

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2017

**KLAUDIE
ČERNOVSKÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Zavedení metody měření vitamínu K
na voltametrickém zařízení PalmSens
EmStat3**

**Implementation of voltammetric
measurement of vitamin K on device
PalmSens EmStat3**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Klaudie Černovská

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zuzana Fílová

Kladno 2017

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Kludie Černovská**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Zavedení metody měření vitamínu K na voltametrickém zařízení PalmSens EmStat3**
Téma anglicky: Implementation of voltammetric measurement of vitamin K on device PalmSens EmStat3

Zásady pro vypracování:

Cílem práce je zavedení metody měření na voltametrickém zařízení se zaměřením na elektrochemické vlastnosti vitamínu K, klíčového kofaktoru hemokoaguace. Navrhněte vhodné zapojení elektrochemického zařízení PalmSens EmStat3 v biochemické laboratoři a přístroj zprovozněte. Provedte sérii měření na elektrochemickém standardu v módu cyklické voltametrie pro ověření metody. Provedte sérii voltametrických měření vitamínu K s použitím různých rozpouštědel. Analyzujte vliv rozpouštědla na měření. Na základě analýzy výsledků měření metodu optimalizujte.

Seznam odborné literatury:

- [1] Klouda, P., Moderní analytické metody, ed. 2, Pavel Klouda: Ostrava, 2003, 132 s., ISBN 8086369072
[2] Fei, J., Wen, X., Zhang, Y., Yi, L., Chen, X., Cao, H. , Voltammetric determination of trace doxorubicin at a nano-titania/nafion composite film modified electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide, Microchimica acta, ročník 164, číslo 1-2, 2009, 85-91 s.

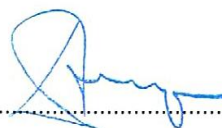
Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Ing. Zuzana Fílová

Konzultant: Ing. Libor Holík



vedoucí katedry / pracoviště



děkan

V Kladně dne 20.02.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Zavedení metody měření vitamínu K na voltametrickém zařízení PalmSens EmStat3“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19.5.2017

.....

Kludie Černovská

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní Ing. Zuzaně Fílové za odbornou pomoc, jež mi byla poskytnuta, a za předávání vědomostí v oboru elektrochemie.

ABSTRAKT

Zavedení metody měření vitamínu K na voltametrickém zařízení PalmSens

EmStat3

Bakalářská práce se zabývá zavedením metod na voltametrickém zařízení EmStat3 firmy PalmSens. Cílem práce bylo zapojení a zprovoznění přístroje EmStat3 v laboratorním zázemí. Součástí práce bylo provedení sérií měření na elektrochemickém standardu (hexakynoželezitanu draselném) pro ověření funkčnosti zařízení za pomoci metody cyklická voltametrie. Za účelem potvrzení elektrochemické aktivity chinonové struktury byl zkoumán hydrochinon rozpuštěný v různých organických a anorganických rozpouštědlech. Byla provedena série voltametrického měření vitamínu K za použití různých rozpouštědel. Pozornost byla soustředěna na vliv rozpouštědla. Z části týkající se hydrochinonu vyplynulo, že chinonová struktura je elektrochemicky aktivní. Jako vhodná organická rozpouštědla byla označena následující rozpouštědla: acetonitril, methanol a propan-1-ol. Z anorganických rozpouštědel se osvědčila kyselina chlorovodíková, sírová a dusičná.

Klíčová slova

Cyklická voltametrie, EmStat3, hexakynoželezitan draselný, hydrochinon, vitamín K

ABSTRACT

Implementation of voltammetric measurement of vitamin K od device PalmSens EmStat3

The dissertation deals with the implementation of methods on an EmStat3 voltammetric device produced by PalmSens. The aim of the study was to connect and run the EmStat3 device in a laboratory background. The study also involved performing a series of measurements on an electrochemical standard (potassium hexacyanoferrate) to verify the functionality of the device using the cyclic voltammetric method. In order to confirm the electrochemical activity of the quinone structure, hydroquinone dissolved in various organic and inorganic solvents was examined. A series of voltammetric measurements of vitamin K were performed using various solvents. Attention was focused on the effect of the solvent. The hydroquinone test demonstrated that the quinone structure was electrochemically active. Acetonitrile, methanol and propan-1-ol were identified as suitable organic solvents and hydrochloric, sulphuric and nitric acid proved to be suitable inorganic ones.

Keywords

Cyclic voltammetry, EmStat3, potassium hexacyanoferrate, hydroquinone, vitamin K

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	9
1 Úvod	10
1.1 Cíle práce.....	11
2 Přehled současného stavu.....	12
2.1 Elektrochemie.....	12
2.2 Polarografie a voltametrie	13
2.2.1 Polarizace elektrod	13
2.2.2 Děje na pracovní elektrodě.....	14
2.2.3 Elektrody a jejich zapojení	14
2.2.4 Výhody polarografických a voltametrických metod	16
2.2.5 Využití voltametrických a polarografických metod	16
2.3 Polarografické metody	17
2.4 Voltametrické metody	19
2.4.1 Cyklická voltametrie	19
3 Metody	22
3.1 Přístroj EmStat3 a nástroje použité během experimentu	22
3.1.1 EmStat3	22
3.1.2 Konektor KAC1.*	23
3.1.3 Tlustovrstvé elektrochemické senzory	23
3.2 Elektrochemicky aktivní látky	25
3.2.1 Hexakynoželezitan draselný	25
3.2.2 Hydrochinon	26
3.2.3 Vitamín K	27
3.2.4 Použité chemikálie.....	29
4 Výsledky.....	31
4.1 Hexakynoželezitan draselný.....	31
4.2 Hydrochinon.....	32
4.3 Vitamín K.....	37

5	Diskuse	43
5.1	Hexakynoželezitan draselný.....	43
5.2	Hydrochinon.....	44
5.3	Vitamín K.....	46
6	Závěr	49
	Seznam použité literatury	50
	Příloha A: Návod k použití	56
	Příloha B: Obsah přiloženého CD	59

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotky	Význam
$E_{1/2}$	V	Půlvlnový potenciál
m	g	Hmotnost
a	mm	Délka
b	mm	Šířka
M	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Molární hmotnost
ρ	$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	Hustota
I_{pa}	A	Elektrický proud pro anodický pík
I_{pc}	A	Elektrický proud pro katodický pík
n	-	Počet vyměňovaných elektronů
F	$\text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$	Faradayova konstanta
A	cm^2	Plocha elektrody
c	$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$	Koncentrace analytu
v	$\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	Skenovací rychlost
D	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Difúzní koeficient
R	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Univerzální plynová konstanta
T	K	Termodynamická teplota

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AdSV	Adsorptivní stripping voltametrie
ASV	Anodická stripping voltametrie
BDD	Bórem dopovaný diamantový film
BDDFE	Bórem dopované diamantové filmové elektrody
CSV	Katodická stripping voltametrie
CV	Cyklická voltametrie
DME	Kapková rtuťová elektroda
DPP	Diferenční pulzní polarografie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LSV	Lineární sweep voltametrie
NPP	Normální pulzní polarografie
NPV	Normální pulzní voltametrie
SMDE	Statická kapková rtuťová elektroda
SV	Staircase voltametrie
SWV	Square wave voltametrie

1 Úvod

Vitamín K je vitamín hrající důležitou roli v lidském organismu. Jeho funkce se uplatňuje především ve srážení krve, mineralizaci kostí a buněčném růstu. Lidskému organismu se vitamín K dostává ve dvou jeho formách, ve formě vitamínu K₁ obsaženého majoritně v zelených rostlinách (např. v kapustě, brokolici, či nati petržele) a ve formě vitamínu K₂, jenž je produkován bakteriemi sídlícími v lidských útrokách. Nedostatek vitamínu K může zapříčinit problémy se srážlivostí krve, mineralizací kostí a buněčným růstem, což může mít pro pacienty fatální důsledky. Z tohoto důvodu jsou na trhu přítomná léčiva obsahující vitamín K (např. přípravek Kanavit). Naopak pro pacienty trpící vysokou srážlivostí krve byla vyvinuta léčiva blokující koagulační schopnosti vitamínu K (např. Warfarin), která snižují pravděpodobnost vzniku onemocnění, jako jsou trombóza a embolie. V současné době se pro farmaceutické stanovování vitamínu K využívají vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s různým typem detekce. Výhodou HPLC metody je především její vysoká selektivita, citlivost, schopnost detekovat nízké koncentrace vitamínu, které se v krevním řečišti pohybují v řádech $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, a malý objem vzorku potřebný pro detekci. Nevýhodou zůstává vysoká nákladnost, což dává prostor pro využití jiných analytických metod. Mezi tyto metody mající potenciál nahradit drahé HPLC metody je možné zařadit elektrochemické metody, především voltametrii. V současné době se pracuje na vývoji voltametrických metod v oblasti biomedicíny. Výhodou těchto metod je vysoká selektivita a schopnost detekce nízkých koncentrací elektrochemicky aktivních látek ve složitých biologických systémech (např. v krvi, nebo moči). Na trhu lze v dnešní době nalézt mnoho voltametrických zařízení. Tato práce byla naměřena na voltametrickém zařízení EmStat3 od firmy PalmSens, jež bylo navrženo, aby bylo kompatibilní, jak s klasickým tříelektrodovým zapojením, tak s moderními tlustovrstvými elektrochemickými senzory.

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je seznámení se s problematikou stanovování vitamínu K za pomoci elektrochemické metody cyklická voltametrie. Pro stanovení bude využit elektrochemický přístroj EmStat3 od firmy PalmSens, jehož vhodné navržení, zapojení a zprovoznění v laboratoři biochemie bude součástí bakalářské práce. V následující části budou popsány jednotlivé části měřící aparatury a elektrochemicky aktivní látky, které budou využity při provedení experimentu. Funkčnost voltametrického přístroje EmStat3 bude ověřena na elektrochemicky aktivní látce (hexakynoželezitanu draselném). Dále budou provedeny experimenty s hydrochinonem, chinonové struktury, která je součástí vitamínu K. Posléze budou provedeny experimenty s vitamínem K za použití různých organických i anorganických rozpouštědel. Následně bude provedena analýza vlivu použitého rozpouštědla na stanovení vitamínu K. Na základě provedené analýzy výsledků budou vybrány vhodné podmínky pro měření. Součástí práce bude sestavení návodu pro použití přístroje EmStat3 v laboratorním zázemí.

2 Přehled současného stavu

2.1 Elektrochemie

Elektrochemie je vědní obor, který studuje rovnováhy a děje v homogenních a heterogenních systémech, v nichž částice alespoň jedné ze složek nesou elektrický náboj. Zkoumání mohou být podrobeny elektrické vlastnosti chemických prvků, nebo může být zkoumán samotný elektrochemický děj. [1; 2]

Elektrochemické metody

Elektrochemické metody mohou být rozděleny do dvou základních oblastí. Rozeznáváme metody založené na elektrodovém ději a metody, které měří elektrické vlastnosti roztoků.

Pod metody založené na elektrodovém ději spadají metody, při nichž na elektrodách probíhá redukce, či oxidace. Elektrodový děj je tedy oxidačně redukční reakce, jenž lze popsat dle následující rovnice:



Zde jsou zařazeny metody, při nichž je měřeno rovnovážné napětí elektrochemického článku, nebo při nichž elektrochemickým článkem prochází elektrický proud. V prvním případě nazýváme elektrochemickou metodu potenciometrií. V druhém výše uvedeném případě rozeznáváme více druhů metod. V případě, kdy se koncentrace látky prakticky nemění, označujeme metodu za voltometrii, nebo klasickou polarografii, naopak v případě změny koncentrace látky, která je způsobena vlivem elektrolýzy, nese metoda označení elektrogravimetrie, nebo coulometrie.

Metody založené na elektrických vlastnostech využívají možnosti měření vodivosti roztoků, nebo kapacity. Metoda, při níž je měřena vodivost roztoku, je označována jako konduktometrie, metoda, při níž jsou získávány informace o hodnotách kapacity, byla pojmenována dielektrimetrie. Mezi elektrochemické metody patří i separační metody, jejichž princip spočívá v rozdílné rychlosti migrace nabitých částic v elektrickém poli. Tyto metody nesou označení elektroforéza a izotachoforéza. [1]

Rozvoj nanotechnologií v elektrochemii vedl ke zkoumání dějů v biologických systémech. Příkladem využití nanotechnologie v elektrochemii může být např. nanosenzor. Jedná se o zařízení, které využívá vlastností nanomateriálů k detekci fyzikálních, chemických či biologických veličin. Je-li senzor upraven pro práci s biologickými materiály, práci *in vivo* nevyjímaje, lze hovořit o nanobiosenzoru. [3] Tento rozvoj posunul elektrochemii na přední příčky moderních analytických metod a napomohl k vývoji senzorů pro biomedicínu.

2.2 Polarografie a voltametrie

Polarografie i voltametrie jsou elektrochemické děje patřící do skupiny metod založených na elektrodovém ději. Polarografie je elektrochemická metoda zkoumající elektroaktivní látky obsažené v analyzovaném roztoku pomocí systémem dvou elektrod. Pro voltametrické stanovení je potřeba elektrod tří. [1; 4] Při polarografickém měření se využívá proměnlivé kapající rtuťové polarizovatelné elektrody. Voltametrické stanovení využívá tuhé polarizovatelné elektrody (např. grafitové, nebo platinové elektrody). Na elektrody, jež jsou ponořeny do roztoku analytu, je vkládáno proměnlivé napětí a je sledován procházející elektrický proud.

Polarografie byla objevena profesorem Jaroslavem Heyrovským, který tuto metodu intenzivně studoval. Její princip byl zveřejněn roku 1921 v časopise nazvaném Chemické listy. Za svůj přínos v oblasti elektrochemie posléze roku 1959 převzal Nobelovou cenou.

2.2.1 Polarizace elektrod

U dokonale polarizovatelné elektrody může i malý elektrický proud vyvolat její polarizaci. [5] Z tohoto důvodu je důležité, aby pracovní elektroda byla malých rozměrů. Naopak referenční elektroda by měla mít velkou pracovní plochu, aby se zabránilo jejímu ovlivňování elektrickým proudem.

Zapojením elektrochemického článku s polarizovatelnou a nepolarizovatelnou elektrodou vznikne v elektrickém obvodu polarizační napětí, které je dáno rozdílem elektrických potenciálů polarizovatelné a nepolarizovatelné elektrody.

