

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza toxikologických vzorků pomocí  
HPLC s elektrochemickou detekcí**

Diplomová práce

Autor práce:	Bc. Iveta Hloušková
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Daniel Riman, PhD.

**Olomouc 2020**

## **Bibliografická identifikace**

Autor	Bc. Iveta Hloušková
Název práce	Analýza toxikologických vzorků pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Mgr. Daniel Riman, PhD.
Rok obhajoby	2020
Abstrakt	Cílem práce bylo implementovat mikrotuhu jako pracovní elektrodu do kapilárního HPLC systému a demonstrovat její vlastnosti na směsi toxikologicky významných látek. Cílem bylo vyvinout metodu pro stanovení této směsi a analyzovat reálné vzorky intoxikovaných pacientů z klinické praxe.
Klíčová slova	tuha, mikrotuha, uhlíková elektroda, HPLC, antipsychotika
Počet stran	71
Jazyk	Český

## **Bibliographic identification**

Author	Bc. Iveta Hloušková
Title	The analysis of toxicological samples by HPLC with electrochemical detection
Type of thesis	Diploma
Department	Department of analytical chemistry
Supervisor	Mgr. Daniel Riman, PhD.
The year of presentation	2020
Abstract	The aim of this work was to implement micropencil lead as a working electrode into a capillary HPLC system and to demonstrate its properties on a mixture of toxicologically important compounds. The aim was to develop and optimize a method for determination of the mixture and to analyze real samples of intoxicated patients from clinical practice.
Keywords	Pencil lead, micropencil lead, carbon electrode, HPLC, antipsychotic
Number of pages	71
Language	Czech

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

**Poděkování:**

Děkuji svému vedoucímu Mgr. Danielovi Rimanovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a pomoc poskytnutou při vypracovávání této práce, stejně jako za podporu poskytnutou v průběhu celého studia. Poděkování patří doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, PhD. za poskytnutí pomůcek potřebných k provedení experimentů a vypracování této práce a dále Mgr. Vladimíru Halouzkovi, PhD. za poskytnutý materiál. Díky patří také Tomášovi Kocourkovi za pomoc při vytváření některých obrázků. Velké díky patří mé rodině a přátelům za podporu a dodávání sil v průběhu celého studia.

# Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2. 1 Tuha .....	9
2. 2 Grafit.....	9
2. 3 Jíl.....	10
2. 4 Výroba tuhy .....	11
2. 5 Rozdělení tuh podle tvrdosti.....	12
2. 6 Chemické vlastnosti tuhy.....	13
2. 6. 1 Volba vhodné tvrdosti elektrody pro analytické účely .....	13
2. 6. 2 Chemické složení tuhy.....	14
2. 6. 3 Strukturní vlastnosti povrchu.....	15
2. 7 Srovnání vlastností tuhy s jinými uhlíkovými elektrodami .....	16
2. 7. 1 Srovnání vlastností tuhy s elektrodou ze skelného uhlíku.....	17
2. 7. 2 Srovnání vlastností tuhy a mikrotuhy .....	17
2. 8 Výhody tuhy jako elektrody .....	18
2. 9 Úpravy povrchu tuhy a jejich aplikace .....	19
2. 9. 1 Elektrody bez povrchové úpravy .....	19
2. 9. 2 Povrchově upravené elektrody.....	21
2. 9. 3 Povrchově modifikované elektrody .....	26
2. 10 Design GPE a měřících cel .....	34
2. 10. 1 Statické cely.....	34
2. 10. 2 Cely pro elektrody na papírovém základě .....	35
2. 10. 3 Průtokové cely .....	35
2. 11 Antipsychotika .....	37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	39
3. 1 Chemikálie.....	39

3. 2 Pomůcky, přístrojové vybavení a podmínky měření .....	39
3. 2. 1 Cyklická voltametrie.....	39
3. 2. 2 HPLC .....	40
3. 2. 3 Příprava roztoků.....	41
3. 3 Výsledky a diskuze .....	43
3. 3. 1 Charakterizace elektrochemických vlastností jednotlivých látek .....	43
3. 3. 2 Vliv příspěvků plochy na proudovou odezvu .....	44
3. 3. 4 HPLC experimenty .....	47
4 Závěr .....	57
5 Seznam použitých zkratk .....	58
6 Seznam použité literatury .....	60

# 1 ÚVOD

Komerčně vyráběná grafitová tuha využívaná jako náplň do dřevěných a mechanických tužek je zajímavým elektrodo­vým materiálem. Svými vlastnostmi tuha odpovídá základním požadavkům na vhodný elektrodo­vý materiál, poskytuje reprodukovatelnou odezvu na analyty, má dostatečnou citlivost a zároveň nízký šum a je možné na ní dosáhnout nízkých limitů detekce a kvantifikace, které jsou dostatečné pro praxi.

Důležitou výhodou je její nízká pořizovací cena, vysoká uniformita a dobrá dostupnost. Její implementace do měřících cel je snadná, tyto cely je možné relativně snadno miniaturizovat a je možné je kombinovat s řadou analytických metod. Tuha nalézá uplatnění při elektrochemických stanoveních v klasickém neprůtočném uspořádání. Obtíže při aplikaci a složitější technické uspořádání však nedovolují širší použití tuhy jako elektrodo­vého materiálu v průtočných analytických systémech.

Cílem této diplomové práce bylo použít mikrotuhu jako pracovní elektrodu v kapilárním HPLC systému, demonstrovat její vlastnosti pomocí směsi 9 různých antipsychotik v krevním séru a provést stanovení antipsychotik v toxikologických vzorcích z klinické praxe.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tuha

Tuha je nástroj používaný k psaní a kreslení. Je to pevný materiál černošedé barvy, který na rozdíl od tekutých náplní do propisek a per zanechává na povrchu stopu setřením určité vrstvy částic ze svého povrchu. Tuha se dá snadno lámat, vede elektrický proud, teplo, a jsou u ní zaznamenány feromagnetické vlastnosti [1].

Na trhu jsou dostupné 2 typy tuh. Prvním typem jsou tuhy s větším průměrem (nad 1 mm), které jsou uzavírány do dřevěných pouzder a známe je jako běžné tužky. Druhým typem jsou tuhy s menším průměrem, tzv. mikrotuhy, které se používají jako náplň do mechanických tužek. Dostupné průměry těchto mikrotuh jsou v řádech desetin milimetrů, nejčastějším rozměrem je průměr 0,5 mm [2]. Oba typy tuh mají odlišný postup výroby. Mezičlánkem mezi klasickou tužkou a mechanickou tužkou je versatilka, kde je tuha o větším průměru umístěna do kovového pouzdra, což umožňuje snadnou výměnu tuhy za jinou.

Konkrétní složení tuhy se odvíjí od výrobce a od požadovaných výsledných vlastností (účel, průměr, tvrdost, barva atd.). Hlavními dvěma složkami jsou grafit a jíl. Ve výrobním procesu se dále využívají různá pojiva, oleje, vosky a další organické látky, mezi které patří i barviva.

### 2.2 Grafit

Grafit je krystalická forma uhlíku, která se v přírodě vyskytuje v metamorfovaných a vyvřelých horninách [3, 4]. Má ocelově šedou až černou barvu. Je nejběžnější přírodní formou uhlíku.

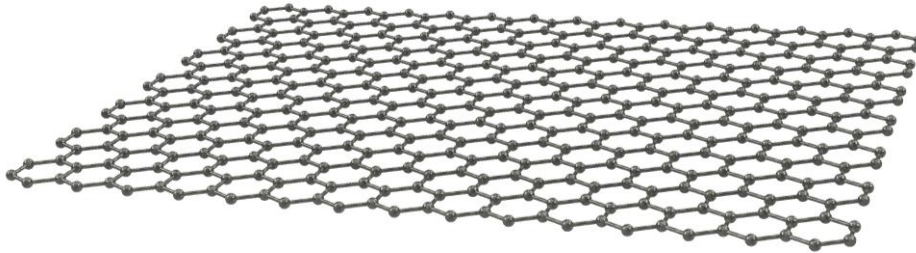
Jednotlivé atomy uhlíku jsou v grafitu uspořádány v hexagonální soustavě s hybridními  $sp^2$  orbitaly a tvoří tenkou planární vrstvu, tzv. grafen (Obr. 1) [3, 5]. Grafenový list má ve zcela planárním stavu nejnižší energii. Grafitová mřížka se skládá z velkého počtu grafenových vrstev, které jsou mezi sebou vázány van der Waalsovými silami. Díky těmto slabým interakcím po sobě tyto vrstvy snadno kloužou a na vhodném substrátu zanechávají tmavou stopu [5]. Díky tomu, že  $\pi$  elektrony grafitu jsou rovnoměrně distribuovány po celém grafenovém listu, je grafit výborným vodičem tepla a elektriny. Výhodou grafitu je chemická inertnost a odolnost vůči korozi [4, 6]. Grafit

se využívá pro výrobu elektrod, žáruvzdorných materiálů, maziv, baterií a pro další průmyslová odvětví. Je možné jej syntetizovat [4].

## 2.3 Jíl

Druhou hlavní složkou tuhy je jíl ze skupiny kaolinitu, nebo smektitu [7, 8]. Složení jílu se liší podle místa jeho výskytu a promítá se do složení výsledného produktu [9].

V jílu jsou nejvíce zastoupeny oxidy křemíku, hliníku, železa a obsahuje i celou řadu dalších kovových oxidů i mikroelementů [1, 10]. Sloučeniny prvků, které obsahuje, jsou pak přítomny ve výsledném produktu, tuze. Díky jílu je výsledný produkt pevnější, dodává tuze plasticitu [7].



Obrázek 1: Schéma grafenového listu

## 2. 4 Výroba tuhy

Prvním krokem při výrobě tuhy je přečišťování dvou hlavních složek grafitu a jílu. Nejprve se daná surovina, např. grafit, rozmělní na mikroskopické částice. Rozmělněný práškový grafit se mísí s horkou vodou, dokud se nevytvoří tekutá homogenní směs [9]. Ta se za stálého míchání vede přes síta do série několika trubek. Síto v každé následující trubce je jemnější než to předchozí, do poslední trubky ze série tedy přechází prakticky čistý materiál bez nečistot. Z přečištěného grafitu se poté odstraní veškerá voda. Jíl se čistí samostatně stejným způsobem jako grafit [11, 12].

Přečištěný grafit a jíl se smísí v žádaném poměru a spolu s vodou se směs znovu důkladně mele. Kvalita tuhy záleží na době, po kterou je směs drcena a homogenizována. Tento proces může probíhat až několik týdnů [9, 11].

Vzniklá hmota se vysuší, a poté se velkým tlakem vytlačuje ven ocelovými válci o různém průměru, tento rozměr rozhoduje o průměru výsledného produktu [9, 11, 13]. Dlouhý kusový válec, který vychází z ocelových forem je pak sekán na kratší délku pro snazší zpracování. Jednotlivé kusy jsou položeny na železný plát, kde dochází k jejich vyrovnání a vysušení při 100-300 °C [6, 12]. Vysušené kusy jsou nasekány na výslednou délku tužek [11]. Následuje další sušení, poté se tuhy vypalují při 1000 °C, kdy dochází k jejich vytvrzení [14]. Regulováním teploty při vypalování se dá částečně ovlivnit výsledná tvrdost tuhy [13].

Po vypálení jsou tuhy impregnovány ponořováním do horké olejové nebo voskové lázně, kdy dochází k adsorpci těchto maziv do mikroporézní struktury tuhy a zaplnění jejich pórů [2, 9]. Impregnace dává tuze hladké vzezření a výslednou schopnost psát [14]. Po impregnaci se tuhy opět suší [11].

Tento postup výroby neumožňuje produkci tuh s průměrem menším než 1 mm, kvůli lámavosti materiálové směsi [2, 13]. Proto je postup výroby modifikován a do materiálové směsi se jako pojivo místo jílu přidávají vyšší přírodní polymery, např. celulóza [6, 13]. V průběhu vypalování tuh v bezkyslíkové atmosféře dochází ke karbonizaci celulózy na uhlík. Výsledná nekeramická vazba je mechanicky odolná a pružná, proto je možné produkovat tuhy o průměru menším než 1 mm [2, 13].

## 2.5 Rozdělení tuh podle tvrdosti

Tvrdot tuhy se dá částečně ovlivnit teplotou vypalovací pece, největší vliv na ni má však poměr grafitu a jílu ve výrobní směsi. K označení jednotlivých stupňů tvrdosti tužek se v evropském systému používají písmena H pro tvrdší tuhy (z anglického „hardness“) a B pro tuhy měkčí (z anglického „blackness“).

H tuhy obsahují ve svém složení větší podíl jílu [10]. Tyto tuhy jsou tvrdší a odolnější vůči mechanickému porušení, používají se spíše pro technické účely. Tuhy označené písmenem B obsahují vyšší podíl grafitu, materiál je pak měkčí a snáze zanechává stopu při kontaktu s povrchem, stopa je černější. [15]. Tuhy s označením B se více používají v oblasti umění. K písmennému označení se přiřazují čísla, 10H je tuha s nejvyšší tvrdostí, 10B s nejnižší. Do škály patří také středně tvrdé tuhy HB a tuhy F (z anglického „fine“). Z hlediska tvrdosti celkem existuje 22 typů tuhy [14, 15]. Na Obr. 2 jsou ukázány stopy tuh různých tvrdostí.

Konkrétní poměr grafitu k jílu se v tuze dané tvrdosti může měnit podle výrobce [14]. Přesné složení materiálové směsi patří k výrobnímu tajemství každého podniku. Přibližné složení středně tvrdé tuhy HB značky Staedtler je 68% grafitu, 26% jílu a 5% vosku (w:w:w), poslední procento mohou tvořit další příměsi [15].

Tvrdot tuhy se po jejich výrobě kontroluje pomocí testu tvrdosti ASTM D3363. Tvrdot je schopnost materiálu odolat plastické deformaci. Test probíhá tak, že je tuha silou a pod určitým úhlem tlačena proti tvrdé podložce, na kterou je umístěn tenký film z vhodného materiálu. Sleduje se mechanické poškrábání, který tuha na filmu z daného materiálu zanechá [10].



Obrázek 2: Zobrazení stop tuh různých tvrdostí značky Pentel

## 2. 6 Chemické vlastnosti tuhy

### 2. 6. 1 Volba vhodné tvrdosti elektrody pro analytické účely

Dvě hlavní složky tuhy mají rozdílné elektrické vlastnosti. Grafit je výborný vodič, zatímco jíl je izolant. Elektrická vodivost tuhy se mění s obsahem jílu, tedy s její tvrdostí [7, 16]. Vodivost běžných uhlíkových elektrod silně závisí na obsahu jejich uhlíkové složky, proto se z teoretického hlediska zdají pro analytické účely optimální měkké tuhy (B tuhy) s vyšším obsahem grafitu [14]. V literatuře lze nalézt využití tuh různých tvrdostí. Volba vhodné tvrdosti se odvíjí od více faktorů, autoři se v názoru na vhodnou tvrdost tuhy v mnoha případech rozcházejí [17].

Měkké tuhy poskytují vysokou proudovou odezvu [18, 19], zároveň je ale pozorována nižší reprodukovatelnost záznamu při opakovaných měřeních. Tyto tuhy jsou často využívány k výrobě kreslených elektrod [15, 20-22]. Kreslené elektrody také trpí nižší reprodukovatelností záznamu, v jejich případě je obtížné zajistit stejnou intenzitu zanechané stopy. Jiné výzkumy využívají tuhy střední tvrdosti HB, jelikož při výzkumu vykazaly ve srovnání s jinými testovanými tuhami nejvyšší poměr signálu a šumu [23]. Důležitým parametrem pro vhodnost elektrodového materiálu je potenciálová píková separace  $\Delta E_p$ , která naznačuje rychlejší přenos elektronu na povrchu elektrody a lepší reverzibilitu systému. Některé výzkumy uvádějí, že nejnižší  $\Delta E_p$  byla pozorována u HB tuh [24], zatímco jiné její nejnižší hodnotu pozorovali u H tuh [6, 13]. Tavares a kol. [13] zkoumali voltametrické chování tuh několika tvrdostí od 3 různých výrobců. Lepší poměr signálu a šumu, lepší citlivost a reprodukovatelnější odezvu vykazaly tvrdší tuhy, a to bez ohledu na výrobce.

Řada autorů vyzdvihuje použití tvrdších tuh kvůli dobré reprodukovatelnosti záznamu. Díky vyššímu obsahu jílu jsou tuhy pravděpodobně rezistentnější vůči zanášení, měkké tuhy mají díky grafitové složce silnější adsorpční vlastnosti [17, 25]. Stradolini a kol. [17] testovali schopnost tuh odlišných tvrdostí odolat zanášení. Z 20 testovaných tři nejměkčí použité tuhy se téměř okamžitě zanesly a nebylo možné je využít k dalším experimentům. Na měkkých tuhách bylo dosaženo vyšší odezvy, bohužel současně vykazaly vyšší hodnotu směrodatné odchylky. Z výsledků vyplývá, že zatímco grafitová složka zajišťuje elektroaktivitu povrchu, tak jílová složka chrání elektrodu před zanášením. K analýze je tedy vhodný určitý kompromis mezi vysokou proudovou

odezvou a ochranou proti zanášení. K dalším experimentům autoři využili tuhu tvrdosti 3H. Vhodnost tvrdších tuh jako elektrodového materiálu potvrzuje řada dalších prací [16, 26, 27].

Jak lze z výše uvedených informací pochopit, vhodná tvrdost tuhy se odvíjí od více parametrů. Na konečnou volbu má vliv cílový analyt a použitá metoda, podílí se na ní také konstrukce cely. Tuhy o stejné tvrdosti, ale různých značek vykazují rozdílné voltametrické chování [13, 14]. Vliv na vhodnost tuhy může mít také způsob úpravy povrchu, po kterém se její elektrochemická odezva může dramaticky měnit (viz Kap. 2. 9. 2) [14].

## 2. 6. 2 Chemické složení tuhy

Základní složení tuh deklarované výrobcí je potvrzené řadou vědeckých studií [10, 15, 28]. Nathani a kol. [29] ve své rešerši např. uvádějí, že B tuhy obsahují přibližně 85 % grafitu, složení HB tuhy je přibližně 68 % grafitu, 26 % jílu a 5 % vosku, poslední procento mohou tvořit další příměsi. Přesné složení tuh se mění s výrobcem.

Mimo uhlík jsou v tuze nejvíce zastoupenými prvky křemík a kyslík [29]. Denman a kol. [9] zkoumali chemické složení 11 různých tuh. Podle jejich výzkumu jsou kromě výše uvedených v největším zastoupení prvky sodík, hořčík, hliník, draslík, vápník, titan a železo. Toto prvkové složení potvrzují i jiné výzkumy, další autoři uvedli také přítomnost dusíku a síry [1, 30]. Tyto prvky se v tuhách vyskytují v různých sloučeninách, nejčastěji ve formě oxidů. Jejich množství, zvláště množství oxidu křemičitého, hlinitého a železitého, je spjato s obsahem jílového podílu v tuze. Při vypalování tuh vznikají na jejich povrchu hlinito-křemičité oxidy, tzv. mulit [10].

Povrchová vrstva tuhy je vždy do jisté míry oxidovaná. Vyskytují se zde vazby uhlíku s kyslíkem, a to hlavně ve formě C-O a C-OH, vazby C=O se vyskytují zřídka. Obecně vzato vazby kyslíku s uhlíkem zabírají okolo 10 % povrchového uhlíku [2, 31]. Výsledný poměr těchto dvou atomů je opět ovlivněn přítomností jílu a dalších pojivových materiálů [31], kdy tvrdší tuhy mají poměr kyslíku k uhlíku vyšší, než tuhy měkké [28]. Asi 20 % celkového povrchu tuhy je tvořeno oxidy křemíku. SiO lze na povrchu nalézt ve větší míře než SiO<sub>2</sub>, pravděpodobně důsledkem zahřívání tuh při výrobním procesu, které probíhá v bezkyslíkové atmosféře při teplotách vhodných pro redukci SiO<sub>2</sub> [2].

