

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko–technologická

Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných  
povrchově aktivními látkami

Bc. Kateřina Netíková

Diplomová práce

2021

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Electrochemical properties of carbon paste electrodes modified with surfactants

Bc. Kateřina Netíková

Diploma Thesis

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Netíková**  
Osobní číslo: **C19588**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných povrchově aktivními látkami**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. V teoretické části proveďte rešerši na téma „*Uhlíkové pastové elektrody modifikované povrchově aktivními látkami*“, přičemž pozornost zaměřte na konfigurace s vysokým obsahem modifikátoru a také na využití pro voltametrická stanovení biologicky aktivních látek nerozpustných či málo rozpustných ve vodných roztocích.
2. Laboratorně připravte zvolené typy uhlíkové pastové elektrody modifikované povrchově aktivními látkami a proveďte základní charakterizaci pomocí cyklické voltametrie na modelových redoxních párech v nevodných prostředích či v rozpouštědlových systémech – směsích s vodou.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

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: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

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

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných povrchově aktivními látkami 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15.07.2021

Kateřina Netíková

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Milanu Sýsovi, PhD. za trpělivost, veškeré poskytnuté rady a ochotný přístup při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr. za vedení této práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

## ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá elektrochemickými vlastnostmi uhlíkových pastových elektrod modifikovaných tenzidy. Teoretická část uvádí obecný popis uhlíkových pastových elektrod, dále specifikuje komponenty, které je možno k přípravě elektrodového materiálu použít, včetně modifikátorů—zde povrchově aktivních látek v pevném stavu. V další části jsou uhlíkové pastové elektrody charakterizovány z jejich elektrochemického hlediska a na závěr je pozornost věnována stručnému popisu nepolárních biologicky aktivních látek. Experimentální část se zaměřuje na výběr optimálních složek pro přípravu elektrodového materiálu a následného testování na standardních redoxních párech pro nevodná prostředí a na modelových analytech.

## KLÍČOVÁ SLOVA

uhlíková pastová elektroda, tenzidy, nepolární biologicky aktivní látky, cyklická voltametrie

## TITLE

Electrochemical properties of carbon paste electrodes modified with solid surfactants

## ANNOTATION

This diploma thesis is focused on electrochemical properties of carbon paste electrodes modified with surfactants. Theoretical part presents general description of carbon paste electrodes, then concerns the main components for preparing the carbon paste electrode material, specifies carbon paste electrodes via their electrochemical properties and possible modifiers; herein, the surfactants in the solid state. Finally, attention is paid to the description of non-polar biologically active substances. The experimental part deals with the selection of optimal components for the preparation of the electrodes of choice and their testing with standard redox pairs for non-aqueous media and model analytes.

## KEYWORDS

carbon paste electrode, surfactants, non-polar biologically active substances, cyclic voltammetry

# OBSAH

ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST.....	17
1. Uhlíkové pastové elektrody.....	17
1.1. Uhlíková pasta.....	19
1.1.1. Uhlíkové materiály.....	19
1.1.1.1. Grafit.....	20
1.1.1.2. Skelný uhlík.....	20
1.1.1.3. Borem dopovaný diamant.....	21
1.1.1.4. Uhlíkové nanomateriály.....	21
1.1.1.4.1. Grafen.....	21
1.1.1.4.2. Fullereny.....	22
1.1.1.4.3. Uhlíkové nanotrubičky.....	22
1.1.2. Pastové kapaliny.....	22
2. Povrchově aktivní látky.....	23
2.1. Kationaktivní tenzidy.....	24
2.2. Anionaktivní tenzidy.....	25
2.3. Amfolytické tenzidy.....	25
2.4. Neiontové tenzidy.....	25
3 Modifikované uhlíkové pastové elektrody.....	26
3.1. Tenzidy modifikované CPEs.....	26
4. Charakterizace uhlíkových pastových elektrod.....	28
4.1. Vodivost elektrodového materiálu.....	28
4.2. Redoxní páry pro nevodná prostředí.....	28
4.2.1. Kinetika přenosu elektronu.....	29
5. Nepolární elektroaktivní biologicky aktivní látky.....	30
5.1. Lipofilní vitaminy.....	30
5.1.1. Vitamin A.....	30
5.1.2. Vitamin D.....	30
5.1.3. Vitamin E.....	31



5.1.4. Vitamin K.....	32
5.2. Steroidní látky.....	32
5.2.1. Cholesterol.....	32
5.2.2. Steroidní hormony.....	33
5.2.3. Žlučové kyseliny.....	34
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
6. Elektrochemické chování tenzidy modifikovaných CPEs.....	35
6.1. Použité chemikálie a materiály.....	35
6.2. Přístrojové vybavení.....	37
6.3. Příprava modifikovaných elektrod.....	38
6.4. Příprava pracovních a zásobních roztoků.....	38
6.5. Pracovní podmínky a parametry voltametrických technik.....	38
6.5.1. Výběr optimálního složení pasty.....	39
6.5.2. Množství surfaktantu.....	39
6.5.3. Vliv rozpouštědla.....	39
6.5.4. Kinetika elektrodových reakcí.....	39
6.5.5. Elektrochemické chování modelových analytů.....	40
6.5.6. Měření kalibrační závislosti modelových analytů.....	40
7. Výsledky a diskuse.....	41
7.1. Výběr pastové kapaliny.....	41
7.2. Výběr uhlíkového prášku.....	42
7.3. Výběr surfaktantu.....	42
7.4. Optimální množství surfaktantu.....	46
7.5. Vliv rozpouštědel.....	47
7.6. Kinetika elektrodových reakcí.....	48
7.7. Analýza modelových analytů.....	53
7.7.1. Elektrochemické chování VD3.....	53
7.7.2. Elektrochemické chování $\beta$ -estradiolu.....	54
7.7.3. Možnosti voltametrického stanovení cholekalciferolu a $\beta$ -estradiolu.....	55
7.7.3.1. Diferenční pulsní voltametrie cholekalciferolu.....	55

7.7.3.2. Diferenční pulsní voltametrie $\beta$ -estradiolu.....	58
8. Závěr.....	60
9. Reference.....	61

# SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<b>Obrázek 1.</b> Titulní stránka referátu k jubileu elektrod z uhlíkové pasty na Univerzitě Pardubice a přebal monografie, která je věnována CPE.....	15
<b>Obrázek 2.</b> Uhlíková pastová elektroda.....	17
<b>Obrázek 3.</b> Různé formy uhlíku: diamant (a), grafit (b), lonsdaleit (c), fulleren C60 (d), C540 (e) a C70 (f), amorfnní uhlík (g) a uhlíková nanotrubiice (h).....	20
<b>Obrázek 4.</b> Rozdělení tenzidů.....	24
<b>Obrázek 5.</b> Schématická struktura povrchu CPE modifikovaného SDS.....	26
<b>Obrázek 6.</b> Reverzibilní jednoelektronová oxidace ferrocenu.....	28
<b>Obrázek 7.</b> Pravděpodobný průběh elektrochemické oxidace cholekalciferolu.....	31
<b>Obrázek 8.</b> Pravděpodobný průběh elektrochemické oxidace $\beta$ -estradiolu.....	33
<b>Obrázek 9.</b> Třielektrodový systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem.....	37
<b>Obrázek 10.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/SDS obsahující 20 % (w/w) PO (červeně), SO (zeleně) a TCP (oranžově).....	41
<b>Obrázek 11.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE složené z 50 % (w/w) SDS, 20 % (w/w) PO a 30 % (w/w) grafitového prášku CR-2 (červeně) nebo 30 % (w/w) grafitového prášku CR-5 (purpurově).....	42
<b>Obrázek 12.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/SDS.....	43
<b>Obrázek 13.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/CPC.....	44
<b>Obrázek 14.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/BTC.....	44
<b>Obrázek 15.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/CTAB.....	44
<b>Obrázek 16.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/DDAB.....	45
<b>Obrázek 17.</b> Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/DMIC.....	45
<b>Obrázek 18.</b> Cyklické voltamogramy CPEs s obsahy 20 (zeleně), 30 (modře), 40 (oranžově), 50 (růžově) a 60 % (w/w) SDS (purpurově) při počátečním potenciálu -0,4 V a konečných potenciálech +1,2 V, +1,4 V, +1,6 V a +1,8 V.....	46
<b>Obrázek 19.</b> Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ferrocenu obdržené na CPE/SDS (A) a GCE (B) v MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{LiClO}_4$ při rychlostech skenování $100\text{--}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i tradiční grafy kinetických závislostí.....	49
<b>Obrázek 20.</b> Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ferrocenu obdržené na CPE/CPC v MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{LiClO}_4$ při rychlostech skenování $100\text{--}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i grafy typických kinetických závislostí.....	51

<b>Obrázek 21.</b> Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ <i>p</i> -hydrochinonu obdržené na CPE/SDS (A) a GCE (B) v MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{LiClO}_4$ při rychlostech skenování $100\text{-}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i typické průběhy kinetických závislostí.....	52
<b>Obrázek 22.</b> Opakující se cyklická voltametrie (5 cyklů) $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cholekalciferolu na CPE/SDS a GCE, rychlost skenování 50 (vlevo) a $100 \text{ m}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (vpravo).....	54
<b>Obrázek 23.</b> Opakující se cyklická voltametrie (5 cyklů) $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\beta$ -estradiolu na CPE/SDS a GCE, rychlost skenování 50 (vlevo) a $100 \text{ m}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (vpravo).....	55
<b>Obrázek 24.</b> DPV voltamogramy 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ VD3 obdržené na CPE/SDS (modré) a GCE (černé) v MeCN s $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{LiClO}_4$ při $E_{\text{ampl}} = 60 \text{ mV}$ , $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$ , $t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$ a $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	56
<b>Obrázek 25.</b> Kalibrační závislosti VD3 pro CPE/SDS (modrá) a GCE (černá).....	57
<b>Obrázek 26.</b> DPV voltamogramy 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\beta$ -estradiolu obdržené na CPE/SDS (modré) a GCE (černé) v MeCN s $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{LiClO}_4$ při $E_{\text{ampl}} = 60 \text{ mV}$ , $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$ , $t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$ a $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	58
<b>Obrázek 27.</b> Kalibrační závislosti $\beta$ -estradiolu pro CPE/SDS (modrá) a GCE (černá).....	59
<b>Tabulka 1.</b> Seznam použitých chemikálií a elektrodoých materiálů.....	36
<b>Tabulka 2.</b> Vliv rozpouštědla na elektrochemické chování CPE/SDS.....	47
<b>Tabulka 3.</b> Porovnání CPE/SDS, CPE/CPC a GCE pomocí $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ redoxního páru.....	50
<b>Tabulka 4.</b> Porovnání CPE/SDS a GCE pomocí <i>p</i> -chinon/ <i>p</i> -hydrochinon redoxního páru...	53
<b>Tabulka 5.</b> Porovnání DPV v elektroanalýze VD3.....	57
<b>Tabulka 6.</b> Porovnání voltametrických metod v elektroanalýze $\beta$ -estradiolu.....	59

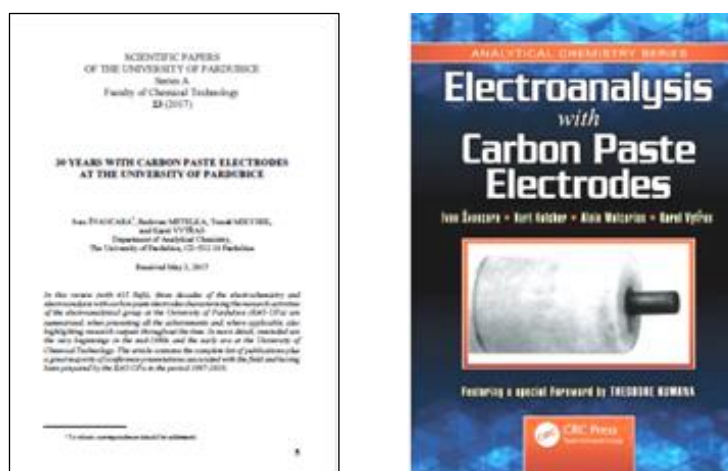
## SEZNAM ZKRATEK

$\alpha$ -TOH	$\alpha$ -tokoferol
BDD	borem dopovaný diamant
BTC	benzethonium chlorid
CPC	monohydrát chloridu hexadecylpyridinia
CPE	uhlíková pastová elektroda
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CV	cyklická voltametrie
DMIC	1,3-didecyl-2-methylimidazolium chlorid
DDAB	didodecyldimethylammonium bromid
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E_{\text{cat}}^{\text{a}}$	anodický potenciál
$E_{\text{cat}}^{\text{c}}$	katodický potenciál
$E_{\text{p}}$	potenciál píku
EtOH	ethanol
Fc/Fc <sup>+</sup>	redoxní pár ferrocenu
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
$I_{\text{p}}$	proud píku
$I_{\text{b}}$	proudové pozadí
$ I_{\text{p}}^{\text{a}}/I_{\text{p}}^{\text{c}} $	poměr proudových odezev
$\log I_{\text{p}}$	logaritmus proudu píku
$\log v$	logaritmus rychlosti skenování
LiClO <sub>4</sub>	chloristan lithný
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MCPEs	modifikované pastové elektrody
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
PO	parafinový olej
PP	polypropylen

PW	parafinový vosk
R	ohmický odpor
$R^2$	koeficient determinace
RSD	relativní směrodatná odchylka
SCE	nasycená kalomelová elektroda
SDS	dodecylsírán sodný
SO	silikonový olej
TCP	trikresylfosfát
VA	vazelína
$v^{1/2}$	druhá odmocnina posuvu potenciálu
VD3	vitamin D <sub>3</sub>

# ÚVOD

Elektrochemická a elektroanalytická měření s uhlíkovými pastovými elektrodami (CPEs) mají na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice více jak třicetiletou tradici a po téměř stejnou dobu představují i poznávací značku elektro-analytické skupiny jak u nás, tak i ve světě. Velmi rozmanité aktivity při výzkumu a využití CPE dokládá i nedávno uveřejněný referát [1], který zahrnuje na čtyři stovky odkazů na odborná sdělení, zahrnující původní publikace, konferenční příspěvky, ale i souhrnné referáty a v neposlední řadě vůbec první monografii, vydanou v prestižním nakladatelství v USA [2], na níž mají zásadní podíl právě pardubičtí elektro-analytikové. Oba spisy ([1,2]; viz také obr. 1 dole) citují i několik desítek diplomových prací z UPa, jinými slovy, i naši diplomanti mají na výsledcích a věhlasu pardubické elektrochemické školy na poli elektroanalýzy s CPE svůj podíl.



**Obr. 1.** Titulní stránka referátu k jubileu elektrod z uhlíkové pasty na Univerzitě Pardubice a přebal monografie, která je věnována CPE (viz [1, 2]).

Na počátku třetí dekády nového tisíciletí, ve složitém období pandemie koronaviru COVID-19, vědecko-výzkumná práce s CPE pokračuje, a to společně s příbuznými uhlíkatými konfiguracemi typu elektrody ze skelného grafitu (GCE) nebo s litograficky tištěnými senzory a články, v posledních letech se stále výraznější orientací na klinickou, farmaceutickou a potravinářskou analýzu biologicky aktivních látek. A řešení konkrétních problémů z této oblasti, v současnosti preferované, jsou opět věnovány četné diplomové práce, namátkou z těch nedávných třeba příspěvky k vývoji metod ke stanovení některých přírodních alkaloidů, sloučenin ze skupiny přírodních olejů, vitamínů či vybraných léčiv a potravinových doplňků.

Svým způsobem zcela novým příspěvkem v takovém směřování je i tato diplomová práce, věnovaná možnostem CPE modifikovaných příměsí povrchově aktivních látek v pevném

stavu. Právě tato úprava činí z elektrod na bázi uhlíkové pasty nástroj, vhodný pro měření v nevodných prostředích [3], a tím i k rozšíření použitelnosti CPE pro studium elektrochemického chování a eventuálně i k elektro–analytickému stanovení celé řady organických sloučenin, mezi nimi i mnohých biologicky aktivních látek, nerozpustných ve vodných roztocích.

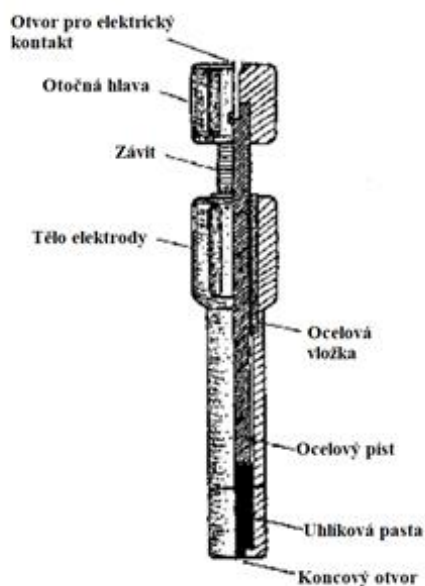


# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Uhlíkové pastové elektrody

V elektroanalytické chemii jsou široce rozšířené pevné uhlíkové elektrody, ať už z grafitu, skelného uhlíku či bórem dopovaného diamantu (BDD). Za zvláštní typ těchto elektrod lze považovat i uhlíkové pastové elektrody. Jedná se totiž o heterogenní uhlíkové elektrody, kdy Teflonové elektrodové pouzdro je naplněno uhlíkovou pastou, složenou z vodivého uhlíkového prášku a pojiva, jež mechanicky váže jednotlivé částice uhlíku, jak je znázorněno na Obr. 2. Pastovým pojivem je většinou nevodivá viskózní nepolární kapalina. Při výběru z velké nabídky pastových pojiv je třeba volit takové pojivo, které má nízkou těkavost, vysokou čistotu a nízkou cenu. Složení pasty silně ovlivňuje reaktivitu elektrod, přičemž zvýšení obsahu pastové kapaliny snižuje rychlost přenosu elektronů stejně jako příspěvek pozadí proudu. Pro srovnání grafitové elektrody poskytují rychlý přenos elektronů (hodnoty se blíží k hodnotám kovových elektrod).

CPEs jsou oblíbené především pro jejich obnovitelný a modifikovatelný povrch, jejich nízkou pořizovací cenu, široký potenciálový rozsah a chemickou inertnost. Uhlíková pasta představuje vhodný elektrodový materiál pro snadné začlenění další komponenty, jež propůjčuje vzniklé heterogenní elektrodě jedinečné vlastnosti [1–4]. Tyto látky se obecně označují jako modifikátory. Modifikátor je jednoduše smíchan s uhlíkovou pastou v keramické třecí misce, kdy musí být modifikátor homogenně rozptýlen v celém objemu tak, aby byly zaručeny konstantní pracovní podmínky během měření.



**Obr. 2.** Uhlíková pastová elektroda (podle [1,2]).

Mezi modifikátory CPEs patří různé látky. Například na univerzitě ve Varšavě byl pro stanovení fenolů použit minerál halloyzit s jeho obsahem 10 % (w/w) [5]. Pro další stanovení fenolů byly za spolupráce třech institutů v Indonésii použity nanočástice stříbra s obsahem 5 % (w/w) [6]. Mezi kurióznější modifikátory patří skořápky vlašských a lískových ořechů, které byly použity pro stanovení 4-chlorfenolu s obsahem skořápek 5 a 10 % (w/w) [7]. Jako předposlední příklad modifikátoru uvedu arabskou gumu, která byla použita pro stanovení 4-aminofenolu s obsahem 5 % (w/w) [8]. Elektrody modifikované tenzidy s nejčastějším obsahem tenzidu 30 % (w/w) představují specifické senzory, které lze použít při voltametrických měřeních v ryze organických rozpouštědlech [9]. Elektrodám modifikovaným právě povrchově aktivními látkami je věnována celá diplomová práce. Tudíž i v teoretické části lze nalézt samostatnou kapitolu věnovanou tomuto tématu.