Po překročení rozkladného napětí, tzn. rozkladného potenciálu pracovní elektrody, začne obvodem procházet elektrický proud a na pracovní elektrodě začne docházet k vylučování analytu. Je-li na polarizovatelné elektrodě vytvořen záporný potenciál vůči nepolarizovatelné elektrodě, pak slouží pracovní elektroda jako katoda. V tomto případě budou elektrony přecházet do roztoku, způsobí redukci redukovatelných látek, a procházející elektrický proud ponese název redukční. Je-li na pracovní elektrodu vložen kladný potenciál vůči referenční elektrodě, pak polarizovatelná elektroda slouží jako anoda, elektrony jsou odčerpávány z roztoku, čímž dochází k oxidaci oxidovatelných látek, a obvodem teče oxidační elektrický proud.

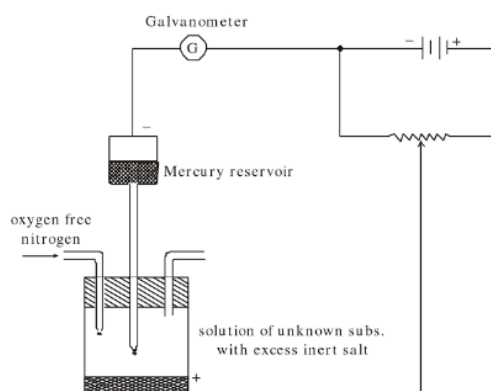
2.2.2 Děje na pracovní elektrodě

Změny způsobené elektrodovými ději nastávají pouze v blízkosti pracovní elektrody. Celý proces zahrnuje tyto děje: transport elektroaktivní látky k elektrodě, vlastní elektrodový děj a vylučování produktu na elektrodě, popřípadě jeho transport od elektrody. [1] Transport elektrochemicky aktivní látky v roztoku může probíhat třemi způsoby. Prvním způsobem je difuze. Tento jev je řízen koncentračním spádem v blízkosti polarizovatelné elektrody, který je způsoben úbytkem této látky u elektrody vlivem elektrolýzy. Druhým způsobem je migrace, jež je vyvolána přítomností elektrického pole mezi elektrodami. Poslední možností je konvekce, jíž rozumíme tok elektrochemicky aktivní látky vlivem teplotních rozdílů, popřípadě míchání.

Cílem polarografického a voltametrického měření je zjištění koncentrace elektrochemicky aktivní látky. Z tohoto důvodu je důležité, aby v roztoku probíhala difuze a aby byla potlačena migrace zkoumané látky. Zamezení migrace může být provedeno přidáním roztoku o koncentraci, která je stonásobně vyšší než koncentrace elektrochemicky aktivní látky. Tímto způsobem je zajištěno, že migrují převážně ionty látky přidané a migrace zkoumané látky je zanedbatelná. Běžně se pro účely zamezení migrace používají chloridy, chlorečnany, chloristany, sírany vápníku a alkalických kovů, v zásaditém prostředí je vhodné využít např. uhličitan sodný nebo uhličitan draselný. [6]

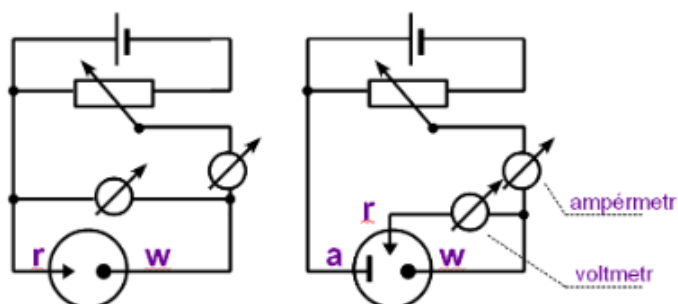
2.2.3 Elektrody a jejich zapojení

Polarografická měřicí aparatura se skládá z polarizovatelné elektrody, zásobníku rtuti, galvanometru, zdroje napětí a polarografické nádoby. Polarografická nádoba je součástí měřicí aparatury, jež obsahuje studovaný roztok. Zahrnuje i nepolarizovatelnou elektrodu, k níž je vztahován potenciál polarizované elektrody. [7] Pracovní elektroda je ponořena do zkoumaného roztoku a referenční je umístěna na dně polarografické nádoby. Galvanoskopem je posléze měřen elektrický proud mezi pracovní a referenční elektrodou. Polarizovatelná elektroda bývá zapojena jako anoda a nepolarizovatelná elektroda bývá zapojena jako katoda.



Obrázek 2.1: Schématické dvouelektrodové zapojení v polarografii [7]

Pro moderní voltametrická měření se využívají elektrody pracovní, referenční a pomocné. Elektroda, na které je měřen procházející elektrický proud, je polarizovatelná elektroda a je označována jako pracovní. Potenciál pracovní elektrody závisí na koncentraci sledované látky. [1] Referenční elektroda, nepolarizovatelná, je málo závislá na hodnotě procházejícího elektrického proudu a její potenciál je konstantní. Pomocná elektroda slouží k uzavření obvodu. Elektrický proud při voltametrickém měření protéká mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Potenciál polarizovatelné elektrody je měřen mezi pracovní a referenční elektrodou voltmetrem.



Obrázek 2.2: Dvou- a třeelektrodové zapojení článku pro voltametrii [8]

Pracovní elektrody tvořené kovovou rtuť se díky možnosti reprodukovatelnosti výsledků experimentu, homogenitě a snadné obnovitelnosti povrchu považují za standard a jsou tudíž hojně využívány. [9] Práce se rtuť je však legislativně omezena Evropskou unií, neboť je toxická. Díky této nepříznivé vlastnosti rtuti jsou snahy nahradit ji jinými netoxickými materiály např. stříbrným pevným amalgámem. [10] Stacionární elektrody jsou pro měření výhodné z hlediska mechanické stability, avšak mají sklony k časté pasivaci, což vyžaduje jejich mechanické a elektrochemické čištění. Výhodou oproti rtuťovým elektrodám je skutečnost, že s pevnými elektrodami se dá pracovat i v oblastech kladného potenciálu a stanovovat tak látky obsažené v roztoku oxidací. Mezi materiály vhodné pro konstrukci těchto elektrod patří především materiály na bázi stříbrného amalgámu různé formy (pastové či pevné), stříbrné i uhlíkové pevné kompozity, zlaté a platinové kompozity. [11] V posledních dvou desetiletích je věnována pozornost novému elektrodovému materiálu, diamantovému filmu dopovanému borem (BDD). Mezi jeho výhodné vlastnosti patří mechanická i chemická stabilita, nízký zbytkový proud a biokompatibilita. Další důležitou vlastností BDD filmu je široké potenciálové okno, závislé na kvalitě filmu a dosahující nejčastěji hodnot kolem 3,5 V. Borem dopované diamantové filmové elektrody (BDDFE) je z tohoto důvodu možné využít při elektrochemických reakcích, jež jsou charakteristické potenciálem, kterého nelze jiným způsobem dosáhnout. [12] Díky svým vlastnostem je BDD film rezistentní vůči pasivaci, což z něj činí vhodný materiál pro velmi citlivá stanovování organických i anorganických látek.

Nejčastěji používanými referenčními elektrodami jsou vodíková, Ag/AgCl (argentchloridová), merkurosulfátová a kalomelová elektroda. [8] Pomocná elektroda je charakteristická svým složením z inertních materiálů (např. platinový drát nebo plíšek).

2.2.4 Výhody polarografických a voltametrických metod

Využívání polarografie a voltametrie je z hlediska moderní techniky přínosné. Jednou z podstatných výhod je šířka spektra stanovovaných analytů. Lze stanovovat široké spektrum anorganických, organických i organokovových sloučenin v širokém koncentračním rozmezí $10^{-3} - 10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Stanovení může být provedeno za pomoci jediného přístroje, jehož pořizovací i provozní náklady nedosahují takové výšky jako přístroje sloužící u spektrometrických či chromatografických metod. [13] Další výhodou je možnost stanovení více analytů vedle sebe, mají-li rozlišitelné potenciály píků. Z měření lze získat informace o kvalitativním (chemickém i redoxním) a kvantitativním složení. Mezi výhody lze zařadit i vysokou rychlost stanovení, snadné zpracování potenciálových křivek a možnost stanovení obsažených látek v malém množství roztoku.

2.2.5 Využití voltametrických a polarografických metod

Polarografické i voltametrické metody mají široké spektrum využití. S jejich pomocí lze stanovovat většinu prvků periodického systému, anorganické i organické polutanty, pesticidy, regulátory rostlinného/živočišného růstu a významné organické látky (barviva, polymery, monomery, výbušniny a agrochemikálie) ve vodě i v jiných matricích (např. v potravinách a krmivech). V neposlední řadě je možné využít tyto metody ke stanovování stopových množství léčiv popř. jejich metabolitů v tělních tekutinách. Pro stanovování v složitých matricích (např. moči, nebo krvi) se využívá kombinace předběžných separačních metod (extrakce, tenkovrstvá chromatografie) a voltametrických, či polarografických metod. Pro tato stanovení bývá volena pulzní polarografie, či adsorpční rozpouštěcí voltametrie, jež umožňují stanovování velmi nízkých koncentrací. [13]

Kromě již klasických a všedních použití lze polarografii a voltametrii využít i pro speciální stanovování. Samostatnou disciplínu biologických aplikací tvoří tzv. „voltametrie *in vivo*“, která slouží ke sledování fyziologicky účinných látek endogenního původu. Jsou sledovány koncentrační změny, které mohou nastat v důsledku různých fyziologických pochodů, nebo v důsledku působení chemických látek vnějšího původu. [14] Řada látek může být sledována prostřednictvím aplikovaného čidla (v tkáni, orgánu nebo cévě), nebo mikroelektrody. Tímto způsobem lze měřit např. chování neurotransmiterů v mozkové tkáni. Elektrochemie „*in vivo*“ může lidstvu poskytnout informace týkající se základních biologických procesů, jež mohou pomoci k rozpoznání chorob, jejich prevenci a kontrole zdraví pacientů. Další speciální využití může být zmíněno v souvislosti s DNA v toxikologické analýze a lékařské diagnostice. Při narušení molekuly DNA mohou na rtuťové elektrodě adeninové a cytosinové zbytky

podléhat redukci. Toto porušení se na voltametrické křivce projeví jako pík, z jehož výšky je možné určit míru poškození, které může vést ke změně životního cyklu buňky, na jehož konci může být i tvorba nádorů. Lze tak stanovit interakci molekuly DNA např. s gama zářením, nebo genotoxickými látkami. Ve fázi vědeckého vývoje se nyní nachází možnost detekce bakterií a virů za pomoci voltametrických a polarografických metod. Výsledkem tohoto bádání by měly být senzory určené pro jejich detekci. Metody nachází uplatnění i v imunologických měřeních, při nichž se zkoumá reakce antigenu s protilátkou. Pro takováto měření se využívá adsorptivní stripping voltametrie (AdSV), při níž jsou antigen a protilátka (voltametricky se často chovají obdobně) nahromaděny adsorpcí na elektrodě. Na výsledné křivce je poté možné sledovat jejich interakce. [14] Tato metoda byla např. použita při sledování reakcí probíhajících mezi lymfocytickými leukemickými buňkami a vypěstovanou protilátkou.

Výše zmíněné metody je možné využít i pro různá stanovování pomocí biosenzorů. Biosenzor lze definovat jako přenosné analytické zařízení skládající se ze dvou hlavních komponent: z biologické složky a fyzikálního převodníku. Biologická složka, tzv. selektor (enzym, protilátka, antigen, receptor, lektin, nukleová kyselina), je komponent rozpoznávající analyt našeho zájmu, zatímco fyzikální převodník (transducer) převádí biointerakce na vhodný analytický signál. V principu se jedná o konverzi interakce biochemické na určitý druh interakce fyzikální. [15] Výhodou biosenzorů je především jejich malá velikost, vysoká selektivita, rychlá analýza, snadná obsluha a měření bez speciálních reagentů.

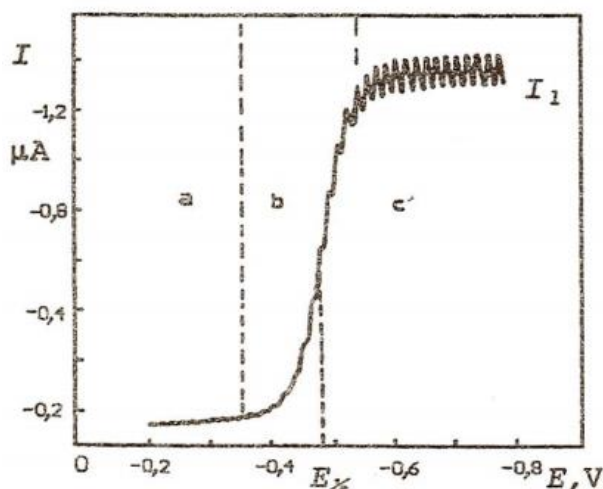
2.3 Polarografické metody

Polarografie je elektrochemická metoda, při které se měří závislost elektrického proudu na elektrickém napětí vkládaném mezi rtuťovou kapkovou/statickou rtuťovou elektrodu a referenční elektrodu. Dle současného pojetí polarografie nemá význam původní elektrochemické metody, pokládá se za součást voltametrie. [16] Mezi současně používané polarografické metody patří především klasická polarografie, diferenční pulzní polarografie (DPP) a normální pulzní polarografie (NPP), přičemž klasická polarografie je nahrazována modernějšími formami (NPP a DPP) kvůli jejich vyšší citlivosti. Další pozitivum moderních forem polarografie je výrazné snížení spotřeby rtuti, kterého je dosaženo použitím kapkových rtuťových elektrod (DME), statických kapkových rtuťových elektrod (SDME) a visících kapkových rtuťových elektrod s mechanickým odtrháváním kapek. [7; 17; 18]

I – E křivky

Křivky označované jako I – E křivky vyznačují v polarografii závislost elektrického proudu, který prochází elektrodou, na potenciálu této elektrody. Jsou též známy pod označením polarizační, voltametrické, či polarografické křivky a vlny. [1] Přítomnost látky podléhající elektrodové reakci (depolarizátoru) dává za vznik polarografické vlně, jejíž poloha určuje kvalitu a hodnota limitního proudu kvantitu. [5] Zkoumané látky mají charakteristickou hodnotu potenciálu, která je označována jako půlvlnový potenciál ($E_{1/2}$), který je pro danou látku konstantní. Tvar polarizační křivky je závislý na polarizaci pracovní elektrody, jež je závislá na složení roztoku.

Na polarizační křivce lze rozeznat tři různé oblasti. Jedná se o oblast polarizace, depolarizace a limitního difuzního proudu.