Tuha se jako elektroda obvykle využívá jednorázově, každé měření tedy probíhá na jiném kusu, nebo je možné její povrch obnovit zkrácením její délky. Aby bylo možné tuhu takto používat, je důležité, aby jednotlivé kusy měly po celé délce stejné složení a také

aby se nelišilo složení jednotlivých kusů. Shodnost složení zkoumali Denman a kol. [9]. Z jejich výzkumu vyplynulo, že se složení jednoho kusu po celé jeho délce nemění, ani se nemění složení několika kusů v rámci stejného balení. Toto tvrzení koresponduje s postupem výroby, kdy má docházet k dlouhodobé a důkladné homogenizaci jednotlivých komponent. Stejně složení jednotlivých kusů ze stejné šarže potvrzuje také reprodukovatelnost signálu po výměně elektrody za nový kus [14, 26]. Analýza tuh ze dvou různých balení od stejného výrobce zakoupených v odstupu několika měsíců ukázala rozdílné prvkové složení daných vzorků. Variabilita v prvkovém složení tuh produkovaných s takovým časovým odstupem, stejně jako variabilita ve složení tuh od různých výrobců, je svázána s obsahem grafitu a jílu, kdy každý výrobce má svůj vlastní zdroj těchto surovin. Největší rozdíly se projeví v obsahu vápníku, železa, hořčíku, zinku, manganu a hliníku, tedy prvků běžně se vyskytujících v jílu [9].

### **2. 6. 3 Strukturní vlastnosti povrchu**

Morfologie povrchu je důležitým aspektem vodivých materiálů, odvíjí se od ní elektrochemické vlastnosti elektrody. Nepravidelná morfologie povrchu zvětšuje aktivní povrch a přispívá k vysoké elektrochemické aktivitě materiálu [20]. Laterální povrch tuh je spíše hladký, některé mikrotuhy vyráběné lisováním grafitu a vyšších polymerů mají podélné drážky, které vznikají při protlačování výrobního materiálu ocelovými válečky [2, 32, 33] Při větším přiblížení lze pozorovat, že povrch má porézní strukturu a je tvořen nepravidelnými útvary, grafitovými vločkami a jílovými částicemi s rozměry řádově v nanometrech [6]. Okraje těchto šupinek jsou nositeli elektroaktivních skupin. Povrch tvrdších tuh je méně uspořádaný a vyskytuje se na něm více šupinek s ostřejšími okraji než u měkčích tuh, proto tvrdší tuhy vykazují vyšší elektrochemickou aktivitu a mírně rychlejší přenos elektronu, než tuhy měkké [6, 28]. Ačkoliv je vysoká elektrochemická aktivita pozorována již u tuh bez jakékoli předchozí aktivace povrchu, lze ji ještě zvýšit např. elektrochemickou aktivací [20]. Metodami aktivace povrchu se dále zabývá

Kap 2. 9. 2. Tím, že je povrch tuhy tvořen z oblastí nevodivého jílu a vodivého grafitu, dá se jeho chování navenek přirovnat k mikroelektrodovému poli [14, 34]. Tímto jevem je možné vysvětlit také nízký poměr signálu a šumu, který tuhy obecně vykazují.

Uhlík je na povrchu tuh v konfiguraci  $sp^2$  a  $sp^3$ . Převaha jedné konfigurace nad druhou se u jednotlivých výrobců liší [2, 31]. Díky tomu, že se uhlík vyskytuje v obou těchto stavech, má tuha vodivé a adsorpční vlastnosti grafitu a zároveň je chemicky

a mechanicky odolná. [14]. Díky tomu je povrch tuhy v průběhu elektrochemického měření chemicky stabilní a nedochází k žádným jeho změnám [35]. V případech, ve kterých na povrchu tuhy dominují  $sp^3$  vazby, jde až o podobnost s diamantovými uhlíkovými filmy [2].

## **2. 7 Srovnání vlastností tuhy s jinými uhlíkovými elektrodami**

Elektrochemické vlastnosti tuhy jsou v řadě výzkumů srovnány s ostatními běžně používanými uhlíkovými elektrodami. Ve svých pracích se mnoho autorů shoduje, že výsledky dosažené na tuze a jiných uhlíkových elektrodách jsou z hlediska velikosti odezvy i elektronové kinetiky srovnatelné [6, 27]. Někteří autoři pozorovali na tuze lépe definované píky, vyšší odezvu a dosáhli nižších limitů detekce (LOD) [36-38]. Tuha má velký elektroaktivní povrch, větší než některé jiné uhlíkové elektrody [39]. Svým kapacitním proudem se tuha blíží k vlastnostem borem dopovaných diamantových elektrod (BDDE), a v literatuře lze nalézt záznamy o nižším kapacitním proudu na tuze než na BDD [2]. Tuhy obvykle vykazují velmi nízkou úroveň šumu a s výjimkou BDD je šum na tuze nižší než na ostatních uhlíkových elektrodách [37, 40]. Nízký šum může být mimo jiné výsledkem faktu, že při oxidaci sloučenin je možné na tuze využít nižší potenciál, než u jiných uhlíkových elektrod [37, 41]. Jak již bylo zmíněno dříve, tuha se dá využít k výrobě kreslených elektrod, které se svým designem dají přirovnat k sítotiskem připraveným elektrodám (SPE). Oba typy elektrod jsou jednorázové a dají se využít pro mikroanalýzu. Výhodou kreslených elektrod oproti SPE je jejich cena, naopak SPE zase poskytují reprodukovatelnější odezvu [42].

Největším problémem pevných uhlíkových elektrod je jejich zanášení oxidačními produkty sloučenin, které pak tvoří na povrchu elektrody tenký film a deaktivují část jejich povrchu [6]. Výsledkem zanášení povrchu elektrody je pokles odezvy při následných měřeních. Aby se tento jev potlačil a odezva elektrody zůstala reprodukovatelná, zařazuje se do postupu analýzy čistící krok, který povrch elektrody obnovuje. Elektrody se čistí, leští, nebo se elektrochemicky aktivují před každým měřením. Takovýmto postupem se prodlužuje doba analýzy, v některých případech může také dojít ke zničení krystalové struktury grafitu [43, 44]. Toto čištění často nezaručí dosažení původní proudové odezvy [23].



V případě tuhy zanášení povrchu nehraje velkou roli. Tuha není náchylná ke tvorbě oxidačních produktů jako jiné typy uhlíkových elektrod [6]. Je schopná detekovat velmi nízké koncentrace analytů, při kterých k zanášení povrchu prakticky nedochází. Jak již bylo zmíněno dříve, tuha se obvykle využívá jako jednorázová elektroda, je tedy po analýze vyměněna za nový kus a případná deaktivace části povrchu neovlivňuje další měření. Povrch tuhy může být také obnoven zkrácením její délky. Tuto obnovu povrchu elektrody přirovnali Wang a kol. [36] ke rtuťové kapající elektrodě, v obou případech je pro každou analýzu dostupný čerstvý povrch elektrody. Taková analogie mezi ostatními pevnými elektrodami mimo tuhu neexistuje.

### **2. 7. 1 Srovnání vlastností tuhy s elektrodou ze skelného uhlíku**

Elektroda ze skelného uhlíku (GCE) je jednou z nejpoužívanějších pevných uhlíkových elektrod. Jejími výhodami jsou vysoká chemická odolnost mimo jiné i vůči kyselinám. Právě pro její vlastnosti a širokou škálu aplikací autoři nejčastěji srovnávají vlastnosti tuh právě s jejími vlastnostmi.

Tuha je ve srovnání s GCE poréznější a má tedy větší elektroaktivní povrch [14, 45], díky čemuž je schopná detekovat velmi nízké koncentrace analytů. V mnoha studiích je na tuze dosahováno citlivější a reprodukovatelnější odezvy na analyt než na GCE [46-48]. Při analýze biologických vzorků byla ve výzkumu Kariukiho a kol. [28] na tuze ve srovnání s GCE zaznamenána vyšší proudová odezva. Výhodou tuhy oproti GCE je, že k oxidaci sloučenin je třeba nižších hodnot potenciálu [18]. Zároveň lze na tuze dosáhnout lepšího tvaru píku [49]. Jak již bylo zmíněno, kinetika přenosu elektronu na povrchu tuhy se může odvíjet od použité tvrdosti, proto je na toto hledisko možné nalézt rozdílné názory. Podle některých výzkumů má rychlejší kinetiku přenosu elektronu GCE [28], v jiných výzkumech je kinetika popsána jako srovnatelná [47]. Z celkového nadhledu vyplývá, že oba typy elektrod vykazují srovnatelné výsledky a záleží spíše na stanovovaném analytu [2, 14, 24, 45].

### **2. 7. 2 Srovnání vlastností tuhy a mikrotyhy**

Mírné rozdíly v elektrochemickém chování je možné nalézt i mezi standardně vyráběnou tuhou s větším průměrem a mikrotuhou. David a kol. [26] uvádí, že na klasické tuze je dosahováno lepší citlivosti a reprodukovatelnosti záznamu a lépe probíhá přenos elektronu

[47]. Vlastnosti mikrotuhy se však více přibližují mikroelektrodovým vlastnostem. Díky svému rozměru mají mikrotuhy vyšší proudovou hustotu a širokou difuzní vrstvu, kdy na stejnou plochu difunduje větší množství analytu. Jako nevýhoda mikrotuhy je uváděna její křehkost, a také fakt, že kvůli absenci obalu může být její povrch snadněji kontaminován [47]. Celu s mikrotuhou lze lépe miniaturizovat a spojit ji s různými analytickými metodami. Díky svým rozměrům je snazší ji implementovat do průtočného systému.

## 2. 8 Výhody tuhy jako elektrody

Velkou výhodou tuhy jako elektrodového materiálu je nízká cena a snadná dostupnost, kterou vyniká nad jinými uhlíkovými elektrodami. Nízká pořizovací cena a dostupnost ji dovoluje používat jako jednorázovou elektrodu, čímž se zjednodušuje manipulace s ní a značně se zkracuje celková doba analýzy. Povrch tuhy lze snadno obnovit zkrácením její délky, v případě potřeby je tedy možné použít jednu elektrodu pro více měření [43]. Snadná úprava její délky také umožňuje lepší uzpůsobení pro danou měřící celu. Cely používající tuhu jako pracovní elektrodu lze dobře miniaturizovat a je možné provádět analýzu v malých objemech vzorku [45].

Povrch tuhy vykazuje vysokou odolnost a chemickou stabilitu. Tuhy jsou dobrým materiálem pro studium průběhu a reverzibility oxidačně-redukčních jevů [45]. Mají široké potenciálové okno, při měření je možné použít negativnější hodnoty potenciálu než v případě kovových elektrod [26, 43], čímž se rozšiřuje jejich spektrum aplikací. Tuha vykazuje nízký šum a je na ní dosahováno nízkých LOD a LOQ, díky čemuž je vhodná pro analýzu vzorků s nízkou koncentrací analytu, aniž by bylo nutné provádět prekoncentraci. Tím se opět zkracuje celková doba analýzy [45]. Povrch tuhy je možné díky jeho adsorpčním vlastnostem modifikovat tak, aby měl vyšší selektivitu a citlivost vůči cílovému analytu [14, 26]. Způsoby modifikace povrchu tuhy se zabývá Kap. 2. 9. 3.

V neposlední řadě hraje v chemii roli také ekologický faktor. Tuha je v podstatě přírodním materiálem, je šetrná k životnímu prostředí a není toxická. Díky tomu nevyžaduje speciální podmínky zacházení, skladování ani likvidace na rozdíl od jiných, např. rtuťových elektrod [6, 26]. V případě použití tuhy v analýze není nutné laboratoře vybavovat žádným speciálním zařízením.

## 2. 9 Úpravy povrchu tuhy a jejich aplikace

Z morfologie a elektrických vlastností povrchu tuhy popsaných v předchozích kapitolách vyplývá, že běžně dostupná grafitová tuha je vhodným elektrodovým materiálem. Toto tvrzení je podloženo celou řadou výzkumů, ve kterých je tuha jako pracovní elektroda využita. Povrch tuhy vykazuje vysokou elektrochemickou aktivitu již bez jakékoliv úpravy, přesto se někteří autoři rozhodli zařadit do procesu analýzy její povrchovou úpravu, aby tak dosáhli ještě vyšší elektrochemické aktivity.

Povrch elektrody může být upravován mechanicky, chemicky, nebo elektrochemicky, stále častěji jsou ve výzkumech využívány adsorpční vlastnosti povrchu tuhy a jsou vyvíjeny rozsáhlejší modifikace vhodnými chemickými strukturami. Tuha pak v některých případech slouží jako nosič pro jiné elektroaktivní materiály, které významně mění vlastnosti jejího povrchu, na samotné redoxní reakci se nepodílí [6, 50]. Následující kapitoly se zabývají využitím tuhy a možnostmi úpravy jejího povrchu, které lze nalézt v literatuře.

### 2. 9. 1 Elektrody bez povrchové úpravy

Povrch tuhy vykazuje dobré elektrochemické vlastnosti i bez jakékoliv povrchové úpravy. Tím, že je povrch tuhy tvořen nepravidelnými šupinkami, nachází se na něm dostatek elektroaktivních míst pro oxidaci a redukci molekul analytu. Díky tomu, že nedochází k žádné úpravě povrchu, tak se zkracuje celkový čas analýzy a zjednodušuje se manipulace s elektrodou. Tuha si tak zachovává výhodu nízké ceny a snadné dostupnosti, kterou vyniká oproti ostatním pevným elektrodám.

Tab. 1 zobrazuje některé výzkumy, které využívají tuhu s neupraveným povrchem jako pracovní elektrodu. Z těchto výzkumů vyplývá, že tuhu bez povrchové úpravy lze využít mimo jiné jako biosenzor pro DNA hybridizace a také pro stanovení látek ve složitějších matricích, je tedy možné provádět stanovení látek v reálných vzorcích.

Tabulka 1: Přehled některých výzkumů používajících jako pracovní elektrodu povrchově neupravovanou tuhu (průměr tuhy je v mm)

<b>Typ</b>	<b>Analyt</b>	<b>Matrice</b>	<b>Metoda</b>	<b>Zdroj</b>
Rotring 0,5 HB	celkový obsah polyfenolů jako kyselina kávová	vodné extrakty čaje	DPV	[51]
Rotring 0,5 HB	kyselina rozmarýnová	vodné extrakty čaje	DPV	[52]
průměr 0,5	kyselina chlorgenová	doplněk stravy (tablety)	DPV	[53]
průměr 0,5	celkový obsah fenolů jako kyselina kávová, antioxidanty	vodné extrakty čaje	FIA	[23]
tvrdost HB	kyselina askorbová	pomerančový džus	CV	[24]
Rotring 0,5 HB	vitamíny B <sub>1</sub> a B <sub>6</sub>	Milgama NA vials (VB1, VB6, kyselina vinná)	DPV	[54]
Tombo 0,5	interakce flavonoidů a iontů Cu <sup>2+</sup>	standardy	DPV	[45]
Tombow Ultra-polymer 0,5 2B	eugenol	desinfekční prostředek Dišinol	DPV	[55]
Pentel Hi-polymer Super C505 0,5 HB	DNA a RNA	standardy	AdSV	[36]
Rotring 0,5 HB	oligonuklidy	standardy	AdS-DPV	[56]
0,5 HB	famotidin	tablety Famotidin ZENTIVA	DPV	[49]
Rotring, 0,5 2B	flutamid a irinocetan	moč a krevní sérum	SW-CSV	[19]
0,5 HB	paklitaxel	krevní plasma	LSV	[39]
Rotring 0.5 HB	klozapin	krevní plasma	DPV	[57]

## **2. 9. 2 Povrchově upravené elektrody**

Přestože pro mnoho analytů dává již neupravená tuha dostatečnou odezvu, někteří autoři zařazují před analýzu povrchovou úpravu elektrody. Takovou úpravou dochází k aktivaci a zvětšení povrchu, což může významně ovlivnit výsledek konečného stanovení [14]. Na povrchově upravovaných elektrodách jsou často získávány vyšší a reprodukovatelnější proudové odezvy.

Povrchová úprava elektrody spočívá v jejím mechanickém, nebo chemickém čištění, také je možné povrch elektrochemicky aktivovat. Často se uvedené možnosti používají v kombinaci. Existují i méně obvyklé způsoby úpravy elektrod, např. tepelná úprava za vakua, úprava laserem, mikrovlnnou plasmou, nebo radiofrekvenční úprava povrchu elektrody [50]. Výsledek zvolené úpravy povrchu elektrody závisí na vlastnostech daného kusu (průměr, tvrdost, výrobce), na cílovém analytu, přítomných rušivých látkách a také na použité metodě.

### **2. 9. 2. 1 Mechanická a chemická aktivace povrchu**

Při mechanické úpravě je cílem odstranit z povrchu elektrody nečistoty a adsorbované částice. V případě tuhy se obvykle provádí leštění na průřezu pomocí filtračního papíru, nebo jiného vhodného materiálu. Odstraněním adsorbovaných částic je dosaženo stejného elektroaktivního povrchu jednotlivých elektrod. Plášť elektrody se pak pro analýzu obvykle obaluje parafilmem, nebo teflonovou páskou [58].

Při chemickém čištění povrchu se tuha ponechává po určitou dobu v organickém rozpouštědle nebo směsi. V roztoku dochází k rozpuštění a desorpci nečistot z jejího povrchu. Používají se vysoce čistá rozpouštědla, např. dichlormethan, acetonitril, toluen, nebo ethanol [50]. K čištění povrchu lze využít i anorganické kyseliny, např.  $\text{HNO}_3$ , nebo HF [2, 59]. Mechanická a chemická úprava povrchu jsou často prvními kroky přípravy povrchu pro elektrochemickou aktivaci nebo modifikaci dalšími strukturami.

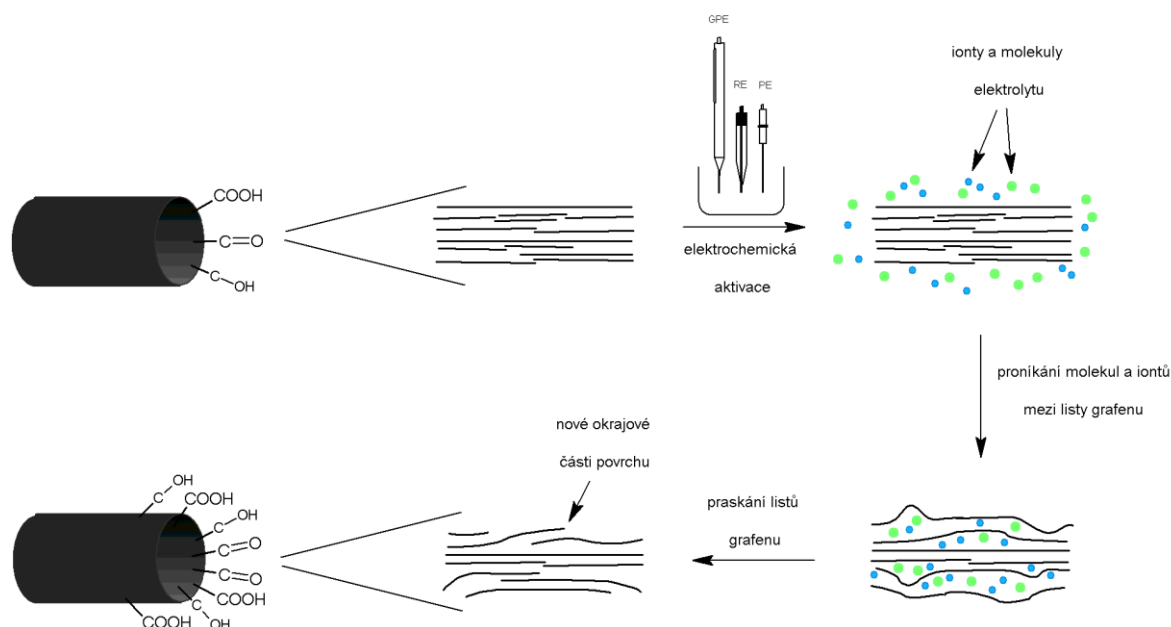
### **2. 9. 2. 2 Elektrochemická aktivace povrchu**

Elektrochemická aktivace povrchu je snadným, rychlým, levným a ekologicky šetrným způsobem úpravy povrchu elektrody [26]. Zahrnuje vložení určité hodnoty nebo rozsahu hodnot potenciálu na pracovní elektrodu po dobu řádově v sekundách. Pracovní elektroda je v průběhu aktivace ponořena do základního elektrolytu [26]. Aplikací

takového potenciálu dochází nejen k desorpci nečistot, ale také k oxidaci povrchové vrstvy grafitu a tvorbě dalších okrajových šupinek na povrchu elektrody, které jsou nositelé redoxně aktivních funkčních skupin (Obr. 3) [31, 48, 50, 60]. Tyto funkční skupiny obohacují elektrostatické síly a vodíkové vazby mezi povrchem elektrody (oxidy grafitu) a dusíkovými nebo kyslíkovými skupinami v oxidovatelných molekulách, čímž odezva elektrody roste [31, 61]. Podle některých autorů dochází po elektrochemické aktivaci také k lepší píkové separaci a ke zvýšení selektivity [62].

