

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Miniaturizované uhlíkové elektrody v průtokových
systémech**

Disertační práce

Autor práce:

Mgr. Rozsypal Jan

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

OLOMOUC 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli, prof. RNDr. Juraji Ševčíkovi, Ph.D. za uvedení do tématu kapilární elektroforézy a za neustálou motivaci. Dále děkuji doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. za umožnění práce v laboratoři HPLC a prof. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. za poskytnutí nezbytného přístrojového a softwarového vybavení a pomoci při jejich úpravách a opravách. Oběma pak moc děkuji za cenné připomínky a doplnění k této závěrečné práci, bez kterých by mohla jen obtížně vzniknout. Rovněž děkuji i ostatním kolegům a kamarádům z katedry analytické chemie za utváření příjemného prostředí a za veškerou pomoc.

Důležité poděkování patří mojí rodině, zejména přítelkyni Aleně a dcerkám Nele a Nině, za zdárné přečkání celého nelehkého období mého studia a hlavně jeho závěrečné části.

SOUHRN

Předložená disertační práce se zabývá aplikací miniaturizovaných uhlíkových elektrod v elektroanalytických metodách realizovaných v průtoku. Teoretická část se zabývá elektrodovými materiály na bázi uhlíku, zejména mikroelektrodami z uhlíkového vlákna a mikrotuhy, což je náhradní elektrodový materiál, který je v současnosti populární díky nízké ceně a dobrým analytickým vlastnostem. Pro uvedené materiály je podán přehled současné literatury o jejich využití v analytické elektrochemii. Dále jsou v teoretické části práce popsány metody analýzy v proudících kapalinách s elektrochemickou detekcí, diskutována je kapalinová chromatografie, elektroforéza a amperometrie v průtoku využívající mikrodialýzu jako vzorkovací techniku. Experimentální část práce popisuje konstrukci elektrochemických detektorů využívajících jako pracovní elektrody uhlíkové vláknové mikroelektrody a mikrotuhu o průměru 0,2 mm, která je nejtenčí běžně dostupná na trhu (Pentel AinStein). Vyvinuté detektory s vláknovými elektrodami byly aplikovány:

1. Jako neenzymatické glukosové senzory, přičemž uhlíkové vlákno bylo opatřeno vrstvou materiálu na bázi niklu resp. slitiny mědi a niklu. Detektory dosahovaly velmi vysoké citlivosti při amperometrii v míchaném roztoku a byly použitelné i v nástřikové průtokové analýze.
2. V kapilární elektroforéze, byla demonstrována aplikovatelnost při stanovení dvou fenolických kyselin (ferulové a gallové)
3. Pro automatizovanou analýzu snadno oxidovatelných látek v pivu ve spojení s mikrodialýzou. Výsledky uspokojivě korelovaly se standardní Kanedovou metodou využívající DPPH

Detektor s mikrotuhou byl testován při HPLC analýze setu osmi antipsychotických léčiv, detekční vlastnosti mikrotuhy umožnily analýzu reálných vzorků krevní plasmy pacientů.

SUMMARY

The submitted dissertation deals with the application of miniaturized carbon electrodes in electroanalytical methods realized in flowing streams. The theoretical part deals with carbon-based electrode materials, in particular carbon fiber microelectrodes and miniature pencil lead, an alternative electrode material that is currently popular due to its low cost and good analytical properties. For these materials, a review of the current literature on their use in analytical electrochemistry is given. In addition, the theoretical part of the work describes methods of analyses in flowing streams featuring electrochemical detection - liquid chromatography, electrophoresis and flow amperometry utilising microdialysis as a sampling technique are discussed. The experimental part of the thesis describes the design of electrochemical detectors using as working electrodes the carbon fiber microelectrodes and a 0,2 mm diameter micro pencil lead, which is the thinnest commercially available (Pentel AinStein).

The developed detectors with carbon fiber microelectrodes have been applied:

1. As non-enzymatic glucose sensors, where the carbon fibre was coated with a layer of nickel-based material or a copper-nickel alloy. The detectors achieved very high sensitivity in stirred solution amperometry and were also applicable in flow injection analysis.
2. In capillary electrophoresis, applicability in the determination of two phenolic acids (ferulic and gallic) was demonstrated.
3. For automated analysis of easily oxidisable substances in beer in conjunction with microdialysis. The results correlated satisfactorily with the standard Kaneda method using DPPH.

The pencil microlead detector was tested in the HPLC analysis of a set of eight antipsychotic drugs; the detection properties of the micro pencil lead allowed the analysis of real patients' blood plasma samples.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1	Mikroelektrody	3
2.2	Uhlíková vlákna a jejich využití pro konstrukci mikroelektrod	4
2.2.1	Výroba uhlíkového vlákna	4
2.2.2	Úpravy povrchu uhlíkových mikroelektrod	5
2.3	Mikrotuha	8
2.4	Elektrochemická detekce v separačních technikách.....	11
2.4.1	Kapalinová chromatografie a elektrochemická detekce.....	11
2.4.2	Elektrochemická detekce v kapilární elektroforéze	13
2.4.3	Mikrodialýza a její přímé spojení s amperometrickou detekcí	14
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení	16
3.1.1	Použité chemikálie a materiál	16
3.1.2	Přístrojové vybavení.....	17
3.1.3	Konstrukce průtočné elektrochemické cely	17
3.2	Výroba a úpravy uhlíkové vláknové elektrody.....	19
3.2.1	Výroba elektrody.....	19
3.2.2	Elektrochemická aktivace a čištění vlákna.....	19
3.2.3	Aktivace a pokovení vlákna jiskrovým výbojem.....	20
3.2.4	Pokovení vlákna mokrou cestou	22
3.3	Sestavení cely s mikrotuhovou elektrodou	22
3.4	Sestava kapilární elektroforézy s amperometrickou detekcí	23
3.5	Sestava pro automatizovanou mikrodialýzu s amperometrickou detekcí	26
4	Výsledky a diskuze	28
4.1	Modifikace vlákna niklem, slitinou mědi s niklem a tvorba glukosového senzoru ..	28
4.1.1	Pokryávání uhlíkového vlákna aktivní vrstvou.....	29
4.1.2	Elektronová mikroskopie a spektrální měření.....	30
4.1.3	Elektrochemická charakterizace.....	31
4.1.4	Glukosový senzor.....	33
4.2	Amperometrická detekce v kapilární elektroforéze.....	35
4.2.1	Detekce ferulové a gallové kyseliny	35

4.2.2	Vliv separačního napětí na detekční systém	36
4.3	Amperometrické stanovení antioxidační kapacity piv ve spojení s automatickou mikrodiálýzou.....	38
4.4	Grafitová mikrotuha pro amperometrickou detekci v HPLC	43
4.4.1	Elektrochemická charakterizace tuhy.....	44
4.4.2	Tuha v kapalinové chromatografii s amperometrickou detekcí	46
5	Závěr	50
6	Seznam použité literatury	54

1 ÚVOD

Technický pokrok umožňuje realizaci elektronických zařízení běžné potřeby (počítače, telefony, aj.), které jsou miniaturizovány, nebo jsou stále výkonnější bez zvětšování jejich rozměrů. Podobné možnosti se otevírají i v dalších oblastech a chemická instrumentace nezůstává stranou. Analytická chemie může dále těžit z pokroku v mikroobrábění a jiných způsobech výroby malých objektů pro tvorbu přístrojů typu „laboratoř na čipu“. Je potřeba mít i prostředky pro kontrolu systému a sběr dat. K tomu je ideální mít, pokud možno, poměrně jednoduchou, malou a levnou řídicí elektroniku. V době všudypřítomných chytrých telefonů není ani potřeba vytvářet zcela nová zařízení. Dokonce i nejlevnější modely telefonů obsahují už z výroby celou řadu senzorů, jako jsou akcelerometry, čidla vzdálenosti a kameru. Dále komunikační moduly pro spojení pomocí sítě Wi-Fi, samozřejmě mikrofon, reproduktor, audio výstup pro sluchátka a port typu USB. Častým operačním systémem levnějších telefonů je Android a pro nadšené a zkušené uživatele jsou dostupné nástroje pro tvorbu vlastních aplikací. To vše dohromady nám poskytuje rozsáhlé pole možností konstrukce nebo vylepšení malých analytických zařízení.

Klíčovou komponentou v takovýchto miniaturních „laboratořích“ jsou ovšem senzory, sloužící jako detektory poskytující vlastní analytickou informaci. Zde narazíme hned na několik obtíží. Jednou z nich je velice komplikované nebo dokonce nemožné zmenšení některých detekčních technik, jako jsou jinak výborné hmotnostní spektrometry. V jiném případě není zmenšení přístroje problém, nebo je dokonce velice jednoduché, ale utrpí některé analytické vlastnosti. Typicky je to ztráta citlivosti fotometrických detektorů kvůli velmi krátké optické dráze v mikrofluidních zařízeních. Naštěstí existuje ještě další varianta, a tou je elektrochemie. V rutinních separačních technikách lehce opomíjená a mezi studenty nepříliš oblíbená, avšak dovolující beze ztráty citlivosti zmenšovat detekční elektrody, včetně potřebných doprovodných elektronických zařízení.

Cílem předložené dizertační práce bylo prozkoumat využití miniaturních uhlíkových elektrod v průtokových systémech. Za tímto účelem byly připraveny elektrody z uhlíkového vlákna a také z nejtěsněji dostupné mikrotuhy (průměr 0,2 mm). Úkolem bylo zkonstruovat detekční cely pro oba typy elektrod a vyzkoušet jejich možnosti v různých průtočných analytických systémech. Uhlíkové vláknové elektrody byly využity při detekci glukosy, jak v

konvenčním amperometrickém uspořádání, tak v průtokové vstřikovací analýze. Proběhly pokusy aplikovat detektor s uhlíkovým vláknem v kapilární elektroforéze. Detektor na bázi uhlíkového vlákna byl dále aplikován při stanovení celkového obsahu snadno oxidovatelných látek v pivu. Pro tento účel byl sestaven automatický vzorkovací systém, využívající mikrodialýzu k přečištění měřených vzorků piva pro následnou amperometrickou detekci. Dále byl zkonstruován detektor založený na mikrotuhové elektrodě a jeho uplatnění bylo ověřeno ve spojení s kapalinovou chromatografií při stanovení antipsychotických léčiv v krevní plasmě.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroelektrody

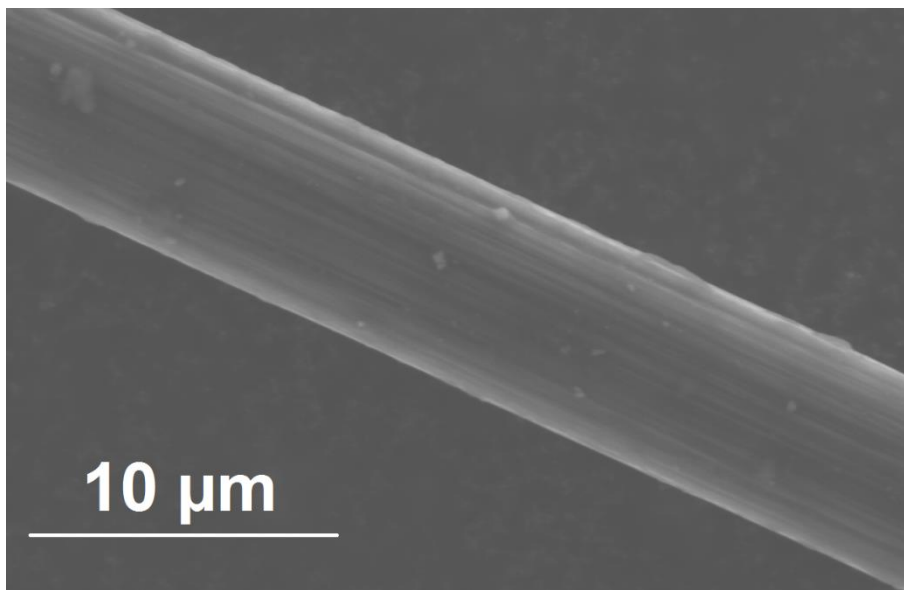
Vzhledem k miniaturizaci instrumentace dochází i k miniaturizaci elektrochemických detekčních cel a elektrod v nich obsažených, zejména pracovní elektrody. Zmenšování rozměrů elektrod přináší obtíže v podobě horší manipulace s nimi. Na druhou stranu dochází k výraznému zlepšení některých jejich vlastností. Menší elektrody mají nižší elektrickou kapacitu a s tím souvisí i menší nabíjecí proudy při aplikaci, nebo změnách pracovního potenciálu. Důsledkem je pak rychlejší ustálení základní linie a lepší poměr signálu ku šumu. Pokud se některý z rozměrů elektrody dostane do řádu jednotek až desítek mikrometrů, vzniká tzv. mikroelektroda. Významnou vlastností mikroelektrod je jejich vysoká relativní citlivost. Důvodem je speciální mód transportu elektroaktivní látek z roztoku k povrchu elektrody. Pokud probíhá elektrodová reakce v nemíchaném roztoku, je za dopravu látky k elektrodě zodpovědná difúze. Rozlišujeme dvě formy difúze a to planární a radiální, z nichž radiální difúze je schopna dodávat větší množství látky k elektrodě. Radiální difúze se projevuje pouze tehdy, pokud je rozměr aktivní části elektrody menší než tloušťka difuzní vrstvy. Tuto podmínku mikroelektrody splňují a proto je u nich radiální difúze dominantní. Existují i soustavy oddělených mikroelektrod zvané mikroelektrodová pole. Signál takových polí se liší v závislosti na vzájemné vzdálenosti elektrod a překryvu jejich difuzních vrstev [1].

Malé rozměry mikroelektrod umožňují jejich umístění do elektrochemických cel nepatrných rozměrů, měření přímo ve výstupních kapilárách kapalinových chromatografů, elektroforéz, nebo v živé tkáni. Příprava mikroelektrod a mikroelektrodových polí může být poměrně jednoduchá s použitím třeba kovových nebo uhlíkových vláken. Nebo je možné požadovaného výsledku dosáhnout technikami mikroobrábění a mikrofabrikace, případně kombinací všech uvedených způsobů [2, 3]. Starší přehledové články o miniaturizovaných elektroanalytických zařízeních jsou dílem J. Wanga [4, 5].

Prakticky libovolný materiál vhodný pro konstrukci makroelektrod může být použitý i pro mikroelektrody. Z důvodu zaměření předkládané práce se dále budeme zabývat hlavně miniaturními elektrodami a mikroelektrodami na bázi uhlíku.

2.2 Uhlíková vlákna a jejich využití pro konstrukci mikroelektrod

Uhlíkové vlákno je materiál, průmyslově vyráběný řízenou karbonizací některých polymerních vláken, jak přírodního, tak syntetického původu. Nejčastějšími prekurzory jsou viskóza, dehet a polyakrylonitril, přičemž v současnosti nejběžnější jsou uhlíková vlákna vyrobená z polyakrylonitrilového prekurzoru (Obr. 1). Uhlíková vlákna se během půl století vyvinula z kuriozity v běžný a cenově dostupný materiál. Disponují dobrým poměrem pevnosti v tahu k hmotnosti a tím jsou jako stvořena k výrobě dílů pro letecký a vojenský průmysl, ale také sportovního vybavení, nebo modelů. Vlákna sama o sobě mají malé uplatnění - nemají dostatečnou tuhost. Daleko větší využití mají kompozitní materiály. Kompozity se vyrábějí smísením buď dlouhých uhlíkových vláken nebo vláken nasekaných na krátké kousky, případně uhlíkové tkaniny s polymerními pojivy, jako jsou epoxidové a polyesterové pryskyřice.



Obr. 1: SEM snímek uhlíkového vlákna bez dodatečných úprav.

2.2.1 Výroba uhlíkového vlákna

Kořeny průmyslové výroby uhlíkových vláken sahají do počátku druhé poloviny dvacátého století, kdy R. Bacon připravil a popsal grafitová vlákna s dobrými mechanickými vlastnostmi [6]. Objev byl učiněn při pokusu o stanovení trojného bodu grafitu. V atmosféře argonu o tlaku okolo 0,9 MPa byl zažehnut stejnosměrný elektrický oblouk mezi grafitovou tyčinkou a grafitovým blokem. Při snížení tlaku odpařený grafit zkondenzoval a na grafitovém

bloku vytvořil depozit podobný krápníku. Při jeho odlomení a rozbití si Bacon všiml, že obsahuje vlákna délky až 3 cm a síly v jednotkách mikrometrů. Vnitřní struktura vláken byla tvořena listy grafitu stočenými do svitků nebo trubiček. Měření mechanických vlastností ukázalo, že vlákna mají dobrou pružnost v ohybu a vysokou pevnost v tahu a vysoký modul pružnosti v tahu. Tento způsob výroby vláken je málo produktivní a velmi nákladný.

Jak již bylo zmíněno, praktickým způsobem výroby uhlíkových vláken je karbonizace vláken vyrobených z materiálů jako je viskóza, dehet nebo polyakrylonitril a dalších. Uhlíková vlákna připravená z různých výchozích surovin se mohou svými vlastnostmi a detaily výrobního procesu velmi lišit, základní postup je však podobný. Zjednodušeně popsáno, výrobní proces zahrnuje tyto kroky: Opatrná oxidace při teplotě 200-400 °C, při teplotě okolo 1600 °C probíhá karbonizace za nepřístupu vzduchu a případně grafitizace při 3000 °C. Přehledné pojednání o prekurzorech uhlíkových vláken, jejich výrobě a vlastnostech nabízí E. Frank a kol. [7]. Více o historii uhlíkových vláken je k dispozici na webových stránkách American Chemical Society [8].

2.2.2 Úpravy povrchu uhlíkových mikroelektrod

První práce o využití uhlíkových vláknových mikroelektrod pro účely elektroanalytické chemie se objevily koncem sedmdesátých let 20. století. Tyto práce se zaměřovaly na studium katecholaminů přímo v živé tkáni [9, 10]. Uhlíková vlákna jsou vhodný materiál pro uvedená měření, protože mají tloušťku v jednotkách až desítkách mikrometrů a jsou biokompatibilní a nezpůsobují tak větší poškození tkání. Jsou také dostatečně mechanicky a chemicky odolná.

Ve stejném období, kdy se poprvé použila mikrovlákná k *in vivo* elektroanalýze, se pracuje i na jejich charakterizaci a modifikaci povrchu za účelem vylepšení elektroanalytických vlastností [11, 12]. Jde zejména o úpravy vedoucí k potlačení vlivu rušivých látek a zlepšení citlivosti. V případě *in vivo* měření hladiny dopaminu je interferujícím analytem zejména kyselina askorbová.

Nejběžnější modifikací povrchu je elektrochemická oxidace uhlíkového vlákna. Je snadno proveditelná a znatelně mění citlivost a selektivitu elektrody [13, 14]. Vysvětlení, jak elektrooxidace ovlivňuje vlastnosti elektrody, bylo navrženo na základě SEM snímků nativního vlákna a vlákna po různém stupni elektrooxidace [15]. Uhlíkové vlákno použité v uvedené práci mělo „cibulovitou“ strukturu. Původně poměrně hladká vnější slupka uhlíkového vlákna je po oxidaci narušena a odhalují se vnitřní vrstvy, bohaté na hrany („edge plane“) grafitického uhlíku. Dochází tedy k odkrytí reaktivnější a morfologicky členitější struktury. Kromě

odstranění povrchové vrstvy vlákna dochází při elektrooxidaci i k zavedení kyslíkatých funkčních. Podrobně se elektrooxidací uhlíkového vlákna zabývali Roberts a kol. [16] a Halouzka a kol., [17]. První skupina aplikovala potenciál cyklující mezi -0,5 a 1,8 V (pokud není uvedeno jinak, jsou všechny v této práci uvedené potenciály v elektrochemických měřeních vztaženy k Ag/AgCl referenční elektrodě) s frekvencí 10 Hz po dobu 5 min. Následné měření Ramanových spekter odhalilo zvýšený výskyt kyslíkatých skupin oproti nativnímu vláknu. Měření povrchu technikou AFM však neukázalo na významné zvýšení drsnosti. Z uvedených zjištění vyplývá, že při úpravě elektrody „mírným“ elektrooxidačním procesem nedochází k rozpadu povrchu vlákna a podstata zlepšení citlivosti na dopamin s největší pravděpodobností spočívá v jeho adsorpci na oxidovaný povrch elektrody.

Druhá zmíněná skupina [17] se zabývala vlivem tvaru vlny aplikovaného potenciálu (sinusoida/trojúhelník) v rozsahu 0–2,9 V s frekvencí 50 Hz. Potenciál byl aplikován po různé dlouhou dobu a byl sledován odpovídající elektrický proud. Charakteristický pokles proudu po asi 0,1 s byl přisouzen rozpadu kompaktní povrchové vrstvy vlákna, následný opětovný nárůst proudu je způsoben odkrytím reaktivnějších vrstev. Ramanova spektra ukázala výskyt hydroxylových skupin v době 0,1 s a v tomto čase měla elektroda i nejvyšší odezvu na dopamin. S rostoucím časem oxidace vlákna selektivita k dopaminu klesala současně s výskytem karboxylových skupin a měření SEM ukázala postupné ztenčování vlákna. Úprava elektrody potenciálovým programem se sinusovým průběhem po dobu pouze 0,1 s se ukázala jako nejlepší pro detekci dopaminu.

Popsané metody elektrooxidace vlákna, v anglickém jazyce nazývané electrochemical pretreatment (ECP), mají ještě další cíl. Uplatní se efekt ztenčení vlákna působením proudu a při vhodném provedení je možné vytvořit na vlákně ostrou špičku. Takto tvarovaná elektroda je lepší pro měření *in vivo*, než elektroda s tupým koncem [18]. Postup je v případě velmi krátkých vláken pracný a obtížně kontrolovatelný. Vyrobené elektrody je navíc potřeba zbavit chemikálií použitých v pracovním roztoku (NaCl nebo H₂CrO₄). Zahrocení vlákna je možné docílit i „suchou cestou“ při použití jiskrového výboje [19, 20]. Požadovaného výsledku se dosahuje ve dvou krocích. V prvním kroku se mezi vlákno a wolframový hrot vloží střídavé napětí 400-600 V a hrot se přiblíží kolmo k vláknu v místě, kde je potřeba vlákno oddělit, typicky na délku 50 μm. Při vzájemné vzdálenosti hrotu a vlákna asi 10 μm přeskočí jiskra a po krátké době se vlákno v místě jiskry přetrhne. V druhém kroku se použije stejnosměrné napětí 700-800 V a elektrody se přiblíží tak, aby se mezi nimi zažehl koronový výboj, který opracuje konec vlákna do hrotitého tvaru.

Dosud bylo psáno pouze o modifikacích samotného uhlíkatého materiálu vlákna. Nic ale nebrání tomu, aby se vlákno stalo nosičem krycích vrstev, částic kovů nebo enzymů. Pokrytí vlákna celistvým filmem má opět původ v *in vivo* měřeních dopaminu. Uplatnění zde našel fluorovaný polymer firmy DuPont dodávaný pod názvem Nafion. Vytvořená vrstva je propustná pro kationty, takže dopamin může projít, zatímco aniontové látky jako kys. askorbová ne [21-23]. Alternativou Nafionu je polypyrrol [24]. Lepší selektivita polypyrrolem modifikované elektrody je vykoupena delší dobou odezvy elektrody [25].

Elektrody modifikované kovými povlaky mají velký význam v elektroanalýze. Jako významné zástupce můžeme uvést zlato a jeho použití při analýze organických sloučenin obsahujících síru [26, 27], dále arsenu nebo [28, 29] antimonu [30]. Platinové elektrody pro detekci aminobifenylů a aminonaftalenů [31]. Měděné a niklové elektrody mají uplatnění při detekci sacharidů [32, 33]. Nelze zapomenout na, v našich krajinách tradiční, rtuť a její dobré vlastnosti při detekci redukovatelných látek [34], ale pro toxicitu jejích sloučenin se od rtuti upouští. Použití makroskopických kovových elektrod nemusí být výhodné pro vysokou cenu materiálu, nevhodné rozměry pro zvolenou aplikaci a podobně.

Nanášení kovu na uhlíkové vlákno může probíhat prostou elektrochemickou redukcí požadovaného kovu z roztoku jeho soli, často za přítomnosti aditiv, ovlivňujících tvar kovových mikrokrystalů rostoucích na vlákně. Tento postup byl využit V. Halouzkou a kol. [35] k přípravě mikroelektrody citlivé na peroxid vodíku, se stříbrnými nanočásticemi jako aktivní látkou a s vrstvou Nafionu ke stabilizaci elektrody a omezení vlivu nežádoucích analytů. Pokrytí vlákna drobnými krystalky má jeden velký přínos-podstatně narůstá plocha povrchu dostupného pro elektrochemické reakce, ve srovnání s hladkým drátkem podobných rozměrů. Pokud dostane povrch podobu nanostruktur, relativní citlivost takovéto elektrody může dále růst [36]. Odlišný způsob pokovování vláken představil J. Suzuki a kol. [37]. V jejich provedení se vlákna pokryla hladkým filmem kovu (Au, Ag nebo Cu) metodou PVD (physical vapor deposition) Tento proces probíhá pod vakuem, kov odpařený za vysoké teploty z mateřského materiálu kondenzoval na uhlíkové tkanině. Za zmínku stojí, že cílem nebylo v tomto případě vytvořit senzor, ale materiál elektrody pro baterie. I rtuť má své místo v oblasti pokovených uhlíkových vláken. Aby se co nejvíce omezilo její množství, vyvinuly se techniky přípravy tenkého filmu rtuti na vlákně, nebo mikrodisku. Opět jde o elektroredukci rtuti z příslušné soli a jsou dva přístupy. V *ex situ* verzi je nejprve vytvořen povlak rtuti a poté se elektroda přesune do měřicí cely [38]. *In situ* varianta obsahuje rtuťnatou sůl jako součást podpůrného elektrolytu [39].