Obrázek 2.3: a) oblast polarizace b) oblast depolarizace c) oblast limitního difuzního proudu [5]

V polarizační oblasti polarizační křivky nedosahuje vložené napětí potřebných hodnot pro rozkladné napětí. Z tohoto důvodu obvodem téměř neprotéká elektrický proud. Malý elektrický proud, který zde můžeme nalézt, se nazývá nabíjecí, či kapacitní elektrický proud. V depolarizační oblasti přesahuje vložené napětí hodnotu rozkladného napětí. Díky přesahu se na katodě vyredukuje elektrochemicky aktivní látka a obvodem protéká elektrický proud. Oblast limitního difuzního proudu je charakteristická tím, že se v okolí elektrod vyrovná úbytek přeměněných látek díky difuzi. Velikost výšky polarizační vlny udává velikost limitního difuzního proudu.

Aby bylo dosaženo kvalitních polarografických křivek, přidávají se do roztoku povrchově aktivní látky (např. želatina), které při dopadu kapičky rtuti zabraňují víření elektrolytu. Zkreslení může způsobit i kyslík přítomný v roztoku, který by se redukoval na peroxid vodíku. Z tohoto důvodu se roztoky nechávají probublávat dusíkem/argonem.

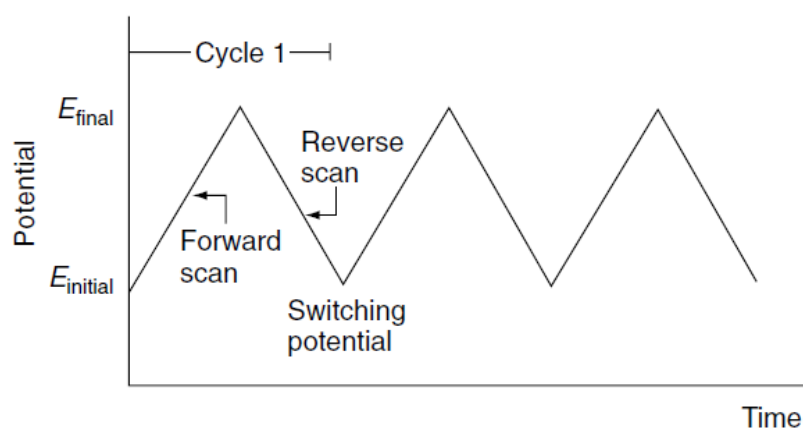
2.4 Voltametrické metody

Voltametrie je elektrochemická metoda, při níž se mezi polarizovatelnou a nepolarizovatelnou elektrodu vkládá napětí. Zásadním rozdílem, kterým se voltametrie odlišuje od polarografie, je její polarizovatelná elektroda. V případě polarografie se využívá rtuťové kapkové elektrody, zatímco v případě voltametrie se využívá stacionárních elektrod, které mají konstantní povrch. Závislost procházejícího elektrického proudu na vkládaném napětí se nazývá voltamogram.

Mezi moderní voltametrické metody patří: lineární sweep voltametrie (LSV), AC voltametrie, cyklická voltametrie (CV), metody spadající pod rozpouštěcí voltametrii a metody spadající pod pulzní voltametrii. Do metod pulzní voltametrie jsou zařazeny normální pulzní voltametrie (NPV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), square wave voltametrie (SWV) a staircase voltametrie (SV), která potlačuje vliv kapacitního proudu v průběhu měření. [19; 20] Mezi metody rozpouštěcí voltametrie patří adsorptivní stripping voltametrie, katodická stripping voltametrie (CSV) a anodická stripping voltametrie (ASV), která je z moderních používaných elektrochemických technik nejcitlivější. Pomocí ASV jsme schopni rozeznat elektrochemicky aktivní látky v roztoku, jejichž koncentrace se pohybuje v rozmezí $10^{-6} - 10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metody rozpouštěcí voltametrie jsou specifické stanovováním elektroaktivních látek ve zkoumaném analytu při elektrolytickém rozpouštění těchto látek, nikoliv při jejich vylučování na polarizovatelné elektrodě. [1] Katodická stripping voltametrie je vhodná pro látky, které s materiálem elektrody vytváří nerozpustnou sůl, nebo nerozpustný film na povrchu elektrody. AdSV je využívána pro látky, jež se těžko rozpouštějí, avšak elektrochemicky aktivní funkční skupinu obsahují. Z tohoto důvodu lze metodu uplatnit při stanovování biologicky aktivní látek, jako jsou léčiva, vitamíny, růstové stimulanty a pesticidy.

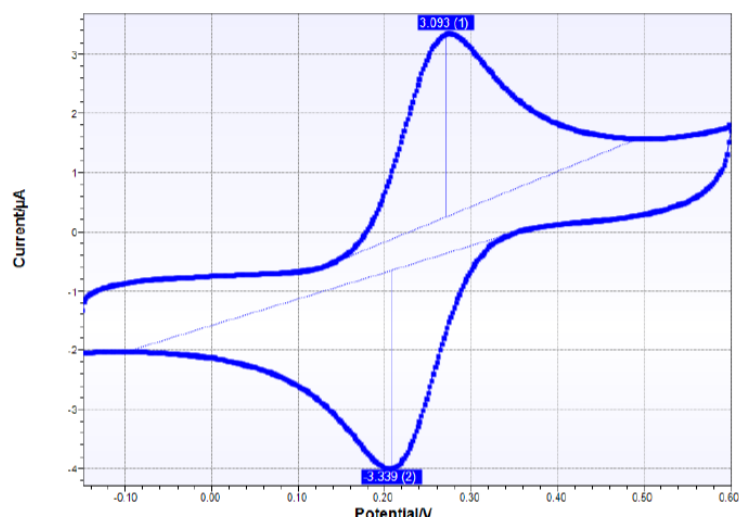
2.4.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je elektrochemická metoda založená na vkládání napětí mezi elektrody, které je charakteristické svým trojúhelníkovým průběhem. Průběh vkládaného napětí není lineární, ale je tvořen drobnými potenciálovými krůčky, které působí lineárním dojmem. Protékající elektrický proud je měřen během druhé poloviny každého potenciálového krůčku. [19; 20]



Obrázek 2.4: Průběh vloženého napětí pro CV [20]

Cyklický voltamogram se skládá ze dvou skenů, z dopředného a zpětného, které tvoří jeden cyklus. Dopředný sken začíná na počátečním potenciálu a končí na zlomovém potenciálu, zatímco zpětný sken začíná na zlomovém potenciálu a je ukončen na konečném potenciálu. Hodnoty počátečního a konečného potenciálu bývají zpravidla stejné. Průběh elektrochemické reakce (redukce či oxidace) lze na voltamogramu pozorovat jako pík. Na cyklickém voltamogramu lze detekovat anodický a katodický pík, které mají charakteristické hodnoty potenciálu a elektrického proudu v závislosti na analyzované látce (kvalitativní veličina) a její koncentraci (kvantitativní veličina). Anodický potenciál odpovídá oxidaci redukované formy a dle IUPAC se vyskytuje v oblasti kladných hodnot elektrického proudu. Katodický potenciál odpovídá redukci oxidované formy a lze jej nalézt v záporných hodnotách elektrického proudu. Potenciálová osa je orientována zleva doprava. [20] V současnosti se lze potkat i s opačnou orientací potenciálové osy a anodických a katodických píků v důsledku dodržování historických zvyklostí (americká elektrochemická literatura). Z vyselektovaných jednotlivých píků, z jejich tvarů i výšek a změn těchto parametrů při různé skenovací rychlosti lze získat informace ohledně analyzovaných látek. Může se jednat např. o informace týkající se kinetiky přenosu náboje, či informace spojené s probíhajícími reakcemi (např. přenos náboje). Charakteristickou schopností cyklické voltametrie je schopnost při zpětném skenu reoxidovat, nebo opět zredukovat produkt, který vzniknul při dopředném skenu. [21]



Obrázek 2.5: Cyklický voltamogram [19]

Elektrochemické reakce lze dle tvaru cyklického voltamogramu rozdělit do dvou skupin. Jedná se o reakce ireverzibilní a kvazireverzibilní. Ireverzibilní reakce jsou charakteristické dobře viditelným katodickým i anodickým píkem. Elektrický proud píků je dán Randles - Ševčíkovou rovnicí:

$$I_{pa} = I_{pc} = 0,4463 \cdot n \cdot F \cdot c \cdot A \cdot (n \cdot F \cdot v \cdot D)^{1/2} \cdot (R \cdot T)^{-1/2} \quad (2.2)$$

Oproti tomu kvazireverzibilní procesy mají dobře viditelný anodický pík. Katodický pík je v případě kvazireverzibilních dějů pouze naznačen a elektrický proud píků je dán Berzins – Delahayovou rovnicí:

$$I_{pa} = I_{pc} = 0,6105 \cdot (n \cdot F)^{3/2} \cdot (R \cdot T)^{-1/2} \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot v^{1/2} \quad (2.3)$$

V rovnicích vystupují následující veličiny: elektrický proud pro anodický pík I_{pa} , elektrický proud pro katodický pík I_{pc} , počet vyměňovaných elektronů n , Faradayova konstanta F , plocha elektrody A , koncentrace analytu c , skenovací rychlost v , difúzní koeficient D , univerzální plynová konstanta R a termodynamická teplota T .

3 Metody

3.1 Přístroj EmStat3 a nástroje použité během experimentu

Měřicí soustava na provedení experimentu se skládá z přístroje EmStat3, jenž je skrz USB port propojen s počítačem, na němž je nainstalován software PSTrace4, konektoru KA1C.5 a tlustovrstvého elektrochemického senzoru.

3.1.1 EmStat3

Firma PalmSens se zabývá tvorbou elektrochemických zařízení. Momentálně jsou na trhu uvedeny tři druhy elektrochemických zařízení od této firmy. Jedná se o přístroje PalmSens, MultiEmStat a EmStat. EmStat přístroje jsou nejmenší elektrochemická rozhraní, která jsou na trhu, a jsou všeobecně používány jako potenciostaty. [22] Přístroj EmStat3 podporuje techniky: lineární sweep voltametrii, diferenciální pulzní voltametrii, square wave voltametrii, normální pulzní voltametrii a cyklickou voltametrii. [23]

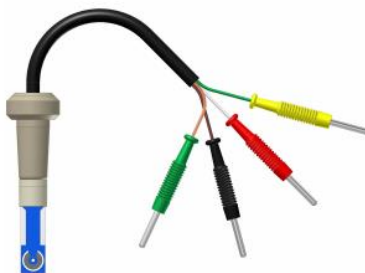
Pro správnou kooperaci s měřícím zařízením a počítačem je nutné použít software PSTrace4, který byl pro tato zařízení navržen. PSTrace4 podporuje následující techniky, kde většina z těchto technik může být použita pro rozbor stopové analýzy. Aplikovatelné voltametrické techniky jsou: lineární sweep voltametrie, diferenciální pulzní voltametrie, square wave voltametrie, normální pulzní voltametrie, AC voltametrie, cyklická voltametrie a stripping chronopotenciometrie (nebo PSA). [19]



Obrázek 3.1: Přístroj EmStat3 [23]

3.1.2 Konektor KAC1.*

Konektory řady KAC1.* jsou výrobky firmy BVT Technologies a.s., které umožňují použití biosenzorů se substrátem typu AC1, AC4, AC11, AC13, AP1, CC1, CC2 a TS1. [24] Na provedení experimentálního měření byl zvolen konektor KAC1.5, jehož zakončení je tvořeno čtyřmi malými banánky. Konektor není specifikován pro použití s určitým elektrochemickým přístrojem a jeho kabel zajišťující propojení konektoru s přístrojem je stíněný, aby bylo zamezeno vzniku šumu. Konektor KAC1.5 má hmotnost $m = 36,0$ g, je dlouhý $a = 37,0$ mm a široký $b = 10,0$ mm.

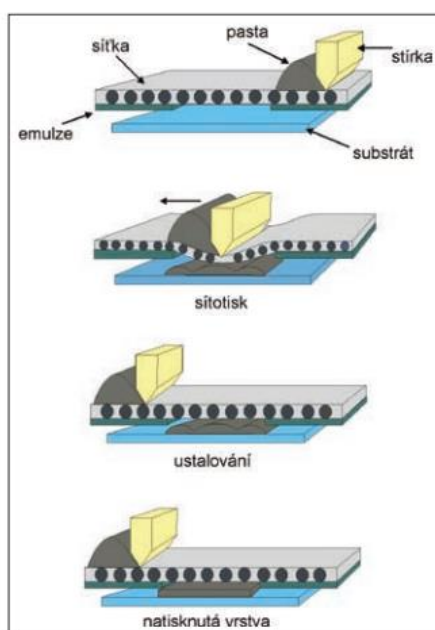


Obrázek 3.2: Konektor KAC1.5 s vloženým tlustovrstvým elektrochemickým senzorem [24]

3.1.3 Tlustovrstvé elektrochemické senzory

Vývoj senzoru

Princip tlustovrstvé technologie spočívá v protlačení pasty volnými oky sítky s motivem na izolační podložku, čímž se vytvoří vrstva pasty v seskupení, které je identické jako na síťce s motivem. Pasta se volnými oky sítky protlačuje stěrkou (zastává funkci flexibilního nože). Schématický náčrt lze pozorovat na obrázku 3.3. [25; 26]



Obrázek 3.3: Schématický náčrt [27]

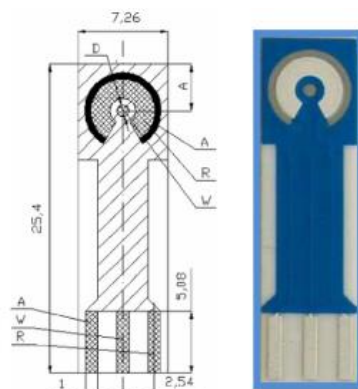
Pro výrobu tlustovrstvých senzorů se využívá široké spektrum past, které se skládají ze čtyř hlavních komponent: dočasného pojiva, permanentního pojiva, funkční složky a ředidla. Obsah jednotlivých prvků ve funkční složce následně ovlivňuje vlastnosti past, včetně elektrických vlastností. Dle těchto vlastností lze rozdělit pasty na vodivé, dielektrické nebo odporové. [28] Následujícími kroky po protlačení pasty oky jsou zasušení, čímž se srovnají nerovnosti vzniklé při sítotisku, a výpal senzoru. [27]

Mezi výhody tlustovrstvé technologie patří především čistota použitých materiálů, široký výběr materiálů pracovní elektrody, množství použité funkční složky, možnost integrace polí elektrod, různorodost funkční složky a možnost spojení s novými technologiemi. Široký výběr materiálů pracovní elektrody poskytuje výrobcům možnost vytvořit kompaktní senzor, jenž je na rozdíl od klasických elektrod homogenní, což zajišťuje rychlou odezvu senzoru a reprodukovatelnost experimentálního měření. V tlustovrstvých senzorech je použito menší množství aktivních materiálů, avšak elektrochemické vlastnosti jsou totožné s vlastnostmi klasických elektrod. To znamená, že kupní cena tohoto senzoru je výrazně nižší a senzor lze v případě jeho kontaminace snáze nahradit novým. Různorodost funkční složky poskytuje výrobcům možnost vytvoření aktivních ploch z klasicky používaných kovů, jako je platina, či zlato, ale i ze slitin.

