

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Příprava a testování uhlíkových kompozitních
elektrod pro analýzu vybraných organických
sloučenin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Tereza Volná

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2014

Souhrn

Rutin a quercetin patří do skupiny flavonoidů, které se hojně nacházejí v mnoha rostlinách např. i v pohance (*Fagopyrum esculentum Moench.*). Rutin a quercetin vykazují elektrochemickou aktivitu a lze je analyzovat voltametrickými metodami. Byly připraveny uhlíkové kompozitní elektrody nemodifikované a modifikované uhlíkatými aerogely. Testování elektrod bylo prováděno cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií. Pomocí cyklické voltametrie byly testovány elektrochemické vlastnosti elektrod a to: rozsahy potenciálů, kvalita povrchu elektrod a velikost aktivního povrchu. Pomocí diferenčně pulzní voltametrie byly sledovány kalibrační závislosti rutinu, quercetinu a směsi obou látek. Tři vybrané elektrody, které vykazovaly nejvyšší citlivost na rutin a quercetin, byly použity pro analýzu reálného vzorku extraktu z pohanky.

Klíčová slova: uhlíková kompozitní elektroda, aerogel, flavonoid, voltametrie

Summary

Rutin and quercetin belongs to the group of flavonoids that are frequently found in many plants such as buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench.*). Rutin and quercetin exhibit electrochemical activity and can be analyzed using voltammetric methods. Two types of carbon composite electrode, unmodified and resorcinol–formaldehyde aerogels modified, were prepared in this work. Cyclic and differential pulse voltammetry were used for testing of electrochemical properties of the electrodes: the electrochemical window, electroactive surface and reversibility of the charge transfer. Differential pulse and adsorptive stripping differential pulse voltammetry were employed for analysis of rutin, quercetin and their mixture in model samples. Three selected electrodes which showed the highest sensitivity to rutin and quercetin were used for the analysis of real sample of buckwheat seeds extract.

Key words: carbon composite electrode, aerogel, flavonoid, voltammetry

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením paní RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....
Tereza Volná

Velmi děkuji paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Za poskytnutí důležitých rad, času stráveného konzultací, ale také za vstřícnost a bezmeznou ochotu, díky které moje diplomová práce mohla vzniknout a být dokončena. Děkuji rovněž doc. Petrovi Bartákovi za analýzu na GC-MS a pomoc s vyhodnocením chromatogramů. Poděkování patří také doc. Zuzaně Navrátilové a doc. Václavu Slovákovi z Ostravské Univerzity za poskytnutí uhlíkatých aerogelů jako modifikátorů.

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. UHLÍKOVÁ PASTOVÁ KOMPOZITNÍ ELEKTRODA	8
2.2. UHLÍKOVÁ TUHÁ KOMPOZITNÍ ELEKTRODA	9
2.3. MODIFIKOVANÉ UHLÍKOVÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODY	10
2.3.1. <i>Skupiny modifikátorů</i>	11
2.4. PŘÍPRAVA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY	13
2.5. PŘÍPRAVA UHLÍKOVÉ TUHÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODY	14
2.6. TESTOVÁNÍ ELEKTROD	15
2.7. VYUŽITÍ UHLÍKOVÝCH KOMPOZITNÍCH ELEKTROD V CHEMICKÉ ANALÝZE	16
2.8. ANORGANICKÁ ANALÝZA	16
2.9. ORGANICKÁ ANALÝZA	18
2.10. FLAVONOIDY.....	20
2.10.1. <i>Quercetin</i>	21
2.10.2. <i>Rutin</i>	23
2.11. STANOVENÍ QUERCETINU A RUTINU UHLÍKOVÝMI KOMPOZITNÍMI ELEKTRODAMI.....	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1. CHEMIKÁLIE	26
3.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	26
3.3. PRACOVNÍ POSTUPY	28
3.3.1. <i>Příprava pracovních roztoků</i>	28
3.3.2. <i>Příprava uhlíkových pastových elektrod</i>	28
3.3.3. <i>Příprava uhlíkových tuhých kompozitních elektrod</i>	29
3.3.4. <i>Cyklická voltamtrie</i>	31
3.3.5. <i>Diferenčně pulzní voltamtrie</i>	31
3.4. ANALÝZA OBSAHU RUTINU A QUERCETINU V EXTRAKTU Z POHANKY	32
3.4.1. <i>Analýza pomocí DPV</i>	32
3.4.2. <i>Analýza pomocí HPLC</i>	33
3.4.3. <i>Analýza pomocí GC-MS</i>	33
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1. UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY	34
4.2. ROZSAH POTENCIÁLŮ PŘIPRAVENÝCH TUHÝCH KOMPOZITNÍCH ELEKTROD.....	36
4.3. KVALITA POVRCHU ELEKTROD	37
4.4. VELIKOST ELEKTROAKTIVNÍ PLOCHY ELEKTROD.....	39
4.5. ANALYTICKÉ VYUŽITÍ KOMPOZITNÍCH ELEKTROD	39
4.5.1. <i>Opakovatelnost měření</i>	40
4.5.2. <i>Vliv doby a potenciálu akumulace na anodickou odezvu quercetinu</i>	42

4.6.	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI.....	43
4.6.1.	<i>Analýza směsi rutinu a quercetinu</i>	45
4.7.	ANALÝZA OBSAHU RUTINU A QUERCETINU V EXTRAKTU Z POHANKY	48
5.	ZÁVĚR.....	52
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	54
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55

1. Úvod

Současné trendy analytické chemie se dělí do dvou velkých skupin. Do první skupiny můžeme zařadit vývoj analytických metod využívajících vysoce sofistikované instrumentace jako jsou hmotnostní spektrometrie či jaderné magnetické rezonance ve spojení s vysoce účinnými separačními technikami, které jsou velmi citlivé, selektivní, ale také jsou finančně náročnější, složitější a zdlouhavé. Do druhé skupiny patří instrumentálně jednodušší metody, např. elektrochemické, které jsou rychlé, finančně méně nákladné, na obsluhu jednodušší, ale na úkor jejich nižší selektivity. Voltametrické metody nenacházejí tak široké uplatnění v praxi jako zmiňované separační metody, ale vyznačují se nižšími pořizovacími a provozními náklady, snadnou dostupností materiálů pro přípravu elektrod. Vhodnou modifikací elektrodoých materiálů lze pak zvýšit selektivitu těchto metod.

Cílem této práce je připravit uhlíkové kompozitní elektrody, které jsou alternativou ke rtuťové kapkové elektrodě, která je bohužel toxická a není vhodná pro dnešní svět zelené chemie. Dále by mohly být vhodnou alternativou k elektrodám z drahých kovů nebo skleněho uhlíku, jejichž pořizovací cena se pohybuje v tisících českých korun. Náklady na přípravu uhlíkových kompozitních elektrod se pohybují řádově v korunách až desítkách korun a vhodnou modifikací materiálu těchto elektrod lze zvýšit jejich selektivitu a citlivost pro dané účely.

Tato práce se věnuje stanovení rutinu a quercetinu voltametrickými technikami s použitím uhlíkových kompozitních elektrod, nemodifikovaných a modifikovaných uhlíkatými aerogely, obsahujících dva typy polymerního pojiva. Analýza byla prováděna na modelových vzorcích i v reálném vzorku pohanky.

2. Teoretická část

2.1. Uhlíková pastová kompozitní elektroda

Před více než padesáti lety, v době významného českého chemika a držitele Nobelovy ceny profesora Jaroslava Heyrovského, se začala psát historie uhlíkových pastových elektrod. Prvním předchůdcem uhlíkových pastových elektrod byla kapající uhlíková elektroda, která byla tvořena z uhlíkového prášku a pojiva. Důvodem, který přispěl k jejímu zavedení, byla snaha objevit elektrodu s obnovitelným povrchem a materiálem, jenž není toxický a nebezpečný pro životní prostředí jako rtuťová kapková elektroda (angl. drop mercury electrode, DME). Kapající uhlíková elektroda měla být vhodnou alternativou. Bohužel se neosvědčila, ale směsi uhlíkového prášku a pojiva připravené v hustší konzistenci se prezentovaly jako slibné elektrodové materiály pro přípravu uhlíkových pastových elektrod [1].

Uhlíková pastová elektroda (angl. carbon paste electrode, CPE) patří mezi elektrody z uhlíkatých materiálů (pyrolytický grafit, skelný uhlík). Řadí se k pevným elektrodám, ale uhlíková pasta, ze které je vyrobena není, kompaktním materiálem [2]. Uhlíková pasta je binární směs tvořená z vodivého uhlíkového prášku a organické nevodivé kapaliny, která slouží jako pojivo. Uhlíkový prášek je tvořen mikrometrickými částicemi o vysoké čistotě a distribuci. Nevodivá kapalina musí splňovat důležité vlastnosti, musí být dostatečně chemicky inertní, izolační, permanentní a s vodou nemísitelná. Mezi pojiva splňující tyto vlastnosti patří parafinové oleje nebo směsi polotuhých nasycených uhlovodíků (bílá vazelína) [1].

Uhlíková pastová elektroda má své výhody, ale i nevýhody. Jedna z hlavních nevýhod, která omezuje její použitelnost v praxi, je experimentální zkušenost pracovníka, na které závisí úspěch práce s uhlíkovou pastovou elektrodou. Protože povrch elektrody je heterogenní a má obecně nižší reprodukovatelnost měření, opakovatelná příprava uhlíkové pasty a obnovení povrchu elektrody vyžaduje značnou zkušenost a cvik. Další nevýhoda je doba její přípravy, která bývá delší oproti jiným elektrodám [3]. Na trhu je možnost zakoupit připravenou uhlíkovou pastu a neztrácet čas při její přípravě. Ale při homogenizaci složek v třecí misce v laboratoři si analytik může zvolit jednotlivé složky a jejich poměr v pastě podle potřeby. To je jedna z velkých výhod uhlíkových pastových elektrod [1]. Mezi další výhody patří snadná dostupnost a především nízká finanční nákladnost materiálu. Ve srovnání

s pevnými elektrodami, jejichž obnovování povrchu je náročnější, je použití CPE velmi snadné, protože její povrch lze snadno obnovit pomocí odříznutí a následného vyleštění. Využití CPE je v oblasti anodických potenciálů výhodné, protože má velice nízký zbytkový proud. Touto vlastností mnohdy předčí jak elektrody z platiny nebo zlata, tak pevné grafitové elektrody. Uhlíkové pasty můžeme dále modifikovat a tím zvýšit citlivost a selektivitu. Uvedené výhody činí z uhlíkových pastových elektrod atraktivní sensory. [3].

2.2. Uhlíková tuhá kompozitní elektroda

Pozornost tuhým kompozitním elektrodám začala být věnována, když se ve světě a i v České republice začaly zavádět ekologické a bezpečnostní předpisy, které zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání rtuťových elektrod. Rtuťové elektrody jsou téměř ideální pracovní elektrody (např. kapková rtuťová elektroda – DME, visící rtuťová kapková elektroda – HDME a rtuťové filmové elektrody – MFE). Mají nízký odpor, chemickou a elektrochemickou inertnost, snadno obnovitelný povrch, široký rozsah pracovního potenciálu. Velmi omezená je jejich použitelnost pro anodickou oxidaci analytů a navíc jsou toxické a produkují toxický odpad, což je jejich největší nevýhoda z hlediska bezpečnosti práce v laboratoři a ochrany životního prostředí. Proto se objevuje snaha tyto elektrody nahradit jinými, pevnými materiály [4].

Materiál kompozitní elektrody je tvořen směsí minimálně jednoho izolantu a jednoho vodiče, případně přidaného modifikátoru. Jako materiál izolantu lze použít ceresinový vosk, teflon, polyethylen, epoxidové a metakrylátové pryskyřice. Podle typu uspořádání vodivé fáze v polymerní matici, mohou být kompozitní elektrody klasifikovány jako pravidelně nebo náhodně uspořádané. Jako materiál pro vodič se používá grafit a práškové kovy [5]. Kompozitní elektrody nabízejí určité výhody, jako jsou nízké provozní náklady, dlouhá životnost, nízká hmotnost, vysoký poměr signál – šum, široké potenciálové okno, odolnost k pasivaci, případně snadné mechanické a elektrochemické čištění, možnost chemické modifikace vodiče nebo izolantu nebo povrchu elektrody [6].

Příkladem kompozitní elektrody obsahující kov je stříbrná kompozitní elektroda. Tato elektroda je vyrobena ze směsi stříbrného a grafitového prášku, který je rozptýlen v metakrylátové pryskyřici [4].

Kompozitní uhlíkové elektrody se skládají z jedné nebo více vodivých složek různě uspořádaných (např. grafitový prášek), které jsou odděleny izolantem (např. epoxidová pryskyřice). Tyto elektrody nabízejí mnoho potenciálních analytických výhod ve srovnání s klasickými elektrodami tvořenými souvislou homogenní vrstvou vodivého materiálu. Zlepšení signálu je vysvětlováno urychlením difuzního toku, což vede k větší proudové hustotě, nižším detekčním limitům a snížení závislosti na konvekčním transportu. Rozložení vodiče a izolantu v materiálu, a tím i na povrchu, hraje významnou roli při získání požadovaného vylepšení proudové hustoty [7].

Kompozitní elektrody lze využít pro stanovení anorganických a organických látek. Nalezly uplatnění v anodické rozpouštěcí voltametii (ASV) při voltametrické analýze iontů kovů (Cd, Pb, Cu, Tl, As) a některých aniontů (Cl^- , Br^-). Praktické využití kompozitních elektrod v organické analýze je omezeno nižší selektivitou a problémy s pasivací povrchu. Problém s pasivací může být vyřešen elektrochemickým nebo mechanickým čištěním. Kromě toho mnoho organických sloučenin poskytuje píky při stejném potenciálu, což vyžaduje krok předběžné separace. Kompozitní elektrody lze např. využít pro stanovení nitrosloúčenin nebo pro anodickou oxidaci aromatických aminosloúčenin a fenolů [6]. Podobně jako uhlíkovou pastovou elektrodu, lze i tuhou kompozitní elektrodu modifikovat různými skupinami modifikátorů, které jsou popsány níže. Použitím modifikátoru lze zvýšit citlivost, zlepšit selektivitu a účinnost analýzy.

2.3. Modifikované uhlíkové kompozitní elektrody

Základem modifikovaných uhlíkových kompozitních elektrod je směs práškového grafitu a nevodivého pojiva. Další složkou ve směsi je pak sám modifikátor. Modifikátorem je obvykle jedna látka, ale kompozity mohou být modifikovány i více složkami. Množství modifikátoru v kompozitu se obvykle pohybuje v rozmezí od 10 do 30 % (w/w), v závislosti na charakteru modifikátoru, aby v modifikovaném kompozitu byl dostatek aktivních míst [1].

Hlavní důvod, proč modifikovat uhlíkový kompozit, je získat elektrodu s žádanými novými, často předdefinovanými vlastnostmi. Modifikace uhlíkových kompozitních elektrod může být dvojího typu. Chemicky modifikovaná CPE je první typ. Na rozdíl od relativně složité úpravy pevných materiálů je příprava chemicky modifikovaných uhlíkových pastových elektrod (CMCPE) velmi jednoduchá, prostřednictvím různých alternativních

postupů. Modifikátor může být rozpuštěn v pojivu nebo smíchán mechanicky při homogenizaci uhlíkové pasty. Je také možné smáčet uhlíkový prášek s roztokem modifikátoru a po odpaření rozpouštědla se získá uhlíkový prášek impregnovaný modifikátorem [1]. Druhý typ je modifikace elektrody *in situ*. Modifikátor je pouze na povrchu elektrody a může být odstraněn po skončení měření. K dispozici je potom nemodifikovaná elektroda. Výhodou modifikace *in situ* je, že stejná uhlíková pasta může být modifikována několika modifikátory [2].

Funkce, které plní modifikátor v uhlíkovém kompozitu jsou:

- zachycení žádoucího analytu, např. při zakoncentrování v rozpouštěcí analýze
- zprostředkování elektrodoových reakcí pomocí imobilizované molekuly
- změna povrchových vlastností uhlíkových kompozitních elektrod

Mezi modifikátory používanými v poslední době lze najít jednotlivé sloučeniny, speciální anorganické materiály nebo i živé organismy [1].

2.3.1. Skupiny modifikátorů

1. Chemické sloučeniny a analytická činidla

Pro modifikaci uhlíkových pastových elektrod lze použít klasická analytická činidla, jako jsou dimethylglyoxim, 8-hydroxychinolin nebo deriváty 2-naftolu. Používají se jako selektivní modifikátory pro akumulaci v adsorpční voltametii vybraných iontů [1].

2. Iontoměniče

Např. cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB) se používá jako vhodný modifikátor pro prekoncentraci kovů. Z katexů např. dodecylsulfát sodný se používá v elektroanalýze aminů jako jsou dopamin a serotonin [8,9].

