolu (viz hodnoty v Tab. 3, s. 65). Kalibrační křivky zde nejsou uvedeny z důvodu větší přehlednosti, jelikož pro každou lihovinu byla měřena nová kalibrační závislost.

Na základě zjištěných výsledků lze konstatovat, že pomocí ADH biosenzoru lze s vysokou přesností určovat obsah ethanolu v lihovinách. Tyto nápoje mají v porovnání s pivem a vínem výrazněji jednodušší matrici a obsahují převážně pouze vodu a ethanol, tudíž zde není riziko zvýšení odezvy signálu, způsobené oxidací dalších elektroaktivních látek přítomných ve vzorku.



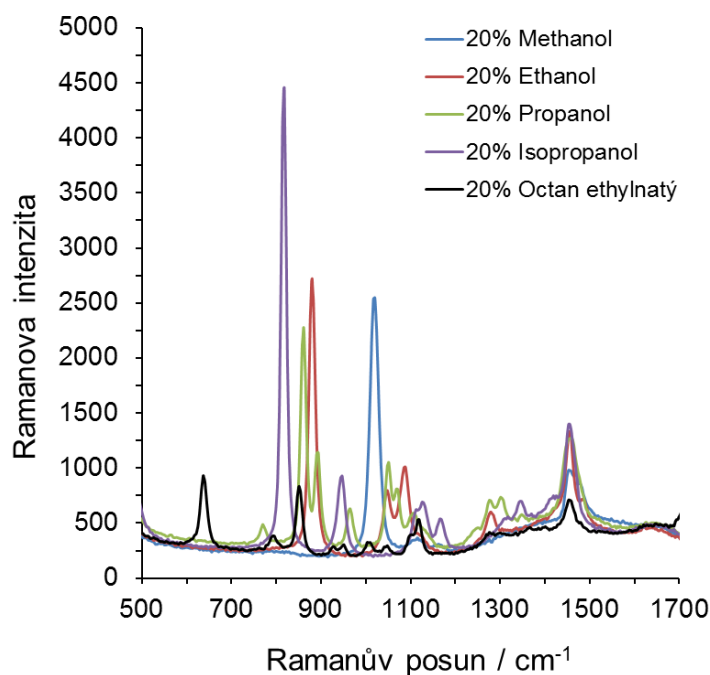


Obr. 35: FIA amperogram 2x naředěného rumu Liberté, vodky Božkov a domácí slivovice. Parametry FIA: Průtoková rychlost 1,6 ml/min, detekční potenciál 0,2 V.

4.12.2 Analýza pomocí Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie byla vybrána jako referenční metoda, pomocí které byly analyzovány totožné alkoholické nápoje. Naměřené výsledky byly konfrontovány s výsledky získanými ADH biosenzorem. Měření bylo prováděno za použití ručního Ramanova spektrometru značky Mira DS, produkovaného společností *Metrohm*.