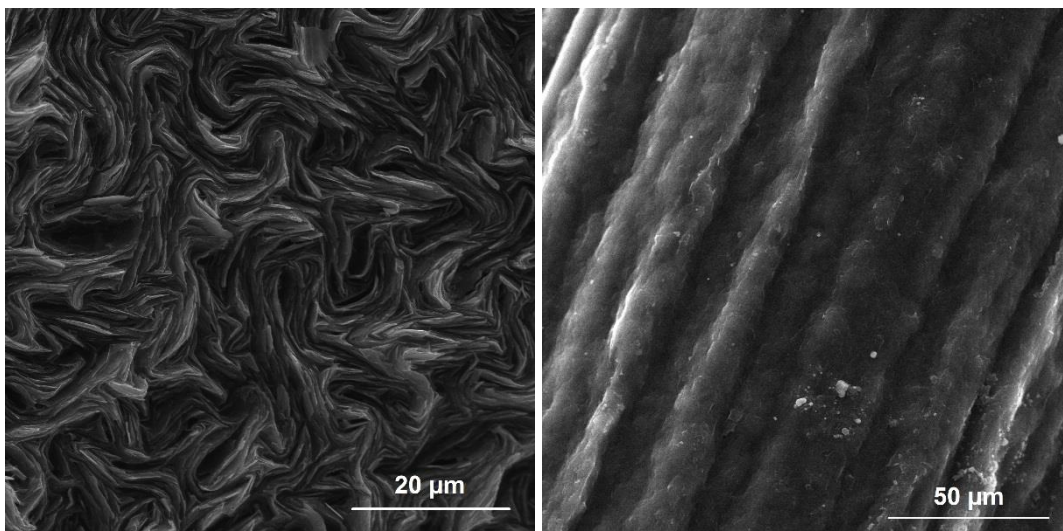
Zajímavým způsobem přípravy vláken s obsahem kovu je metoda elektrostatického zvláknování. Prekurzorem je polyakrylonitril a acetylacetonát nikelnatý, obojí v roztoku dimethylformamidu. Po zvláknění následuje tepelný program v kontrolované atmosféře pro redukci Ni^{2+} na nanočástice niklu a karbonizaci vlákna. Autoři dále nepoužívali samotná vlákna, ale pastu vzniklou smísením vláken s minerálním olejem. Cílem bylo vytvořit neenzymatický senzor na glukosu nebo ethanol [40, 41].

Jako zástupce enzymatických senzorů uveďme elektrodu citlivou na acetylcholin. Na uhlíkové vlákno je v polymerní matrici inhibována dvojice enzymů, acetylcholinesterasa a cholinoxidasa. Podstatou měření je kaskáda enzymových reakcí na jejímž konci stojí peroxid vodíku a který je detekován amperometricky [42]. Z novější doby pochází senzor, kombinující téměř všechny výše uvedené techniky úprav vlákna. Na vlákno jsou postupně deponovány porézní zlaté nanočástice, platinové nanočástice, následuje vrstva Nafionu. Po zaschnutí následuje zafixování glukosaoxidasy a laktátoxidasy na předchozí vrstvy. Finální pokrytí tvoří polyuretan a permselektivní vrstva z fenylendiaminu. Výsledkem je čidlo schopné současně detekovat glukosu a kyselinu mléčnou *in vivo* [43].

2.3 Mikrotuha

Snadno dostupnou a levnou formou uhlíku pro přípravu elektrod jsou běžné tuhy využívané v psacích potřebách. Tuhy lze rozdělit do dvou kategorií, a to na klasické tuhy (typický průměr 2 mm) známé z dřevěných tužek a mikrotuhy o síle 0,2–0,9 mm.

Klasické tuhy jsou vyrobeny ze směsi jemně mletého grafitu a jílu nebo dalších přísad. Směs se za mokra důkladně promísí a po vylisování přebytečné vody je protlačena matricí s otvorem o průměru odpovídajícím výsledné tuze. Následuje sušení a vytvrzení za vysoké teploty, finální úpravou bývá napuštění tuhy olejem nebo voskem. Mikrotuhy už nevystačí s keramickým pojivem. K dosažení uspokojivých mechanických vlastností obsahuje tuha podíl polymeru, který po karbonizaci za vysoké teploty dodá potřebnou odolnost vůči zlomení. Nejtenší mikrotuhy mají nominální průměr 0,2 mm, nejčastěji používaná tloušťka mikrotuhy pro běžné psaní a rýsování je 0,5 mm. SEM snímek tuhy tohoto typu je uveden na Obr. 2. Použití tuhy z tužky nebo grafitové tyčinky z baterie či elektrické obloukové lampy jako uspokojivé náhražky speciálních, precizně připravených, ale hůře dostupných elektrod, je zmíněno v práci z roku 1995. Tuha zde byla aplikována jako elektroda pro abrazivní rozpouštěcí voltametrii [44]. Další použití zahrnuje tuhu se rtuťovým filmem, opět pro rozpouštěcí voltametrii [45].



Obr. 2: SEM snímky tuhy Pentel AinStein 0,2 mm. Vlevo: průřez, vpravo: boční stěna.

Tuhy se kromě rozměrů liší svým složením, jak už bylo uvedeno výše. Kromě odstínu černě má složení vliv i na elektrochemické chování. Tuhy síly 0,5 mm a různých tříd tvrdosti byly testovány jako čidlo pro analýzu DNA a RNA a detekci hybridizace DNA [46, 47]. Rozdíly v chování tuh mohou být přisouzeny různé struktuře povrchu a vlivu negrafitických přísad (polymery, jíl). Důkladně se studiem vlastností mikrotyh zabýval R. Navrátil a kol. [48]. Mikrotyhy s obsahem polymeru byly testovány cyklickou voltametrií na redoxní sondě $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Tuhy byly upraveny tak, aby v kontaktu s elektrolytem bylo pouze čelo tuhy, nebo boční stěna. Z naměřených dat vyplývá, že stěna tuhy má daleko lepší schopnost přenosu náboje oproti čelu a to i pokud byla povrchová vrstva boční stěny opatrně odstraněna brusným papírem. Další studium technikou SEM odhalilo různou kvalitu povrchu tuhy (hladký, podélné brázdy). Větší přiblížení umožnilo nahlédnout na detailní strukturu. Vyskytují se zde lístky grafitu, nebo malé částice na amorfním pozadí. Chemické složení podle EDX a XPS potvrzuje výskyt uhlíku, oxidy křemíku-pravděpodobně pozůstatek silikonového oleje použitého při výrobě tuhy. V případě tuhy neobsahující polymer se objevily signály hliníku, sodíku a vápníku, prozrazující použití jílového pojiva. Ve všech případech vykazoval uhlík jen velmi malý stupeň oxidace.

Pro úplnost uveďme, že už o několik let dříve se J. Kariuki [49] podrobně zabýval studiem tuhy s obsahem jílu, tedy běžné dřevěné tužky, a jejímu srovnání se skelným uhlíkem a vysoce orientovaným pyrolytickým grafitem. Tužka byla ostrouhána obvyklým způsobem a bez dalších úprav podrobena měření. Z cyklické voltametrie několika modelových redoxních

systemu vyplynulo, že tuha dosahuje podobné rychlosti přenosu náboje jako skelný uhlík a může tedy sloužit jako levnější alternativa k ušlechtlejším uhlíkovým materiálům.

Na rozdíl od uhlíkových vláken, má tuha dobré elektrochemické vlastnosti už z výroby a lze ji rovnou použít k měření. Jako příklad může být průtočná cela pro měření celkové antioxidační kapacity čajů [50], měření hladiny paracetamolu v krevním séru v cele o malém objemu (15 μ l) [51], vysoce účinný detektor oxidovatelných látek po HPLC separaci [52], pro detekci nízkých koncentrací kyseliny chlorogenové v moči [53]. Zařízení typu „laboratoř ve stříkačce“ využívalo tuhu ve dvou provedeních - holou a pokrytou Nafionem, pro měření dopaminu v mozkomíšním moku myší [54].

V poslední uvedené práci se setkáváme s tuhou, která je pokrytá funkční vrstvou. Stejně jako u uhlíkových vláknových elektrod, není žádných překážek tvořit elektrody z tuhy vylepšené o další materiály. Motivace a způsoby přípravy jsou obdobné. Jako zástupce lze představit nanojehličky oxidu cíničitého, připravené *ex situ*. Po smísení s Nafionem jsou nanoseny na mikrotyhu s cílem vytvořit senzor na arsen [55]. Elektrodeponovaná vrstva niklu, která je následně oxidována na aktivní formu hydroxidu-oxidu niklu. Hotová elektroda byla použita pro elektrooxidaci glycerolu, ethanolu a methanolu [56]. Pro stanovení bisfenolu A a bisfenolu S byl na tuhu nanesen povlak z 1,3,5-triformylfloroglucinolu a 2,6-diaminoanthrachinonu. Vznikla tak vodivá vrstva schopná adsorbovat aromatické látky [57]. I jiné formy uhlíku jako grafen nebo uhlíkové nanotrubičky mohou být použity k vylepšení vlastností tuhy. Jako třeba mnohvrstevnatý senzor pokrytý Nafionem s obsahem nanotrubiček, na které je dále elektrodeponován bismut. Hotový senzor má uplatnění v detekci olovnatých a kademnatých iontů [58]. Existují i imunosenzory na základě tuhy, jako je senzor schopný měřit hladinu protilátek proti toxinu bakterie *Corynebacterium diphtheriae*, způsobující záškrť [59]. Pro detekci glukosy v průtokovém systému byl sestaven i senzor, který pro dosažení dobrých vlastností kombinuje při své výrobě elektrochemickou aktivaci tuhy, poté elektrodepozici kvantových teček ZnS-CdS, na které je posléze navázána glukosaoxidas pomocí chitosanu [60]. Tuha může být i aktivní částí integrovaného senzoru. Byla zainkorporována do keramické destičky obsahující pomocnou a referenční elektrodu vytvořenou sítotiskem [48].

2.4 Elektrochemická detekce v separačních technikách

2.4.1 Kapalinová chromatografie a elektrochemická detekce

Kapalinová chromatografie je pravděpodobně nejrozšířenější separační metodou pro analýzu kapalných vzorků. Podobně jako u jiných technologií jsou i zde snahy o zmenšení používané instrumentace, při zachování, nebo dokonce zlepšení požadovaných vlastností.

Miniaturizace v této oblasti přináší zajímavá technická řešení pro téměř každý modul kapalinového chromatografu. Zvyšují se nároky na pumpy dodávající mobilní fázi, protože je potřeba pracovat za velmi vysokých tlaků (až stovek MPa) a současně spolehlivě udržovat i velice nízké průtoky mobilní fáze (v řádu $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$). Klasické dvoučinné pumpy je možné nahradit stříkačkovými [61]. Případně je možné využít elektroosmotický jev v porézním materiálu [62, 63] nebo kapilárách [64] k vyvolání proudění kapaliny. Mobilní fáze může být poháněna i stlačeným plynem z tlakové lahve. Tato „pumpa“ pak nepotřebuje ke svému provozu elektrický proud. Uvedený systém představili S. Chatzimichail a kol. [65]. Zařízení má hmotnost okolo čtyř kilogramů, mobilní fáze je dopravována tlakem dusíku z malé tlakové lahve, využívané jako zdroj energie pro vzduchovky nebo paintballové markery.

Vývoj chromatografických kolon také směřuje k menší průměrům, až do podoby kapilár. Stejným směrem se ubírá vývoj náplňové stacionární fáze, kdy velikost zrn se rovněž snižuje. Přínosem tohoto trendu je menší spotřeba mobilní fáze a vyšší účinnost kolon, ovšem za cenu rostoucího hydraulického odporu kolony. Řešením jak snížit provozní tlak a přitom zachovat účinnost separace je použití kolon s monolitickou náplní [66]. Obdobné techniky tvorby stacionární fáze jsou použitelné i v mikrofluidních zařízeních [67, 68].

Co se detekce týče, mají dominantní postavení optické detektory a hmotnostní spektrometry, není výjimkou jejich tandemové spojení. Běžnou součástí každého kapalinového chromatografu je fotometrický detektor, často ve vícekanálovém provedení nebo ještě lépe, se senzorem typu fotodiodového pole. Použití refraktometrických a fluorimetrických detektorů, přestože první z nich je univerzální a druhý jmenovaný vyniká vysokou citlivostí na úzký okruh analytů, je méně běžné. Hmotnostní detektory disponují dobrou citlivostí, jsou univerzální a mohou přispět k určení struktury neznámého analytu, to vše je ale vykoupeno vysokými pořizovacími a provozními náklady.

Naproti tomu elektrochemická detekce může, v ideálním případě, dosáhnout citlivosti srovnatelné s fluorimetrickou detekcí. Látek obsahujících elektroaktivní funkční skupinu je

poměrně velké množství, případně lze detekovat jinak obtížně detekovatelné látky, typicky sacharidy. Nezanedbatelnou výhodou elektrochemických detektorů je nízká pořizovací cena, srovnatelná s optickými detektory, a malé náklady na provoz a údržbu. Z elektroanalytických metod, které mohou být uplatněny při provozu elektrochemického detektoru je nejčastější měření za konstantního potenciálu. Podle provedení pracovní elektrody v detektoru pak rozlišujeme amperometrickou a coulometrickou detekci. Amperometrické cely dosahují malé faradaické účinnosti (zpravidla do 5%), ale k dispozici je větší výběr elektrodových materiálů, jako jsou různé kovy, skelný uhlík nebo borem dopovaný diamant. Pracovní elektrodou coulometrické cely je nejčastěji porézní uhlíková elektroda. Velký povrch elektrody umožňuje dosahovat faradaické účinnosti blíží se 100 %.

Některé modely coulometrických cel obsahují více elektrod, nebo je možné cely řadit do série [69]. Takové zařízení přináší hned několik výhod. Vložním postupně rostoucího potenciálu na jednotlivé elektrody můžeme získat elektrochemické „spektrum“ a rozlišit tak koeluující látky. Pokud má sledovaná látka dobrou reverzibilitu elektrodového děje, můžeme ji na jedné elektrodě oxidovat a na další opět redukovat, nebo obráceně. Takto je možné vylepšit citlivost a selektivitu stanovení. Tak jako každá technika, ani elektrochemická detekce nemá jen výhody. Velkým potenciálním problémem je znečištění povrchu elektrod [70]. Zdrojem znečištění bývá sorpce některých látek, jako jsou proteiny, nebo produkty elektrodové reakce, např. při oxidaci fenolických látek vznikají radikálové meziprodukty které se následně spojují do polymerních struktur [71-73]. Ze způsobů, jak reaktivovat elektrodu uvedme vhodný potenciálový program, který může vytvořený pasivující film opět narušit. Elektrody z kovu a skelného uhlíku mohou být reaktivovány leštěním. V případě coulometrických cel není vzhledem ke struktuře elektrody leštění možné. Je potřeba mít na zřeteli, že porézní elektroda se chová jako dobrý filtr, je proto nezbytné vyvarovat se jakéhokoliv mechanického znečištění mobilní fáze. Mezi celou a kolonu by měl být vložen filtr, protože zdrojem znečištění mohou být i částičky stacionární fáze.

Byť elektrochemické detektory nabízí nesporné výhody, je nepravděpodobné, že by v rutinní analytické praxi ohrozily postavení optických a hmotnostních detektorů. Nicméně existuje oblast, kde jsou nenahraditelné, a tou jsou právě miniaturizovaná zařízení.

Přestože v miniaturizovaných zařízeních padá první volba na fotometrickou detekci s použitím LED [74, 75], tento typ detekce trpí výrazným nedostatkem a tím je pokles citlivosti s klesajícími rozměry detekční cely. Elektrochemická detekce tento problém nemá a stále je

relativně technicky nenáročná. Příkladem uplatnění elektrochemické detekce může být zařízení od A. Ishidy a kol. [76]. Jde o kompletní miniaturní chromatografické zařízení kombinující elektroosmotickou a membránovou pumpu, mikrofluidní čipovou kolonu a elektrochemický detektor.

2.4.2 Elektrochemická detekce v kapilární elektroforéze

Na základě předchozí kapitoly můžeme nabýt dojmu, že miniaturizace kapalinové chromatografie bojuje s překážkami hlavně na straně uvedení mobilní fáze do pohybu a plnění kolon, zatímco koncovka v podobě jednoduchých detektorů je již snadná.

Pokud se podíváme na kapilární elektroforézu, mohlo by se zdát, že realizace techniky snad nemůže být jednodušší. Nepotřebuje přesná čerpadla ani sofistikované sorbenty pro stacionární fázi a přesto má dobré separační schopnosti. Stejný pohled můžeme mít na elektrochemickou detekci v kapilární elektroforéze, a hlavně v mikrofluidních elektroforetických zařízeních. Přináší dobrou citlivost, která není snižována nepatrným průsvitem mikrofluidních kanálků. Spolu s existencí mikroelektrod a malých potenciostatů se tato cesta přímo nabízí ke konstrukci „laboratoře na čipu“. Přehledový článek na téma elektrochemie a mikroelektroforetická zařízení je k dispozici od J. Wanga [4].

Ve skutečnosti je realizace takového zařízení poněkud ztížena velmi rozdílnými elektrickými poměry při separaci látek a při jejich detekci. Na straně separace se běžně pracuje s napětím o velikosti jednotek až desítek kilovoltů, při detekci pak v případě amperometrie okolo jednotek voltu a méně. Jsou dva významné směry, jak vliv separačního pole omezit. V případě CE na čipu se využilo skokového rozšíření separačního kanálku těsně před měřicí elektrodou, např. z 50 na 1000 μm [77, 78]. Úměrně tomu klesne elektrický odpor kanálku a s tím je spojený i prudký pokles síly elektrického pole. Stejný princip, ale s extrémně úzkou křemennou kapilárou (2 μm) použili S. Sloss a A. Ewing [79]. V tomto případě byl konec kapiláry vyleptán fluorovodíkem do kuželovitého tvaru a do něj vložena uhlíková vláknová elektroda. V poněkud odlišném přístupu byla detekční elektroda vsunuta do návleku z Nafionu, který je propustný pro některé ionty. Tento návlek byl nasazen na konec separační kapiláry a sloužil k uzemnění separačního napětí [80]. Uspořádání kdy je detekční elektroda na konci separačního kanálku se v anglické literatuře označuje jako „end-column/capillary/channel detection“.

Druhá možnost, detekce v kanálku, tzv. „on-column/capillary/channel detection“, staví na nějaké formě uzemnění separačního pole ještě před detekční elektrodou (metoda

„decoupling/decoupler“). Řešení má několik variant a dva problémy, které je potřeba mít na paměti. V místě uzemnění je nulové elektrické pole, to znamená že pohyb iontů se zde zastavuje. Aby se analyt dostal dále, je nezbytné mít dostatečně silný elektroosmotický tok. Některá praktická provedení mají uzemnění vně separačního kanálku a analyt je tedy tažen gradientem elektrického pole mimo oblast detekce. Byla testována řada způsobů, jak uzemnění provést. Na čipové elektroforéze může být zemnicí elektroda zabudována přímo do kanálku a teprve dále po proudu za ní je umístěna detekční elektroda [81]. Pokud pracujeme s křemennými kapilárami, může tato být přerušena a přemostěna membránou typu Nafion nebo porézním sklem. Trhliny lze vytvořit též zlomením, nebo tepelným šokem a opět použít vhodnou krycí vrstvu. Technika laserové ablace je použitelná pro vyvrtání velice jemných děr jak do křemenných kapilár, tak i do stěny kanálku čipové elektroforézy [82]. Přehledový článek, zabývající se elektrochemickou detekcí v klasické kapilární elektroforéze, napsal FM. Matysik [83]. Článek z oblasti spojení elektroforézy na mikročipu s elektrochemickou detekcí je dostupný od autorského kolektivu B. Costy [84].

2.4.3 Mikrodialýza a její přímé spojení s amperometrickou detekcí

Dialýza obecně je děj, kdy dochází k prostupu látky přes membránu. Hnací silou je rozdílná koncentrace této látky na obou stranách membrány, uplatňuje se tedy difúze a osmóza. Zásadní vlastností membrány je schopnost propouštět pouze některé látky, obvykle na základě velikosti molekul. Membrána je pak definovaná mezní molekulovou hmotností látky, která může volně procházet. Používá se anglický termín „cut-off“, je uváděn zpravidla v kiloDaltonech (kDa), a má souvislost s porozitou membrány [85]. Je však potřeba pamatovat, že mezní hodnota není striktně nepropustná hranice pro větší molekuly a naopak volně propustná pro molekuly menší. V zásadě lze tvrdit, že molekuly mnohem menší než mezní hodnota budou membránou procházet výrazně rychleji, než ty, které jsou svou velikostí poblíž, nebo nad tuto hodnotu. Prakticky se používají hlavně synteticky připravené membrány z materiálů jako jsou regenerovaná celulóza (celofán), polysulfon, polyethersulfon nebo polykarbonát a mnohé další [86, 87].

Příkladem využití dialýzy je vyčištění proteinů od nízkomolekulárních látek, obvykle solí. V tomto případě se roztok obsahující znečištěný protein naplní do tzv. dialyzačního sáčku zhotoveného třeba z celofánu a ponoří se do čistého rozpouštědla. Po ustálení rovnováhy je koncentrace nízkomolekulárních látek v roztoku proteinu daleko nižší. S výhodou lze postupovat i obráceně a vyčistit vzorek od větších molekul, které mohou komplikovat požadovanou analýzu.

Druhého principu využívá mikrodialyzační sonda. Sondu tvoří dvě kapiláry, pro vstup čistého roztoku (perfuzát) a výstup roztoku obohaceného o další látky (dialyzát). Tyto kapiláry vedou do trubičkové polopropustné membrány, která je aktivní částí sondy. Sonda pracuje s velmi malými průtoky perfuzní kapaliny (v oblasti 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a méně). Nalezení ideální průtokové rychlosti komplikuje zvláštní chování mikrodialýzy. Větší průtoková rychlost poskytne za daný časový interval větší absolutní výtěžek mikrodialýzy, ale koncentrace látek v dialyzátu (relativní výtěžek) bude nižší [88]. Abychom se dopracovali požadovaného výtěžku, musíme uvážit dva jevy, související s rychlostí proudění perfuzní kapaliny. Prvním z nich je větší koncentrační spád mezi vnitřní a vnější stranou membrány, vyvolaný rychlejším prouděním perfuzního roztoku, což by mělo urychlit přenos látek skrz membránu. Druhý jev souvisí s tím, že rychlost prostupu žádaných látek membránou má svůj limit. Pokud tedy bude průtok perfuzní kapaliny příliš velký, nemusí být ustalování koncentrační rovnováhy mezi oběma stranami membrány dostatečně rychlé. Výsledkem je naředění dialyzovaných látek velkým objemem proteklé perfuzní kapaliny.

Aktivní část sondy může být poměrně malá, méně jak milimetr v průměru a centimetr délky. Nalezla proto uplatnění v medicinském výzkumu, jako miniinvazivní metoda pro dlouhodobé sbírání vzorků přímo z živé tkáně [89]. Mezi sledované látky patří neurotransmitery nebo molekuly zprostředkující přenos energie, léčiva nebo antioxidanty. Mikrodialýza má uplatnění i mimo živé tkáně, skupina G. Bazzu a kol. [90] použila mikrodialýzu k extrakci fenolických látek z olivového oleje. Naměřené koncentrace fenolických látek získaných dialýzou, byly v dobré shodě s výtěžkem obvyklé extrakce kapalina-kapalina.

Se získaným dialyzátem lze naložit dvojím způsobem. Buď jej jímat a dále analyzovat např. pomocí HPLC [91], CE [92], nebo je možné provádět detekci přímo na výstupu ze sondy, pokud není potřeba látky obsažené v dialyzátu dále separovat. Tento druhý způsob byl využit k amperometrické detekci dopaminu produkovaného buněčnou kulturou PC12 [93]. Mikrodialýza je ve spojení s elektrochemií užitečná pro svou schopnost zadržet některé biomolekuly (proteiny, lipidy), které by jinak svou sorpcí na povrch elektrody velmi rychle znehodnotily její citlivost [70, 94].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

3.1.1 Použité chemikálie a materiál

Detaily složení a přípravy roztoků a vzorků jsou součástí příslušných oddílů v kapitole 4.