3. Jílové minerály

Patří sem např. zeolit a montmorillonit. Tyto látky mohou být přírodní i syntetického původu, představují skupinu hydratovaných krystalických aluminosilikátů. Vykazují adsorpční a katalytické vlastnosti. Uhlíkové pastové elektrody modifikované jílovými minerály se využívají ve speciální analýze reálných vzorků [1].

4. Huminové látky

Huminové kyseliny a humáty jsou známy jako efektivní iontoměniče přírodního původu. Uhlíková pastová elektroda modifikovaná humáty je velmi vhodná pro detekci iontů vzácných kovů [1].

5. Substráty ze živých organismů

Uhlíkovou pastu lze modifikovat pomocí biomasy, jako jsou rašelina, vodní řasy, bakterie nebo chitin [1].

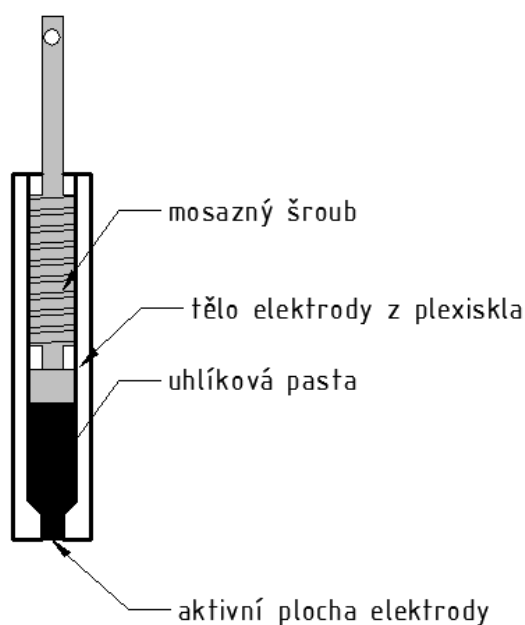
6. Uhlíkaté materiály

Pro modifikaci uhlíkové pasty lze použít různé formy přírodního uhlí (hnědé, černé), aktivní uhlí a uhlíkaté aerogely. Zmíněné uhlíkaté materiály přitahují pozornost jako adsorbenty. Adsorpční vlastnosti jsou způsobeny velkou povrchovou plochou a pórovitou strukturou. Uhlíkaté aerogely vykazují nízký elektrický odpor, mají vysokou povrchovou plochu $> 400 \text{ m}^2/\text{g}$ a velikost pórů je $< 100 \text{ nm}$. Uhlíkaté aerogely použité v elektrodách se jeví jako vhodný způsob pro elektrickou sorpci v odstranění iontů z brakické vody, mořské vody a radioaktivních odpadních toků. Další výzkumy ukázaly, že i měď, kadmium, olovo, nikl a zinek lze odstranit z roztoků pomocí uhlíkatých aerogelů [3].

Modifikované elektrody jsou často používané při voltametrických stanoveních organických sloučenin, protože použitím vhodného modifikátoru lze zlepšit selektivitu, účinnost a především zvýšit citlivost, a to zejména v anodické a katodické rozpouštěcí voltametii [10].

2.4. Příprava uhlíkové pastové elektrody

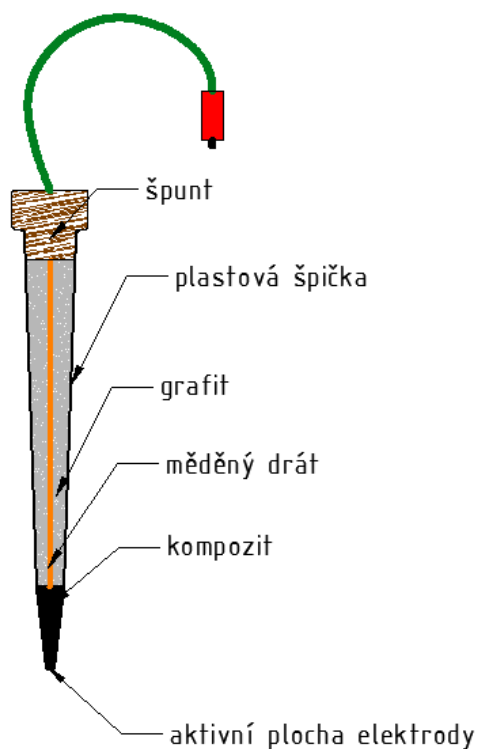
Pro přípravu uhlíkové pasty se používá uhlíkový (grafitový) prášek a vhodné pojivo (organická kapalina), které se musí důkladně homogenizovat v třecí misce. Vhodným uhlíkovým materiálem je grafitový prášek. Tento materiál má vysokou jednotnost distribuce částic, jejichž velikost cca 5 μm odpovídá požadavkům na vhodný uhlíkový materiál pro přípravu past. Aktivní uhlí a saze nelze doporučit k přípravě uhlíkových past. Tyto formy uhlíku mívají obtížně definovatelné velikosti částic a jejich distribuce a vykazují adsorpční schopnosti, které se mohou nežádoucím způsobem projevit v chování past. Jako vhodné pojivo se používají chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkavé látky. Tyto požadavky splňují lehké uhlovodíky $\text{C}_6 - \text{C}_{10}$, aromáty, silikonové oleje nebo parafinový olej, který se používá nejčastěji a je znám pod názvem Nujol. Obě složky pro přípravu uhlíkové pasty se důkladně homogenizují v třecí misce. Příprava pasty by měla být pečlivá, protože tato fáze ovlivňuje budoucí vlastnosti elektrody. Vzniklá pasta je hustá, ale zároveň se nesmí drolit a lepit se na povrch třecí misky. Uhlíkovou pastu lze uchovávat v plastové nádobce, pasty jsou stabilní, vydrží řadu týdnů bez výraznějších změn vlastností. Uhlíková pasta se plní do elektrodového pouzdra, které je tvořeno např. z plexiskla a mosazného šroubu (obr. 1). Duté elektrodové tělo se naplní uhlíkovou pastou a utlačí se pomocí mosazného šroubu. Takto připravená elektroda se ponechá několik dní vyžrát, aby se dokončila homogenizace [2].



Obrázek 1 Uhlíková pastová elektroda

2.5. Příprava uhlíkové tuhé kompozitní elektrody

Uhlíková kompozitní elektroda je tvořena vodivým a nevodivým materiálem. Jako vodivá část se používá grafitový prášek a jako izolant lze použít např. epoxidovou pryskyřici. Uhlík a epoxidová pryskyřice se homogenizují, čímž dojde k vytvoření plastické kompozitní hmoty. Takto připravená směs se naplní do plexisklového válečku a nechá se šest hodin polymerizovat v sušárně při 65°C. Poté se aktivní povrch elektrody zabrousí. Elektrický kontakt se vytvoří měděným drátkem, který se vsune do vrstvy práškového grafitu naspaného do těla elektrody a zajišťujícího elektricky vodivé spojení mezi kompozitním materiálem a kovovým vodičem (obr. 2) [11].



Obrázek 2 Uhlíková kompozitní elektroda

2.6. Testování elektrod

Každou nově připravenou uhlíkovou kompozitní elektrodu je potřeba otestovat. Důvodem je, že na rozdíl od komerčně dostupných pevných elektrod, pro něž základní elektrochemické vlastnosti jsou srovnatelné, u kompozitních uhlíkových elektrod se jednotlivé fyzikálně – chemické a elektrochemické vlastnosti mohou výrazně lišit případ od případu. Výběr komponent uhlíkové směsi pro přípravu elektrod, jejich kvalita a vzájemný poměr ve směsi, způsob přípravy a optimální homogenizace – všechny tyto aspekty určují výsledné chování elektrod. Elektrochemické vlastnosti různých typů elektrod lze jen přibližně předvídat a jejich podrobnější popis vyžaduje provedení příslušných testů. Mezi parametry, které se sledují při testování elektrod, patří [12]:

- Ohmický odpor
- Rozsah potenciálů a zbytkový proud
- Měření s modelovým systémem

Velikost ohmického odporu má přímý vliv na měření elektrochemických závislostí. Uhlíkové směsi s vysokým ohmickým odporem vykazují zvýšené zbytkové proudy. Ohmický odpor uhlíkových směsí se pohybuje v desítkách ohmů. Vyšší odpor může být způsobený použitím nevhodného grafitu nebo pojiva [12].

Vlastnosti jako rozsah potenciálů a zbytkové proudy představují asi nejvýznamnější parametry kompozitních uhlíkových elektrod ve voltametii. Bezpochybně by měly být testovány u každé nově připravené elektrody. Rozsah potenciálu, v němž lze měřit, určuje především kvalita použitého uhlíkového prášku a pojiva a jejich vzájemný poměr. Potenciálový rozsah závisí na prostředí, v němž měření bylo provedeno. V kyselých roztocích bývá -1,0 V až +1,5 V, v neutrálních -1,3 V až +1,4 V a v alkalických -1,2 V až +1,2 V (vs. Ag/AgCl). Velikost zbytkového proudu nemůže být přesně definována, protože silně závisí na složení uhlíkové směsi a použitého typu měření. Zbytkové proudy se mohou pohybovat v desítkách nA nebo mohou být v řádu μA [12].

Mezi modelové systémy používané pro jednoduchou charakterizaci elektrod ve voltametrické patří:

- $[Fe(CN_6)]^{3-} / [Fe(CN_6)]^{4-}$ - tento redoxní pár představuje typický reverzibilní systém. Doporučená koncentrace se pohybuje mezi 10^{-4} až 10^{-3} mol/l. Při použití klasické cyklické voltametrie by měl být potenciálový rozdíl ΔE_p mezi anodickými a katodickými píky 59 mV při 25°C [12].
- Ag^+ / Ag^0 – tento systém se obvykle sleduje cyklickou voltametrií v octanových tlumivých roztocích nebo roztocích dusičnanů a poskytuje stejné informace jako předešlý redoxní pár [12].
- Chinon/hydrochinon – je klasifikován jako kvazi-reverzibilní systém, jehož reakční kinetika závisí na typu použité elektrody a pH prostředí [12].

2.7. Využití uhlíkových kompozitních elektrod v chemické analýze

Uhlíkové kompozitní elektrody našly široké uplatnění v anorganické a organické analýze. Pro chemickou analýzu se využívají nemodifikované i modifikované uhlíkové kompozitní elektrody. Méně často se pro stanovení anorganických iontů, komplexů a molekul používají nemodifikované elektrody. Oproti tomu se v organické analýze využívají jak nemodifikované tak i modifikované elektrody. Nemodifikované elektrody jsou především atraktivní v případech, že hydrofobní pojivo, které je použito v uhlíkovém kompozitu jako izolant, působí jako určitý druh modifikátoru, který přitahuje lipofilní molekuly mnoha organických a biologických látek, včetně drog nebo léčiv [13].

2.8. Anorganická analýza

Anorganická analýza s různými druhy uhlíkových kompozitních elektrod patří mezi nejširší oblast aplikací v elektrochemii. Více než 70 prvků periodické tabulky, ve formě volných iontů nebo vázaných v komplexech a molekulách, bylo stanoveno uhlíkovými kompozitními elektrodami v kombinaci s voltametrickými, amperometrckými nebo potenciometrckými metodami [13].

Chemicky modifikované uhlíkové kompozitní elektrody jsou převážně využívány v kvantitativní analýze. Umožňují zvýšit citlivost a selektivitu pomocí prekoncentrace analytu na povrchu elektrody s využitím metody rozpouštěcí voltametrie [13].

Uhlíkové kompozitní elektrody umožňují analyzovat široké spektrum materiálů různého původu: technologické a komerční produkty, vzorky z životního prostředí, které mohou být pevné, kapalné nebo plynné, biologické tkáně. Můžeme analyzovat přátelské materiály jako ovoce a zeleninu nebo velmi nebezpečné nestabilní látky jako je azid olovnatý. Uhlíkové kompozitní elektrody se stále drží na předních příčkách ve využití v moderní anorganické elektroanalýze. Především chemicky modifikované elektrody přinesly mnoho nových a zajímavých postupů jako je speciální analýza. Např. pro sledování těžkých kovů a jejich migrace v životním prostředí byla využita CPE s jílovým modifikátorem [1].

Ušlechtilé kovy, jako Au, Ag a těžké kovy Hg, Cu, Pb, Cd, Zn ve vodných roztocích určitého složení, mohou být detegovány na CPE pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie, kdy se nejprve na povrchu elektrody elektrolyticky redukují ionty M^{n+} a deponují se ve formě kovu M^0 s následně se re-oxidují $M^0 \rightarrow M^{n+}$. Pro stříbro byl použit modelový vzorek matrice (fotografická lázeň), zatímco další těžké kovy byly analyzovány v reálných vzorcích (přírodní nebo znečištěné vody, sedimenty, ovzduší, odpady, lidské vlasy, povýstřelová rezidua). Ionty s negativním potenciálem redukce např. Zn^{2+} nelze detegovat pomocí nemodifikované uhlíkové pastové elektrody, neboť jejich signál leží v katodické oblasti mimo využitelný potenciálový rozsah CPE. Způsob jak překonat toto omezení je použít pokovovanou (modifikovanou) CPE, která je pokryta filmem rtuti, což umožňuje redukcí kovových iontů ve formě amalgámu [13]. V tabulce 1 jsou uvedeny některé analytické aplikace uhlíkových kompozitních elektrod v anorganické analýze.

Tabulka 1 Aplikace uhlíkových kompozitních elektrod v anorganické analýze

Analyt	Vzorek	Elektroda		Měřící technika	LOD	citace
		Pojivo	Modifikátor			
Au ^{III}	Modelový roztok	Minerální olej (Nujol)	-	LSV	$5 \cdot 10^{-9}$ mol/l	[14]
Ag ^I	Modelový roztok	Minerální olej (Nujol)	-	LSV	$5 \cdot 10^{-9}$ mol/l	[14]
Cd ²⁺	Říční voda	Minerální olej (parafín)	Amberlit IRC	DPV	$4 \cdot 10^{-8}$ mol/l	[15]
Cu ^{II}	Minerální rudy	Minerální olej (Nujol)	Hektorit	DPV	$1 \cdot 10^{-7}$ mol/l	[16]
Pb ²⁺	Lidská moč	Minerální olej (Nujol)	Amberlite IRC	ASV	$6 \cdot 10^{-9}$ mol/l	[13]
Hg ²⁺	Odpadní voda	Minerální olej (parafín)	Silikagel	DPASV	$5 \cdot 10^{-9}$ mol/l	[13]
Zn ²⁺	Pitná voda	trikresylfosfát	Rtuťový film <i>in situ</i>	DPASV	$2 \cdot 10^{-7}$ mol/l	[17]

2.9. Organická analýza

Pro široké použití kompozitních a uhlíkových pastových elektrod v organické analýze je několik důvodů. Hlavním důvodem je téměř neomezená možnost volby složení uhlíkových směsí, čímž lze elektrody přizpůsobit pro zamýšlené analytické použití, které umožňuje buď zvýšit citlivost a selektivitu stanovení nebo potlačit rušivé vlivy [1]. Praktické využití uhlíkových kompozitních elektrod v organické analýze je spojeno s dvěma problémy. První je pasivace povrchu elektrody. Druhý problém je způsobený tím, že organické sloučeniny mají stejné nebo velmi podobné potenciály (např. nitro-sloučeniny). Tento problém vyžaduje použití předběžného separačního kroku. Ale i přes tyto problémy jsou uhlíkové kompozitní elektrody hojně využívány v organické analýze [18].

Modifikované i nemodifikované uhlíkové kompozitní elektrody jsou využívány v přímém stanovení oxidovatelných léčiv v různých farmaceutických přípravcích nebo se využívají pro stanovení fenolů či aromatických aminů. Mez stanovitelnosti se na nemodifikovaných CPE pohybuje od $1 \cdot 10^{-6}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l bez akumulace. S akumulací mez stanovitelnosti klesne až na $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l. Výběrem vhodné prekoncentrační techniky se může mez stanovitelnosti ještě snížit. Nemodifikované CPE našly uplatnění především ve farmaceutické a klinické analýze. Např. při stanovení metabolitů léků a drog v moči, jejichž matrice je komplikovaná, analytik hledá přítomnost nebo nepřítomnost látky určitého potenciálu. Uhlíkové pastové elektrody modifikované enzymy jako jsou peroxidáza, glukózoxydáza atd. se využívají např. v analýze sacharidů, především glukózy, která se stanovuje v potravinách a krevním séru [1].

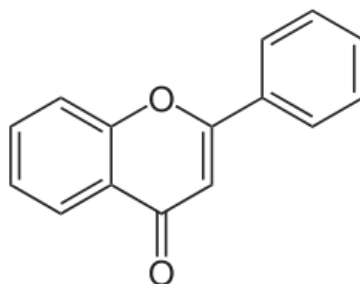
Karboxylové kyseliny jsou další skupinou, kterou lze analyzovat uhlíkovými kompozitními elektrodami. Nejčastěji studovaným analytem je laktát, který je především sledován v analýze potravin ve fermentačních procesech nebo v klinické analýze. Mez stanovení se u karboxylových kyselin pohybuje v řádech $1 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Nejnížší mez stanovení $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l byl naměřen u kyseliny askorbové. Ethanol je analyt, který se nejčastěji analyzuje ve skupině alkoholů. Stanovuje se v různých nápojích. U modelových vzorků byla naměřena mez detekce $8 \cdot 10^{-10}$ mol/l, ale u reálných vzorků je tato mez o několik řádů vyšší. Další skupinou jsou pesticidy, které lze stanovit v reálných vzorcích jako je půda, říční vody s mezí stanovitelnosti v řádu 10^{-9} mol/l nebo nižší [1]. V tabulce 2 jsou uvedeny vybrané aplikace uhlíkových kompozitních elektrod pro organickou analýzu.