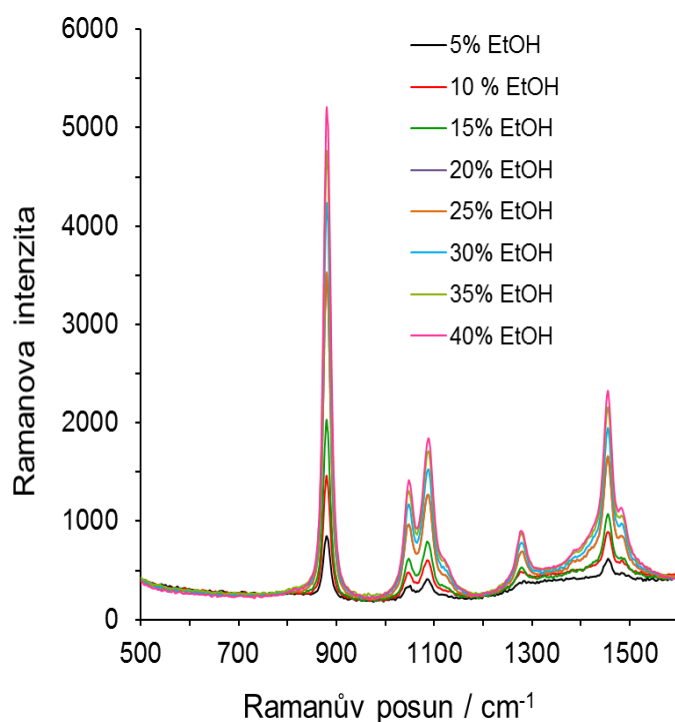
Prvně byly proměřeny roztoky vybraných komponent, které by se mohly vyskytovat v alkoholických nápojích. Na základě konfrontace naměřených spekter standardů a spektra vzorku lze potvrdit jejich přítomnost v analyzovaném nápoji (vzorku). Pomocí ručního Ramanova spektrometru byly změřeny roztoky methanolu, ethanolu, propanolu, isopropanolu, octanu ethylnatého a jejich výsledná spektra zobrazuje Obr. 36. Samotné měření probíhalo vždy totožným způsobem, kdy se do skleněné vialky napipetovaly 2 ml roztoku. Po proměření byla vialka vložena do nástavce, který byl v přímém kontaktu s laserem o energii 50 mW. Po několika vteřinách měření bylo zaznamenané příslušné spektrum.



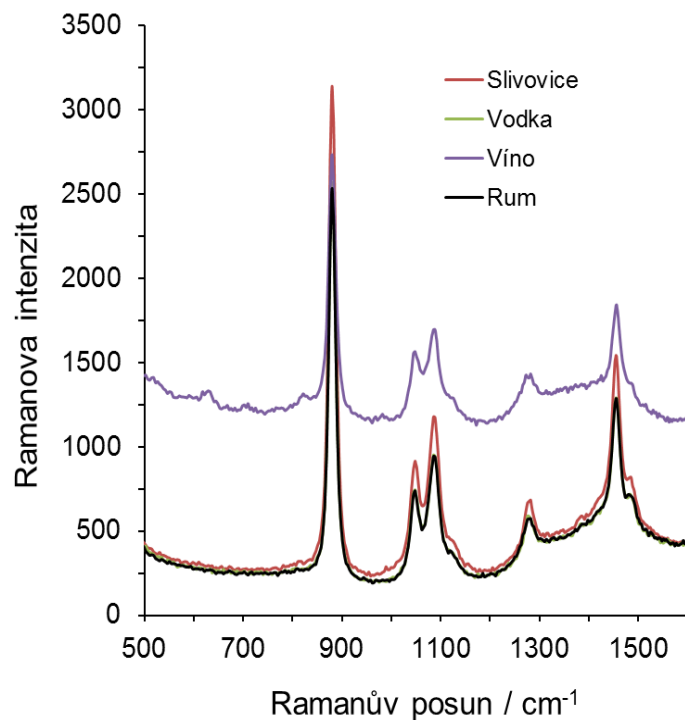
Obr. 36: Ramanova spektra vybraných komponent. Parametry Ramanovy spektroskopie: Energie laseru 50 mW, integrační čas 1 s, počet skenů 5.

Z Obr. 36 je patrné, že Ramanovu spektroskopii lze považovat za účinný nástroj při rozlišení ethanolu vedle methanolu, neboť jednotlivá spektra se dostatečně liší. Pás odpovídající molekule ethanolu se nachází při Ramanově posunu 880 cm^{-1} , zatímco methanol při Ramanově posunu 1020 cm^{-1} .

Následně byly proměřeny kalibrační roztoky obsahující 5-40 % ethanolu. V výsledných spektra zobrazuje Obr. 37. Zde bylo potvrzeno, že pás odpovídající molekule ethanolu se nachází při Ramanově posunu 880 cm^{-1} a jeho intenzita výrazně roste se zvyšující se koncentrací. Po vyhodnocení naměřených spekter byla získána kalibrační křivka ve tvaru $y=129.02x-86.107$ s $R^2=0.9951$. Obdobným způsobem byly změřeny vzorky piva, bílého vína, rumu, vodky a domácí slivovice a výsledná spektra ilustruje Obr. 38.