Senzor AC1

Senzory řady AC1 jsou výrobky firmy BVT Technologies a.s. Jedná se o senzor, který má v sobě integrované klasické elektrody. Jeho výhodami v porovnání s klasickými elektrodami jsou levnost, jednoduchost, odolnost a homogennost, jež je důležitá pro reprodukovatelnost měření a rychlost odezvy.

Senzor řady AC1 může být vytvořen z různých materiálů a pro popis jeho složení se využívá následující formule AC1.W*.R* (*). První písmeno v této formuli charakterizuje metodu, pro kterou je vhodné senzor použít. Může se jednat o amperometrii (A), či konduktometrii (C). Druhé písmeno v pořadí určuje nosný substrát. V tomto případě je písmeno C použito pro nosný substrát keramické povahy a písmeno P označuje plastový nosný substrát. Následuje písmeno W, které je doprovázeno znakem, jenž charakterizuje materiál pracovní elektrody. Může se jednat o písmeno S, které značí, že pracovní elektroda je tvořena vrstvou zlata a platiny, nebo číslo 1, jenž je charakteristické pro pracovní elektrodu vyrobenou z čistého zlata. Číslo 2 nese pracovní elektroda vyrobená z čisté platiny, číslo 3 je přiřazováno elektrodě z čistého stříbra a čísla 4 a 5 jsou charakteristická pro elektrody, jež jsou tvořeny různými typy grafitu. Poslední písmeno R je následováno znakem, který specifikuje referenční elektrodu. Jedná se o znak S, který je přiřazen elektrodám vytvořeným ze stříbra, číslo 1, jenž je charakteristické pro elektrody vyrobené ze směsi stříbra a chloridu stříbrného, a číslo 2, které označuje elektrody z pochloridovaného stříbra. Tato formule může být obohacena o dvě písmena H a T. Písmeno H je použito v případě, kdy může být senzor ohříván, a písmeno T je použito za předpokladu, že senzor bude při experimentu využit jako teplotní senzor. [29]



Obrázek 3.4: Senzor typu AC1.W*.R* (*) [29]

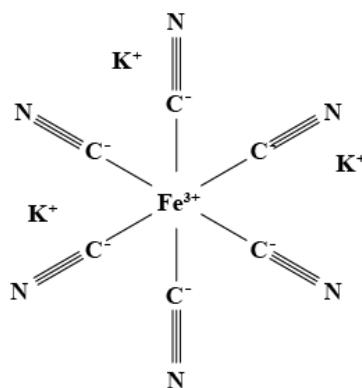
Na provedení experimentu byl využity tlustovrstvé elektrochemické senzory s označením typu AC1.W1.RS, AC1.W2.RS, AC1.W3.RS a AC1.W4.RS. Jde o senzory určené pro amperometrii, jejichž nosný substrát je keramické povahy. Referenční elektroda je tvořena stříbrem a pracovní elektrody jsou tvořeny čistým zlatem, platinou, stříbrem a grafitem. Délka senzoru AC1.W*.RS je $a = 25,4$ mm, šířka tohoto senzoru činí $b = 7,3$ mm a hmotnost senzoru je $m = 0,5$ g.

3.2 Elektrochemicky aktivní látky

Elektrochemicky aktivní látky jsou schopny elektrochemické přeměny, tzn., že v roztoku probíhá jejich redukce, či oxidace. Pro ověření funkčnosti přístroje EmStat3 byl vybrán roztok hexakynoželezitanu draselného, který je považován za elektrochemický standard. Na ověření elektroaktivity vitamínu K byl použit roztok hydrochinonu.

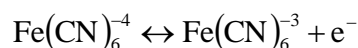
3.2.1 Hexakynoželezitan draselný

Hexakynoželezitan draselný (červená krevní sůl, ferrikyanid draselný, potassium hexacyanoferrate) má vzorec $K_3[Fe(CN)_6]$. [30]



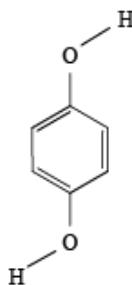
Obrázek 3.5: Struktura hexakynoželezitanu draselného [30]

Za standardní teploty a tlaku se vyskytuje ve formě rubínově zbarvených krystalů nebo prášku charakteristického červeno-oranžového zbarvení. Molární hmotnost je $M = 329,248 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, hustota je $\rho = 1,858 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a rozpustnost ve vodě při teplotě 25°C je $48,8 \text{ g}/100 \text{ ml H}_2\text{O}$. [30] Dle literatury [31] probíhá základní elektrochemická reakce dle následující rovnice:



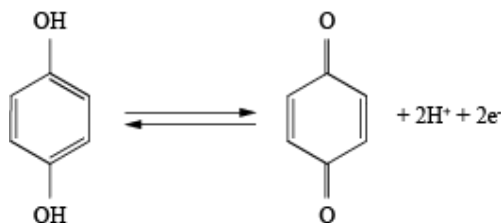
3.2.2 Hydrochinon

Hydrochinon (benzen-1,4-diol) je organická sloučenina patřící mezi fenoly se vzorcem $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$. Molekula hydrochinonu obsahuje dvě hydroxylové skupiny navázané na fenolovém jádře v para pozici. [32]



Obrázek 3.6: Struktura hydrochinonu [33]

Hydrochinon je za standardního tlaku a teploty pevná látka ve formě bílého až světle šedivého prášku. Molekulární hmotnost je $M = 110,112 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a hustota je při 20°C dosahuje $\rho = 1,328 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. [33] Dle literatury [34] probíhá základní elektrochemická reakce dle následující rovnice:



3.2.3 Vitamín K

Vitamín K lze všeobecně zařadit do skupiny hydrofobních vitamínů rozpustných v tucích. Samotný vitamín hraje klíčovou roli ve srážlivosti krve, buněčném růstu a mineralizaci kostí. [35; 36]

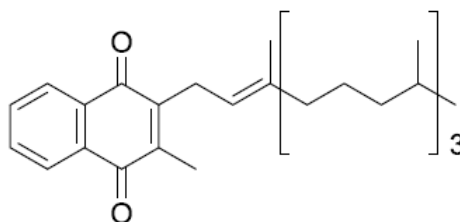
Vitamín K hraje důležitou roli v koagulační kaskádě, což je termín označující sled událostí s hierarchickou závislostí v lidském těle, který dává za vznik sraženinám, jež jsou příčinou zastavení krvácení. Hlavní příčinou tvorby trombusu je aktivace několika vitamín K dependentních faktorů, které zapříčiní vznik fibrinové sítě a následný vznik sraženiny. [37]

Poslední výzkumy dokazují, že vitamín K u pacientů s osteoporózou zvyšuje hustotu kostí, čímž dochází k snižování pravděpodobnosti vzniku fraktury. [38]

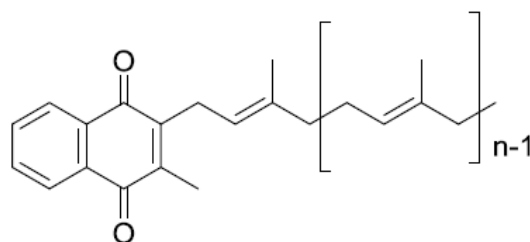
Mezi pacienty trpící nedostatkem vitamín K se řadí osoby užívající antikoagulační léčiva, osoby s významným poškozením, nebo onemocněním jater, s poruchami vstřebávání tuku a novorozenci.

Pacientům trpícím vyšší pravděpodobností tvorby krevních sraženin jsou předepisována perorální antikoagulační léčiva (např. Warfarin, Heparin), která snižují možnost výskytu plicní embolie, infarktu a mozkové mrtvice.

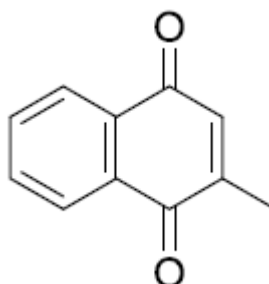
Vitamín K je souhrnný název pro několik forem tohoto vitamínu. V současné době jsou formy vitamínu K řazeny do tří tříd dle podobné chemické struktury. Jedná se o třídu vitamínu K₁, třídu vitamínu K₂ a třídu vitamínu K₃. Ve třídě vitamínu K₂, lze nalézt více než jednu formu vitamínu K. Zbylé třídy obsahují jedinou formu tohoto vitamínu. [39]



Obrázek 3.7: Vitamín K₁ [39]



Obrázek 3.8: Vitamín K₂ [39]



Obrázek 3.9: Vitamín K₃ [39]

Vitamín K₁ (fylochinon, 2-methyl-3-fytyl-1,4-naftochinon) má sumární vzorec C₃₁H₄₆O₂ a molární hmotnost $M = 450,707 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. [40] Je široce rozšířen ve vyšších rostlinách a modro-zelených řasách. Je součástí mnoha pokrmů, obzvláště listové zeleniny a rostlinných olejů.

Vitamín K₂ (menachinon) se dělí na jednotlivé formy dle počtu opakujících se pětiuhlíkatých jednotek v postranním řetězci (počet opakování 1 – 14). Pro odlišení jednotlivých forem vitamínu se používá zkratka MK následovaná číslem, které udává počet opakujících se jednotek v postranním řetězci. [37] Formu vitamínu K MK-4 syntetizují symbiotické bakterie v lidském organismu (střevní mikroflóra). V současné době je považována za látku s potencionálním protinádorovým účinkem, ovlivňuje transkripční faktory, což má za následek vznik apoptózy buňky, popř. zastavení buněčného cyklu. [41]

Vitamín K₃ (menadion) má vzorec 2-methyl-1,4-naftochinon. Jedná se o synteticky vyráběný naftochinon bez postranního řetězce a aktivity, který může být přeměněn na aktivní formu vitamín K₂. Vitamín K₃ má sumární vzorec C₁₁H₈O₂ a molární hmotností $M = 172,183 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Vitamín K₃ je součástí krmných směsí pro hospodářská zvířata. Jeho použití na lidech je zakázáno Evropskou Unií kvůli jeho negativním vlivům na lidský organismus (např. může zapříčinit oxidativní poškození buněk, mozku a jater). [42]

Stanovení vitamínu K

Pro farmakologické a epidemiologické účely jsou vyžadovány přesné analytické metody zaručující vysokou selektivitu a citlivost, které umožní stanovení nízkých koncentrací vitamínu K₁ v plazmě pohybující se v rozmezí 0,25 – 2,7 nmol·l⁻¹. [43; 44] Z tohoto důvodu jsou v současné době pro stanovování využívány chromatografické metody, plynová chromatografie (gas chromatography, GC) a vysoce účinná kapalinová chromatografie. [45] HPLC metoda poskytuje výhodu díky nízkému objemu vzorku nutného pro analýzu, což je výhodné především u dětských pacientů. Jednotlivé HPLC metody využívané k detekci vitamínu K se liší použitým druhem detektoru. Může se jednat o detektory fluorescenční [43; 44], detektory pracující v ultrafialové oblasti [46] a detektory elektrochemické [47; 48]. Vitamín K lze stanovovat i pomocí spektrofotometrických metod [49]. Jejich přesnost je však nižší než metod chromatografických.

Stanovování vitamínu K pomocí metody cyklická voltametrie se v současné době nachází ve vývoji. Problém je hydrofobnost vitamínu K. Z tohoto důvodu jsou pro rozpuštění tohoto vitamínu zkoušena organická rozpouštědla, jako je acetonitril [50], dimethylforamid [51], methanol [52], chloroform [53] a další. Jako pomocný elektrolyt je možné volit např. tyto roztoky organických solí: tetrabutylammonium hexafluorofosfát (Bu₄NPF₆) [50] a tetraethylammonium tetrafluoroborát (TEABF₄) [51]. Výhodou použití organických solí jako pomocných roztoků jsou dobře viditelné píky ve voltamogramech. Nevýhodou použití těchto solí jsou jejich nebezpečné vlastnosti (vysoká škodlivost při požití a inhalaci, schopnost podráždit kůži i oční okolí v případě kontaktu a vysoká toxicita pro vodní organismy). Z tohoto důvodu je snaha nalézt a používat méně hazardní soli jako je např. dusičnan draselný (KNO₃). [52] Vitamín K je dle literatury [54] možné stanovit i v anorganických kyselinách a zásadách. Mezi tato rozpouštědla patří kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina dusičná (HNO₃), kyselina sírová (H₂SO₄), kyselina chloristá (HClO₄), hydroxid draselný (KOH) a hydroxid lithný (LiOH). [54]

3.2.4 Použité chemikálie

V experimentech byly použity chemikálie uvedené v tabulce 3.1, všechny v čistotě p. a., a vitamínový přípravek Kanavit od mezinárodní farmaceutické společnosti Zentiva, jehož účinná látka je vitamín K₁. Koncentrace vitamínu je 44·10⁻³ mol·l⁻¹. Pomocné složky v přípravku jsou polysorbát 80, dihydrát dinatrium-edetát a kyselina sorbová, která je také elektrochemicky aktivní. [55; 56] Koncentrace pomocných složek nejsou známy.