Tabulka 2 Aplikace uhlíkových kompozitních elektrod v organické analýze

Analyt	Vzorek	Elektroda		Měřicí technika	LOD	citace
		Pojivo	Modifikátor			
Bisfenol A	Odpadní plastové materiály	Minerální olej (parafín)	CTAB	DPV	8 nmol/l	[13]
4-nitrofenol	Modelový roztok	Minerální olej (parafín)	Zeolit	DPV	10 μ mol/l	[13]
Azobenzen	Odpadní voda	Minerální olej (Nujol)	-	DPV	-	[13]
Nikotin	Tabákové listy	Minerální olej (parafín)	Cholin oxidáza + hovězí sérový albumin	DPASV	1 \cdot 10 ⁻⁵ mol/l	[13]
Aspirin	Acylpirin	Minerální olej (parafín)	-	SWV	1 fmol (v 5 μ l)	[13]
Heroin	Zabavená droga	Minerální olej (parafín)	-	LSV	-	[13]
Kyselina askorbová	Ovocný džus	-	-	DPCSV	5 \cdot 10 ⁻⁶ mol/l	[1]

2.10. Flavonoidy

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Strukturním základem všech flavonoidů je molekula flavonu (obr. 3), odvozená od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu, který má v poloze C-2 substituovanou fenylovou skupinu. Všechny tři kruhy bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami. Mohou se vyskytovat jako volné látky, ale častěji se vyskytují jako glykosidy, acylované glykosidy nebo polymery [19].

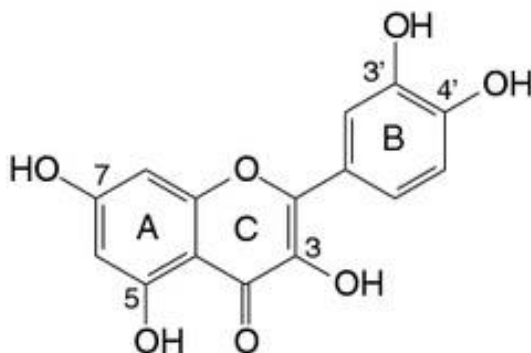


Obrázek 3 Struktura flavonu

Flavonoidy se nacházejí v mnoha rostlinách, ovoci, zelenině a čaji. Některé flavonoidy jsou důležitá rostlinná barviva, jiné jsou známé pro svoji chuť (trpkost, hořkost). Nejvýznamnější flavonoidní barviva jsou žlutě zbarvené flavonoly. Mezi ně patří quercetin a rutin [19].

2.10.1. Quercetin

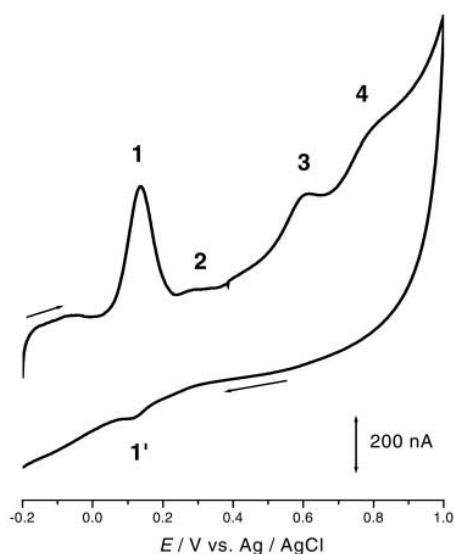
Quercetin (obr. 4) je žlutá krystalická látka špatně rozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v methanolu [20]. Quercetin je hojně rozšířen v rostlinné říši a z flavonoidních molekul patří k nejrozšířenějším. Nachází se např. v pohance seté, která ho obsahuje 2,4 mg/100g pohanky [21]. Quercetin je aglykon ze skupiny flavonoidů a do této skupiny patří i isoquercetin, rutin nebo hyperosid. Quercetin nemá navázanou cukernou složku v kruhu C v poloze 3 a má oproti rutinu tuto polohu obsazenou navíc hydroxylovou skupinou, což zvyšuje aktivitu quercetinu [22].



Obrázek 4 Strukturální vzorec quercetinu [23].

Quercetin vykazuje prospěšné účinky na lidské zdraví, působí jako silný antioxidant, působí proti zánětům, kardiovaskulárním onemocněním, bakteriím a virům. Quercetin zachytává radikály kyslíku a inhibuje oxidace LDL cholesterolu a tím chrání vitamín E v lidském těle. Quercetin společně s kyselinou askorbovou snižují výskyt oxidačního poškození neurovaskulární struktury v kůži [22].

Struktura quercetinu obsahuje fenolové skupiny, které se mohou oxidovat a z toho vyplývá, že quercetin je elektrochemicky aktivní a lze jej analyzovat pomocí elektrochemických metod. Pro zjištění elektrochemického chování quercetinu se používají voltametrické techniky jako CV, DPV a SWV (angl. Square–Wave Voltammetry). Cyklický voltamogram (obr. 5) quercetinu ukazuje čtyři oxidační píky. Nejsilnější anodický signál 1 odpovídá oxidaci dvou hydroxylových skupin v kruhu B v polohách 3' a 4'. Jedná se o dvouelektronovou oxidaci, projevující se reverzibilním píkem 1', jejíž produktem je *o*-chinon (schéma 1). Potenciály píků jsou závislé na pH, se snižující se hodnotou pH se píky posouvají směrem ke kladnějším hodnotám potenciálu. Produkty oxidace quercetinu se silně adsorbují na povrch elektrody, což má za následek snížení proudové odezvy ve druhém cyklu [22].



Obrázek 5 Cyklický voltamogram $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l quercetinu ve fosfátovém pufru pH = 7,7, rychlost polarizace elektrody 50 mV/s [22].

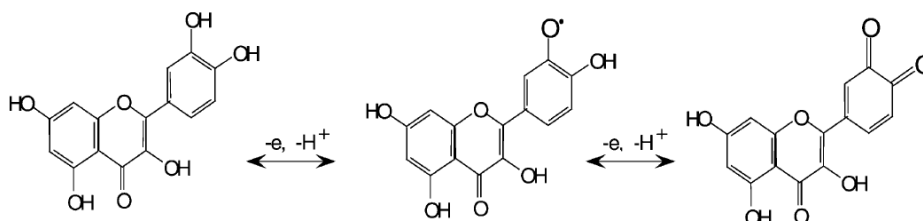
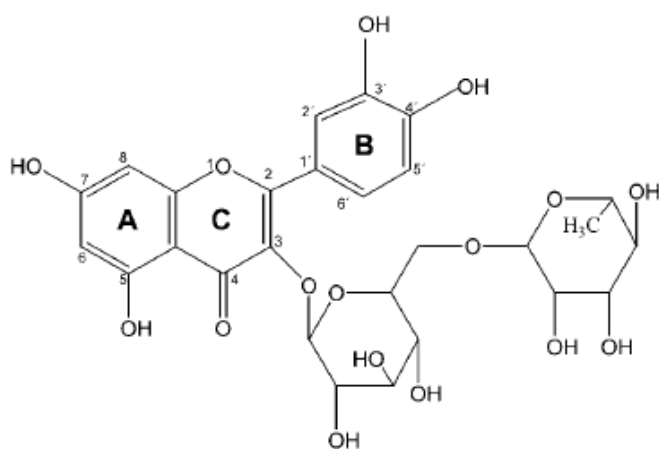


Schéma 1 První stupeň oxidace quercetinu [22].

Kromě elektrochemických metod lze použít i jiné techniky pro stanovení quercetinu. Velmi využívané jsou separační techniky jako kapalinová a plynová chromatografie. Dále se využívají spektrální techniky (NMR, UV) a elektroforetické techniky [24].

2.10.2. Rutin

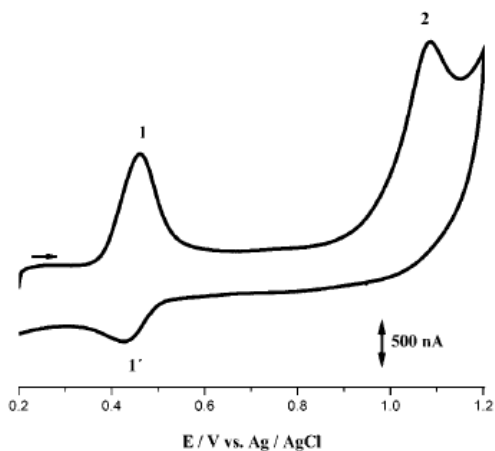
Rutin (obr. 6) je žlutá krystalická látka, dobře rozpustná v pyridinu, methanolu, hůře ve vodě, acetonu a téměř nerozpustná v chloroformu a etheru [20]. Rutin je jedním z nejvíce bioaktivních flavonoidů, je znám také pod názvem vitamín P. Výzkumy ukázaly, že rutin podobně jako quercetin má pozitivní účinky na lidské zdraví. Působí protizánětlivě, protinádorově, antibakteriálně, snižuje LDL cholesterol, posiluje stěny krevních kapilár a zvyšuje pružnost cév [25]. Rutin se vyskytuje v mnoha rostlinách, ovoci, zelenině a zeleném čaji. Největší obsah rutinu se nachází v pohance seté, 10 mg/100g [21]. Rutin je tvořen dvěma částmi, necukernou částí - quercetinem, na kterém je v kruhu C v poloze 3 navázaná cukerná část - disacharid rutinosa [24].



Obrázek 6 Strukturální vzorec rutinu [25]

Podobně jako quercetin i rutin obsahuje snadno oxidovatelné fenolové skupiny, tzn. že je elektroaktivní a můžeme jej analyzovat pomocí elektrochemických metod. Stejně jako v případě výše zmiňovaného quercetinu se elektrochemické chování rutinu sleduje pomocí voltametrických technik CV, DPV a SWV. Cyklický voltamogram (obr. 7) znázorňuje reverzibilní pík 1, který náleží oxidaci dvou hydroxylových skupin kruhu B v polohách 3' a

4^e. Jedná se o dvouelektronovou oxidaci, jejíž produktem je *o*-chinon (schéma 2). Pík 2 odpovídá ireverzibilní oxidaci dvou hydroxylových skupin v kruhu A v polohách 5^e a 7^e [25].



Obrázek 7 Cyklický voltamogram 0,1 mM rutinu v acetátovém pufru pH = 4,5, rychlost polarizace elektrody 100 mV/s [25].

Podobně jako u quercetinu i u rutinu se produkty oxidace silně adsorbují na povrch elektrody a snižují proudovou odezvu v následujících potenciálových cyklech. Se snižující se hodnotou pH se proudové píky posouvají ke kladnějším hodnotám potenciálu [25].

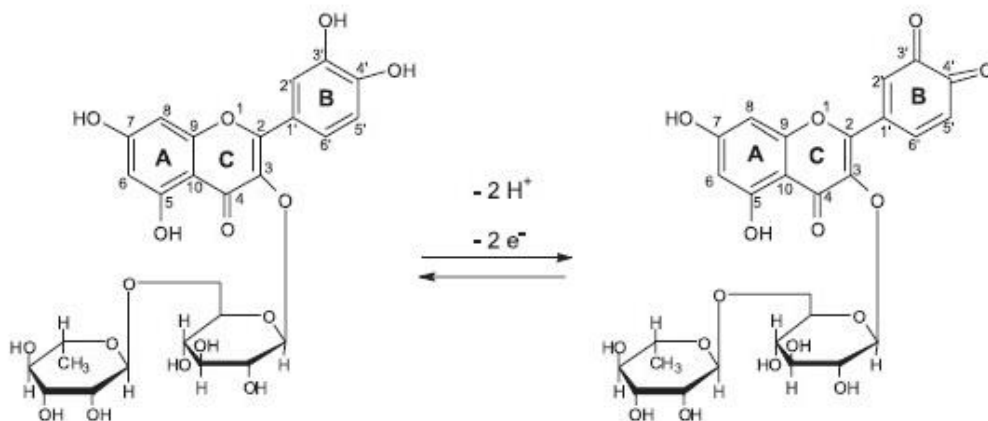


Schéma 2 První stupeň oxidace rutinu [26]

2.11. Stanovení quercetinu a rutinu uhlíkovými kompozitními elektrodami

Pro analýzu směsi rutinu a quercetinu v modelovém a reálném vzorku byla použita pastová elektroda s mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (CNTPE). Přesná množství quercetinu a rutinu byla přidána do zředěného krevního séra a moči a vzorky byly analyzovány. Průměrná výtěžnost byla 97 % a limit detekce $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l. Díky akumulaci quercetinu a rutinu na povrchu elektrody byly získány dobře oddělené píky pro citlivé a selektivní stanovení. Tato pastová elektroda snížila redoxní potenciál quercetinu a tím došlo k lepší separaci quercetinu a rutinu oproti elektrodě ze skelného uhlíku, na které proudové píky obou látek nebyly rozlišeny [27].

Pomocí uhlíkové pastové elektrody modifikované ftalocyaninem železa (IP/CPE) a iontovou kapalinou (IL/CPE) byl stanoven rutin v pohance seté. Jako měřicí technika byla použita DPV. Mez detekce rutinu obou elektrod byl IP/CPE $8 \cdot 10^{-8}$ mol/l a IC/CPE $6 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Nalezený obsah rutinu v pohance seté byl 12,3 a 11,0 mg/100g, což odpovídá množství 13,6 mg/ [21], které je uváděno v literatuře [28].

Pro stanovení quercetinu v reálném vzorku čaje a zimolezu byla použita uhlíková pastová elektroda modifikovaná silikagelem. Připravená elektroda vykazovala nízkou relativní směrodatnou odchylku 2,8 %, což vypovídá o dobré reprodukovatelnosti a přesnosti detekce. Mez detekce byla určena metodou DPV byla $1,16 \cdot 10^{-8}$ mol/l [29].

Uhlíková pastová elektroda modifikovaná DNA za použití iontové kapaliny jako pojiva byla použita pro stanovení rutinu. Byla použita CV a DPV. Mez detekce rutinu byla $1,3 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Elektroda vykazovala vyšší citlivost a selektivitu na rutin oproti elektrodě, u které nebyla použita iontová kapalina jako pojivo a nebyla modifikovaná DNA [30].

Byla popsána prekoncentrace rutinu a dalších flavonoidů (quercetin, morin, galangin atd.) na uhlíkové pastové elektrodě a jejich následné stanovení pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Mez stanovitelnosti flavonoidů bez použití akumulace byla 10^{-6} mol/l, po použití akumulace 1 - 4 min se mez detekce snížila na $10^{-8} - 10^{-7}$ mol/l [31].