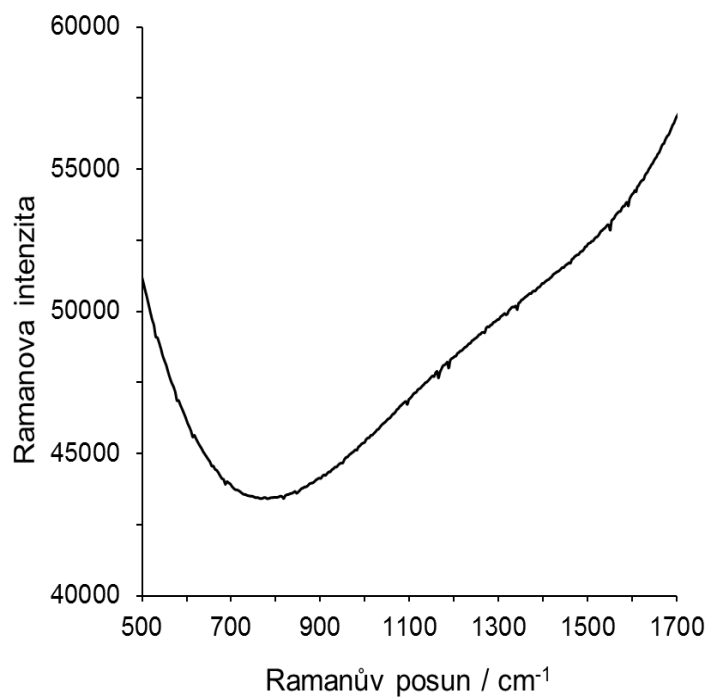


Obr. 37: Ramanova spektra 5-40% ethanolu. Parametry Ramanovy spektroskopie: Energie laseru 50 mW, integrační čas 1 s, počet skenů 5.



Obr. 38: Ramanova spektra lihovin ředěných v poměru 1:1 a neředěného vína. Parametry Ramanovy spektroskopie: Energie laseru 50 mW, integrační čas 1 s, počet skenů 5.

Pivo Primátor 24° nelze pomocí Ramanovy spektroskopie změřit, respektive spektrum nemá patřičný charakter (viz Obr. 39).



Obr. 39: Ramanovo spektrum piva Primátor 24°. Parametry Ramanovy spektroskopie: Energie laseru 50 mW, integrační čas 1 s, počet skenů 5.

Na základě Obr. 39 lze konstatovat, že analyzované tmavé pivo obsahovalo větší množství vedlejších látek vzniklých během svrchního kvašení, které zabránily rozptylu světla na molekulách ethanolu. Nicméně pro analýzu zbylých alkoholických nápojů je Ramanova spektroskopie dostačující a naměřené výsledky zobrazuje Tab. 3.

Tab. 3: Výsledky analýzy vybraných lihovin, piva a vína.

Vzorek	ADH biosenzor nalezený obsah EtOH (%)	Deklarovaný obsah EtOH (%)	Referenční metoda nalezený obsah EtOH (%)	Návratnost (výtěžnost) (%)
Rum Liberté	36,72±0,8	37,5	36,24	97,92
Vodka Božkov	36,7±0,5	37,5	37,11	97,87
Domácí slivovice	52,61±0,5	—	44,6	—
Bevno Pálava	79,9±0,7	11,5	11,76	>> 100
Pivo Primátor 24°	36,81±0,5	10,5	—	>> 100

Hodnoty uvedeny jako průměr ± průměrná odchylka pro minimálně 3 opakování.