Účinnost elektroaktivace povrchu elektrody závisí přímo úměrně na hodnotě aplikovaného potenciálu [50, 62]. Dále je závislá na druhu základního elektrolytu, iontové síle roztoku, počtu skenů a použité skenovací rychlosti [26, 50]. V Tab. 2 lze nalézt některé výzkumy, které povrch tuhy před samotnou analýzou elektrochemicky aktivovali.

Nevýhodou elektrochemické aktivace je, že se zvyšující odezvou se současně zvyšuje šum elektrody. Díky zvětšování povrchu a tvorbě nových šupinek také může docházet k silnější adsorpci, a tedy silnějšímu zanášení elektrody, což může mít za následek snižování odezvy v průběhu měření. Některé látky na elektrochemicky upravené tuze poskytly vyšší odezvu než na tuze s modifikovaným povrchem [63].



Obrázek 3: Schéma procesu elektrochemické aktivace

Tabulka 2: Přehled některých výzkumů používajících jako pracovní elektrodu povrchově upravovanou tuhu (průměr tuhy je v mm)

Typ	Úprava elektrody	Elektrolyt	Analyt	Matrice	Metoda	Zdroj
Rotring 2,0 H	vyleštěná, ponechána 15 min ve směsi 0,1 M HCl+EtOH	-	bisfenol A	vodný extrakt z kojenecké plastové lahve	AdS-DPV	[58]
0,7 2B	0 až 1.6 V a 0 až -0.6 V do reprodukovatelného chování poté 60 s při 1.6 V a 60 s při -0.6 V (vs. SCE)	B-R pH 1,81	trepibuton	standard	SWV	[64]
Rotring 0,5 HB	1. metoda: 60 s při +1400 V (vs. Ag/AgCl)	ABS pH 4,8	alkylfenoly	vzorky vody	DPV	[63]
Tombow 0,7 B	60 s při +1.4 V, poté cyklování E mezi -1.00 V až +1.00 V, skenovací rychlost 50 mV·s <sup>-1</sup> (vs. Ag/AgCl)	0,05 M PBS pH 7,5 obsahující 0,1 M KCl	alkylfenoly	pitná a studniční voda a vzorky oceli	DPV	[18]
3 mm 6B	vyleštěná, 180 s při 2 V (vs. Ag/AgCl)	PBS pH 7	mono-fenolické konzervanty	insulinové injekce	DPV	[25]
<b>Kokuyo Camlin 2,0 2B</b>	50 cyklů při 1.5 V, skenovací rychlost 0.05 V·s <sup>-1</sup> (vs. Ag/AgCl)	0,1 M PBS pH 7	hydrochinon a katechol	kohoutková voda	CV, DPV	[65]

Typ	Úprava elektrody	Elektrolyt	Analyt	Matrice	Metoda	Zdroj
Tombow 0,5 2B	vyleštěná, 60 s při + 1.45 V (vs. Ag/AgCl)	0,1 M PBS pH 7 obsahující 0,1 M KCl	cetirizin	sirup proti kašli	SVW	[66]
Tombo 0,5	30 s při 1.40 V (vs. Ag/AgCl)	vodné médium obsahujícím základní elektrolyt	kapsaicin, dihydrokapsaicin	výrobky z chilli papriček	LSV; SW- AdSV	[37]
Faber Castel 0,5	60 s při +1.45 V (vs. Ag/AgCl)	0,1 M PBS pH 7 obsahující 0,1 M KCl	kyselina taninová	bílé víno, ovocný džus, černý čaj	AdS-DPV	[67]
Faber Castel 0,5	60 s při +1.45 V (vs. Ag/AgCl)	0,1 M PBS pH 7 obsahující 0,1 M KCl	kvercetin	ovocný džus	AdS-DPV	[68]
HB	vyleštěná, 30 s při +1.3 V (vs. Ag/AgCl)	0,04 M B-R pH 6	pantoprazol	králičí krevní sérum	AdSV	[60]
Rotring 0.7 HB	100 cyklů při 0.02 - 0.30 V (vs. Ag/AgCl), skenovací rychlost 20 mV·s <sup>-1</sup>	0,04 M B-R pH 6	nalbufin	moč	CV, DPV, SVW	[48]



Typ	Úprava elektrody	Elektrolyt	Analyt	Matrice	Metoda	Zdroj
Rotring Hi-polymer 0,5 HB	5 cyklů při +0.1 V až -2.1 V (vs. Ag/AgCl), skenovací rychlost 50 mV·s <sup>-1</sup>	0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	tryptofan, kyselina močová, xantin, hypoxantin	krevní plasma, moč	AdS-DPSV	[31]
Tombo 0,5	1 min při + 2.0 V	0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	dopamin	krevní sérum	DPV; ATS-DPV	[62]
Tombo 0,5	5 cyklů -0.3 V až +2.0 V, skenovací rychlost 50 mV·s <sup>-1</sup>	0,1 M LiClO <sub>4</sub> + 0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	kyselina močová	moč, krevní sérum	DPV	[69]
Rotring 2,0 H	vyleštěná, 30 cyklů při +1.5 až +2.0 V (vs. SCE), skenovací rychlost 50 mV·s <sup>-1</sup>	0,1 M PBS pH 7	kyselina močová	moč, krevní sérum	DPV	[70]
Rotring 2,0 H	vyleštěná, 100 cyklů při +1.5 až +2.0 V (vs. SCE), skenovací rychlost 100 mV·s <sup>-1</sup>	0,1 M PBS pH 7	dopamin, kyselina močová	moč, krevní sérum	DPV	[71]
Rotring H 2,0	10 min při +1.70 V 10 min	0,1 M B-R pH 11	metamfetamin	krevní sérum, moč, vzorky drog	DPV	[72]

## 2. 9. 3 Povrchově modifikované elektrody

Povrch elektrod tuhy je možné díky jeho adsorpčním vlastnostem relativně snadno modifikovat jinými chemickými strukturami. Vhodná chemická struktura katalyzuje elektrochemickou reakci a napomáhá přenosu elektronu [73]. Deponací těchto struktur dochází ke zvětšování povrchu, je tedy dosahováno vyšší odezvy, nižších LOD a zvyšuje se selektivita vůči cílovému analytu. Modifikace povrchu elektrody se velmi často provádí pro zvýšení jejich bioaktivity, jelikož deponované struktury vytváří skvělé prostředí pro imobilizaci biomolekul a výrobu biosenzorů [73].

### 2. 9. 3. 1 Modifikace povrchu pomocí polymerů

Polymery se na povrchu elektrody mohou na elektronové výměně podílet aktivně, nebo pasivně. K modifikaci se nejčastěji využívají vodivé polymery, které mají aktivní podíl na redoxní reakci, např. polypyrol a polyanilin. Polymery, které nejsou příliš dobrými vodiči, lze dopovat vhodným iontem, dopantem, díky kterému pak nesou povrchový náboj [74]. Polymer se tak stává selektivní vůči analytům nesoucí opačný náboj a interferenty jsou odpuzovány [75]. Při dopování polypyrolu nitrátovými ionty může být polymerový film využit jako vysoce selektivní iontová membrána [76]. K modifikaci mohou být využity také neutrální polymery, které pak zvyšují selektivitu elektrody svojí strukturou. Mezi polymerní řetězce proniknou pouze malé molekuly analytu, větší molekuly (interferenty) se do jeho struktury nedostanou a neproniknou k povrchu elektrody [74]. V takovém případě plní polymer pouze úlohu mechanické ochrany a nepodílí se na výměně elektronu. Při modifikaci povrchu polymery působí na analyt více hydrofilní a hydrofobní interakce a také elektrostatické síly [74].

Někteří autoři využívají modifikaci molekulárně vtištěnými polymery (MIP). Taková modifikace spočívá v polymerizaci funkčních monomerů v přítomnosti předlohy, kterou tvoří cílový analyt. Po polymerizaci je předloha odstraněna extrakcí, čímž vznikají dutiny s přesnou velikostí a tvarem pro selektivní stanovení konkrétního analytu [59].

Modifikace pomocí polymerů je možné využít v kombinaci s dalšími strukturami. Katalytická aktivita takové kombinace je vyšší než při použití každého materiálu samostatně, je tedy pak možné provádět vysoce selektivní analýzu [73]. Některé polymery, např. polypyrol, mohou v průběhu času ztrácet své vodivé vlastnosti. Řešením je např. umístění nanočástic na jeho strukturu, systém pak získává

dlouhodobou stabilitu [74]. Mimo to polymer zároveň slouží jako předloha pro depozici nanočástic a umožňuje jejich homogenní distribuci po povrchu elektrody.

### **2. 9. 3. 2 Modifikace pomocí nanostruktur**

Díky svým unikátním chemickým vlastnostem, kterými se liší od jiných materiálů, jsou nanostruktury skvělým materiálem pro modifikaci elektrod. Depozicí nanostruktur na povrch elektrody se zvětšuje její povrch a dochází k lepšímu převodu hmoty. Nanostruktury jsou vysoce stabilní. Velkou výhodou nanostruktur je jejich možná funkcionalizace dalšími strukturami, čímž povrch tuhy získává vysoce selektivní vlastnosti [75]. V okolí elektrody modifikované nanostrukturami běží kovergentní namísto lineární difuze, což urychluje průběh elektrochemické reakce [73].

Mezi používané modifikační materiály patří nanočástice kovů, oxidů kovů, komplexů kovů a uhlíkových nanostruktur, časté jsou i jejich kombinace s polymery. Na rozdíl od povrchové úpravy elektrody leštěním či oplachem, kdy dochází pouze ke zlepšení vlastností tuhy jako materiálu, dochází při modifikaci nanostrukturami k dodání vlastností, které povrch tuhy bez modifikace nemá. Na tyto struktury je možné vázat např. enzymy, a tak vytvořit biosenzor selektivní pouze pro jeden nebo skupinu analytů. V takovém případě slouží nanostruktury pouze jako vazebné médium.

#### *Modifikace povrchu pomocí nanočástic*

Nanočástice kovů zvyšují elektrokatalytickou aktivitu a vodivost povrchu, přispívají k lepším celkovým elektrochemickým charakteristikám elektrody. Díky nim je dosahováno dostatečné separace píků i u sloučenin, které mají blízký oxidační potenciál [73]. Výhodou nanočástic je, že se dají přímo deponovat na povrch elektrody, nepotřebují žádné další navazovací médium [74, 75].

Nejčastěji využívaným kovem k modifikaci je zlato. Zlaté nanočástice vykazují vysokou biokompatibilitu a stabilitu částic. Nevýhodou této modifikace je, že na záznamu se vyskytují nežádoucí příspěvkové signály, které mají původ v agregátech nanočástic. Řešením je využití zlatých nanotrubiček, které se homogenněji rozprostírají po povrchu elektrody a díky svému tvaru poskytují stabilnější prostředí pro detekci [77, 78].

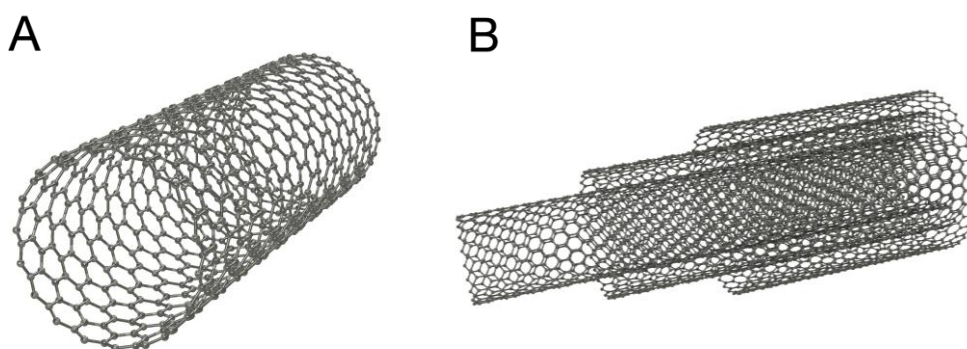
Mimo zlato lze pro výrobu nanočástic využít také měď [79, 80], palladium [81], či další kovy (Tab. 3). Jsou také využívány nanočástice oxidů kovů, nebo jejich komplexní sloučeniny.

### *Modifikace povrchu pomocí uhlíkových nanostruktur*

Uhlíkové nanostrukтуры mají dutou geometrii a značně zvětšují povrch elektrody. Díky této jejich vlastnosti je možné dosáhnout nižších limitů detekce za současné lineární odezvy. Uhlíkové nanostrukтуры mají elektrokatalytický efekt, rychlou kinetiku přenosu elektronu, a v kombinaci s polymery nebo nanočásticemi dochází při detekci k synergickému efektu [75]. K modifikaci se využívají jedностěnné nebo víceštěnné uhlíkové nanotrubičky, stěny jsou tvořeny grafenovou vrstvou (Obr. 4).

Ačkoliv je výška signálu a citlivost modifikovaných elektrod v případě některých analytů vyšší než nemodifikovaných, má využití modifikovaných elektrod několik úskalí. Efektivita modifikací pomocí nanostruktur závisí na úspěšné syntéze těchto struktur, která je obvykle složitá a zdlouhavá. Dalším kritickým krokem je umístění těchto struktur na povrch elektrody tak, aby jednotlivé kusy měly stejný aktivní povrch [50]. Některé metody depozice nanomateriálů mohou navíc podpořit adsorpci nečistot na povrch elektrody a tím jeho část deaktivovat [74]. Tyto faktory znesnadňují masovou produkci tuh s modifikovaným povrchem [73].

Se značným zvětšením povrchu při modifikaci pomocí chemických nanostruktur se pojí také zesílení adsorpčních vlastností povrchu elektrody. V průběhu měření může tedy docházet ke změnám vlastností povrchu vlivem oxidačních produktů, které mohou na povrchu elektrody tvořit tenký film. Tento jev vede ke ztrátě signálu a elektrody mohou trpět nedostatečnou stabilitou odezvy [69]. Problémy se stanovením se objevují při stanovení v komplexních maticích [73].



Obrázek 4: Schéma jedностěnné (A) a víceštěnné (B) uhlíkové nanotrubičky

Efektivita senzoru se nedá posuzovat pouze podle jeho LOD, stejně důležité jsou doba a obtížnost přípravy elektrody, pořizovací cena a její robustnost. U nemodifikovaných elektrod nejsou potřeba k přípravě drahé žádné materiály [55]. Tuha si tak zachová výhodu nízké ceny a snadné dostupnosti. Z řady studií vyplývá, že pro širokou škálu látek žádná povrchová modifikace elektrody není nezbytně nutná, což zjednodušuje a zkracuje celý proces analýzy [45, 55].

Tabulka 3: Přehled některých výzkumů používajících jako pracovní elektrodu tuhu s modifikovaným povrchem (průměr tuhy je v mm)

Typ	Modifikace elektrody	Analyt	Matrice	Metoda	Zdroj
Shine 0,5 2B	PP dopovaný NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -GP	dusičnanové ionty	standardy	potenciometrie	[76]
Tombo 0,5	MIP PP-GPE	Insekticid chlorpyrifos	kohoutková voda, půda, kukuřičné listy	impedimetrie	[82]
Owner 0,7 HB	MIP PP-GPE	fenthiazin	vzorky masa a ryb	DPV	[83]
Camlin. 0,5 2B	MIP-sol-gel-GPE	kyselina listová	krevní sérum	chronocoulometrie	[33]
HB 2,0	ABSA-ND-GPE	kyselina listová	moč	DPCSV	[59]
-	PVF-GPE	DNA hybridizace	standard	DPV	[84]
0,5 HB	Melanin-GPE	dopamin	standard	amperometrie	[85]
-	CHIT-IL-GPE	interakce NK s mitomycinem	standard	DPV, EIS	[86]
Kokuyo Camlin 0,5 HB	TyB-GPE	hydrochlorothiazid	léčivo Aquazide-25	DPV	[87]
-	CB-GPE	hovězí albumin	standardy	CV, EIS	[88]
Tombo 0,5	MDB-GPE	DNA hybridizace HSV	reálné vzorky z PCR	DPV	[89]
-	AuNPs-GPE	DNA hybridizace	umělý PCR produkt	DPV	[90]
Camlin 0,5 2B	AuNPs-GPE	L-dopa	části <i>Mucuna pruriens</i> , Siddha produkty	DPV	[32]
Pentel 0,5 HB	AuNPs-GPE	hydrazin	pitná voda	SWV, amperometrie	[40]

<b>Typ</b>	<b>Modifikace elektrody</b>	<b>Analyt</b>	<b>Matrice</b>	<b>Metoda</b>	<b>Zdroj</b>
Pentel 0,5 HB	AuNPs-GPE	4-nitrofenol	vzorky vody	LSV	[91]
-	AuNPs-GPE	hydrazin	vzorky vody	FIA	[92]
XQ CERAMIC 0,5	AuNDs-GPE	ionty Hg <sup>2+</sup>	vzorky voda	DP-ASV	[93]
-	AuNPs-PP-GPE	adrenalone	krevní sérum, moč	SVW	[94]
-	AuNRs-GPE	DNA hybridizace	standard	EIS	[95]
Owner 0,5	HGNPs-rGO-GPE	ceftizoxim	krevní sérum, léčiva	chronocoulometrie	[96]
Pentel 0,5 HB	AuNPs-GluOx-GPE	glukóza	větve stromů	amperometrie	[97]
Pentel 0,5 HB	CuNPs-GPE	4-nitrofenol	standard	amperometrie	[75]
Tombow 0,5	CuNPs-GPE	glukóza	krevní sérum	amperometrie	[44]
Ultra-Polymer 0,5 2B	[98]vzork <sup>2+</sup> -Nf-PGE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	kosmetické výrobky	FIA	[99]
Rotring 2,0	Cu-nanofilm-GPE	dusičnanové ionty	standard	chronoamperometrie	[80]
Rotring 2,0	CuHCF	L-cystein	moč	amperometrie	[100]
Faber Castell, 0.7 HB	Cu-AgNPs-GPE	dopamin	standard	chronoamperometrie	[101]
Rotring 2,0 H	Bi-GPE	diazepam	tablety, moč	DPV	[102]
Tombow 0,5 3B	Gr-Bi -GPE	Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	standard	SW-ASV	[103]
-	TiO <sub>2</sub> , SnO <sub>2</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GPE	DNA hybridizace	standard	DPV	[104]
-	MoS <sub>2</sub> -GPE	guanin a adenin	standard	DPV	[29]
-	Ag-FeOOH-GPE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	standard	amperometrie	[105]
Tombow HB	SWCNTs-GPE	gen p53	standard	DPV	[106]
-	SWCNTs-CHIT-GPE	vitamin B <sub>12</sub>	léčiva tablety	SWV, EIS	[107]

<b>Typ</b>	<b>Modifikace elektrody</b>	<b>Analyt</b>	<b>Matrice</b>	<b>Metoda</b>	<b>Zdroj</b>
-	SEP-SWCNTs- GPE	DNA hybridizace	standard	EIS	[86]
-	MWCNTs	DNA hybridizace	standard	DPV	[34]
Rotring 2,0 H	MWCNTs-GPE	diclofenac	tablety léčiva, moč	DPV, HPLC-UV	[108]
-	PP-MWCNTs-GPE	interakce DNA s merkaptopurinem	tablety léčiva, moč	DPV	[109]
0,5 2B	MWCNTs–AuNPs-GPE	estradiol	krvní sérum	LSV	[110]
Staedler 3,0 2B	PANI-NRs-MWCNTs- GPE a CHIT-MWCNTs-GPE	bisfenol A	kojenecké láhve	FIA	[111]
Staedtler 2,0 6H	(HRP-AuNPs) <sub>2</sub> -CHIT- GPE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	barva na vlasy	amperometrie	[112]
Camlin 2,0 6B	GKNPs-GPONPs-GPE	glycerol	krvní sérum	EIS, CV	[113]
Camlin 2,0 6B	HbNPs-GPE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	krvní sérum	amperometrie	[114]