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Pro přípravu uhlíkových past byl použit vločkový grafit (Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo), parafínový olej a nujol (oba byly zakoupeny v lékárně). Pro přípravu uhlíkového kompozitu byl použit vločkový grafit a dva druhy pojiva, rychleschnoucí epoxidové lepidlo transparentní typ CEP-12021 (Metrum, Přerov) a Dentacryl technický (SporaDental, Jičín). Jako modifikátory pro uhlíkové kompozity byly použity dva typy uhlíkatých aerogelů, které byly získány od týmu doc. Václava Slováka z katedry chemie Ostravské Univerzity:

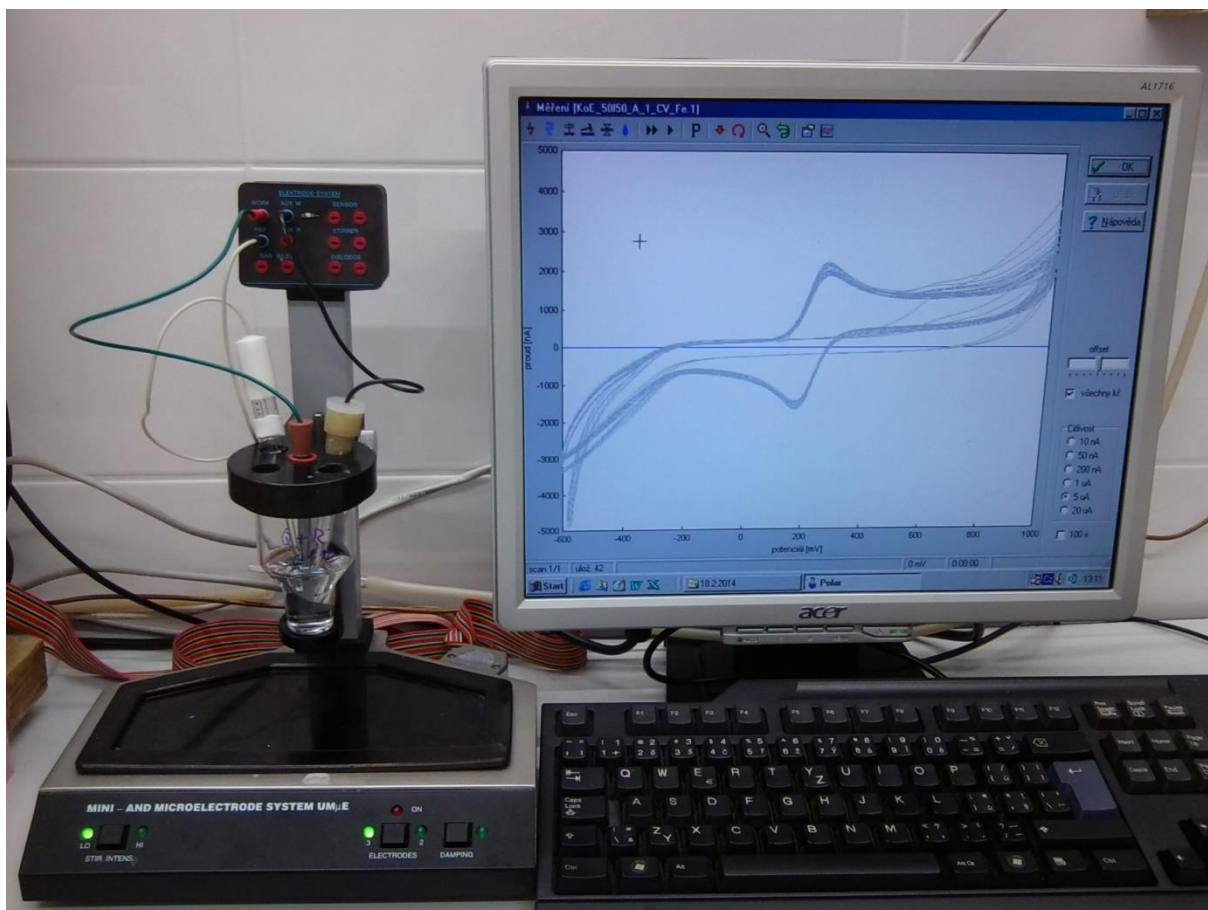
- Aerogel typu RFA_x – roztok resorcinolu a formaldehydu byl smíchán s roztokem katalyzátoru (HCl a dusičnany kovů). Připravená směs byla nalita do forem ke kondenzaci. Vzniklý gel byl vytlačen z formy a nasekán na malé kousky. Organický aerogel byl pyrolyzován v atmosféře dusíku za vzniku černého prášku [32, 33].
- Aerogel typu RFB_x – roztok resorcinolu a formaldehydu byl smíchán s roztokem katalyzátoru (Na₂CO₃ a dusičnany kovů). Aerogel typu RFB_x byl připraven stejně jako výše zmiňovaný aerogel typu RFA_x [32, 33].

Zásobní roztoky o koncentracích $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l quercetinu (98%, Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo) a rutinu (95%, Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo) byly připraveny rozpuštěním navážky pevné látky v methanolu (p.a., Lech–Ner, Neratovice). Základní Britton-Robinsonův pufr byl připraven z kyseliny trihydrogenborité (p.a., Lachema, Brno), kyseliny trihydrogenfosforečné (85% p.a., Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo), octové kyseliny (99% p.a., Lach–Ner, Neratovice) a hydroxidu sodného (p.a., Lech–Ner, Neratovice), který byl použit pro úpravu pH. Dále byl připraven zásobní roztok hexakvanoželeznatanu draselného (čistý, Lachema, Brno) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 1 mol/l chloridu draselném (p.a., Penta, Chrudim).

3.2. Přístrojové vybavení

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco–Tribo–Polarograf (Polaro–Sensors, Praha) v tříelektrodovém zapojení (obr. 8). Jako pomocná elektroda byla použita

drátková platinová elektroda, jako referentní Ag/AgCl elektroda a byly použity dva typy pracovních elektrod - uhlíkové pastové elektrody a uhlíkové tuhé kompozitní elektrody. Jejich příprava je popsána dále v části 3.3. Pro porovnání byla použita komerční elektroda ze skelného uhlíku (průměr disku 3 mm, Bioanalytical Systems, USA). Pro přípravu tlumivých roztoků byl použit pH-metr InoLab 720 (WTW, Weinheim, Německo).



Obrázek 8 Eco-Tribo-Polarograf v tříelektrodeovém zapojení

Obsah rutinu a kvercetin v extraktech z pohanky byl stanoven metodou HPLC. Kapalinový chromatograf sestával z isokratického čerpadla Alfa 10 Plus, UV-VIS detektoru Safir 800 a dávkovacího ventilu se smyčkou 20 μ l (vše Ecom, Praha). Byla použita kolona Kinetex 2.6 μ m C18 100 Å 100 x 4.6 mm od firmy Phenomenex (Chromservis, Praha).

Analýza metodou GC-MS byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním detektorem Agilent 5973N MSD (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Byla použita kolona: HP-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent, Palo Alto, CA, USA) a jako nosný plyn He, 99,998 % (SIAD, Bergamo, Itálie).

3.3. Pracovní postupy

3.3.1. Příprava pracovních roztoků

Ze základního Britton–Robinsonova pufru byly titrací 50% roztokem hydroxidu sodného připraveny pufrы o pH 3; 7 a 11. Zásobní roztoky rutinu a quercetinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byly připraveny navážením pevného standardu a jeho rozpuštěním v methanolu. Roztok hexokvanoželeznatanu draselného o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 1 mol/l chloridu draselném byl připraven navážením vypočteného množství standardů obou látek a jejich rozpuštěním v destilované vodě.

3.3.2. Příprava uhlíkových pastových elektrod

Před přípravou uhlíkových past bylo potřeba zvlhčit uhlíkaté aerogely, které byly použity jako modifikátory. Proces zvlhčování probíhal v atmosféře vodních par v exikátoru. Přesně navážené množství aerogelu (0,5 g) se rozprostřelo na hodinovém sklíčku a vložilo se do exikátoru, který byl naplněn destilovanou vodou. Zvlhčování probíhalo několik dní, dokud hmotnost modifikátoru nebyla konstantní. Aerogel RFA_x byl zvlhčován dva dny a obsah vody byl 5,26 % hm (použitý pro CPE_A/N) a 6,53 % hm (použitý pro CPE_A/P). Aerogel RFB_x byl zvlhčován pět dnů a obsah vody byl 19,80 % hm (použitý pro CPE_B/N) a 21,05 % hm (použitý pro CPE_B/P).

Poté se přesně navázily podíly vločkového grafitu (0,5; 2,0 a 2,0 g). 0,5 g grafitu se vpravilo to skleněné třecí misky a přidal se zvlhčený aerogel a směs se homogenizovala po dobu 10 minut. Homogenizaci bylo potřeba provádět důkladně, cílem bylo získat dobře zhomogenizovanou směs. Po 10 minutách se přidal druhý podíl grafitu 2,0 g a opět se prováděla důkladná homogenizace po dobu 10 minut. Během homogenizace bylo potřeba seškrabávat části směsi, které ulpěly na stěnách třecí misky. Přidala se poslední část grafitu 2,0 g a směs se homogenizovala 15 minut. Po homogenizaci se po částech přidávalo přesně odvážené množství nujolu nebo parafinového oleje, které sloužily jako pojivo. Celá směs se důkladně zhomogenizovala. Připravená pasta se uložila do polypropylenové nádobky a označila se názvem pasty a datem přípravy.

Připravená pasta se vpravila do těla elektrody, kde se utlačila šroubem. Takto připravená uhlíková pastová elektroda se nechala ve svislé poloze několik dnů vyžrát.

Nový povrch elektrody byl připraven vytlačáním malého množství pasty (asi 0,5 mm pomocí mosazného šroubovacího pístu), které bylo setřeno na filtračním papíře a vyleštěno na křídovém papíře do kovového lesku. Na takto připraveném povrchu byla prováděna měření. Uvedeným postupem byl připraven nový pracovní povrch před každým měřením.

Bylo připraveno celkem šest uhlíkových past (Tabulka 3). Byly použity dva druhy pojiva, parafinový olej a nujol, ze kterých byly připraveny tři uhlíkové pasty, nemodifikovaná a dvě modifikované uhlíkatými aerogely typu RFA_x a RFB_x.

Tabulka 3 Obsah složek zastoupených v uhlíkových pastových elektrodách

Elektroda	Obsah vločkového grafitu [g]	Druh pojiva	Obsah pojiva	Množství modifikátoru [g]	Obsah modifikátoru [%]
CPE_0/N	5,00	Nujol	2,00 g	-	-
CPE_A/N	4,50	Nujol	2,00 g	0,50	10
CPE_B/N	4,50	Nujol	2,00 g	0,50	10
CPE_0/P	5,00	Parafinový olej	1,25 ml	-	-
CPE_A/P	4,50	Parafinový olej	1,25 ml	0,50	10
CPE_B/P	4,50	Parafinový olej	1,25 ml	0,50	10

3.3.3. Příprava uhlíkových tuhých kompozitních elektrod

Nejprve byla připravena těla elektrod z plastových špiček o objemu 1 ml. Konec špičky se zkrátil o 0,5 mm a vnitřní stěna špičky se pokryla tenkou vrstvou epoxidové pryskyřice, která zajistila fixaci kompozitu uvnitř špičky.

Před samotnou přípravou uhlíkových kompozitních elektrod bylo potřeba zvlhčit modifikátory, stejným postupem jako u uhlíkových pastových elektrod, který je popsán výše. Obsah vody v aerogelu typu RFA_x byl 2,70 % a 1,18 % hm. Obsah vody v aerogelu typu RFB_x byl 4,05 % a 7,25 % hm.

Byly připraveny uhlíkové kompozitní elektrody s různým obsahem uhlíku a pojiva ve směsi. Byly použity dva druhy pojiva, Dentacryl (DAC) a epoxidová pryskyřice (CCE).

Obsah uhlíku v kompozitní směsi byl 30 %, 40 %, 50 % a 60 % hm. Složení jednotlivých elektrod je uvedeno v Tabulce 4. Nemodifikované uhlíkové kompozitní elektrody byly připraveny smícháním naváženého množství vločkového grafitu a pojiva. Vzniklá směs s epoxidovou pryskyřicí se vpravila do plastické špičky a nechala se polymerizovat v sušárně při 65°C po dobu 6 hodin. Směs připravená z Dentacrylu se nechala polymerizovat při 75°C po stejnou dobu. Modifikované elektrody se připravily důkladnou homogenizací vločkového grafitu a zvlhčeného aerogelu v třecí misce, ke směsi se přidalo navážené množství epoxidové pryskyřice a celá směs se promíchala. Vzniklá směs se vpravila do plastové špičky a nechala se polymerizovat v sušárně při 65 °C po dobu 6 hodin. Po polymerizaci se všechny elektrody zabrousily na brusném kameni. Na takto připravených elektrodách se prováděla měření. Před každým měřením se povrch elektrody obnovil jemným zabroušením povrchu na jemnější části brusného kamene.

Byly připraveny vždy dvě elektrody stejného složení, u kterých byly testovány jejich elektrochemické vlastnosti. Pro další měření byla z každé dvojice vybrána ta elektroda, která vykazovala vhodnější vlastnosti.

Tabulka 4 Obsah složek zastoupených v uhlíkových tuhých kompozitních elektrodách

Elektroda	Obsah vločkového grafitu [g]	Obsah pojiva [g]	Množství modifikátoru [g]	Obsah modifikátoru [%]
CCE30	0,30	0,70	-	-
CCE40	0,40	0,60	-	-
CCE50	0,50	0,50	-	-
CCE40_A	0,36	0,60	0,04	10
CCE50_A	0,45	0,50	0,05	10
CCE40_B	0,36	0,60	0,04	10
CCE50_B	0,45	0,50	0,05	10
DAC40	0,40	0,60	-	-
DAC60	0,60	0,40	-	-

CCE-pojivo epoxidová pryskyřice, DAC-pojivo Dentacryl

3.3.4. Cyklická voltamtrie

Pomocí cyklické voltametrie (CV) byly testovány elektrochemické vlastnosti elektrod, a to potenciálový rozsah, reverzibilita redoxního páru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a velikost elektroaktivní plochy elektrod. Při měření rozsahu potenciálů se do nádoby napipetovalo 20 ml základního elektrolytu, který byl tvořen 10 ml destilované vody a 10 ml Britton–Robinsonova pufru o pH 3, 7 a 11. Parametry CV byly: rozsah potenciálu -1500 až +1500 mV, rychlost polarizace elektrody 100 mV/s.

Při měření reverzibility redoxního páru bylo do nádoby napipetováno 20 ml roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 1 mol/l roztoku KCl. Parametry CV byly: rozsah potenciálu -600 až +1000 mV, rychlost polarizace elektrody 20 mV/s.

Při měření velikosti elektroaktivní plochy elektrod bylo do nádoby napipetováno 20 ml roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 1 mol/l roztoku KCl. Parametry CV byly: rozsah potenciálu -200 až +600 mV, rychlosti polarizace elektrody byly 5; 10; 15; 20 a 25 mV/s.

Všechna měření byla provedena šestkrát, data byla testována na odlehlé body pomocí Grubbsova testu. Pro vyhodnocení byly použity průměrné hodnoty.

3.3.5. Diferenčně pulzní voltametrie

Pomocí diferenčně pulzní voltametrie (DPV) byly u jednotlivých elektrod sledovány závislosti proudové odezvy na době akumulace, změně potenciálu akumulace a kalibrační závislosti. Parametry DPV: rychlost polarizace elektrody 20 mV/s, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 100 ms. Při měření závislosti proudové odezvy na době akumulace a změně potenciálu akumulace bylo do nádoby napipetováno 10 ml Britton – Robinsonova pufru pH = 3, 10 ml destilované vody a 100 μl zásobního roztoku quercetinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Stejným postupem byly připraveny dvě sady kalibračních roztoků quercetinu a rutinu o výsledných koncentracích quercetinu a rutinu v nádobce 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,1 $\mu\text{mol/l}$ pro akumulaci 30 s, a 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 $\mu\text{mol/l}$ pro akumulaci 60s.

Pomocí DPV se sledovala proudová odezva směsi rutinu a quercetinu, jejichž koncentrace v nádobce byly 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 $\mu\text{mol/l}$ bez použití akumulace. Parametry DPV: rychlost polarizace elektrody 20 mV/s, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 100 ms.

Všechna měření byla provedena šestkrát, data byla testována na odlehlé body pomocí Grubbsova testu. Pro vyhodnocení byly použity průměrné hodnoty.

3.4. Analýza obsahu rutinu a quercetinu v extraktu z pohanky

Bylo připraveno šest vzorků pohanky. Semena pohanky byla rozdrčena v třecí misce. Na každý vzorek se navážil vždy 1 g rozdrčených semen pohanky. Ke třem vzorkům rozdrčených semen se přidalo 40 ml destilované vody a směs se vařila pod hodinovým sklem pět minut. K dalším třem vzorkům pohanky se přidal 1 ml standardu quercetinu $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a 1 ml standardu rutinu $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a methanol použitý jako rozpouštědlo se nechal volně při laboratorní teplotě odpařit. Pak se ke vzorkům přidalo 40 ml destilované vody a směs se vařila pod hodinovým sklem pět minut. Po vychladnutí se obsah kádinky kvantitativně převedl do odměrných baněk o objemu 50 ml a doplnil se destilovanou vodou po rysku. Následně se všechny vzorky zcentrifugovaly při otáčkách 40 000 rpm po dobu 20 minut. Vzorky se následně zfiltraly přes filtrační papír a byly použity pro analýzu pomocí dvou technik: elektrochemické DPV a separační techniky HPLC.

3.4.1. Analýza pomocí DPV

K základnímu elektrolytu, který obsahoval 10 ml Britton-Robinsonova pufru o $\text{pH} = 3$ a 8 ml destilované vody, byl přidán extrakt z pohanky o objemu 2 ml. Následně byly přidány tři přídatky standardů rutinu a quercetinu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) o objemu 40 μl obou látek. Měření bylo opakováno šestkrát. Po vyhodnocení křivek byl obsah rutinu a quercetinu přepočítán na mg/100g pohanky.

3.4.2. Analýza pomocí HPLC

Byly připraveny dva standardy rutinu a quercetinu o koncentracích 2 a $20 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Extrakt z pohanky byl zředěný methanolem v poměru 1 : 1 (v/v). Takto připravený vzorek se zcentrifugoval při otáčkách 40 000 rpm po dobu 20 minut a přefiltroval přes stříkačkový filtr. Nástřik byl 100 μ l a smyčka nádávkovala 20 μ l. Analýza probíhala na koloně Kinetex 2.6 μ m C18 100 Å 100 x 4.6 mm, detekce UV-VIS detektorem byla při vlnové délce $\lambda = 258$ nm. Mobilní fáze byla CH₃OH : H₂O : HCOOH v poměru 50 : 49 : 1 o průtoku 0,5 ml/min. Obsah rutinu a quercetinu byl vyhodnocen z rovnice regresní přímky a následně přepočítán na mg/100g pohanky.