Pokud není uvedeno jinak, byly chemikálie získány od společnosti Sigma-Aldrich (Německo). Kyselina gallová, kyselina ferrulová, kyselina boritá, kyselina mravenčí, kyselina askorbová, kyselina močová, paracetamol, amoniak, kyselina fosforečná (puriss), hydrogenfosforečnan draselný (TraceSelect, Honeywell Fluka, Švýcarsko), difenylpikrylhydrazil, D-glukosa (Penta, Česká republika). Methanol, acetonitril, voda (vše gradientová čistota, VWR Chemicals, Francie), lyofilizované kontrolní sérum (BCS) (BioSystems, Španělsko)

Antipsychotické substance: Kvetiapin hemifumarát, olanzapin, clozapin, flufenazin hydrochlorid, promazin hydrochloride, promethazin hydrochlorid, levomepromazine hydrochlorid, chlorpromazin hydrochlorid, thioridazine hydrochlorid

Piva: Corona Extra (Modelo Brewery, Mexico City, Mexiko), Leffe Blonde (Anheuser-Busch InBev, Leuven, Belgie), Stella Artois (Anheuser-Busch InBev, Leuven, Belgie), Heineken lager (Heineken group, Zoeterwoude, Nizozemsko), Rastinger (Pivovar Nymburk, Tesco Brewing Group, Česká republika), Radegast (Pivovar Radegast, Nošovice, Česká republika), Budweiser Budvar (Budějovický Budvar, a.s., České Budějovice, Česká republika), Pilsner Urquell (Plzeňský Prazdroj, a.s., Plzeň, Česká republika), piva byla koupena v místních prodejnách potravin nebo ve specializovaných prodejnách.

Materiál pro výrobu elektrod: Epoxidová lepidla EC101 (Polytec, Německo) a L285 (Havel Composites, Česká republika), polyakrylonitrilová uhlíková tkanina (Havel Composites, Česká republika), hematologické kapiláry (Keraglass, Česká republika), grafitové tuhy AinStein 0,2 mm B (Pentel Ltd., Japonsko) a Tombow Polymer 0,5 mm HB (Japonsko), drát Ni (99,99 %) a Cu/Ni (55/45 %, m/m) (Alfa Aesar, Německo)

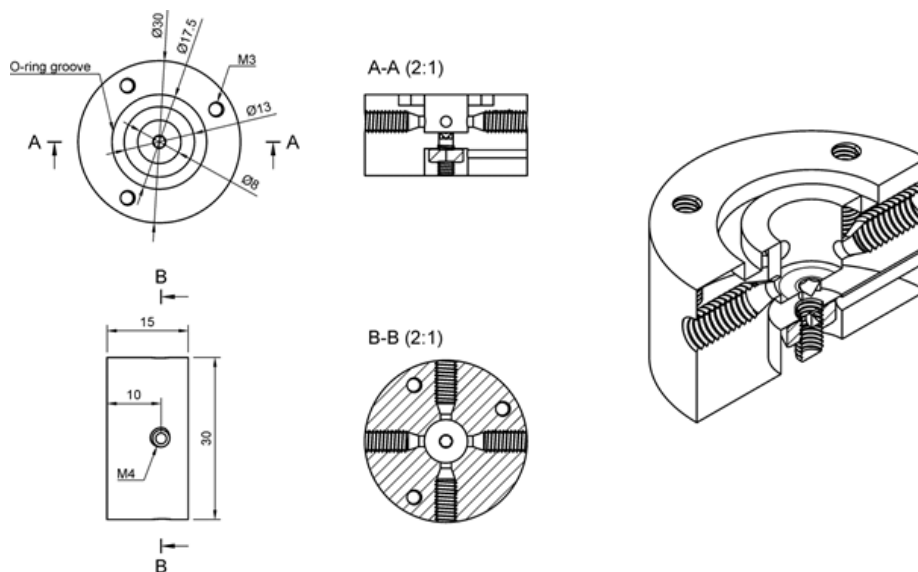
Další materiál: křemenné kapiláry vnitřního průměru 50 μm a 200 μm (Polymicro Technologies, USA), mikrodialyzační sonda MAB 11.8.10, 6 kDa (Microbiotech/se AB Stockholm, Švédsko)

3.1.2 Přístrojové vybavení

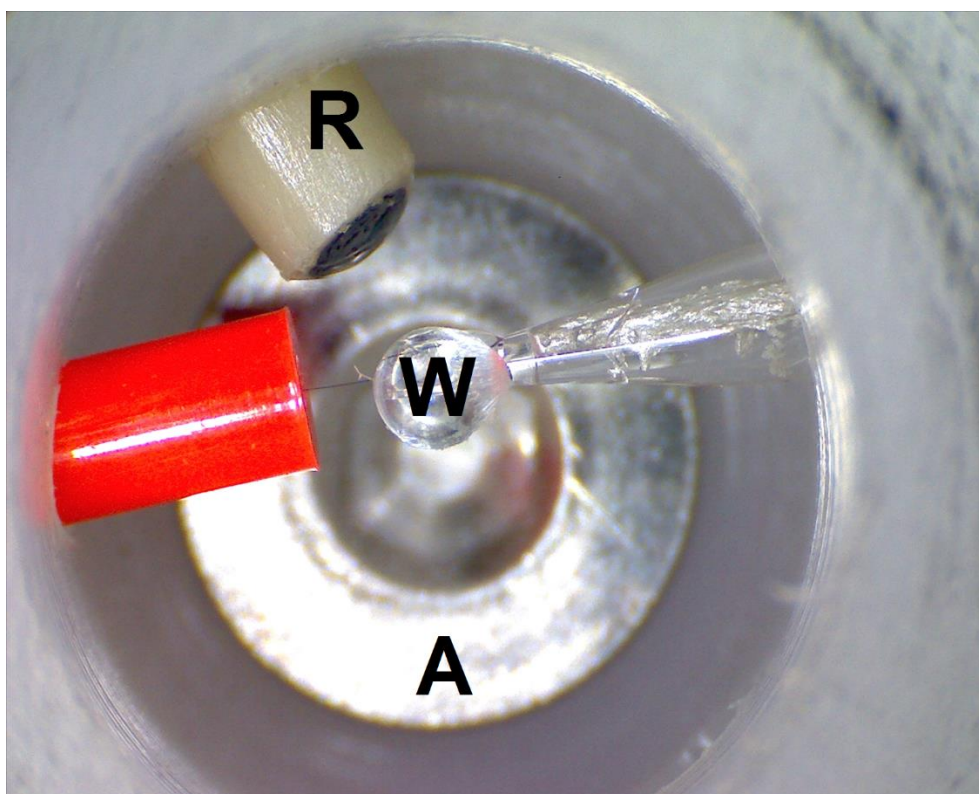
VN zdroj napětí pro elektroforézu CZE1000R (Spellman, USA), zařízení na tažení skleněných kapilár Narishige PC10 (Japonsko), laboratorní zdroj napětí NRP-3630 (Manson, Hongkong), skenovací elektronový mikroskop Vega 3 (Tescan, Česká republika), EDX modul pro SEM – Quantax EasyEDS (Bruker, USA), mikroskop se skenující sondou Dimension Icon AFM (Bruker, USA), rentgenový fotoelektronový spektrometr PHI VersaProbe II XPS (Physical Electronics, USA), UV/VIS Spektrometr Genesis 180 (Thermo Scientific, USA), stříkačková pumpa Labflow S300 (Trystom, Česká republika), potenciostat Nanoampere1 L-Chem (Česká republika), potenciostat ESA Coulochem III (USA), amperometrická cela model 5040, skelný uhlík (ESA, USA), sestava HPLC LC10 (Shimadzu, Japonsko), referenční elektroda LF2 (Innovative Instruments Inc., USA). Další vybavení jako je VN zdroj napětí pro jiskrový výboj, potenciostat pro amperometrii při kapilární elektroforéze a poziční zařízení pro mikrodialýzu s amperometrickou detekcí, včetně doprovodné elektroniky sestrojil prof. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

3.1.3 Konstrukce průtočné elektrochemické cely

Pro všechna elektrochemická měření, která jsou představena v této práci a byla prováděna v průtočných systémech, byla jako detekční systém využita průtočná cela vlastní výroby. Základem detekční cely byl nylonový blok s vyvrtaným měřicím prostorem o objemu asi 300 μ l. K připojení dalšího příslušenství, jako jsou přívodní a odpadní trubice a držáky referenční a pracovní elektrody jsou po stranách bloku vyvrtány otvory, které jsou opatřeny závitem na standardní PEEK šroubení používané v HPLC. Otvory jsou orientovány tak, aby byly vždy dva přesně naproti sobě. Pomocnou elektrodou je nerezový šroub na dně nylonového bloku. Blok je shora uzavřen nylonovým, nebo průhledným polyakrylátovým víčkem. Na Obr. 3 je k vidění podrobné schéma průtočné cely. Více podrobností a původní technický výkres cely je k nalezení v práci D. Rimana a kol [52]. Obr. 4 ukazuje rozmístění vnitřních komponent pro měření s vláknovou mikroelektrodou. Takto sestrojená cela našla široké uplatnění, jak v průtoku (HPLC, CE, mikrodialýza), tak ve stacionárním roztoku, pokud je potřeba elektrochemická studie malého množství vzorku (asi 250-350 μ l). V tomto případě není elektroda vsunuta do kapiláry, ale pouze uchycena v cele a otvory pro přívodní a odpadní kapiláru zaslepeny.



Obr. 3: Detailní technický náčrt elektrochemické průtočné cely. Převzato z přílohy článku D. Rimana a kol. [52].



Obr. 4: Vnitřní uspořádání elektrochemické cely s vláknovou mikroelektrodou. Červená kapilára přivádí eluát z HPLC kolony. Do kapiláry je vsunuto vlákno pracovní elektrody **W**. Dále cela obsahuje referenční elektrodu **R** a kovové dno tvoří pomocnou elektrodu **A**.

3.2 Výroba a úpravy uhlíkové vláknové elektrody

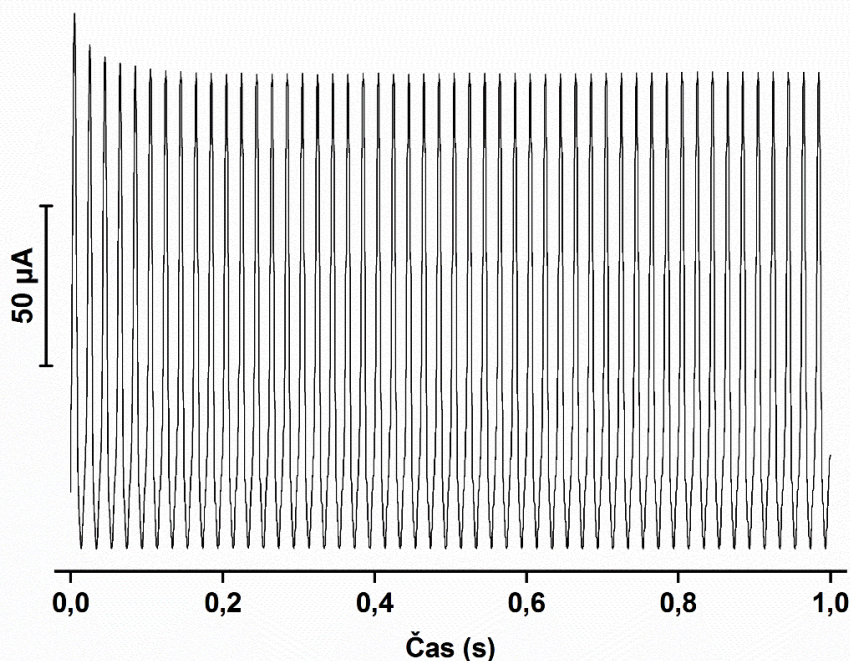
3.2.1 Výroba elektrody

Základem mikroelektrody je uhlíkové mikrovláknó získané rozdělením komerčně dostupné uhlíkové tkaniny na jednotlivá vlákna. Tato vlákna mají průměr okolo 10 μm . Prekurzorem uhlíkového vlákna je v tom případě vlákno z polyakrylonitrilu. Nachystaná vlákna jsou zkrácena na asi centimetrové úseky. Přívodní kontakt je zhotoven z měděného drátu o průměru asi 0,1 mm. Vlákno je přilepeno k drátu pomocí stříbrem plněné epoxidové pryskyřice, místo kontaktu musí být dobře zbaveno mastnoty a oxidace. Za tímto účelem se osvědčilo zahřátí měděných drátů do červeného žáru a okamžité schlazení v ethanolu, takto získáme čerstvý měděný povrch. Epoxid se vytvrzuje po dobu jedné hodiny při teplotě 120 °C. Aby se zajistil styk analyzované látky pouze s uhlíkovým vláknem a dodala se elektrodě mechanická ochrana, je sestava drát–vlákno vložena do skleněné kapiláry, která je na jednom konci vytažena do úzké špičky. Tímto zúžením je vlákno vyvedeno ven a utěsněno nízkoviskózní epoxidovou pryskyřicí L285 a stejně tak se utěsní zadní strana kapiláry, pro ochranu spoje vlákno–stříbro–měď před vlhkostí a případnou korozí. Epoxid vytvrzne za pokojové teploty během 24 hodin, nebo lze tvrdnutí urychlit zvýšením teploty na 60 °C. V tomto případě ale nemůžeme zalepit oba konce současně, protože rozpínající se vzduch uvnitř kapiláry by vytlačil lepidlo ven. Při lepení zúženého konce kapiláry může dojít k tomu, že kapilární síly nasají lepidlo a v okolí vlákna zůstane prohlubeň, ta může zapříčinit rozkmitání vlákna pokud by protékající měřená kapalina začala v prohlubni vířit. Tento jev se projeví zvýšeným šumem měřeného signálu. Abychom tomuto zabránili, je vhodné na vytvrzenou pryskyřici nanést ještě jednu malou kapku, která vytvoří na špičce kapiláry kuličku. Posledním krokem přípravy je odmaštění vlákna krátkým ponořením např. do dichlormethanu v ultrazvukové lázni a zkrácení vlákna na potřebnou délku.

3.2.2 Elektrochemická aktivace a čištění vlákna

Takto zhotovená elektroda je použitelná pro měření, avšak je vhodné provést dodatečné úpravy pro zlepšení elektrochemických vlastností. V této práci bylo využito zkrácené varianty elektrochemické aktivace („pretreatment“) podle V. Halouzky a kol. [17]. Byl zachován základní program cyklování potenciálu mezi 0 V a 2,9 V s frekvencí 50 Hz se sinusovým průběhem po dobu 1 s a následně dva kondičionální kroky o stálém potenciálu -0,8 V a 1,5 V, každý po dobu 5 s. Jde prakticky o jeden z mála způsobů čištění vláknové mikroelektrody. Průběh proudu může být během procedury monitorován, typický záznam je ukázán na Obr. 5.

V průběhu procedury dochází k odstranění tenké vrstvy materiálu vlákna, což postupně vede k jeho ztenčování. Po provedení řádově desítek čistících kroků je elektroda znehodnocena.

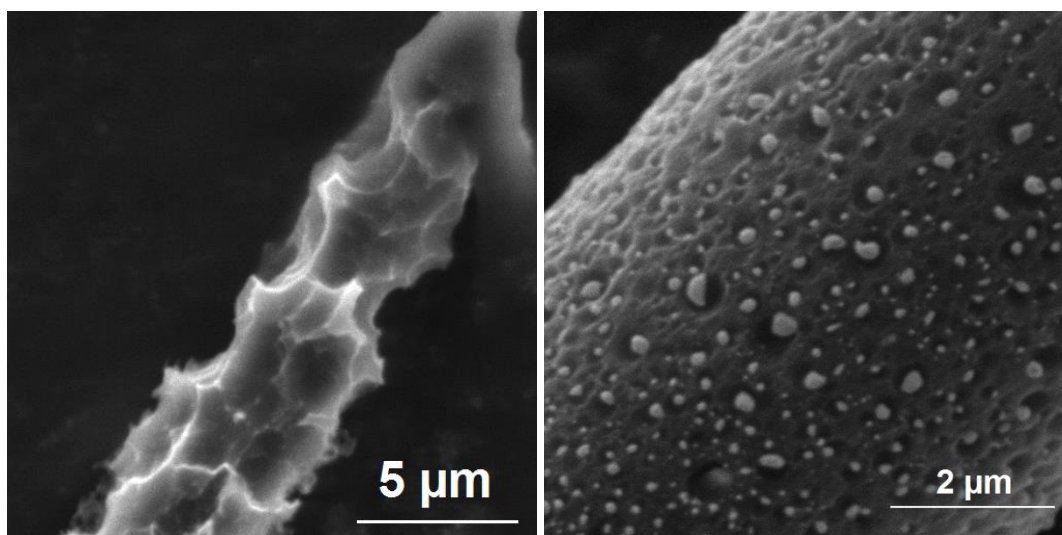


Obr. 5: Průběh proudu při „pretreatmentu“ uhlíkového vlákna.

3.2.3 Aktivace a pokovení vlákna jiskrovým výbojem

Další použitá modifikace elektrody je její eroze pomocí jiskrového výboje. Při vhodné konstrukci napájecího zdroje je jinak krátkodobý výboj generován s vysokou frekvencí a teplota jisker dosahuje až několik tisíc Kelvinů. Z uvedeného vyplývá, že takto provedený jiskrový výboj má dostatečnou energii k odpaření materiálu elektrod a tím dojde k vytvoření oblaku aerosolu [95]. Tento jev má široké uplatnění ve strojírenství při tzv. elektroerozivním obrábění jinak obtížně opracovatelných materiálů s vysokou přesností [96]. Pro účely úpravy vláknové elektrody byla metoda původně použita k zahrocení vlákna pro aplikace, kdy je potřeba měřit přímo v živé. Jiskrový výboj přeskakoval mezi uhlíkovým vláknem a wolframovým hrotem umístěným kolmo na vlákno. V případě, že bychom se chtěli vyvarovat kontaminace uhlíkového vlákna kovovým materiálem, dalo by se očekávat, že pokud připojíme uhlíkovou elektrodu ke kladnému pólu zdroje, mělo by docházet k tomu, že kladný náboj elektrody bude odpuzovat kationty kovu z protielektrody. Na toto upozorňují autoři původní metody [19].

Nicméně k přenosu materiálu elektrody dochází spíše opačným směrem. Při výboji je totiž ionizován vzduch (kyslík, dusík) a vzniklé kladně nabitě částice bombardují povrch elektrody, která je připojena k zápornému pólu zdroje vysokého napětí. To vede k erozi uvedené elektrody a uvolněný materiál se po ochlazení usazuje na elektrodě připojené ke kladnému pólu, často ve formě nanočástic (je-li jiskrový výboj prováděn na vzduchu, může být materiál oxidován) [97]. Jak dokládá Obr. 6, snímky ze SEM potvrzují, že při kladné polaritě vlákna dochází k mírné erozi uhlíku a depozici nanočástic kovu v tomto případě platiny. Záporná polarita pak způsobuje silnou erozi vlákna a minimální výskyt částic kovu. Ukázalo se však, že přítomnost kovových částic nemusí být na závadu a naopak může výrazně zlepšit vlastnosti elektrody, např. katalýzou elektrochemických dějů nebo k ovlivnění selektivity elektrody. Jev byl uplatněn k pokovení uhlíkových tištěných elektrod bismutem [98], dále zkoumán i v případě vláknových elektrod [99].



Obr. 6: SEM snímek jiskrou upraveného vlákna. Jiskrový výboj byl prováděn při napětí 1,2 kV proti Pt elektrodě. Výsledná podoba vlákna se liší podle použité polarity vloženého napětí. Vlevo: elektroda připojena na minus pól, vpravo: plus pól zdroje vysokého napětí.

Praktické provedení je následující: Elektrodu připojíme k měkkému zdroji napětí a polaritu zvolíme podle požadovaného účinku. Pokud nebude uvedeno jinak, byla použita plus polarita na vlákno. Jako protielektroda slouží vyčištěný kousek wolframu. Napětí je nastaveno na 800 V a při přiblížení obou elektrod dojde k přeskočení jiskrového výboje. V případě, že je zdroj dodává příliš velký proud, může se stát, že se vlákno může ohřát do červeného žáru, případně okamžitě shořet. Výkon zdroje se dá naladit vložením vhodného rezistoru do série s vláknovou

elektrodou. Výsledné elektrody byly v rámci této práce použity všude, kde se hovoří o vláknové elektrodě a není uveden jiný způsob úpravy.

3.2.4 Pokovení vlákna mokrou cestou

Jiným zkoumaným způsobem nanesení kovu na povrch elektrody je mezielektrodotový přenos materiálu. Metoda byla dříve použita k depozici částic stříbra [100] nebo mědi [101]. Při tomto procesu dochází k anodické oxidaci materiálu kovu v tomto případě mědi nebo slitiny mědi a niklu (55/45), přenosu vzniklých kationtů na povrch katody, kterou je uhlíkové vlákno, a jejich opětovné redukci. Vložené napětí je okolo 20 V po dobu 30 minut. Protože použitý „elektrolyt“ je velmi čistá voda, je koncentrace iontů uvolňovaných z kovu velmi malá. To vede k přednostní nukleaci nových částic na úkor růstu stávajících. Situace se však zcela změní po delší době působení napětí. Začne docházet k tvorbě celistvé vrstvy, která již nemá charakter kovu s malým množstvím oxidovaných forem. Podíl oxidové a hydroxidové podoby vrstvy a její tloušťka v čase narůstá. Předpokládá se, že toto je způsobeno změnou mechanismu vzniku vrstvy, z redukce kovových iontů na povrchu katody na elektroforetický přenos větších částic materiálu anody a jejich opětovné usazení na katodě. Tyto oxidované vrstvy, pokud byly tvořeny oxidy a hydroxidy niklu a mědi, se ukázaly jako velmi vhodné pro oxidaci glukosy v alkalických roztocích a tedy umožňují konstrukci miniaturního glukosového senzoru.

3.3 Sestavení cely s mikrotuhovou elektrodou

Zde použité elektrody vycházely z mikrotuhy Pentel AinStein o nejmenším dostupném průměru, tedy 0,2 mm a tvrdostní třídy B. Tato malá velikost byla zvolena, protože bylo potřeba elektrodu vsunout přímo do výstupní kapiláry chromatografu, aby se co nejvíce omezilo rozmytí zón vycházejících z kolony.

Přestože je uváděný průměr tuhy 0,2 mm, není možné ji rovnou vsunout do modré PEEK kapiláry (0,254 mm). Změřený průměr tuhy je $0,26 \pm 0,01$ mm. Řešením je ruční převrtání kapiláry na mírně větší průměr. Jako vhodný nástroj se nabízel karbidový mikrovrtáček 0,3 mm. Při ručním vrtání se dá jen obtížně zabránit bočnímu namáhání a křehký karbidový materiál se při tomto zatížení snadno zlomí. Výbornou alternativou se stala insulinová stříkačka (Omnican 100, B. Braun) s jehlou o vnějším průměru asi 0,33 mm [52]. Při vrtání bylo potřeba mít kapiláru připojenou k HPLC pumpě a udržovat stálý tok vody, aby se odplavovaly odvrtné pilinky, jinak dochází k ucpání kapiláry na čele vývrtu. Takto upravená kapilára je přišroubovaná k detekční cele a vloží se do ní tuha tak, aby procházela celou a ven protějším

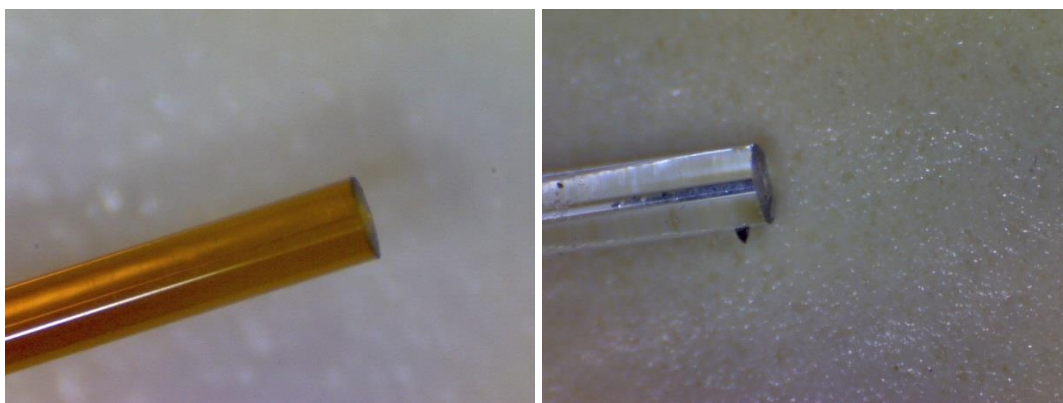
otvorem. Na tuhu se nasune PEEK šroubení s měkkou silikonovou hadičkou a zašroubuje se k bločku cely. Přestože výrobce slibuje zvláště odolnou strukturu tuhy, díky přítomnosti křemíkatého skeletu, je stále poměrně křehká a při zasouvání do kapiláry a utažení šroubení je potřeba si počínat velmi opatrně. Ze stejného důvodu není možné připojit na tuhu běžnou krokosvorku a elektrický kontakt s potenciostatem je proveden nasunutím „štětečku“ jemných měděných drátků z rozpleteného kabelu. Sestava tuha-kapilára v tomto provedení umožňuje kontakt tuhy s eluátem nejenom uvnitř kapiláry, ale i ve zbylém prostoru cely a tím nepříznivě ovlivnit tvar píku (chvostování). Dá se předpokládat, že dojde k velkému rozptýlení zóny analytu po opuštění kapiláry a tím pádem zanedbatelnému vlivu na měřený signál, ale i přesto je vhodné část tuhy mimo kapiláru izolovat. Jednoduchým způsobem je použití delší silikonové trubičky, upevňující tuhu ve šroubení, tak aby zasahovala až dovnitř cely, téměř k ústí přívodní kapiláry. Důkladnější, ale pracnější postup je pokrytí části tuhy elektroforeticky naneseným filmem, technikou zvanou e-coating a běžně používanou ve šperkařství, např. KLIAR-CB (Legor Group). Pro malé rozměry cely je nezbytné použít i miniaturizované Ag/AgCl referenční elektrody jako je Leak-Free LF2 (Innovative instruments Inc, USA) nebo domácí konstrukce s využitím pipetové špičky.