Vysvětlivky zkratk k Tab. 3:

ABSA	kyselina poly(p-aminobenzensulfonová)
AuNDs	zlaté nanotečky
AuNPs	zlaté nanočástice
AuNRs	zlaté nanotrubičky
CB	Cibacron Blue F3G
CuNPs	měděné nanočástice
GKNPs	nanočástice glycerol kinázy
GluOx	glukóza oxidáza
GPE	tuha („graphite pencil electrode“)
GPONPs	nanočástice glycerol-3-fosfát oxidázy
Gr-Bi	nanokompozit grafenu a bismutu
HbNPs	hemoglobinové nanočástice
HCF	hexakynoželeznatan
HGNPs	duté zlaté nanočástice
HRP	křenová peroxidáza
HSV	herpes simplex
CHIT	chitosan
IL	iontová kapalina
MDB	Meldola Blue
MWCNTs	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
Nc	neokuproin

ND	nanotečky
Ni	nafion
NK	nukleové kyseliny
p-XO	polyxylenová oranž
PANI	polyanilin
PP	polypyrol
PVF	poly(vinylferrocenium)
rGO	redukovaný grafen
SEP	sepiolit
SW-ASV	square wave anodická rozpouštěcí voltametrie
SWNCTs	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky
TyB	trypanová modř

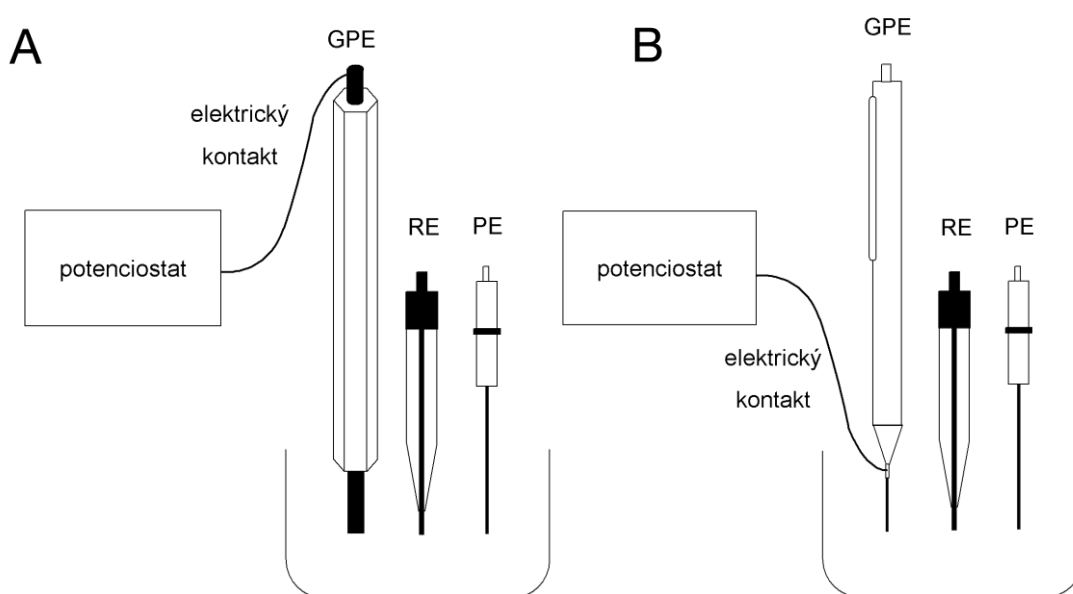
## 2. 10 Design GPE a měřících cel

### 2. 10. 1 Statické cely

Z dat uvedených v tabulkách v předchozích kapitolách je vidět, že většina prací využívá tuhu jako pracovní elektrodu ve statickém uspořádání. Obvyklým postupem je vsunutí tuhy kolmo shora do cely s elektrolytem. Do roztoku elektrolytu je ponořována konstantní délka tuhy, čímž je zajištěn stejný aktivní povrch elektrod při jednotlivých měřeních [26, 62].

V případě klasických tužek je jako držák využito dřevěné pouzdro tužky. Z obou konců tužky je dřevo odstraněno, jeden konec je ponořen do elektrolytu v měřící cele a pomocí druhého konce je zajištěn elektrický kontakt. V případě mikrotuh je jako držák použita mechanická tužka, elektrický kontakt je zajištěn přímým kontaktem s mikrotuhou, nebo častěji pomocí kovových částí mechanické tužky, které jsou s tuhou v kontaktu (Obr. 5). Lze nalézt i cely jiných konstrukcí, které jako držák pro mikrotuhu využívají plastovou stříkačku [115], nebo špičku mikropipety [57, 116].

Některé cely svou konstrukcí umožňují po analýze vysunout z držáku a zkrácením obnovit její povrch, v jiných případech je nutné po analýze vyměnit kus



Obrázek 5: Schéma zapojení tuhy (A) a mikrotuhy (B) jako pracovní elektrody ve statické elektrochemii. GPE: pracovní elektroda; RE: referentní elektroda; PE: pracovní elektroda.

za nový. Elektroda může být také do roztoku vnořena skrz septum [57]. Tuhu lze využít také jako diskovou elektrodu, přičemž kontaktu jejího pláště s roztokem je zabráněno teflonovou [33], nebo PVC trubičkou [117], teflonovou páskou [58, 71], parafilmem [25] či špičkou mikropipety [118].

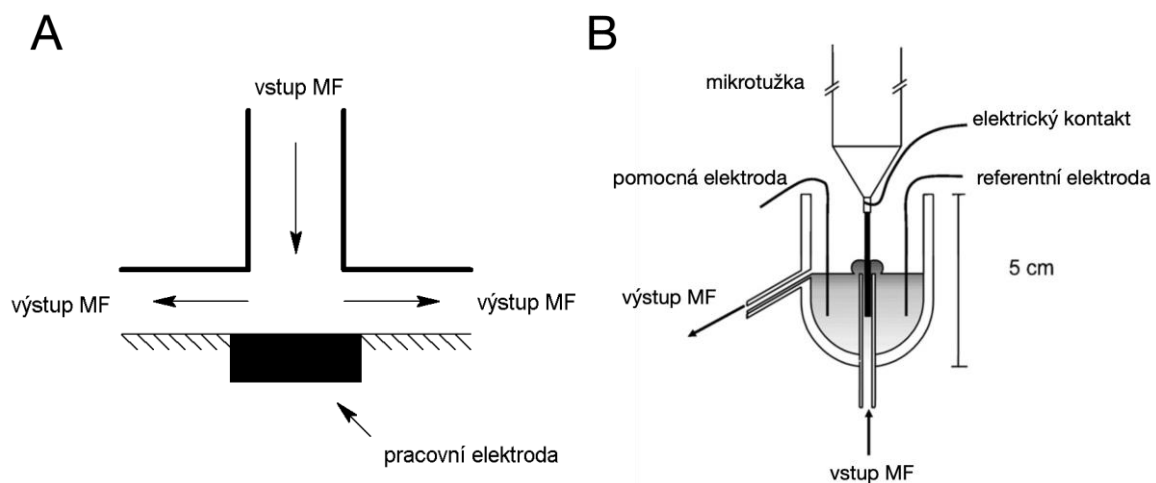
## **2. 10. 2 Cely pro elektrody na papírovém základě**

Jak již bylo uvedeno dříve, schopnost tuhy snadno zanechat otěrem stopu na substrátu se využívá pro výrobu elektrod na papírovém základě, tedy kreslených elektrod. Výhodou kreslených elektrod je možnost vytvořit tříelektrodový systém na jednom kusu substrátu [119]. Stopa kreslených elektrod může být izolována od okolí pomocí vosků nebo lepidel, takové elektrody jsou známé jako elektronické jazyky [120]. Kreslené elektrody mohou být využity ve statickém uspořádání, nebo v mikrofluidních celách. Papírový substrát tvoří síť mikrokanálek, skrze které může kapalina pomocí kapilárních sil procházet samovolně [121].

## **2. 10. 3 Průtokové cely**

Jednou z výhod tuhy je snadná miniaturizovatelnost měřicí cely, a tedy možné použití v HPLC. Díky vlastnostem tuhy jako je např. malé zanášení povrchu by bylo výhodné využít tuhu pro stanovení směsí a analýzu složitějších matic. Přesto se mnoho výzkumů použitím tuhy v průtokovém systému nezabývá [99].

Výzkumy, které se touto problematikou zabývají, obvykle používají uspořádání „wall-jet“ (Obr. 6A). Takovou celu sestrojili např. Hiroi a kol. [122] pro stanovení fenolů a chlorfenolů. Plášť elektrody byl obalen teflonovou páskou, mobilní fáze z kolony byla vedena kolmo na průřez elektrody, kde docházelo k detekci. Cela podobné konstrukce byla použita také v dalších výzkumech [55, 66, 118, 123]. Buratti a kol. [23] použili k sestrojení průtokové cely Pasteurovu pipetu. Na svém tenčím konci byla pipeta uříznuta, z opačné strany do ní byla vsunuta skleněná trubička o vnitřním průměru 1 mm napojená na pumpu. Do skleněné trubičky byla zasunuta tuha o průměru 0,5 mm tak, aby byly ponořeny 4 mm její délky. Schéma uspořádání této cely je zobrazeno na Obr. 6B. Průtokové cely jsou konstruovány tak, aby bylo možné provádět detekci ve velmi malých objemech a při nízkých průtocích [124].



Obrázek 6: A) Schéma uspořádání „wall-jet“ cely; B) schéma průtokové cely z výzkumu Buratti a kol. [23]

## 2. 11 Antipsychotika

Antipsychotika (ATP) jsou skupinou léčiv, která se používají k léčbě psychických poruch. Psychické poruchy mají emocionální původ a jsou spojeny s vážným narušením myšlení, chování, schopností rozeznat realitu, nedostatečným vnímáním, které vede až k halucinacím a bludům [125]. Do psychických poruch spadají akutní psychózy, maniodepresivní poruchy, deliria, deprese či schizofrenie. [126].

Psychické poruchy jsou důsledkem neurochemické disbalancie v mozku. Myšlenkové procesy a emoce jsou kontrolovány neurotransmitery (např. dopamin, serotonin), jejichž nadbytek se může projevit psychickou poruchou [125]. Antipsychotika jsou tzv. antagonisty neurotransmiterů, tedy konkurují jejich vazbám na receptory a dočasně receptory blokují, čímž pomáhají udržet stabilní stav pacienta [127]. Podle mechanismu účinku se dělí na tři generace.

Antipsychotika 1. generace, dříve označovaná jako typická ATP se váží na  $D_2$  receptor dopaminu pevněji, než dopamin sám a jejich disociační konstanta ( $K_D$ ) je nižší než  $K_D$  dopaminu [127]. U této skupiny ATP se při léčbě silněji projevují vedlejší nežádoucí účinky (extrapyramidové symptomy apod.). [125]. Do této skupiny patří např. chlorpromazin, flufenazin, perferazin, promazin a thioridazin.

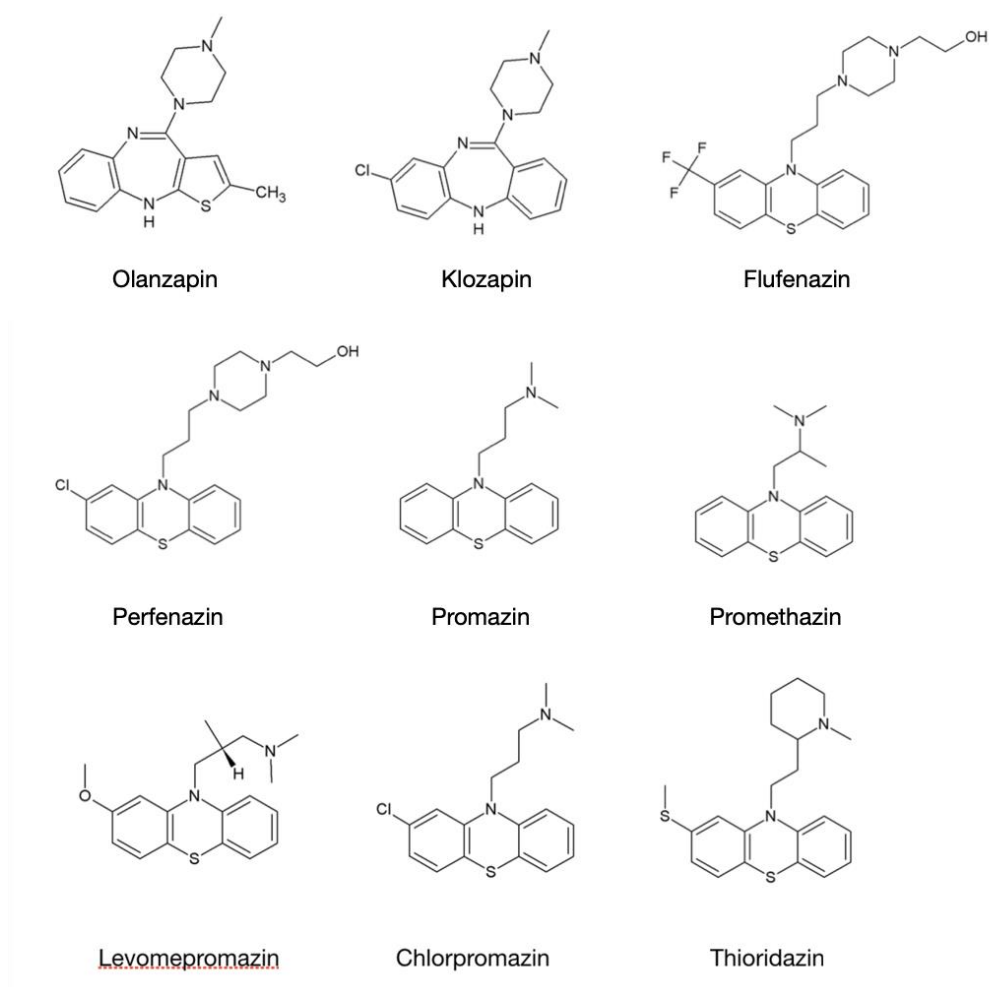
Další skupinou je 2. generace ATP, dříve označovaná jako atypická. Označení „atypická“ získali díky tomu, že při stejné účinnosti léčby byly u pacientů pozorovány méně často nežádoucí vedlejší projevy. ATP 2. generace se na receptor  $D_2$  váží slaběji než dopamin sám a rychle disociují (vyšší  $K_D$ ), čímž dříve umožňují běžnou transmissi dopaminu [125]. Současně s dopaminovými receptory blokují také další druhy receptorů, např. serotoninové, nebo histaminové receptory čímž snižují riziko nežádoucích vedlejších projevů. Tato skupina ATP má však za následek metabolické změny organismu, např. zvýšení váhy, nebo vznik diabetu. Do této skupiny spadají např. klozapin, olanzapin nebo kvetiapin [125, 126, 128].

Funkce 3. generace ATP je založena na parciální blokaci  $D_2$  receptorů. ATP z této skupiny může působit jako agonista nebo antagonist v závislosti na koncentraci daného neurotransmiteru tak, že v případě nízké koncentrace dopaminu bude receptory stimulovat a v případě vysoké koncentrace je bude inhibovat. Jediným známým zástupcem je aripipazol [127, 128].

Stanovení ATP v tělních tekutinách je důležité z terapeutického hlediska i z hlediska forenzní analýzy. Předávkování ATP může vést k úmrtí. ATP bývají zneužívány

k sebevraždám, jelikož jsou snadno dostupné, v některých zemích je možné je zakoupit bez předpisu lékaře.

ATP jsou elektrochemicky aktivní. Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení ATP v krevní plasmě pomocí metody HPLC-ED s tuhou jako pracovní elektrodou. Funkčnost metody je demonstrována na směsi 9 ATP (Obr. 7) ve spikované plasmě. Výhodou použité metody je nízká cena, jednoduchost obsluhy, snadná miniaturizovatelnost, a tedy nižší spotřeba organických rozpouštědel v mobilní fázi a využitelnost pro malé objemy vzorku. Spolehlivost metody je ukázána na dvou reálných vzorcích krevní plasmy.



Obrázek 7: Struktura jednotlivých ATP použitých k analýze

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

Kvetiapin hemifumarát, Olanzapin, Klozapin, Flufenazin hydrochlorid, Promazin hydrochlorid (vnitřní standard), Promethazin hydrochlorid, Levopromazin hydrochlorid, Chlorpromazin hydrochlorid, Thioridazin hydrochlorid a Perferazin pocházely ze Sigma-Aldrich (Německo).

Použitý methanol (MeOH; p.a.) a acetonitril (ACN; p.a.) pocházely z VWR Chemicals (Francie),  $K_2HPO_4$  (TraceSelect) z Honeywell Fluka (Švýcarsko),  $H_3PO_4$  (puriss.p.a.) ze Sigma-Aldrich (Německo) a CERAMIX z Legor roup S. p. A. (Itálie). Jako matrice modelových vzorků bylo použito lyofilizované kontrolní sérum Level I (BCS) původem z BioSystems (Španělsko). Použitá ultračistá deionizovaná voda pocházela ze systému Millipore Smart Direct Q-3 UV, Merci (Česká republika).

Vzorky krevní plasmy intoxikovaných pacientů byly obdrženy z Ústavu soudního lékařství a medicínského práva, Fakultní nemocnice Olomouc. Se vzorky bylo nakládáno podle pokynů Etické komise Univerzity Palackého.

### 3.2 Pomůcky, přístrojové vybavení a podmínky měření

#### 3.2.1 Cyklická voltametrie

K charakterizaci elektrod cyklickou voltametrií (CV) byla použita pracovní stanice Nanoampere 1 (L-Chem, Česká republika). Měření probíhalo v tříelektrodevém zapojení v miniaturizované detekční celi. Pracovní elektrodou byla mikrotuha AinStein s průměrem 0,2 mm, tvrdosti B (Pentel Ltd., Japan), resp. Tombow Polymer HB o průměru 0,5 mm (Tombow, Japan). Dále byly v celi zapojeny v laboratoři vyrobená špičková referentní elektroda Ag/AgCl a pomocná elektroda, šroub z nerezové oceli, která tvořila dno miniaturní cely. Celkový objem cely byl 350  $\mu$ l. Základním elektrolytem byla zvolena směs MeOH:fosfátový pufr (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5) v poměru 2:1(v:v). Měření bylo provedeno při skenovací rychlosti 50  $\text{mV}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Do cely se základním elektrolytem byla vsunuta konstantní délka elektrody. V případě elektrody AinStein 0,2 B bylo ponořeno do roztoku základního elektrolytu 5 mm její délky, v případě elektrody Tombow 0,5 HB byl ponořen 1 mm její délky. Ke stanovení

byly využity standardní roztoky ATP, výsledná koncentrace konkrétního ATP v cele byla  $0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Při testování vlivu průřezu a laterálního povrchu elektrody na velikost odezvy byla elektroda ponořena do roztoku materiálu CERAMIX na dobu 1 min při potenciálu 30 V. Poté byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a po dobu min 5 min vysušena na vzduchu, a následně v sušárně po dobu  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30-40 min.