CPEs zhotovené z běžného grafitového prášku a silikonového nebo parafínového oleje mají tendenci vykazovat nestabilní chování v organických pracovních médiích či v jejich směsích s vodou (voda/metanol, voda/acetonitril apod.) v důsledku rozpouštění pastové kapaliny [10]. Dále je důležité zmínit, že typ zvoleného uhlíku zásadně ovlivňuje možnosti výběru pracovního média. Například CPEs připravené z prášku ze skelného uhlíku jsou stabilní pro směsná média i s obsahem organického rozpouštědla až 80 % (V/V) [11]. Nicméně i výběr pastové kapaliny může významně ovlivnit použití finálních heterogenních senzorů, kdy například CPEs připravené z vysoce viskózních kapalin (vosky) mohou taktéž odolávat přítomnosti vysokého obsahu organické fáze [12].

Důležitou vlastností pro všechny elektrody je jejich potenciálové okno, tedy pracovní rozsah, ve kterém lze uskutečnit elektrochemické (elektrodové) reakce. V případě CPEs je potenciálové okno široké, může se pohybovat v rozmezí od -1,5 až +1,3 V dle závislosti na pH pracovního média. Potenciálový limit v anodické oblasti je přisuzován proudům, které jsou způsobeny oxidací základního elektrolytu, kde se může uplatňovat oxidace povrchu samotné elektrody. Katodický limit potenciálu je dán hodnotou přepětí vodíku. Oba potenciálové limity se dají ovlivnit úpravou uhlíkového prášku a pastové kapaliny, což je velkou výhodou CPEs a umožňuje měřit systémy s extrémně pozitivními potenciály.

Mezi další vlastnost těchto elektrod patří reprodukovatelnost proudové odezvy. U CPEs je poněkud horší než u elektrod z kompaktních materiálů či rtuťové kapkové elektrody a pohybuje se většinou okolo 5 % relativní směrodatné odchylky (RSD). Je to dáno tím, že se nedokonale obnovuje jejich povrch.

Nevýhodou při přípravě past je přítomnost atmosférického kyslíku v pórech uhlíku a v pojivové kapalině. To má za následek vykazování nezanedbatelného proudu způsobeného

elektrodovou redukcí přítomného kyslíku v pastě, což má rušivý vliv při aplikaci těchto elektrod v oblasti katodických potenciálů.

Při měření s CPEs lze dosáhnout nízkých mezí detekcí. Přímou analýzou na nemodifikovaných CPEs lze dosáhnout meze detekce od  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v závislosti na typu analytu. Použití CPEs je v elektroanalytické chemii široké, neboť je lze aplikovat pro voltametrická stanovení jak anorganických, tak i organických sloučenin, které vykazují biologicky aktivní účinky. V užším slova smyslu se může jednat o léčiva a jejich metabolity, vitamíny, pesticidy, alkaloidy atd. [13].

## 1.1. Uhlíková pasta

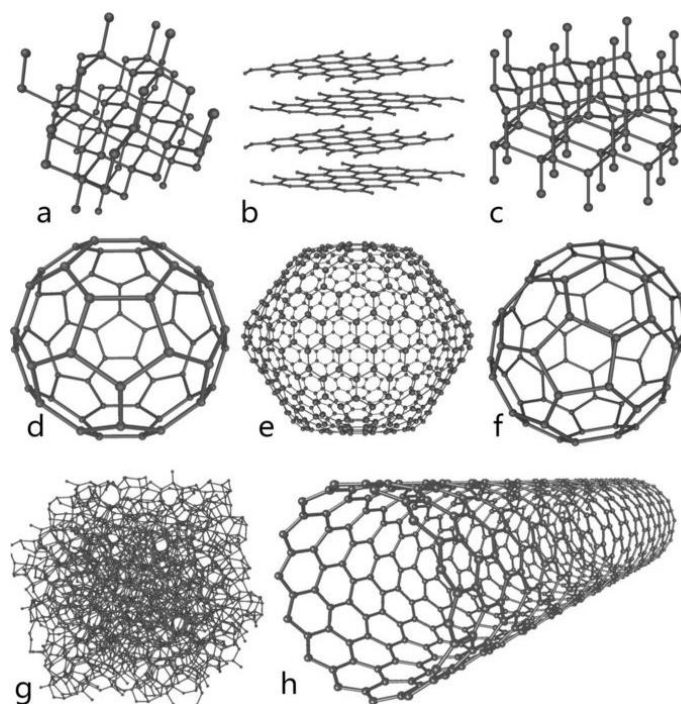
V základu se jedná o směs uhlíkového prášku, jakožto elektrodového materiálu, s kapalným pojivem, které slouží ke spojení jednotlivých uhlíkových částic. Optimální výběr obou složek pasty je důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledné chování elektrody. Proto je nutné brát v potaz vlastnosti obou zmiňovaných složek pasty.

Pro přípravu CPEs je dobré volit takové uhlíkové prášky, které mají velikost částic od 1 do 20  $\mu\text{m}$  (větší částice vytvářejí spíše drsnou strukturu a nepříznivé mechanické a elektrochemické vlastnosti, v případě uhlíkových nanočástic se velikost pohybuje od 1 do 100 nm), jsou vysoce chemicky čisté (vyvarování se nežádoucích interferencí), mají jednotnou velikost částic a nízkou adsorpční schopnost (adsorpce kyslíku a elektroaktivních nečistot). Kromě velikosti uhlíkových částic hraje důležitou roli i samotný tvar částic na opakovatelnost naměřených výsledků, neboť čím blíže se uhlíkové částice blíží ideálnímu tvaru (koule), tím je zaručena větší homogenita pasty [14]. Příklady používaných uhlíkových materiálů jsou uvedeny v nadcházejících kapitolách.

### 1.1.1. Uhlíkové materiály

Na Obr. 3 jsou zobrazeny uhlíkové materiály, které se používají při výrobě nebo modifikaci CPEs. Mezi tyto materiály patří diamant, grafit, grafen (jednovrstevný grafit), lonsdaleit, fullereny, amorfni uhlík a uhlíkové nanotrubičky. Dále je možné použít alternativní formy výše zmíněných materiálů, kterými jsou koks, saze, živočišné uhlí, šungit (porézní polyminerální uhlíková hornina) atd.

Následující podkapitoly jsou věnovány popisu jednotlivých uhlíkových materiálů a jejich základní charakterizaci.



**Obr. 3.** Různé formy uhlíku: diamant (a), grafit (b), lonsdaleit (c), fulleren C60 (d), C540 (e) a C70 (f), amorfní uhlík (g) a uhlíková nanotrubička (h) [15].

#### 1.1.1.1. Grafit

Grafit představuje nejčastější přírodní modifikaci uhlíku, jehož struktura se skládá z vrstev tzv. grafenu, které jsou tvořeny uhlíky navázanými do šestiúhelníků. Na každý uhlík jsou kovalentně vázány další tři uhlíky (hybridizace  $sp^2$ ). Tvoří se zde rozsáhlý systém delokalizovaných elektronů ( $\pi$ -systém). Jednotlivé vrstvy spolu drží pouze pomocí slabých interakcí, tzv. van der Waalovy síly.

Jedná se o formu čistého uhlíku, která se běžně vyskytuje jako černé krystalové vločky. Mezi jeho unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti patří vlastnosti kovů a nekovů, díky kterým je ideální pro mnoho průmyslových a technologických aplikací. Mezi kovové vlastnosti patří vysoká tepelná a elektrická vodivost. Mezi nekovové vlastnosti patří inertnost vůči většině chemických činidel (silné kyseliny a zásady, rozpouštědla a tavidla), vysoká tepelná stabilita a mazivost. Tvrdost grafitu je na prvním místě Mohsovy stupnice. Je klasifikován do několika tříd: amorfní, krystaly, krystalové vločky a syntetický grafit [16]. Nejčastěji používané grafitové prášky pro přípravu uhlíkových past mají velikost částic do 2  $\mu\text{m}$  nebo 5  $\mu\text{m}$  [17].

#### 1.1.1.2. Skelný uhlík

Jedná se o plynem nepropustný, elektricky vodivý materiál, který je vysoce chemicky inertní. Vyrábí se karbonizací uhlovodíků s vysokou molekulovou hmotností. Pro vysokou

chemickou čistotu skelného uhlíku se jeho konečná fáze zpracování pohybuje při teplotách 1500–2500 °C. Z tohoto materiálu se vyrábí pracovní elektrody ze skelného uhlíku. Tyto elektrody jsou vhodné pro měření v potenciálním rozsahu přibližně od -0,8 V do +1,2 V v kyselém prostředí. GCE se vyrábí lisováním sklovitého uhlíku do tyče z epoxidové pryskyřice. Tato tyč se vytvoří nalitím roztavené pryskyřice mezi dvě části skleněné trubice. Vnější část skleněné trubice se odstraní a vnitřní část se ponechá. Do vnitřní trubice se nalije malé množství rtuti, do které je poté vložen měděný drát [18, 19]. Pro přípravu uhlíkových past se běžně používá prášek ze skelného uhlíku o velikosti částic 2–12 μm [17].

#### 1.1.1.3. Borem dopovaný diamant

Přírodní nebo nedopovaný diamant je elektrický izolátor a nelze ho použít jako elektrodový materiál. Po dopování borem (obvykle mezi  $10^{18}$  a  $10^{21}$  atomů na  $\text{cm}^3$ ) je dosaženo snížení měrného odporu a vzniká tak materiál pro elektrochemické aplikace [20]. BDD lze tedy charakterizovat jako polokov, který se vyznačuje dobrou vodivostí a rychlým přenosem elektronů. Díky jeho vlastnostem se využívá jako elektrodový materiál. Mezi jeho výhody, oproti elektrodovým materiálům, jako je např. zlato, platina nebo skelný uhlík, patří široké elektrochemické potenciálové rozmezí pro vodná prostředí (3–3,5 V), pro nevodná média (5–7,5 V), a také malý a stabilní proud pozadí [21].

#### 1.1.1.4. Uhlíkové nanomateriály

Tyto materiály mají vysokou aktivní plochu, a tudíž senzory z nich vyrobené většinou vykazují vysokou citlivost. Dále je známá vysoká sorpce nepolárních organických sloučenin na tyto nanomateriály, jež se využívá při akumulaci analytů během stripping voltametrie. Pro svoji vysokou pořizovací cenu bývají uhlíkové nanomateriály často používány jako modifikátory CPEs, kdy je možné použít jejich redukované formy (H terminovaný uhlík), jejich oxidované formy či dokonce složitěji chemicky modifikované varianty [22]. Níže jsou stručně popsány nejčastěji používané uhlíkové nanomateriály v elektroanalytické chemii.

##### 1.1.1.4.1. Grafen

Tato forma uhlíku, která je strukturou podobná grafitu, je tvořena jednou vrstvou atomů uhlíku uspořádaných do tvaru šestiúhelníků, které jsou spojeny pomocí  $\text{sp}^2$  vazeb. Jeho elektrony se chovají tak, jako kdyby neměly žádnou efektivní hmotnost a pohybovaly se téměř rychlostí světla. Díky uspořádání atomů patří grafen mezi jedny z nejlehčích

a nejpružnějších materiálů. Mezi jeho další vlastnosti spadá jak elektrická a tepelná vodivost, tak vysoká světelná propustnost [23].

#### *1.1.1.4.2. Fullereny*

Jedná se o polyedrické, uhlíkové útvary, ve kterých jsou  $sp^2$  uhlíky vázány ke třem sousedním uhlíkům v uspořádání pětičlenných a šestičlenných kruhů. Mezi jejich unikátní vlastnost patří to, že když je do fullerenu uzavřena nějaká molekula, není na něj chemicky vázána a ani nemůže interagovat s vnějším okolím. Takový jev je tzv. endohedrický. Mezi jejich další vlastnosti patří jejich malá velikost a velká odolnost vůči teplotě a tlaku. Vlastnosti se dají optimalizovat pomocí substituování atomů jiných prvků na jejich povrch. Fullereny lze připravit pomocí základní metody, která je založena na odpařování grafitu vzniklého v elektrickém oblouku mezi grafitovými elektrodami v heliové atmosféře za sníženého tlaku a následnou extrakcí [24].

#### *1.1.1.4.3. Uhlíkové nanotrubic*

Jsou to dlouhé, válcovité molekuly skládající se z hexagonálního uspořádání hybridizovaných atomů uhlíku, které vznikají svinutím jedné či více vrstev grafenu. Jak je uvedeno na Obr. 3, díky tomu rozeznáváme jednostěnné a mnohostěnné uhlíkové nanotrubic. Obě formy jsou velmi oblíbené jak pro své elektrické vlastnosti, tak pro tepelnou a mechanickou stabilitu, díky které jsou zajímavé pro vývoj nejrůznějších sensorů. Obecně lze konstatovat, že CPEs modifikované těmito nano-trubicemi většinou vykazují vyšší citlivost. Důvodem je jejich vysoký specifický povrch, který se pohybuje kolem  $>500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  [25].

### 1.1.2. Pastové kapaliny

Druhou zmiňovanou složkou uhlíkové pasty je kapalné pojivo, též se lze v literatuře setkat s pojmem pastová kapalina. Podobně jako na uhlíkový prášek jsou na pastovou kapalinu kladena požadovaná kritéria. Je nutné, aby se jednalo o látku chemicky inertní, chemicky stálou, neměla by se mísit s roztoky analytů, měla by být minimálně těkavá a neměla by obsahovat elektroaktivní nečistoty.

Takové podmínky většinou splňují uhlovodíky, jako je parafín či vazelína (VA). Dále je možné použít silikonový olej (SO) o různé viskozitě, jež je dána délkou polydimethylsiloxanového řetězce. K méně častým pastovým kapalinám patří rostlinné oleje, živočišné tuky či vosky. V poslední řadě stojí za zmínku iontové kapaliny [14].

## 2. Povrchově aktivní látky

Tenzidy jsou organické látky, které jsou schopny se již při nízkých koncentracích samovolně adsorbovat na fázovém rozhraní a tím snižovat povrchové napětí, případně povrchovou energii. V soustavě kapalina/plyn s tenzidem rozpuštěným v kapalné fázi se adsorpcí na pohyblivém fázovém rozhraní snižuje povrchové napětí. V soustavě kapalina/kapalina se tenzid adsorbuje na povrchu jedné z kapalných fází a snižuje tak mezifázové napětí. V soustavě kapalina/pevná látka se tenzid rozpuštěný v kapalné fázi adsorbuje na povrchu kapalné nebo pevné fáze a snižuje mezifázové napětí.

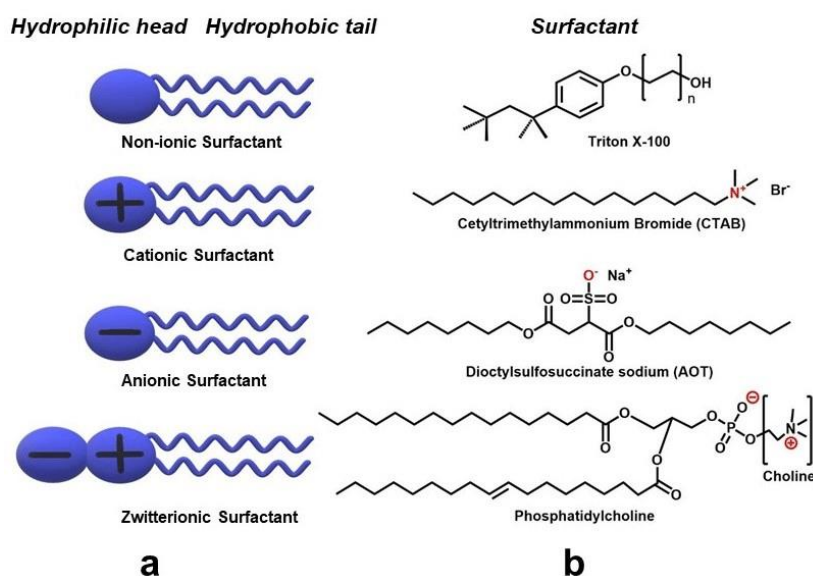
Tyto organické sloučeniny stabilizují, nebo v případě potřeby ruší disperzní systémy, snižují tření, urychlují technologické procesy, ovlivňují fyzikálně-mechanické vlastnosti materiálů, aktivně se účastní biochemických procesů v živých organismech apod. Tyto specifické vlastnosti tenzidů jsou determinované chemickou a fyzikální strukturou jejich molekul, které mají dipolární asymetrickou strukturu, která má za následek jeho amfifilní vlastnosti.

Surfaktanty obsahují ve své molekule skupiny s velkou afinitou k rozpouštědлу a skupiny, které rozpouštědlo odpuzují. Pokud je rozpouštědlem voda, je k ní hydrofilní část přitahována. Specifická funkce hydrofilní skupiny přítomné v molekule tenzidu je založena na silném ovlivnění celkové polarity a na rozdělení elektrického náboje, včetně celkového iontového charakteru. Naopak hydrofobní část tenzidu vodu odpuzuje a zaujímá uspořádání, které s ní co nejvíce omezuje kontakt. Hydrofilní částí molekuly je nejčastěji polární nebo silně iontová skupina. Hydrofobní částí je nejčastěji uhlovodíkový řetězec s rozvětvenou nebo lineární strukturou tvořený 12–18 uhlíkovými atomy [26, 32].

Pokud je dosaženo určité koncentrace tenzidů, tzv. kritické koncentrace, molekuly nebo ionty tenzidu se agregují do útvarů označovaných jako micely. Účinek tenzidů lze vysvětlit tak, že neasociované molekuly nebo ionty, které jsou povrchově aktivní, se adsorbují v určitém roztoku na fázové rozhraní, čímž vzniká povrchový film. Micely se přímo tvorby tohoto filmu nezúčastňují, ale v důsledku dynamické rovnováhy mezi koncentrací a micel a nezreagovaných molekul tenzidu ovlivňují snižování napětí na rozhraní fází. Vznik povrchového filmu se nejvýrazněji projeví na fázovém rozhraní kapalina/plyn (pára), tuhá fáze/pára [27].

Závažným problémem tenzidů, především těch kationtových, je jejich toxicita. V odpadních vodách mají negativní vliv na vodní organismy, jelikož při průniku do buněk napadají jejich biomembránu a tím mění její biologickou funkci [28].

Nejčastěji jsou tenzidy děleny dle jejich hydrofilní složky, podle její schopnosti disociovat na ionty. Člení se tedy na tenzidy neionické a ionické, které jsou dále děleny na kationaktivní, anionaktivní a amfolytické. Neionické tenzidy nemají náboj a ve vodném prostředí nedisociují. Naopak ionické tenzidy jsou schopny ve vodném prostředí disociovat a vzniklé ionty jsou nositeli povrchové aktivity [29]. Na Obr. 4 jsou schematicky demonstrovány rozdíly (klasifikace) mezi jednotlivými typy tenzidů s příklady.