Z Tab. 3 je patrné, že výsledky měření obdržené ADH biosenzorem na bázi SPCE/GR/ADH/RhO₂ a Ramanovou spektroskopií si jsou velice blízké. Obsah ethanolu v rumu byl přesněji změřen za použití ADH biosenzoru, zatímco obsah ethanolu ve vodce byl přesněji určen Ramanovým spektrometrem. Naměřené obsahy ethanolu ve slivovici se mírně lišily, o cca ± 5 %, ani nebyla k dispozici deklarována hodnota, neboť se jednalo o anonymní domácí produkt bez jakékoli specifikace.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byl v elektroanalytické skupině KAlCh poprvé testován amperometrický biosenzor na bázi alkoholdehydrogenázy, určený k detekci a stanovení ethanolu v alkoholických nápojích.

Při konstrukci amperometrického převodníku byly testovány uhlíkové elektrodové materiály, jmenovitě grafen, uhlíkové vícevrstevné nanotrubičky a uhlíkový inkoust. Cyklická voltametrie posloužila k porovnání vlastností výše zmíněných elektrodové materiálu. Bylo zjištěno, že pro roli transduktoru se nejvíce hodí grafen, jelikož dobře interaguje s NAD^+ a mediátorem – RhO_2 . Naproti tomu jako nejméně vhodný se ukázal tradiční uhlíkový inkoust, a to z důvodu vysokého proudového pozadí.

K imobilizaci ADH a NAD^+ byl použit glutaraldehyd a Nafion. Bylo zjištěno, že způsob založený na mnohonásobném vrstvení jednotlivých komponent a imobilizačních složek je zcela neefektivní a v systémech pracujících s kontinuálním tokem dochází k jejich souvislému vyplavování. Oproti tomu biosenzory utvořené z tzv. kompozitní směsi, jež se tvoří smícháním všech komponent a imobilizačních složek dohromady, vykazují vysokou stabilitu a nedochází k vyplavování jednotlivých komponent.

Pro získání dostatečně citlivého ADH biosenzoru muselo být optimalizováno množství jednotlivých komponent utvářející biosenzor, tj. ADH, NAD^+ , glutaraldehyd a Nafion. S již nalezenou optimální konfigurací biosenzoru byly poté optimalizovány pracovní podmínky průtokové injekční analýzy (FIA), která byla shledána jako vhodný měřicí režim pro stanovení obsahu ethanolu ve vybraných alkoholických nápojích.

Analýzou modelového roztoku 3% ethanolu bylo potvrzeno, že ADH biosenzor je dostatečně citlivý, kdy mez stanovitelnosti byla odhadnuta na 1,12 % (v/v) ethanolu a mez detekce 0,33 % (v/v) ethanolu. Přesnost ADH biosenzoru byla matematicky vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka o hodnotě cca $\pm 2,4$ %.

Navržená konfigurace i pracovní postup s biosenzorem na bázi SPCE/GR/ADH/ RhO_2 byl pak testován na stanovení obsahu ethanolu v modelovém vzorku. Ukázalo se, že dosavadní prototyp není zatím vhodný pro analýzu nápojů s nižším obsahem ethanolu a složitější maticí – tj. piva a vína. Naměřený obsah ethanolu byl v porovnání se skutečnou hodnotou značně vyšší. Tento jev lze vysvětlit výskytem většího množství dalších elektroaktivních látek, které se na povrchu pracovní elektrody v sestavě ADH biosenzoru rovněž oxidují, především pravděpodobně přítomné antioxidanty.

Ke stanovení obsahu ethanolu v lihovinách s vyššími obsahy ethanolu a méně složitou matricí však již testovaný biosenzor poskytl uspokojivé výsledky. Se slušnou přesností byl pomocí FIA s amperometrickou detekcí stanoven obsah ethanolu v rumu, vodce a v domácí slivovici. Bylo tak zjištěno, že rum obsahuje $36,72 \pm 0,8$ % ethanolu, při deklarované hodnotě 37,5 %. Rovněž byl zjištěn obsah ethanolu ve vodce, jenž odpovídal hodnotě $36,7 \pm 0,5$ %, kdy deklarovaná hodnota je 37,5%. Taktéž proběhla analýza domácí slivovice, kdy byl zjištěn obsah ethanolu $52,6 \pm 0,5$ %.