### 3. 2. 2 HPLC

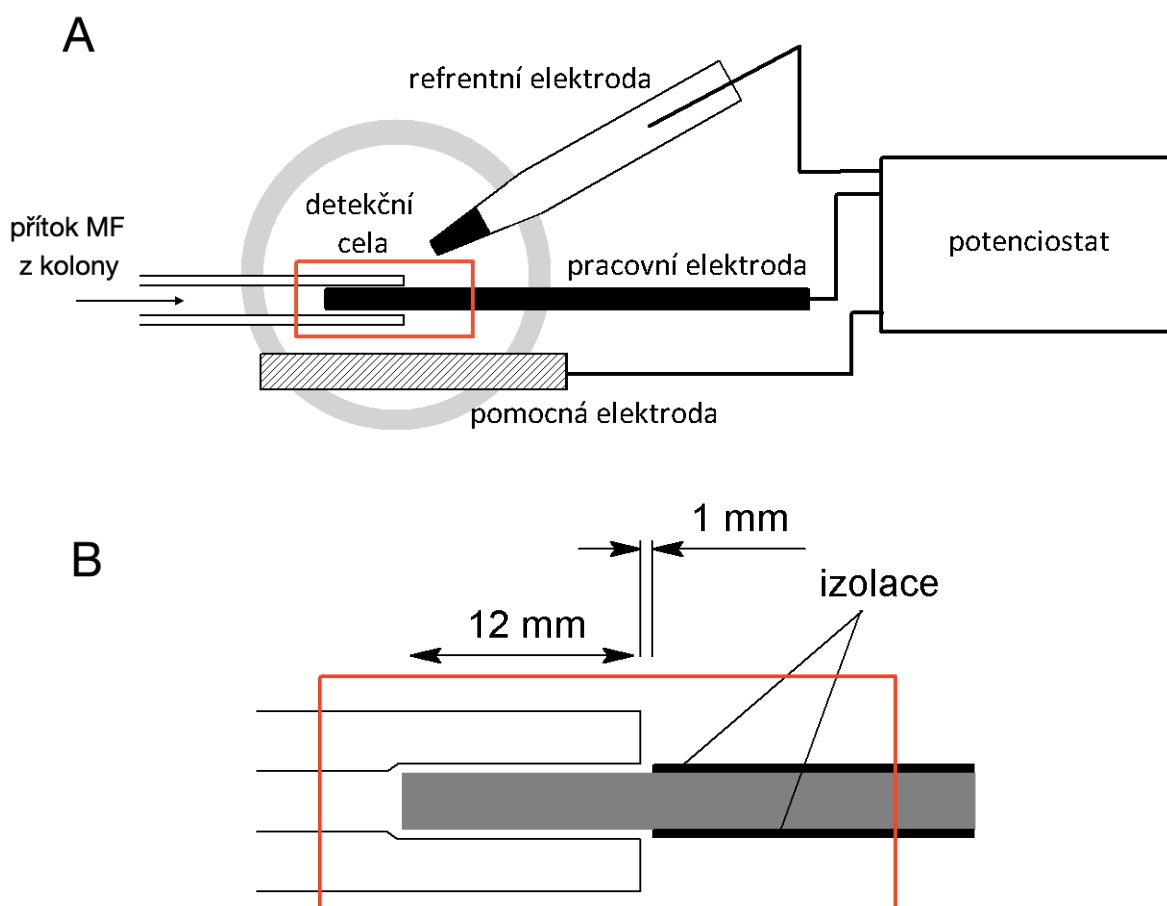
Mobilní fáze složená z  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5), MeOH a ACN byla před použitím filtrována za vakua pomocí 0,2 mm nylonového membránového filtru (Supelco, USA) a odplyněna proudem helia.

Použitý HPLC systém se skládal z isokratické pumpy Shimadzu LC-10AD (Shimadzu, Japonsko), šesticestného ventilu Rheodyne 7725 (Rheodyne, USA) s 20  $\mu\text{l}$  smyčkou (PEEK<sup>TM</sup>) pro nástřik vzorků, separační kolony Nucleodur Gravity C<sub>8</sub> 5  $\mu\text{l}$ , 250 mm  $\times$  2,1 mm I.D. s C<sub>8</sub> předkolonou (Macherey-Nagel, Německo), termostatu Shimadzu CTO-10ACvp (Shimadzu, Japonsko) nastaveného na konstantní teplotu  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ., potenciostatu ESA Coulochem III (ESA Inc., USA) nastaveného na hodnotu +900 mV (pokud není uvedeno jinak) a nekomerční detekční cely vyvinuté doc. Janem Hrbáčem Ph.D. [129]. Všechny použité spojovací elementy byly z materiálu PEEK<sup>TM</sup>. Vzorky byly nástřikovány pomocí 50  $\mu\text{l}$  stříkačky Hamilton (Hamilton, USA).

Analýza probíhala v tříelektrodovém zapojení, kdy jako pracovní elektroda byla zapojena mikrotuha AinStein B o průměru 0,2 mm. Mikrotuha byla pomocí ferule umístěna do cely a vsunuta do protilehlé kapiláry přivádějící mobilní fázi z kolony. Aby bylo možné takto mikrotuhu do kapiláry vsunout, byl vnitřní průměr kapiláry (254  $\mu\text{m}$ ) nejprve rozšířen pomocí insulinové stříkačky v délce 12 mm na 315 až 320  $\mu\text{m}$ . Špičková referentní elektroda Ag/AgCl (vyrobená v laboratoři) byla umístěna v těsné blízkosti kapiláry přivádějící mobilní fázi z kolony, jako pomocná elektroda byl využit šroub z nerezové oceli, který tvořil dno cely. Připojení detekční cely k HPLC systému a rozložení elektrod v cele je zobrazeno na Obr. 8.

Data byla zaznamenána a zpracována pomocí chromatografického programu DataApex Clarity (DataApex, Česká republika). K analýze byla využita metoda vnitřního standardu.





Obrázek 8: A) Schéma uspořádání elektrod v detekční cele při HPLC stanovení. B) Detail umístění mikrotuhy AinStein 0,2 B (průměr 260 – 270  $\mu\text{m}$ ) v kapiláře. Vnitřní průměr nerozšířené kapiláry: 254  $\mu\text{m}$ ; pomocí insulinové stříkačky rozšířen na 315 – 320  $\mu\text{m}$ .

### 3. 2. 3 Příprava roztoků

Pro přípravu standardních roztoků ATP byl použit vždy 1 mg standardu, který byl rozpuštěn v 10 ml MeOH a poté uchováván pro další použití ve tmě při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu několika týdnů. Před použitím byl roztok standardu dále ředěn na požadovanou koncentraci deionizovanou vodou.

Jako matrice pro modelovou směs ATP bylo použito kontrolní BSC sérum, ke kterému byly přidány standardní roztoky ATP tak, aby výsledná koncentrace každého z nich byla  $250\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pokud není uvedeno jinak. Koncentrace vnitřního standardu byla při všech měřeních  $200\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro kalibrační řadu bylo BSC sérum spikováno v rozmezí koncentrací  $0,5 - 500\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace vnitřního standardu byla ve všech kalibračních roztocích  $200\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ze vzorků určených k HPLC analýze byly odstraněny proteiny srážením ACN a centrifugací. Ke 100  $\mu\text{l}$  BSC, resp. krevní plasmy, bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  ACN a vzorek byl 5 min centrifugován při 10 000  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Supernatant blanku a spikovaného BCS byl k nástřiku do HPLC použit přímo, supernatant reálných vzorků krevní plasmy byl před nástřikem dále zředěn deionizovanou vodou (1:1; v:v).

### 3. 3 Výsledky a diskuze

Cílem práce bylo demonstrovat, že mikrotuha je vhodná jako HPLC detektor pro stanovení složitějších směsí elektroaktivních látek i pro analýzu vzorků z klinické praxe. K těmto účelům byla vyvinuta a optimalizována metoda.

#### 3. 3. 1 Charakterizace elektrochemických vlastností jednotlivých látek

Nejprve bylo charakterizováno elektrochemické chování jednotlivých ATP na povrchu mikrotuh pomocí cyklické voltametrie. Cyklické voltamogramy byly zaznamenány na mikrotuze AinStein 0,2 B, která byla dále využita v HPLC experimentech. Pro srovnání jejího chování byly zaznamenány cyklické voltamogramy na mikrotuze Tombow 0,5 HB, jejíž vlastnosti byly již dříve dobře charakterizovány a dá se ve srovnání s mikrotuhou AinStein 0,2 B považovat za velkoplochou elektrodu.

Na elektrody byl vložen potenciál v rozsahu -100 až +1100 mV (vs. Ag/AgCl). Jednotlivé voltamogramy jsou zobrazeny na Obr. 9 a 10. Nárůst signálu se na obou mikrotuhách objevoval ve většině případů okolo +600 mV, vrchol píků se pak nachází mezi +650 až +700 mV. V případě olanzapinu a klozapinu se odezva zvyšovala již od +300 mV, vrchol píku se nacházel mírně před +600 mV. Všechna ATP vykazala ireverzibilní, popř. částečně ireverzibilní chování na obou typech elektrod.

Mikrotuha AinStein 0,2 B poskytla ve většině případů dobře definované píky, kde lze určit jejich maximum. V případě mikrotuhy Tombow 0,5 HB byl pozorován nárůst signálu téměř od úplného počátku měření, tedy již při nepatrných potenciálech. To má za následek hůře definované píky, v případě olanzapinu až nepozorovatelné. V případě promethazinu a thioridazinu byla na mikrotuze Tombow 0,5 HB pozorována vícestupňová oxidace, která se na mikrotuze AinStein 0,2 B neprojevila. Rozdíl mezi mikrotuhou AinStein 0,2 B a Tombow 0,5 HB je ve velikosti šumu, kdy v případě mikrotuhy AinStein 0,2 B je šum výrazně nižší, změna proudu způsobená analytem je tedy v poměru k šumu vyšší.

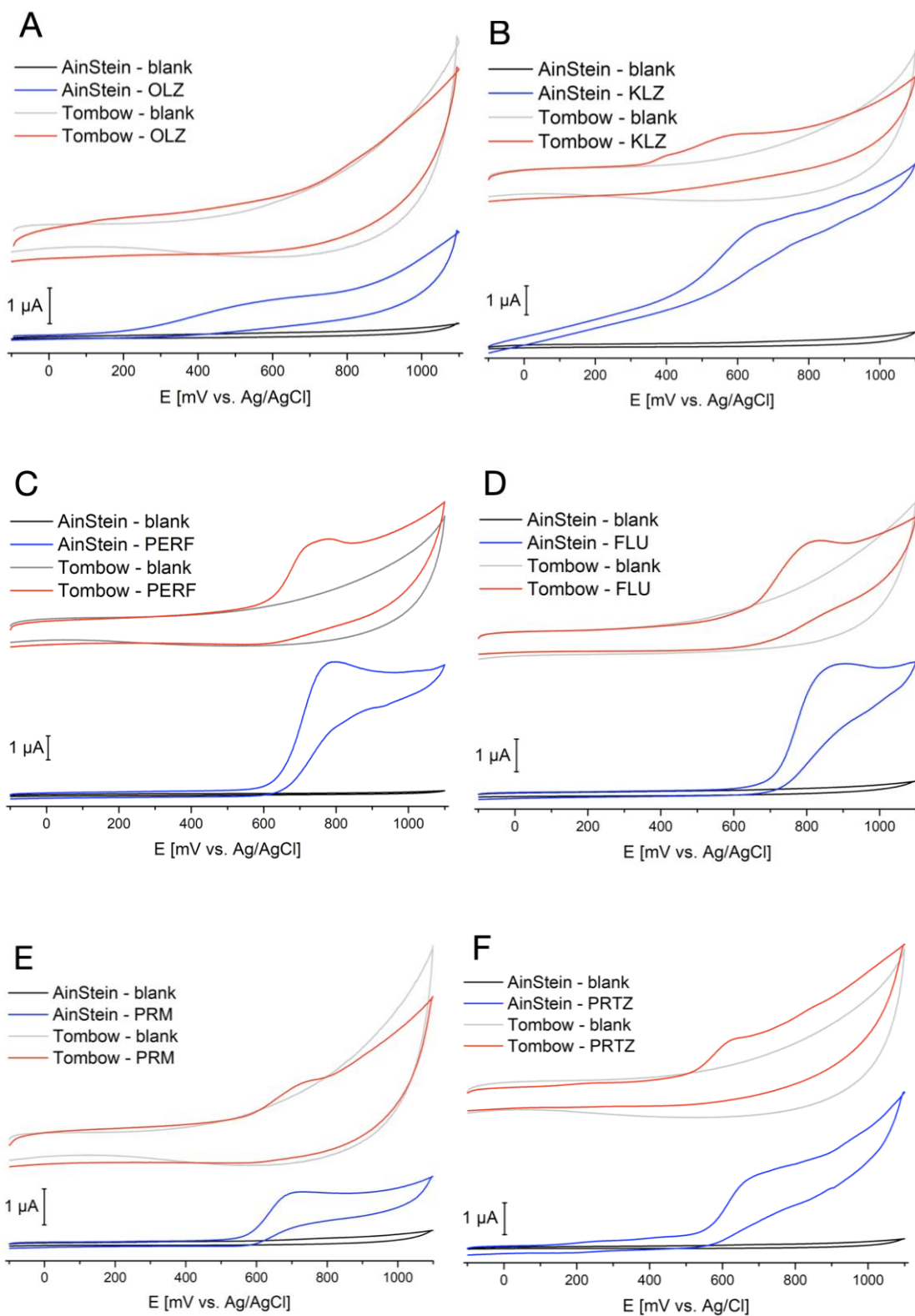
Byly srovnány blanky roztoků proměřené na obou elektrodách v elektrolytu obsahujícím pouze fosfátový pufr a záznamy byly srovnány s původními voltamogramy zaznamenanými v základním elektrolytu obsahujícím MeOH a fosfátový pufr (2:1). Při měření ve fosfátovém pufru jsou voltamogramy srovnatelné. V přítomnosti methanolu je

však situace rozdílná. Na tuze AinStein 0,2 B se záznam při měření v elektrolytu MeOH:fosfátový pufr (2:1) příliš nezměnil, oproti tomu na Tombow 0,5 HB došlo k nárůstu šumu a také k počátečnímu nárůstu odezvy. Tento jev může být způsoben vyšší citlivostí mikrotuhy Tombow 0,5 HB na složení základního elektrolytu z hlediska organické fáze, která negativně ovlivňuje iontovou sílu elektrolytu. Důsledkem toho jsou voltamogramy zaznamenané na mikrotuze Tombow táhlé a hůře definované, než na mikrotuze AinStein 0,2 B. Povrch mikrotuhy AinStein 0,2 B se zdá být vůči organické složce odolnější, což může být výhodou v HPLC systému s reverzními fázemi, kde se organická složka v mobilní fázi obvykle vyskytuje.

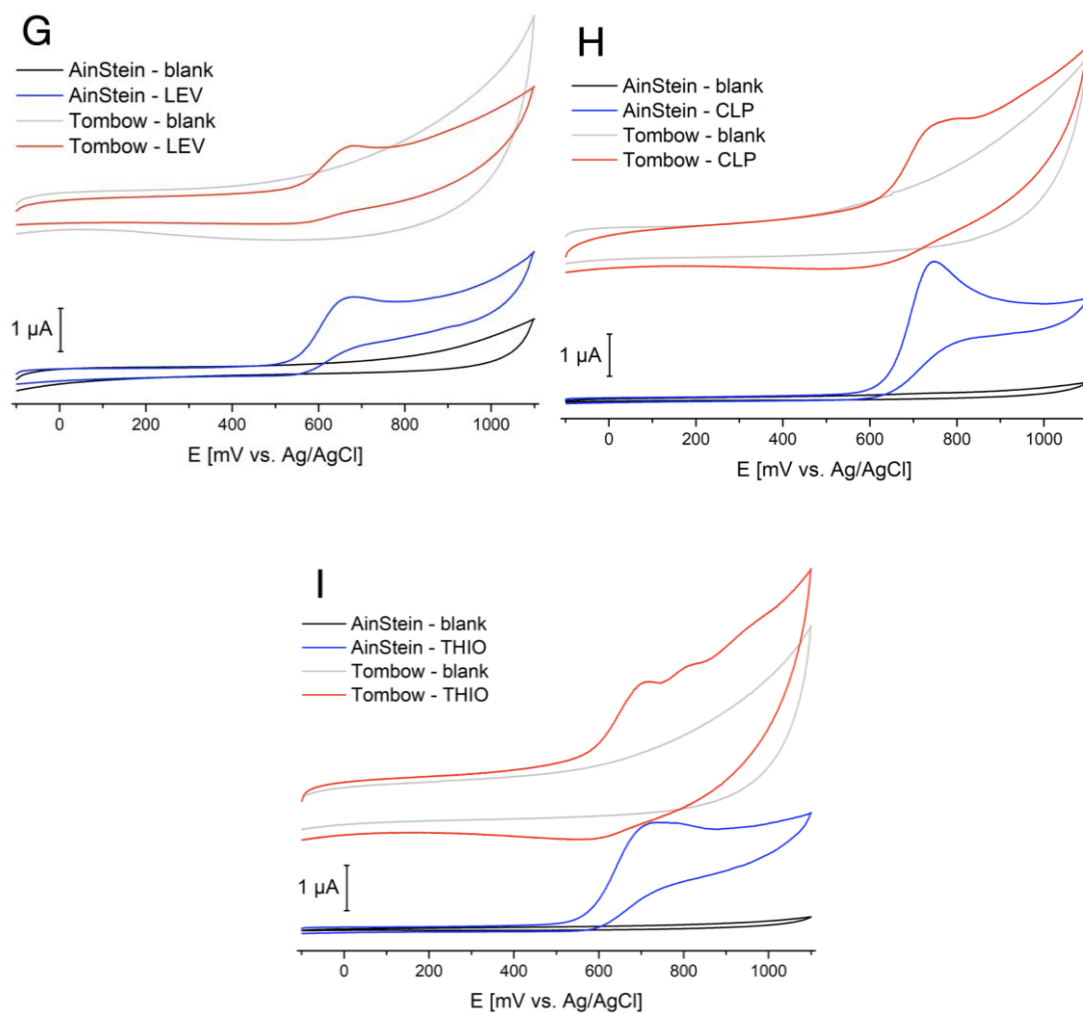
### **3. 3. 2 Vliv příspěvků plochy na proudovou odezvu**

Aktivní plocha mikrotuhy ponořené v roztoku se skládá z plochy průřezu a laterálního povrchu, tedy plochy pláště. Proudová odezva elektrody se tedy teoreticky skládá ze dvou příspěvků, z oxidace sloučenin na průřezu a na plášti elektrody. Pro otestování, zda jeden z těchto příspěvků dominuje nad druhým byl pro sérii měření zalepen průřez elektrody AinStein 0,2 B pomocí chemicky inertního materiálu CERAMIX. Na elektrodě se zalepeným průřezem byly proměřeny blanky a voltamogramy jednotlivých látek.

Výsledky tohoto měření jsou nejednoznačné a zdá se, že ani jeden z těchto příspěvků nemá výrazně větší vliv na celkovou proudovou odezvu elektrody. V následujících měřeních tedy nebylo zalepení průřezu elektrody zařazeno do postupu analýzy.