Obr. 4. Rozdělení tenzidů (dle [30]).

## 2.1. Kationaktivní tenzidy

Obsahují jednu či více funkčních skupin, které ve vodném prostředí disociují na povrchově aktivní kladně nabitě ionty. Bývají silně adsorbovány na většinu pevných povrchů, které mají záporný náboj. Téměř u všech kationických tenzidů je kationtem kvartérní dusíkový atom. Tyto kationické tenzidy jsou kvartérní amoniové soli, a to chloridy, bromidy nebo methosulfáty.

Kvartérní amoniové soli mají většinou jeden až tři další alkyly. Význam kationaktivních tenzidů spočívá především v jejich germicidních a avivážních účincích. Oproti anionaktivním tenzidům vykazují značnou variabilitu uspořádání molekul. Anionické tenzidy nelze kombinovat s tenzidy kationickými, neboť se vzájemně srážejí na nerozpustný aglomerát. Pokud se přesto kombinují, poté jen ty typy, které mají v molekule kromě ionické části i neionickou část. Tato neionická část poté zajišťuje rozpustnost vzniklého aglomerátu ve vodě. Nevýhodou kationaktivních tenzidů je jejich špatná biologická rozložitelnost a vyšší cena oproti anionaktivním tenzidům [29].



## 2.2. Anionaktivní tenzidy

Anionaktivní tenzidy patří mezi nejrozšířenější tenzidy vůbec. Ve vodném prostředí disociují molekuly na záporně nabitě organické ionty a díky tomu podporují sorpci nečistot, které mají většinou kladný náboj. Mezi tenzidy mají nejúčinnější detergenční vlastnosti. Nejstarším a nejdéle používaným anionaktivním tenzidem je mýdlo. Jedná se o sodnou sůl vyšších mastných kyselin. Nevýhodou mýdel je, že ve tvrdé vodě tvoří nerozpustné hořečnaté a vápenaté soli [29].

Dalším příkladem anionaktivních tenzidů je dodecylsírán sodný (SDS), který byl využíván při modifikaci CPEs v experimentální části. Běžně se tento surfaktant využívá ve farmacii, kosmetice, pracích práscích atd. [31]. Kromě toho je zapotřebí zmínit i dodecylbenzensulfonát sodný, jenž se liší přítomností aromatického jádra.

## 2.3. Amfolytické tenzidy

Jsou charakterizovány přítomností dvou hydrofilních skupin, tedy kyselé a zásadité skupiny, které molekule udělují amfoterní charakter, a to v závislosti na podmínkách prostředí (pH). V alkalickém prostředí se chovají jako aniontové tenzidy a v kyselém prostředí se chovají jako kationtové tenzidy. Molekula musí obsahovat alespoň jeden dlouhý alifatický řetězec. Amfolytické tenzidy mají velmi dobré prací a čisticí schopnosti. Jejich značnou výhodou je to, že jsou kombinovatelné se všemi ostatními typy tenzidů [32]. Patří mezi ně alkybetainy, sulfobetainy a aminokarboxylové kyseliny [29].

## 2.4. Neiontové tenzidy

Jedná se o sloučeniny, které ve vodném prostředí nedisociují. Oproti anionickým tenzidům mají nižší detergenční vlastnosti a nejsou příliš stále v silně kyselém či silně alkalickém prostředí. Významnými neiontovými tenzidy jsou kondenzační produkty vícesytných alkoholů a sacharidů s vyššími mastnými kyselinami [29].

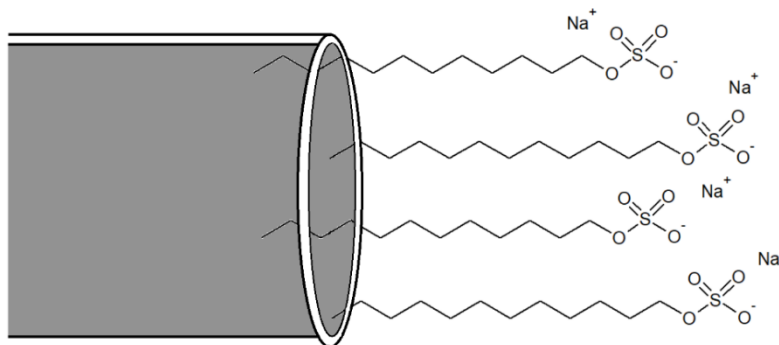
### 3. Modifikované uhlíkové pastové elektrody

Jak již bylo zmíněno, velkou výhodou CPEs je jejich jednoduchá modifikace. Pasty mohou být modifikovány buď přímým přimícháním modifikátoru při její výrobě (nejběžnější metoda), nebo lze modifikovat povrch již hotové CPE. Mezi obecná kritéria pro modifikátory používané při jejich přímém přidávání do pasty patří, že by neměly být rozpustné v analyzovaném roztoku a neměly by podstupovat elektrochemické transformace v rámci rozsahu voltametrické reakce analyzované látky s výjimkou katalytické aplikace.

Modifikované pastové elektrody (MCPEs) se dělí na elektrody modifikované chemicky, biologicky či fyzikálně. Chemicky MCPEs obsahují chemickou látku, ať už v celém objemu, nebo pouze na povrchu. Biologicky MCPEs jsou nazývány biosenzory. Jedná se o CPEs obsahující biologickou komponentu, kterou může být např. enzym, protilátky, části rostlin (pletiva), živočichů (tkáně), mikroorganismy atd. Fyzikálně modifikovanými CPEs se rozumí takové elektrody, které jsou před vlastním měřením upraveny pomocí např. změny teploty, vystavením magnetickému poli apod. [33]. Jelikož je tato diplomová práce věnována charakterizaci CPEs modifikovaných vysokým obsahem tenzidu, nejsou prezentovány další jiné modifikace.

#### 3.1. Tenzidy modifikované CPEs

CPEs lze modifikovat tenzidy dvojnásobem, a to buď přímým zamícháním (rozpuštěním) vybraného tenzidu do pasty [4], popř. pastové kapaliny, nebo extrakcí tenzidu z vodného roztoku do pastové kapaliny již zhotovené CPE, tzv. koroze povrchu [34]. Schématické znázornění CPE povrchově modifikované SDS je zobrazeno na Obr. 5. Aby mohly být tyto modifikované CPEs použity při voltametrických měření v ryzě organických rozpouštědlech, je zapotřebí vysoký obsah tenzidu až kolem 30 % (w/w). Z tohoto důvodu tenzidy korodované CPEs (povrchově modifikované) nelze využít pro výše zmíněná měření.



**Obr. 5.** Schématická struktura povrchu CPE modifikovaného SDS.

Přítomný surfaktant zabraňuje rozpouštění pastového pojiva a následného rozpadu CPE. Mezi nejčastěji používaná organická rozpouštědla v elektroanalytické chemii patří např. *N,N*-dimethylformamid, acetonitril (MeCN), tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid, 1,2-dimethoxyethan či dichlormethan. CPEs s vysokým obsahem tenzidu by bylo možné tedy použít při voltametrickém stanovení elektroaktivních lipofilních látek.

Takovýto druh elektrod byl poprvé testován v roce 1965 a jsou nazývány podle svého objevitele jako elektrody dle Adamse, též Adamsovy elektrody. V praxi je pro CPE modifikaci tenzidy využíváno několik látek, kdy mezi nejoblíbenější patří SDS [9, 12, 35–37]. Za zmínku stojí říct, že existuje pouze několik málo vědeckých prací věnovaných právě CPEs modifikovaných tenzidy. Tudíž je známo jen málo informací a vlivu výběru tenzidu, pojiva či typu uhlíku na finální vlastnosti CPEs.

## 4. Charakterizace uhlíkových pastových elektrod

Mezi vlastnosti, ve kterých se CPEs liší od ostatních elektrodových materiálů používaných v elektrochemické analýze, lze zařadit jejich heterogenní charakter, nízký ohmický odpor ( $R$ ), nízké proudy pozadí, jejich snadnou polarizovatelnost a vliv na přenos náboje [12]. V následujících podkapitolách jsou popsány základní nástroje sloužící k charakterizaci takovýchto senzorů.

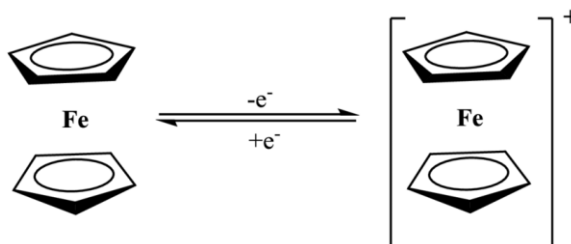
### 4.1. Vodivost elektrodového materiálu

Běžně používané CPEs mají velmi nízký ohmický odpor v jednotkách až desítkách ohmů. K nárůstu odporu dochází s rostoucím množstvím pojiva. V případě, že je obsah uhlíku v pastě výrazně vyšší než obsah pojiva, odpor dosahuje nízkých hodnot do 20  $\Omega$ . S nárůstem obsahu pojiva nad 30 % ( $w/w$ ) dochází k prudkému nárůstu ohmického odporu pasty.

Vysvětlení tohoto chování nabízí model nejtěsnějšího uspořádání kulových částic (nepravidelné částice se též řídí tímto principem) převzatý z krystalografie. Podle této teorie zaujímají částice 52–74 % objemu. Pokud tedy uhlíkové částice obsažené ve směsi uhlíkové pasty převažují výrazněji nad množstvím pojiva, jsou tyto částice v maximálním možném kontaktu, čímž je zajištěna vodivost pasty. Pastová kapalina pak vyplňuje prostor mezi uhlíkovými částicemi. S dalším nárůstem obsahu pojiva se uhlíkové částice dostávají z nejtěsnějšího uspořádání a jejich kontakt není tedy plně zajištěn, přičemž s výrazně vyšším podílem pojiva je kontakt částic náhodný [38].

### 4.2. Redoxní páry pro nevodná prostředí

Pro elektrochemickou charakterizaci se používají modely systémů o známém mechanismu průběhu elektrodové reakce. Příklady mohou být redoxní pár ferrocenu ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) (viz Obr. 6), jenž je považován za téměř ideální jednoelektronový reverzibilní systém [38] a chinon/hydrochinon za kvazi–reverzibilní systém [39]. Pro tyto systémy se měří závislosti potenciálu píku a jejich proudových odezev v závislosti na změně rychlosti polarizace ( $v$ ).



**Obr. 6.** Reverzibilní jednoelektronová oxidace ferrocenu [40].

#### 4.2.1. Kinetika přenosu elektronu

V elektrochemii se rychlost elektrodového děje označuje jako reverzibilita. Stupeň reverzibility je dán hodnotou aktivačního přepětí. Pokud systém vykazuje nulové přepětí, a tedy nekonečně velkou rychlostní konstantu, tak se mezi oxidovanou a redukovanou formou látky stačí ustavovat rovnováha dle Nernstovy rovnice (1),

$$E_c^0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{k_a^0}{k_k^0} \quad (1)$$

kde  $E_c^0$  je potenciál,  $R$  je molární plynová konstanta ( $R = 8,31441 \cdot \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $T$  je absolutní teplota,  $n$  značí počet vyměněných elektronů,  $F$  značí Faradayovu konstantu ( $F = 9648,104 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $k_k$  a  $k_a$  jsou rychlostní konstanty katodické a anodické reakce [41].

V praxi je snaha o dosažení co největší aktivní plochy elektrody, která se počítá pomocí Randles–Ševčíkovy rovnice (2),

$$I_p^c = I_p^a = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot c \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

kde  $I_p^a$  je anodický iontový proud,  $I_p^c$  je katodický iontový proud,  $A$  je aktivní plocha elektrody,  $D$  značí difúzní koeficient,  $c$  je molární koncentrace, a  $v$  představuje rychlost polarizace. Rozdíl mezi anodickým a katodickým potenciálem je dán následující rovnicí (3),

$$\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = \frac{0,0592}{n} \quad (3)$$

kde  $E_p^a$  je anodický potenciál a  $E_p^c$  je katodický potenciál.

Ireverzibilní systémy jsou kvůli pomalé výměně elektronů charakteristické vzdálenými a sníženými píky. Potenciál je závislý na rychlosti reakce a v tomto případě Randles–Ševčíkova rovnice (4) nabývá tvaru,

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[ 0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left( \frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (4)$$

kde  $\alpha$  je koeficient přenosu náboje,  $n_a$  je počet vyměněných elektronů při přechodu náboje a  $k^0$  je standardní rychlostní konstanta elektrodové reakce. Z toho je odvozen vztah pro proud píku ireverzibilního systému (5) [42].

$$I_p = (2,99 \cdot 10^5) n (\alpha n_a^{\frac{1}{2}}) A D^{\frac{1}{2}} c v^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Pokud je hodnota rozdílů potenciálů  $\Delta E_p$  vyšší než podíl  $200/n$  (mV), lze pro výpočet přenosu počtu elektronů a koeficientu přenosu náboje u reverzibilních elektrodových reakcí použít Lavironovy rovnice pro anodické a katodické děje (6 a 7),

$$E_p^a = E^0 - \frac{2,3 RT}{(1-\alpha)nF} \log v \quad (6)$$

$$E_p^c = E^0 - \frac{2,3 RT}{\alpha n F} \log v \quad (7)$$

kdy se v praxi prokládají pouze lineární části křivek popisující závislost  $E_p^a$  a  $E_p^c$  na  $\log v$  [43].

## 5. Nepochární elektroaktivní biologicky aktivní látky

V elektroanalytické chemii se většinou na uhlíkových pastových elektrodách detekují biologicky aktivní anorganické (těžké kovy a minerály) a organické (vitamíny, léčiva, hormony, pesticidy atd.) látky rozpustné ve vodě. Nicméně jen mizivá část vědeckých prací je věnovaná analýze nepolárních organických sloučenin. Níže jsou uvedeny příklady biologicky aktivních organických látek, které by bylo možné elektrochemicky stanovovat v klinicky významných vzorcích.

### 5.1. Lipofilní vitamíny

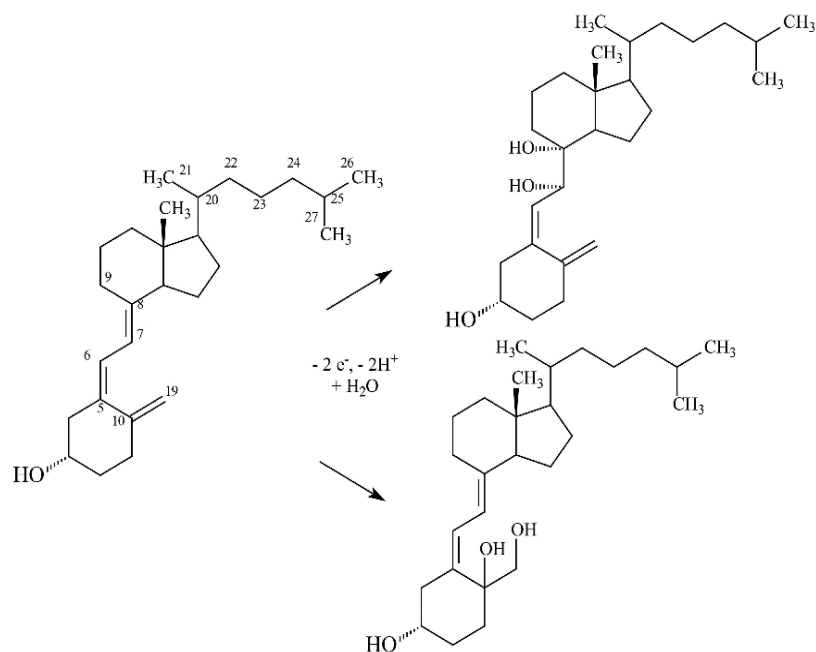
Jedná se o nepolární organické sloučeniny, které jsou nezbytné pro širokou škálu fyziologických funkcí. Některé původní formy vitaminů musí podlehnout chemické změně, aby se staly biologicky aktivními [44]. Existují čtyři hlavní skupiny lipofilních vitaminů, které jsou zmíněny v následujících odstavcích.

#### 5.1.1. Vitamin A

Za vitamin A se považuje *all-trans*-retinol, *all-trans*-retinal a *all-trans*-retinová kyselina. V přírodě se vitamin A většinou vyskytuje ve formě provitaminů (karotenoidů). Dále je možné se setkat i s estery typu *all-trans*-retinolu [44]. K oxidaci *all-trans*-retinolu dochází na skelné uhlíkové elektrodě při potenciálu + 0,8 V vs. ref. v MeCN s chloristanem lithným [45].

#### 5.1.2. Vitamin D

Vitamíny ze skupiny D patří mezi sekosteroidy. Mezi nejvýznamnější formy tohoto vitaminu patří vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) a vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol), které se od sebe liší strukturou postranního řetězce. Tyto formy vznikají účinkem ultrafialového záření z prekurzorů, které se označují jako provitamíny D. Ergokalciferol vzniká z prekurzoru ergosterolu a je rostlinného původu. Cholecalciferol vzniká z provitaminu 7-dehydrocholesterolu a je původu živočišného. Struktury provitaminů D jsou tvořeny cyklopentaperhydrofenanthreny, které obsahují methylenové skupiny, hydroxylovou skupinu a systém konjugovaných dvojných vazeb [46]. Jelikož byl vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) vybrán jako modelový analyt pro voltametrická měření na CPEs modifikovaných tenzidy, jeho pravděpodobná elektrodová reakce je popsána na Obr. 7.



**Obr. 7.** Pravděpodobný průběh elektrochemické oxidace cholekalciferolu [47].

Cyklickou voltametrií (CV) byl při stanovení VD3 detekován oxidační pík přibližně při +1,1V vs. nasycené kalomelové elektrodě (SCE). Jako pracovní elektroda byla vybrána GCE. Jednalo se o irreverzibilní děj v prostředí methanolu (MeOH) s acetátovým puforem. Během oxidačního skenování byla pozorována adsorpce produktů oxidace na povrch elektrody, což vedlo ke snížení oxidačního píku při opakovaném měření [48].

Zde je nutné zmínit, že povrch CPEs modifikovaných tenzidy je polární z důvodu přítomnosti hydrofilní funkční skupiny. Z tohoto důvodu lze předpokládat minimální adsorpci oxidačních produktů, a tudíž dostatečně reprodukovatelná opakovatelná měření.

### 5.1.3. Vitamin E

Vitamin E zahrnuje dvě skupiny, a to tokoferoly a tokotrienoly. Tyto látky obsahují chromanolový cyklus s bočním řetězcem lišící se polohou a počtem methylových skupin. Právě dle počtu a polohy methylových skupin se obě skupiny vitaminu E dělí na čtyři izomery ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) [44]. Pomocí CV bylo při stanovení  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -TOH) zjištěno, že se tento nejvíce biologicky aktivní izomer oxiduje při +0,5 V vs.  $Fc/Fc^+$  na platinové elektrodě v prostředí MeCN [49]. Lze usuzovat, že se  $\alpha$ -TOH bude oxidovat za podobných podmínek i na CPEs modifikovaných tenzidy, jelikož volba elektrodového materiálu má povětšinou minimální vliv na polohu oxidačního píku.