3.4.3. Analýza pomocí GC-MS

Extrakt z pohanky byl analyzován metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí následujícím postupem: 1 ml vzorku extraktu s přídavkem 10 μ g fisetinu jako vnitřního standardu byl odpařen proudem dusíku při 50°C. Odparek byl rozpuštěn v 75 μ l pyridinu a 75 μ l *N,O*-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamidu (BSTFA) a derivatizován 1 hodinu při 90°C. Vzorky byly doplněny hexanem do 1 ml, resp. 0,5 ml a analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Separace byla provedena na nepolární kapilární koloně koloně HP-5ms (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) s heliem jako nosným plynem o průtoku 0,9 ml/min. Objem nástřiku byl 1 μ l a dávkovací puls: 140 kPa, 0,4 min. Byl použit teplotní program (50 °C – 2 min – 10 °C/min – 300 °C – 15 min). Hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu 29 – 800 m/z.

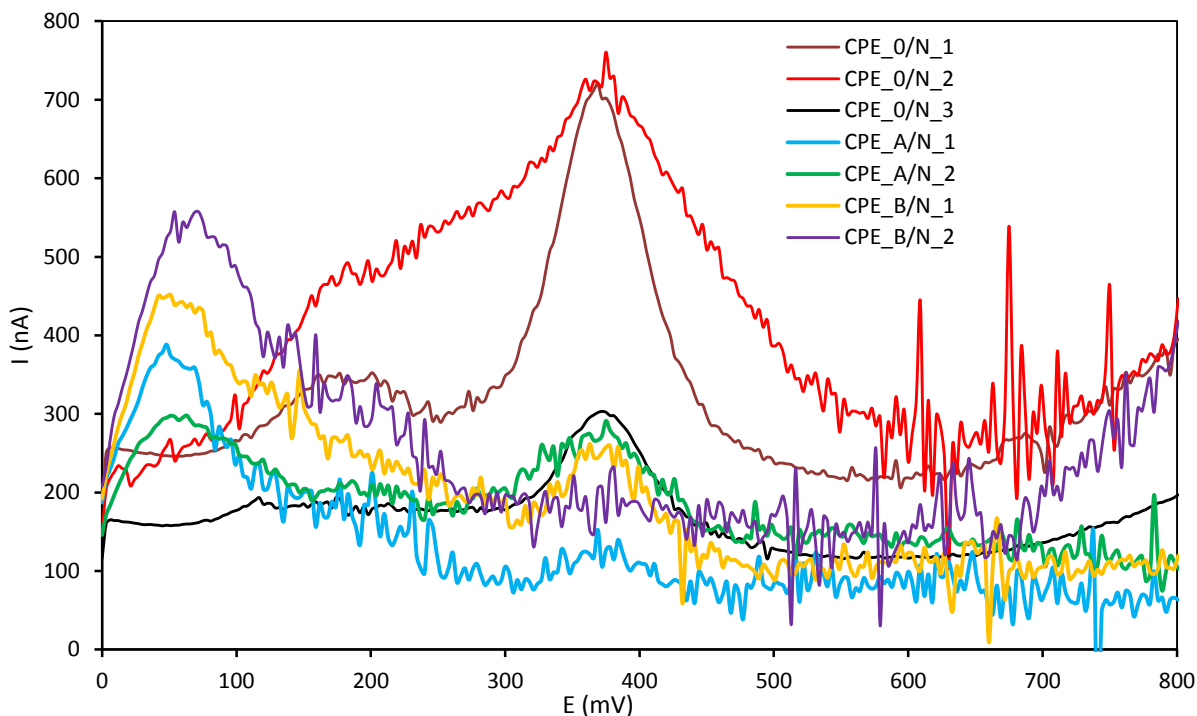
4. Výsledky a diskuze

4.1. Uhlíkové pastové elektrody

Bylo připraveno celkem šest uhlíkových pastových elektrod. Během přípravy uhlíkových past se nevyskytl žádný problém a uhlíkové pasty byly pečlivě připraveny podle návodu. Během měření s uhlíkovými pastovými elektrodami se vyskytl problém s obnovením jejich povrchu. Povrch elektrody nebylo možné vyleštit do kovového lesku, na povrchu byly rýhy a docházelo k odlupování vločkového grafitu z povrchu elektrody. Nový povrch elektrody byl připraven obvyklým postupem, který je popsán v kapitole 3.3.2. I když byly připravené nové elektrody s použitím dvou druhů pojiva a uhlíková pasta byla důkladně zhomogenizovaná a připravená podle postupu, který se v přípravě dříve osvědčil, nepodařilo se připravit uhlíkové pastové elektrody s povrchem, na kterém by šlo měřit. Po půl roce neúspěšných pokusů byly další experimenty prováděny pouze s tuhými kompozitními elektrodami.

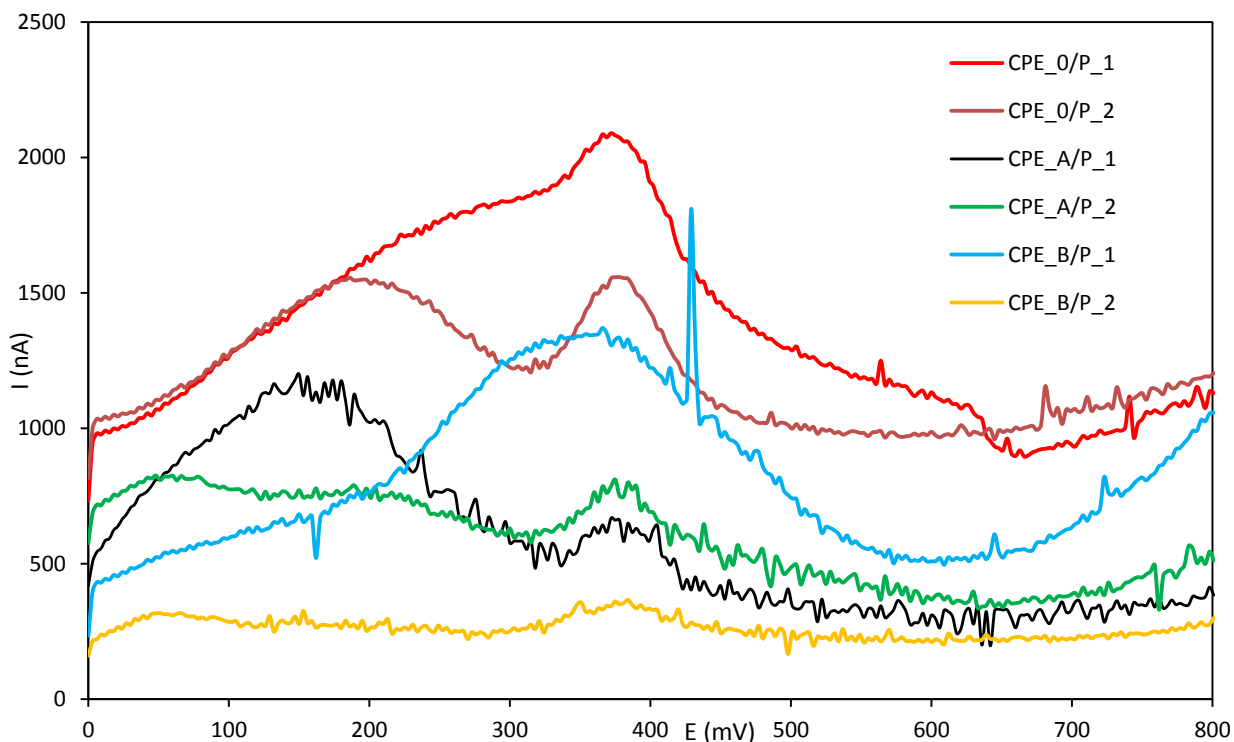
Příčina neúspěchu nebyla zjištěna. Jak bylo zmíněno výše, byly použity stejné komponenty, poměry a postupy přípravy, které se osvědčily v předešlých experimentech a byly publikovány v práci [3].

Na obrázku 9 lze vidět ukázkou měření s uhlíkovými pastovými elektrodami. Diferenčně pulzní voltamogramy quercetinu o celkové koncentraci v nádobce $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l byly změřeny třemi elektrodami nemodifikovanou CPE_0/N, modifikovanou uhlíkatým aerogelem RFA_x CPE_A/N a modifikovanou uhlíkatým aerogelem RFB_x CPE_B/N, ve kterých byl použit Nujol jako pojivo. Elektroda CPE_0/N zaznamenala pík quercetinu ($E_p = 365$ mV), ale ze třech opakování jsou použitelné dva voltamogramy a druhý červený záznam je nepoužitelný z důvodu vysokého proudového pozadí a velkého šumu, v nichž se ztrácí proudová odezva analytu. Obě modifikované elektrody kvůli vysokým hodnotám šumu a celkové nestabilitě signálu byly nepoužitelné. V tomto duchu se nesla téměř všechna měření pomocí uhlíkových pastových elektrod.



Obrázek 9 Diferenčně pulzní voltamogramy quercetinu $c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, akumulace 60 s

Na obrázku 10 lze vidět diferenčně pulzní voltamogramy quercetinu o celkové koncentraci v nádobce $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, které byly změřeny třemi elektrodami: nemodifikovanou CPE_0/P a dvěma modifikovanými CPE_A/P a CPE_B/P, ve kterých byl použit parafínový olej jako pojivo. Jako v předešlém případě ani tyto elektrody neposkytovaly opakovatelnou proudovou odezvu a proto byly nepoužitelné pro analytické účely.



Obrázek 10 Diferenčně pulzní voltamogramy quercetinu $c = 1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, akumulace 30 s

4.2. Rozsah potenciálů připravených tuhých kompozitních elektrod

Využitelný potenciálový rozsah, ve kterém lze na elektrodě sledovat redoxní reakce studovaných látek, je důležitý parametr pro elektrochemická měření. Oproti klasické rtuťové elektrodě, která má anodický rozsah maximálně do +400 mV, mají uhlíkové elektrody širší anodický rozsah až do +1500 mV v závislosti na prostředí.

V tabulce 5 jsou uvedeny potenciálové rozsahy připravených kompozitních elektrod. Nejširší rozsah u všech elektrod je v kyselém prostředí. Se zvyšujícím se pH elektrolytu dochází u všech elektrod k zúžení potenciálového rozsahu. Nemodifikované elektrody s vyšším obsahem uhlíku a s oběma druhy pojiv CCE50 a DAC60 mají v neutrálních a alkalických prostředích o 100 mV širší rozsah v katodické oblasti než nemodifikované elektrody CCE40 a DAC40 s nižším obsahem uhlíku. Elektrody CCE40_A a CCE50_A modifikované aerogelem typu RFA_x mají širší katodický rozsah oproti nemodifikovaným elektrodám. Elektroda modifikovaná aerogelem typu RFB_x má oproti elektrodám modifikovaným aerogelem typu RFA_x užší rozsah v anodické oblasti potenciálů. Celkově lze říci, že pracovní potenciálové rozsahy se příliš neliší u jednotlivých elektrod a typ použitého pojiva, modifikátoru nebo obsah grafitu v kompozitní směsi neovlivňuje příliš rozsahy potenciálů.

Tabulka 5 Rozsahy potenciálů elektrod v různých prostředích

Elektroda	BR pufr pH=3 rozsah [mV]	BR pufr pH=7 rozsah [mV]	BR pufr pH=11 rozsah [mV]
CCE40	-500+1000	-400+900	-300+800
CCE50	-500+1000	-500+900	-400+800
CCE40_A	-600+1000	-600+800	-500+800
CCE50_A	-600+1000	-600+900	-400+800
CCE50_B	-600+900	-600+800	-500+700
DAC40	-500+1000	-400+900	-300+800
DAC60	-500+1000	-500+900	-400+800

4.3. Kvalita povrchu elektrod

V elektroanalýze je důležitá dobrá reprodukovatelnost měření, proto je kvalita povrchu elektrod důležitou vlastností. U elektrod se měří elektrický odpor, který by měl být co nejnižší a pohybovat se v desítkách až stovkách ohmů. Velikost odporu závisí na množství použitého pojiva a jeho typu. Jak lze vidět v tabulce 6, velikost odporu je velmi ovlivněna přítomností uhlíkatého aerogelu jako modifikátoru, protože uhlíkatý aerogel je elektricky nevodivý a tím přispívá ke zvýšení odporu v modifikovaných elektrodách.

Tabulka 6 Elektrický odpor elektrod

Elektroda	Odpor [Ω]
CCE30	38 000
CCE40	450
CCE50	190
CCE40_A	15 000
CCE50_A	1 000
CCE40_B	400 000
CCE50_B	20 000
DAC40	300
DAC60	300

Kvalitu povrchu elektrod lze vyhodnotit pomocí reverzibilního elektrochemického systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \leftrightarrow [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Cyklický voltamogram tohoto systému je tvořen redukčním a oxidačním píkem. Hodnoty redukčních E_c a oxidačních E_a potenciálů a jim odpovídajících proudů lze použít pro hodnocení reverzibility elektrodového děje. Mírou reverzibility elektrodového děje $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ je rozdíl potenciálů $\Delta E = E_a - E_c$, který se používá jako jeden z ukazatelů kvality elektrodového povrchu. Na dokonalém povrchu elektrody je teoretická hodnota reverzibilního jednoelektronového děje 59 mV při 25°C. U pevných elektrod je tento rozdíl větší. Na platinové elektrodě, jejíž povrch je velmi kvalitní, byl naměřen rozdíl 130 mV. Na uhlíkových pastových elektrodách je rozdíl potenciálů vyšší kolem 300 – 390 mV [34], což je způsobeno heterogenitou pasty. Při reverzibilním ději oba píky poskytují stejnou proudovou odezvu a jejich poměr se rovná jedné. Poměr redukčního i_c a oxidačního i_a proudu je další parametr pro hodnocení kvality povrchu elektrod.

Redoxní systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ lze využít pro posouzení kvality povrchu elektrody. Čím více se blíží rozdíl potenciálů píků hodnotě 59 mV a poměr proudů píků jedné, tím je povrch elektrody kvalitnější.

Tabulka 7 Reverzibilita elektrodového děje redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Elektroda	E_a [mV]	i_a [nA]	E_c [mV]	i_c [nA]	$E_a - E_c$ [mV]	i_c/i_a
CCE40	267	1173	156	1155	111	0,98
CCE50	276	1448	156	1355	120	0,94
CCE40_A	282	1018	126	949	156	0,93
CCE50_A	263	1792	165	1801	98	1,00
CCE50_B	260	1187	150	1160	110	0,98
DAC40	253	1412	152	1421	101	1,00
DAC60	234	2414	114	2075	120	0,86

V tabulce 7 lze vidět, že nejhorší povrch má elektroda DAC60, což může být způsobeno heterogenitou kompozitní směsí, která se při přípravě špatně homogenizovala kvůli vysokému obsahu uhlíku. Rozdíl potenciálů u kompozitních elektrod, jejichž povrch je heterogenní, je menší než rozdíl potenciálu u platinové elektrody, jejichž povrch lze považovat za velmi kvalitní. Poměry proudů píků jsou velmi blízké nebo rovny jedné. Pro porovnání byl stejný roztok změřen elektrodou ze skelného uhlíku (gC). Rozdíl potenciálů píků byl 90 mV a poměr proudů píků 0,95. To ukazuje, že kvalita povrchu připravených uhlíkových kompozitních elektrod je téměř srovnatelná s kvalitou povrchu komerční gC elektrody.

V porovnání s uhlíkovými pastovými elektrodami, popsány v pracích [3, 35], kde je rozdíl $E_a - E_c$ 300 až 600 mV, u uhlíkových kompozitních elektrod připravených v této práci je rozdíl $E_a - E_c$ mnohem nižší a poměr proudů blíže k jedné. Můžeme tedy říci, že povrch uhlíkových kompozitních elektrod vykazuje lepší elektrochemické vlastnosti než povrch uhlíkových pastových elektrod popsanych v uvedených pracích.

4.4. Velikost elektroaktivní plochy elektrod

Ze závislosti proudové odezvy redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na změně rychlosti polarizace elektrody byla pomocí Randles–Ševčíkovy rovnice vypočítána elektroaktivní plocha elektrod. V tabulce 8 jsou uvedeny jednotlivé velikosti ploch elektrod. Rozdíly v plochách jsou způsobeny ruční přípravou těl elektrod z plastových špiček, kdy nelze zaručit u všech elektrod stejnou geometrickou plochu disku, a především použitím různých poměrů vodivého grafitu a nevodivého izolantu a také použitím elektricky nevodivého uhlíkatého aerogelu. Např. elektroda DAC40, která má o 20% nižší obsah grafitu ve směsi, má menší elektroaktivní plochu oproti elektrodě DAC60. Velikost elektroaktivní plochy elektrod také do značné míry koresponduje s jejich elektrickým odporem (Tabulka 6).