3.4 Sestava kapilární elektroforézy s amperometrickou detekcí

Pro elektroforetické experimenty byla zvolena křemenná kapilára s polyimidovým potahem o vnitřním průměru 50 μm , vnějším 363 μm a délky 25 cm. Tato délka byla zvolena pro snadné srovnání dosažených migračních časů s kapilární elektroforézou Agilent G1600 a odpovídá nejkratší možné efektivní délce kapiláry (minimální celkové délka kapiláry asi 33 cm) pro tento přístroj.

Abychom omezili deformace zón analytu a pro usnadnění instalace mikroelektrody, je žádoucí mít konce kapiláry zarovnané. Toho lze dosáhnout odřezáním konce kapiláry speciálním diamantovým řezákem. Protože jsou tyto nástroje poměrně drahé, bylo vyzkoušeno zabroušení konce kapiláry jemným brusným papírem (P800). Postup je následující: Konec kapiláry určený k obroušení je vsunut do 3 cm dlouhé teflonové hadičky tak, aby asi 1 cm kapiláry vyčníval ven. Poté je hadička vsunuta do běžného PEEK šroubu pro HPLC kapiláry o vnějším průměru 1/16 palce. Šroub nám umožní pohodlné držení kapiláry mezi prsty. Opačný konec kapiláry je jinou hadičkou spojen s inzulinovou stříkačkou, která je umístěna v pružinové pumpě a tak zajišťuje průtok směsi vody a methanolu kapilárou. Během broušení je nezbytné

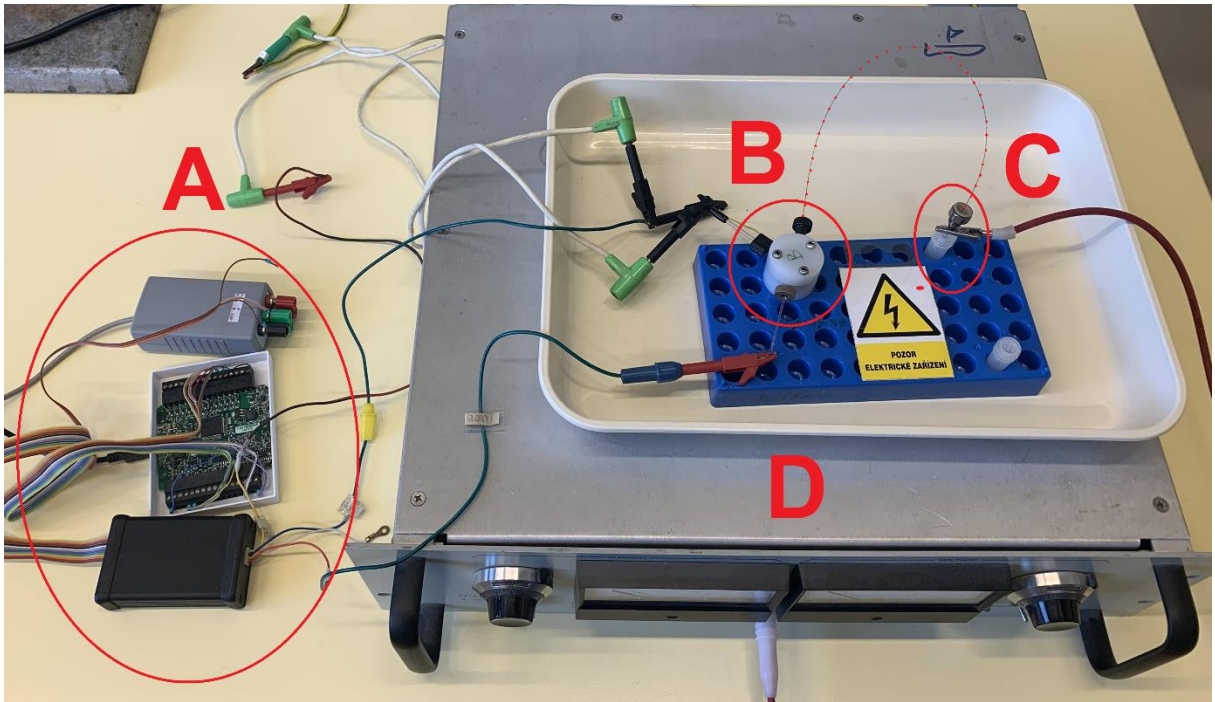
zajistit stálý průtok kapaliny, jinak dojde k ucpání kapiláry uvolněným abrazivem, viz Obr. 7. Při broušení může dojít k nežádoucímu vyštípnutí kapiláry. Tomuto problému zamezíme, pokud na kapiláře ponecháme polyimidový povlak. Práce se kontroluje pomocí mikroskopu. Postup se doporučuje provést i u druhého konce kapiláry. Po vysušení kapiláry proudem vzduchu se z jejích konců odstraní několik milimetrů polyimidového potahu opálením ve speciálním přístroji (Window Maker). Kapilára se upevní do měřicí cely pomocí stejného šroubu s hadičkou, ve kterém byla uchycena při broušení. Nyní je možné do kapiláry vsunout vláknovou mikroelektrodu.



Obr. 7: Vlevo: kapilára po ručním zabroušení konce brusným papírem. Vpravo: Nevhodně opracovaná kapilára, kde došlo k ucpání částicemi brusného materiálu.

Před vlastním měřením je potřeba kapiláru promýt roztokem NaOH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 5 min. a poté vodou a základním elektrolytem. Promývání základním elektrolytem je vhodné provádět po dobu alespoň 10 min. K promývání můžeme použít stříkačky typu Hamilton nebo insulinové stříkačky, nejlépe s využitím pružinové nebo elektrické stříkačkové pumpy. Dávkování vzorku bylo prováděno elektrokineticky. Elektrický kontakt separačního napětí na vstupní straně kapiláry poskytuje platinová elektroda z přístroje Agilent G1600, na výstupní straně nerezový šroub, který je součástí měřicí cely. Sestavená aparatura je k vidění na Obr. 8.

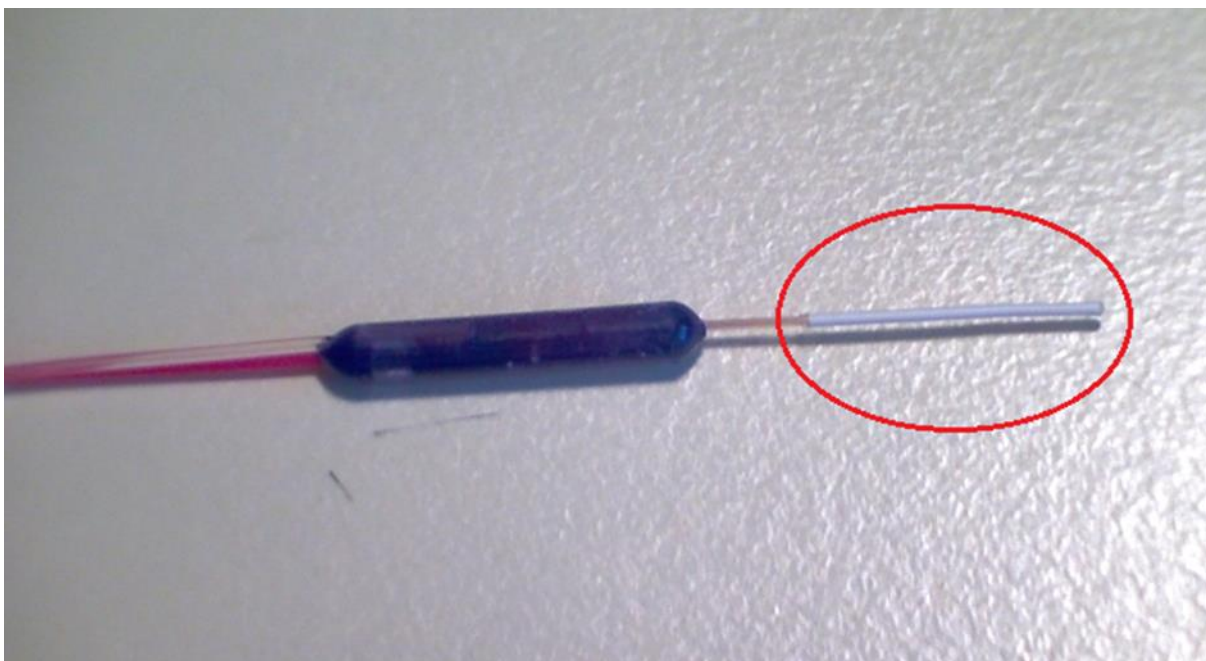
Pro ověření funkce separační části sestavy byla použita fluorescenční barviva fluorescein a rhodamin B. Měřicí cely je otevřena a výstup z kapiláry je osvětlen ultrafialovou výbojkou nebo LED a pozorován vizuálně nebo s pomocí USB mikroskopu.



*Obr. 8: Aparatura pro kapilární elektroforézu s amperometrickou detekcí je tvořena elektronikou potenciostatu **A**. Cíla detektoru **B** je spojena separační kapilárou (vyznačena tečkovaně) s vialkou obsahující základní elektrolyt a elektrodu přivádějící separační napětí **C**, které dodává nastavitelný zdroj vysokého napětí **D**.*

3.5 Sestava pro automatizovanou mikrodialýzu s amperometrickou detekcí

Základem automatizované mikrodialyzační aparatury je poziční zařízení [102], které zajišťuje vzájemný pohyb mikrotitrační destičky a mikrodialyzační sondy. Detailní fotografie sondy je na Obr. 9.

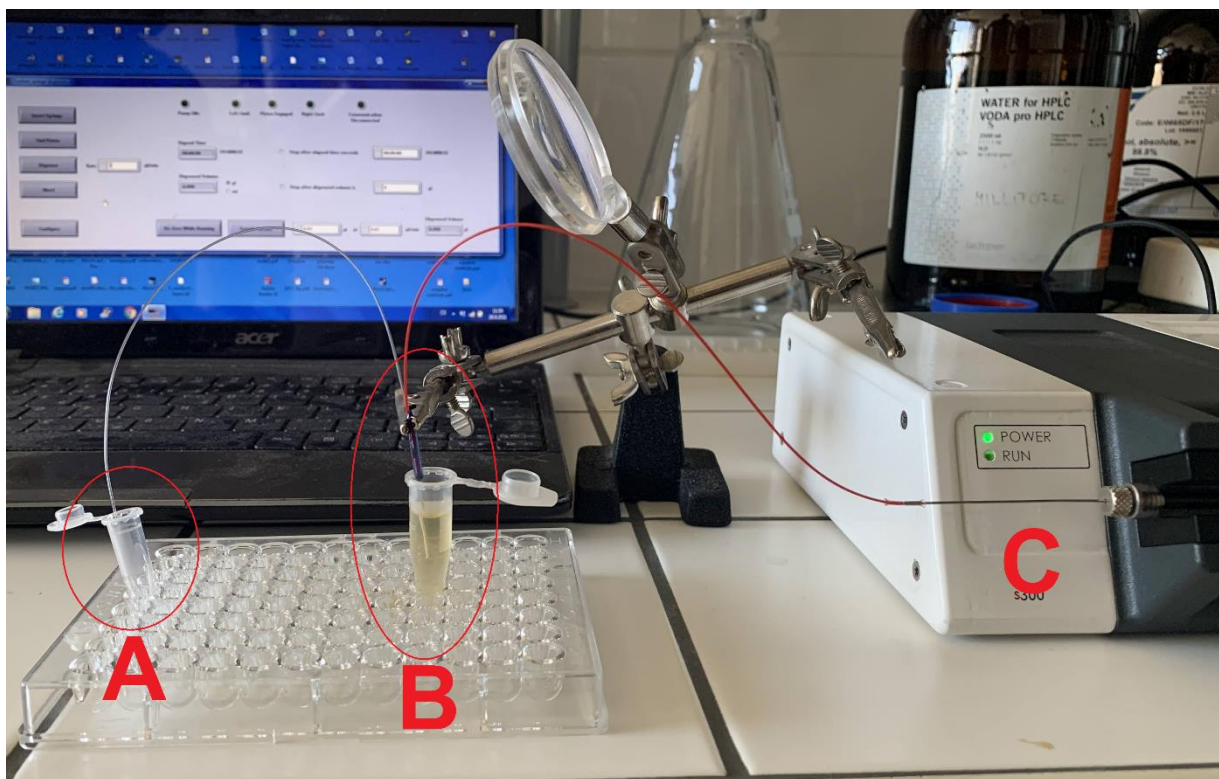


Obr. 9: Mikrodialyzační sonda. V levé části obrázku je přívodní (červená) a výstupní (průhledná) kapilára. Aktivní část sondy, dialyzační membrána, je označena v kroužku. Rozšířená středová část zajišťuje spojení všech tří komponent sondy.

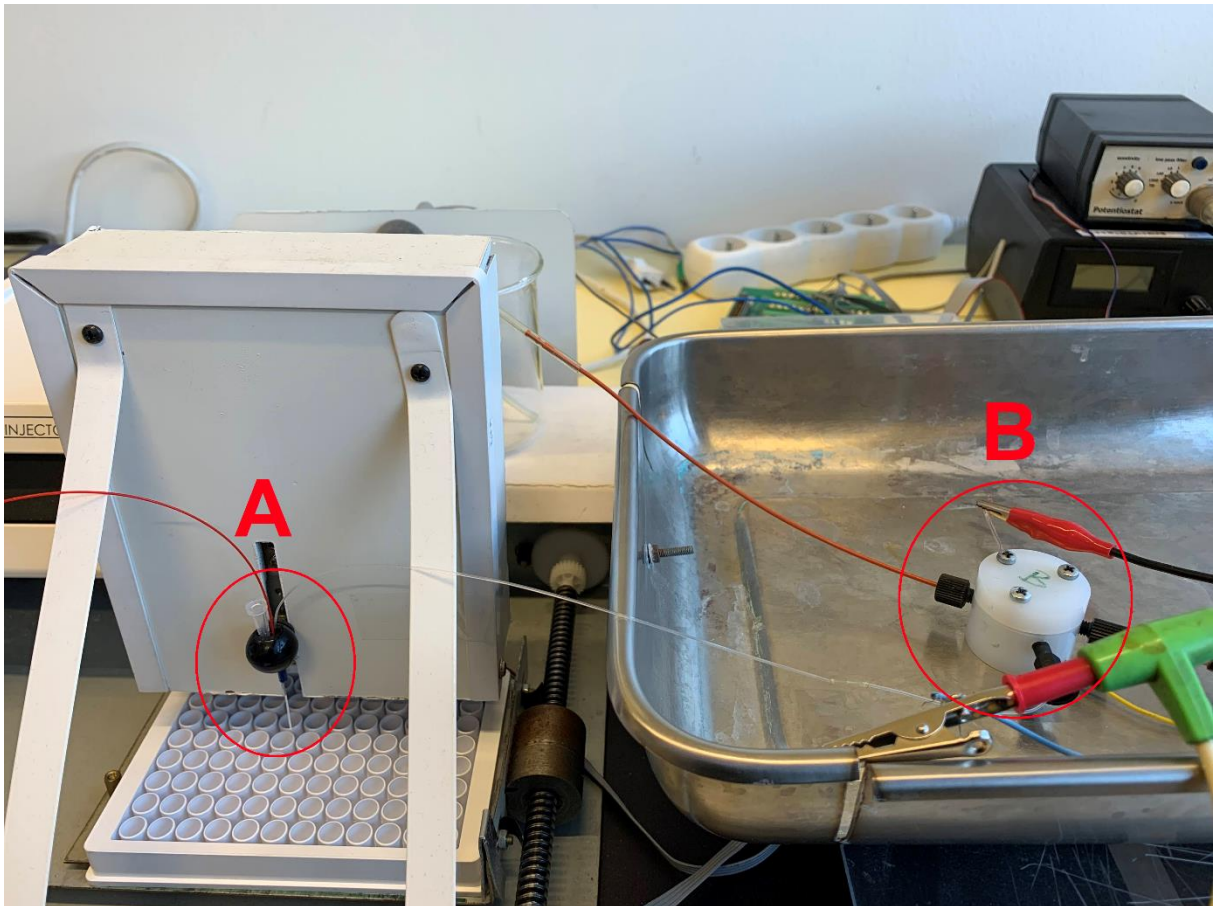
Perfuzní roztok o požadovaném průtoku je dodáván přesnou stříkačkovou pumpou. Hadičky o vnějším průměru 0,65 mm a průsvitu 0,12 mm jsou spojeny pružným návlekm, který po namočení do 70% ethanolu nabobtná, snadno se navleče na hadičku a po uschnutí se opět smrští a hadičky těsně sevře. Upevnění výstupní hadičky mikrodialyzační sondy do elektrochemické průtočné cely detektoru je realizováno běžným HPLC šroubením, skrze které je vedena teflonová trubička odpovídajícího vnitřního i vnějšího průměru. Detaily průtočné cely jsou popsány v kapitole 3.1.3.

Kontrolu potenciálového programu a sběr proudu obstarává potenciostat, který je schopen pracovat jak v režimu amperometrického měření, tak čištění elektrody. Přepínání obou funkcí je rovněž automatizované. Veškerý řídicí software pozičního zařízení, potenciostatu a

stříkačkové pumpy je napsán v programovacím prostředí LabView. Základní uspořádání pro mikrodialýzu vzorku je na Obr. 10. Detail zobrazující dialyzační a elektrochemickou část automatické aparatury je na Obr. 11.



Obr. 10: Aparatura pro mikrodialýzu vzorku zahrnuje vialku pro sběr dialyzátu pro další analýzu A. Mikrodialyzační sondu ponořenou do vzorku piva B a stříkačkovou pumpu C.



*Obr. 11: Detail aparatury pro automatickou mikrodialýzu s amperometrickou detekcí. Mikrodialyzační sonda **A** je uchycena v zařízení zajišťující její vsunutí do vzorku a opětovné vytáhnutí. Vespod je mikrotitrační destička na vzorky, která je připevněna v pozičním zařízení. Vývod mikrodialyzační sondy je v průtočné cele detektoru **B**. Během měření je měřicí cela uzavřena v uzemněné kovové nádobě.*

4 Výsledky a diskuze

4.1 Modifikace vlákna niklem, slitinou mědi s niklem a tvorba glukosového senzoru

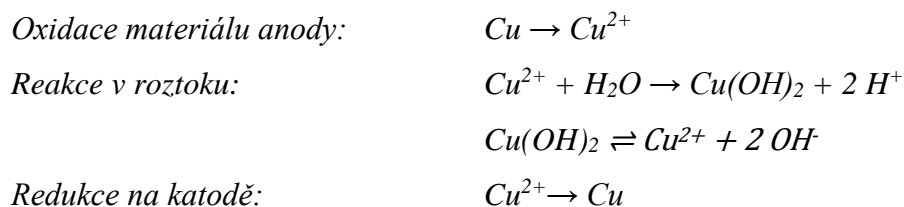
Čistě uhlíkové vlákno není příliš vhodný materiál ke konstrukci elektrody na detekci sacharidů. Daleko lepší volbou je měď, nikl, případně jejich slitina. Podstatou funkce elektrod připravených z uvedených prvků je v případě glukosy její oxidace na glukonolakton reakcí s hydroxid-oxidu mědi a niklu ve vysokém oxidačním stavu (III) [103, 104]. Tento neobvykle vysoký oxidační stav je možné připravit elektrooxidací v alkalickém prostředí.

Jak je u elektrod obvyklé, tak i v případě těchto materiálů vlastnosti připraveného senzoru silně závisí na struktuře povrchu nebo jeho chemické formě. Niklové elektrody poskytují výbornou citlivost, mají ale horší stabilitu odezvy. Na vině je pravděpodobně vznik odlišných forem hydroxidu, hydratované α -Ni(OH)₂ a bezvodé, stabilnější β -Ni(OH)₂ formy, ve kterou α forma samovolně přechází. Další oxidací v alkalickém prostředí vzniká hydroxid-oxid β -NiO(OH), který se částečně transformuje na nestabilní γ -NiO(OH) formu, pokud oxidace probíhá za vysokého potenciálu, velkého proudu nebo vysoké koncentrace alkálií [105-107]. Transformace mezi jednotlivými formami je pomalá a nekompletní, mezi příslušnými formami se ustavuje rovnováha. Tvorba γ -NiO(OH) je nežádoucí, protože při něm dochází k interkalaci alkalických iontů do struktury a tím k její expanzi a tvorbě trhlin a rozpadu vznikající oxidované vrstvy [108, 109]. Použití slitiny Cu/Ni jako výchozího materiálu pro tvorbu elektrody je výhodné nejen z důvodu synergického efektu obou kovů (jejich oxidovaných forem) na oxidaci glukosy, ale také proto, že přítomnost mědi a jejích sloučenin inhibuje přechod β -NiO(OH) na nevhovující γ -NiO(OH) a tím přispívá ke stabilitě elektrody [106].

4.1.1 Pokrývání uhlíkového vlákna aktivní vrstvou

Snadným způsobem nanášení kovových materiálů na uhlíkové vlákno je elektrodepozice a to nejen s použitím čistého kovu jako anody, ale i slitin kovů. Výsledkem je poté pokrytí katody směsnými částicemi výchozích kovů nebo vznik silnější vrstvy v závislosti na experimentálních podmínkách.

Nanostrukturované vrstvy mohou být připraveny elektrodepozicí kovu anody v prostředí velmi čisté vody [100, 101]. Takto uspořádaný systém obsahuje pouze velmi malé množství kovových iontů, kontrolované součinem rozpustnosti příslušného hydroxidu nebo nebo hydroxid-oxidu. Na příkladu mědi je děj popsán rovnicemi:

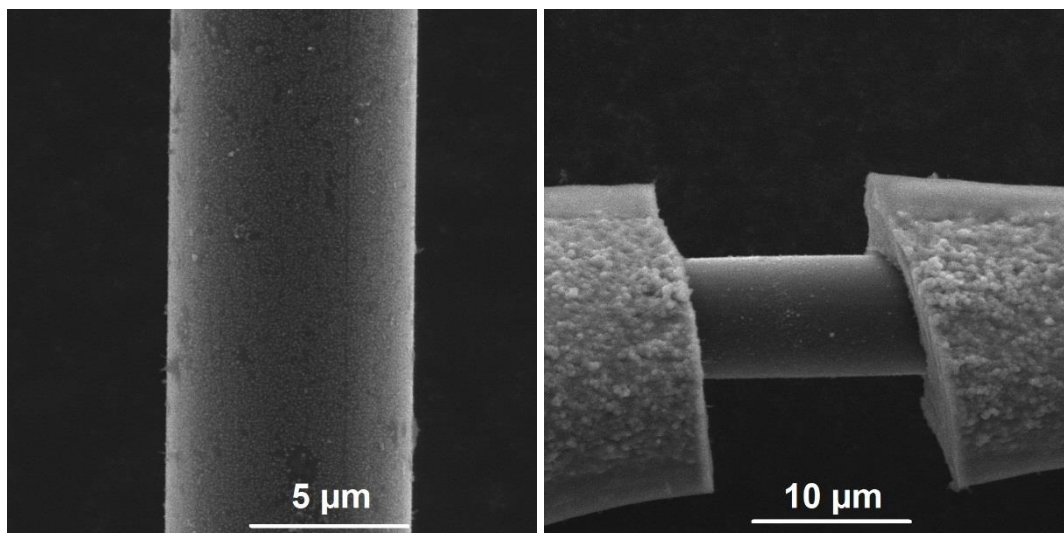


Některé kovy se při oxidaci potáhnou kompaktní vrstvou korozních produktů, která brání dalšímu narušování kovu. To je případ i mědi a niklu a množství materiálu uvolněného při anodizaci je tedy dále omezeno vznikem pasivující vrstvy [110, 111].

Uhlíkové vláknová elektroda a drátek z niklu nebo jeho slitiny s mědí (45/55 hm.%) byly ponořeny do ultračisté vody v křemenné kádince. Vzájemná vzdálenost obou elektrod byla asi 1 cm. Uhlíkové vlákno je zapojeno jako katoda, na elektrody je poté vloženo napětí 20 V. Doba po kterou je elektrodepozice prováděna, má zásadní vliv na výslednou podobu pokrytí uhlíkového vlákna.