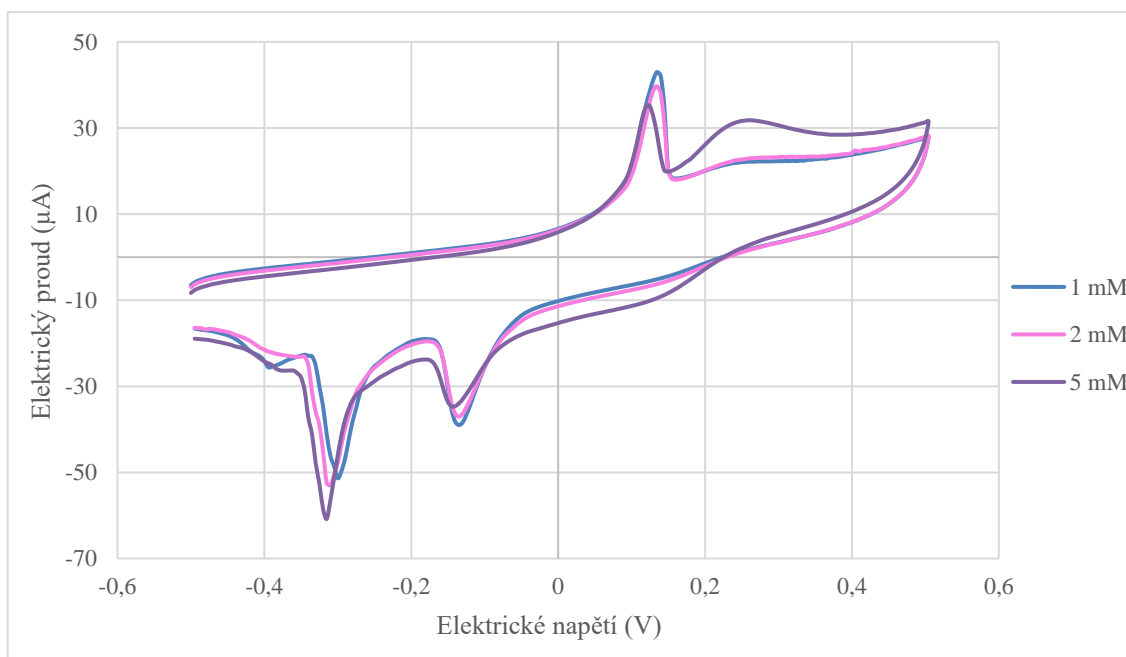
Tabulka 3.1: Použité chemikálie

Název chemikálie	Výrobce
Hexakynoželezitan draselný	Lach-Ner s. r. o.
Chlorid draselný	Lach-Ner s. r. o.
Chloristan draselný	Penta s. r. o.
Hydrochinon	Lachema n. p. Brno
Methanol	Lach-Ner s. r. o.
Ethanol	Lach-Ner s. r. o.
Propan-1-ol	Lach-Ner s. r. o.
Butan-1-ol	Lach-Ner s. r. o.
Trimethylbutan-1-ol	Lach-Ner s. r. o.
Acetonitril	Sigma
Chloroform	Lach-Ner s.r. o.
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner s. r. o.
Kyseliny sírová	Lach-Ner s. r. o.
Kyselina dusičná	Lach-Ner s. r. o.
Kyselina sorbová	Sigma
Hydroxid draselný	Lach-Ner s. r. o.

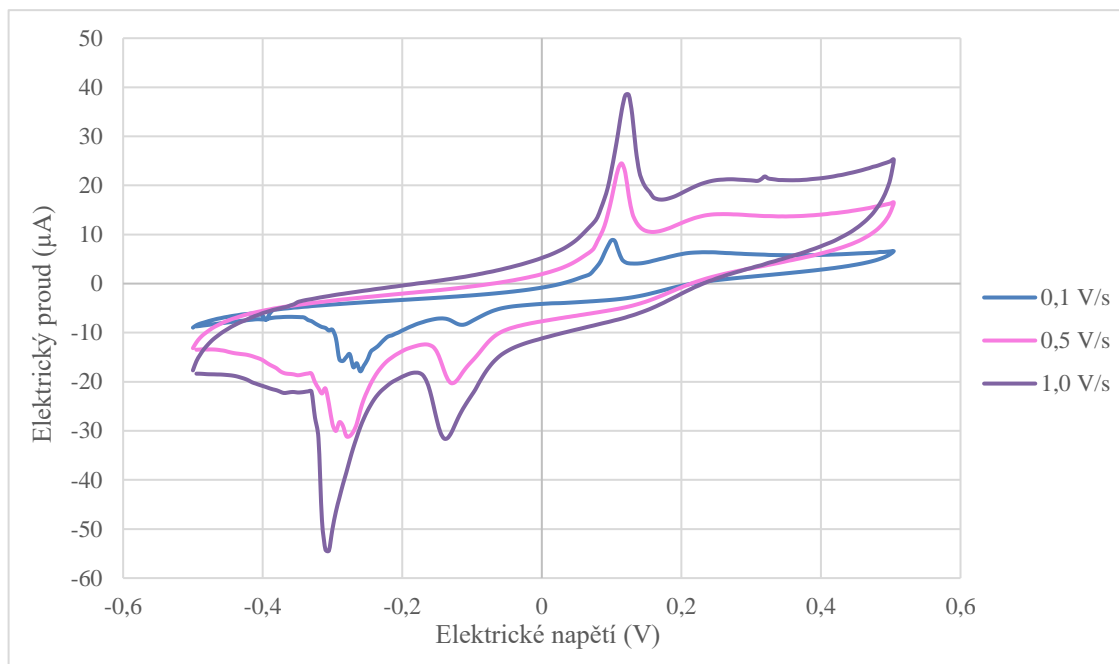
4 Výsledky

4.1 Hexakynoželezitan draselný

Bylo provedeno měření metodou cyklická voltametrie roztoku hexakynoželezitanu draselného pomocí přístroje EmStat3. Byly proměřeny roztoky o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako pomocný roztok byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Byly nastaveny tyto parametry měření: počáteční potenciál $U = -0,5 \text{ V}$, zlomový potenciál $U = 0,5 \text{ V}$ a skenovací rychlost $v = 1,0 \text{ V/s}$. Byla sledována závislost procházejícího elektrického proudu na elektrickém napětí při navyšování koncentrace $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Pro sledování vlivu skenovací rychlosti byl využit roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Počáteční i zlomový potenciál byl stejný jako v případě, kdy byl sledován vliv koncentrace. Skenovací rychlost postupně nabývala hodnot $0,1 \text{ V/s}$, $0,5 \text{ V/s}$ a $1,0 \text{ V/s}$. Na provedení části experimentu týkající se hexakynoželezitanu byl použit tlustovrstvý elektrochemický senzor s platinovou pracovní elektrodou.



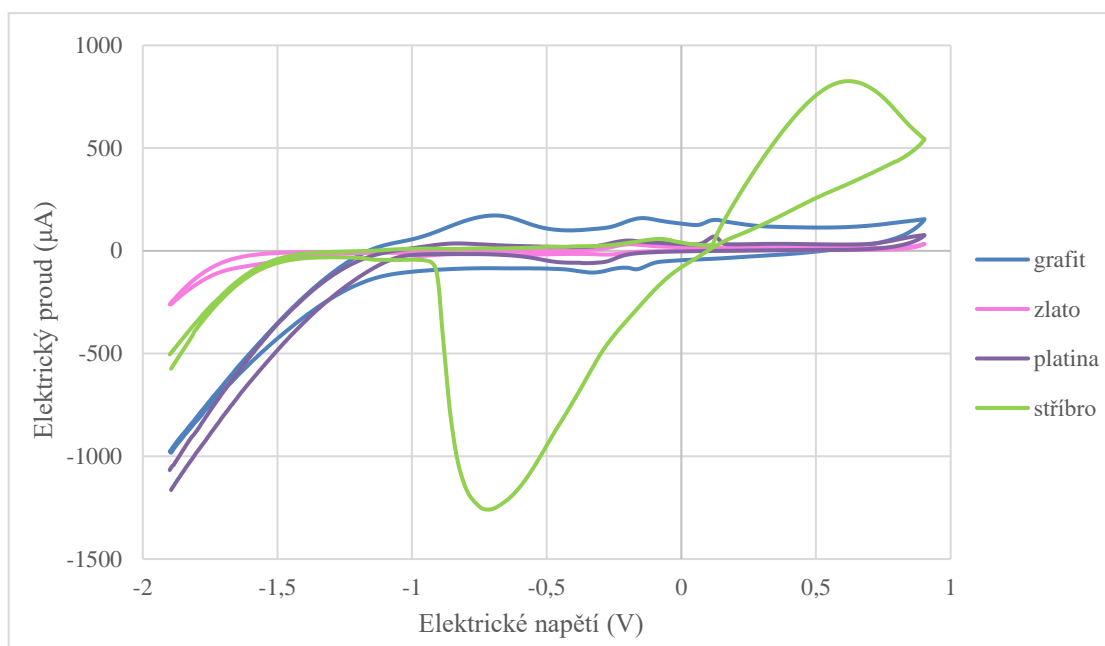
Obrázek 4.1: Voltamogram pro $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ pro koncentrace $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obrázek 4.2: Voltamogram pro roztok $K_3[Fe(CN)_6]$ pro koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro skenovací rychlosti $0,1 \text{ V/s}$, $0,5 \text{ V/s}$ a $1,0 \text{ V/s}$

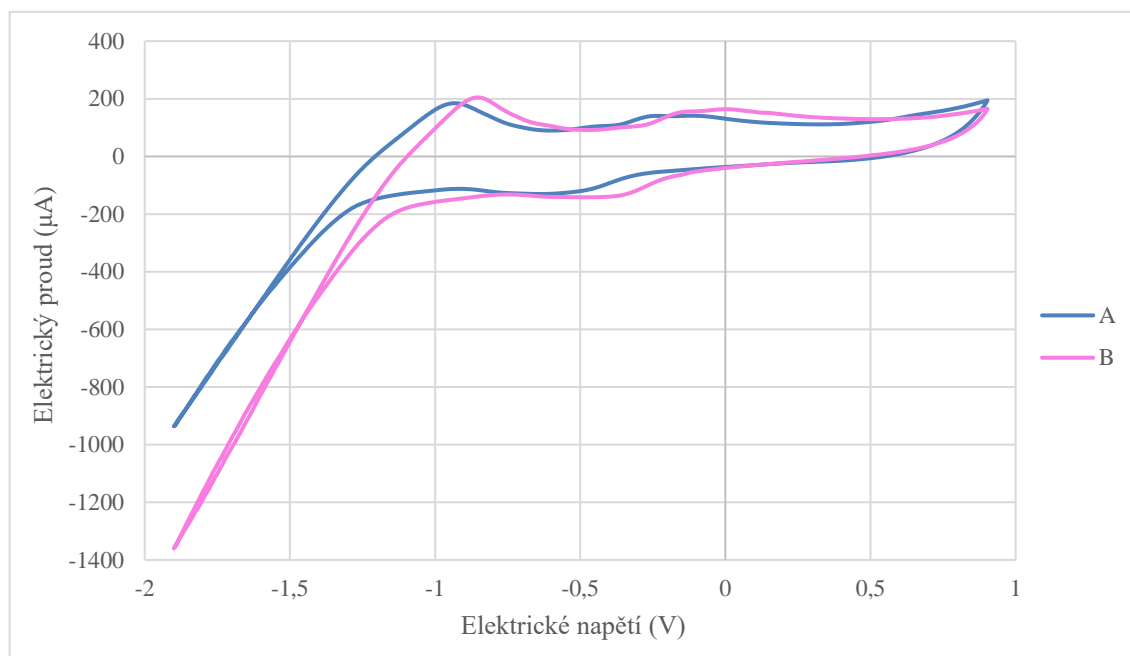
4.2 Hydrochinon

Bylo provedeno měření roztoků hydrochinonu o námi zvolené koncentraci $c = 3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v různých organických i anorganických rozpouštědlech pomocí metody cyklická voltametrie na přístroji EmStat3. Jako pomocné elektrolyty byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a roztok chloristanu draselného o koncentraci $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Byly nastaveny tyto parametry měření: počáteční potenciál $U = -1,9 \text{ V}$, zlomový potenciál $U = 0,9 \text{ V}$ a skenovací rychlost $v = 1,0 \text{ V/s}$. Experiment byl proveden za pomoci čtyř elektrochemických senzorů s různou pracovní elektrodou. Byly použity senzory se zlatou, platinovou, stříbrnou a grafitovou pracovní elektrodou.

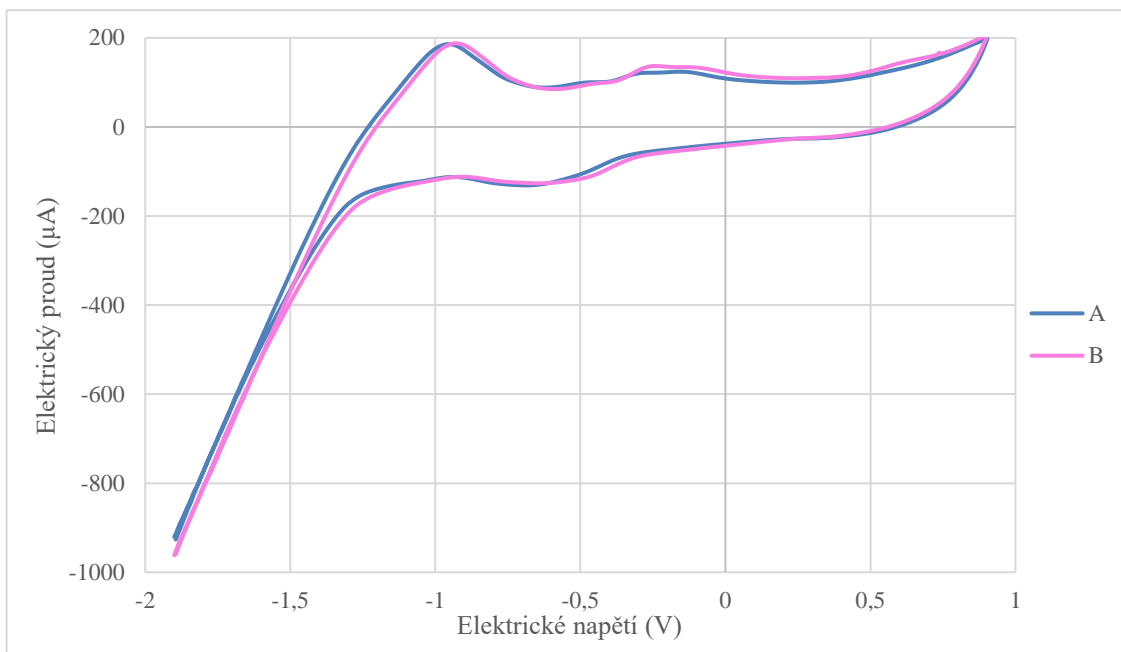


Obrázek 4.3: Voltamogram pro hydrochinon o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v KCl – výběr senzoru

Následující měření byla provedena s grafitovým senzorem, neboť poskytoval voltamogramy s nejlépe viditelnými píky.