Tabulka 8 Velikost elektroaktivních ploch elektrod

Elektroda	Plocha [mm ²]
CCE40	16
CCE50	17
CCE40_A	6
CCE50_A	23
CCE50_B	12
DAC40	10
DAC60	15

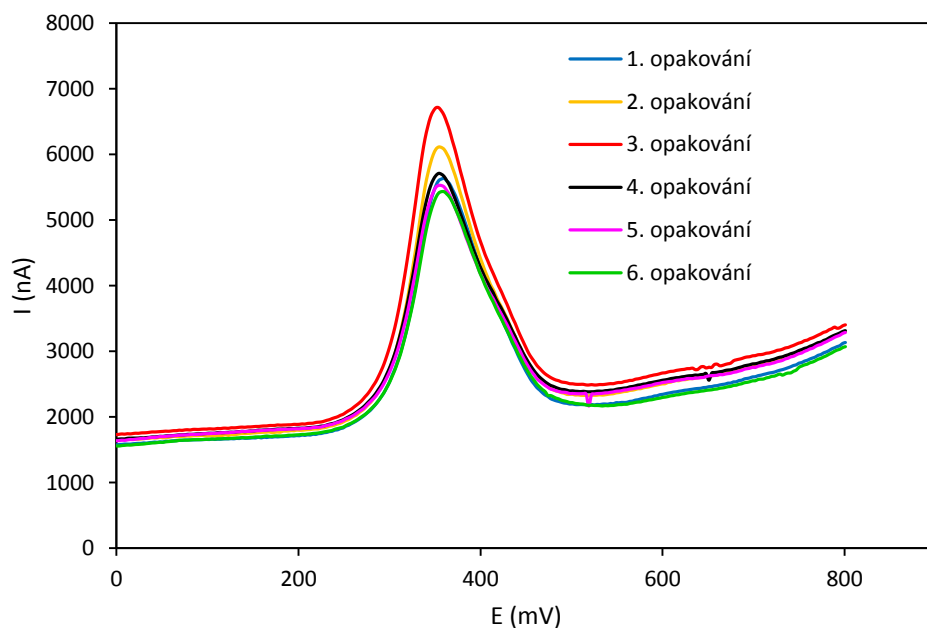
4.5. Analytické využití kompozitních elektrod

Využitelnost nově připravených uhlíkových kompozitních elektrod pro analytické účely byla testována na dvou elektroaktivních modelových látkách – rutinou a quercetinu. Byla sledována opakovatelnost měření proudové odezvy těchto látek, která je ukazatelem preciznosti měření. Z literatury [23, 25] je známo, že se oba flavonoidy adsorbují na povrchu uhlíkových elektrod. Adsorpci je možné využít ke zvýšení citlivosti měření metodou adsorptivní rozpouštěcí voltametrie. Proto byl sledován vliv potenciálu a doby akumulace na proudovou odezvu rutinou a quercetinu a za vybraných vhodných podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti jak samotných látek, tak i jejich směsi.

4.5.1. Opakovatelnost měření

U elektrod byla zjišťována opakovatelnost měření. Tuhé kompozitní elektrody jako všechny pevné elektrody vykazují horší opakovatelnost obnovy povrchu ve srovnání se rtuťovou kapkovou elektrodou [36]. Na obrázku 11 lze vidět, že výška proudu DPV píku quercetinu se při šest opakovaných záznamech poněkud liší. To je způsobeno zejména heterogenitou elektrodového materiálu a povrchu. Při obnově povrchu jeho ručním leštěním před každým měřením se získá pokaždé poněkud jiný počet elektroaktivních míst dostupných pro elektrodovou reakci s analytem.

Výsledky z šesti opakovaných měření byly statisticky zpracovány. Pomocí Grubbsova testu byly testovány odlehlé body. Pro elektrody CCE40, CCE50, CCE40_A, CCE50_A, CCE50_B, DAC40 a DAC60 byla opakovatelnost měření testována na roztoku quercetinu o koncentraci 8 $\mu\text{mol/l}$, doba akumulace 30 s. Pro elektrody CCE50, DAC40 a DAC60 byla testována opakovatelnost měření i na roztoku rutinu o koncentraci 8 $\mu\text{mol/l}$, doba akumulace 30 s (Tabulka 9).



Obrázek 11 Adsorptivní diferenčně pulzní voltamogramy quercetinu (8 $\mu\text{mol/l}$) na elektrodě CCE50 s povrchem obnovovaným před každým měřením, doba akumulace 30 s.

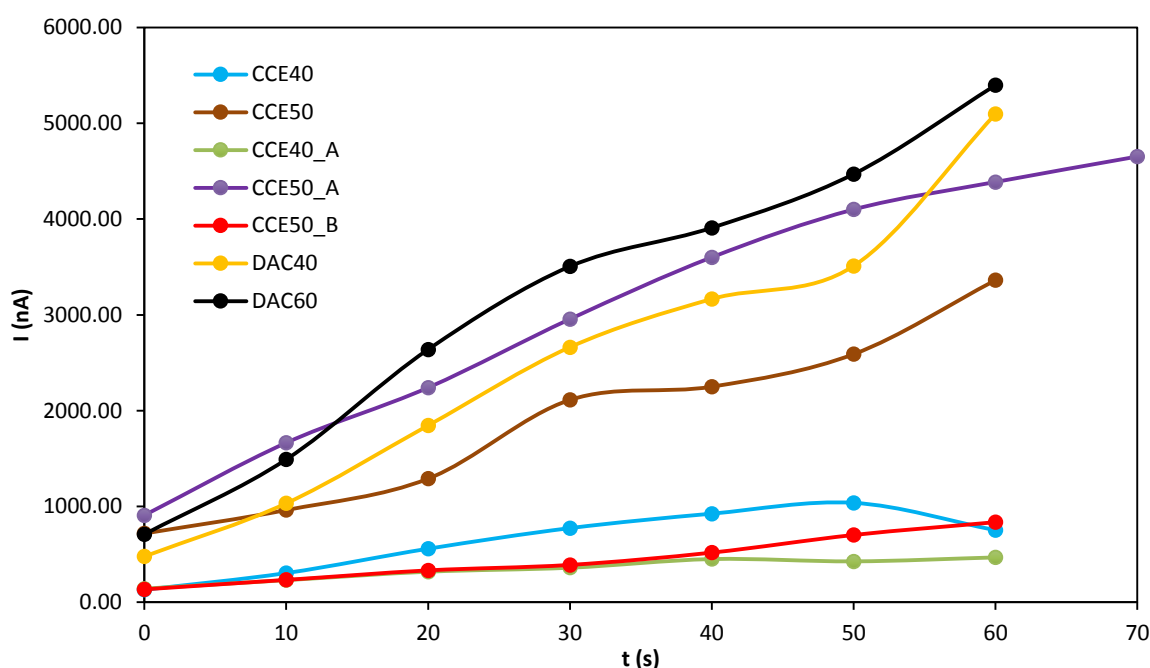
Tabulka 9 Opakovatelnost měření quercetinu a rutinu na tuhých kompozitních elektrodách vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou

Elektroda	Standard [8 μmol/l]	RSD [%]
CCE40	quercetin	6,20
CCE50	quercetin	11,14
CCE40_A	quercetin	8,81
CCE50_A	quercetin	5,75
CCE50_B	quercetin	5,78
DAC40	quercetin	4,07
DAC60	quercetin	7,83
CCE50	rutin	12,70
DAC40	rutin	10,95
DAC60	rutin	6,12

Z výsledků z tabulky 9 lze vidět, že relativní směrodatná odchylka se výrazně zvýšila u elektrody DAC40 při měření roztoku rutinu, což bylo způsobeno vyšší adsorpcí rutinu na povrch elektrody oproti quercetinu. Při obnovování povrchu se elektrochemické produkty rutinu hůře odstraňovaly z povrchu elektrody. U všech elektrod s výjimkou CCE50 a DAC40 byly směrodatné odchylky do 10 %. Opakovatelnost měření v roztoku rutinu o koncentraci 0,1 mmol/l na nemodifikované CPE byla 7 % [24]. Relativní směrodatná odchylka grafitové kompozitní elektrody stanovení olovnatých iontů byla kolem 2 % [37]. Relativní směrodatná odchylka 7 % byla naměřena při detekci 2-aminonaftalénu na uhlíkové kompozitní elektrodě s obsahem uhlíku ve směsi 30 % [38].

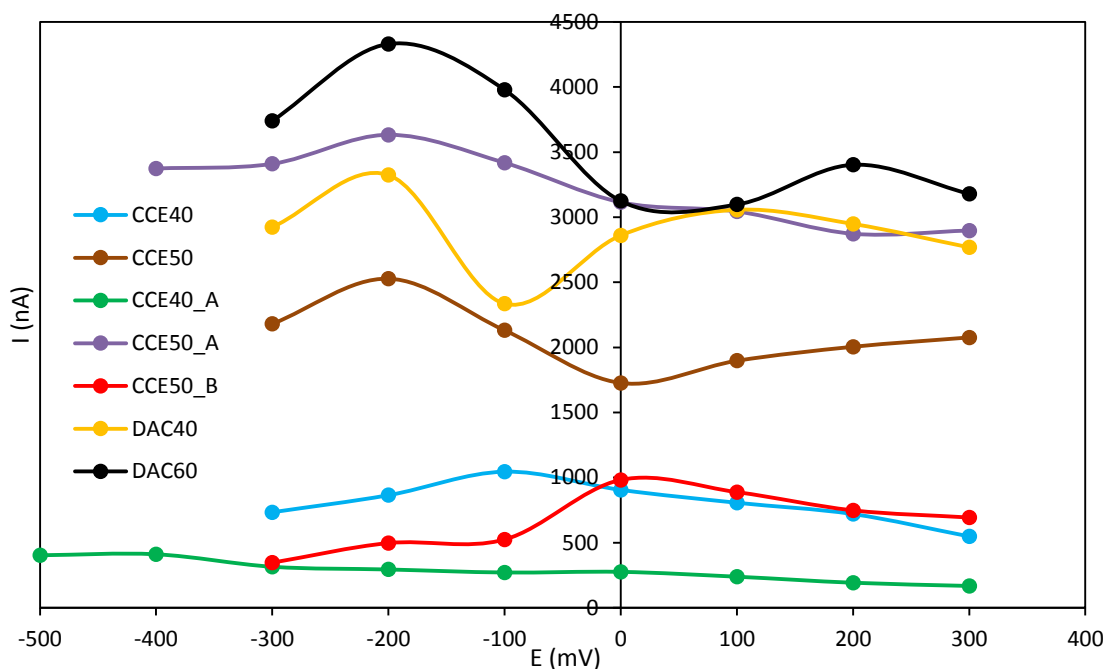
4.5.2. Vliv doby a potenciálu akumulace na anodickou odezvu quercetinu

Pomocí DPV se sledovala závislost proudové odezvy quercetinu na době akumulace. Koncentrace quercetinu v nádobce byla $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l a doba akumulace byla 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 s. Nejmenší nárůst proudového signálu byl pozorován u elektrod CCE40, CCE50_B a CCE40_A (obr. 12). Tento malý nárůst může souviset s menším elektroaktivním povrchem těchto elektrod (tabulka 8). Elektrody, u nichž byl použit Dentacryl jako pojivo, vykazují vyšší proudové odezvy. Pro testování změny potenciálu akumulace byla použita akumulace 30 s.



Obrázek 12 Závislost proudové odezvy quercetinu ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) na době akumulace

Potenciál akumulace byl měněn v rozsahu -300 až +300 mV a zaznamenávaly se proudové odezvy quercetinu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Potenciál, u něhož byla proudové odezva nejvyšší, se použil pro další experimenty. U elektrod DAC60, DAC 40, CCE50_A, CCE50 byla nejvyšší proudové odezvu zaznamenána u potenciálu -200 mV (obr. 13). Nejvyšší proudová odezva elektrody CCE50_B byla u 0 mV. U elektrod CCE40 a CCE40_A nárůst proudové odezvy nebyl tak strmý jako u předešlých elektrod. Elektroda CCE40_A vykazuje téměř neměnnou proudovou odezvu, která může být způsobena malou elektroaktivní plochou elektrody. Elektroda CCE40 vykazovala nejvyšší proud u potenciálu -100 mV. Potenciály akumulace, při kterých elektrody měly nejvyšší proudové odezvy, byly použity pro další měření.



Obrázek 13 Závislost proudové odezvy quercetinu ($c = 5 \cdot 10^{-6}$) mol/l na potenciálu akumulace

4.6. Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti rutin a quercetinu byly měřeny pomocí diferenčně pulzní voltametrie s použitím doby akumulace 30 s a 60 s. Pro jednotlivé elektrody byly určeny meze detekce rutin a quercetinu. Meze detekce (LOD) byly vypočteny z parametrů regresních kalibračních přímek naměřených s použitím akumulace 60 s jednak pomocí vztahu (1):

$$LOD = \frac{s_b \cdot 3}{a} \quad (1)$$

kde s_b je směrodatná odchylka úseku, a je směrnice regresní přímky, jednak pomocí statistického programu QC Expert. Pro určení meze detekce v programu QC Expert byla použita přímá metoda signálu IUPAC.

Jednotlivé hodnoty LOD pro rutin a quercetin jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11. Kalibrační závislosti rutin a quercetinu jsou lineární v určitých koncentračních mezích, při vyšších koncentracích jsou nelineární, protože dochází k v důsledku adsorpce rutin a quercetinu k úplnému pokrytí povrchu elektrody. V takovém případě proudová odezva limituje a kalibrační křivka má tvar adsorpční izotermy.

Tabulka 10 Parametry kalibračních regresních přímek ($y = ax + b$) a meze detekce quercetinu, doba akumulace 60 s

Elektroda	Quercetin						
	c [$\mu\text{mol/l}$]	a [$\text{nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$]	b [nA]	s_b [nA]	R^2 [nA]	LOD^1 [$\mu\text{mol/l}$]	LOD^2 [$\mu\text{mol/l}$]
CCE40	0,4 – 1,2	644	-85	51	0,9749	0,24	0,51
CCE50	0,1 – 1,2	1472	-70	66	0,9813	0,13	0,27
CCE40_A	0,2 – 1,0	193	-11	12	0,9739	0,19	0,41
CCE50_A	0,1 – 0,6	1483	-25	11	0,9993	0,02	0,07
CCE50_B	0,4 – 1,2	332	14	47	0,9244	0,42	0,79
DAC40	0,1 – 1,0	990	-31	28	0,9912	0,09	0,19
DAC60	0,1 – 1,0	321	-3	12	0,9864	0,11	0,23

c -lineární koncentrační rozsah, LOD^1 – z rovnice 1, LOD^2 – QC Expert, s_b -směrodatná odchylka úseku

Tabulka 11 Parametry kalibračních regresních přímek ($y = ax + b$) a meze detekce rutinu, doba akumulace 60 s

Elektroda	Rutin						
	c [$\mu\text{mol/l}$]	a [$\text{nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$]	b [nA]	s_b [nA]	R^2 [nA]	LOD^1 [$\mu\text{mol/l}$]	LOD^2 [$\mu\text{mol/l}$]
CCE50	0,1 – 1,0	2044	-221	119	0,9644	0,18	0,36
DAC40	0,1 – 0,8	1842	-99	52	0,9899	0,09	0,20
DAC60	0,1 – 0,8	1510	-54	64	0,9858	0,13	0,24

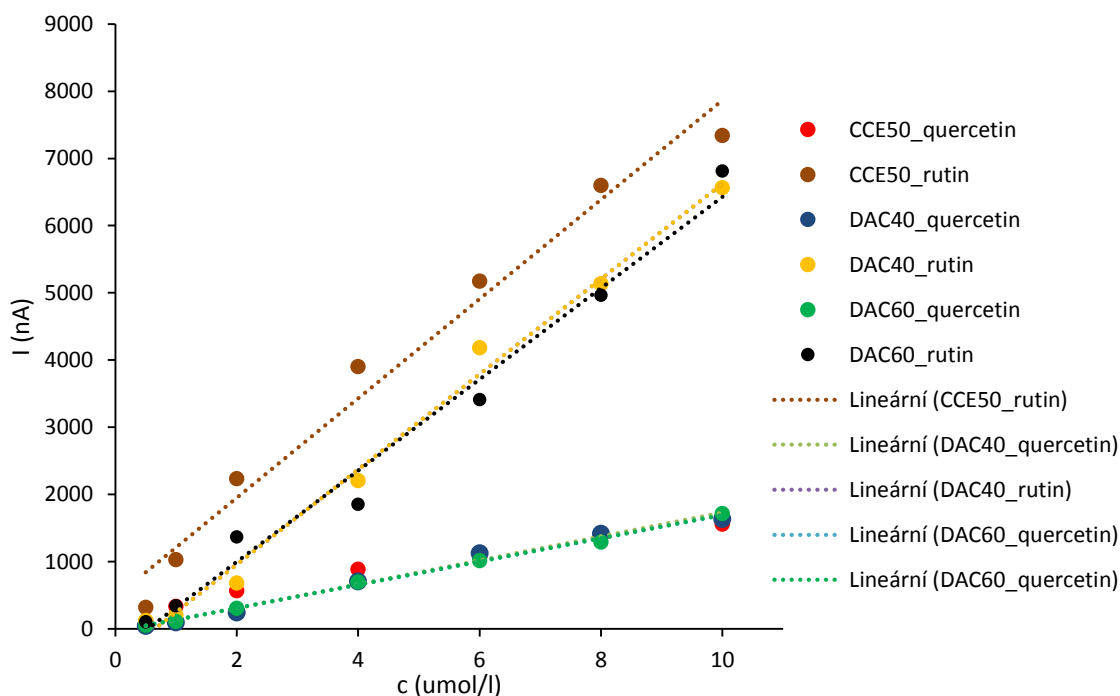
c -lineární koncentrační rozsah, LOD^1 – z rovnice 1, LOD^2 – QC Expert, s_b – směrodatná odchylka úseku

Meze detekce vypočtené z rovnice 1 (LOD^1) mají nižší hodnotu než meze detekce vypočtené pomocí programu QC Expert (LOD^2). Meze detekce LOD^1 reálně odpovídají koncentracím quercetinu a rutinu, u kterých byl zaznamenán vyhodnotitelný proudový pík quercetinu a rutinu. U elektrody CCE50_A ani jedna z hodnot LOD neodpovídá skutečnosti. Ačkoliv jsou $\text{LOD}^1 = 0,0696 \mu\text{mol/l}$ a $\text{LOD}^2 = 0,0219 \mu\text{mol/l}$, nejnižší koncentrace quercetinu, při které je zaznamenán zřetelný a vyhodnotitelný proudový pík byla $0,1 \mu\text{mol/l}$. Nejnižší citlivost na quercetin mají elektrody CCE40_A, CCE50_B a DAC60. Nízká citlivost modifikovaných elektrod mohla být způsobena přítomností modifikátoru v kompozitní směsi. Nízká citlivost elektrody DAC60 byla způsobena nedokonalou homogenizací kompozitní směsi. Úzký lineární rozsah elektrody CCE50_A je způsoben velkým elektroaktivním

povrchem elektrody (tabulka 8), na který se quercetin adsorboval ve větší míře a kalibrační křivka měla tvar adsorpční izotermy.