4.1.2 Elektronová mikroskopie a spektrální měření

Pomocí SEM byly pořízeny snímky vláken po různé době depozice (Obr. 12). Po asi 15 minutách začíná docházet k rovnoměrnému pokrytí povrchu vlákna jednotlivými nanočásticemi příslušných kovů. Mezi 22. a 25. minutou už nemá pokrytí podobu jednotlivých částic, ale vzniká souvislá vrstva o tloušťce asi 2 μm . Mohutnost vrstvy dále narůstá a po uplynutí 30 minut dosahuje tloušťky asi 5 μm . Změny na vlákně jsou, při porovnání s neupraveným vláknem, patrné i pouhým okem.



Obr. 12: SEM snímky uhlíkového vlákna s nánosem diskrétních nanočástic po uplynutí 15 minut depozice (vlevo). Vpravo je vlákno s poškozenou nanosenou vrstvou, ze snímku je dobře patrná mohutnost depozitu po 30 minutách.

Vznik hustého pokrytí povrchu oddělenými nanočásticemi je v souladu s modelem formování tenkých vrstev podle Volmera a Webera [112]. Velmi nízká koncentrace kovových iontů a s ní spojená nízká výměnná proudová hustota dává přednost nukleaci nových částic před růstem stávajících [113]. Husté pokrytí částicemi je umožněno velmi nízkou vodivostí „elektrolytu“, v tomto případě velmi čisté vody. Pokrytý povrch elektrody byl dále zkoumán technikou EDX. Ta odhalila, že poměr ploch kovů a kyslíku ukazuje na převážně kovový charakter částic s menším zastoupením oxidovaných forem. Zajímavé bylo zjištění, že plocha

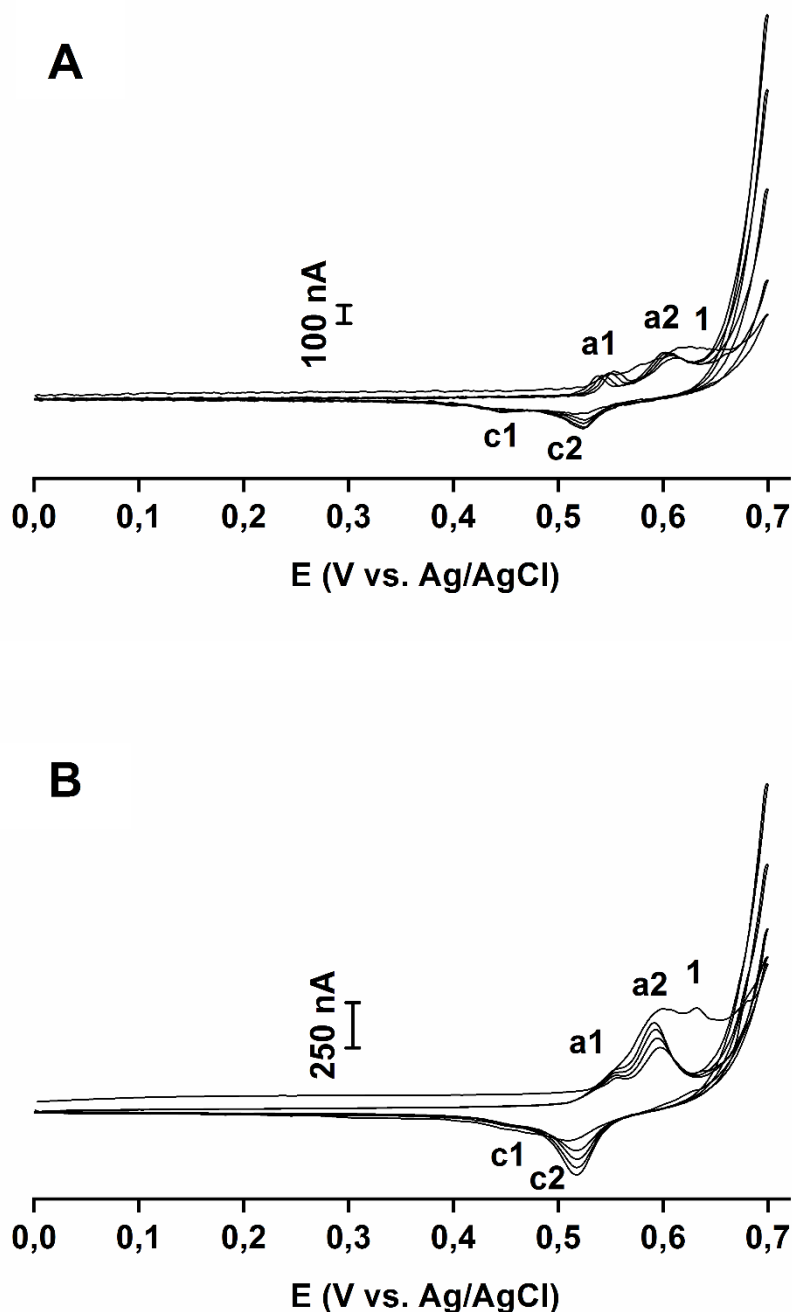
signálu mědi a niklu je v případě směsných částic v poměru asi 5:1, kdežto výchozí materiál drátu obsahoval kovy v poměru 1,2:1. Zvýšený výskyt kovové mědi může být vysvětlen na její snažší redukci z příslušného iontu ve srovnání s niklem.

Jak již bylo uvedeno, po uplynutí asi 22 minut ztrácí nanášený materiál podobu jednotlivých částic a začíná převládat pokrytí kompaktní vrstvou. S rostoucím časem depozice síla vrstvy dále roste a může dojít i k jejímu popraskání. Měření EDX spektra ukázalo, že kromě změny morfologie nanesené vrstvy, se mění i její chemické složení. Objevuje se značný nárůst signálu kyslíku, který svou plochou už překoná plochy signálů kovů a je tedy na místě se domnívat, že se jejich oxidovaná podoba stává dominantní. K určení chemické podoby studované vrstvy byla použita technika XPS. Touto cestou byla získána informace, že vrstva připravená z niklu jako výchozího materiálu, obsahuje 74,2 % NiO a 25,8 % Ni(OH)₂. Pokud se díváme na vrstvu původem ze slitiny Cu/Ni, pak najdeme NiO v zastoupení 40,3 %. Z pohledu signálů mědi pak získáme hlavní složku 49,4 % Cu₂O, v menším množství pak oxid měďnatý, hydroxid měďnatý a 15 % kovové mědi. Výskyt oxidovaných sloučenin v silnější vrstvě depozitu na katodě, která poskytuje redukující podklad může být překvapivý. Vysvětlení přítomnosti hydroxidů může přinést nárůst pH v okolí katody, protože zde dochází i k elektrolyze vody a vyredukovaný kov by mohl v prostředí se zvýšenou koncentrací hydroxidových iontů vytvářet odpovídající sraženinu. Největší zastoupení v připravených vrstvách nemají hydroxidy, ale oxidy a u nich není uvedené vysvětlení možné. Nabízí se možnost přenosu oxidovaného kovu z anody na katodu pod vlivem elektrického pole v procesu zvaném elektroforetická depozice. Koloidní částice nesoucí na svém povrchu náboj budou migrovat k opačně nabitě elektrodě, kde se usadí a postupně utvoří povlak [114-116]. Elektroforetická depozice vrstev není neznámou technikou. Hotové lázně obsahující suspenzi koloidu materiálu k depozici a pomocné látky jsou komerčně dostupné.

4.1.3 Elektrochemická charakterizace

Pro získání informace o redoxním chování obou vytvořených typů elektrod byla využita cyklická voltametrie. Na záznamu (Obr. 13) jsou patrné dva anodické a dva katodické signály a odlišné chování prvního cyklu oproti následujícím. Původcem anodického signálu prvního cyklu je pravděpodobně oxidace Ni(OH)₂ a NiO na společný produkt NiO(OH) [117, 118]. Je dobré připomenout, že jak Ni(OH)₂, tak NiO(OH) se mohou vyskytovat ve dvou modifikacích a každá má svůj signál na voltamogramu. Pokud se jedná o CV elektrody s niklem, tak můžeme v následujících cyklech sledovat v katodickém směru nárůst signálu redukce β-NiO(OH), kdežto γ-NiO(OH) se příliš nemění. V anodické větvi vidíme mírný nárůst signálů α a β-

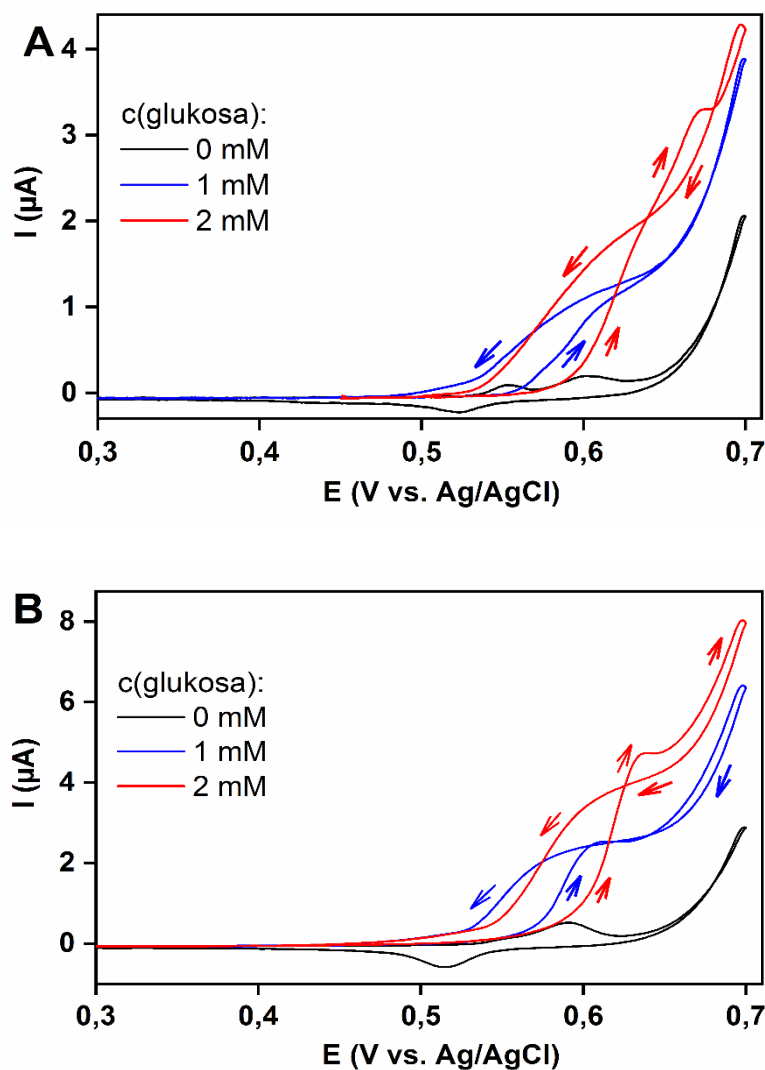
Ni(OH)₂ a jejich pomalé přibližování. Tento posun by mohl ukazovat na to, že se při redukci β a γ-NiO(OH) utváří třetí, nebo lépe, směsná fáze obsahující jak α, tak β- Ni(OH)₂. Chování elektrody s Cu/Ni je obdobné, ale se zřetelně vyššími proudy a jiným poměrem síly signálů. Současně není možné odlišit signály mědi a jejích oxidovaných forem.



Obr. 13: Cyklický voltamogram elektrody typu Ni (A) a CuNi (B) v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ NaOH při skenovací rychlosti 5 mV·s⁻¹. Křivka **1** odpovídá prvnímu skenu. Významné body **a1**, **a2** jsou signály oxidace α-Ni(OH)₂ a β- Ni(OH)₂ na NiO(OH). Signály **c1** a **c2** přísluší redukci β-NiO(OH) a γ-NiO(OH).

4.1.4 Glukosový senzor

Připravené elektrody byly testovány na citlivost vůči glukose pomocí cyklické voltametrie (Obr. 14). Před měřením byly elektrody kondicionovány pěti voltametrickými cykly v prostředí NaOH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a v tomto prostředí probíhalo i měření glukosy. Elektroda obsahující Cu/Ni vykazuje asi dvakrát vyšší elektrooxidační proudy ve srovnání s Ni elektrodou, proto byla pro další experimenty používána pouze elektroda typu Cu/Ni.

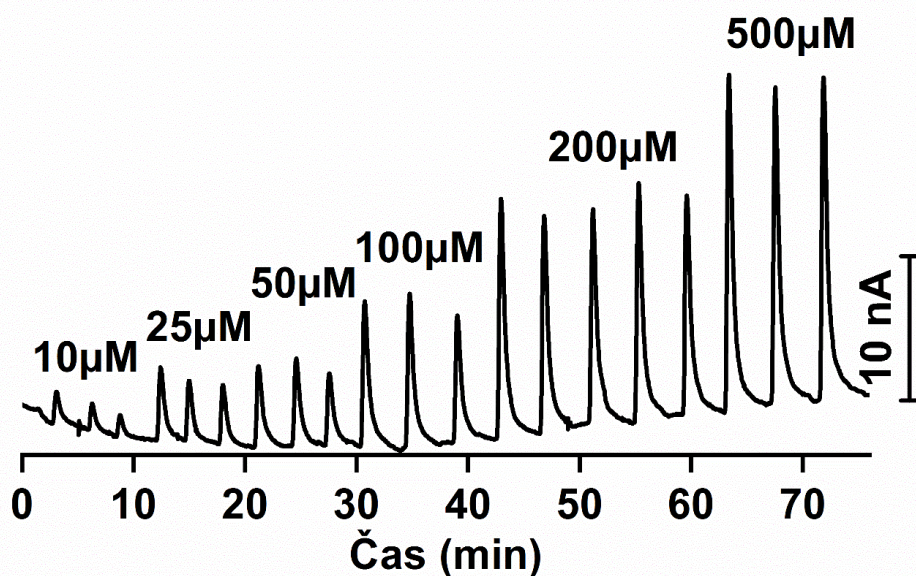


Obr. 14: Cyklický voltamogram pátého cyklu kondicionace elektrody typu Ni (A) a Cu/Ni (B), rychlost skenu $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH bez glukosy (černá). Měření v přítomnosti glukosy o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (modrá), nebo $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (červená). Šipkami je vyznačen směr potenciálového skenu.

Další optimalizace směřovaly k určení vhodných podmínek pro amperometrická měření, pro která jsou výsledné elektrody zamýšleny. Pro vyvážení živostnosti senzoru a vhodného poměru signálu a šumu byl jako optimální stanoven potenciál 550 mV. Funkce senzoru je závislá na přítomnosti NiO(OH) na jeho povrchu a jeho vznik je podmíněn dostatečným množstvím hydroxidových iontů v pracovním roztoku. Měření je proveditelné už při koncentraci NaOH 10 mmol·l⁻¹, ale pouze při malé koncentraci glukosy. Vyšší koncentrace NaOH v hodnotách 0,1 a 0,5 mol·l⁻¹ umožňují měření ve větším rozsahu koncentrace glukosy a protože 0,1 mol·l⁻¹ je méně zatížena šumem, byla stanovena jako optimální.

Jak ukázala fyzikální měření vlastností deponované vrstvy, závisí její morfologie a složení na době, po kterou byla depozice prováděna. Proto je vhodné otestovat zda a jaký vliv má doba depozice na amperometrickou odezvu při elektroxidaci glukosy. Výsledkem bylo, že citlivost elektrody roste, dosáhne maxima a opět klesá. Nárůst citlivosti můžeme přisoudit vyššímu množství NiO a Ni(OH)₂ čili prekurzorů aktivní látky NiO(OH) v nanosené vrstvě. Zdůvodnění následného úpadku signálu můžeme nalézt na SEM snímku vlákna po 27 minutách depozice a s tloušťkou vrstvy asi 5 μm. Už zde jsou dobře viditelné trhliny v pokrytí a dalo by se předpokládat, že s dalším zvyšováním mocnosti vrstvy roste pravděpodobnost jejího rozpraskání a oddělení od uhlíkového vlákna. Optimální doba depozice je 30 minut.

Použití Cu/Ni elektrod pro měření glukosy v krevním séru může být komplikováno odezvou na interferující látky. Elektroda může být citlivá nejen na glukosu, ale i na další látky, jako je například kyselina askorbová, nebo kyselina močová apod. Při měření modelového vzorku glukosy a interferentu, každý v koncentračním poměru 1:10 vzhledem ke glukose, byl podíl signálu rušivých látek zanedbatelný. Navíc v lidské krvi je glukosa v asi 30-ti násobném nadbytku oproti potenciálním rušivým látkám. Pro ověření funkce na skutečném vzorku bylo dávkováno 100 μl lidského séra do cely obsahující 30 ml 0,1 mol·l⁻¹ NaOH a následovaly tři standardní přídatky glukosy tak, aby výsledná koncentrace přídatku činila 10 μmol·l⁻¹. Naměřený výsledek se dobře shodoval s hodnotou získanou komerčním glukometrem. Připravený senzor je možné použít i v průtoku (Obr. 15), je ale nutné upozornit na opatrné zacházení při vkládání vlákna elektrody do kapilár. Pokud by docházelo k ohybu vlákna při manipulaci, existuje riziko rozlámání a opadání nanosené aktivní vrstvy.



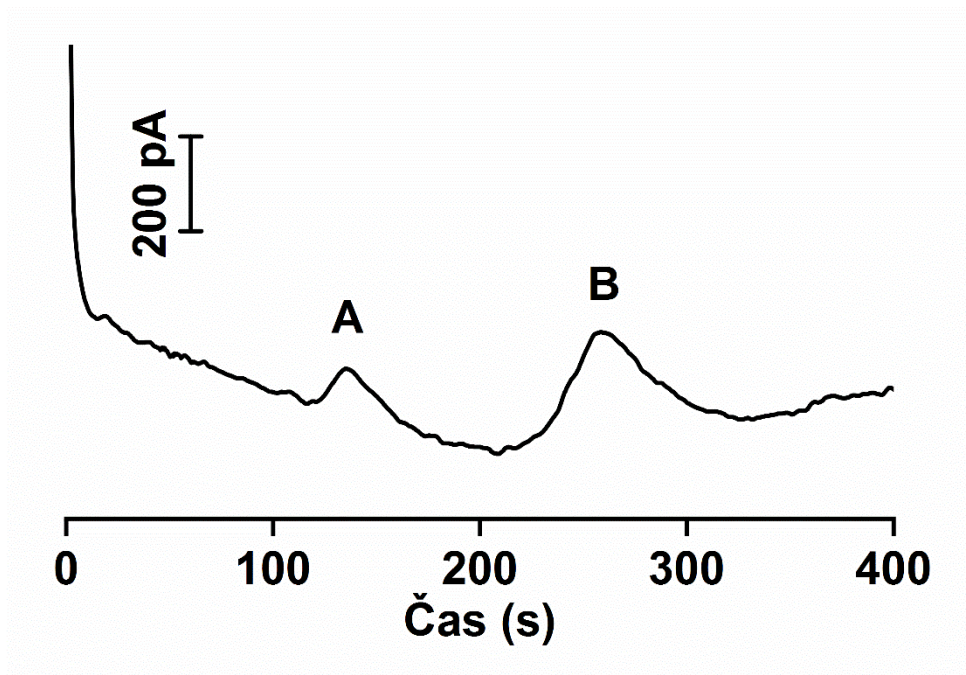
Obr. 15: Průtoková vstříkovací analýza glukosy ($c = 10\text{-}500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na elektrodě typu CuNi. Pracovní potenciál 550 mV, mobilní fáze $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, průtok mobilní fáze $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2 Amperometrická detekce v kapilární elektroforéze

Aparatura pro kapilární elektroforézu je, ve své nejprimitivnější podobě, velice jednoduchá a poměrně málo náročná na přístrojové vybavení. Bylo proto nasnadě vyzkoušet její spojení s již mnohokrát ověřenými uhlíkovými vláknovými mikroelektrodami v amperometrické detekci. V kapitole 2.4.2 jsou popsána úskalí takového spojení a možná řešení a přesto bylo rozhodnuto vyzkoušet přímé spojení těchto technik bez použití „decouplingu“.

4.2.1 Detekce ferulové a gallové kyseliny

Pro ověření funkce aparatury byly zvoleny elektrochemicky snadno oxidovatelné organické kyseliny, ferulová a gallová. Koncentrace kys. ferulové byla $0,51 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, kys. gallové $0,59 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, oba vzorky byly připraveny rozpustěním příslušné navážky v methanolu a vodě (1:9) a na pracovní koncentraci zředěny $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátovým pufrům, $\text{pH} = 9,5$. Tento pufr sloužil i jako základní elektrolyt. Dávkování vzorku bylo prováděno elektrokineticky, při 10 kV po dobu 10 s. Separační napětí 10 kV. Měřicí cela nebyla osazena samostatnou referenční elektrodou. Jako pseudoreference sloužil nerezový šroub na dně cely, současně plnící funkci pomocné elektrody a uzemňovací elektrody pro obvod vysokého napětí. Potenciál vložený na měřicí elektrodu dosahoval 1500 mV. Výsledný záznam je na Obr. 16.



Obr. 16: Elektroforeogram separace gallové kyseliny (A, $c = 0,59 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a ferulové kyseliny (B, $c = 0,51 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Separační napětí 10 kV, potenciál pracovní elektrody 1500 mV (vs. pseudoreference).

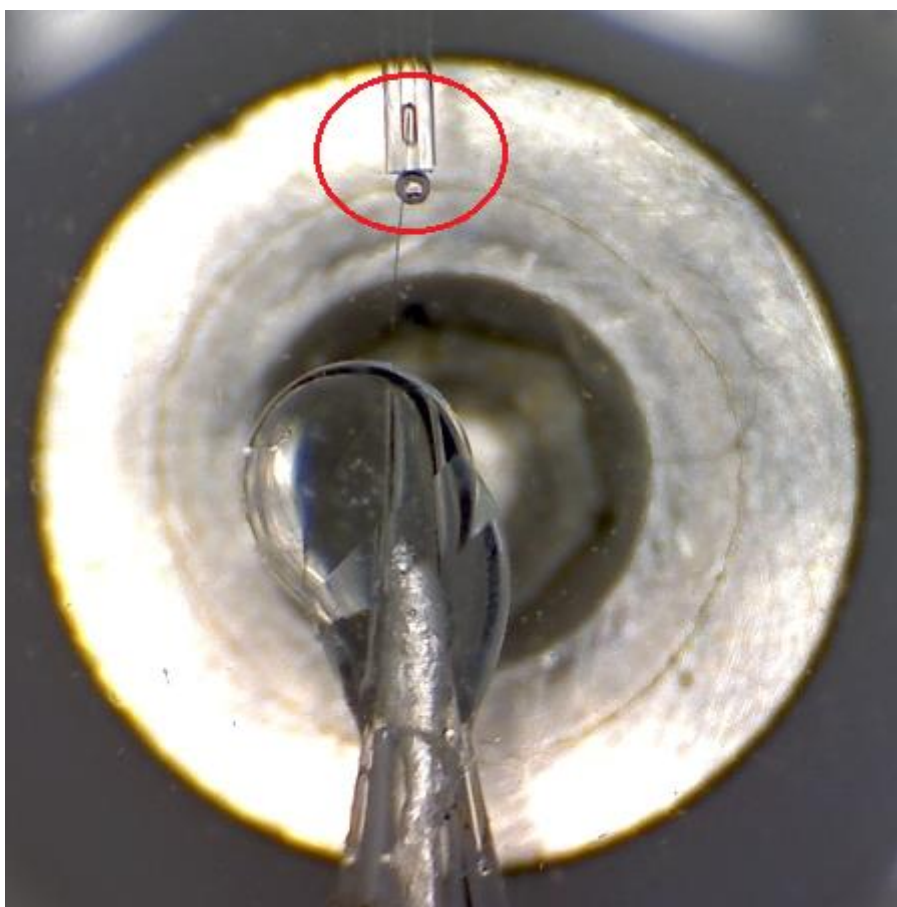
4.2.2 Vliv separačního napětí na detekční systém

Experimenty prokázaly určitou schopnost elektroforézy s amperometrickou detekcí pracovat i bez elektrické izolace separační a detekční části, ale za cenu veliké nespolehlivosti a krátké životnosti senzoru. Uváděným negativním jevem bývá zvýšený šum na detektoru [83]. V tomto případě byl běžnou příčinou selhání měření kolaps separační části přístroje vlivem zavzdušnění kapiláry a tím přerušení proudu. Původní domněnka byla, že bubliny plynu pocházejí z nedostatečně promyté kapiláry, nebo při neobratné manipulaci se vstupní částí kapiláry při přesouvání mezi vialkou vzorku a základního elektrolytu.

Nebylo bez zajímavosti, že pokud byly prováděny ověřovací experimenty bez přítomnosti měřící elektrody, pouze se směsí fluorescenčních barviv a s vizuální kontrolou chování separační části aparatury, byla četnost výskytu výše zmíněného problému velmi vzácná a dělení vzorku fungovalo bezchybně. Padlo tedy podezření na interakci materiálu elektrody s vnějším elektrickým polem. Jako příklad uveďme separační napětí 15 kV při délce kapiláry 25 cm vyvolá elektrické o intenzitě $600 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Délka vlákna pracovní elektrody uvnitř kapiláry je okolo 2,5-3 mm, vlákno je tedy vystaveno gradientu elektrického pole až 180 V. Vše za zjednodušujícího předpokladu, že separační napětí je uzemněno na výstupním konci kapiláry.