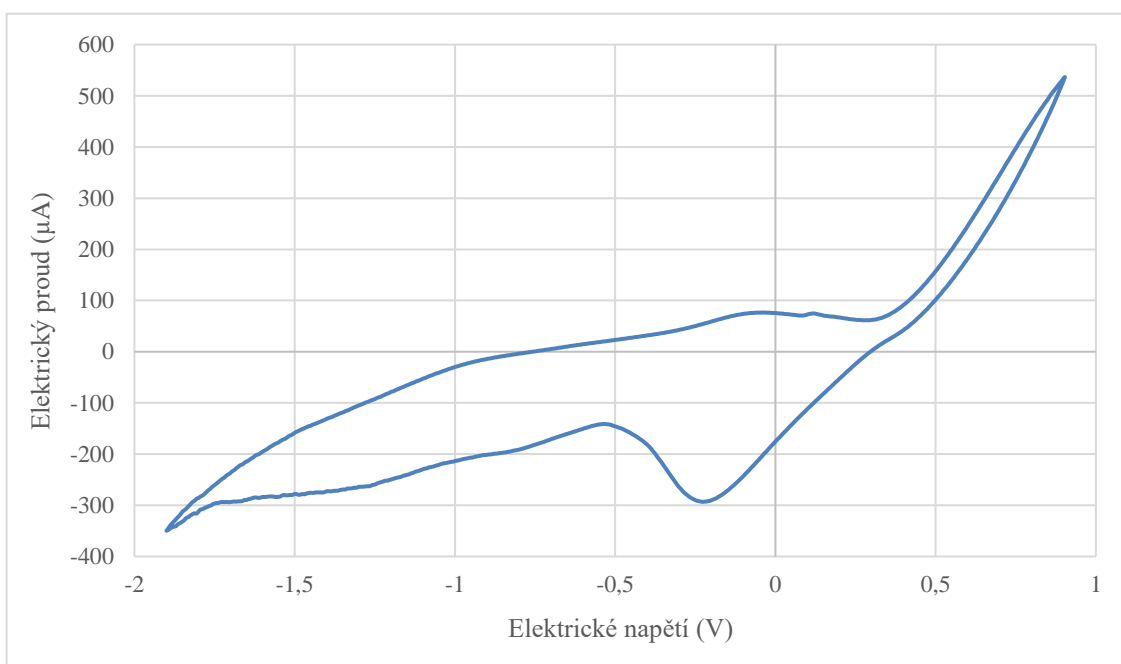


Obrázek 4.4: Voltamogram pro hydrochinon s různými pomocnými roztoky A – KClO_4
B – KCl



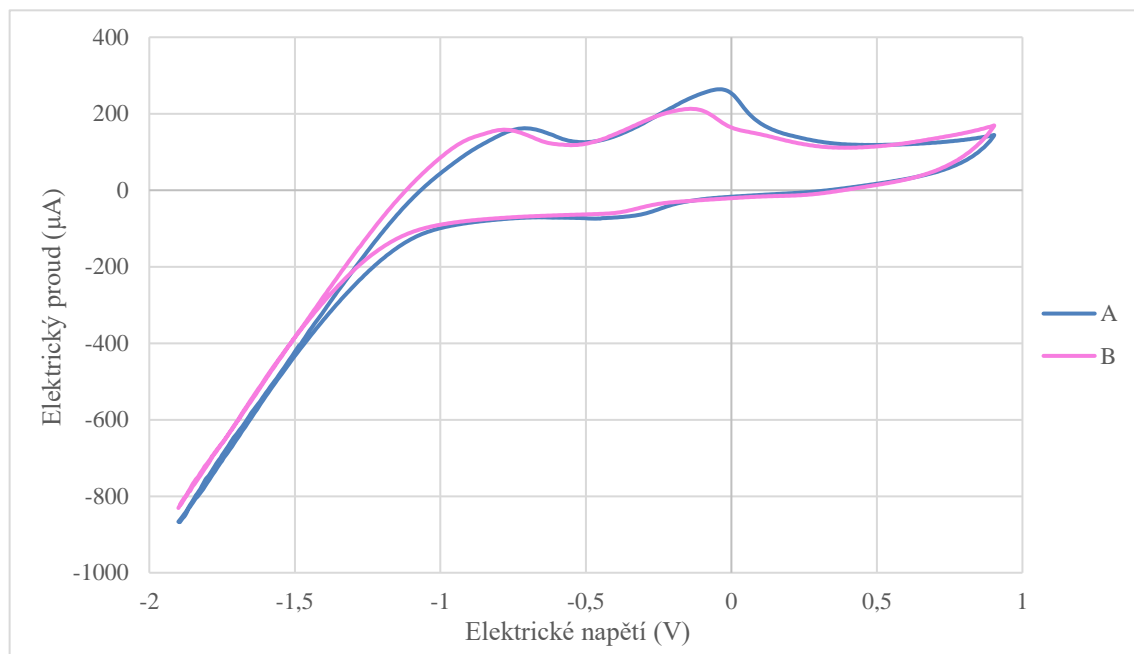
Obrázek 4.5: Voltamogram pro hydrochinon v 0,1M KClO₄ o koncentraci A – 1,6 mmol·l⁻¹
B – 3,2 mmol·l⁻¹

Jako organická rozpouštědla byla použita kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ a hydroxid draselný o koncentraci 2 mol·l⁻¹. Vypovídající hodnota byla pouze u voltamogramu pro kyselinu chlorovodíkovou, protože při pokusu o rozpuštění hydrochinonu v hydroxid draselném došlo k chemické reakci. Tato chemická reakce zapříčinila vznik nové sloučeniny v roztoku.



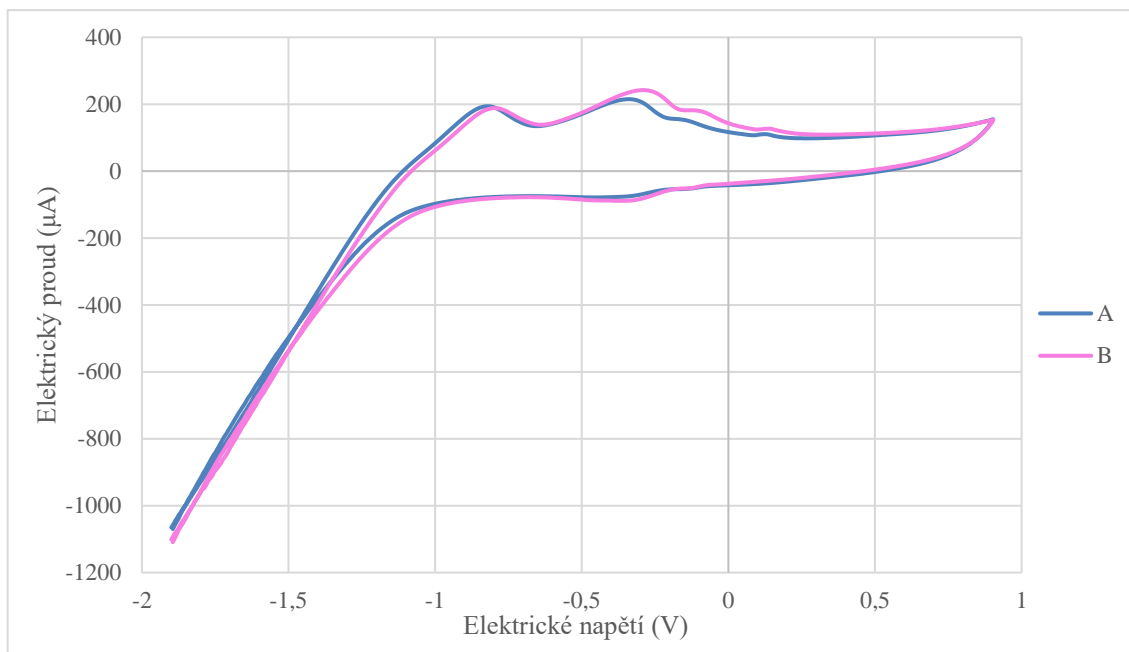
Obrázek 4.6: Voltamogram pro hydrochinon v HCl o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹

Z organických rozpouštědel byl použit ethanol, methanol, propan-1-ol, butan-1-ol a trimethylbutan-1-ol. Jako pomocný roztok byl využit 0,1M chloridu draselného a 0,1M roztok chloristanu draselného. Z důvodu dobré viditelnosti píků na voltamogramu byl pro následující měření použit senzor s grafitovou pracovní elektrodou.

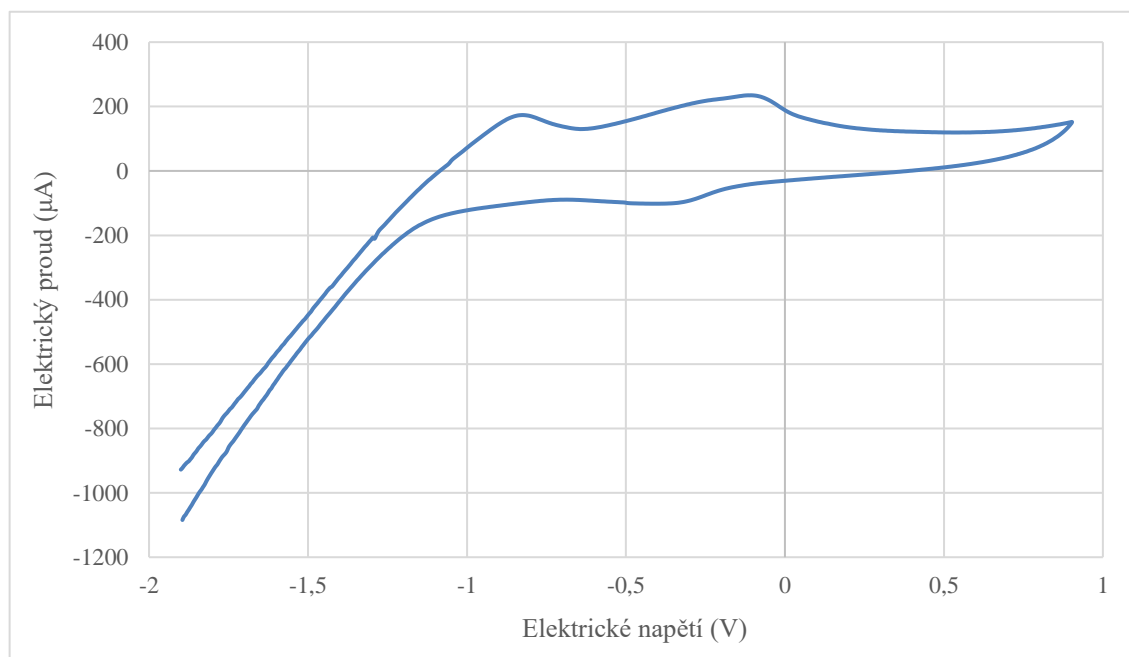


Obrázek 4.7: Voltamogram pro hydrochinon v methanolu pro různé pomocné roztoky A – KCl
B – KClO₄

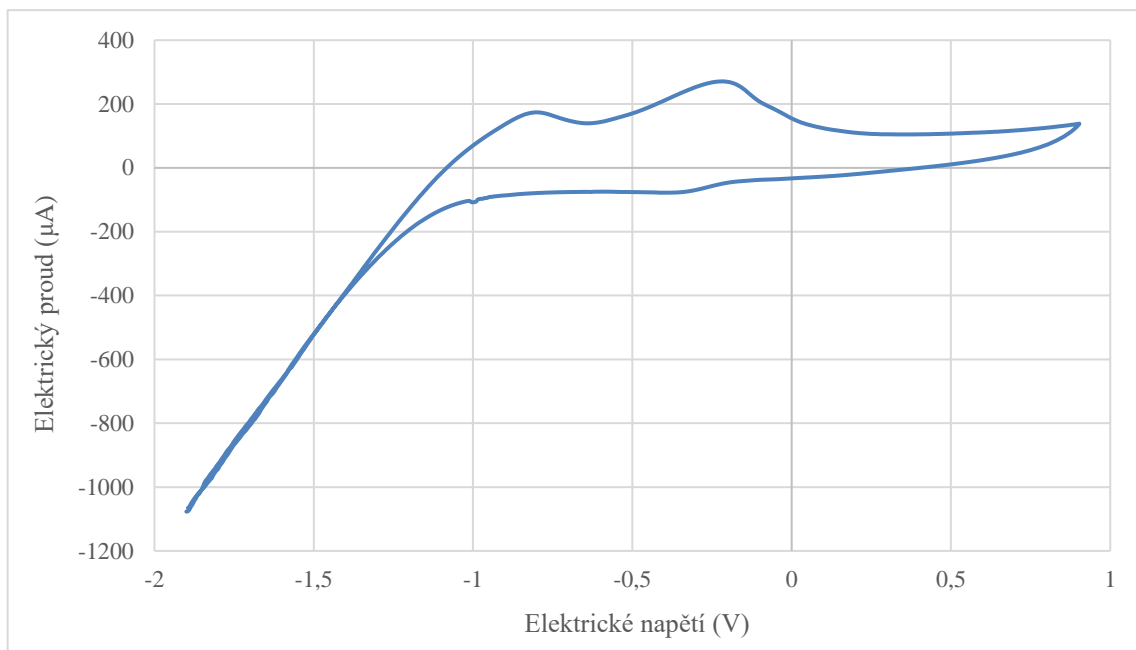
Ve voltamogramech s roztoky chloridu draselného a chloristanu draselného nebyly zásadnější rozdíly. Anodické i katodické píky bylo možné pozorovat při použití obou pomocných roztoků. V případě použití chloridu draselného byly píky voltamogramu lépe viditelné a z tohoto důvodu je tento pomocný roztok použit pro následující měření.