4.6.1. Analýza směsi rutin a quercetinu

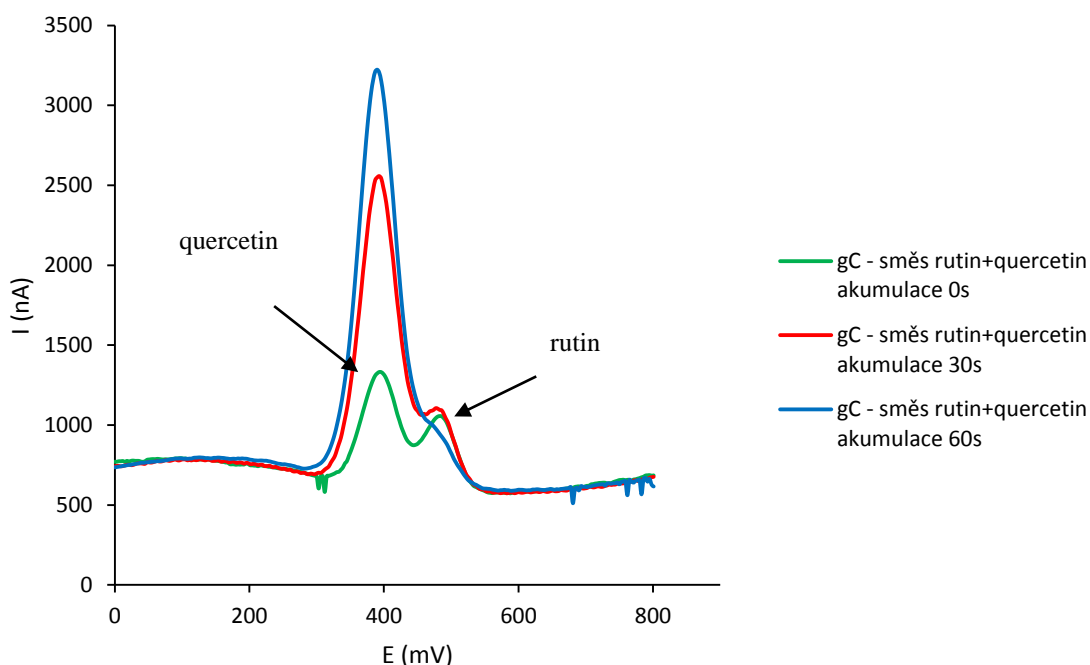
Flavonoidy rutin a jeho aglykon quercetin se v přírodních vzorcích vyskytují velmi často společně. Rozdíl jejich redoxních potenciálů je poměrně malý, a proto je obtížné na některých běžných elektrodách stanovit obě látky vedle sebe [27]. Nejprve byly změřeny kalibrační závislosti směsi rutin a quercetinu o koncentracích 0,5 až 10 $\mu\text{mol/l}$ každé látky bez použití akumulace. Pro tyto experimenty byly použity elektrody CCE50, DAC40 a DAC60, protože ze všech připravených elektrod vykazovaly nejvyšší proudovou odezvu na oba flavonoly. Jak je patrné z průběhu kalibračních závislostí (obr. 14), všechny tři tuhé kompozitní elektrody vykazovaly vyšší citlivost na rutin a stejnou citlivost na quercetin. Z kompozitních elektrod měla epoxidová elektroda CCE50 vyšší citlivost na rutin než obě dentacrylové elektrody. Nelineární tvar kalibrační závislosti změřené elektrodou CCE50 napovídá, že rutin se silně adsorbuje na její povrch.



Obrázek 14 Kalibrační závislosti rutin a quercetinu bez akumulace

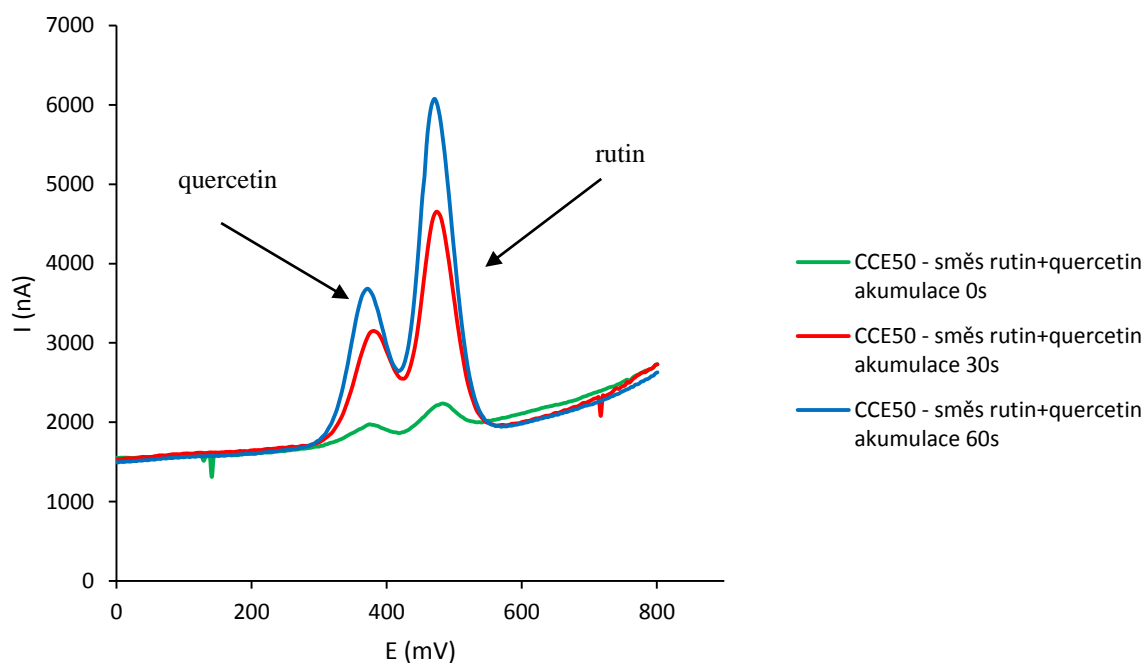
Dále byla sledována nejnižší detegovatelná koncentrace jednoho flavonolu v roztoku s nadbytkem druhého. Nejnižší detegované množství rutinu v roztoku obsahujícím quercetin o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo 0,5 $\mu\text{mol/l}$ u všech tří elektrod CCE50, DAC40 a DAC60. Rutin tedy bylo možné detegovat v přítomnosti dvacetinásobného nadbytku quercetinu. V roztoku rutinu o koncentraci 4 $\mu\text{mol/l}$ bylo detegována nejnižší koncentrace quercetinu 0,5 $\mu\text{mol/l}$ pomocí elektrody CCE50. U obou dentakrylových elektrod byla detegována nejnižší koncentrace quercetinu 1 $\mu\text{mol/l}$ v roztoku rutinu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Znamená to, že quercetin může být ještě detegován v přítomnosti zhruba desetinásobného nadbytku rutinu.

Pro porovnání byla směs rutinu a quercetinu měřena komerční elektrodou ze skelného uhlíku (angl. glassy carbon, gC). Na rozdíl od kompozitních elektrod tato elektroda vykazovala vyšší citlivost na quercetin (obr. 15). Zároveň lze vidět, že při použití adsorptivní DPV s rostoucí dobou akumulace dochází ke slévání obou píků. Rutin se na povrchu elektrody ze skelného uhlíku hůře akumuluje oproti quercetinu a dochází k tomu, že při použití akumuláční techniky ho téměř nelze v ekvimolární směsi s quercetinem detegovat.



Obrázek 15 Diferenčně pulzní voltamogramy směsi rutinu a quercetinu $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ (obou látek) změřené pomocí gC elektrody, doba akumulace 0; 30 a 60 s.

Na tuhých kompozitních elektrodách se více akumuluje rutin než quercetin (obr. 16). Se zvyšujícím se časem akumulace dochází k adsorpci rutinu i quercetinu na povrch elektrody. U kompozitních elektrod je možné detegovat oba píky quercetinu a rutinu v jejich směsi. Z porovnání obrázků 15 a 16 vyplývá, že tuhé kompozitní elektrody jsou vhodnější pro analýzu směsí, které obsahují rutin a quercetin. Rozdíl potenciálů píky rutinu a quercetinu byly 90 mV u elektrody gC, 100 mV u elektrody CCE50 a 98 mV u elektrody DAC40. Větší rozdíl potenciálů píků u kompozitních elektrod CCE50 a DAC40 je lepší pro kvantifikaci obou látek ve směsi.



Obrázek 16 Diferenčně pulzní voltamogramy směsi rutinu a quercetinu $c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l (obou látek) změřené pomocí CCE50 elektrody, doba akumulace 0; 30 a 60 s.

Vyšší akumulace rutinu oproti quercetinu na povrchu tuhých kompozitních elektrod by mohla být způsobena interakcí cukerné složky rutinu s pojivem obsaženým v elektrodovém materiálu. Obě použitá pojiva, epoxidová pryskyřice i methylmetakrylátová pryskyřice (Dentacryl), obsahují kyslíkové funkční skupiny: hydroxylové a etherové (epoxid), esterová (Dentacryl). Výše uvedené výsledky naznačují, že zejména kyslíkové skupiny epoxidu by mohly mít zásadní vliv na adsorpci rutinu.

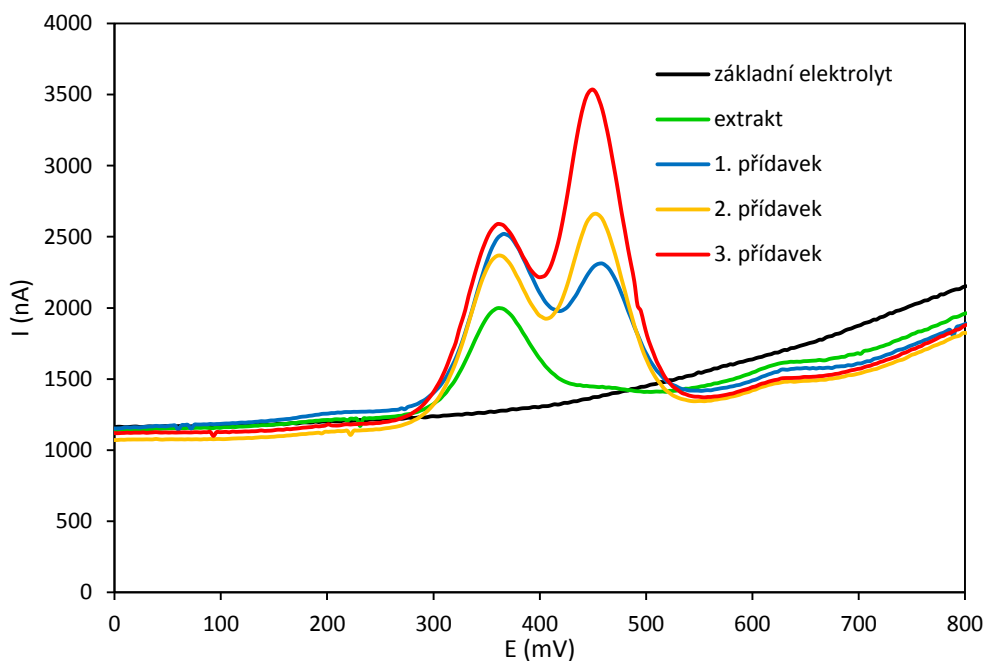
4.7. Analýza obsahu rutinu a quercetinu v extraktu z pohanky

Jako reálný vzorek byla vybrána pohanka, protože obsahuje oba flavonoly. Extrakční postup byl převzat z práce [28] jako nejvíce účinný z postupů uvedených v citované práci. Extrakty z pohanky byly měřeny na třech elektrodách CCE50, DAC40 a DAC60. Měření byla prováděna pomocí DPV bez akumulace, aby se zabránilo pasivaci povrchu elektrody složkami složitější matrice (zejména škrobu). Ve všech šesti připravených vzorcích byl prokázán rutin i quercetin. Voltametričnou metodou bylo ve vzorcích stanoveno větší množství quercetinu než rutinu. Kvantifikace byla provedena metodou standardního přídávku k měřenému vzorku. V tabulce 12 jsou uvedeny průměrné koncentrace rutinu a quercetinu naměřené v pohankových extraktech.

Tabulka 12 Průměrný obsah rutinu a quercetinu v extraktech ze semen pohanky změřený pomocí tří tuhých kompozitních elektrod

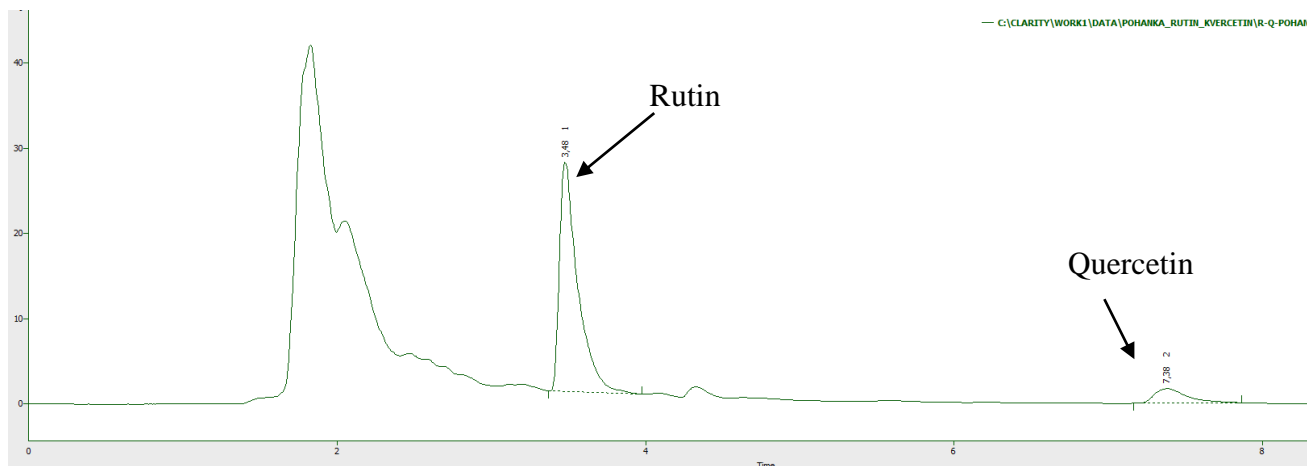
	Rutin [mg/100g]	Quercetin [mg/100g]
CCE50	6,9	80
DAC40	4,7	104
DAC60	6,2	112

V diferenčně pulzních voltamogramech pohankových extraktů (obr. 17) byly zaznamenány píky s potenciály, kterým odpovídá rutin (druhý pík) a quercetin (první pík) a došlo ke zvýšení proudových odezev těchto píků po přidání standardů obou látek.