Obrázek 9: Cyklické voltamogramy jednotlivých ATP: A) olanzapin; B) klozapin; C) perferazin; D) flufenazin; E) promazin; F) promethazin. Mikrotuha AinStein 0,2 B: blank (černá), jednotlivá ATP (modrá), mikrotuha Tombow 0,5 HB: blank (šedá) a jednotlivá ATP (červená). Základní elektrolyt: MeOH:fosfátový pufr ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5), 2:1 (v:v), skenovací rychlost  $50 \text{ mV}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace analytu  $0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



Obrázek 10: Cyklické voltamogramy jednotlivých ATP (pokračování): G) levomepromazin; H) chlorpromazin; I) thioridazin. Mikrotuha AinStein 0,2 B: blank (černá), jednotlivá ATP (modrá), mikrotuha Tombow 0,5 HB: blank (šedá), jednotlivá ATP (červená). Základní elektrolyt: MeOH:fosfátový pufr ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5), 2:1(v:v), skenovací rychlost  $50 \text{ mV}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace analytu  $0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3. 3. 4 HPLC experimenty

#### 3. 3. 4. 1 Optimalizace podmínek

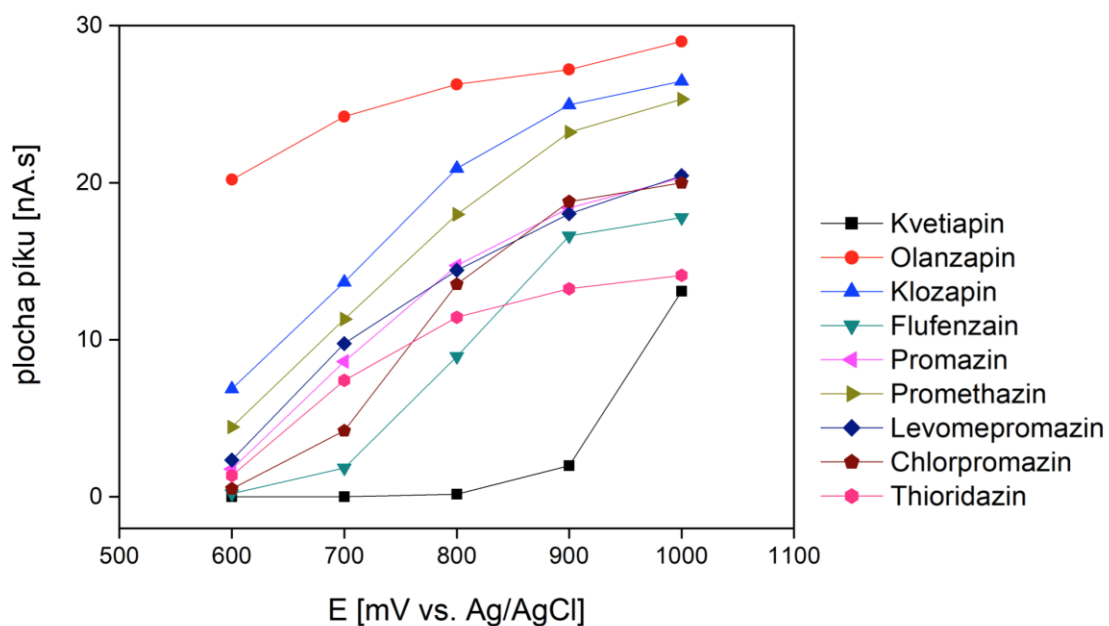
##### *Volba pracovního potenciálu*

Významným parametrem, který ovlivňuje výsledek analýzy je volba pracovního potenciálu. Potenciálem je možné do určité míry ovlivňovat selektivitu měření. Obecně platí, že se zvyšujícím se potenciálem se zvyšuje také proudová odezva elektrody na analyt, zároveň se však při vyšších potenciálech začíná oxidovat povrch elektrody, což má za následek zvýšení šumu a poškození povrchu elektrody. Potenciál se tedy volí tak, aby bylo dosaženo co nejvyššího poměru signál:šum (S:N).

Pro určení optimálního pracovního potenciálu pro stanovení směsi byly proměřeny závislosti proudové odezvy jednotlivých analytů na hodnotě vloženého potenciálu. Testované hodnoty potenciálu byly +600 až +1000 mV (vs. Ag/AgCl), přičemž nárůst potenciálu mezi jednotlivými experimenty byl 100 mV. Proudová odezva u všech analytů s potenciálem roste (Obr. 11). U olanzapinu a thioridazinu lze pozorovat pozvolný nárůst odezvy, kdy k největší změně ve velikosti odezvy dochází od +600 do +700 mV. Nárůst odezvy u flufenazinu a chlorpromazinu je prudší, nejvýraznější změna nastává v rozmezí +700 až +800 mV. Odezva klopazinu, promazinu, promethazinu a levomepromazinu se s potenciálem mění nejdramatičtěji, prudký nárůst lze pozorovat hlavně od počátečních +600 mV do +900 mV.

Z obrázku zobrazující hydrodynamické voltamogramy je jasně patrné, že kvetiapin má odlišné elektrooxidační vlastnosti od ostatních vybraných ATP. K dosažení dostatečného analytického signálu je k jeho oxidaci třeba značně vyššího potenciálu. Od +600 mV do +800 mV dochází k téměř nepozorovatelnému zvýšení odezvy, při +900 mV je změna odezvy patrnější, při +1000 mV odezva narůstá téměř desetinásobně. Kvetiapin sice obecně patří do skupiny zájmu při stanovení ATP léčiv, nebyl však cílovým analytem, proto mu celkové podmínky měření nebyly přizpůsobovány. Možnosti jeho stanovení jsou šíře komentovány dále.

U všech ostatních ATP mimo kvetiapin není nárůst odezvy při potenciálu +1000 mV vůči odezvě dosažené při +900 mV příliš výrazný, naopak šum se vlivem oxidace povrchu elektrody značně zvyšuje. Nejvyšší poměr S:N vykazala většina ATP při potenciálu +900 mV, proto byla tato hodnota potenciálu zvolena pro další experimenty.



Obrázek 11: Hydrodynamické voltamogramy jednotlivých ATP. Podmínky měření: MF:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5):MeOH:ACN v poměru 47:7:46 (v:v:v), průtoková rychlost  $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### *Složení mobilní fáze*

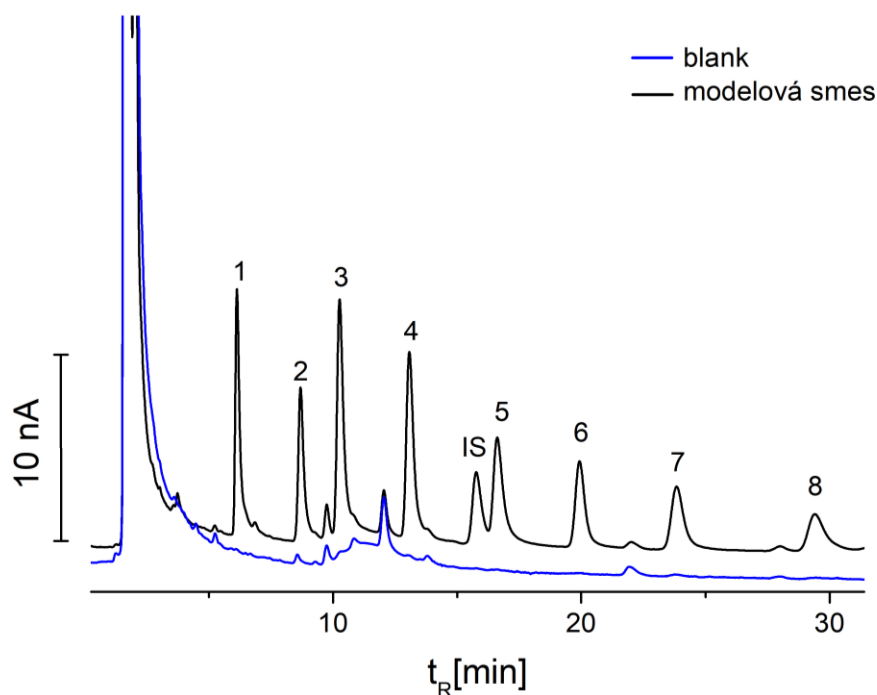
Základním faktorem pro úspěšnou separaci je složení mobilní fáze. Tento faktor je tím kritičtější, čím složitější směs je analyzována. Vedle úspěšné separace analytů jde o to, udržet co nejkratší možnou dobu celkové analýzy, od které se dále odvíjí nižší spotřeba mobilní fáze. Kromě vhodného poměru zvolených složek byla testována také optimální průtoková rychlost, která má vliv na dobu analýzy, velikost odezvy i tvar píků. Pro tuto optimalizaci byla připravena modelová směs ATP skládající se z olanzapinu, klozapinu, peferazinu, flufenazinu, promethazinu, levomepromazinu, chlorpromazinu a thiopromazinu, každé z uvedených léčiv o koncentraci  $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  v BSC kontrolním séru. Ve směsi byl také přítomen vnitřní standard s výslednou koncentrací  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Původní testovaná směs pro mobilní fázi se skládala z  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5) a ACN a vycházela z předchozích výzkumů [130]. Kvůli výměně kolony a vyššího počtu látek ve stanovované směsi látek bylo nutné přidat vyšší podíl organické fáze. Při přidavku vyššího podílu ACN však dochází k částečnému vysrážení hydrogenfosforečnanu v roztoku. Proto byla část ACN v mobilní fázi nahrazena MeOH, kde k tomuto vysrážení nedocházelo.

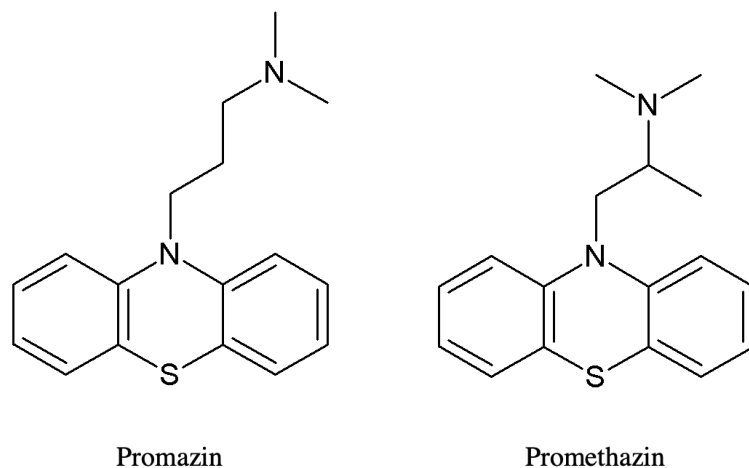
Konečné použité složení mobilní fáze pro další stanovení bylo  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5):MeOH:ACN v poměru 47:7:46 (v:v:v) při průtokové rychlosti



0,3 ml·min<sup>-1</sup>. Za těchto podmínek bylo dosaženo dostatečného rozlišení píků a zároveň byl zachován přiměřený čas separace 32 min. Obr. 12 zobrazuje separaci modelové směsi všech 8 ATP včetně vnitřního standardu. Za optimálních podmínek se systému spolehlivě dařila separace vnitřního standardu promazinu a analytu promethazinu, jež mají velmi podobnou chemickou strukturu (Obr. 13). Zajímavostí je, že při stanovení pomocí LC-MS k rozlišení těchto dvou látek nedochází, jelikož se jejich MS spektra shodují.



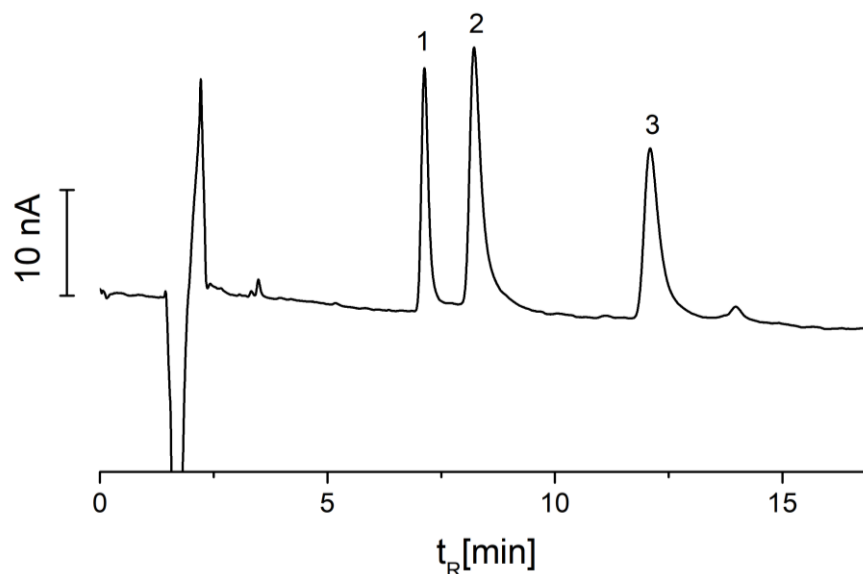
Obrázek 12: Modelová směs 8 ATP (koncentrace každého 250 nmol·l<sup>-1</sup>) a vnitřního standardu (IS) promazinu (koncentrace 200 nmol·l<sup>-1</sup>): (1) olanzapin; (2) klozapin; (3) perferazin; (4) flufenazin; (5) promethazin; (6) levomepromzin; (7) chlorpromazin; (8) thioridzin. MF: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(50 mmol·l<sup>-1</sup>, pH 7,5):MeOH:ACN, 47:7:46 (v:v:v); E = +900 mV vs. Ag/AgCl.



Obrázek 13: Chemická struktura promazinu (v práci IS) a promethazinu.

Do prvotních testů separace byl zahrnut také kvetiapin, ukázalo se však, že při výše uvedených chromatografických podmínkách dochází k jeho koeluci s olanzapinem. Při úpravě mobilní fáze tak, aby vyhovovala separaci těchto dvou ATP, byl čas analýzy nepřiměřeně dlouhý, čímž také docházelo k rozmývání píků jdoucích v konečné části chromatogramu.

Kvetiapin i olanzapin patří do druhé generace ATP, je tedy nepravděpodobné, že by se v reálných vzorcích vyskytovaly současně, proto bylo rozhodnuto vyloučit kvetiapin z modelové směsi ATP. V případě, že by bylo třeba ověřit jeho přítomnost ve vzorku, je možné provést doplňkovou analýzu s vyšším potenciálem. Jak lze pozorovat v hydrodynamickém voltamogramu, odezva kvetiapinu je při +1000 mV oproti odezvě zaznamenané při +900 mV téměř desetinásobná. Pokud by tedy byl v doplňkové analýze při +1000 mV na chromatogramu pozorován značný nárůst proudové odezvy v retenčním čase olanzapinu, resp. kvetiapinu, dalo by se usuzovat, že je kvetiapin ve směsi přítomen. V takovém případě by bylo vhodné provést alternativní analýzu s pozměněnou mobilní fází. Navržená mobilní fáze pro tuto alternativní analýzu obsahuje méně organické složky a skládá se z  $K_2HPO_4$  ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,5) a ACN v poměru 54:46 (v:v). Při této mobilní fázi je dosaženo vyhovující separace pro kvantifikaci obou těchto ATP. Obě látky se vyskytují na začátku chromatogramu, přítomnost kvetiapinu lze tedy potvrdit v relativně krátkém čase (Obr. 14). Při této alternativní analýze je nutné zvýšit potenciál na +1000 mV.

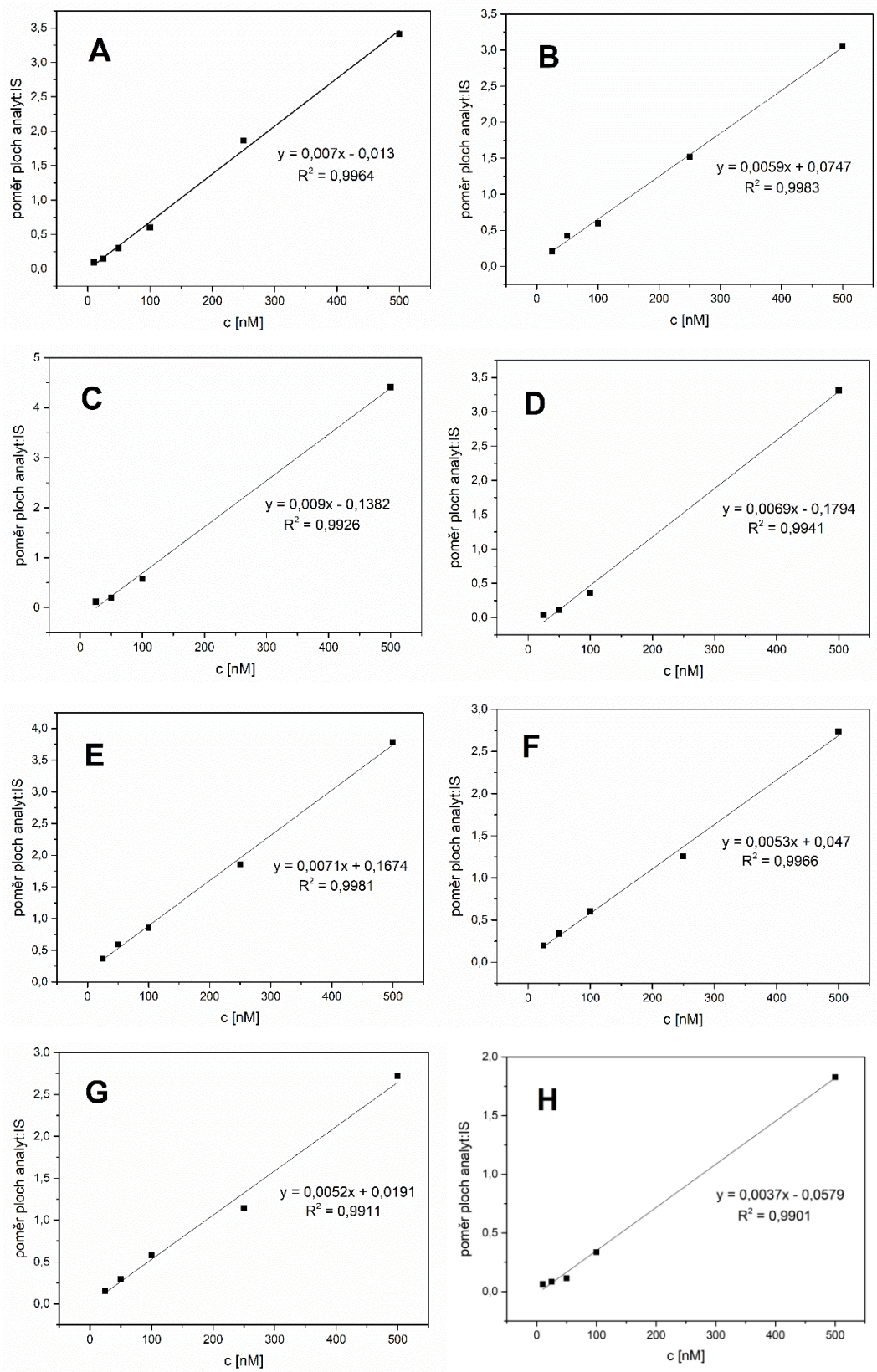


Obrázek 14: Záznam separace kvetiapinu (1), olanzapinu (2) a klozapinu (3); mobilní fáze: 50 mM-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5):ACN (54:6, v:v), E = +1000 mV (vs. Ag/AgCl).

### 3. 3. 4. 2 Kalibrace

Jako matrice pro kalibraci všech ATP bylo použito kontrolní BSC sérum. Kalibrační křivky jsou založeny na hodnotách poměru ploch píku konkrétního analytu a vnitřního standardu (Obr. 15).

Limity detekce (LOD) analytů se pohybovaly v řádu jednotek nanomolů, limity kvantifikace (LOQ) řádově v jednotkách až desítkách nanomolů. Odezva mikrotuhy na zvyšující se koncentrace analytů byla lineární v rozsahu LOQ – 500 nmol·l<sup>-1</sup> u všech testovaných ATP. Návratnost stanovení se pohybovala v rozsahu 93,4 – 114,2 %. Přesné LOD, LOQ jednotlivých ATP, příslušné regresní rovnice, koeficient determinace a vypočítaná návratnost analýz jsou uvedeny v Tab. 4. Zjištěné LOD a LOQ korespondují s hodnotami koncentrací, ve kterých se vybraná ATP běžně vyskytují v krevní plasmě. Kalibrační parametry olanzapinu a promethazinu byly dále použity pro určení koncentrace těchto ATP v reálných vzorcích.



Obrázek 15: Kalibrační křivky jednotlivých ATP: A) olanzapin; B) klozapin; C) perferazin; D) flufenazin; E) promethazin; F) levomepromazin; G) chlorpromazin; H) thioridazin

Tabulka 4: Kalibrační parametry jednotlivých ATP pro vyvinutou metodu HPLC-ED

<b>Analyt</b>	<b>LOD [nmol·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>LOQ [nmol·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>LDR [nmol·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Kalibrační rovnice</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Návratnost* [%]</b>
Olanzapin	1,0	3,4	LOQ – 500	$y = 0,007x - 0,013$	0,9964	102,3 ± 0,35
Klozapin	1,1	3,6	LOQ – 500	$y = 0,0059x + 0,0747$	0,9983	97,9 ± 0,47
Perferazin	3,5	11,2	LOQ – 500	$y = 0,000x - 0,1382$	0,9926	111,5 ± 1,22
Flufenazin	4,6	20,6	LOQ – 500	$y = 0,0069x - 0,1794$	0,9941	112,1 ± 1,03
Promazin (IS)	1,6	5,4	LOQ – 500			
Promethazin	3,9	13,1	LOQ – 500	$y = 0,0071x + 0,1674$	0,9981	88,8 ± 0,17
Levopromethazin	6,4	21,2	LOQ – 500	$y = 0,0053x - 0,047$	0,9966	93,4 ± 0,55
Chlorpromazin	7,9	26,2	LOQ – 500	$y = 0,0052x - 0,0191$	0,9911	97,5 ± 0,78
Thioridazin	5,9	19,6	LOQ – 500	$y = 0,0037x - 0,0579$	0,9901	114,2 ± 1,12

n = 4; \*koncentrační hladina 250 nmol·l<sup>-1</sup>.