#### 5.1.4. Vitamin K

Vitaminy K jsou odvozeny od 2-methyl-1,4-naftachinonu. Převládající formou tohoto vitamínu obsaženou v potravinách je fyllochinon označován jako vitamin K<sub>1</sub>. Forma K<sub>2</sub> (menachinon) je produkována střevní mikroflórou zejména bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Forma K<sub>3</sub> (menadion) je vyráběna synteticky [50].

Pomocí CV bylo zjištěno, že vitamin K<sub>1</sub> je nejprve redukován při -1,2 V vs. Fc/Fc<sup>+</sup> za vzniku radikálového aniontu, ten je možné dále redukovat při -1,7 V vs. Fc/Fc<sup>+</sup> za vzniku dianiontu. První krok nastává při potenciálu, který je nerozeznatelný od redukce molekulárního kyslíku, proto je nutné rozpuštěný kyslík odstranit z roztoku. Oba kroky elektronového přenosu jsou reverzibilní. Takovéto chování bylo pozorováno na GCE v čistém MeCN s příměsí tetrabutylamonium hexafluorofosfátu [48].

## 5.2. Steroidní látky

Steroidy jsou organické sloučeniny, které mají kondenzované tři cyklohexanové kruhy a jeden cyklopentanový kruh. Jejich fyziologickou funkci určuje jejich struktura. Zaleží na funkčních skupinách napojených na čtyřkruhové jádro, na oxidačním stavu a na přítomnosti postranního řetězce napojeného na uhlíku C17. Samotné steroidní jádro není elektrochemicky aktivní. Tuto aktivitu zajišťují napojené funkční skupiny či dvojně vazby v jádře [51]. V nadcházejících podkapitolách jsou popsány významné steroidní látky a jejich doposud zjištěné elektrochemické chování.

### 5.2.1. Cholesterol

Cholesterol patří mezi nejvýznamnější steroly v lidském organismu. Je nedílnou součástí všech eukaryotních buněčných membrán a je prekurzorem při biosyntéze žlučových kyselin a steroidních hormonů. Jedná se o amfifilní molekulu, což znamená, že obsahuje polární část s hydroxylovou skupinou, díky níž je molekula hydrofilní a část nepolární, která je tvořena steroidním jádrem a uhlovodíkovým řetězcem, díky nimž je molekula lipofilní [52].

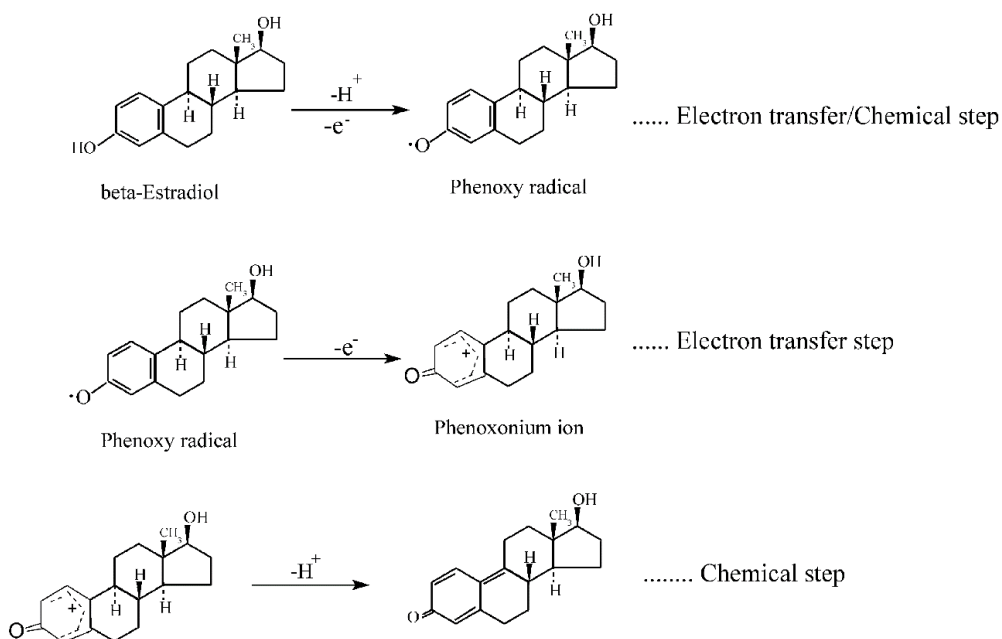
Přímá elektrochemická oxidace cholesterolu je obtížně dosažitelná, neboť se jedná o molekulu chudou na elektrony. Z literatury bylo zjištěno, že ke zdárné oxidaci je třeba volit pouze nevodná média nebo média s vysokým podílem organické fáze [53]. Například v Riyantově studii bylo pomocí CV sledováno elektrochemické chování cholesterolu a zjištěn oxidační pík při +0,46 V vs. Ag/AgCl na zlaté elektrodě v prostředí hydroxidu sodného [54].



### 5.2.2. Steroidní hormony

Jedná se o hormony lipofilní povahy, které vznikají z cholesterolu procesem steroidogeneze. Existují dvě hlavní třídy steroidních hormonů, a to kortikosteroidy (mineralokortikoidy a glukokortikoidy) a pohlavní hormony (androgeny, estrogeny a progesterony) [55]. Pomocí CV se přišlo na to, že testosteron lze anodicky oxidovat přibližně při +0,57 V vs. SCE pomocí skelné elektrody modifikované kobaltovým filmem v prostředí hydroxidu sodného [56].

CV se rovněž zjistilo, že  $\beta$ -estradiol se anodicky oxiduje při +0,7 V vs. Ag/AgCl na GCE modifikovanou sazemí. Jednalo se o irreverzibilní děj v prostředí fosfátového pufru [57]. Mimochodem  $\beta$ -estradiol je možné elektrochemicky oxidovat při +1.0 V vs. Ag/AgCl ve směsi MeCN a vody (50:50) [58]. Níže jsou popsány elektroodové reakce  $\beta$ -estradiolu (Obr. 8.), jenž byl zvolen v této diplomové práci jako modelový analyt.



**Obr. 8.** Pravděpodobný průběh elektrochemické oxidace  $\beta$ -estradiolu [57].

### 5.2.3. Žlučové kyseliny

Jedná se o kyselé steroly s nasyceným steroidním jádrem a napojenou karboxylovou skupinou na pěti či osmi uhlíkovém postranním řetězci. Dělí se na dvě skupiny, na primární žlučové kyseliny, které vznikají přímo z cholesterolu a na sekundární žlučové kyseliny, které vznikají činností střevní mikroflóry. Mezi hlavní primární žlučové kyseliny u lidí patří kyselina cholová a chenodeoxycholová [54]. Jelikož se tyto látky oxidují při vysokých kladných potenciálech, je nutné použít BDD elektrodu, jež má široké potenciálové rozpětí. Takto lze kupříkladu anodicky oxidovat kyselinu cholovou při +1,2 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v prostředí kyseliny chloristé v MeCN po zahřívání při 50 °C po dobu 5 minut [59].

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6. Elektrochemické chování tenzidy modifikovaných CPEs

Tato diplomová práce se věnovala elektrochemickému chování CPEs modifikovaných tenzidy, kdy cílem bylo nalézt optimální složení takového heterogenního senzoru pro možná praktická měření a uplatnění v elektroanalytické chemii, konkrétně ve voltametrickém stanovení nepolárních elektroaktivních látek, jejichž monitorování má význam v klinické analýze.

V rámci optimalizace bylo důležité vybrat vhodný typ uhlíkového materiálu (prášku), pastovou kapalinu (pojivo), druh surfaktantu a jeho množství. Po výběru optimálního složení se CPE modifikovaná tenzidem proměřovala v různých organických rozpouštědlech, aby se zjistily její možnosti použití v elektroanalýze.

Samotná charakterizace se prováděla nejdříve na měření standardních redoxních párech pro nevodná prostředí ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  a  $p$ -chinon/ $p$ -hydrochinon), kdy současně byla tato měření zopakována na komerční GCE, aby se daly získané výsledky porovnat. V poslední řadě se proměřily kalibrační závislosti dvou modelových analytů VD3 a hormonu  $\beta$ -estradiolu. Naměřené výsledky byly rovněž porovnávány s naměřenými výsledky pomocí GCE.

Jednotlivé kroky optimalizace, obdržené výsledky a detailní diskuse jsou prezentovány v následujících kapitolách a patřičně ilustrovány příslušnými grafy, kdy některé výsledky jsou přehledně zahrnuty v tabulkách.

### 6.1. Použité chemikálie a materiály

Veškeré použité chemikálie vykazovaly čistotou pro analytické účely a jejich seznam je zobrazen v Tab. 1. Technicky čistý ethanol se používal pouze na oplachování elektrod a voltametrických cel. Technicky čistým acetonem se promývaly elektrodové držáky z Teflonu.

**Tab. 1.** Seznam použitých chemikálií a elektrodoých materiálů.

Chemikálie a elektrodoé materiály	Výrobce
1,3-didecyl-2-methylimidazolium chlorid, 96% (DMIC)	Merck KGaA, Německo
Aceton, 99%	Merck KGaA, Německo
Acetonitril, 99,9%	Honeywell, Německo
Benzethonium chlorid, 99% (BTC)	Merck KGaA, Německo
$\beta$ -Estradiol	Merck KGaA, Německo
Chloristan lithný (LiClO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Německo
Cholekalciferol	Merck KGaA, Německo
Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)	Janssen chimica, Belgie
Didodecyldimethylammonium bromid, 98% (DDAB)	Merck KGaA, Německo
Dimethylsulfoxid	Mallinckrodt, USA
Dioxan	Merck KGaA, Německo
Dodecylsírán sodný	Merck KGaA, Německo
Ethanol, 96% (EtOH)	Merck KGaA, Německo
Ferrocen	Merck KGaA, Německo
Hydrochinon	Merck KGaA, Německo
Monohydrát chloridu hexadecylpyridinia, 99% (CPC)	Merck KGaA, Německo
Isopropylalkohol	Fichema, Česko
Methanol	Penta, Česko
Parafínový olej (PO)	Merck KGaA, Německo
Parafínový vosk (PW)	Merck KGaA, Německo
Polypropylen (PP)	Merck KGaA, Německo
RW-B uhlík	Ringsdorff Werke Ltd, Německo
Sigradur G (velikost částic 10-20 $\mu$ m)	HTW Maintigen, Německo
Silikonový olej o viskozitě 8000 cSt (SO)	Lučební závody Kolín, Česko
Surový šungit (velikost částic 1-20 $\mu$ m)	Skywest Trading s.r.o., Česko
Trikresylfosfát (TCP)	Fluka Biochemika, Švýcarsko
Uhlíkový prášek (velikost částic $\geq 2$ $\mu$ m)	Graphite Týn s.r.o., Česko
Uhlíkový prášek (velikost částic $\geq 5$ $\mu$ m)	Graphite Týn s.r.o., Česko
Vazelína (VA)	Merck KGaA, Německo

## 6.2. Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla prováděna v klasickém tříelektrodevém zapojení v 50 ml skleněné voltametrické cele při laboratorních podmínkách. Pracovní CPE modifikovaná jedním z vybraných tenzidů, referentní kalomelová elektroda  $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 | \text{KCl}$  se solným můstkem a platinový plíšek jako pomocná elektroda (Obr. 9) byly společně zapojeny k potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Praha, Česká republika) kompatibilním s programem Nova verze 1.11. Získaná data se dále zpracovávala v programu Excel od společnosti Microsoft.

K navažování látek byly použity analytické váhy značky KERN 770 od společnosti Mettler–Toledo, s.r.o. (Praha, Česká republika) s přesností na čtyři desetinná místa a váhy značky Sartorius BP 211 D od společnosti Minebea Intec GmbH (Hamburg, Německo) s přesností na pět desetinných míst. K rozpouštění pevných látek byla použita ultrazvuková vana značky Sonorex od společnosti VERKON s.r.o. (Praha, Česká republika). K měření ohmického odporu uhlíkových past naplněných v elektrodových držácích byl použit digitální multimetr HC–3500T od společnosti Equipment Hung Chang Co. Ltd., (Soul, Jižní Korea).



**Obr. 9.** Tříelektrodevý systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem.

### 6.3. Příprava modifikovaných elektrod

Pro přípravu optimálního elektrodového materiálu byly vybírány různé pastové kapaliny (PO, PP, PW, SO, VA a TCP) o obsahu 20 % (w/w), které se smíchaly s různými typy uhlíkových prášků (grafit, skelný uhlík, surový šungit a RW-B uhlík) o obsahu 30 % (w/w) a vybranými surfaktanty (SDS, CPC, BTC, CTAB, DMAB, DDC-2-MIC a cocamidopropyl betain) o obsahu 50 % (w/w).

Vlastní homogenizace se uskutečnila v keramické třecí misce po dobu 20 minut, kdy se nejdříve navázila pastová kapalina s tenzidem a až po rozpuštění tenzidu byl přidán uhlíkový prášek. Výsledná uhlíková pasta byla poté napěchována do dutiny (průměr 3 mm) Teflonového elektrodového držáku opatřeného kovovým pístem, který zajišťuje elektrický kontakt. Takto připravené elektrody byly před měřením po dobu jednoho dne odloženy za laboratorních podmínek. Obecně platí, že čerstvě připravené elektrody by neměly být ihned používány, neboť dost často vykazují nestabilní elektrochemické chování. U CPEs prošlých výše zmíněnou auto-homogenizací byly proměřeny ohmické odpory.

### 6.4. Příprava pracovních a zásobních roztoků

Zásobní roztok  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  základního elektrolytu byl připraven navážením 1 g  $\text{LiClO}_4$  a rozpuštěním v 100 ml MeCN v ultrazvuku po dobu 2 minut. Pro přípravu 10 ml standardního roztoku ferrocenu o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo naváženo 0,0186 g ferrocenu a rozpuštěno v 10 ml MeCN. Pro přípravu 10 ml standardního roztoku hydrochinonu o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo naváženo 0,0110 g hydrochinonu a rozpuštěno v 10 ml MeCN. Pro přípravu 10 ml standardního roztoku VD3 o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  se navážilo 0,0385 g cholekalciferolu a rozpuštěno v 10 ml MeCN. Pro přípravu 10 ml standardního roztoku  $\beta$ -estradiolu o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo naváženo 0,0272 g tohoto hormonu a rozpuštěno v 10 ml MeCN.

### 6.5. Pracovní podmínky a parametry voltametrických technik

Všechna měření byla uskutečňována ve skleněné voltametrické cele, která obsahovala vždy 10 ml pracovního elektrolytu. Před každým měřením byl povrch CPE elektrody obnovován vytlačení malého množství pasty a následným vyleštěním o suchý filtrační papír. Povrch GCE byl obnovován leštěním vodnou suspenzí aluminy (velikost částic  $1 \mu\text{m}$ ) po dobu 10 s a následným opláchnutím proudem EtOH. Pracovní podmínky použitých voltametrických technik v různých částech optimalizace jsou vypsány níže.

### 6.5.1. Výběr optimálního složení pasty

Cyklická voltametrie v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlost skenování ( $\nu$ ) =  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: od +1.0 až do +2.0 V

### 6.5.2. Množství surfaktantu

Cyklická voltametrie v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlost skenování ( $\nu$ ) =  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: od +1,0 do +1,8 V

### 6.5.3. Vliv rozpouštědla

Cyklická voltametrie v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlost skenování ( $\nu$ ) =  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: +1,6 V

### 6.5.4. Kinetika elektrodoých reakcí

Cyklická voltametrie  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN s  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ferrocenu

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlosti skenování 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 a  $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: +0,8 a +1,0 V

Cyklická voltametrie  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN s  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrochinonu

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlosti skenování 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 a  $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: +1,6 V

### 6.5.5. Elektrochemické chování modelových analytů

Opakující se cyklická voltametrie ( $N=5$ ) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN s přítomností  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  VD3 nebo  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlost skenování ( $v$ ) = 50 a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Počáteční potenciál: -0,4 V

Koncový potenciál: +1,4 V pro  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a +1,8 V pro  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

### 6.5.6. Měření kalibrační závislosti modelových analytů

Diferenčně pulzní voltametrie  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v 99,9% MeCN s přítomností 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  VD3 a  $\beta$ -estradiolu

Potenciálový krok ( $E_{\text{step}}$ ) = 2,5 mV

Rychlost skenování ( $v$ ) =  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Potenciál amplitudy ( $E_{\text{ampl}}$ ) = 60 mV

Doba pulzu ( $t_{\text{pulse}}$ ) = 0,05 s



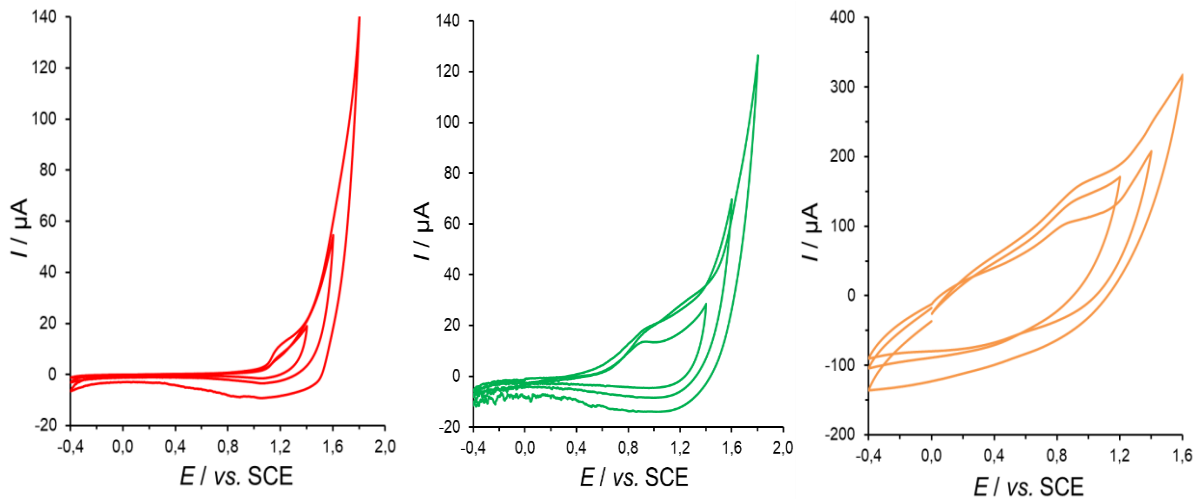
## 7. Výsledky a diskuse

### 7.1. Výběr pastové kapaliny

Při výběru optimálního druhu pastové kapaliny měly připravené CPEs vždy stejné složení uhlíku a tenzidu, a to 30 % (w/w) grafitového prášku (typ CR–2) a 50 % (w/w) SDS (CPE/SDS). V této studii bylo voleno mezi různými pojivy, jmenovitě ataktickým polypropylenem, PO, PW, SO, TCP a VA.

VA ( $R = 2,08 \text{ k}\Omega$ ) a PW ( $R = 247 \text{ k}\Omega$ ) poskytovaly vysoké hodnoty ohmického odporu, proto s nimi nebylo provedeno žádné voltametrické měření. Hodnoty  $R$  byly pro elektrodu s PO  $R = 0,374 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu se SO  $R = 0,394 \text{ k}\Omega$  a pro elektrodu s TCP  $R = 0,448 \text{ k}\Omega$ . Na Obr. 10 jsou zobrazeny příslušné cyklické voltamogramy základního elektrolytu pro různě široká potenciálová rozmezí. Proudová odezva základního elektrolytu se zvyšovala s nastavenou vyšší hodnotou koncového potenciálu.