Obrázek 17 Diferenčně pulzní voltamogramy extraktu z pohanky měřené elektrodou CCE50 se třemi přídávky 40 µ standardu směsi rutinu ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) a quercetinu ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/l)

Jako srovnávací metoda byla použita HPLC. Retenční čas standardu rutinu byl 6,63 minut a retenční čas standardu quercetinu byl 3,23 minut. Těmto naměřeným retenčním časům odpovídaly retenční časy rutinu a quercetinu, které byly detegovány v extraktu z pohanky. Vzorky extraktů z pohanky, které byly naměřeny pomocí HPLC obsahovaly v průměru quercetinu 0,09 mg/100g (RSD = 60%) a rutinu 4,06 mg/100g pohanky (RSD = 19 %). Obsah rutinu se téměř shoduje s obsahem naměřeným pomocí tuhých kompozitních elektrod (tabulka 12). Ale obsah quercetinu naměřený pomocí HPLC je tisíckrát menší než obsah quercetinu, který byl naměřen pomocí tuhých kompozitních elektrod. S opakovaným nástřikem vzorku pohanky docházelo ke snižování ploch píků, které odpovídaly quercetinu. Návratnost měření, která byla změřena pomocí dvou vzorků extraktů pohany, do kterých byly přidány standardní přídávky obou látek (1 ml + 1ml), (3ml + 3 ml) o koncentraci 1 mmol/l. Návratnost u rutinu byla 73 % zatímco u quercetinu byla 8 %. To by naznačovalo, že quercetin v extraktu podléhal rozkladu pravděpodobně v důsledku snadné oxidace vzdušným kyslíkem [39]. Na obrázku 18 je ukázka chromatogramu extraktu z pohanky. Intenzivní pík v mrtvém čase zřejmě náležel škrobům, které jsou obsaženy v pohance.



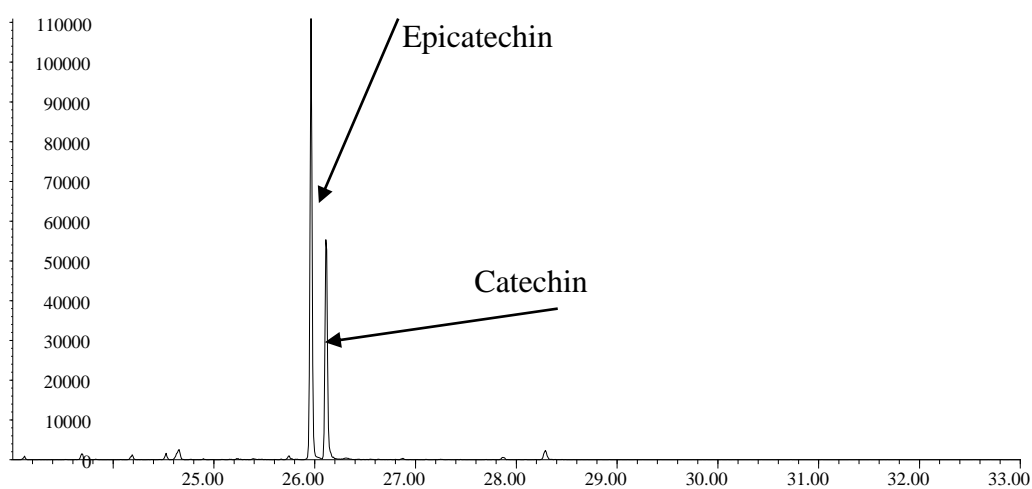
Obrázek 18 Chromatogram extraktu z pohanky

K objasnění nesouladu mezi obsahem quercetinu v pohankových extraktech stanoveným voltametrií a kapalinovou chromatografií přispěly výsledky analýzy extraktů provedené pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Pomocí této metody byly v extraktu pohanky nalezeny flavonoidy catechin a epicatechin (obr. 19) v množství větším než je množství rutinu stanovené voltametriky a HPLC (tabulka 13).

Tabulka 13 Koncentrace fenolových látek obsažených v extraktu pohanky

Látka	Molekulární iont [m/z]	Retenční čas [min]	Plocha	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [mg/100g] pohanky
Fisetin	559	28,87	8076956	10	-
Quercetin	647	29,69	133348	0,18	3,67
Epicatechin	368	26,96	1631403	2,02	20,20
Catechin	368	27,11	962135	1,19	11,91
Vanilová kys.	297	17,52	12867	0,02	0,16
Protokatechová kys.	193	18,14	235214	0,29	2,91
Galová kys.	458	19,57	36686	0,05	0,45
Kávoá kys.	396	21,18	20750	0,03	0,26

Catechin a epicatechin mají podobnou strukturu jako quercetin. Oxidační potenciál catechinu v pufru o pH 3,6 je 400 mV [40] a oxidační potenciál quercetinu v pufru o pH 3,0 je 370 mV. Obě hodnoty jsou si blízké a při voltametrickém měření mohl být při stejném potenciálu detegován quercetin, catechin, epicatechin a další flavonoidy, které mají podobné oxidační potenciály jako quercetin, což mohlo mít za následek vyšší proudovou odezvu píku, který náležel quercetinu. Mohl by to být důvod, proč se dvěma technikami (DPV a HPLC) naměřily rozdílné koncentrace quercetinu v extraktu z pohanky.



Obrázek 19 Záznam z GC-MS analýzy vzorku pohanky

5. Závěr

Byly připraveny dva typy uhlíkových kompozitních elektrod: pastové elektrody nemodifikované a modifikované uhlíkatými aerogely a tuhé kompozitní elektrody nemodifikované a modifikované aerogely, s polymerními pojivy. Všechny šest připravených uhlíkových pastových elektrod vykazovalo špatně opakovatelnou a tudíž analyticky nepoužitelnou odezvu, která byla způsobena nedokonalým vyleštěním pracovního povrchu elektrod. Pro další analýzy byly použity pouze tuhé kompozitní elektrody a uhlíkové pastové elektrody se pro další experimenty nepoužívaly.

Tuhé kompozitní elektrody byly připraveny smícháním grafitového prášku a dvou různých polymerních pojiv: epoxidové pryskyřice a methylmetakrylátové pryskyřice (Dentacryl). Byly připraveny kompozity s různými poměry grafit/pojivo, kde obsah vodivého grafitu byl 30 – 60 hmotnostních procent. Elektrochemické vlastnosti připravených elektrod byly testovány pomocí cyklické a diferenčně pulzní voltametrie. Všechny elektrody vykazovaly téměř stejný využitelný potenciálový rozsah. Při testování kvality povrchu elektrod byly poměry proudu katodického a anodického píku i_c/i_a modelového systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ rovny nebo téměř rovny jedné a rozdíl potenciálů $E_a - E_c$ se pohyboval v rozmezí 98 - 156 mV. Povrch uhlíkových kompozitních elektrod vykazoval lepší elektrochemické vlastnosti než povrch uhlíkových pastových elektrod popsanych v literatuře.

Pro analytickou aplikaci tuhých kompozitních uhlíkových elektrod byly vybrány flavonoly rutin a quercetin. U všech elektrod byl zaznamenán nárůst proudové odezvy po akumulaci rutinu a quercetinu na povrch elektrody. Elektrody vykazovaly vyšší citlivost na rutin než na quercetin pravděpodobně v důsledku interakce rutinosidu s kyslíkovými skupinami polymerního pojiva. U elektrod byly naměřeny kalibrační závislosti rutinu a quercetinu s akumulací 30 a 60 s. Tři elektrody CCE50, DAC40 a DAC60, které měly nejvyšší proudovou odezvu na rutin a quercetin, byly použity pro stanovení směsi rutinu a quercetinu. Na všech třech elektrodách došlo k dobrému rozlišení píků obou látek. S rostoucí dobou akumulace se rutin na povrch elektrody více akumuloval než quercetin, oba píky bylo možné využít ke kvantifikaci. Oproti tomu na elektrodě ze skelného uhlíku docházelo k menší akumulaci rutinu než quercetinu a s rostoucí dobou akumulace se pík rutinu sléval s píkem quercetinu a nebylo možné rutin detegovat. Lze tedy říci, že tuhé kompozitní elektrody

popsané v této práci jsou vhodnější pro analýzu směsi rutin a quercetinu než elektroda ze skelného uhlíku.

Elektrody CCE50, DAC40 a DAC60 byly použity pro analýzu reálného vzorku pohanky. V extraktech z pohanky byly voltametrickou technikou stanoveny rutin a quercetin. Množství rutin v extraktu se pohyboval od 4,7 do 9,2 mg/100g pohanky. Množství quercetinu se pohybovalo od 80 do 112 mg/100g pohanky. Pomocí HPLC byl také prokázán a stanoven rutin a quercetin v extraktu z pohanky. Průměrný obsah rutin byl 4 mg/100g pohanky, ale obsah quercetinu byl 0,09 mg/100g pohanky což je tisíckrát menší obsah quercetinu stanovený pomocí voltametrie. Pomocí GC-MS analýzy byl v extraktu zaznamenán catechin a epicatechin. Oba tyto flavonoidy mají podobné hodnoty oxidačního potenciálu jako quercetin. Vyšší proudová odezva při potenciálu oxidace quercetinu zaznamenaná voltametricky byla tedy zřejmě způsobena směsí látek o stejném oxidačním potenciálu jako má quercetin, což mohlo mít za následek nadhodnocení obsahu quercetinu stanoveného voltametricky.

6. Seznam použitých zkratek

DME	Rtuťová kapková elektroda
HDME	Visící rtuťová kapková elektroda
MFE	Rtuťová filmová elektroda
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CMCPE	Chemicky modifikovaná uhlíková pastová elektroda
gC	Elektroda ze skleného uhlíku
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie
LSV	Voltametrie s lineárně rostoucím napětím
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
DPASV	Diferenčně pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie
DPCSV	Diferenčně pulzní katodická rozpouštěcí voltametrie
SWV	Square wave voltametrie
CV	Cyklická voltametrie
CNTPE	Pastová elektroda s mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami
LOD	Mez detekce
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
RSD	Relativní směrodatná odchylka
NMR	Nukleární magnetická rezonance

7. Seznam použité literatury

- [1] Švancara, I., Vytřas, K., Barek, J., Zima, J.: *Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis*. Cr. Rev. Anal. Chem. 31, 311, (2001).
- [2] Švancara, I., Vytřas, K.: *Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod*. Chem. Listy 88, 138, (1994).
- [3] Volná, T.: *Bakalářská práce*. Ostravská Univerzita, Ostrava 2012.
- [4] Šebková, S.: *Voltametrické stanovení Alizarinové chromové černi PT s využitím kompozitních elektrod*. Chem. Listy 100, 449, (2006).
- [5] Navrátil, T.: *Kompozitní elektrody*, ve skriptu *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Praha, 2006.
<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/elektroanalytika.pdf>, staženo dne 30.1.2014.
- [6] Navrátil, T., Barek, J.: *Analytical Applications of Composite Solid Electrodes*. Cr. Rev. Anal. Chem. 39, 131, (2009).
- [7] Wang, J., Angnes, L., Tobias, H., Roesner, R. A., Hong, K. C., Glass, R. S., Kong, F. M., Pekala, R. W.: *Carbon aerogel composite electrodes*. Anal. Chem. 65, 2300, (1993).
- [8] Zheng, J., Zhou, X.: *Sodium dodecyl sulfate-modified carbon paste electrodes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid*. Bioelectrochemistry. 70, 408, (2007).
- [9] Chowdappa N., Swamy, B. E. K, Niranjana, E.: *Cyclic Voltammetric Studies of Serotonin at Sodium Dodecyl Sulfate Modified Carbon Paste Electrode*. Int. J. Electrochem. Sci. 4, 425, (2009).
- [10] El Mhammedi, M. A., Achak. M., Chtaini, A.: *Electrochemical determination of para-nitrophenol at apatite-modified carbon paste electrode: Application in river water samples*. J. Hazard. Mater. 163, 323, (2009).
- [11] Šebková, S.: *Stanovení chloridů na stříbrných kompozitních elektrodách*. Chem. Listy 97, 201, (2003).
- [12] Švancara, I., Schachl, K.: *Testing of Unmodified Carbon Paste Electrodes*. Chem. Listy 93, 490, (1999).

- [13] Švancara, I., Kalcher, K., Walcarius, A., Vytřas, K.: *Electroanalysis with carbon paste electrodes*, CRC Press, New York 2012.
- [14] Jacobs, E. S.: *Anodic stripping voltammetry of gold and silver with carbon paste electrodes*. *Anal.Chem.* 25, 2112, (1963).
- [15] Agraz, R., Sevilla M. T., Pinilla, J. M., Hernandez, L.: *Voltammetric determination of cadmium on a carbon paste electrode modified with a chelating resin*. *Electroanalysis* 3, 393, (1991).
- [16] Wang, G. S., Peng, T. Z., Shen, B. E., Qu, L. M., Zhu, P. L.: *Determination of copper with hectorite carbon paste electrode*. *Fenxi Ceshi Xuebao* 12, 67, (1993).
- [17] Švancara, I., Pravda, M., Hvizdalova, M., Vytřas, K., Kalcher, K.: *Voltammetric investigations on carbon paste electrodes as supports for mercury films*. *Electroanalysis* 6, 663, (1994).
- [18] Navrátil, T. *Composite solid electrodes – Tool for organic electrochemistry*. *Current organic chemistry* 15, 2996, (2011).
- [19] Velíšek, J., Hajšlová, J.: *Chemie potravin II.*, OSSIS, Tábor 2009.
- [20] Budavari S., O'Neil M. J., Smith A.: *The Merck Index*, Merck, 12. vydání, New York 1996.
- [21] Morishita, T., Yamaguchi, H., Degi, K.: *The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and Tartary buckwheat grain*. *Plant Production Science* 10, 99, (2007).
- [22] Brett, A. M. O., Ghica, M. E.: *Electrochemical oxidation of quercetin*. *Electroanalysis* 15, 1745, (2003).
- [23] <http://www.springerimages.com/Images/Chemistry/1-10.1007_s00253-008-1554-7-0>, staženo 19.4.2014
- [24] Macíková, P.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého, Olomouc 2009
- [25] Brett, A. M. O., Ghica, M. E.: *Electrochemical oxidation of rutin*. *Electroanalysis* 17, 313, (2005).
- [26] Antos, S. X.; Mazo, L. H., Cavaleiro, É. T. G.: *The use of a graphite-silicone rubber composite electrode in the determination of rutin in pharmaceutical formulation*. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 1600, (2008).

- [27] Lin, X. G., He, J. B., Zha, Z. G.: *Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry*. Sens. Actuators, B. 119, 608, (2006).
- [28] Macíková, P., Halouzka, V., Hrbáč, J., Barták, P., Skopalová, J. *Electrochemical behaviour and determination of rutin on modified carbon paste electrodes*. The Scientific World Journal 2012, 1 – 9, (2012).
- [29] Chen, X., Li, Q., Yu, S.: *Activated silica gel based carbon paste electrodes exhibit signal enhancement for quercetin*. Electrochim. Acta 81, 106, (2012).
- [30] Wang, Y., Xiong, H., Zhang, X.: *Detection of rutin at DNA modified carbon paste electrode based on a mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder*. Microchim. Acta 170, 27, (2010).
- [31] Zoulis, N. E., Efstathiou, C. E.: *Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids*, Anal. Chim. Acta 320, 255, (1996).
- [32] Martiníková, S.: *Diplomová práce*. Ostravská Univerzita, Ostrava 2011.
- [33] Martiníková, S., Slovák, V., *Surface area of carbon aerogels prepared under different conditions without supercritical drying*. Chemistry - the creative force. Norimberk, 2010, 743.
- [34] Olson, C., Adams, R. N.: *Carbon Paste Electrodes Application to Anodic Voltammetry*. Anal. Chim. Acta 22, 582, (1960).
- [35] Navrátilová, Z., *Coal as a New Carbon Paste Electrode Modifier with Sorption Properties*. Electroanalysis 21, 1758, (2009).
- [36] Navrátil, T., Kopanica, M.: *Stanovení olova na stříbrných kompozitních elektrodách s využitím efektu „underpotential deposition“*. Chem. Listy 96, 111, (2002).
- [37] Navrátil, T. Barek, J., Kopanica, M.: *Anodic Stripping Voltammetry Using Graphite Composite Solid Electrode*. Collect. Czech. Chem. Commun. 74, 1807, (2009).
- [38] Šebková, S., Navrátil, T., Kopanica, M.: *Graphite Composite Electrode in Voltammetry*. Anal. Lett. 38, 1, (2005).
- [39] Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Gal M., Zabka J.: *The oxidation of natural flavonoid quercetin*. Chem. Commun. 48, 3433, (2012).

- [40] Martinez, S., Valek, L., Petrovic, Z.: *Catechin antioxidant action at various pH studied by cyclic voltammetry and PM3 semi-empirical calculations*. J. Electroanal. Chem. 584, 92, (2005).