Jako referenční metoda byla použita Ramanova spektroskopie, v podobě přenosného analyzátoru firmy *Metrohm*, jenž byl použit k ověření výsledků naměřených amperometrickým biosenzorem typu SPCE/GR/ADH/RhO₂. Analýzou příslušných šarží stejných alkoholických nápojů bylo zjištěno, že výsledky obdržené s ADH biosenzorem a pomocí Ramanova spektrometru si jsou velice blízké.

V budoucnosti je třeba věnovat úsilí pro další zefektivnění imobilizační techniky, a to v souvislosti s potlačením možných interferencí elektroaktivních látek. Zde se např. nabízí zařadit do sestavy biosenzoru dodatečnou ochrannou membránu, která by propouštěla pouze ethanol (a event. příbuzné alkoholy), ale zamezila kontaktu potenciálně rušivých elektroaktivních látek s povrchem pracovní elektrody.

Závěrem lze konstatovat, že i úvodní studie s biosenzorem typu SPCE/GR/ADH/RhO₂ ukázala, že jde o slibnou alternativu z pohledu rychlé a jednoduché metody pro orientační testování obsahu alkoholu ve vzorcích typu lihovin.

6. Literatura

1. Parikha M., Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **2016**, 6 (2), 153-159.
2. Nikhil B., Pawan J., Nello F., Pedro E., Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry* **2016**, 60 (1), 1-8.
3. Musa A., Kuswandi B., Recent progress in alcohol biosensors. *OA Alcohol* **2014**, 2 (1), 1-8.
4. Belluzo S. M., Ribone É. M., Lagier M. C., Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sensors* **2008**, 8, 1366-1399.
5. Salimi F., Negahdary M., Mazaheri G., Javadi S., Sayad A., A novel alcohol biosensors based on alcohol dehydrogenase and modified electrode with ZrO₂ nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science* **2012**, 7 (8), 7225-7234.
6. Çolak Ö., Arslan F., Amperometric biosensing of ethanol based on integration of alcohol dehydrogenase with Pt/PPy–PVS/MB electrode. *Turkish Journal of Chemistry* **2015**, 39 (1), 84-95.
7. Alpat Ş., Telefoncu A., Development of an alcohol dehydrogenase biosensor for ethanol determination with toluidine blue O covalently attached to a cellulose acetate modified electrode. *Sensors* **2010**, 10 (1), 748-764.
8. Santos S. A., Pereira C. A., Durán N., Kubota T. L., Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and methyl red on multi-wall carbon nanotube. *Electrochimica Acta* **2006**, 52 (1), 215-220.
9. Nguyen H. H., Kim M., An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology* **2017**, 26 (6), 157-163.
10. Valach M., Šturdík E., Konštrukcie ampérometrických biosenzorov pre rýchle a jednoduché stanovenie etanolu. *Chemické listy* **2006**, 100 (5), 330-336.
11. Guo K., Qian K., Zhang S., Kong J., Yu Ch., Liu B., Bio-electrocatalysis of NADH and ethanol based on graphene sheets modified electrodes. *Talanta* **2011**, 85 (2), 1174-1179.
12. Tkáč J., Švitel J., Šturdík E., Stanovenie významných látok v nápojoch biosenzormi. *Chemické listy* **1993**, 100, 518-526.
13. Jubete E., Loaiza O. A., Pomposo J. A., Grande H., Rodríguez J., Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors. *Journal of Sensors* **2009**, 2009 (5), 6.