### 3.3.4.3 Stabilita odezvy elektrody

Stabilita odezvy značí chemickou odolnost povrchu elektrody a je její důležitou charakteristikou. Ztráta signálu v průběhu času znamená, že povrch podléhá změnám v podobě buďto přímé oxidace povrchu, nebo tvorby tenkého filmu oxidačních produktů na povrchu elektrody.

Stabilita odezvy byla testována v rámci jednoho dne i v rámci několika po sobě jdoucích dní pomocí standardů o koncentraci 100 a 200 nmol·l<sup>-1</sup>. V obou časových rozmezích povrch elektrody vykázal výbornou stabilitu na obou koncentračních hladinách. Z naměřených odezev standardů byly spočítány relativní směrodatné odchylky (RSD), které jsou uvedeny v Tab. 5. Dle výsledků k přílišnému zanášení povrchu elektrody nedochází. Nevýznamné zanášení povrchu může být způsobeno nízkou koncentrací látek v roztoku, velmi krátkou dobou kontaktu zóny analytu a také omýváním povrchu elektrody proudem mobilní fáze s vysokým obsahem organických rozpouštědel.

Dále byla testována shoda odezvy po výměně elektrody za nový kus ze stejného balení. Výsledky prokázaly, že chemické složení mikrotuh z jedné šarže se nemění. Výpočty z opakovaných měření (n = 5) ukázaly, že RSD stanovení na různých mikrotuhách ze stejného balení je  $\sigma = 3,86\%$  na koncentrační hladině 250 nmol·l<sup>-1</sup>.

Tabulka 5: Relativní směrodatné odchylky (RSD) odezev pro jednotlivé analyty při opakovaném nástřiku standardů

Analyt	RSD v rámci jednoho dne [%]		RSD v rámci několika dní [%]	
	100 nmol·l <sup>-1</sup>	250 nmol·l <sup>-1</sup>	100 nmol·l <sup>-1</sup>	250 nmol·l <sup>-1</sup>
Olanzapin	1,62	1,59	0,89	0,78
Klozapin	1,30	1,27	0,57	0,55
Perferazin	1,78	1,42	1,78	1,53
Flufenazin	0,25	0,27	0,51	0,38
Promethazin	0,63	0,48	1,54	1,38
Levomepromazin	1,01	0,89	2,01	1,97
Chlorpromazin	0,11	0,13	3,03	2,68
Thioridazin	2,01	1,62	1,88	1,77

### 3. 3. 4. 4 Stanovení reálných vzorků

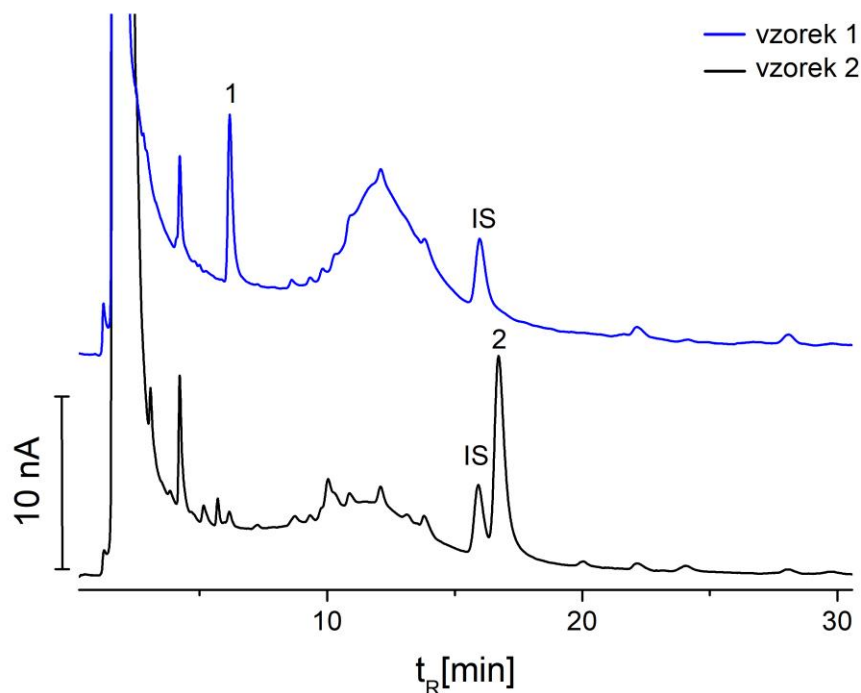
Po optimalizaci podmínek měření, určení kalibračních parametrů a dalších charakteristik mikrotuhy AinStein 0,2 B byla metoda použita pro identifikaci a určení koncentrace ATP v reálných vzorcích krevní plasmy pacientů získaných z Ústavu soudního lékařství a medicínského práva Fakultní nemocnice Olomouc.

Vzorek 1 byla krevní plasma mladého muže užívajícího mimo jiné léky i olanzapin. Krev byla subjektu odebrána po pokusu o sebevraždu předávkováním, lze tedy předpokládat přítomnost olanzapinu v krvi. Vzorek 2 byla krevní plasma starší ženy, která byla po delší dobu léčena promethazinem, u níž vlivem dlouhodobě nízkého příjmu tekutin došlo ke zvýšení koncentrace účinné látky v krvi.

Identifikace obou ATP byla potvrzena přidavkem standardu příslušného léčiva ke vzorku, což vedlo k nárůstu píků. Koncentrace léčiv ve vzorcích byla stanovena metodou vnitřního standardu a vypočítané hodnoty byly srovnány se standardně používanou LC-MS metodou pro stanovení léčiv v praxi. Chromatogram obou stanovení je možné vidět na Obr. 16.

Koncentrace olanzapinu ve vzorku 1 byla vyvinutou metodou stanovena na  $717,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace promethazinu ve vzorku 2 na  $1752 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky získané pomocí nově vyvinuté LC-ED metody jsou srovnatelné s výsledky běžně používané LC-MS metody. Návratnost LC-ED metody vůči LC-MS byly  $101,9 \pm 0,14 \%$  v případě olanzapinu a  $88,9 \pm 0,11 \%$  v případě promethazinu (Tab. 6).

Uvedené experimenty prokázaly, že mikrotuha je vhodným materiálem pro detekci při stanovení elektrochemicky aktivních látek, zejména ATP, ve vzorcích z klinické praxe. Na mikrotuze je možné dosáhnout vyhovujících LOD pro klinickou praxi. Stanovení v reálných vzorcích je možné provádět bez přílišné úpravy vzorku (bez potřeby extrakce či jiné prekoncentrační metody).



Obrázek 16: Chromatogramy reálných vzorků. Vzorek 1: olanzapin; vzorek 2: promethazin. MF:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,5):MeOH:ACN, 47:7:46 (v:v:v);  $E = +900$  mV vs. Ag/AgCl.

Tabulka 6: Vypočítané hodnoty koncentrace daných ATP v reálných vzorcích

Vzorek	Koncentrace z HPLC-EC [ $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Koncentrace z LC-MS [ $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Návratnost [%]
Plasma 1	$717,6 \pm 3,0$	704,2	$101,9 \pm 0,14$
Plasma 2	$1752 \pm 2,98$	1970	$88,9 \pm 0,11$

Výhodami mikrotuhy jako elektrody je nízká cena, snadná dostupnost a snadná výměna pracovní elektrody v případě zanešené povrchu (např. velké množství analýz reálných vzorků obsahující vysoké množství proteinů). Velkou výhodou je měření v malých objemech vzorku a snadné zapojení k HPLC systému. Při analýze dochází k minimální spotřebě organických rozpouštědel. Mikrotuha sama je prakticky přírodním materiálem, není nutná její složitá likvidace.



## 4 Závěr

Cílem diplomové práce bylo aplikovat mikrotuhu jako pracovní elektrodu do HPLC systému a její elektrodové vlastnosti demonstrovat pomocí modelové směsi 9 ATP. Mikrotuha AinStein 0,2 B byla úspěšně využita pro stanovení ATP ve dvou reálných vzorcích z klinické praxe.

Nejprve bylo pomocí CV srovnáno elektrochemické chování mikrotuhy AinStein 0,2 B a Tombow 0,5 HB, která v tomto srovnání sloužila jako velkoplošná elektroda. Také bylo srovnáno chování jednotlivých ATP na obou těchto elektrodách. Bylo testováno, zda má na velikost proudové odezvy majoritní vliv průřez elektrody či její laterální povrch, výrazně větší vliv jednoho z příspěvků však nebyl prokázán.

Provedené experimenty ukázaly, že mikrotuha AinStein 0,2 B vykazuje dobrou elektrochemickou aktivitu bez jakékoliv úpravy povrchu. O vhodnosti mikrotuhy jako pracovní elektrody svědčí dosažené LOD a LOQ, které jsou u všech ATP v řádu jednotek až desítek  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a jsou tedy více než dostačující pro stanovení ATP v reálných vzorcích, kde se ATP vyskytují ve značně vyšších koncentracích. Mikrotuha vykazala dostatečnou stabilitu odezvy v rámci jednoho i několika dní, reprodukovatelnou odezvu poskytla také po výměně elektrody za nový kus. Možnost použití mikrotuhy v klinické praxi byla demonstrována na dvou případech intoxikace. V obou případech bylo dosaženo dobré shody s výsledky získanými pomocí běžně používané metody LC-MS.

## 5 Seznam použitých zkratek

ABS	acetátový pufr
ABSA	kyselina poly(p-aminobenzensulfonová)
ACN	acetonitril
AdS-DPV	adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
ATP	antipsychotika
ATS-DPV	adsorpční přenosová rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie
AuNDs	zlaté nanotečky
AuNPs	zlaté nanočástice
AuNRs	zlaté nanotrubičky
B-R	Britton-Robinsonův pufr
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
CB	Cibacron Blue F3G
CuNPs	měděné nanočástice
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPCSV	diferenčně pulzní katodická rozpouštěcí voltametrie
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
FIA	průtoková injekční analýza
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GKNPs	nanočástice glycerolkinázy
GluOx	glukózaoxidáza
GPE	tuha („graphite pencil electrode“)
GPONPs	nanočástice glycerol-3-fosfát oxidázy
Gr-Bi	nanokompozit grafenu a bismutu
HbNPs	hemoglobinové nanočástice
HCF	hexakynoželeznan
HGNPs	duté zlaté nanočástice
HPLC-ED	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí
HRP	křenová peroxidáza

HSV	vir herpes simplex
CHIT	chitosan
IL	iontová kapalina
LC-ED	kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LSV	lineární „sweep“ voltametrie
MDB	Meldola Blue
MeOH	methanol
MIP	molekulárně vtištěný polymer
MWCNTs	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
Nc	neokuproin
ND	nanotečky
Ni	nafion
NK	nukleové kyseliny
p-XO	polyxylenová oranž
PANI	polyanilin
PBS	fosfátový pufr
PP	polypyrol
PVF	poly(vinylferrocenium)
rGO	redukovaný grafen
RNA	ribonukleová kyselina
RSD	relativní směrodatná odchylka
S:N	poměr signálu ku šumu
SEP	sepiolit
SPE	sítotiskem připravené elektrody
SW-ASV	square wave anodická rozpouštěcí voltametrie
SW-CSV	square wave katodická rozpouštěcí voltametrie
SWNCTs	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky
SWV	squarewave voltametrie
TyB	trypanová modř

## 6 Seznam použité literatury

- [1] R.N. Bhowmik, Ferromagnetism in lead graphite-pencils and magnetic composite with CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> particles, *Compos. Part B* 43 (2012) 503-509.
- [2] R. Navrátil, A. Kotzianová, V. Halouzka, T. Opletal, I. Třísková, L. Trnková, J. Hrbáč, Polymer lead pencil graphite as electrode material: Voltammetric, XPS and Raman study, *J. Electroanal. Chem.* 783 (2016) 152–160.
- [3] H.O. Pierson, *Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes: Properties, Processing and Applications*, Noyes Publications, United States of America, 1993.
- [4] A.D. Jara, A. Betemariam, G. Woldetinsae, J.Y. Kim, Purification, application and current market trend of natural graphite: A review, *Int. J. Min. Sci. Technol.* 29 (2019) 671–689.
- [5] R. Sengupta, B. Bhattacharya, S. Bandyopadhyay, A.K. Bhowmick, A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 638–670.
- [6] Annu, S. Sharma, R. Jain, A.N. Raja, Review—Pencil Graphite Electrode: An Emerging Sensing Material, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020).
- [7] M. Darder, P. Aranda, C. Ruiz-Garcia, F.M. Fernandes, E. Ruiz-Hitzky, The Meeting Point of Carbonaceous Materials and Clays: Toward a New Generation of Functional Composites, *Adv. Funct. Mater. The Meeting Point of Carbonaceous Materials and Clays: Toward a New Generation of Functional Composites* (2017).
- [8] A. Knápek, D. Sobola, D. Burda, A. Daňhel, M. Mousa, V. Kolařík, Polymer Graphite Pencil Lead as a Cheap Alternative for Classic Conductive SPM Probes, *Nanomaterials* 9 (2019) 1756(1)-1756(12).
- [9] J.A. Denman, I.M. Kempson, W.M. Skinner, K.P. Kirkbride, Discrimination of pencil markings on paper using elemental analysis: An initial investigation, *Forensic Sci. Int.* 175 (2008) 123-129.
- [10] Y. Kim, A. Sung, Y. Seo, S. Hwang, H. Kim, Measurement of hardness and friction properties of pencil leads for quantification of pencil hardness test, *Adv. Appl. Ceram.* 115 (8) (2016) 443-448.
- [11] H. Petroski, *The Pencil: A History of Design and Circumstance*, Alfred A. Knopf, New York, 1989.

- [12] F.L. Encke, The Chemistry and Manufacturing of the Lead Pencil, *J. Chem. Educ.* 47 (1970).
- [13] P.H.C.P. Tavares, P.J.S. Barbeira, Influence of pencil lead hardness on voltammetric response of graphite reinforcement carbon electrodes, *J. Appl. Electrochem* 38 (2008) 827–832.
- [14] Á. Torrinha, C.G. Amorim, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, Biosenzig based on pencil graphite electrodes, *Talanta* 190 (2018) 235-247.
- [15] M.P. Down, C.W. Foster, X. Ji, C.E. Banks, Pencil drawn paper based supercapacitors, *RSC Adv.* 6 (2016) 81130-81141.
- [16] A.M. Bond, P.J. Mahon, J. Schiewe, V. Vincente-Beckett, An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 67—74.
- [17] F. Stradolini, T. Kilic, A.D. Consiglio, M. Ozsoz, G.D. Micheli, S. Carrara, Long-term Monitoring of Propofol and Fouling Effect on Pencil Graphite Electrodes, *Electroanalysis* 30 (2018) 1363-1369.
- [18] L. Liv, N. Nakiboglu, Simple and rapid voltammetric determination of boron in water and steel samples using a pencil graphite electrode, *Turk. J. Chem.* 40 (2016) 412 – 421.
- [19] Y.M. Temerk, H.S.M. Ibrahim, W. Schuhmann, Square Wave Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of the Anticancer Drugs Flutamide and Irinotecan in Biological Fluids Using Renewable Pencil Graphite Electrodes, *Electroanal.* 28 (2016) 372-379.
- [20] C.W. Foster, D.A.C. Brownson, A.P.R.d. Souza, E. Bernalte, J. Iniesta, M. Bertotti, C.E. Banks, Pencil it in: pencil drawn electrochemical sensing platforms, *Analyst* 141 (2016) 4055-4064.
- [21] S.H. Lee, J.Y. Ban, C.-H. Oh, H.-K. Park, S. Choi, A solvent-free microbial-activated air cathode battery paper platform made with pencil-traced graphite electrodes, *Sci. Rep.* 6 (2016) 28588.
- [22] Y. Zhang, Z. Duan, H. Zou, M. Ma, Drawn a facile sensor: A fast response humidity sensor based on pencil-trace, *Sens. Actuator B-Chem.* 261 (2018) 345-353.
- [23] 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.
- [24] D. King, J. Friend, J. Kariuki, Measuring Vitamin C Content of Commercial Orange Juice Using a Pencil Lead Electrode, *J. Chem. Educ.* 87 (2010) 507-509.

- [25] N. Vishnu, A.S. Kumar, A preanodized 6B-pencil graphite as an efficient electrochemical sensor for mono-phenolic preservatives (phenol and meta-cresol) in insulin formulations, *Anal. Methods* 7 (2015) 1943-1950.
- [26] I.G. David, D.-E. Popa, M. Bualendra, Pencil Graphite Electrodes: A Versatile Tool in Electroanalysis, *J. Anal. Methods Chem.* 2 (2017) 1-22.
- [27] J. Wang, A.-N. Kawde, Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 219-224.
- [28] J.K. Kariuki, An Electrochemical and Spectroscopic Characterization of Pencil Graphite Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 159 (2012) H747-H751.
- [29] A. Nathani, N. Vishnu, C. Sharma, Review—Pencil Graphite Electrodes as Platform for Enzyme and Enzyme-Like Protein Immobilization for Electrochemical Detection, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 037520-037532.
- [30] C.-W. Lin, Z. Zhao, K. Kim, J. Huang, Pencil Drawn Strain Gauges and Chemiresistors on Paper, *Sci Rep* 4 (2014) 3812.
- [31] S. Hasoň, V. Ostnatá, M. Fojta, Simultaneous voltammetric determination of free tryptophan, uric acid, xanthine and hypoxanthine in plasma and urine, *Electrochim. Acta* 329 (2020) 135132-135142.
- [32] H.C.B. Kalachar, S. Basavanna, R. Viswanatha, Y.A. Naik, D.A. Raj, P.N. Sudha, Electrochemical Determination of 1-Dopa in *Mucuna pruriens* Seeds, Leaves and Commercial Siddha Product Using Gold Modified Pencil Graphite Electrode, *Electroanal.* 23 (2011) 1107-1115.
- [33] B.B. Prasad, R. Madhuri, M.P. Tiwari, P.S. Sharma, Electrochemical sensor for folic acid based on a hyperbranched molecularly imprinted polymer-immobilized sol-gel-modified pencil graphite electrode, *Sens. Actuator B-Chem.* 146 (2010) 321-330.
- [34] A. Erdem, P. Pappakonstantinou, H. Murphy, Direct DNA Hybridization at Disposable Graphite Electrodes Modified with Carbon Nanotubes, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6656-6659.
- [35] D.G. Dilgin, S. Karakaya, Differential pulse voltammetric determination of acyclovir in pharmaceutical preparations using a pencil graphite electrode, *Mater. Sci. Eng. C* 63 (2016) 570-576.
- [36] 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.
- [37] Y. Yardim, Z. Şentürk, Electrochemical evaluation and adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin or dihydrocapsaicin on a disposable pencil graphite electrode, *Talanta* 112 (2013) 11-19.