Obrázek 4.8: Voltamogram pro hydrochinon rozpuštěný v ethanolu o různých koncentracích A – $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ B – $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ s pomocným $0,1\text{M}$ roztokem KCl



Obrázek 4.9: Voltamogram pro hydrochinon o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěný v propan-1-olu s pomocným $0,1\text{M}$ roztokem KCl

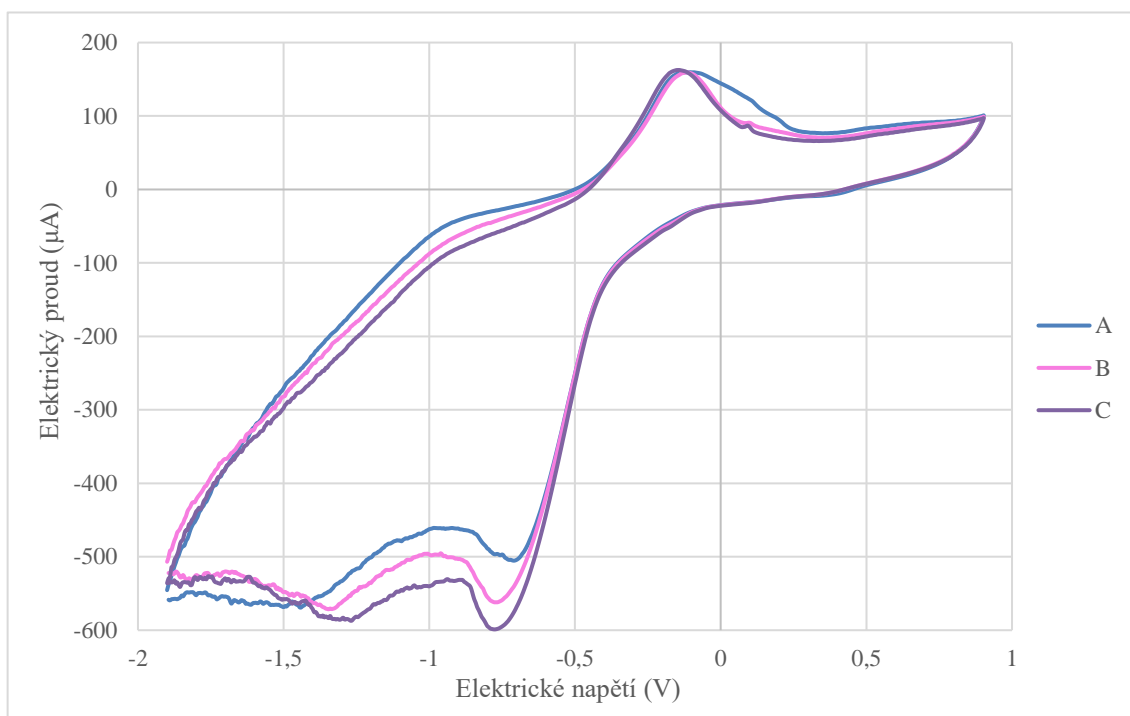


Obrázek 4.10: Voltamogram pro hydrochinon o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěný v butan-1-olu a s pomocným 0,1M roztokem KCl

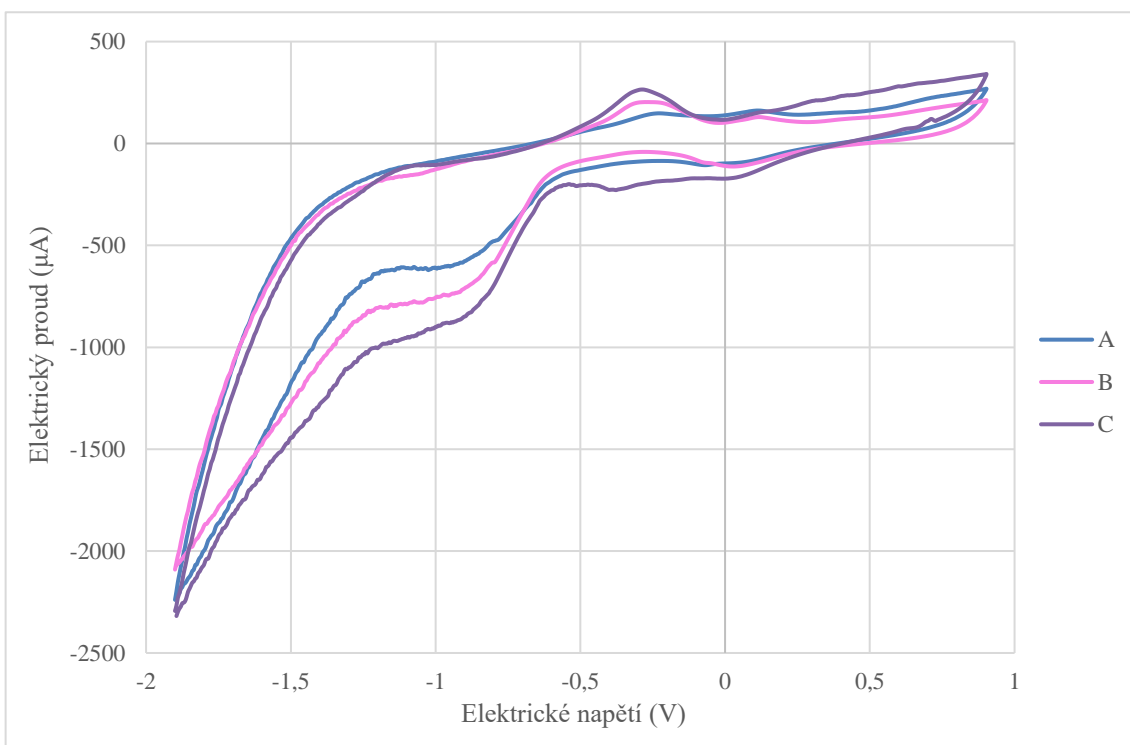
Rozpuštění hydrochinonu v trimethylbutan-1-olu nebylo úspěšné. V průběhu rozpouštění se vytvořil nehomogenní roztok. Z tohoto důvodu nebylo možné provést voltametrické měření.

4.3 Vitamín K

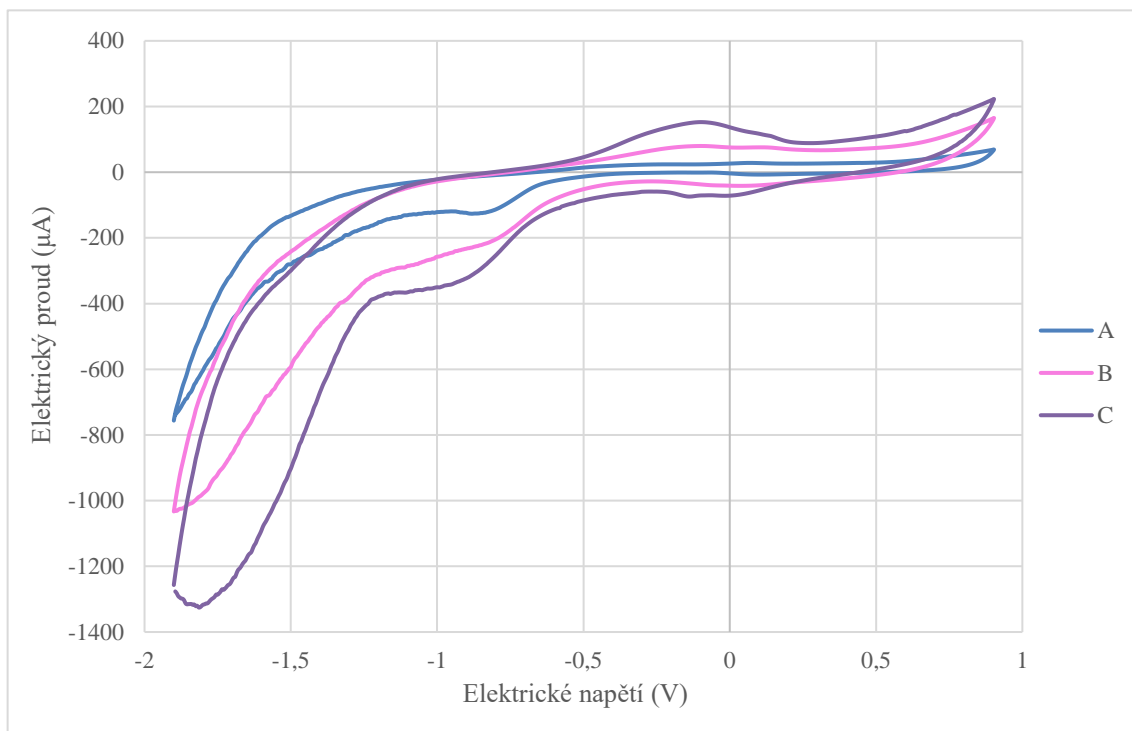
Bylo provedeno cyklické voltametrické měření vitamínu K v různých rozpouštědlech na přístroji EmStat3 s tlustovrstvým elektrochemickým senzorem majícím grafitovou pracovní elektrodu. Jako anorganická rozpouštědla byly použity: kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina sírová (H_2SO_4), kyselina dusičná (HNO_3) a hydroxid draselný (KOH) o koncentracích $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Organická rozpouštědla použitá pro stanovení vitamínu K byly: methanol, ethanol, propan-1-ol, acetonitril a chloroform. Parametry měření byly nastaveny následovně: počáteční potenciál $U = -1,9 \text{ V}$, zlomový potenciál $U = 0,9 \text{ V}$ a skenovací rychlost $v = 1,0 \text{ V/s}$.



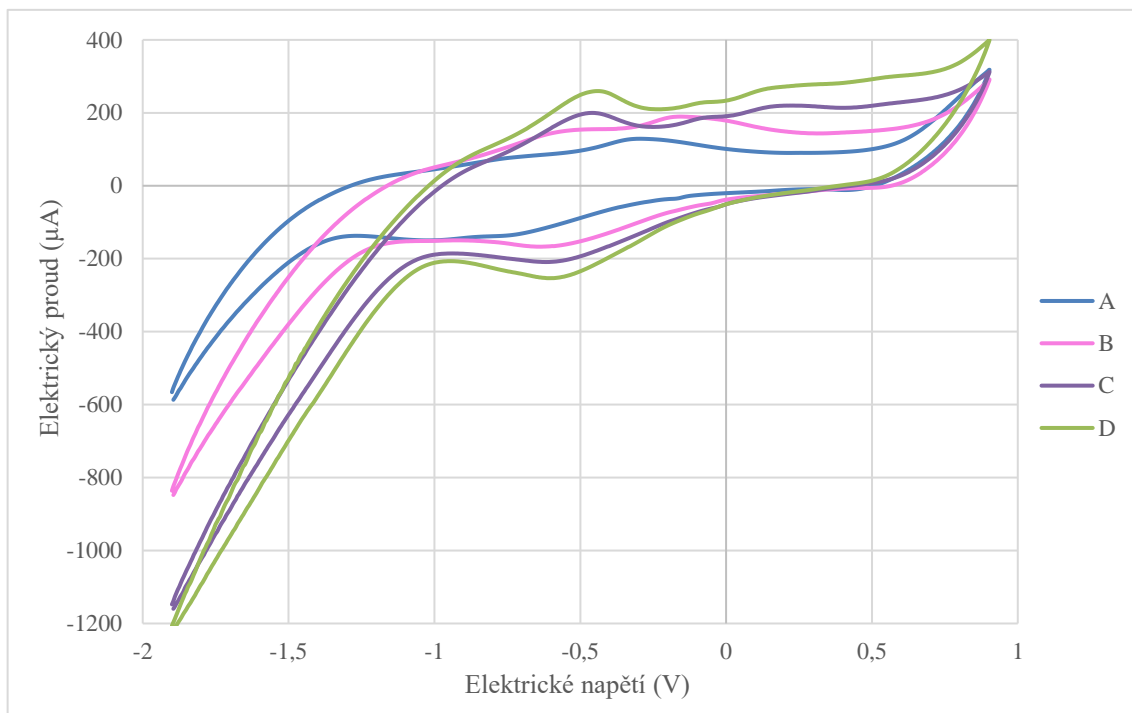
Obrázek 4.11: Voltamogram pro vitamín K v HCl o různých koncentracích A – $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
 B – $5,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obrázek 4.12: Voltamogram pro vitamín K v H_2SO_4 o různých koncentracích A – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
 B – $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

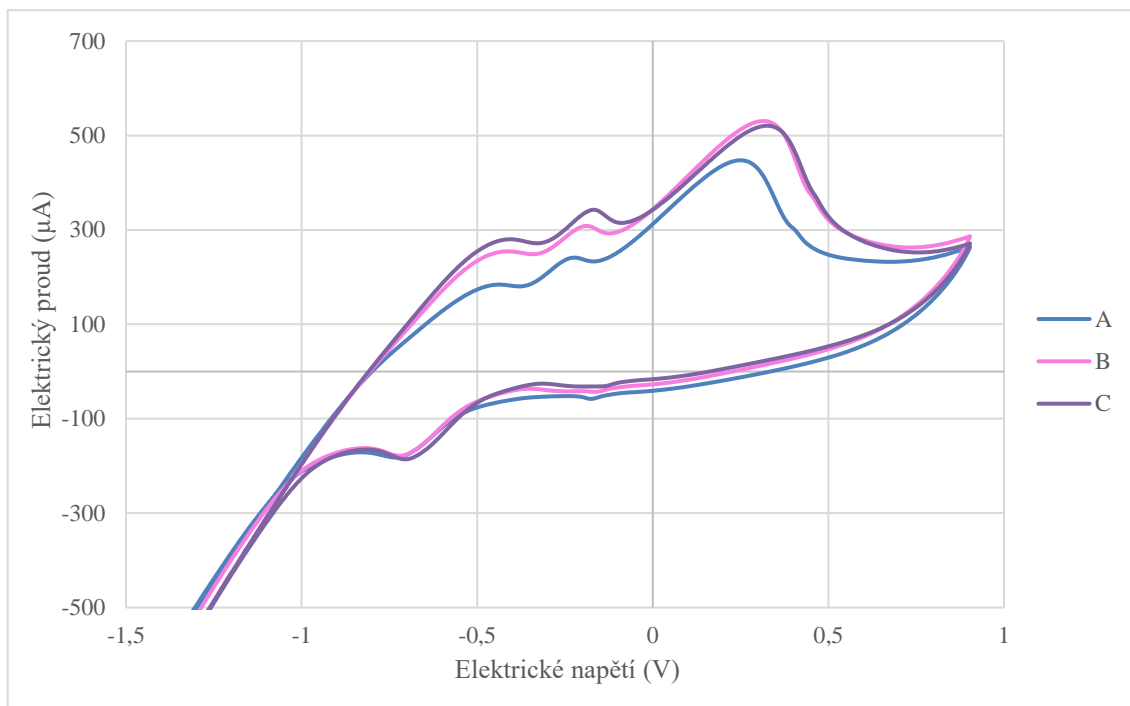


Obrázek 4.13: Voltamogram pro vitamín K v HNO_3 o různých koncentracích A – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
 B – $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