Závěrem lze říci, že nejlepších výsledků dosáhla pasta s PO, která poskytovala nejnižší hodnoty proudového pozadí základní linie. Pasta s TCP je nevhodná, jelikož poskytovala vysoké hodnoty proudového pozadí základní linie. Kvůli takto vysokým proudovým odezvám pozadí by bylo obtížné získat při analýze nízkých koncentrací analytů anodický signál.

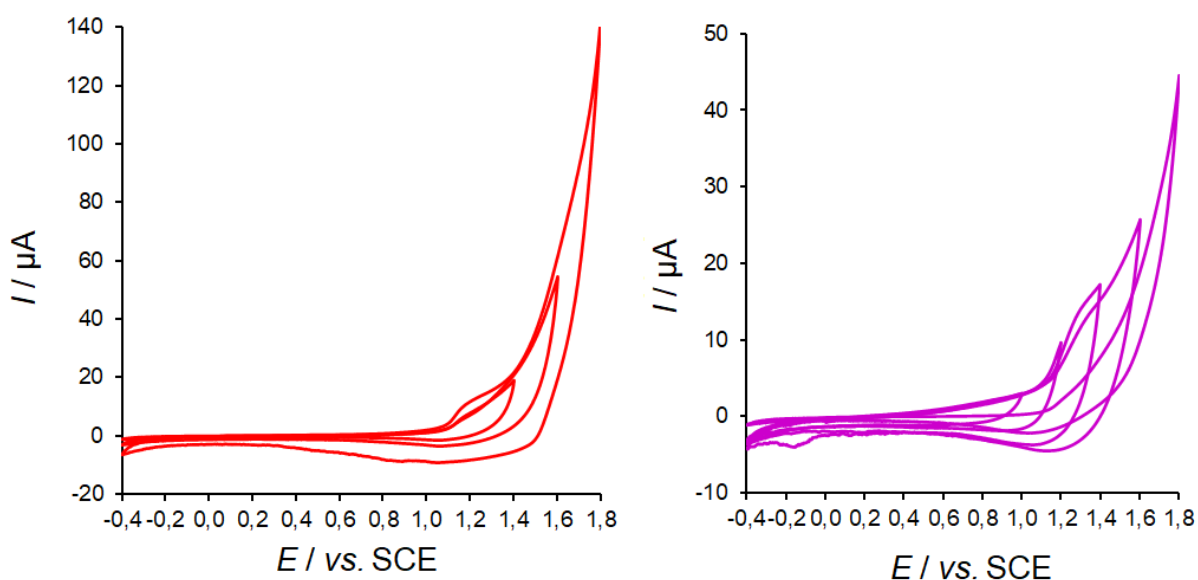


**Obr. 10.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/SDS obsahující 20 % (w/w) PO (červeně), SO (zeleně) a TCP (oranžově).

## 7.2. Výběr uhlíkového prášku

Při výběru optimálního typu uhlíkového prášku se volilo mezi grafitem CR-2 nebo CR-5, skelným uhlíkem, surovým šungitem (tzv. kamenným uhlíkem) a uhlíkem RW-B. Elektrody s obsahem skelného uhlíku, surového šungitu a RW-B uhlíku poskytovaly vysoké hodnoty  $R$ , nad jednotky megaohmů, proto s nimi nebylo provedeno žádné měření. Konzistence připomínaly spíše tuhé kompozity, které se jen obtížně vytlačovaly z elektrodových pouzder.

Hodnoty  $R$  byly pro elektrodu s grafitovým práškem CR-2  $R = 0,374 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu s grafitovým práškem CR-5  $R = 1,133 \text{ k}\Omega$ . Na Obr. 11 jsou zobrazeny příslušné cyklické voltamogramy základního elektrolytu pro jedno opakování. Proudová odezva základní linie se zvyšovala s vyšší hodnotou koncového potenciálu. Závěrem lze říci, že nejlepších výsledků dosáhla pasta s grafitovým práškem CR-5, která poskytovala nižší proudové hodnoty pozadí.



**Obr. 11.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE složené z 50 % (w/w) SDS, 20 % (w/w) PO a 30 % (w/w) grafitového prášku CR-2 (červeně) nebo 30 % (w/w) grafitového prášku CR-5 (purpurově).

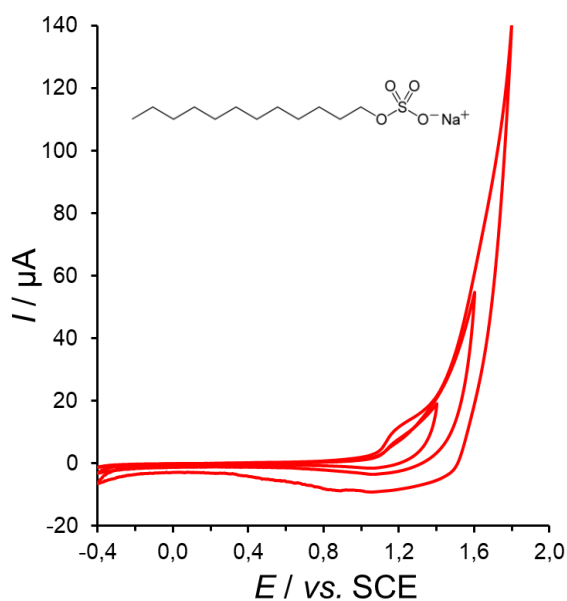
## 7.3. Výběr surfaktantu

Při výběru optimálního druhu surfaktantu bylo voleno mezi následujícími látkami, jmenovitě BTC, DDAB, DMIC, cocamidopropyl betain, CPC, CTAB a SDS. Tyto modifikované CPEs měly vždy obsah 50 % (w/w) tenzidu, 20 % (w/w) PO a 30 % (w/w) grafitového prášku CR-2. Pasta obsahující cocamidopropyl betain byla velmi mazlavá a nešla prakticky napěchovat do dutiny elektrodového držáku.

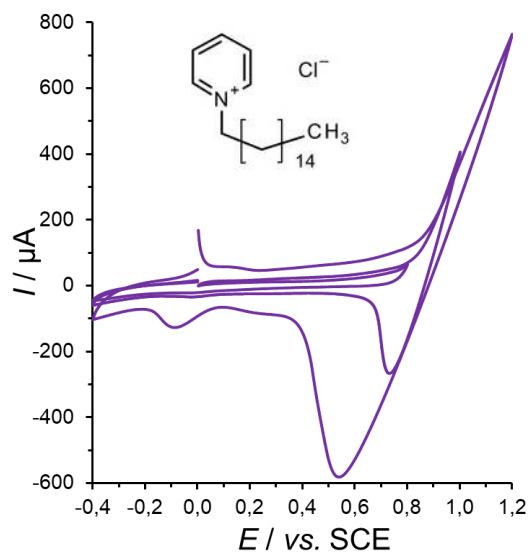
Hodnoty  $R$  byly pro elektrodu s SDS  $R = 0,374 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu s CPC  $R = 0,972 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu s BTC  $R = 0,188 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu s CTAB  $R = 0,209 \text{ k}\Omega$ , pro elektrodu s DMIC  $R = 0,299 \text{ k}\Omega$  a pro elektrodu s DDAB  $R = 1,372 \text{ k}\Omega$ .

Na Obr. 12 až 17 jsou zobrazeny příslušné cyklické voltamogramy základního elektrolytu, a to vždy pro jedno opakování a různě široká potenciálová okna. Navíc tyto záznamy obsahují chemickou strukturu použitého tenzidu. Proudová odezva základní linie rostla s vyššími hodnotami koncových potenciálů.

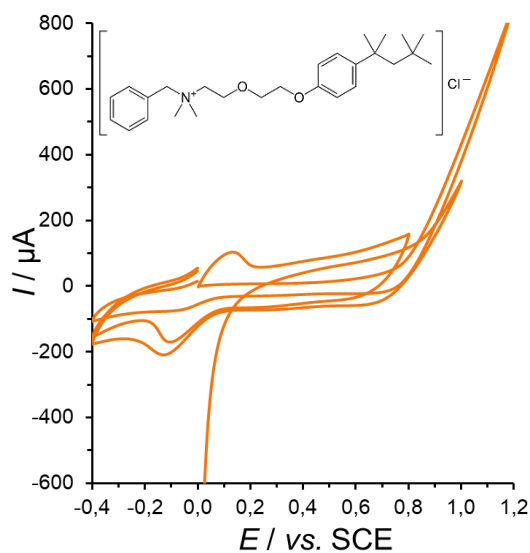
Závěrem lze říci, že nejlepších výsledků dosáhla pasta s SDS, která poskytovala nejnižší hodnoty proudového pozadí základní linie a navíc přítomný SDS nepodléhal elektrochemickým reakcím, na rozdíl od BTC, CTAB, DMIC a DDAB, které elektrochemicky reagovaly, neboť ve své chemické struktuře obsahují elektroaktivní centra. S těmito elektrodami lze měřit pouze do potenciálu, kdy ještě nedochází k chemické změně přítomného tenzidu, např. CPE s přítomností CPC je možné použít pro anodické oxidace do koncového potenciálu  $+0,8 \text{ V}$ .



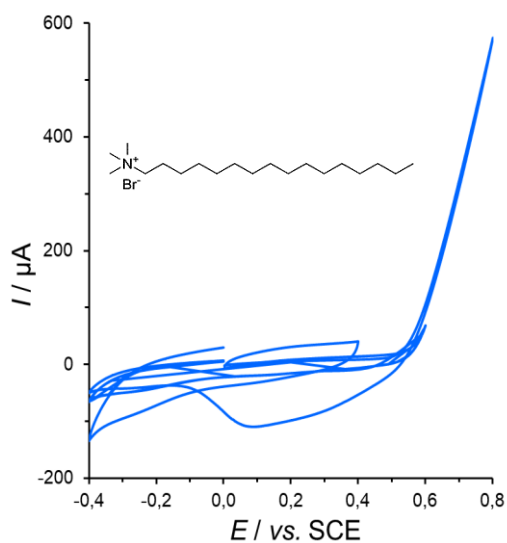
**Obr. 12.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/SDS.



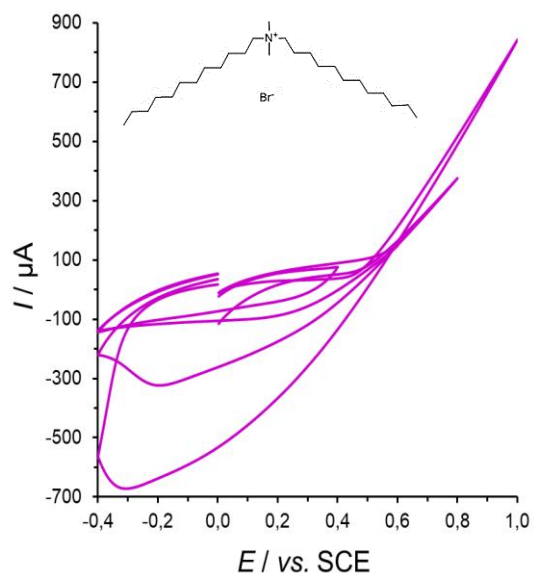
**Obr. 13.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/CPC.



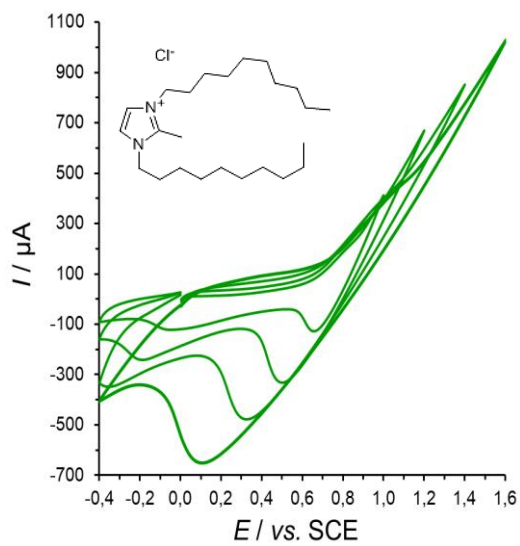
**Obr. 14.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/BTC.



**Obr. 15.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/CTAB.



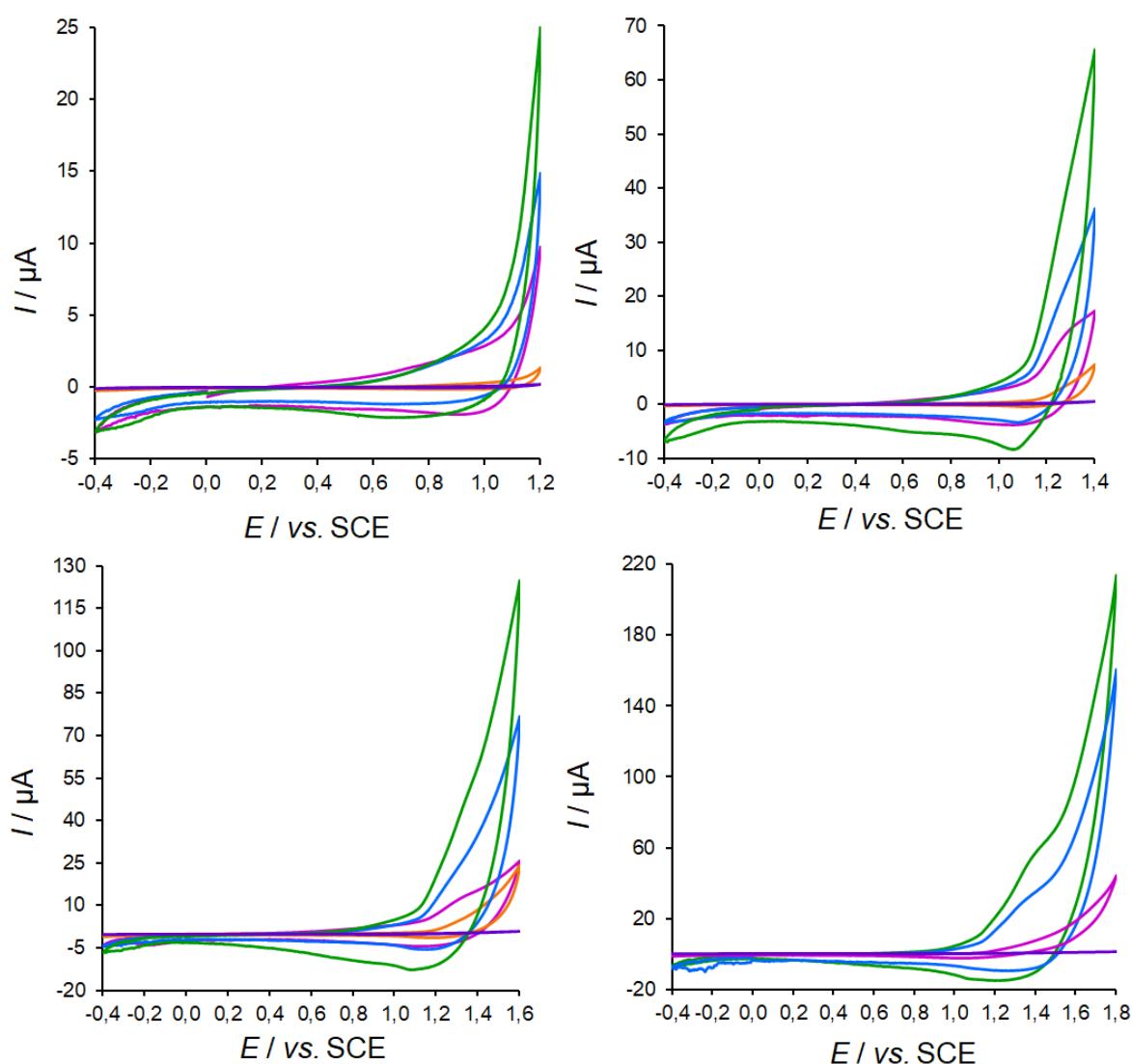
**Obr. 16.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/DDAB.



**Obr. 17.** Cyklické voltamogramy základního elektrolytu pořízené na CPE/DMIC.

## 7.4. Optimální množství surfaktantu

Při výběru optimálního množství surfaktantu byly umíchnuty pasty s 20 % (w/w) PO, s obsahem surfaktantu 20, 30, 40, 50 a 60 % (w/w) a s grafitovým práškem CR-5. Hodnoty naměřených  $R$  byly pro elektrodu s obsahem SDS 20 % (w/w)  $R = 0,021 \text{ k}\Omega$ , pro 30 % (w/w)  $R = 0,059 \text{ k}\Omega$ , pro 40 % (w/w)  $R = 0,248 \text{ k}\Omega$ , pro 50 % (w/w)  $R = 1,133 \text{ k}\Omega$  a pro 60 % (w/w)  $R = 1330 \text{ k}\Omega$ . Se zvyšujícím se obsahem tenzidu se zvyšuje objem pastové kapaliny, protože tenzid se v PO rozpouští. Tento jev zapříčiní, že částice grafitu jsou dále od sebe, a tudíž dojde k zhoršení kontaktu mezi těmito vodivými částicemi. Cyklické voltamogramy základního elektrolytu obdržené pro CPEs s různým obsahem SDS jsou zobrazeny na Obr. 18.



**Obr. 18.** Cyklické voltamogramy CPEs s obsahy 20 (zeleně), 30 (modře), 40 (oranžově), 50 (růžově) a 60 % (w/w) SDS (purpurově) při počátečním potenciálu  $-0,4 \text{ V}$  a konečných potenciálech  $+1,2 \text{ V}$ ,  $+1,4 \text{ V}$ ,  $+1,6 \text{ V}$  a  $+1,8 \text{ V}$ .

Jak je zřejmé z výše uvedených cyklických voltamogramů k významnému nárůstu proudového pozadí docházelo již při +1.2 V pro CPEs s obsahem 20 a 30 % (w/w) SDS. Z toho vyplývá, že obsah do 30 % (w/w) SDS neochrání uhlíkovou pastovou elektrodu před působením MeCN. Na rozdíl CPE s obsahem 60 % (w/w) SDS pro svůj vysokým ohmický odpor nelze použít pro voltametrická měření. Z těchto poznatků lze vyvodit závěr, že CPEs s obsahem 40 až 50 % (w/w) SDS je možné považovat za použitelné, kdy elektroda s obsahem 40 % SDS (w/w) se zdá být optimální.

### 7.5. Vliv rozpouštědel

Modifikovanou CPE s 20 % PO, 40 % grafitového prášku CR-5 a 40 % SDS (vše w/w) lze považovat za optimální pracovní elektrodu pro elektrochemická měření v čistě organických rozpouštědlech, kdy v této práci převažovaly spíše slabě polární organická rozpouštědla. Tato elektroda byla testována cyklickou voltametrií při počátečním potenciálu -0,4 V a konečném potenciálu +1,6 V. Seznam rozpouštědel, druh elektrolytu, hodnoty koncového anodického potenciálu ( $E_{cat}^a$ ) a velikost proudového pozadí ( $I_b$ ) jsou uvedeny v Tab. 2. Je nutné připomenout, že v prostředí dioxanu se uhlíková pasta rozpadla. Z uvedených dat je možné usoudit, že optimální rozpouštědlo pro anodická měření představuje MeCN.