Za uvedených podmínek se vlákno elektrody pravděpodobně chovalo jako bipolární elektroda, tedy že se na něm vytvořil elektrický potenciál obrácené polarity, než jakou má pole, které jej vyvolalo [119]. Přičemž nejvyšší napětí je na opačných koncích bipolární elektrody. V popisovaném uspořádání je vlákno jedním koncem vodivě spojeno s potenciostatem, kdežto bipolární elektrody mají oba konce volné. I tak byla pozorovatelná elektrolýza přítomného roztoku a s ní spojený vývoj plynu na špičce elektrody (Obr. 17). Protože bylo měření prováděno v alkalickém pufru a v neupravené křemenné kapiláře, napětí na vstupu kapiláry bylo kladné a bubliny plynu byly tedy neustále vypuzovány z kapiláry elektroosmotickým tokem. Při obrácení polarity bylo zřetelné i obrácení proudu bublin směrem dovnitř kapiláry.

Za předpokladu kladného napětí na vstupu kapiláry by měla špička uhlíkového vlákna záporné napětí a tedy by na ní měla probíhat redukce vodíku. V případě obrácení polarity vysokého napětí, by se dal očekávat vývoj vodíku na elektrodě v oblasti konce kapiláry. Proud plynu byl pozorován, ale nebylo možné spolehlivě potvrdit, že začátek vývoje bublin je právě na ústí kapiláry.



Obr. 17: Detail umístění vlákna pracovní elektrody do výstupu separační kapiláry. Ve zvýrazněné oblasti je dobře patrný vývoj bublin plynu v okolí konce vlákna.

Kromě častého přerušení separace vlivem vývoje bublin plynu docházelo i ke změnám materiálu elektrody a po čase k jeho úplné destrukci. V průběhu experimentu bylo viditelné postupné tmavnutí vlákna a jeho ztluštění, ale jen úsek vnořený do kapiláry. Postupem času se vlákno v oblasti ústí kapiláry přelomilo a bylo obvykle vyplaveno ven elektrosmotickým tokem. Způsobem jak omezit nežádoucí jevy je použití velice úzké kapiláry (5 μm) a aby bylo možné vložit vlákno, je koncová část kapiláry kuželovitě rozšířena leptáním. Vychází se ze skutečnosti, že podstatná část elektrického pole je na vysokém elektrickém odporu úzké kapiláry a toto pole rychle ztrácí intenzitu s rozšiřujícím se průsvitem kapiláry. Leptání vyžaduje práci s kys. fluorovodíkovou a zároveň se takto úzké kapiláry obtížně promývají. Proto byla vyzkoušena jiná cesta, ale stavějící na stejném principu - spojení 23 cm dlouhého úseku kapiláry malého průměru (50 μm) s 2 cm krátkým úsekem kapiláry většího průsvitu, do kterého bylo vloženo vlákno. Technika spojování vychází z práce A. Šebestové a J. Petra [120]. I přes provedené úpravy nebylo dosaženo sestavení spolehlivé aparatury pro kapilární elektroforézu s amperometrickou detekcí. Objevovaly se i závady elektronické, kdy sepnutí vysokého napětí způsobovalo náhlé převrácení měřeného amperogramu, tedy signály byly záporné. V jiných případech uzavření separačního a detekčního obvodu na stejné elektrodě zcela znemožnilo funkci potenciostatu, pokud byl řídicí počítač napájen z elektrické sítě a ne z vlastního akumulátoru. Tyto potíže nebyly uspokojivě vysvětleny a vyřešeny a práce na aparatuře byla pozastavena.

4.3 Amperometrické stanovení antioxidační kapacity piv ve spojení s automatickou mikrodialýzou

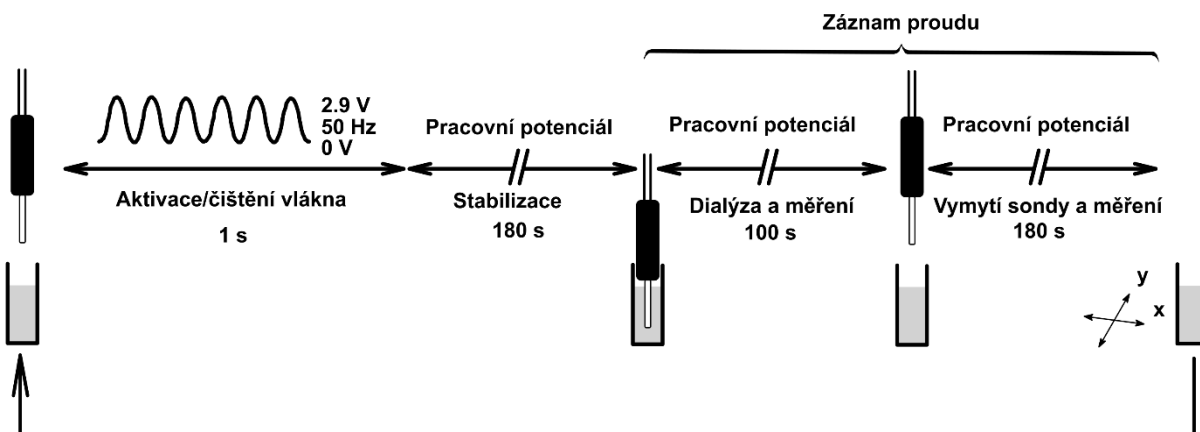
Vzorky českých i světových piv byly zbaveny rozpuštěných plynů pomocí ultrazvukové lázně. Dále bylo změřeno pH a po rozdělení na asi 50 ml podíly byly vzorky uskladěny v mrazničce při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ke stanovení antioxidační kapacity byly vzorky piv naředěny pufrům mravenčanem amonným ($50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}=3,5$) v poměru 1:4. Standardní látkou byla kyselina gallová o koncentraci $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v témže pufru jako vzorky piva. Kyselina gallová je používána jako standard ve Folin-Ciocalteu metodě stanovení celkového obsahu fenolů a antioxidační kapacity [121] a proto byla použita i v této práci. Roztoky k měření byly rozpipetovány po 400 μl do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Každý vzorek ve třech opakováních.

Pro ustálení vlastností membrány je potřeba před zahájením měření mikrodialyzační sondu na asi 5 minut namočit do 70% ethanolu a poté nechat promývat pracovním pufrem po dobu asi 10 minut. Jak již bylo uvedeno, výtěžek dialýzy je nepřímo úměrný průtokové rychlosti perfuzního roztoku. Pro odhadnutí výtěžku byl proveden voltametrický experiment s kyselinou gallovou jako standardem. Vzorek o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl dialyzován při průtoku $7 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a získaný dialyzát byl zředěn na polovinu a podroben square wave voltametii na uhlíkové vláknové mikroelektrodě. Rozdíl v koncentraci kyseliny gallové před a po dialýze odpovídal, za daných podmínek, výtěžku okolo 10 %. Průtoková rychlost $7 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ byla použita při získání pivních dialyzátů pro účely experimentů v kapalinové chromatografii. Pro přímou amperometrii dialyzátů byla průtoková rychlost nastavena na $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, jako vhodný kompromis mezi citlivostí a rychlostí měření. Zvýšený průtok nemá v tomto případě zásadní negativní vliv na citlivost měření, protože se měří kumulativní signál všech snadno oxidovatelných látek, na rozdíl od signálu separovaných látek v chromatografickém experimentu.

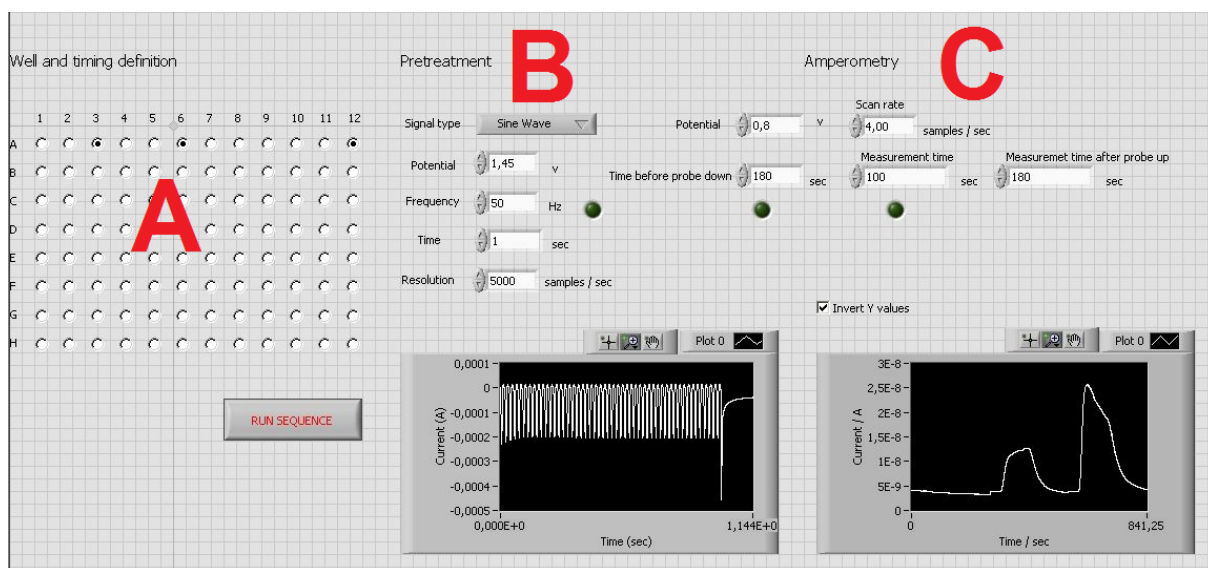
Při sestavení aparatury je vhodné elektromagnetické odstínění měřicí cely, jednoduchým způsobem je uzavření do kovové nádoby a vodivým spojením se zemnicím bodem potenciostatu. V průběhu měření se vyskytoval problém s ostrými falešnými signály, které byly způsobeny průchodem poměrně velkého počtu bublinek plynu přes vlákno elektrody. Původní podezření na nedostatečné odplynění použitých roztoků (ultrazvukem nebo probubláním heliem) se nepotvrdilo. Současně pohyb v blízkém okolí stříkačkové pumpy způsoboval rušení na amperogramu. Oba jevy zanikly po spojení kovové jehly stříkačky, která je v kontaktu s perfuzním pufrem, s kovovou nádobou odstínění cely pomocí vodiče.

Celou měřicí proceduru můžeme rozdělit do několika kroků. V prvním kroku je elektroda aktivována/regenerována sekundovým elektrickým procesem sinusového průběhu o frekvenci 50 Hz a amplitudě 2,9 V. Dále je na elektrodu vložen pracovní potenciál, po uplynutí 180 s je proud pozadí ustálen a aparatura je připravena k měření. Dialyzační sonda se ponoří do měřeného roztoku a je spuštěn záznam proudu. Po uplynutí asi 50 s doputuje zóna analytu k pracovní elektrodě a dojde k rychlému dosažení maxima proudu, který od tohoto bodu může opět začít klesat vlivem znečištění elektrody. Po uplynutí 100 s je sonda vytažena z roztoku. Záznam proudu stále běží a po vymytí zóny analytu ze spojovacích hadiček proud rychle poklesne na úroveň proudu pozadí a záznam je ukončen. Délka posledního kroku byla nastavena na 180 s. Dále je mikrotitrační destička posunuta do pozice pro měření dalšího vzorku

a celý proces se opakuje. Obr. 18 ukazuje stručný diagram všech výše popsaných kroků. Na Obr. 19 je ukázka uživatelského rozhraní řídicího softwaru.



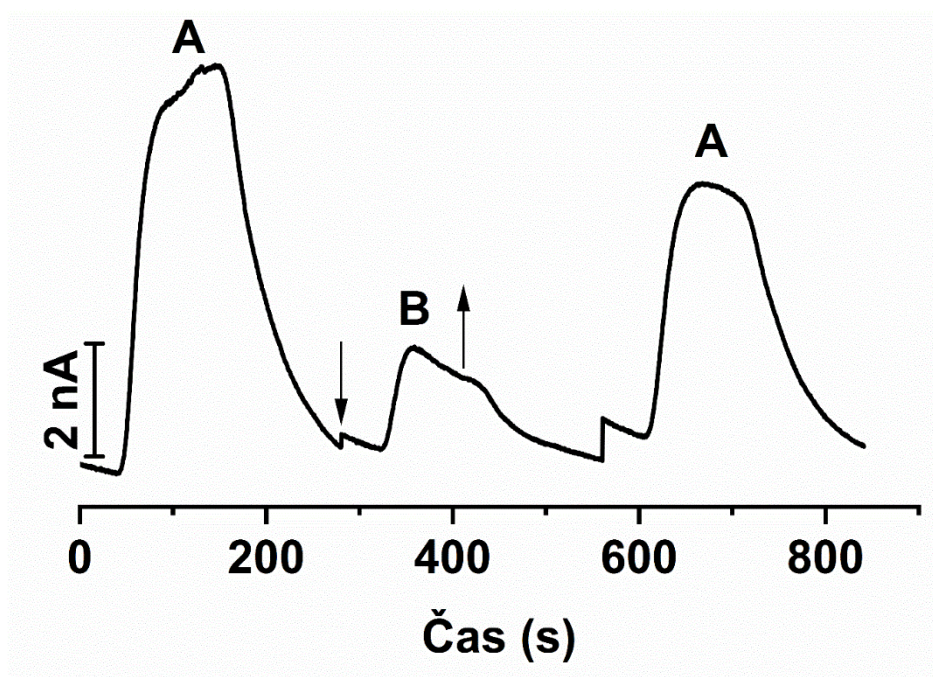
Obr. 18: Diagram jednotlivých kroků kompletní měřicí procedury se zobrazením vzájemné polohy dialyzační sondy a vzorku.



Obr. 19: Uživatelské prostředí řídicího softwaru umožňuje specifikovat pozice vzorků v mikrotitrační destičce (A), nastavit parametry reaktivace elektrody (B) a amperometrického měření (C). Ke každé elektrochemické proceduře je zobrazen příslušný graf naměřeného proudu.

Běžné rozvržení vzorků na mikrotitrační destičce začínalo vzorkem standardu, poté vzorky piv a nakonec opět standard pro ověření stability měření. Vše ve třech opakováních. V počátečních experimentech při použití zcela nové elektrody byl nápadný nesoulad velikosti signálu standardu na začátku a na konci sady měření. Důvodem je trvalá změna

vlastností elektrody po prvním kontaktu s pivním dialyzátem. Proto byla na začátek každé série měření vložena kombinace vzorků standard-pivo-standard, typický amperogram této sestavy je na Obr. 20. Ze záznamu je patrné, že po prvním kontaktu elektrody se vzorkem piva její citlivost poklesla. V následných měřeních je již citlivost elektrody stabilní a můžeme měřit kompletní sadu připravených vzorků a standardů.

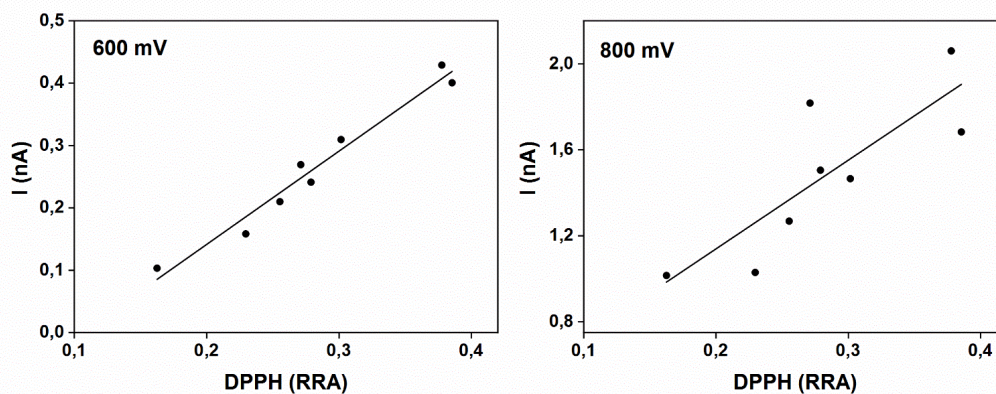


Obr. 20: Amperogram s charakteristickým průběhem proudu při prvním měření kombinace vzorků: standard (A)-pivo (B)-standard. Na signálu B jsou šipkami vyznačeny body, kdy je mikrodialyzační sonda vsunuta do vzorku nebo z něj vytažena.

Abychom ověřili důvěryhodnost výsledků získaných amperometrickou metodou, byly vzorky piv podrobeny analýze metodou podle Kanedy [122]. Tato metoda využívá roztoku stabilního radikálu DPPH v pufovaném methanolu. Připravený roztok má sytě fialovou barvu a odpovídající absorpční maximum je 525 nm. Pokud dojde k reakci mezi DPPH a redukujícími látkami vzniká nažloutlý produkt. Tuto změnu lze velice snadno sledovat fotometricky, typicky po době inkubace mezi 10–30 minutami. V této práci byl zvolen interval 10 minut a pokles absorbance byl sledován v 10 s intervalech. Z rozdílu počáteční a koncové absorbance se počítá tzv. relativní redukční aktivita.

Z výsledků amperometrických měření vyplynula dobrá korelace celkové antioxidační kapacity s metodou podle Kanedy, ale pouze při potenciálu 600 mV. S rostoucím potenciálem

se korelace zhoršovala (Obr. 21). Data naměřená amperometricky při 600 mV, ekvivalentní koncentraci standardu gallové kyseliny a redukční aktivitu podle Kanedy shrnuje Tab. 1.



Obr. 21: Korelace proudu, naměřeného metodou mikrodialýzy s amperometrickou detekcí, a relativní redukční aktivity získané metodou podle Kanedy, klesá s rostoucím pracovním potenciálem amperometrie. Ukázka korelace při 600 mV vs. 800 mV.

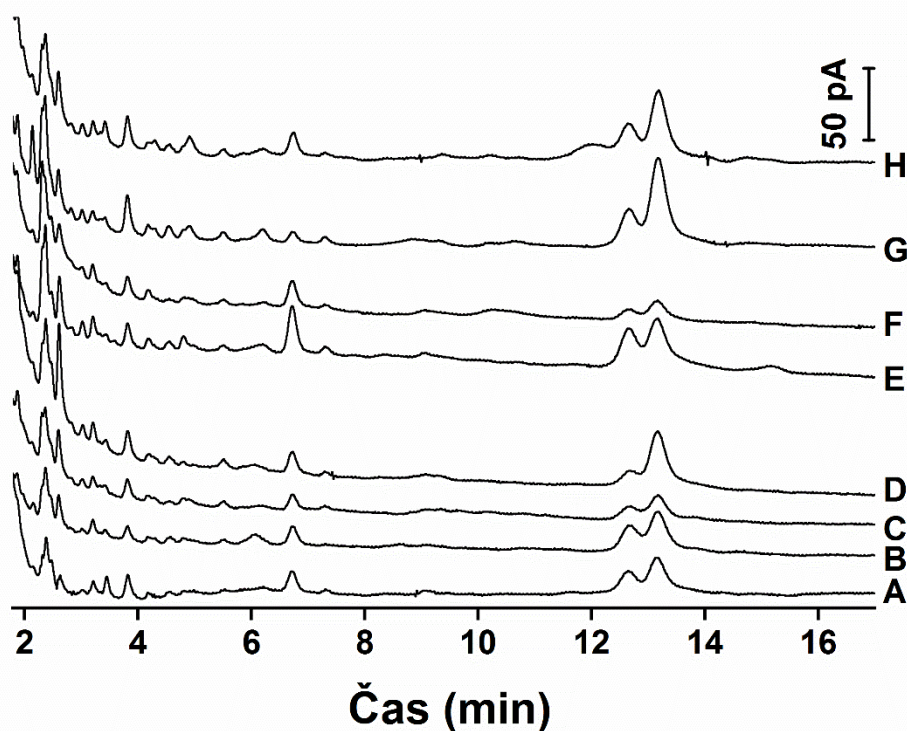
Tab. 1: Seznam měřených piv a data získaná amperometrickou metodou a metodou podle Kanedy.

Pivo	Amperometrie* I(nA)	Amperometrie*, ekv. kys. gallové ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	DPPH (relativní redukční aktivita)
Corona Extra	0.53	8.18	0.163
Leffe Blonde	2.06	45.2	0.385
Stella Artois	1.24	25.4	0.279
Heineken Lager	0.82	15.1	0.23
Rastinger	1.08	21.5	0.255
Radegast	1.39	28.9	0.271
Budweiser Budvar	1.59	33.9	0.301
Pilsner Urquell	2.21	48.8	0.378

* Amperometrie měřená při potenciálu 600 mV, proud je přepočítán na nezředěné pivo ($\times 5$)

Ve snaze o objasnění dosažených výsledků byla provedena sada měření HPLC-ED na vzorku dialyzátu piva Pilsner Urquell. Dialyzát byl rozdělen na dva podíly, jeden smíchan s nadbytkem reakční směsi pro metodu DPPH a druhý pouze s odpovídajícím množstvím methanolu. Po hodinové inkubaci byly naměřeny chromatogramy za různých potenciálů. Oproti očekávání nedošlo k úplnému vymizení signálů relativně snadno oxidovatelných látek po reakci s DPPH. Některé signály pouze poklesly a jiné byly zcela nedotčeny. Přitom v době nástřiku měl vzorek stále sytě fialové zbarvení, nemohlo se tedy stát, že by koncentrace DPPH nebyla v nadbytku

oproti koncentraci antioxidantů. S rostoucím pracovním potenciálem se objevily i nové signály, neovlivněné přítomností DPPH. Tento nesoulad mezi reaktivitou DPPH a elektrochemickou aktivitou látek přítomných v dialyzátu vysvětluje, proč s rostoucím anodickým potenciálem klesá korelace mezi celkovou antioxidační kapacitou naměřenou Kanedovou metodou a amperometrií. Je zajímavé, že vzorky piva různých výrobců jsou si velmi podobné z pohledu HPLC-ED (Obr. 22). A to i přesto, že můžeme předpokládat odlišnosti ve způsobu vaření piva a použití surovin jiných odrůd a původu.



Obr. 22: Chromatogramy dialyzátů piva naměřené amperometrickou detekcí při potenciálu 600 mV. Corona Extra **A**, Leffe Blonde **B**, Stella Artois **C**, Heineken Lager **D**, Rastinger **E**, Radegast **F**, Budweiser Budvar **G**, Pilsner Urquell **H**.

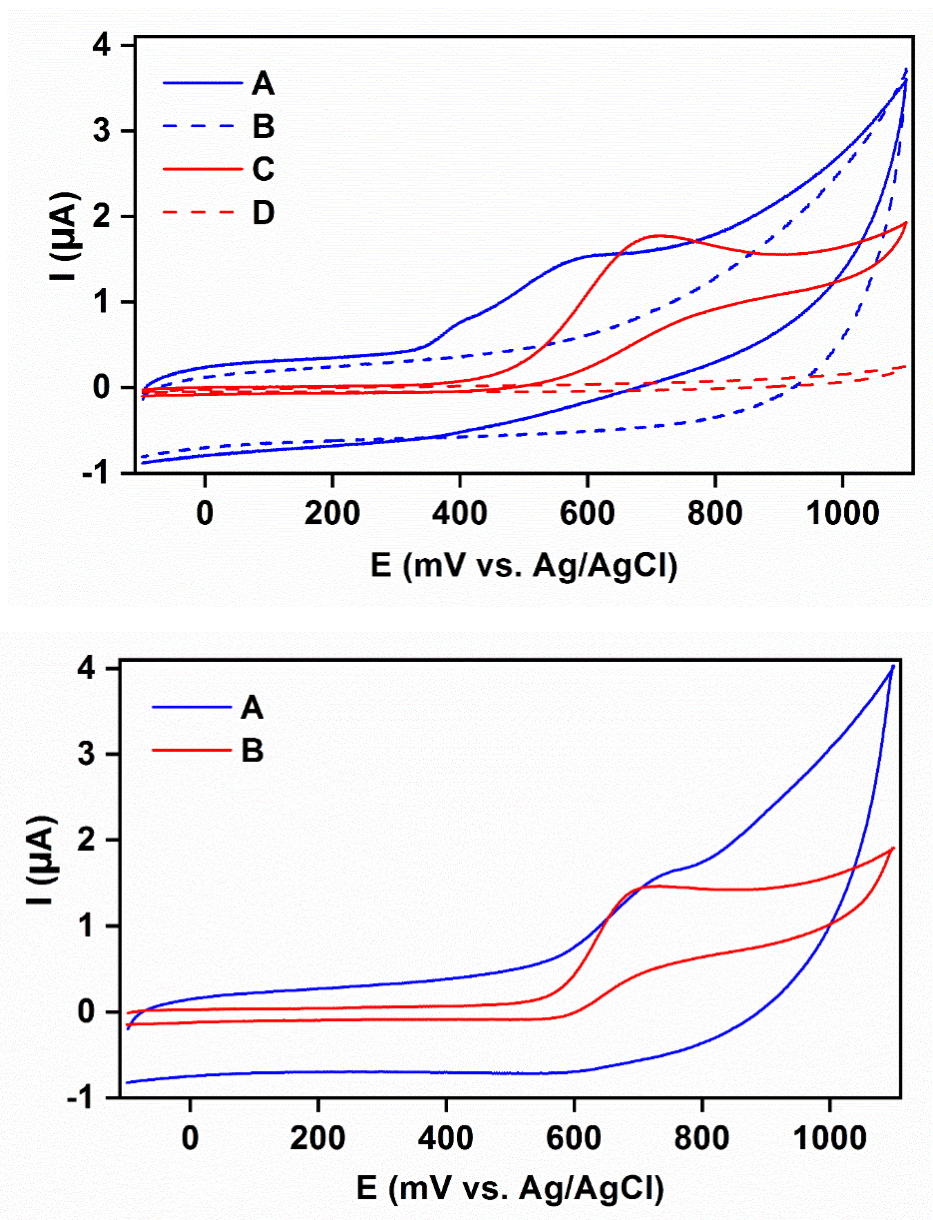
4.4 Grafitová mikrotuha pro amperometrickou detekci v HPLC

Možnost měření na detekční cele, která má dobrou citlivost, je poměrně snadno sestavitelná a přitom za zlomek ceny komerčního výrobku, je lákavá. Takovéto parametry splňuje zcela využívající grafitovou mikrotuhu jako elektrochemicky aktivní senzor. Výhodou je i to, že se k výrobě takového zařízení dá využít základní model měřicí cely z nylonového bloku, bez potřeby větších úprav. Prakticky to znamená jen změnu ve způsobu uchycení tuhy oproti

vláknové elektrodě a mírná změna v kapiláře přivádějící eluát z kolony. Veškeré detaily jsou popsány v kapitole 3.3. Obdobná sestava už prokázala své kvality a protože se vyskytla možnost získat reálný vzorek pocházející z předávkování antipsychotickým přípravkem, bylo rozhodnuto vyzkoušet i tuto cestu.