14. Rocchita G., Spanu A., Babudieri S., Latte G., Madeddu G., Galleri G., Nuvoli S., Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors* **2016**, 16 (6), 1-21.
15. Ramesh P., Sivakumar P., Sampath S., Phenoxazine functionalized, exfoliated graphite based electrodes for NADH oxidation and ethanol biosensing. *Electroanalysis* **2003**, 15 (23-24), 1850-1858.
16. Hooda V., Kumar V., Gahlaut A., Alcohol quantification: recent insights into amperometric enzyme biosensors. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology: An International Journal* **2018**, 46 (2), 398-410.
17. Polan V., Eisner A., Vytřas K., Simple and rapid determination of ethanol content in beer using an amperometric biosensor. *Chemosensors* **2015**, 3 (2), 169-177.
18. Trivic S., Vladimir L., Structure and function of yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2000**, 65 (4), 207-227.
19. de Smidt O., du Preez J. C., Albertyn J., The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research* **2008**, 8 (7), 967-968.
20. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a7011?lang=en®ion=CZ> [online 29. 01. 2019].
21. Raj S. B., Ramaswamy S., Plapp B. V., Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry* **2014**, 53 (36), 5791-5803.
22. Šturdík E., Valach M., Bienz ýnov ý biosensor na stanovenie etanolu. *Nova Biotechnologica V-I* **2005**, 7-15.
23. Omer A. M., Hassan M., Tamer T. M., Methods of enzyme immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* **2016**, 7 (6), 385-392.
24. Putzbach W., Ronkainen N. J., Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors* **2013**, 13 (4), 4811-4840.
25. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **2012**, 30 (3), 489-511.
26. Shinde P., Musameh M., Gao Y., Robinson A. J., Immobilization and stabilization of alcohol dehydrogenase on polyvinyl alcohol fibre. *Biotechnology Reports* **2018**, 19, 1-7.
27. Belluzo S. M., Ribone É. M., Lagier M. C., Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sensors* **2008**, 8, 1366-1399.
28. Švancara I., Schachl K., Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemick é listy* **1999**, 93 (8), 490-499.

29. Wang J., Kirgöz Ü. A., Mo J-W., Lu J., Glassy carbon paste electrodes. *Electrochemistry Communications* **2001**, 3 (4), 203-208.
30. https://www.researchgate.net/profile/Stella_Girousi/publication/233608570/figure/fig1/AS:341579874226178@1458450396127/Fig-1-Carbon-paste-electrode.png [online 29. 01. 2019].
31. Morrin A., Killard A. J., Smyth M. R., Electrochemical characterisation of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes. *Analytical Letters* **2003**, 36 (9), 2021-2039.
32. González-Sánchez M.I., Gómez-Monedero B., Agrisuelas J., Iniesta J., Valero E., Highly activated screen-printed carbon electrodes by electrochemical treatment with hydrogen peroxide. *Electrochemistry Communications* **2018**, 91, 36-40.
33. http://www.dropsens.com/en/img/productos/screen_printed_elect2.gif [online 30. 01. 2019].
34. Tomchenko A. A., Printed chemical sensors: from screen-printing to microprinting. In: *Encyclopedia of Sensors*. American Scientific Publishers, **2006**, 279-290. ISBN 9781588830562.
35. Pandey P. a Dahiya M., Carbon nanotubes: Types, methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research* **2016**, 1 (4), 15-21.
36. Wang J., Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* **2005**, 17 (1), 7-14.
37. Jeon I-Y., Chang w. D., Nanjundan A. K., Baek J-B., Carbon nanotubes - polymer nanocomposites. IntechOpen (Zagreb, CRO) **2011**. ISBN 978-953-307-498-6.
38. Vidu R., Rahman M., Mahmoudi M., Enachescu M., Nanostructures: A platform for brain repair and augmentation. *Frontiers in Systems Neuroscience* **2014**, 8 (91), 1-24.
39. Manso J., Mena Luz M., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J., Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode. *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (11), 4007-4012.
40. Lee Ch-A., Tsai Y-Ch., Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 138 (2), 518-523.
41. Cai Ch-X., Xue K-H., Zhou Y-M., Yang H., Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode. *Talanta* **1997**, 44 (3), 339-347.