**Tab. 2.** Vliv rozpouštědla na elektrochemické chování CPE/SDS.

Rozpouštědlo	Elektrolyt	$I_b / \mu A$	$E_{cat}^a / V$
Aceton	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	26,831	0,9
Dioxan	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	—	—
DMSO	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	26,115	0,7
EtOH	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	24,393	0,8
IPA	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	24,362	0,8
MeCN	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	0,109	1,2
MeOH	0,1 mol·l <sup>-1</sup> LiClO <sub>4</sub>	14,179	0,8

## 7.6. Kinetika elektrodoových reakcí

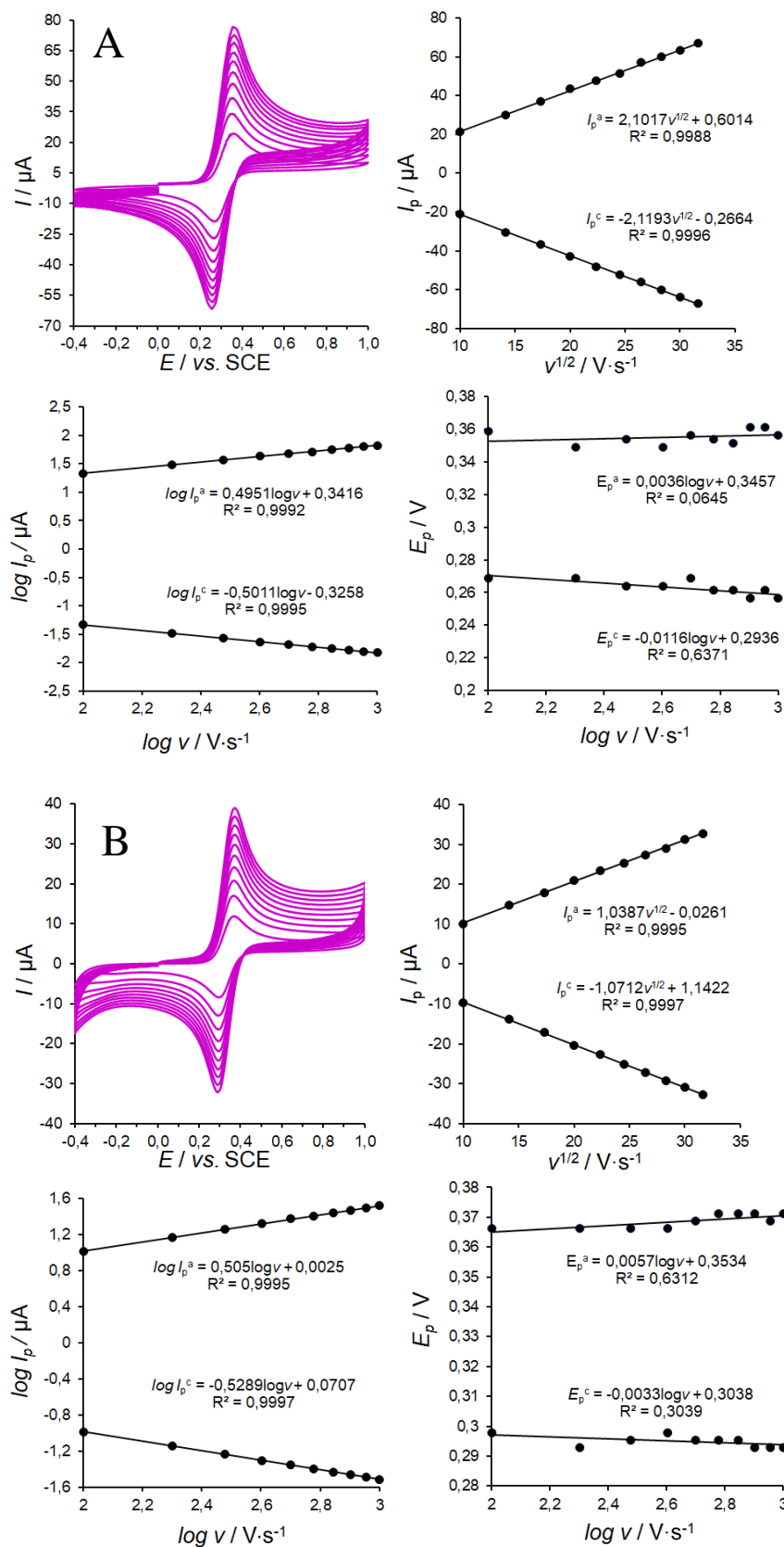
Pro námi zvolené elektrochemicky reverzibilní reakce ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  a  $p$ -chinon/ $p$ -hydrochinon), je potenciál píku ( $E_p$ ) společně s dalšími potenciálovými charakteristikami nezávislý na rychlosti posuvu potenciálu a proudová hustota píku je přímo úměrná druhé odmocnině rychlosti posuvu potenciálu ( $v^{1/2}$ ). Je zřejmé, že z výsledků těchto měření lze zjistit počet elektronů vyměňovaných při elektrodoové reakci a eventuálně i difúzní koeficient elektroaktivní látky.

V této diplomové práci byly zkoumány následující systémy, a to elektrochemické chování výše zmíněných redoxních párů ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na CPE/SDS, CPE/CPC a GCE v čistém MeCN obsahující  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Při studiu závislosti potenciálů píků a proudových odezev ferrocenu na změně rychlosti polarizace bylo zjištěno, že proud píku ( $I_p$ ) lineárně roste s  $v^{1/2}$ . Tyto lineární regrese byly charakterizovány koeficienty determinace ( $R^2$ ), a to  $R^2 = 0,9988$  pro CPE/SDS a  $R^2 = 0,9995$  pro GCE.

Dále byly zjištěny hodnoty směrnic pro CPE/SDS  $k^a = 0,495 \mu\text{A} (\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})^{-1/2}$  a pro GCE  $k^a = 0,505 \mu\text{A} (\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})^{-1/2}$  z lineárních závislostí logaritmu proudu píku ( $\log I_p$ ) na logaritmu rychlosti skenování ( $\log v$ ). Z těchto hodnot lze usoudit, že je pro obě elektrody elektrochemická oxidace řízena difúzí ( $k = 0,5$ ) a ne adsorpcí ( $k = 1,0$ ).

Výsledky z měření lze vidět na Obr. 19 a Tab. 3. Za laboratorních podmínek, pro ideálně jedno-elektronový reverzibilní systém platí, že rozdíl  $E_p^a$  a katodického potenciálu ( $E_p^c$ ) by měl dle Nernstovy rovnice odpovídat přibližně hodnotě 59 mV. K této teoretické hodnotě se více přiblížila GCE. Co se týče poměru proudových odezev  $|I_p^a/I_p^c|$ , byly spočteny hodnoty kolem 1 pro obě pracovní elektrody. Tyto hodnoty nasvědčují o ideálním reverzibilním chování ferrocenu na CPE/SDS.



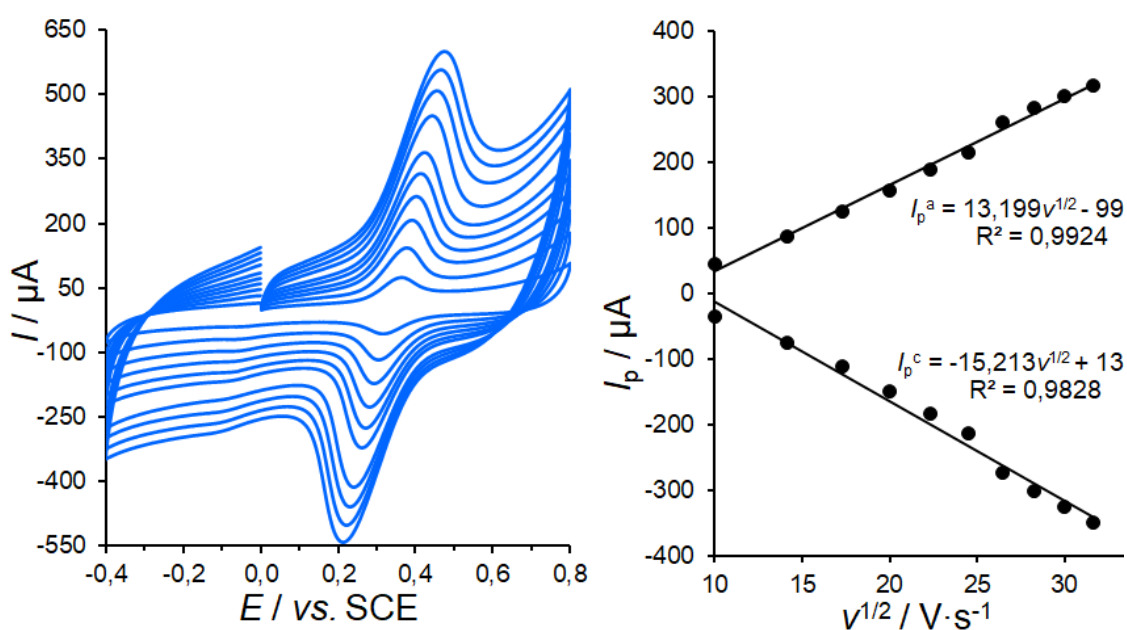


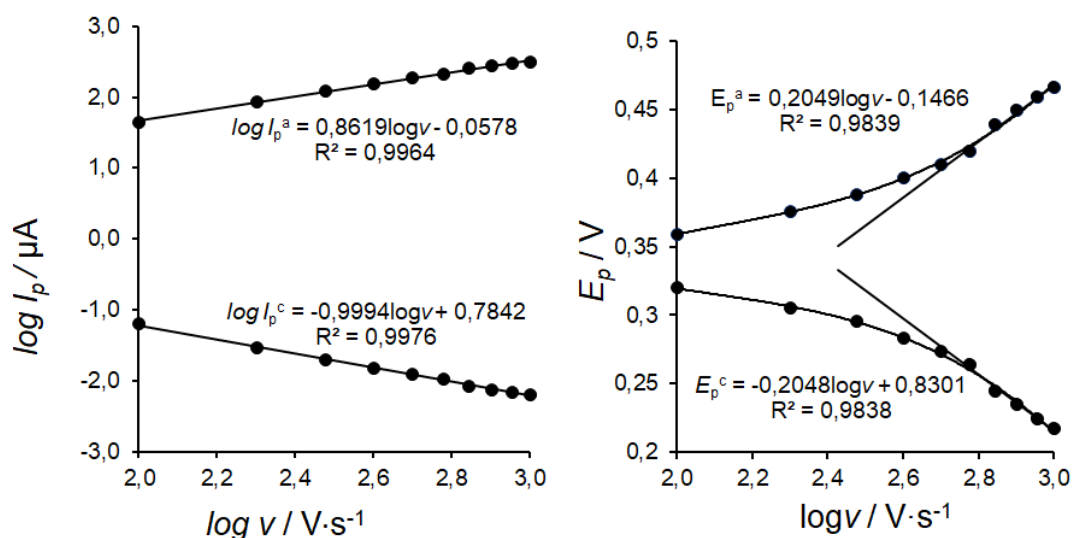
**Obr. 19.** Cyklické voltamogramy  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ferrocenu obdržené na CPE/SDS (A) a GCE (B) v MeCN s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlostech skenování  $100\text{--}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i tradiční grafy kinetických závislostí.

**Tab. 3.** Porovnání CPE/SDS, CPE/CPC a GCE pomocí Fc/Fc<sup>+</sup> redoxního páru.

$v$ (mV·s <sup>-1</sup> )	$\Delta E_p$ (V)	$ I_p^a/I_p^c $	$\Delta E_p$ (V)	$ I_p^a/I_p^c $	$\Delta E_p$ (V)	$ I_p^a/I_p^c $
	CPE/CPC	CPE/CPC	CPE/SDS	CPE/SDS	GCE	GCE
100	0,0391	1,2444	0,0903	1,0198	0,0684	1,0395
200	0,0708	1,1367	0,0806	0,9850	0,0732	1,0600
300	0,0928	1,0976	0,0903	1,0060	0,0708	1,0478
400	0,1172	1,0343	0,0855	1,0139	0,0684	1,0245
500	0,1367	1,0234	0,0879	0,9867	0,0732	1,0341
600	0,1563	0,9977	0,0928	0,9787	0,0757	1,0094
700	0,1953	0,9561	0,0903	1,0214	0,0757	1,0059
800	0,2148	0,9367	0,1049	0,9993	0,0781	0,9946
900	0,2344	0,9247	0,1001	0,9908	0,0757	1,0103
1000	0,2490	0,9057	0,1001	0,9970	0,0781	1,0002

Dále byla uskutečněna studie rychlosti na CPE obsahující 40 % (w/w) CPC v prostředí základního elektrolytu (MeCN) s přítomností 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ferrocenu (viz. Obr. 20), kdy bylo zjištěno, že  $I_p$  lineárně roste s  $v^{1/2}$ . Tato lineární závislost byla charakterizována  $R^2 = 0,9924$ . Dále byly zjištěny hodnoty směrnice  $k^a = 0,8619 \mu\text{A} (\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})^{-1/2}$  a  $k^c = -0,9994 \mu\text{A} (\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})^{-1/2}$  z lineárních závislostí  $\log I_p$  na  $\log v$ . Z těchto hodnot lze usoudit, že je elektrochemická oxidace řízena spíše adsorpcí ( $k = 1$ ).

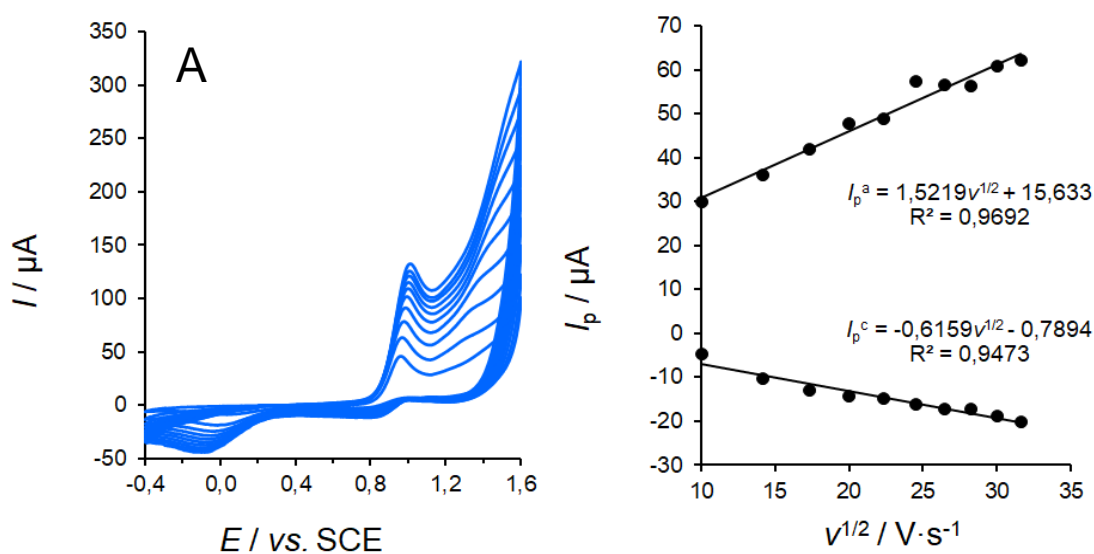


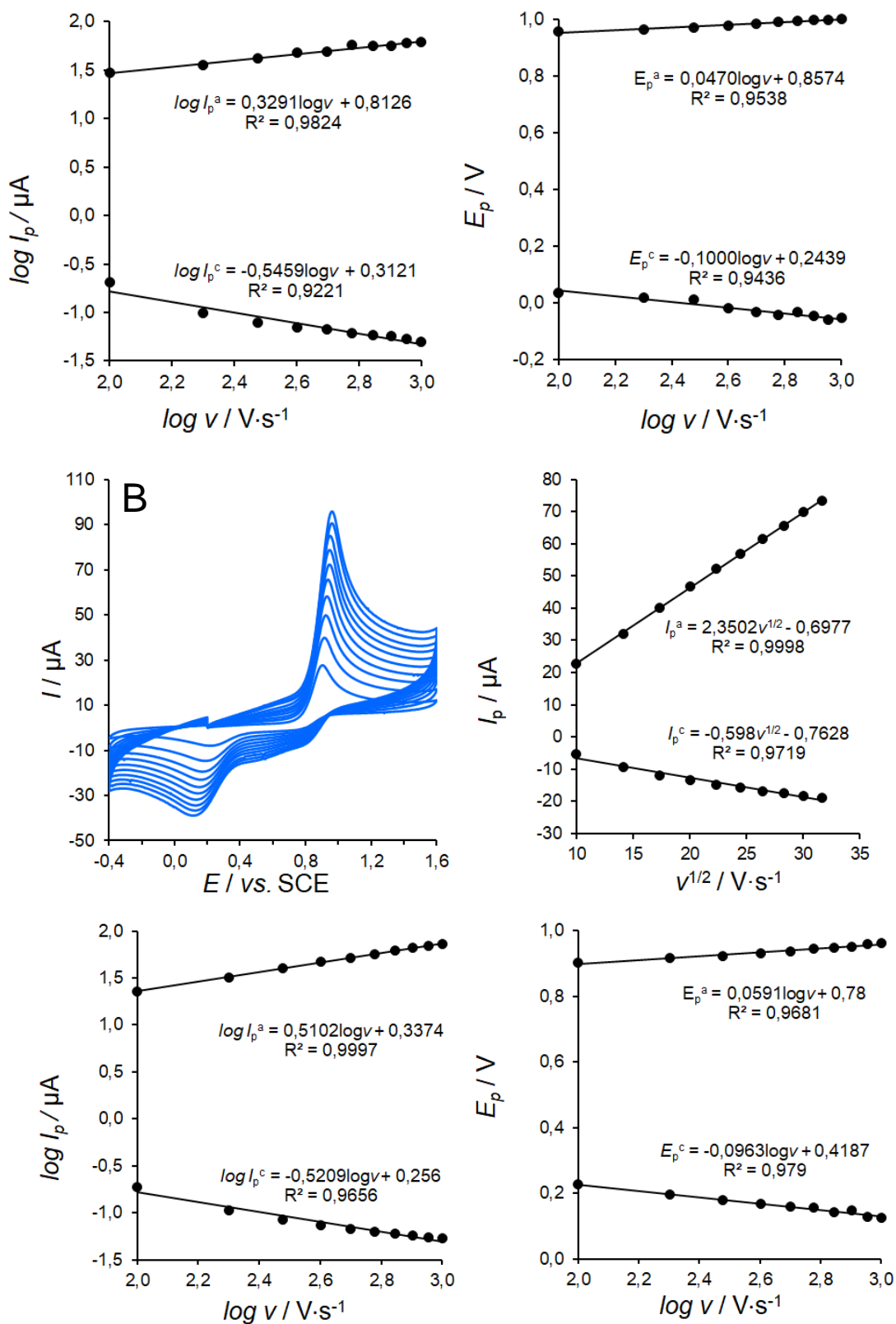


**Obr. 20.** Cyklické voltamogramy  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ferrocenu obdržené na CPE/CPC v MeCN s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlostech skenování  $100\text{-}1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i grafy typických kinetických závislostí.