4.4.1 Elektrochemická charakterizace tuhy

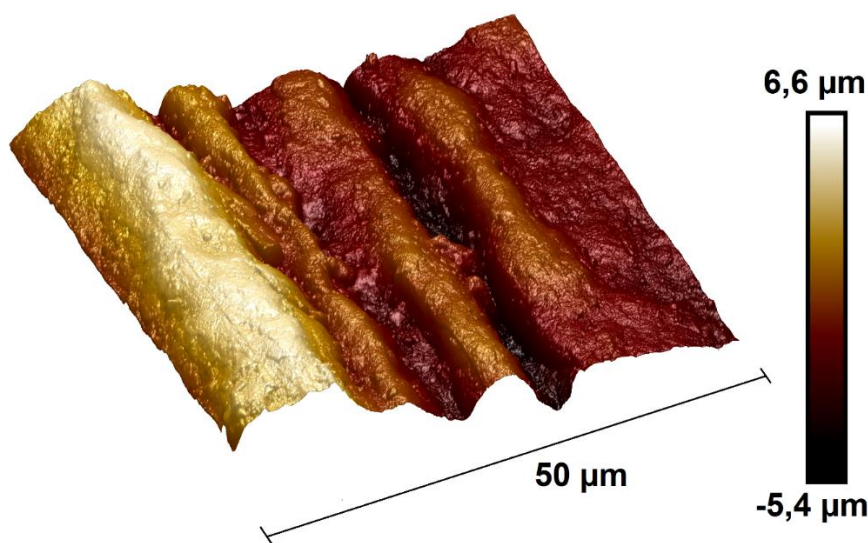
Bylo vybráno osm antipsychotických substancí, na kterých se testovalo chování dvou typů tuh pomocí cyklické voltametrie. Tuhy Tombow a AinStein se liší svým průměrem (0,55 a 0,26 mm) a také svou elektrochemickou aktivitou. Srovnatelné proudy v maximu signálu byly dosaženy v případě, že byla aktivní délka (a odpovídající geometrická plocha) tuhy Tombow omezena na 1 mm ($1,97 \text{ mm}^2$) a 5 mm ($4,13 \text{ mm}^2$) pro AinStein. Vymezení aktivní plochy bylo dáno hloubkou ponoření tuhy do měřeného roztoku. Voltamogramy byly měřeny v prostředí fosfátového pufru ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}=7,5$). Protože bylo dále plánováno využití tuhy k detekci v HPLC, bylo nezbytné ověřit i vliv nemalého množství organických rozpouštědel v budoucí mobilní fázi. Proto bylo měření provedeno i ve směsi uvedeného pufru s methanolem v poměru 1:2. Při srovnání s čistým pufrům zaznamenala tuha Tombow nápadně větší proudy pozadí, pokud byl přítomen methanol, přitom pozad'ový signál obou tuh byl velmi podobný v prostředí čistého pufru. Dále byla měřena odezva tuh na clozapin a promazin v prostředí pufr/methanol a i zde pozorujeme odlišné chování. Tuha Tombow poskytuje signál s horšími analytickými vlastnostmi oproti tuze AinStein (redox reakce rozlišená do dvou píků - nejspíše jde o absorpční předpík a vyšší proud pozadí). Výše diskutované voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 23.



Obr. 23: Cyklické voltamogramy na tuze Tombow (modrá) a AinStein (červená). Horní graf zobrazuje CV v přítomnosti clozapinu ($c=0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), linie A,C. Linie (B,D) odpovídají CV podpůrného elektrolytu. Dolní graf obsahuje záznam CV promazinu ($c=0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Složení podpůrného elektrolytu: MeOH a fosfátový pufr ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}=7,5$) v poměru 2:1 (V/V). Skenovací rychlost $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Objasnění může přinést stavba tuhy AinStein, ve které tvoří nosnou kostru zesíťovaná struktura z oxidu křemičitého. Ta má za úkol dodávat tuze mechanickou odolnost. Současně však způsobí, že je tuha tvořena ostrůvky vodivého grafitu, oddělenými nevodivou kostrou z oxidu křemičitého. Ve výsledku takové uspořádání odpovídá sestavě mikroelektrodového pole. To se vyznačuje, ve srovnání s „makroelektrodou“, lepším poměrem faradaických a

kapacitních proudů a nižším IR spádem, vzhledem ke geometrické ploše elektrody. Pro mikroelektrodotový charakter tuhy AinStein hovoří i sigmoidní tvar voltamogramu získaný při studiu tohoto typu tuhy pomocí redoxních standardů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a ferrocenu. Dále byla využita pouze tuha AinStein. Pro získání představy o podobě povrchu použité tuhy bylo využito techniky AFM. Získaný snímek (Obr. 24) zobrazuje členitou boční stěnu tuhy, pokrytou rovnoběžnými brázdami.



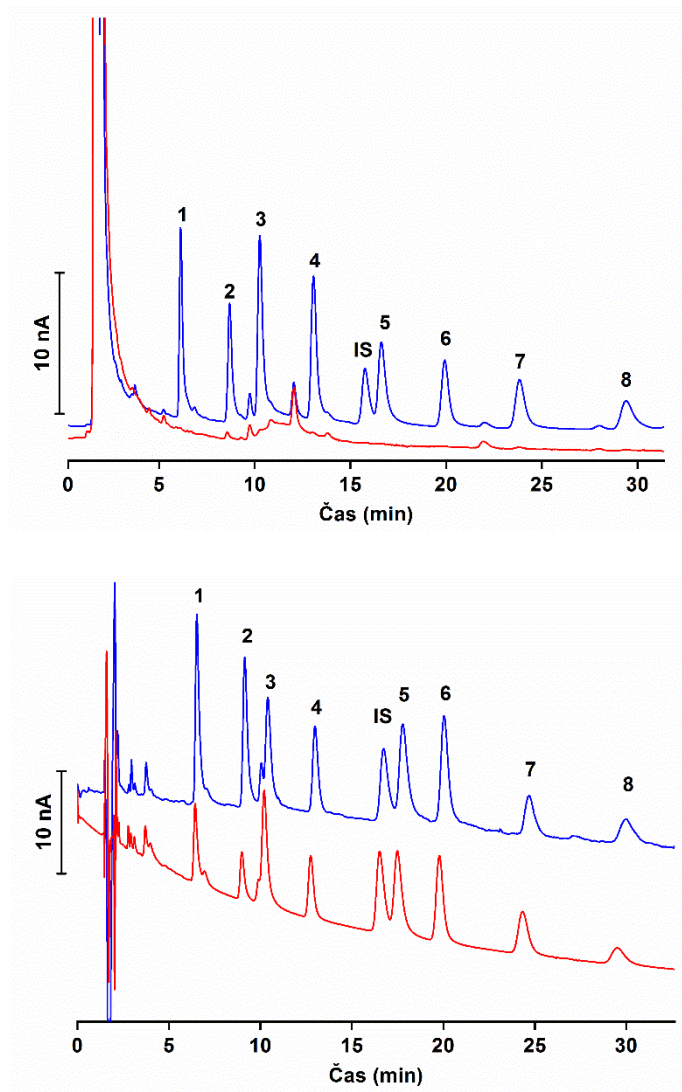
Obr. 24: AFM snímek boční stěny mikrotuhy (Pentel AinStein 0,2 mm).

4.4.2 Tuha v kapalinové chromatografii s amperometrickou detekcí

Uplatnění tuhové elektrody při detekci antipsychotických substancí předcházelo několik optimalizačních kroků HPLC separace. Všechna měření byla provedena na koloně s reverzní fází C8, 5 μm , 250x2,1 mm, Nucleodur Gravity s předkolonkou C8, obojí od výrobce Macherey-Nagel (Německo). Zásadní vliv na retenci má poměr vodné a organické složky v mobilní fázi, pH a koncentrace použitého pufru (iontová síla). Mobilní fáze o složení fosfátový pufr/acetonitril (58/48) sloužila jako výchozí bod. Ve zkoumaném rozsahu pH (4,5–8,5) se směrem k alkalické oblasti prodlužovaly retenční časy a rostlo rozlišení. S ohledem i na doporučené provozní podmínky kolony bylo jako vhodné pH zvolena hodnota 7,5. S tím jak rostla iontová síla pufru v koncentračním rozsahu 10-100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, klesala retence látek na stacionární fázi a zlepšoval se tvar píku. Koncentrace pufru 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ je rozumným

kompromisem mezi dobou analýzy, tvarem píku a rozlišením. Pro zlepšení separace bylo pozměněno i složení mobilní fáze. Dále používaná mobilní fáze obsahuje tyto složky K_2HPO_4 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}=7,5$)/ MeOH/ACN v poměru 47/7/46.

Modelovým vzorkem bylo telecí serum s přidavkem směsi vybraných antipsychotických látek, každá o výsledné koncentraci $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 25, horní). Po vysrážení proteinů acetonitrilem a centrifugací byl supernatant dávkován do HPLC. Vlastnosti vyvinutého detektoru s tuhovou elektrodou byly porovnány s komerční detekční celou. Vzhledem k tomu, že detektory obsahují rozdílné referenční elektrody, bylo nutné použít různé pracovní potenciály. Potenciál vložený na pracovní elektrodu tuhového detektoru byl 900 mV vs. Ag/AgCl , což odpovídá potenciálu 650 mV vs. Pd/H_2 pro komerční celu. Jak dokládá chromatogram (Obr. 25, dolní), nemá použití cely domácí konstrukce negativní vliv na tvar signálů ve srovnání s komerční amperometrickou průtokovou celou. Navíc se tuhová cela vyznačuje rychlejším ustálením základní linie.

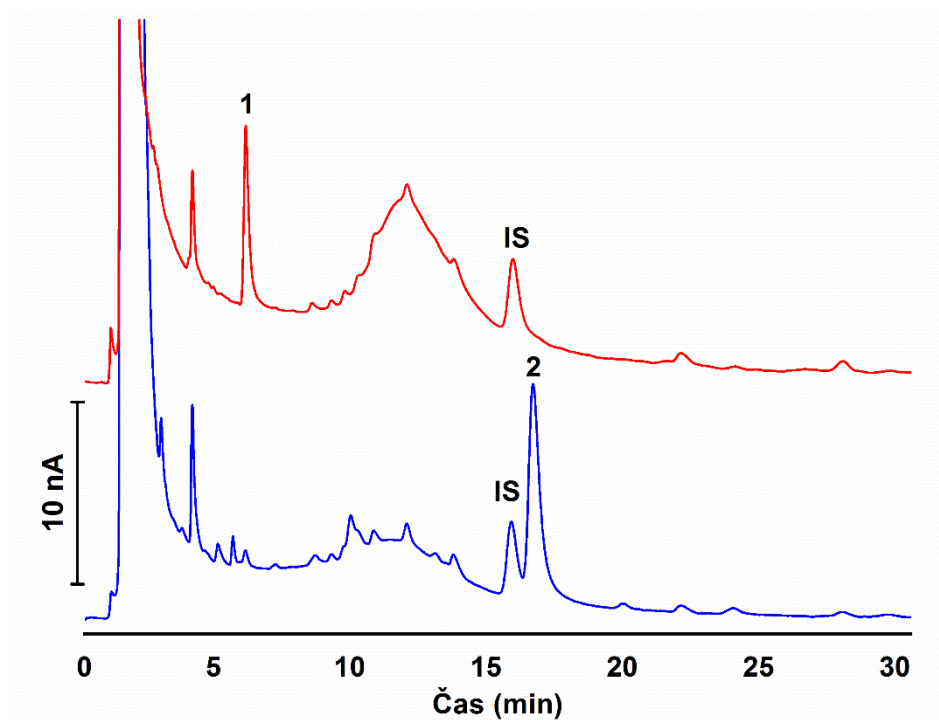


Obr. 25: Chromatogramy modelové směsi antipsychotických substancí. Horní graf ukazuje měření v umělém séru, červená linie odpovídá slepému vzorku, chromatogram séra obohaceného směsí sledovaných látek ukazuje modrá linie. Dolní graf porovnává chromatogramy změřené pomocí detektoru s tuhovou elektrodou (modrá) a na komerčním amperometrickém detektoru s elektrodou ze skelného uhlíku (červená). 1 quetiapin, 2 olanzapin, 3 clozapin, 4 flufenazin, IS promazin, 5 prometazin, 6 levomopremazin, 7 chlorpromazin, 8 thioridazin.

Reálný vzorek krevní plasmy pacientů s otravou olanzapinem a prometazinem byl upraven stejně jako modelové sérum a před nástřikem byl získaný supernatant ještě zředěn na polovinu deionizovanou vodou. Získaná informace o koncentraci daného léčiva v plasmě pacienta byla porovnána se standardní metodou LC-MS používanou v soudním lékařství. Naměřené údaje jsou v dobré shodě s referenční metodou a jsou shrnuty v Tab. 2; příslušný chromatografický záznam je na Obr. 26.

Tab. 2: Koncentrace antipsychotických látek v krevní plazmě pacientů, změřená metodami HPLC-ED a HPLC-MS a

	$c_{(ED)}$ (nmol·l ⁻¹)	$c_{(MS)}$ (nmol·l ⁻¹)	Výtěžek (%)
Plazma 1 (Olanzapin)	717.6 ± 3.0	704.2	101.9 ± 0.14
Plazma 2 (Prometazin)	1752.1 ± 2.98	1970	88.9 ± 0.11



Obr. 26: Chromatografická analýza reálných vzorků krevní plasmy pacientů. Červený chromatogram obsahuje signál olanzapinu (1). V modrém chromatogramu je signál prometazinu (2). Jako vnitřní standard (IS) je použit promazin.

5 Závěr

V předložené disertační práci byly studovány možnosti konstrukce a aplikace miniaturizovaných elektrod v chemické analýze. Pro tento účel byly využity v rutinní praxi méně obvyklé elektrodové materiály, uhlíkové vlákno a grafitová tuha, které jsou však velmi levné a snadno dostupné. Kromě konstrukce elektrod byly dále studovány postupy jejich dodatečných úprav za účelem vylepšení citlivosti nebo selektivity. Před vlastní analytickou aplikací byly elektrody podrobeny řadě fyzikálních měření. Objektem zájmu byly hlavně vlastnosti povrchu použitých materiálů jak v původní podobě, tak po aplikaci modifikujících postupů. Povrch byl studován z pohledu morfologie, s využitím zobrazovacích technik SEM, AFM a z pohledu chemického složení, pomocí metod EDX a XPS.

Mnohé přístupy studované v této práci vyžadovaly použití nestandardního vybavení. Musely být provedeny menší úpravy komerční instrumentace, jako např. záměna originálního detektoru v kapalinovém chromatografu za průtočnou amperometrickou celu, vyrobenou speciálně za účelem měření s využitím mikroelektrod. Jindy bylo potřeba zkonstruovat zcela nové přístroje, jako byl zdroj napětí pro jiskrový výboj či poziční zařízení pro automatickou mikrodialýzu.

Zkonstruované detektory byly testovány v několika oblastech:

1. Byl zkoumán elektrochemický způsob nanesení niklu a slitiny mědi a niklu (55/44, m/m), založený na přenosu materiálu z niklové resp. mědňiklové anody na uhlíkové vlákno, zapojené jako katoda v prostředí velmi čisté vody. Výsledná podoba upraveného vlákna byla závislá na době, po kterou reakce probíhaly. Po uplynutí asi 15 minut bylo získáno vlákno pokryté jednotlivými nanočásticemi výchozích kovů. Po delším časovém intervalu se místo částic začaly tvořit celistvé vrstvy, které měly charakter jak elementárních kovů, tak jejich oxidů a hydroxidů, díky změně mechanismu z elektroredukce na elektroforetickou depozici. A právě elektrody pokryté elektroforetickými vrstvami se prokázaly jako nejúčinnější pro stanovení glukosy, zejména pak ty, pro které byla výchozím materiálem slitina mědi a niklu. Hotové elektrody byly mimo modelových vzorků vyzkoušeny i na vzorcích zředěného lidského krevního séra. Stanovení glukosy bylo provedeno amperometricky v míchaném roztoku. Naměřená koncentrace glukosy v séru činila $5,13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a byla ve shodě s koncentrací zjištěnou komerčním glukometrem. Tato koncentrace odpovídá normální hladině

krevního cukru u zdravého jedince. Stejný typ senzoru byl úspěšně ověřen i na modelovém vzorku glukosy při měření metodou nástřikové průtokové analýzy.

2. Možnosti spojení nejjednodušší varianty kapilární elektroforézy s amperometrickou detekcí byly testovány na modelovém vzorku, obsahujícím snadno oxidovatelné fenolové kyseliny. Elektrodovým materiálem použitým v detektoru bylo uhlíkové vlákno, aktivované jiskrovým výbojem. Uhlíkové vlákno bylo připojeno na plus pól zdroje vysokého napětí, jako protielektroda sloužil wolfram. Snahou bylo vyhnout se „decouplingu“ separačního napětí a měřit s amperometrickou detekcí přímo pod vlivem separačního napětí, nebo jej alespoň omezit spojením kapilár různých vnitřních průměrů. Podařilo se dosáhnout dílčího úspěchu při separaci a detekci ferulové a gallové kyseliny, avšak měření trpělo mnoha technickými problémy, které plynuly z neodstíněného separačního napětí. Vizually byl pozorovatelný rozklad základního elektrolytu a vývoj bublin plynu na vlákně elektrody. Následkem byla velmi nízká životnost použitého senzoru, nestabilita separačního obvodu a problémy s elektronikou potenciostatu detektoru.
3. Elektrody z uhlíkového mikrovlákná lze aktivovat a čistit vhodným elektrochemickým programem, tzv. „pretreatment“, přímo v amperometrické cele bez potřeby demontáže. Na základě toho bylo možné sestavit zařízení, které je schopné automaticky odebírat vzorky a provádět na nich amperometrické stanovení. Protože bylo cílem měřit celkovou antioxidační kapacitu pív, která souvisí s celkovým obsahem snadno oxidovatelných látek, nebyla nutná aplikace chromatografických technik. Pivo je však poměrně komplikovaná matrice a obsahuje mnoho látek, které způsobují pasivaci elektrod. Tyto látky mají často vysokomolekulární strukturu, nabízí se tedy aplikace dialýzy pro jejich odstranění. Kompletní aparatura tedy obsahovala mikrodialyzační sondu, skrze kterou byl odebírán vzorek. Ten následně putoval do průtočné cely, kde byl analyzován amperometricky. Součástí aparatury byl potenciostat, který automaticky přepínal mezi měřícím a čistícím programem, aplikovaným na pracovní elektrodu. Získaná amperometrická data byla korelována se standardní metodou podle Kanedy [122], která využívá radikálové reakce a vyhodnocuje se fotometricky. V oblasti nízkého pracovního potenciálu (600 mV) bylo dosaženo velmi dobré korelace obou metod ($R^2 = 0,965$). S rostoucím potenciálem korelace klesá. S využitím HPLC s amperometrickou detekcí bylo zjištěno, že při vyšších potenciálech dochází k elektrooxidaci látek, které současně nejsou schopny odbarvovat radiálové činidlo DPPH používané při standardním stanovení (Kanedova metoda).

4. Grafitová mikrotuha byla bez dodatečných úprav použita jako senzor pro stanovení antipsychotických léčiv metodou HPLC s amperometrickou detekcí. Elektrochemické chování tuhy dvou výrobců (Tombow 0,5 mm a Pentel AinStein 0,2 mm) bylo nejprve studováno cyklickou voltametří. Tuhy byly testovány na vzorcích dvou antipsychotik, clozapinu a promazinu ($c = 0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Lepší elektrochemickou charakteristiku vykazovala tuha AinStein a byla tedy použita pro HPLC-ED měření. Chromatografická separace byla provedena na modelové směsi osmi antipsychotických látek v telecím séru. Limity detekce pro jednotlivé látky se pohybovaly v rozmezí 1–7,9 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zkonstruovaný detektor byl porovnán s komerční amperometrickou celou, obsahující skelný uhlík jako pracovní elektrodu. Z hlediska citlivosti byly oba detektory na podobné úrovni, detektor s tuhou však předčil komerční model v rychlejším ústálení základní linie a nepoměrně nižší cenou. Tuhový detektor byl testován i na reálném vzorku krevní plasmy lidských pacientů, diagnostikovaných s otravou olanzapinem resp. prometazinem. Nalezené koncentrace látek byly v dobré shodě se standární metodou HPLC-MS, používanou v soudním lékařství. Výtěžnost metody HPLC-ED vs. HPLC-MS byla 101,9 % pro olanzapin a 88,9 % pro prometazin.

Výše uvedené příklady použití miniaturních uhlíkových elektrod dobře dokumentují jejich široké pole aplikací při detekci v instrumentální analytické chemii. Zkonstruované elektrody vynikají dobrými elektrochemickými vlastnostmi, jako je citlivost a rychlá odezva. Selektivitu elektrod je možné „ušít na míru“ s pomocí rozsáhlé palety modifikací jejich povrchu. Neméně atraktivní je velmi nízká cena materiálů potřebných pro konstrukci těchto elektrod. Miniaturní uhlíkové elektrody budou dále studovány jak z pohledu analytické chemie, hledáním nových, zajímavých analytů, tak z pohledu jejich fyzikálních vlastností.