42. Kulkarni A. A., Vaidya I. S., Flow injection analysis: an overview. *Journal of Critical Reviews* **2015**, 4 (2), 19-24.
43. <http://flowinjectiontutorial.com/images/Methods%201.1.4.%20Pic%201.png> [online 18. 02. 2019].
44. Hasík T., Svět piva a piva svět. Grada, Praha; **2013**, 125. ISBN 978-80-247-4648-7.
45. <https://2fdltvvn8wp2rn64ywgk8o17-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2016/08/ale-vs-lager.jpg> [online 25. 04. 2019].
46. Jurkov áM., Olšovská J., Čejka P., Determination of sugars and sacharides in beer. *Kvasný průmysl* **2018**, 64 (2), 58-64.
47. Domin éA., *V úo*. Nakladatelstv íSlovart **2015**, 919. ISBN 978-80-7391-701-2.
48. Markoski M. M., Garavaglia J., Oliveira A., Olivaes J., Marcadenti A., Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. *Nutrition and Metabolic Insights* **2016**, 9, 51-57.
49. Simonov áJ., *O víně*. Nakladatelstv íSlovart **2002**, 224. ISBN 978-80-7391-557-5.
50. https://t4.ftcdn.net/jpg/00/79/36/31/240_F_79363152_K9IX6ydv054KILq2YuJcoUPiM0nOM3eW.jpg [online 25. 04. 2019].
51. Wiśniewska P., Śliwińska-Bartel M., Dymerski T., Wardencki W., Application of gas chromatography to analysis of spirit-based alcoholic beverages. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2014**, 45 (3), 201-225.
52. Harrison J., Ridley N., *Destil áty*. Nakladatelstv íSlovart **2017**, 224. ISBN 978-80-7529-301-5.
53. <https://www.celticwhiskeyshop.com/image/cache/data/Vodka/smirnoff-776x1176.jpg> [online 25. 04. 2019].
54. Höferl M., Stoilova I., Schmidt E., Wanner J., Jirovetz L., Trifonova D., Krastev L., Krastanov A., Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis L.*) essential oil. *Antioxidants* **2014**, 3, 81-98.
55. Becker D., Wirtz D. H., *Velká kniha o rumu*. Nakladatelstv íJOTA **2018**, 320. ISBN 978-80-7565-338-3.
56. https://secure.ce-tescoassets.com/assets/CZ/439/8595010600439/ShotType1_540x540.jpg [online 25. 04. 2019].
57. Tin Win D., Breath alcohol testers-prevents road accidents. *AU Journal of Technology* **2006**, 10 (2), 75-80.

58. Jones W. A., The Relationship between Blood Alcohol Concentration (BAC) and Breath Alcohol Concentration (BrAC): A review of the evidence. In: *Road safety research reports*. Department for Transport: London, **2010**, 1-43. ISBN 9781906581962.
59. <https://www.chem.wisc.edu/deptfiles/genchem/demonstrations/Images/04chemrxn/breathalyzer.jpg> [online 18. 04. 2019].
60. Freudenrich C., How Breathalyzers Work. In: *HowStuffWorks [online]*, **2000**.
Dostupn  z:
<https://electronics.howstuffworks.com/gadgets/automotive/breathalyzer.htm>
61. Wang M-L., Choong Y-M., Su N-W., Lee M-H., A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* **2003**, 11 (11), 133-140.
62. Weatherly Ch. A., Woods R. M., Armstrong D. W., Rapid analysis of ethanol and water in commercial products using ionic liquid capillary gas chromatography with thermal conductivity detection and/or barrier discharge ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62 (8), 1832-1838.
63. Stup  k M., Kocourek V., Kolouchov   I., Hajslov   J., Rapid approach for the determination of alcoholic strength and overall quality check of various spirit drinks and wines using GC-MS. *Food Control* **2017**, 80, 307-313.
64. Yadav P. K., Sharma R. M., Forensic characterization of liquor samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Arab Journal of Forensic Sciences & Forensic Medicine* **2017**, 1 (6), 695-714.
65. Lachenmeier D.W., Godelmann R., Steiner M., Ansay B., Weigel J., Krieg G., Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal* **2010**, 4 (5), 1-13.
66. Shope T. B., Vickers T. J., Mann Ch. K., The direct analysis of fermentation products by Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **1987**, 41 (5), 908-912.
67. Lachenmeier D. W., Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry* **2007**, 101 (2), 825-832.
68. Polshin E., Aernouts B., Saeys W., Delvaux F., Delvaux F. R., Saison D., Hertog M., Nicola   B. M., Lammertyn J., Beer quality screening by FT-IR spectrometry: Impact of measurement strategies, data pre-processings and variable selection algorithms. *Journal of Food Engineering* **2011**, 106 (3), 188-198.