V poslední řadě byla studie rychlosti skenování provedena v prostředí základního elektrolytu s  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrochinonem (viz. Obr. 21), představující typicky kvazi-reverzibilní systém (Tab. 4), kdy bylo zjištěno, že  $I_p$  lineárně roste s  $v^{1/2}$ , pro CPE/SDS nabývaly  $R^2$  hodnoty 0,9692 a 0,9998 pro GCE.

Poté byly spočteny hodnoty směrnice lineární regrese závislosti  $\log I_p^a$  na  $\log v$ , a to  $k^a = 0,329 \mu\text{A} (\text{mV s}^{-1})^{-1/2}$  pro CPE/SDS a  $k^a = 0,5102 \mu\text{A} (\text{mV s}^{-1})^{-1/2}$  pro GCE. Z těchto hodnot lze opět usoudit, že pro obě elektrody je oxidace řízena difúzí a ne adsorpcí.





**Obř. 21.** Cyklické voltamogramy 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  *p*-hydrochinonu obdržené na CPE/SDS (A) a GCE (B) v MeCN s 0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  LiClO<sub>4</sub> při rychlostech skenování 100–1000  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsou zobrazeny i typické průběhy kinetických závislostí.

**Tab. 4.** Porovnání CPE/SDS a GCE pomocí *p*-chinon/*p*-hydrochinon redoxního páru.

$v$ (mV·s <sup>-1</sup> )	$\Delta E_p$ (V)	$ I_p^a/I_p^c $	$\Delta E_p$ (V)	$ I_p^a/I_p^c $
	CPE/SDS	CPE/SDS	GCE	GCE
100	0,9204	6,2051	0,6763	4,2724
200	0,9448	3,5237	0,7202	3,4190
300	0,9570	3,2717	0,7446	3,3817
400	0,9937	3,3637	0,7617	3,4688
500	1,0156	3,3139	0,7788	3,5167
600	1,0327	3,5197	0,7886	3,6090
700	1,0254	3,3156	0,8032	3,6583
800	1,0425	3,2566	0,8008	3,7838
900	1,0547	3,2636	0,8301	3,8032
1000	1,0522	3,1068	0,8374	3,8973

### 7.7. Analýza modelových analytů

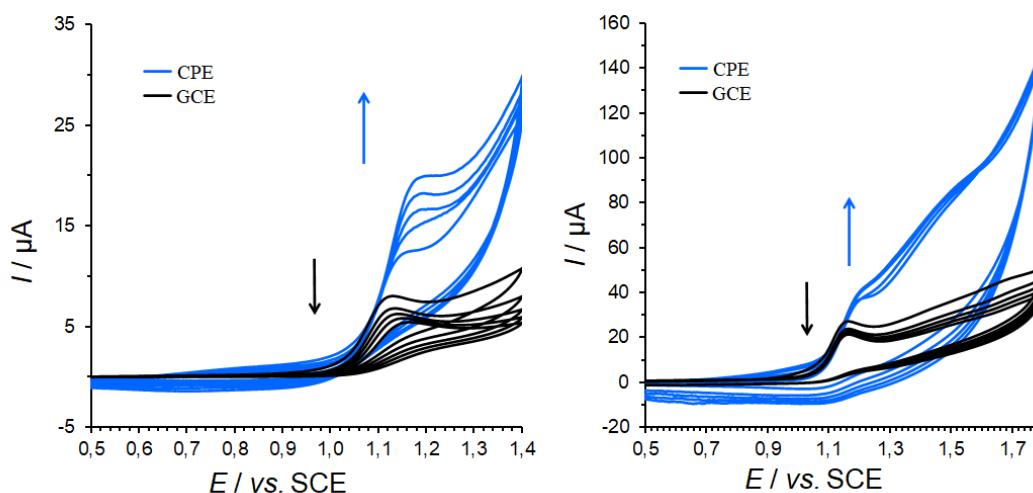
Pro testování využití CPEs modifikovaných tenzidy byla provedena série voltametrických měření dvou modelových analytů, představující roztoky VD3 a  $\beta$ -estradiolu v čistém MeCN obsahující 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  LiClO<sub>4</sub>. Zde je důležité konstatovat, že parametry diferenční pulsní voltametrie (DPV) nebyly optimalizovány pro dosažení maximálního proudového výtěžku elektrochemické oxidace těchto dvou biologicky aktivních látek. Cílem bylo porovnat vybranou CPE/SDS s komerční GCE za stejných pracovních podmínek.

Nejprve bylo nutné popsat elektrochemické chování VD3 a  $\beta$ -estradiolu tak, aby bylo možné určit hodnoty (polohy) oxidačních píků. Za tímto účelem byla provedena měření pomocí CV jejich 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  standardních roztoků při rychlosti skenování 50 a 100 mV·s<sup>-1</sup>. Poté byla provedena kalibrační měření pro koncentrační rozmezí od 50 do 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  VD3 a  $\beta$ -estradiolu za stejných pracovních parametrů DPV.

#### 7.7.1. Elektrochemické chování VD3

Pomocí CV byl proměřen 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok cholekalciferolu pro pět opakování při skenovacích rychlostech 50 a 100 mV·s<sup>-1</sup>, jak je vidět na Obr. 22. Připravená CPE s 40 % (w/w) SDS byla porovnána s komerční GCE, kdy na obou elektrodách bylo zjištěno ireverzibilní chování VD3. Při skenovací rychlosti 50 mV·s<sup>-1</sup> se v případě CPE/SDS objevil anodický pík při +1,14 V, při dalších opakováních docházelo ke zvyšování proudové odezvy

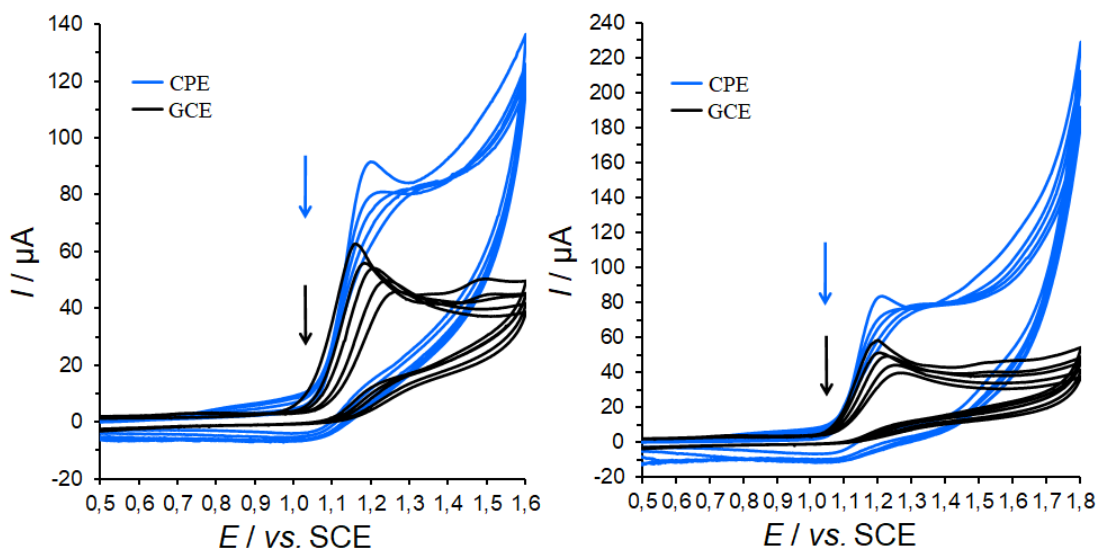
a posunu píku na +1,18 V. V případě GCE se oxidační pík objevil při +1,12 V, s každým opakováním docházelo k úpadku proudové odezvy a posunu píku přibližně o +0,01 V každým cyklem. Podobnému chování se dospělo i v případě použití rychlosti skenování  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nicméně nárůst výšky píku nebyl významný během opakujících se měření na stejném povrchu CPE/SDS. Z tohoto hlediska lze predikovat, že by se měla elektroanalytická měření VD3 provádět při vysokých rychlostech skenování, kdy je zaručena vyšší reprodukovatelnost opakovaných měření.



**Obr. 22.** Opakující se cyklická voltametrie (5 cyklů)  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cholecalciferolu na CPE/SDS a GCE, rychlost skenování  $50$  (vlevo) a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (vpravo).

### 7.7.2. Elektrochemické chování $\beta$ -estradiolu

Pomocí CV byl proměřen  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok  $\beta$ -estradiolu pro pět opakování při skenovacích rychlostech  $50$  a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , jak je demonstrováno na Obr. 23. Opět byla porovnáváno elektrochemické chování na CPE/SDS a GCE. Elektrochemická aktivita  $\beta$ -estradiolu se projevila oxidačním píkem při  $+1.2 \text{ V}$  v čistém MeCN s přítomností  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$ , kdy při dalších opakováních docházelo k poklesu proudové odezvy a posunu píku o  $+0,05 \text{ V}$ . V případě GCE se oxidační pík objevil při  $+1,15 \text{ V}$ , s každým opakováním docházelo taktéž k poklesu proudové odezvy a posunu píku přibližně o  $+0,025 \text{ V}$ . Obdobnému chování se dospělo i při použití dvojnásobně vyšší rychlosti skenování. Z výše uvedených skutečností lze usoudit, že  $\beta$ -estradiol podléhá ireverzibilní elektrodové oxidaci, kdy lze konstatovat, že při nižších rychlostech skenování jsou obdržené oxidační píky lépe vyvinuté a rozlišitelné od základní linie.



**Obr. 23.** Opakující se cyklická voltametrie (5 cyklů)  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu na CPE/SDS a GCE, rychlost skenování 50 (vlevo) a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (vpravo).

### 7.7.3. Možnosti voltametrického stanovení cholekalciferolu a $\beta$ -estradiolu

V elektroanalytické chemii se často používají pulzní voltametrické techniky pro svoji schopnost eliminovat kapacitní proud, způsobený nabitím pracovní elektrody (kondenzátoru), a tudíž dosáhnout nižších hodnot limitů kvantifikace (LOQ) a detekce (LOD). Tyto základní analytické parametry lze spočítat pomocí rovnic 6 a 7,

$$\text{LOD} = (3 \cdot s) / k \quad (6)$$

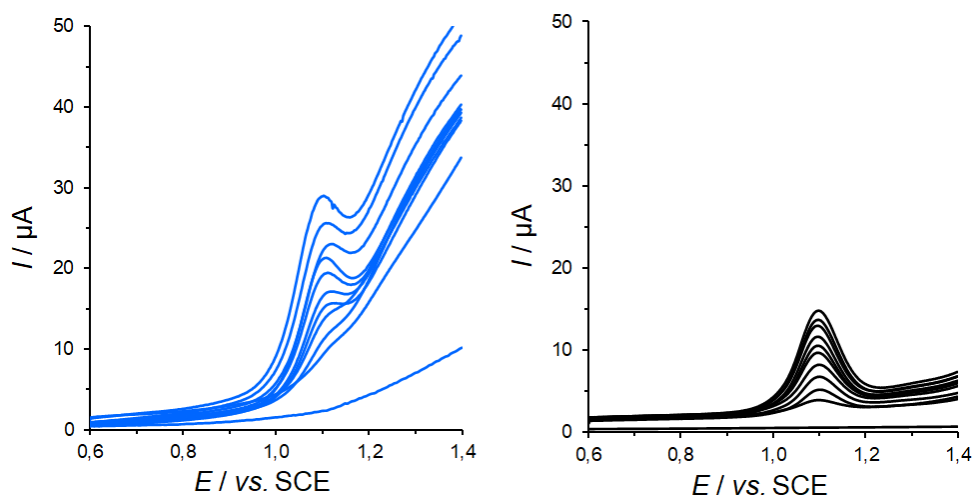
$$\text{LOQ} = (10 \cdot s) / k \quad (7)$$

kde  $s$  představuje směrodatnou odchylku šumu základní linie a  $k$  směrnici lineární regrese kalibrační závislosti, též známou jako citlivost analytické metody.

#### 7.7.3.1. Diferenční pulsní voltametrie cholekalciferolu

Obr. 24 ilustruje obdržené anodické voltamogramy cholekalciferolu pomocí DPV pro koncentrace 0 (základní linie), 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  měřené na CPE/SDS a GCE, kdy každý bod kalibrace byl minimálně pětkrát proměřen ( $N=5$ ) tak, aby mohla být spočtena i přesnost měření, jež se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka v procentech (%). Nicméně správnost analýzy modelového vzorku, prezentována často jako návratnost v procentech (%), nebyla v této studii stanovena pro VD3 a  $\beta$ -estradiol. Rovněž, jak již bylo v úvodu zmíněno, kalibrační měření nebyla prováděna za optimálních

podmínek (parametrů DPV). V těchto měření by se mohlo dále pokračovat v rámci další navazující diplomové práci.



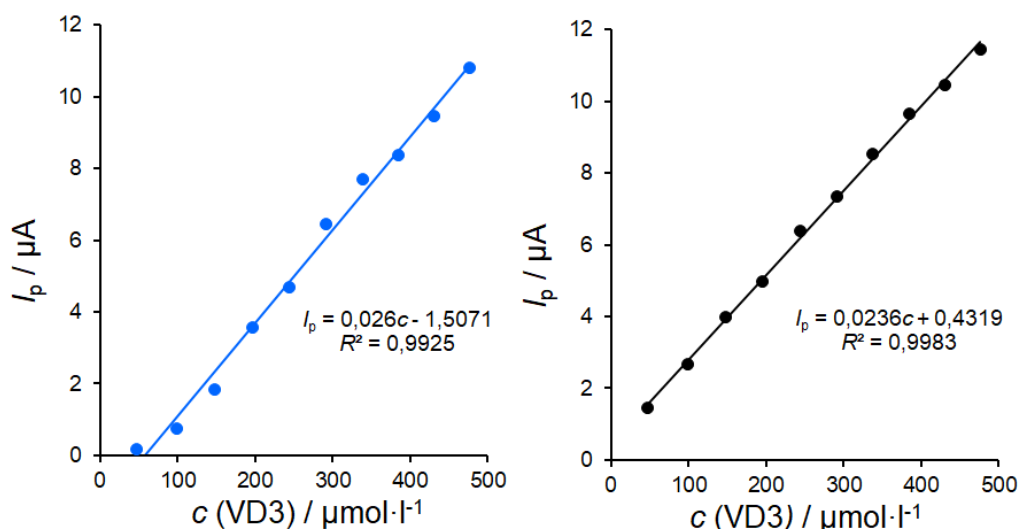
**Obr. 24.** DPV voltamogramy 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  VD3 obdržené na CPE/SDS (modré) a GCE (černé) v MeCN s 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  LiClO<sub>4</sub> při  $E_{\text{ampl}} = 60$  mV,  $E_{\text{step}} = 2,5$  mV,  $t_{\text{pulse}} = 0,05$  s a  $\nu = 50$  mV s<sup>-1</sup>.

Z těchto měření byly odečteny výšky píků a sestrojeny kalibrační závislosti (Obr. 25). Z velikosti úseku rovnic lineární regrese ( $q$ ) je možné usoudit, zdali je možné použít pro kvantitativní analýzu metodu standardního přídávku. V tomto případě byly obdrženy hodnoty  $-1,5071$   $\mu\text{A}$  pro CPE/SDS a  $+0,4319$   $\mu\text{A}$  pro GCE. Proto lze usoudit, že voltametrická analýza VD3 na CPE/SDS za zvolených pracovních podmínek nelze uskutečnit metodou standardního přídávku.

Lineární rozsahy VD3 jak pro CPE/SDS, tak i pro GCE přesahovaly koncentraci 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a lze je popsat rovnicemi lineární regrese  $I_p = 0,026c - 1,5071$  a charakterizovat korelačním koeficientem  $R^2 = 0,9925$  pro CPE/SDS a  $I_p = 0,0236c + 0,432$  a  $R^2 = 0,9983$  pro GCE. Obě elektrody měří stejně citlivě, jelikož poskytují podobnou hodnotu směrnice  $k$ .

Pro CPE/SDS vyšla hodnota LOD = 5,350  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota LOQ = 17,834  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro GCE vyšla hodnota LOD = 17,924  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota LOQ = 59,747  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z porovnání těchto hodnot lze dojít k závěru, že CPE modifikovanou tenzidy lze dosáhnout lepších analytických parametrů. Kromě toho je zřejmé, že po detailnější optimalizaci mohou být tyto hodnoty i desetinásobně nižší.





**Obř. 25.** Kalibrační závislosti VD3 pro CPE/SDS (modřá) a GCE (černá).

Hodnota RSD pro opakovaná měření ovlivňuje významně přesnost výsledné analytické metody. Pokud je vypočtená hodnota RSD (%) nižší než 5 %, považujeme metodu za velmi přesnou. Odchylky byly vypočteny dle rovnice 8.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (8)$$

Pro koncentraci 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  VD3 byla spočtena opakovatelnost měření 6,473 % RSD pro CPE/SDS a 3,434 % RSD pro GCE. Z porovnání těchto dvou hodnot je zřejmé, že měření na komerční GCE jsou přesná a splňují kritérium 5 % RSD pro hladinu významnosti 95 %.

Ve srovnání s dříve publikovanými voltametričnými metodami (viz. Tab. 5), které byly použity pro voltametričké stanovení cholekalciferolu, bylo s CPE/SDS dosaženo širšího lineárního rozsahu. Hodnoty LOD v porovnání pro CPE/SDS dosahovaly výrazně nižších hodnot. Lze předvídat, že po optimalizaci DPV parametrů bude dosaženo obdobných hodnot.

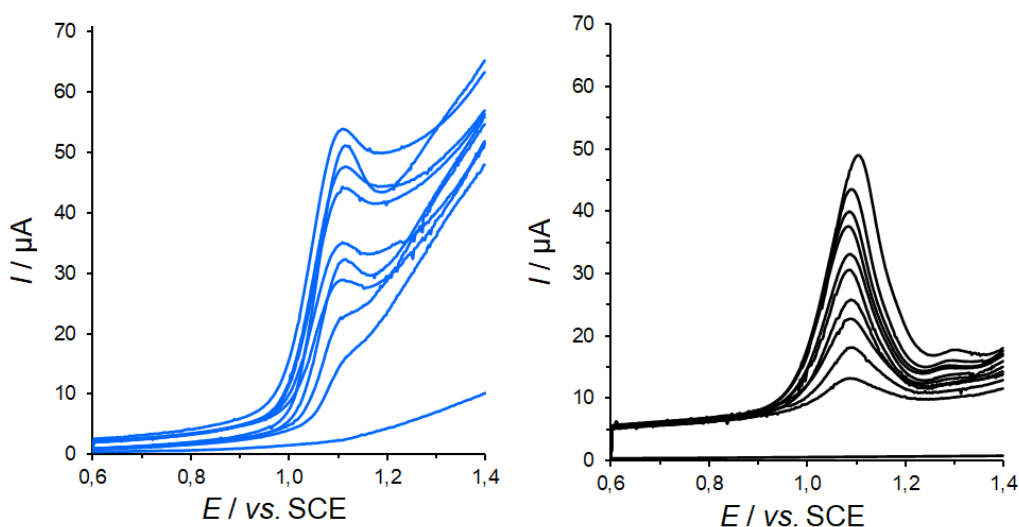
**Tab. 5.** Porovnání DPV v elektroanalýze VD3.