Seznam použitých zkratk

Wi-Fi	Standard pro bezdrátovou komunikaci, typicky bezdrátový internet
USB	Univerzální sériová sběrnice
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie/mikroskop
PVD	Technika napařování vrstev
ECP	Electrochemical pretreatment, elektrochemická úprava elektrod
AFM	Mikroskopie atomárních sil
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LED	Dioda emitující světlo
MS	Hmotnostní spektrometrie
CE	Kapilární elektroforéza
VN	Vysoké napětí
PEEK	Polyetereterketon, běžný materiál plastových součástí HPLC instrumentace
UV/Vis	Oblast ultrafialové a viditelné části elektromagnetického spektra
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, stabilní radikálové činidlo

6 Seznam použité literatury

- [1] K. Stulík, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical report), Pure and Applied Chemistry, 72 (2000) 1483-1492.
- [2] H.S. Jeong, S. Hwang, K.S. Min, S.B. Jun, Fabrication of Planar Microelectrode Array Using Laser-Patterned ITO and SU-8, Micromachines, 12 (2021) 1347.
- [3] R.A. Saylor, E.A. Reid, S.M. Lunte, Microchip electrophoresis with electrochemical detection for the determination of analytes in the dopamine metabolic pathway, ELECTROPHORESIS, 36 (2015) 1912-1919.
- [4] J. Wang, Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review, Talanta, 56 (2002) 223-231.
- [5] J. Wang, Portable electrochemical systems, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21 (2002) 226-232.
- [6] R. Bacon, Growth, structure, and properties of graphite whiskers, Journal of Applied Physics, 31 (1960).
- [7] E. Frank, F. Hermanutz, M.R. Buchmeiser, Carbon Fibers: Precursors, Manufacturing, and Properties, Macromolecular Materials and Engineering, 297 (2012) 493-501.
- [8] American Chemical Society National Historic Chemical Landmarks. High Performance Carbon Fibers.
<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/carbonfibers.html>.
Staženo 25. 5. 2022.
- [9] F. Gonon, R. Cespuglio, J.L. Ponchon, M. Buda, M. Jouvét, R.N. Adams, J.F. Pujol, [In vivo continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum], Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles, 286 (1978) 1203-1206.
- [10] J.L. Ponchon, R. Cespuglio, F. Gonon, M. Jouvét, J.F. Pujol, Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for in vitro and in vivo determination of catecholamines, Analytical Chemistry, 51 (1979) 1483-1486.
- [11] F. Gonon, C. Fombarlet, M. Buda, J.F. Pujol, Electrochemical treatment of pyrolytic carbon fiber electrodes, Analytical Chemistry, 53 (1981) 1386-1389.
- [12] M. Dayton, J. Brown, K. Stutts, R. Wightman, Faradaic electrochemistry at microvoltammetric electrodes, Analytical Chemistry, 52 (1980) 946-950.
- [13] R. Bravo, C. Hsueh, A. Brajter-Toth, A. Jaramillo, Possibilities and limitations in miniaturized sensor design for uric acid, Analyst, 123 (1998) 1625-1630.
- [14] M.L.A.V. Heien, P.E.M. Phillips, G.D. Stuber, A.T. Seipel, R.M. Wightman, Overoxidation of carbon-fiber microelectrodes enhances dopamine adsorption and increases sensitivity, Analyst, 128 (2003) 1413-1419.
- [15] G.M. Swain, T. Kuwana, Electrochemical formation of high surface area carbon fibers, Analytical Chemistry, 63 (1991) 517-519.
- [16] J.G. Roberts, B.P. Moody, G.S. McCarty, L.A. Sombers, Specific Oxygen-Containing Functional Groups on the Carbon Surface Underlie an Enhanced Sensitivity to Dopamine at Electrochemically Pretreated Carbon Fiber Microelectrodes, Langmuir, 26 (2010) 9116-9122.
- [17] V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, D. Riman, P. Jakubec, Z. Bartosova, V. Masek, P. Mojzes, J. Vacek, Electrochemical pretreatment of carbon fiber microelectrodes based on sinusoidal-wave potential cycling and its application to amperometric sensing of bioactive compounds, Current Analytical Chemistry, 9 (2013) 305-311.

- [18] A. Kuras, N. Gutmanienė, Preparation of carbon-fibre microelectrode for extracellular recording of synaptic potentials, *Journal of Neuroscience Methods*, 62 (1995) 207-212.
- [19] J. Millar, C.W.A. Pelling, Improved methods for construction of carbon fibre electrodes for extracellular spike recording, *Journal of Neuroscience Methods*, 110 (2001) 1-8.
- [20] D. Budai, Z. Molnár, Novel carbon fiber microelectrodes for extracellular electrophysiology, *Acta Biologica Szegediensis*, 45 (2001) 65-73.
- [21] M.P. Brazell, R.J. Kasser, K.J. Renner, J. Feng, B. Moghaddam, R.N. Adams, Electrocoating carbon fiber microelectrodes with Nafion improves selectivity for electroactive neurotransmitters, *Journal of Neuroscience Methods*, 22 (1987) 167-172.
- [22] G.A. Gerhardt, A.F. Oke, G. Nagy, B. Moghaddam, R.N. Adams, Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry, *Brain Research*, 290 (1984) 390-395.
- [23] G.A. Gerhardt, A.F. Hoffman, Effects of recording media composition on the responses of Nafion-coated carbon fiber microelectrodes measured using high-speed chronoamperometry, *Journal of Neuroscience Methods*, 109 (2001) 13-21.
- [24] C. Hsueh, A. Brajter-Toth, Electrochemical preparation and analytical applications of ultrathin overoxidized polypyrrole films, *Analytical Chemistry*, 66 (1994) 2458-2464.
- [25] K. Pihel, Q.D. Walker, R.M. Wightman, Overoxidized Polypyrrole-Coated Carbon Fiber Microelectrodes for Dopamine Measurements with Fast-Scan Cyclic Voltammetry, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 2084-2089.
- [26] W.R. Fawcett, M. Fedurco, Z. Kovacova, Z. Borkowska, Electrochemistry of Cysteine on Low-Index Single-Crystal Gold Electrodes, *Langmuir*, 10 (1994) 912-919.
- [27] G. Hager, A. Brolo, Adsorption/desorption behaviour of cysteine and cystine in neutral and basic media: Electrochemical evidence for differing thiol and disulfide adsorption to a Au(1 1 1) single crystal electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 550 (2003) 291-301.
- [28] P. Salaün, B. Planer-Friedrich, C.M.G. van den Berg, Inorganic arsenic speciation in water and seawater by anodic stripping voltammetry with a gold microelectrode, *Analytica Chimica Acta*, 585 (2007) 312-322.
- [29] G. Forsberg, J.W. O'Laughlin, R.G. Megargle, S.R. Koirtyihann, Determination of arsenic by anodic stripping voltammetry and differential pulse anodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry*, 47 (1975) 1586-1592.
- [30] P. Salaün, K.B. Gibbon-Walsh, G.M.S. Alves, H.M.V.M. Soares, C.M.G. van den Berg, Determination of arsenic and antimony in seawater by voltammetric and chronopotentiometric stripping using a vibrated gold microwire electrode, *Analytica Chimica Acta*, 746 (2012) 53-62.
- [31] J. Zavazalova, H. Dejmekova, J. Barek, K. Peckova, Tubular and Microcylindrical Platinum Electrodes for Amperometric Detection of Aminobiphenyls and Aminonaphthalenes in HPLC, *Electroanalysis*, 26 (2014) 687-696.
- [32] X. Bai, W. Chen, Y. Song, J. Zhang, R. Ge, W. Wei, Z. Jiao, Y. Sun, Nickel-copper oxide nanowires for highly sensitive sensing of glucose, *Applied Surface Science*, 420 (2017) 927-934.
- [33] L. Wang, Y. Xie, C. Wei, X. Lu, X. Li, Y. Song, Hierarchical NiO Superstructures/Foam Ni Electrode Derived from Ni Metal-Organic Framework Flakes on Foam Ni for Glucose Sensing, *Electrochimica Acta*, 174 (2015) 846-852.
- [34] J. Barek, A.G. Fogg, A. Muck, J. Zima, Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (2001) 291-309.
- [35] V. Halouzka, P. Jakubec, C. Gregor, D. Jancik, K. Papadopoulos, T. Triantis, J. Hrbac, Silver-Nafion coated cylindrical carbon fiber microelectrode for amperometric monitoring of hydrogen peroxide heterogeneous catalytic decomposition, *Chemical Engineering Journal*, 165 (2010) 813-818.

- [36] C.M. Welch, C.E. Banks, A.O. Simm, R.G. Compton, Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 12-21.
- [37] J. Suzuki, M. Yoshida, Y. Nishijima, K. Sekine, T. Takamura, Effect of a vacuum-deposited metal film on the CV of the Li insertion/extraction reaction at a graphitized carbon fiber electrode, *Electrochimica Acta*, 47 (2002) 3881-3890.
- [38] J. Goł, J. Osteryoung, Mercury-coated carbon fiber microelectrodes: Preparation and some properties, *Analytica Chimica Acta*, 181 (1986) 211-218.
- [39] J. Wang, P. Tuzhi, J. Zadeii, Evaluation of differential-pulse anodic stripping voltammetry at mercury-coated carbon fiber electrodes. Comparison to analogous measurements at rotating disk electrodes, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 2119-2122.
- [40] Y. Liu, H. Teng, H. Hou, T. You, Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 3329-3334.
- [41] Y. Liu, L. Zhang, Q. Guo, H. Hou, T. You, Enzyme-free ethanol sensor based on electrospun nickel nanoparticle-loaded carbon fiber paste electrode, *Analytica Chimica Acta*, 663 (2010) 153-157.
- [42] E.N. Navera, K. Sode, E. Tamiya, I. Karube, Development of acetylcholine sensor using carbon fiber (amperometric determination), *Biosensors and Bioelectronics*, 6 (1991) 675-680.
- [43] M. Regiart, A. Ledo, E. Fernandes, G.A. Messina, C.M.A. Brett, M. Bertotti, R.M. Barbosa, Highly sensitive and selective nanostructured microbiosensors for glucose and lactate simultaneous measurements in blood serum and in vivo in brain tissue, *Biosensors and Bioelectronics*, 199 (2022) 113874.
- [44] D. Blum, W. Leyffer, R. Holze, Pencil-leads as new electrodes for abrasive stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 8 (1996) 296-297.
- [45] A.M. Bond, P.J. Mahon, J. Schiewe, V. Vicente-Beckett, An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 345 (1997) 67-74.
- [46] J. Wang, A.-N. Kawde, E. Sahlin, Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA, *Analyst*, 125 (2000) 5-7.
- [47] J. Wang, A.-N. Kawde, Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analytica Chimica Acta*, 431 (2001) 219-224.
- [48] R. Navratil, A. Kotzianova, V. Halouzka, T. Opletal, I. Triskova, L. Trnkova, J. Hrbac, Polymer lead pencil graphite as electrode material: Voltammetric, XPS and Raman study, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 783 (2016) 152-160.
- [49] J. Kariuki, An Electrochemical and Spectroscopic Characterization of Pencil Graphite Electrodes, *Journal of the Electrochemical Society*, 159 (2012) H747-H751.
- [50] S. Buratti, M. Scampicchio, G. Giovanelli, S. Mannino, A low-cost and low-tech electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions, *Talanta*, 75 (2008) 312-316.
- [51] J. Sripirom, W.C. Sim, P. Khunkaewla, W. Suginta, A. Schulte, Simple and Economical Analytical Voltammetry in 15 μ L Volumes: Paracetamol Voltammetry in Blood Serum as a Working Example, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 10105-10110.
- [52] D. Riman, M.I. Prodromidis, D. Jirovsky, J. Hrbac, Low-cost pencil graphite-based electrochemical detector for HPLC with near-coulometric efficiency, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296 (2019) 126618.
- [53] Z. Huang, Y. Zhang, J. Sun, S. Chen, Y. Chen, Y. Fang, Nanomolar detection of chlorogenic acid at the cross-section surface of the pencil lead electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 321 (2020) 128550.

- [54] A. Alachkar, S. Alhassan, M. Senel, Lab-In-A-Syringe: A Novel Electrochemical Biosensor for On-Site and Real-Time Monitoring of Dopamine in Freely Behaving Mice, *ACS Sensors*, 7 (2022) 331-337.
- [55] G. Bhanjana, N. Mehta, G.R. Chaudhary, N. Dilbaghi, K.-H. Kim, S. Kumar, Novel electrochemical sensing of arsenic ions using a simple graphite pencil electrode modified with tin oxide nanoneedles, *Journal of Molecular Liquids*, 264 (2018) 198-204.
- [56] M. Nacef, M.L. Chelaghmia, O. Khelifi, M. Pontié, M. Djelaibia, R. Guerfa, V. Bertagna, C. Vautrin-UI, A. Fares, A.M. Affoune, Electrodeposited Ni on pencil graphite electrode for glycerol electrooxidation in alkaline media, *International Journal of Hydrogen Energy*, 46 (2021) 37670-37678.
- [57] Y.-Y. Huang, Y.-H. Pang, X.-F. Shen, R. Jiang, Y.-Y. Wang, Covalent organic framework DQTP modified pencil graphite electrode for simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol S, *Talanta*, 236 (2022) 122859.
- [58] G.S. Ustabasi, I. Yilmaz, M. Ozcan, E. Cetinkaya, Construction of Pencil Graphite Electrode Modified with Nafion, MWCNT, and Bismuth for Simultaneous Lead and Cadmium Detection, *Journal of The Electrochemical Society*, 168 (2021) 106513.
- [59] W.A. Ameku, V.N. Ataide, E.T. Costa, L.R. Gomes, P. Napoleão-Pêgo, D. William Provance, T.R.L.C. Paixão, M.O. Salles, S.G. De-Simone, A Pencil-Lead Immunosensor for the Rapid Electrochemical Measurement of Anti-Diphtheria Toxin Antibodies, *Biosensors*, 11 (2021) 489.
- [60] Ö. Sağlam, B. Kızılkaya, H. Uysal, Y. Dilgin, Biosensing of glucose in flow injection analysis system based on glucose oxidase-quantum dot modified pencil graphite electrode, *Talanta*, 147 (2016) 315-321.
- [61] Y. Li, M. Dvořák, P.N. Nesterenko, R. Stanley, N. Nuchtavorn, L.K. Krčmová, J. Aufartová, M. Macka, Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components, *Analytica Chimica Acta*, 896 (2015) 166-176.
- [62] C. Gu, Z. Jia, Z. Zhu, C. He, W. Wang, A. Morgan, J.J. Lu, S. Liu, Miniaturized Electroosmotic Pump Capable of Generating Pressures of More than 1200 Bar, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 9609-9614.
- [63] L. Zhou, J.J. Lu, C. Gu, S. Liu, Binary Electroosmotic-Pump Nanoflow Gradient Generator for Miniaturized High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 12214-12219.
- [64] I.M. Lazar, B.L. Karger, Multiple Open-Channel Electroosmotic Pumping System for Microfluidic Sample Handling, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 6259-6268.
- [65] S. Chatzimichail, F. Rahimi, A. Saifuddin, A.J. Surman, S.D. Taylor-Robinson, A. Salehi-Reyhani, Hand-portable HPLC with broadband spectral detection enables analysis of complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures, *Communications Chemistry*, 4 (2021) 17.
- [66] Y. Li, H.D. Tolley, M.L. Lee, Preparation of monoliths from single crosslinking monomers for reversed-phase capillary chromatography of small molecules, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1399-1408.
- [67] K.B. Lynch, A. Chen, S. Liu, Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation, *Talanta*, 177 (2018) 94-103.
- [68] K.B. Lynch, A. Chen, Y. Yang, J.J. Lu, S. Liu, High-performance liquid chromatographic cartridge with gradient elution capability coupled with UV absorbance detector and mass spectrometer for peptide and protein analysis, *Journal of Separation Science*, 40 (2017) 2752-2758.
- [69] T. Vovk, M. Bogataj, R. Roškar, V. Kmetec, A. Mrhar, Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector, *International Journal of Pharmaceutics*, 291 (2005) 161-169.

- [70] B.L. Hanssen, S. Siraj, D.K.Y. Wong, Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems, *Reviews in Analytical Chemistry*, 35 (2016) 1-28.
- [71] M. Gattrell, D. Kirk, A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation, *Journal of The Electrochemical Society*, 139 (1992) 2736.
- [72] M. Gattrell, D. Kirk, A study of the oxidation of phenol at platinum and preoxidized platinum surfaces, *Journal of the Electrochemical Society*, 140 (1993) 1534.
- [73] W. Harreither, R. Trouillon, P. Poulin, W. Neri, A.G. Ewing, G. Safina, Carbon Nanotube Fiber Microelectrodes Show a Higher Resistance to Dopamine Fouling, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 7447-7453.
- [74] S. Sharma, H.D. Tolley, P.B. Farnsworth, M.L. Lee, LED-Based UV Absorption Detector with Low Detection Limits for Capillary Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 1381-1386.
- [75] S. Schmid, M. Macka, P.C. Hauser, UV-absorbance detector for HPLC based on a light-emitting diode, *Analyst*, 133 (2008) 465-469.
- [76] A. Ishida, M. Fujii, T. Fujimoto, S. Sasaki, I. Yanagisawa, H. Tani, M. Tokeshi, A Portable Liquid Chromatograph with a Battery-operated Compact Electroosmotic Pump and a Microfluidic Chip Device with a Reversed Phase Packed Column, *Analytical Sciences*, 31 (2015) 1163-1169.
- [77] R.S. Martin, A.J. Gawron, B.A. Fogarty, F.B. Regan, E. Dempsey, S.M. Lunte, Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis/electrochemistry, *Analyst*, 126 (2001) 277-280.
- [78] A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 684-688.
- [79] S. Sloss, A.G. Ewing, Improved method for end-column amperometric detection for capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 577-581.
- [80] S. Park, C.E. Lunte, A perfluorosulfonated ionomer end-column electrical decoupler for capillary electrophoresis/electrochemical detection, *Analytical chemistry*, 67 (1995) 4366-4370.
- [81] D.-c. Chen, F.-L. Hsu, D.-Z. Zhan, C.-h. Chen, Palladium Film Decoupler for Amperometric Detection in Electrophoresis Chips, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 758-762.
- [82] J.S. Rossier, R. Ferrigno, H.H. Girault, Electrophoresis with electrochemical detection in a polymer microdevice, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 492 (2000) 15-22.
- [83] F.-M. Matysik, End-Column Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis, *Electroanalysis*, 12 (2000) 1349-1355.
- [84] B.M.D.C. Costa, S. Griveau, F. d'Orlye, F. Bedioui, J.A.F. da Silva, A. Varenne, Microchip electrophoresis and electrochemical detection: A review on a growing synergistic implementation, *Electrochimica Acta*, 391 (2021) 138928.
- [85] J. De Jong, R.G. Lammertink, M. Wessling, Membranes and microfluidics: a review, *Lab on a Chip*, 6 (2006) 1125-1139.
- [86] M. Ulbricht, Advanced functional polymer membranes, *Polymer*, 47 (2006) 2217-2262.
- [87] K. Sakai, Determination of pore size and pore size distribution: 2. Dialysis membranes, *Journal of Membrane Science*, 96 (1994) 91-130.
- [88] K.N. Schultz, R.T. Kennedy, Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications, *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 1 (2008) 627-661.
- [89] D. Wang, W. Zhu, Y. An, J. Zheng, W. Zhang, L. Jin, H. Gao, L. Lin, LC with Novel Electrochemical Detection for Analysis of Monoamine Neurotransmitters in Rat Brain After Administration of (R)-Salsolinol and (R)-N-Methylsalsolinol, *Chromatographia*, 67 (2008) 369-374.

- [90] G. Bazzu, M.G. Molinu, A. Dore, P.A. Serra, Microdialysis as a New Technique for Extracting Phenolic Compounds from Extra Virgin Olive Oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 1829-1835.
- [91] Y.-T. Lin, W.-S. Huang, H.-Y. Tsai, M.-M. Lee, Y.-F. Chen, In vivo microdialysis and in vitro HPLC analysis of the impact of paeoniflorin on the monoamine levels and their metabolites in the rodent brain, *Biomedicine (Taipei)*, 9 (2019) 11-11.
- [92] M.T. Bowser, R.T. Kennedy, In vivomonitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS*, 22 (2001) 3668-3676.
- [93] R. Migheli, G. Puggioni, S. Dedola, G. Rocchitta, G. Calia, G. Bazzu, G. Esposito, J.P. Lowry, R.D. O'Neill, M.S. Desole, E. Miele, P.A. Serra, Novel integrated microdialysis–amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: Design, construction, and validation, *Analytical Biochemistry*, 380 (2008) 323-330.
- [94] E. Peltola, A. Aarva, S. Sainio, J.J. Heikkinen, N. Wester, V. Jokinen, J. Koskinen, T. Laurila, Biofouling affects the redox kinetics of outer and inner sphere probes on carbon surfaces drastically differently – implications to biosensing, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22 (2020) 16630-16640.
- [95] D.E. Evans, R.M. Harrison, J.G. Ayres, The Generation and Characterization of Metallic and Mixed Element Aerosols for Human Challenge Studies, *Aerosol Science and Technology*, 37 (2003) 975-987.
- [96] E.C. Jameson, *Electrical discharge machining*, Society of Manufacturing Engineers, 2001.
- [97] J. Rozsypal, *Modifikované mikroelektrody pro stanovení vybraných kovů pulzními voltametričnými metodami a stripping analýzou*, Palacký University Olomouc, 2014.
- [98] D. Riman, D. Jirovsky, J. Hrbac, M.I. Prodromidis, Green and facile electrode modification by spark discharge: Bismuth oxide-screen printed electrodes for the screening of ultra-trace Cd(II) and Pb(II), *Electrochemistry Communications*, 50 (2015) 20-23.
- [99] Z. Bartosova, D. Riman, V. Halouzka, J. Vostalova, V. Simanek, J. Hrbac, D. Jirovsky, A comparison of electrochemically pre-treated and spark-platinized carbon fiber microelectrode. Measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human urine and plasma, *Analytica Chimica Acta*, 935 (2016) 82-89.
- [100] V. Halouzka, P. Jakubec, L. Kvitek, V. Likodimos, A.G. Kontos, K. Papadopoulos, P. Falaras, J. Hrbac, Deposition of Nanostructured Ag Films on Silicon Wafers by Electrochemical/Electrophoretic Deposition for Electrochemical and SERS Sensing, *Journal of The Electrochemical Society*, 160 (2013) B54-B59.
- [101] D. Riman, Z. Bartosova, V. Halouzka, J. Vacek, D. Jirovsky, J. Hrbac, Facile preparation of nanostructured copper-coated carbon microelectrodes for amperometric sensing of carbohydrates, *RSC Advances*, 5 (2015) 31245-31249.
- [102] P. Jakubec, M. Bancirova, V. Halouzka, A. Lojek, M. Ciz, P. Denev, N. Cibicek, J. Vacek, J. Vostalova, J. Ulrichova, J. Hrbac, Electrochemical Sensing of Total Antioxidant Capacity and Polyphenol Content in Wine Samples Using Amperometry Online-Coupled with Microdialysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 7836-7843.
- [103] K.E. Toghill, R.G. Compton, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation, *International Journal of Electrochemical Science*, 5 (2010) 1246-1301.
- [104] K. Tian, M. Prestgard, A. Tiwari, A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors, *Materials Science and Engineering: C*, 41 (2014) 100-118.
- [105] M. Jafarian, F. Forouzandeh, I. Danaee, F. Gobal, M.G. Mahjani, Electrocatalytic oxidation of glucose on Ni and NiCu alloy modified glassy carbon electrode, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 13 (2009) 1171-1179.

- [106] I. Danaee, M. Jafarian, F. Forouzandeh, F. Gobal, M.G. Mahjani, Kinetic Interpretation of a Negative Time Constant Impedance of Glucose Electrooxidation, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 15933-15940.
- [107] D. Singh, Characteristics and Effects of γ -NiOOH on Cell Performance and a Method to Quantify It in Nickel Electrodes, *Journal of The Electrochemical Society*, 145 (1998) 116-120.
- [108] A. Van der Ven, D. Morgan, Y. Meng, G. Ceder, Phase stability of nickel hydroxides and oxyhydroxides, *Journal of The Electrochemical Society*, 153 (2005) A210.
- [109] J. Chen, D. Bradhurst, S. Dou, H.-K. Liu, Nickel hydroxide as an active material for the positive electrode in rechargeable alkaline batteries, *Journal of The Electrochemical Society*, 146 (1999) 3606.
- [110] V.N. Tseluikin, Anodic dissolution of the copper-nickel alloy under transient conditions, *Protection of Metals*, 44 (2008) 521-523.
- [111] M. Alsabet, M. Grden, G. Jerkiewicz, Electrochemical Growth of Surface Oxides on Nickel. Part 1: Formation of α -Ni(OH)₂ in Relation to the Polarization Potential, Polarization Time, and Temperature, *Electrocatalysis*, 2 (2011) 317-330.
- [112] L.P. Bicelli, B. Bozzini, C. Mele, L. D'Urzo, A review of nanostructural aspects of metal electrodeposition, *International Journal of Electrochemical Science*, 3 (2008) 356-408.
- [113] A. Milchev, W.S. Kruijt, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, Distribution of the nucleation rate in the vicinity of a growing spherical cluster: Part 1. Theory and simulation results, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 362 (1993) 21-31.
- [114] I. Corni, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition: From traditional ceramics to nanotechnology, *Journal of the European Ceramic Society*, 28 (2008) 1353-1367.
- [115] L. Besra, M. Liu, A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD), *Progress in Materials Science*, 52 (2007) 1-61.
- [116] A.R. Boccaccini, I. Zhitomirsky, Application of electrophoretic and electrolytic deposition techniques in ceramics processing, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6 (2002) 251-260.
- [117] M.S. Kim, K.B. Kim, A Study on the Phase Transformation of Electrochemically Precipitated Nickel Hydroxides Using an Electrochemical Quartz Crystal Microbalance, *Journal of The Electrochemical Society*, 145 (1998) 507-511.
- [118] K.E. Toghill, L. Xiao, M.A. Phillips, R.G. Compton, The non-enzymatic determination of glucose using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron-doped diamond electrode or nickel foil electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147 (2010) 642-652.
- [119] F. Mavré, R.K. Anand, D.R. Laws, K.-F. Chow, B.-Y. Chang, J.A. Crooks, R.M. Crooks, Bipolar Electrodes: A Useful Tool for Concentration, Separation, and Detection of Analytes in Microelectrochemical Systems, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 8766-8774.
- [120] A. Šebestová, J. Petr, Fast separation of enantiomers by capillary electrophoresis using a combination of two capillaries with different internal diameters, *ELECTROPHORESIS*, 38 (2017) 3124-3129.
- [121] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1999, pp. 152-178.
- [122] H. Kaneda, N. Kobayashi, I. Takashio, I. Tamaki, K. Shinotsuka, Beer Staling Mechanism, *Master Brew. Assoc. Am. Tech. Q.*, 36 (1999) 41-47.