69. Vašková H., Quantitative evaluation of methanol content in beverages based on Raman spectral data. In: *Mathematics and Computers in Biology and Biomedical Informatics*. WSEAS Press, **2013**, 81-85. ISBN 978-960-474-333-9.
70. Pappas Ch., Basalekou M., Konstantinou E., Proxenia N., Evaluation of a Raman spectroscopic method for the determination of alcohol content in Greek spirit Tsipouro. *Current Research in Nutrition and Food Science* **2016**, 4 (2), 1-9.
71. de Marcos S., Galbán J., Albajez R., Castillo J. R., Enzymatic determination of ethanol based on the intrinsic fluorescence of alcohol dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 343 (1-2), 117-123.
72. Březina M., Zuman P., *Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii*. Zdravotnické nakladatelství **1952**, 287-289.
73. Tsai Y-Ch., Huang J-D., Chiu Ch-Ch., Amperometric ethanol biosensors based on poly(vinyl alcohol)-multiwalled carbon nanotube-alcohol dehydrogenase biocomposite. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, 22 (12), 3051-3056.
74. Benchettara A., Benchettara A., Simultaneous electrochemical determination of glucose and ethanol on glassy carbon electrode modified with nickel oxides. *Journal of Materials and Environmental Science* **2016**, 7 (11), 4324-4329.
75. Benchettara A., Benchettara A., Electrochemical determination of ethanol, 2-propanol and 1-butanol on glassy carbon electrode modified with nickel oxide film. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* **2014**, 6 (2), 187-196.
76. Švitel J., Čurilla O., Stanovenie etanolu v pive biosenzorom. *Kvasný Průmysl* **1996**, 42, (7-8), 241-242.
77. Blaedel W. J., Engstrom R. C., Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate, and malate. *Analytical Chemistry* **1980**, 52 (11), 1691-1697.
78. Larsson P-O., Mosbach K., The preparation and characterisation of a water-soluble coenzymically active dextran-NAD⁺. *FEBS Letters* **1974**, 46 (1), 119-122.
79. Luo P., Liu Y., Xie G., Xiong X., Deng S., Song F., Determination of serum alcohol using a disposable biosensor. *Forensic Science International* **2008**, 179 (2-3), 192-198.
80. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure4/178/mfcd00012113.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00012113-medium.png [online 27. 04. 2019].
81. Zhen S., Wang Y., Liu Ch., Xie G., Zou Ch., Zheng J., Zhu Y., A novel microassay for measuring blood alcohol concentration using a disposable biosensor strip. *Forensic Science International* **2011**, 207 (1-3), 177-182.

82. Xu Z., Guo Z., Dong S., Electrogenerated chemiluminescence biosensor with alcohol dehydrogenase and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) immobilized in sol-gel hybrid material. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 21 (3), 455-461.
83. Polan V., Vytřas K., Determination of ethanol in alcoholic drinks using an enzyme biosensor containing alcohol dehydrogenase. *Microorganisms in Industry and Environment*. World Scientific Publishing **2011**, 688-691. ISBN 13-978-981-4322-2.