Senzor	Metoda	Pracovní médium	Linearita ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Ref.
GCE/SiO <sub>2</sub> /GO/Ni(OH) <sub>2</sub>	DPV	H <sub>2</sub> O, NaOH	5–50	0,003	[60]
GCE	DPV	40% EtOH, LiClO <sub>4</sub>	0,3–4,3	0,12	[61]
GCE	DPV	MeOH, LiClO <sub>4</sub>	2–200	2	[62]
CPE/SDS	DPV	MeCN, LiClO <sub>4</sub>	50–500	5,35	Tato práce

Poznámky: GO; oxidovaný grafen.

### 7.7.3.2. Diferenční pulsní voltametrie $\beta$ -estradiolu

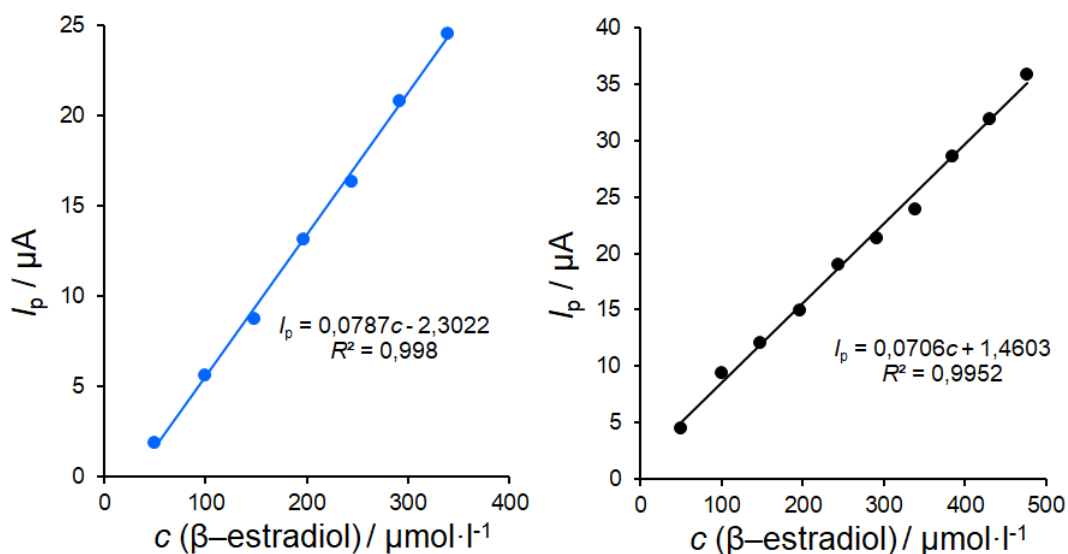
Obr. 26 ilustruje obdržené anodické voltamogramy  $\beta$ -estradiolu pomocí DPV pro koncentrace 0 (základní linie), 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  měřené na CPE/SDS a GCE, kdy každý bod kalibrace byl minimálně pětkrát proměřen ( $N = 5$ ). Z těchto měření byly odečteny výšky píků a vypočteny průměrné hodnoty ( $\bar{x}$ ) s odpovídajícími směrodatnými odchylkami ( $s$ ).



**Obr. 26.** DPV voltamogramy 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu obdržené na CPE/SDS (modré) a GCE (černé) v MeCN s 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při  $E_{\text{ampl}} = 60 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{pulse}} = 0,05 \text{ s}$  a  $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Lineární rozsah od 40 do 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu zjištěný pro CPE/SDS byl popsán rovnicí regrese  $I_p = 0,0787c - 2,3022$  a charakterizován korelačním koeficientem  $R^2 = 0,998$ . Na rozdíl výrazně širší lineární rozsah (60–500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu) byl obdržen pro GCE, jenž lze popsat rovnicí  $I_p = 0,0706c + 1,4603$  a charakterizován korelačním koeficientem  $R^2 = 0,9952$ . Obě elektrody měří stejně citlivě, jelikož mají podobnou hodnotu směrnice  $k$ . Dále bylo zjištěno, že dle úseku rovnice nejde ani s jednou elektrodou měřit metodou standardního přídatku, neboť nabývaly vysokých hodnot (viz. Obr. 27). Pro CPE/SDS vyšla hodnota  $\text{LOD} = 5,515,262 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota  $\text{LOQ} = 18,384 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro GCE byla vypočtena hodnota  $\text{LOD} = 6,847 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{LOQ} = 22,824 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nicméně i v tomto případě je nutné připomenout, že parametry DPV nebyly optimalizovány, a proto se dá předpokládat, že je možné dosáhnout výrazně vyšší citlivosti. Pro koncentraci 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -estradiolu byla spočtena opakovatelnost měření 7,275 % RSD pro CPE/SDS a 3,549 % RSD pro GCE.

Z porovnání těchto dvou hodnot je zřejmé, že měření na komerční GCE jsou přesnější a splňují kritérium 5 % RSD pro hladinu významnosti 95 %.



**Obr. 27.** Kalibrační závislosti  $\beta$ -estradiolu pro CPE/SDS (modrá) a GCE (černá).

Ve srovnání s vybranými voltametričnými metodami (Tab. 6), které byly použity pro voltametričké stanovení  $\beta$ -estradiolu, bylo s CPE/SDS dosaženo širšího lineárního rozsahu. Hodnota limitu detekce pro CPE/SDS je v porovnání s vybranými metodami vyšší. Lepších výsledků však dosahují ty metody, které jsou schopny detekovat  $\beta$ -estradiolu v úzkém kalibračním intervalu.

**Tab. 6.** Porovnání voltametričných metod v elektroanalýze  $\beta$ -estradiolu.

Senzor	Metoda	Pracovní médium	Linearita ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Ref.
GCE/CB	ASV	H <sub>2</sub> O, PB	0,15–3,5	0,09	57
GCE/CNT/Ni(cyclam)	SWV	MeCN, NaOH	0,5–40	0,06	63
GCE/MWCNTs-Nafion <sup>®</sup>	SWV	H <sub>2</sub> O, PB	0,25–10	0,01	64
CPE/SDS	DPV	MeCN, LiClO <sub>4</sub>	50–350	5,52	Tato práce

Poznámky: CB; uhlíkové saze, CNT; uhlíkové nanotrubičky; MWCNTs; vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky a PB; fosfátový pufr.

## 8. Závěr

Z obdržených experimentálních výsledků lze usuzovat, že původní Adamsova koncepce uhlíkové pastové elektrody modifikované pevným tenzidem [3] je plně funkční a obecně použitelná pro voltametrická měření nepolárních biologicky aktivních látek v nevodných, tj. čistě organických rozpouštědlech. Dosavadní výsledky úvodní studie v rámci této DP potvrzují, že výběr vhodného typu uhlíkového materiálu, pastové kapaliny, druhu povrchově aktivní látky v kombinaci se zvoleným organickým rozpouštědlem hrají klíčovou roli ve výsledných elektrochemických vlastnostech elektrody a tudíž i v její praktické použitelnosti.

Základním kritériem pro přípravu těchto modifikovaných heterogenních senzorů je elektrochemická inertnost použitých tenzidů, nebo alespoň elektroinaktivita v oblasti potenciálů se signály studovaných látek. Z charakterizace, prováděné na standardních redoxních párech pro nevodná prostředí a na dvou modelových analytech, lze vydedukovat, že uhlíková pastová elektroda modifikovaná dodecylsíranem sodným (v pevném stavu) oplývá zajímavými měřicími schopnostmi, které jsou srovnatelné s charakteristikami komerční elektrody ze skelného uhlíku. Uhlíkové pastové elektrody mají oproti elektrodám z tuhého uhlíku velkou výhodu v tom, že je tu možnost úpravy složení elektrodového materiálu.

Na závěr této víceméně úvodní studie je nutno dodat, že s vidinou budoucího širšího využití CPE s pevnými tenzidy v praxi, bude nutno věnovat více pozornosti optimalizaci experimentálních i přístrojových podmínek pro dané látky a analyzované typy vzorků.

## 9. Reference

- [1] I. Švancara, R. Metelka, T. Mikysek, K. Vytřas, 30 Years with Carbon Paste Electrodes at the University of Pardubice. *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* 23, **2017**, 5–50.
- [2] I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytřas, Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes. *Taylor & Francis / CRC Press*, Boca Raton (FL, USA), **2012**.
- [3] L.S. Marcoux, K.G. Prater, B.G. Prater, R.N. Adams, Nonaqueous carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* 37, **1965**, 1446–1447.
- [4] J. Wang, B. A. Freiha, et al., Extractive preconcentration of organic compounds at carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* 56, **1984**, 849–852.
- [5] E. Wierzbicka, I. Legocka, et al., Halloysite as a Carbon Paste Electrode Modifier for the Detection of Phenol Compounds. *International Journal of Electrochemical Science* 14 (5), **2019**, 4114–4123.
- [6] T. Sulistyorini, H. Setiyanto, et al., Modification of Carbon Paste Electrode with Ag Nanoparticle for Voltammetric Determination of Phenol. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Mathematics, Science, and Computer Science Education International Seminar, MSCEIS*, **2019**, 1–7.
- [7] K. Skrzypczyńska, K. Kuśmierk, Nutshells et al., as modifiers of carbon paste electrode used in detecting chloroorganic water pollutants. *BioResources* 15 (1), **2020**, 368–381.
- [8] S. M. Foukmeniok, O. Ilboudo, et al., New electrochemical carbon paste electrode (CPE) based on Arabic Gum modifier and dedicated to 4-aminophenol. *Journal of Applied Electrochemistry* 49 (6), **2019**, 575–584.
- [9] S. Žabčíková, M. Sýs, a kol., Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných tenzidy. *L. seminář o tenzidech a detergentech, sborník přednášek*, **2017**, 73–79, ISBN: 978-80-7560-098-1.
- [10] T. Kawashima, G.A. Rechnitz, et al., Potentiometric enzyme electrode for uric acid. *Analytica Chimica Acta* 83, **1976**, 9–17.
- [11] H. Dejmeková, J. Zima, et al., Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in Flowing Methanolic Solutions. *Electroanalysis* 24, **2012**, 1–5.
- [12] K. Kalcher, I. Švancara, et al., Heterogeneous Carbon Electrochemical Sensors. *Encyclopedia of Sensors*, **2006**, 1–147, ISBN: 1-58883-056-X.

- [13] I. Švancara, K. Vytřas, a kol., Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, **1994**, str. 138–146.
- [14] K. Kalcher, J.–M. Kauffmann, et al., Sensors Based on Carbon Paste Electrochemical Analysis. *A Review with Particular Emphasis on the Period 1990–1993*, 1994, 2.
- [15] [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=86035](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=86035) [Online 21.06.2021].
- [16] G.R. Robinson, et al., Graphite. Critical Mineral Resources of the United States – Economic and Environmental Geology and Prospects for Future Supply. *U.S. Geological Survey Professional Paper* 1802, **2017**, J1–J6.
- [17] I. Švancara, K. Schachl, Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické listy* 93, **1999**, 490–499.
- [18] H.E. Zittel, F.J. Miller, et al., A Glassy–Carbon Electrode for Voltammetry. *Analytical Chemistry* 37, **1965**, 200–203.
- [19] M. Hassler, Other commonly used biomedical coatings: pyrolytic carbon coatings. *Coatings for Biomedical Applications*, **2012**, 75–105.
- [20] J. M. Freitas, T. C. Oliveira, et al., Boron Doped Diamond Electrodes in Flow–Based Systems. *Frontiers in Chemistry* 7, **2019**, 1–21.
- [21] K. Muzyka, J. Sun, et al., Boron Doped Diamond: Current Progress and Challenges in view of Electroanalytical Applications. *Analytical Methods* 11, **2019**, 397–414.
- [22] A. C. Power, B. Gorey, et al., Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors. *Nanotechnology Reviews* 7 (1), **2017**, 19–41.
- [23] Z. Sun, D. K. James, et al., Graphene Chemistry: Synthesis and Manipulation. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2 (19), **2011**, 2425–2432.
- [24] A. Mateo–Alonso, D. Bonifazi, et al., Functionalization and applications of fullerene. *Carbon Nanotechnology*, **2006**, 155–189.
- [25] A. M. Holban, A. M. Grumezescu, et al., Inorganic nanoarchitectonics designed for drug delivery and anti-infective surfaces. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*, **2016**, 301–327.
- [26] Y. Nakama, Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*, **2017**, 231–244, ISBN: 978-0-12-802005-0.

- [27] A. Blažej, a kol., Tenzidy. *Alfa*, **1977**, 481.
- [28] M. T. Garcia, et al., Biodegradability and toxicity of sulphonate-based surfactants in aerobic and anaerobic aquatic environments. *Web of science* 43, **2009**, 295–302.
- [29] J. Šmidrkal, a kol., Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy* 93, **1999**, 421–427.
- [30] M. S. Zohr Shiri, W. Henderson, M. R. Mucalo, A Review of The Lesser–Studied Microemulsion–Based Synthesis Methodologies Used for Preparing Nanoparticle Systems of The Noble Metals, Os, Re, Ir and Rh. *Materials* 12 (12), **2019**, 1–26.
- [31] C. Bondi, J. L. Marks, et al., Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. *Environmental Health Insights* 9, **2015**, 27–32.
- [32] P. Pitter, et al., Hydrochemie. *VŠCHT*, **1999**, 555.
- [33] K. Kalcher, et al., Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis. *Electroanalysis* 2, **1990**, 419–433.
- [34] K. Digua, J. M. Kauffmann, J. L. Delplancke, Surfactant modified carbon paste electrode: Part 1: Electrochemical and microscopic characterization. *Electroanalysis* 6 (5–6), **1994**, 451–458.
- [35] K. Gong, Q. Fang, et al., Nonaqueous redox–flow batteries: organic solvents, supporting electrolytes, and redox pairs. *Energy and Environmental Science* 8, **2015**, 3515–3530.
- [36] Wang, J., Ü. Anik Kirgöz, J.-W. Mo, J. Lu, A. Nasser Kawde, and A. Muck, Glassy carbon paste electrodes. *Electrochemistry Communications*, **2001**, 3 (4), p. 203–208.
- [37] M. Sýs, T. Mikysek, Electrochemical characterisation of carbon paste electrodes modified with different surfactants. *52. seminář o tenzidech a detergentech*, **2019**.
- [38] T. Mikysek, M. Stočes, et al., Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod. *Chemické listy* 108 (5), **2014**, 513–518.
- [39] J. Q. Chambers, et al., Electrochemistry of quinones. *The Quinonoid Compounds* 1, **1988**, 719–757.
- [40] N. S. Neghmouche, T. Lanez, Calculation of Electrochemical parameters starting from the polarization curves of ferrocene at glassy carbon electrode. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* 4, **2013**, 37–45.

- [41] J. Barek, Jiří. F. Opekar, K. Štulík, Voltametrické a polarografické metody. *Elektroanalytická chemie*, **2005**, 73–117, ISBN: 80-246-1146-5.
- [42] J. Wang, et al., Study of Electrode Reactions and Interfacial Properties. *Analytical electrochemistry*, **2006**, 29–34, ISBN: 978-0-471-67879-3.
- [43] M. Sýs, R. Metelka, M. Stočes, K. Vytřas, Electrochemical properties of  $\alpha$ -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous–acetonic mixture. *Monatsh Chem* 147, **2016**, 31–38.
- [44] A. A. Albahrani, R. F. Greaves, et al., Fat–Soluble Vitamins: Clinical Indications and Current Challenges for Chromatographic Measurement. *The Clinical Biochemist Reviews* 37 (1), **2016**, 27–47.
- [45] S. Žabčíková, T. Mikysek, et al., Electrochemical Study and Determination of All-*trans*-Retinol at Carbon Paste Electrode Modified by a Surfactant. *Food Technology & Biotechnology* 56 (3), **2018**, 337–343.
- [46] V. Palička, a kol., Vitamin D a jeho role (nejen) v osteologii. *Interní medicína pro praxi* 13 (10), **2011**, 383–387.
- [47] A. Durović, Z. Stojanović, et al., Electrochemical Determination of Vitamin D<sub>3</sub> in Pharmaceutical Products by Using Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 32, **2020**, 741–748.
- [48] R. D. Webster, et al., Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The Chemical Records*, 12 (1), **2012**, 188-200.
- [49] M. D. Lovander, et al., Critical Review–Electrochemical Properties of 13 Vitamins: A Critical Review and Assessment. *Journal of The Electrochemical Society*, 165 (2), **2018**, G18–G49.
- [50] U. Gröber, J. Reichrath, et al., Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. *Dermatoendocrinology* 6 (1), **2014**, 1–6.
- [51] J. Klouda, J. Barek, et al., Non–Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 47 (5), **2017**, 384–404.



- [52] K. Nováková, T. Navrátil, Laboratorní přístroje a postupy. *Chemické Listy* 108, **2014**, 219–225.
- [53] K. Pecková, K. Nesměrák, Electrochemistry of Bile Acids, Cholesterol, and Related Compounds. *Sensing in Electroanalysis* 7, **2012**, 87–96.
- [54] Riyanto, R. A. Tama, Cyclic voltammetry of glucose, uric acid, and cholesterol using gold electrode. *AIP Conference Proceedings* 2229, **2020**, ISBN: 030037-1-030037-6.
- [55] S. Whirledge, J. A. Cidlowski, Steroid Hormone Action. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, **2019**, 115–131, ISBN: 978-0-323-47912-7.
- [56] S. L. Moura, et al., Electrochemical detection in vitro and electron transfer mechanism of testosterone using a modified electrode with a cobalt oxide film. *Sensors and Actuators B* 202, **2014**, 469–474.
- [57] J. Smajdor, R. Piech, et al., Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection. *Analytical Biochemistry* 544, **2018**, 7–12.
- [58] M. M. Ngundi, O. A. Sadik, et al., First comparative reaction mechanisms of  $\beta$ -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. *Electrochemistry Communications* 5, **2003**, 61–67.
- [59] J. Klouda et al., A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples. *Biochemistry* 134, **2020**, 1–11.
- [60] T. C. Canevari, F. H. Cincotto, et al., Synthesis and characterization of a-nickel (II) hydroxide particles on organic-inorganic matrix and its application in a sensitive electrochemical sensor for vitamin D determination. *Electrochimica Acta* 147 (1), **2014**, 688–695.
- [61] F. H. Cincotto, T. C. Canevari et al., Highly sensitive electrochemical sensor for determination of vitamin D in mixtures of water-ethanol. *Electroanalysis* 26 (12), **2014**, 2783–2788.
- [62] J. Hernández-Méndez, A. Sánchez-Pérez et al., Voltammetric determination of vitamin D<sub>3</sub> with a rotating glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 6 (6–8), **1988**, 737-741.

- [63] X. Liu, D. K. Y. Wong, Electroanalytic detection of estradiol at a carbon nanotube/Ni(Cyclam) composite electrode fabricated based on a two-factorial design. *Analytica Chimica Acta* 594, **2007**, 184–191.
- [64] N. Terui, B. Fugetsu, S. Tanaka, Voltammetric behavior and determination of 17  $\beta$ -estradiol at multi-wall carbon nanotube–nafion modified glassy carbon electrode. *Analytical Science* 22, **2006**, 895–898.