- [38] M. Rizk, M.M.A. El-Alamin, H.A.M. Hendawy, M.I. Moawad, Highly Sensitive Differential Pulse and Square Wave Voltammetric Methods for Determination of Strontium Ranelate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form, *Electroanal.* 28 (2016) 770-777.
- [39] J.I. Gowda, S.T. Nandibewoor, Electrochemical characterization and determination of paclitaxel drug using graphite pencil electrode, *Electrochim. Acta* 116 (2014) 326-333.
- [40] M.A. Aziz, A.-N. Kawde, Gold nanoparticle-modified graphite pencil electrode for the high-sensitivity detection of hydrazine, *Talanta* 115 (2013) 214-221.
- [41] N. Aladag, L. Trnková, A. Kouřilová, M. Ozsoz, F. Jelen, Voltammetric Study of Aminopurines on Pencil Graphite Electrode in the Presence of Copper Ions, *Electroanal.* 22 (2010) 1675-1681.
- [42] E. Bernalte, C.W. Foster, D.A.C. Brownson, M. Mosna, G.C. Smith, C.E. Banks, Pencil It in: Exploring the Feasibility of Hand-Drawn Pencil Electrochemical Sensors and Their Direct Comparison to Screen-Printed Electrodes, *Biosensors* 6(3):45 (2016).
- [43] K. Aoki, T. Okamoto, H. Kaneko, K. Nozaki, A. Negishi, Applicability of graphite reinforcement carbon used as the lead of a mechanical pencil to voltammetric electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 263 (1989) 323-331.
- [44] S. Pourbeyram, K. Mehdizadeh, Nonenzymatic glucose sensor based on disposable pencil graphite electrode modified by copper nanoparticles, *J. Food Drug. Anal.* 24 (2016) 894-902.
- [45] M. Vestergaard, K. Kerman, E. Tamiya, An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 273-281.
- [46] I.G. David, D.E. Popa, M. Buleandra, Z. Moldovan, E.E. Iorgulescu, I.A. Badea, Cheap pencil graphite electrodes for rapid voltammetric determination of chlorogenic acid in dietary supplements, *Anal. Methods* 8 (2016) 6537-6544.
- [47] J. Kariuki, E. Ervin, C. Olafson, Development of a Novel, Low-Cost, Disposable Wooden Pencil Graphite Electrode for Use in the Determination of Antioxidants and Other Biological Compounds, *Sensors* 15 (2015) 18887-18900.
- [48] H.M. Elqudaby, H.A.M. Hendawy, E.R. Souaya, G.G. Mohamed, G.M.G. Eldin, Utility of Activated Glassy Carbon and Pencil Graphite Electrodes for Voltammetric Determination of Nalbuphine Hydrochloride in Pharmaceutical and Biological Fluids, *Int. J. Electrochem. Sci.* (2016).

- [49] I.G. David, D.E. Popa, A.-A. Calin, M. Buleandra, E.-E. Iorgulescu, Voltammetric determination of famotidine on a disposable pencil graphite electrode, *Turk. J. Chem.* 40 (2016) 125-135.
- [50] A. Rana, N. Baig, T.A. Saleh, Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review, *J. Electroanal. Chem.* 833 (2019) 313-332.
- [51] I.G. David, A.-M.C. Bizgan, D.E. Popa, M. Buleandra, Z. Moldovan, I.A. Badea, T.A. Tekiner, H. Basaga, A.A. Ciucu, Rapid determination of total polyphenolic content in tea samples based on caffeic acid voltammetric behaviour on a disposable graphite electrode, *Food Chem.* 173 (2015) 1059-1065.
- [52] I.G. David, M. Buleandra, D.E. Popa, A.-M.C. Bizgan, Z. Moldovan, I.-A. Badea, E.E. Iorgulescu, T.A. Tekiner, Voltammetric determination of polyphenolic content as rosmarinic acid equivalent in tea samples using pencil graphite electrodes, *J. Food Sci. Technol* 53(6) (2016) 2589-2596.
- [53] I.G. David, D.E. Popa, M. Buleandra, Z. Moldova, E.E. Iorgulescu, I.A. Badea, Cheap pencil graphite electrodes for rapid voltammetric determination of chlorogenic acid in dietary supplements, *Anal. Methods* 8 (2016) 6537-6544.
- [54] I.G. David, M.-A. Florea, O.G. Cracea, D.E. Popa, M. Buleandra, E.E. Iorgulescu, V. David, I.A. Badea, A.A. Ciucu, Voltammetric determination of B1 and B6 vitamins using a pencil graphite electrode, *Chem. Pap.* 69 (2015) 901-910.
- [55] Ö. Saglam, D.G. Dilgin, B. Ertek, Y. Dilgin, Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode, *Mater. Sci. Eng. C* 60 (2016) 156-162.
- [56] S. Hasoň, M. Fojta, V. Ostatná, Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes, *J. Electroanal. Chem.* 847 (2019).
- [57] A. Rouhollahi, M. Kouchaki, S. Seidi, Electrically stimulated liquid phase microextraction combined with differential pulse voltammetry: a new and efficient design for in situ determination of clozapine from complicated matrices, *RSC Adv.* 6 (2016) 12943-12952
- [58] M.A. Kamyabi, N. Hajari, Easy Activation of Pencil Graphite Electrode as Sensing Platform for Determination of Bisphenol A, *J. Anal. Chem.* 74 (2019) 286-295.
- [59] S. Güney, Electrochemical synthesis of molecularly imprinted poly(p-aminobenzene sulphonic acid) on carbon nanodots coated pencil graphite electrode for selective determination of folic acid, *J. Electroanal. Chem.* 854 (2019) 113518.



- [60] P.Y. Khashaba, H.R.H. Ali, M.M. El-Wakil, Square Wave Stripping Voltammetric Determination of Pantoprazole in Rabbit Plasma Using Surfactant-Based Pencil Graphite Electrode, *J. Anal. Chem.* 74 (2019) 609-616.
- [61] M. Wang, Q. Wang, X. Lu, K. Wang, L. Fang, F. Ren, G. Lu, H. Zhang, Interaction Behaviors of Fibrinopeptide-A and Graphene with Different Functional Groups: A Molecular Dynamics Simulation Approach, *J. Phys. Chem B* 121 (2017) 7907-7915.
- [62] A. Özcan, Y. Sahin, Selective and Sensitive Voltammetric Determination of Dopamine in Blood by Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrodes, *Electroanal.* 21 (2009) 2363-2370.
- [63] I.G. David, I.A. Badea, G.L. Radu, Disposable carbon electrodes as an alternative for the direct voltammetric determination of alkyl phenols from water samples, *Turk. J. Chem.* 37 (2013) 91-100.
- [64] W. Gao, J. Song, N. Wu, Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode, *J. Electroanal. Chem.* 576 (2005) 1-7.
- [65] S. Nagarajen, R. Vairimuthu, R. Angamuthu, G. Venkatachalam, Electrochemical fabrication of reusable pencil graphite electrodes for highly sensitive, selective and simultaneous determination of hydroquinone and catechol, *J. Electroanal. Chem.* 846 (2019) 113156.
- [66] S. Karakaya, D.G. Dilgin, Low-cost determination of cetirizine by square wave voltammetry in a disposable electrode, *Monatsch. Chem* 150 (2019) 1003-1010.
- [67] D.L. Vu, B. Ertek, Y. Dilgin, L. Červenka, Voltammetric Determination of Tannic Acid in Beverages using Pencil Graphite Electrode, *Czech J. Food Sci.* 33 (2015) 72-76.
- [68] D.L. Vu, S. Žabčíková, L. Červenka, B. Ertek, Y. Dilgin, Sensitive Voltammetric Determination of Natural Flavonoid Quercetin on a Disposable Graphite Lead, *Food Technol. Biotechnol.* 53 (2015) 379-384.
- [69] A. Özcan, Y. Sahin, Preparation of selective and sensitive electrochemically treated pencil graphite electrodes for the determination of uric acid in urine and blood serum, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2497-2502.
- [70] E. Alipour, M.R. Majidi, A. Saadatirad, S.M. Golabi, Determination of uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode, *Anal. Methods* 4 (2012) 2288-2295.

- [71] E. Alipour, M.R. Majidi, A. Saadatired, S.M. Golabi, Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode, *Electrochim. Acta* 91 (2013) 36-42.
- [72] A.H. Oghli, E. Alipour, M. Asadzadeh, Development of a novel voltammetric sensor for the determination of methamphetamine in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode, *RSC Adv.* 5 (2015) 9674-9682.
- [73] M.R. Akanda, M. Sohail, M.A. Aziz, A.-N. Kawde, Recent Advances in Nanomaterial-Modified Pencil Graphite Electrodes for Electroanalysis, *Electroanal.* 28 (2016) 408-424.
- [74] N. Baig, A. Rana, A.-N. Kawde, Modified Electrodes for Selective Voltammetric Detection of Biomolecules, *Electroanal.* 30 (2018) 2551-2574.
- [75] A.-N. Kawde, Porous Copper-Modified Graphite Pencil Electrode for the Amperometric Detection of 4-Nitrophenol, *Electroanal.* 26 (2014) 2484-2490.
- [76] T.A. Bendikov, T.C. Harmon, A Sensitive Nitrate Ion-Selective Electrode from a Pencil Lead, *J. Chem. Educ.* 82 (2005) 439-441.
- [77] R. Devi, S. Yadav, R. Nehra, C.S. Pundir, An amperometric hypoxanthine biosensor based on Au@FeNPs for determination of hypoxanthine in meat samples, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 629-635.
- [78] J. Narang, N. Malhotra, G. Singh, C.S. Pundir, Electrochemical impedimetric detection of anti-HIV drug taking gold nanorods as a sensing interface, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 332-337.
- [79] M.R. Majidi, Reaction and nucleation mechanisms of copper electrodeposition on disposable pencil graphite electrode, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1119-1126.
- [80] M.R. Majidi, K. Asadpour-Zeynali, B. Hafezi, Fabrication of Nanostructured Copper Thin Films at Disposable Pencil Graphite Electrode and its Application to Electrocatalytic Reduction of Nitrate, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 162-170.
- [81] M. Rezaei, S.H. Tabaian, D.F. Haghshenas, Nucleation and growth of Pd nanoparticles during electrocrystallization on pencil graphite, *Electrochim. Acta* 59 (2012) 360-366.
- [82] Z.O. Uygun, Y. Dilgin, A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos, *Sens. Actuator B-Chem.* 188 (2013) 78-84.
- [83] A. Nezhadali, Z. Rouki, M. Nezhadali, Electrochemical preparation of a molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for the determination of phenothiazine in model and real biological samples, *Talanta* 144 (2015) 456-465.

- [84] F. Kuralay, A. Erdem, S. Abaci, H. Özyörük, A. Yildiz, Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization, *Electrochem. commun.* 11 (2009) 1242-1246.
- [85] M.D. Rubianes, G.A. Rivas, Amperometric Quantification of Dopamine Using Different Carbon Electrodes Modified with a Melanin-Type Polymer, *Anal. Lett.* 36 (2003) 329-345.
- [86] A. Erdem, F. Kuralay, H.E. Cubukcu, G. Congur, H. Karadeniz, E. Canavar, Sensitive sepiolite-carbon nanotubes based disposable electrodes for direct detection of DNA and anticancer drug–DNA interactions, *Analyst* 137 (2012).
- [87] H.T. Purushothama, Y.A. Nayaka, Pencil graphite electrode based electrochemical system for the investigation of antihypertensive drug hydrochlorothiazide: An electrochemical study, *Chem. Phys. Lett.* 734 (2019) 136718.
- [88] F. Kuralay, E. Yilmaz, L. Uzun, A. Denizli, Cibacron Blue F3GA modified disposable pencil graphite electrode for the investigation of affinity binding to bovine serum albumin, *Colloid. Surface B* 110 (2013) 270-274.
- [89] P. Kara, B. Meric, A. Zeytinoglu, M. Ozsoz, Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 69-76.
- [90] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, Electrochemical Genosensors Based on Colloidal Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2181-2187.
- [91] A. Rana, A.-N. Kawde, M. Ibrahim, Simple and sensitive detection of 4-nitrophenol in real water samples using gold nanoparticles modified pretreated graphite pencil electrode, *J. Electroanal. Chem.* 820 (2018) 24-31.
- [92] I. Teoman, S. Karakaya, Y. Dilgin, Sensitive and Rapid Flow Injection Amperometric Hydrazine Sensor using an Electrodeposited Gold Nanoparticle Graphite Pencil Electrode, *Anal. Lett.* 52 (2019) 2041-2056.
- [93] V.H. Dang, N.H. Anh, P.T.H. Yen, N.Q. Giao, V.T.T. Ha, An attempt to use pencil leads as cheap materials for electrochemical sensor Vietnam. *J. Chem* 56 (2018) 726-729.
- [94] S. Jahandari, M.A. Taher, H. Karimi-Maleh, A first adrenalone electrochemical sensor using a gold-nanoparticle/poly(pyrrole) composite- modified graphite electrode, *Anal. Methods* 11 (2019) 2658.

- [95] G. Congur, F. Sayar, A. Erdem, E. Paksin, Voltammetric and impedimetric DNA detection at single-use graphite electrodes modified with gold nanorods, *Colloid. Surface B* 112 (2013) 61-66.
- [96] F. Azadmehr, K. Zarei, Ultrasensitive determination of ceftizoxime using pencil graphite electrode modified by hollow gold nanoparticles/reduced graphene oxide, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 1890-1900.
- [97] C. Cheng, K.-C. Chang, C.-S. Chena, D.G. Pijanowska, Biosensor with Nano-gold Particle Modified Pencil Lead Carbon Electrode for Long-term Glucose Monitoring of Waste Tree Branch Hydrolysis, *J. Chin. Chem. Soc-Taip.* 58 (2011) 739-748.
- [98] N. Vishnu, S. Badhulika, Single step grown MoS<sub>2</sub> on pencil graphite as an electrochemical sensor for T guanine and adenine: A novel and low cost electrode for DNA studies, *Biosens. Bioelectron.* 124-125 (2019) 122-128.
- [99] G. Emir, Y. Dilgin, R. Apak, A New Redox Mediator (Cupric-Neocuproine Complex)-Modified Pencil Graphite Electrode for the Electrocatalytic Oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: A Flow Injection Amperometric Sensor, *Chem. Electro. Chem* 7 (2020) 649-658.
- [100] M.R. Majidi, K. Asadpour-Zeynali, B. Hafezi, Sensing L-cysteine in urine using a pencil graphite electrode modified with a copper hexacyanoferrate nanostructure, *Microchim. Acta* 169 (2010) 283-288.
- [101] M. Hyder, G.R.K. Reddy, B. Naveen, P.S. Kumar, Copper-silver bimetallic nanoelectrocatalyst on pencil graphite substrate for T highly selective amperometric dopamine sensor, *Chem. Phys. Lett.* 740 (2020) 137086.
- [102] M. Dehghanzade, E. Alipour, Voltammetric determination of diazepam using a bismuth modified pencil graphite electrode, *Anal. Methods* 8 (2016) 1995-2004.
- [103] H.D. Kilic, H. Kizil, Simultaneous Analysis of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> at Graphene/Bismuth Nanocomposite Film-Modified Pencil Graphite Electrode Using Square Wave Anodic Stripping Voltammetry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 8113-8121.
- [104] S. Mathur, A. Erdem, C. Cavelius, S. Barth, J. Altmayer, Amplified electrochemical DNA-sensing of nanostructured metal oxide films deposited on disposable graphite electrodes functionalized by chemical vapor deposition, *Sens. Actuator B-Chem.* 136 (2009) 432-437.
- [105] J. Zhang, J. Zheng, An enzyme-free hydrogen peroxide sensor based on Ag/FeOOH nanocomposites, *Anal. Methods* 7 (2015) 1788-1793.

- [106] G. Congur, M. Plucnara, A. Erdem, M. Fojta, Detection of p53 Gene by Using Genomagnetic Assay Combined with Carbon Nanotube Modified Disposable Sensor Technology, *Electroanal.* 27 (2015) 1579 - 1586.
- [107] F. Kuralay, T. Vural, C. Bayram, E.B. Denkbaz, S. Abaci, Carbon nanotube–chitosan modified disposable pencil graphite electrode for Vitamin B12 analysis, *Colloid. Surface B* 87 (2011) 18-22.
- [108] G.P. Fard, E. Alipour, R.E.A. Sabzi, Modification of a disposable pencil graphite electrode with multiwalled carbon nanotubes: application to electrochemical determination of diclofenac sodium in some pharmaceutical and biological samples, *Anal. Methods* 8 (2016) 3966-3974.
- [109] H. Karimi-Maleh, F. Tahernejad-Javazmi, N. Atar, M.L. Yola, V.K. Gupta, A.A. Ensafi, A Novel DNA Biosensor Based on a Pencil Graphite Electrode Modified with Polypyrrole/Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes for Determination of 6-Mercaptopurine Anticancer Drug, *Ind. Eng. hem. Res.* (2015) 3634-3639.
- [110] G. Hao, D. Zheng, T. Gan, C. Hu, S. Hu, Development and application of estradiol sensor based on layer-by-layer assembling technique, *J. Exp. Nanosci* 6 (2011) 13-28.
- [111] S. Poorahong, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, W. Limbut, A. Numnuam, P. Kanatharana, Amperometric sensor for detection of bisphenol A using a pencil graphite electrode modified with polyaniline nanorods and multiwalled carbon nanotubes, *Microchim. Acta* 16 (2012) 91-99.
- [112] S. Teepoo, P. Chumsaeng, P. Nethan, W. Prueprang, P. Timsae, Highly Sensitive Pencil-Based Renewable Biosensor for Hydrogen Peroxide Detection With a Novel Bionanomultilayer, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 4645-4656.
- [113] V. Narwal, C.S. Piundir, Fabrication of glycerol biosensor based on co-immobilization of enzyme nanoparticles onto pencil graphite electrode, *Anal. Biochem.* 555 (2018) 94-103.
- [114] V. Narwal, R. Deswal, C.S. Pundir, Fabrication of an electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on immobilization T of hemoglobin nanoparticles onto pencil graphite electrode, *Process Biochem.* 71 (2018) 61-68.
- [115] K. Pokpas, S. Zbeda, N. Jahed, N. Mohamed, P.G. Baker, E.I. Iwuoha, Electrochemically Reduced Graphene Oxide Pencil-Graphite in situ Plated Bismuth-film Electrode for the Determination of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 736-759.
- [116] B.-C. Hsieh, T.-J. Cheng, S.-H. Shih, R.L.C. Chen, Pencil lead microelectrode and the application on cell dielectrophoresis, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9916-9920.

- [117] A. Cantalapiedra, M.J. Gismera, J.R. Procopio, M.T. Sevilla, Electrochemical sensor based on polystyrene sulfonate–carbon nanopowders composite for Cu (II) determination, *Talanta* 139 (2015) 111-116.
- [118] M. Güneş, S. Karakaya, Y. Dilgin, Development of an interference-minimized amperometric-FIA glucose biosensor at a pyrocatechol violet/glucose dehydrogenase-modified graphite pencil electrode, *Chem. Pap.* (2020).
- [119] W. Li, D. Qian, Y. Li, N. Bao, H. Gu, C. Yu, Fully-drawn pencil-on-paper sensors for electroanalysis of dopamine, *J. Electroanal. Chem.* 769 (2016) 72-79.
- [120] E.W. Nery, J.A. Guimaraes, L.T. Kubota, Paper-Based Electronic Tongue, *Electroanal.* (2015) 2357-2362.
- [121] R.K. Arun, V. Gupta, P. Singh, G. Biswas, N. Chanda, Selection of Graphite Pencil Grades for the Design of Suitable Electrodes for Stacking Multiple Single-Inlet Paper-Pencil Fuel Cells *ChemistrySelect* 4 (2019) 152-159.
- [122] J. Jin, T. Hiroi, K. Sato, T. Miwa, T. Takeuchi, Use of Disposable GRC Electrodes for the Detection of Phenol and Chlorophenols in Liquid Chromatography, *Anal. Sci.* 18 (2002) 549-554.
- [123] S. Ayaz, Y. Dilgin, Flow injection amperometric determination of hydrazine based on its electrocatalytic oxidation at pyrocatechol violet modified pencil graphite electrode, *Electrochim. Acta* 258 (2017) 1086-1095.
- [124] P. Masawat, S. Liawruangrath, Y. Vaneesorn, B. Liawruangrath, Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry, *Talanta* 58 (2002) 1221-1234.
- [125] M. Ratnaparkhi, G.P. Mohanta, L. Upadhyay, A typical Antipsychotic: A Review, *Int. J. Drug Dev. Res.* 2(4) (2010) 879-885.
- [126] D.M. Gardner, R.J. Baldessarini, P. Waraich, Modern antipsychotic drugs: a critical overview, *CMAJ* 172(13) (2005) 1703-1711.
- [127] R.B. Mailman, V. Murthy, Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity?, *Curr. Pharm. Des.* 16(5) (2010) 488-501.
- [128] A.N.d. Araújo, E.P.d. Sena, I.R.d. Oliveira, M.F. Juruena, Antipsychotic agents: efficacy and safety in schizophrenia, *Drug. Healthc. Patient. Saf.* 4 (2012) 173-180.
- [129] D. Riman, M.I. Prodromidis, D. Jirovský, J. Hrbáč, Low-cost pencil graphite-based electrochemical detector for HPLC with near-coulometric efficiency, *Sens. Actuator B-Chem.* 296 (2019) 126618.

[130] K. Krčová, Simultánní stanovení antipsychotických léčiv metodou HPLC - ED, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2019.