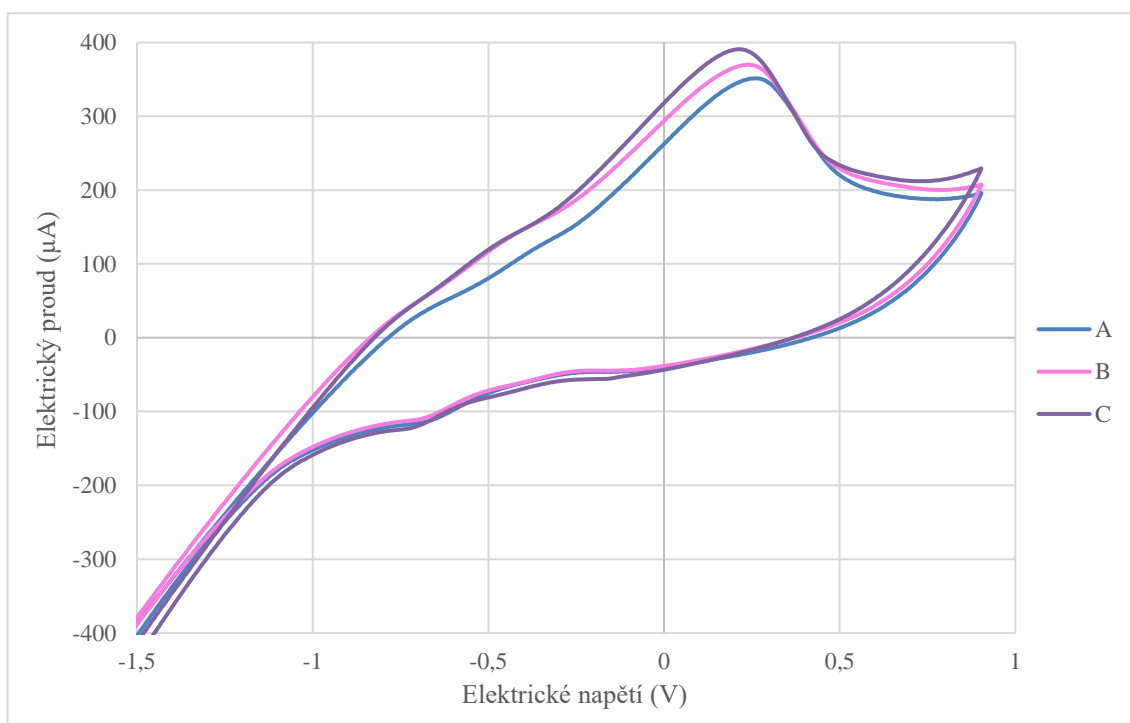


Obrázek 4.14: Voltamogram pro vitamín K v KOH o různých koncentracích A – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
 B – $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $5,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ D – $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

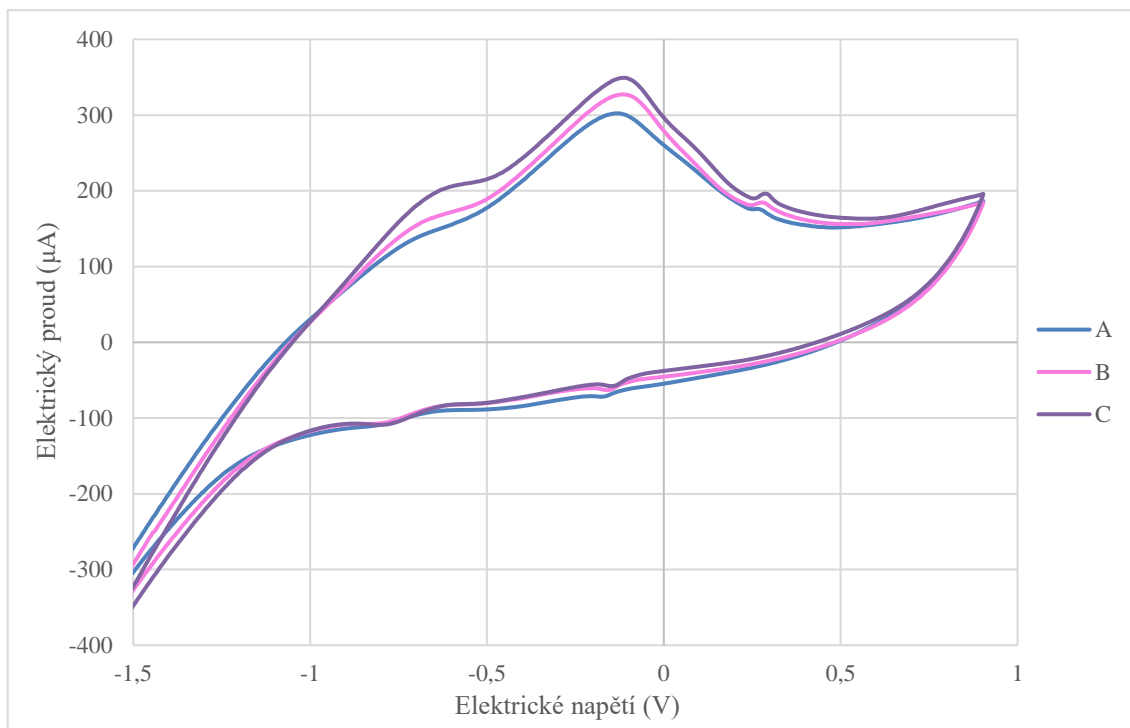
Dalším skupinou rozpouštědel byla organická rozpouštědla. Vitamin K byl po jednom rozpouštěn v methanolu, ethanolu, propan-1-olu, acetonitrilu a chloroformu. Jako pomocný roztok byl využit chlorid draselný o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



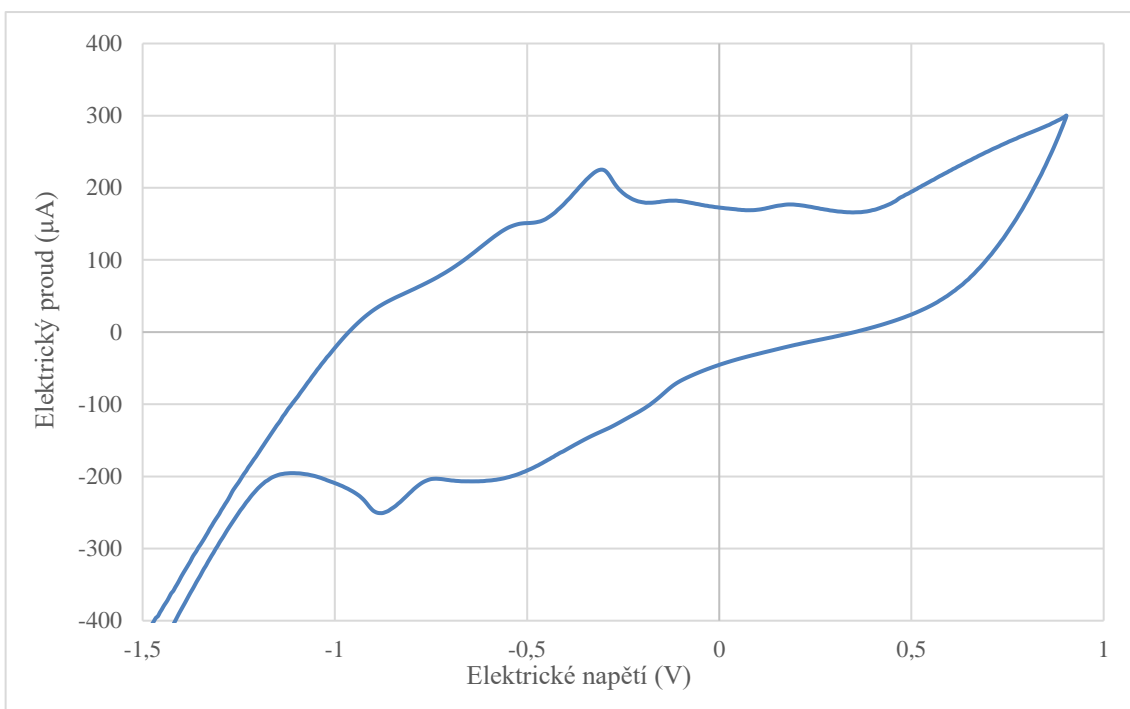
Obrázek 4.15: Voltamogram pro vitamin K rozpouštěný v methanolu o koncentraci A – $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ B – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obrázek 4.16: Voltamogram pro vitamin K rozpouštěný v ethanolu o koncentraci A – $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ B – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



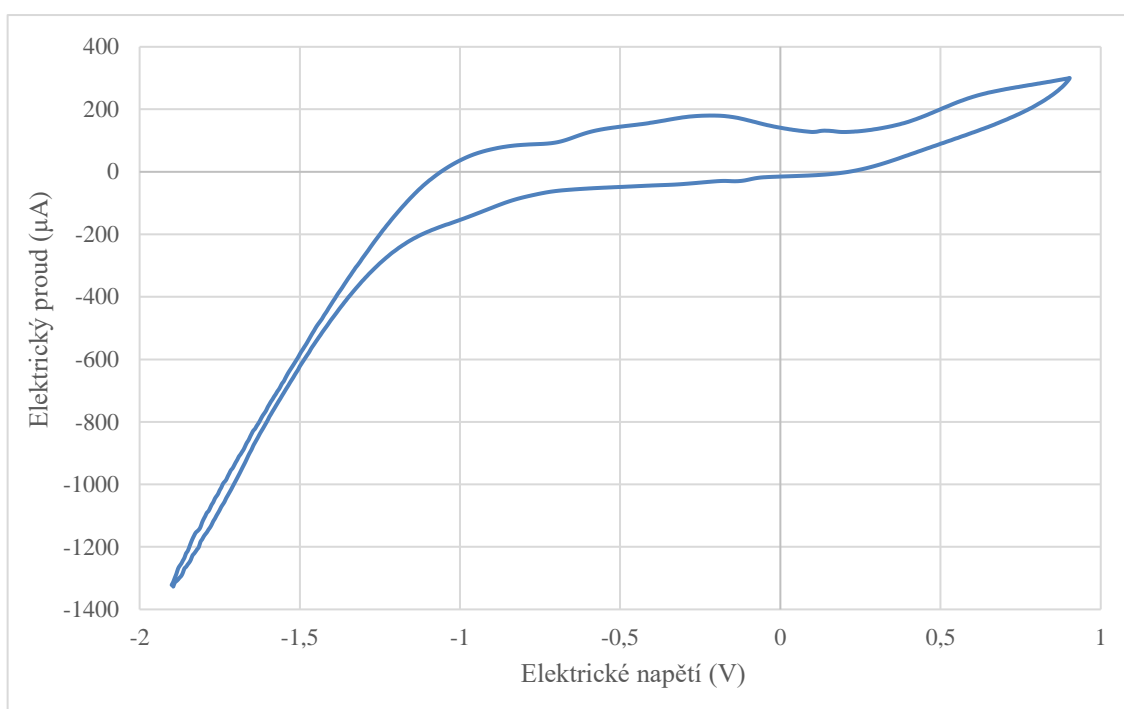
Obrázek 4.17: Voltamogram pro vitamín K rozpuštěný v propan-1-olu o koncentraci
 A – $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ B – $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ C – $3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obrázek 4.18: Voltamogram pro vitamín K v acetonitrilu o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ doplněný
 0,1M KCl

Vitamín K rozpuštěný v chloroformu neposkytoval možnost voltametrického stanovení. Důvodem byla jeho rozpustnost. Při pokusu o jeho rozpuštění se vytvořil nehomogenní roztok.

Byla také ověřena kyselina sorbová, která je pomocnou složkou v přípravku Kanavit. Byl připraven roztok kyseliny v sorbové v methanolu s pomocným roztokem 0,1M chloridu draselného. Výsledná koncentrace kyseliny sorbové byla $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozpouštědlo methanol bylo zvoleno z důvodu dobré rozpustnosti kyseliny sorbové v něm.



Obrázek 4.19: Voltamogram kyseliny sorbové o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěné v methanolu a doplněné 0,1M KCl

5 Diskuse

Cílem bakalářské práce bylo navržení vhodného zapojení a zprovoznění elektrochemického zařízení EmStat3. Při jeho zapojování bylo postupováno dle technického manuálu. Přístroj EmStat3 je pro použití v laboratorním prostředí vhodný, neboť vykazuje kompatibilitu s klasickými elektrodami i moderními elektrochemickými senzory, které byly pro účely bakalářské práce zvoleny. Důvody použití elektrochemických senzorů byly: nízká nákladovost, možnost bezproblémové výměny v případě jeho poškození a nízký objem vzorků potřebný pro stanovení. Měřicí aparatura se skládala ze stolního počítače s nainstalovaným softwarem PSTrace4, přístroje EmStat3, konektoru KAC1.5 a elektrochemického senzoru AC1.W*.RS. Zapojení bylo intuitivní a proběhlo bez problémů, neboť každé spojení mělo charakteristický konektor. Pro stanovování elektrochemicky aktivních látek bylo nutné zvládnout práci se softwarem PSTrace4, který poskytuje širokou škálu použitelných elektrochemických metod. Po získání přehledu o možnostech, které software nabízí, bylo jeho ovládání vnímáno jako intuitivní. Zprovoznění elektrochemického zařízení EmStat3 firmy PalmSens proběhlo úspěšně.

5.1 Hexakynoželezitan draselný

Cílem části vypracování týkající se hexakynoželezitanu draselného (elektrochemického standardu) bylo ověření funkčnosti metody cyklická voltametrie. Metoda byla ověřena za pomoci Randles-Ševčíkovy rovnice, která tvrdí, že s narůstající koncentrací zkoumaného analytu a narůstající skenovací rychlostí bude zaznamenán i nárůst elektrického proudu procházejícího roztokem.

Nejdříve byl zkoumán vliv koncentrace $K_3[Fe(CN)_6]$ na velikost elektrického proudu procházejícího analyzovaným vzorkem. Pro provedení experimentu byly použity roztoky o koncentracích $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako pomocný roztok byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Během experimentu byl zaznamenán nárůst elektrického proudu při rostoucí koncentraci zkoumaného analytu. Při voltametričtém měření lze vedle sebe detekovat jednotlivé organické i anorganické elektrochemicky aktivní látky obsažené ve zkoumaném vzorku, neboť každá látka má svůj pík při určité charakteristické hodnotě elektrického napětí. V případě $K_3[Fe(CN)_6]$ se hodnota píku pohybuje okolo $E = \pm 0,3 \text{ V}$. Na voltamogramu (obrázek 4.1) lze kromě charakteristického píku pozorovat další pík. Na základě této skutečnosti lze konstatovat, že měřené roztoky byly znečištěny příměsí, jejíž zdroj byl pravděpodobně roztok chloridu draselného. Toto znečištění se projevilo přítomností dalšího píku, jehož potenciál se pohyboval v rozmezí $E = 0,1 - 0,2 \text{ V}$ (v kladných i záporných hodnotách). Průběhu experimentu však znečištění nebránilo, protože jednotlivé píky bylo možné od sebe dobře

rozpoznat. Tento experiment byl proveden za účelem určení vlivu koncentrace na velikost elektrického proudu. Cílem bylo zjištění, zda dochází k jeho nárůstu, či poklesu. Nejednalo se o čistě kvantitativní stanovení, kterému by znečištění způsobovalo problémy. Z tohoto důvodu bylo možné voltametrické měření dokončit i s přítomnými nečistotami. Na grafickém zobrazení závislosti elektrického proudu na napětí (obrázek 4.1) bylo možné pozorovat nárůst elektrického proudu s růstem koncentrace $K_3[Fe(CN)_6]$ v roztoku.

Následně byl zkoumán vliv skenovací rychlosti na elektrický proud. Pro měření byl použit roztok $K_3[Fe(CN)_6]$ o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jako pomocný roztok $0,1\text{M}$ chlorid draselný. Použité skenovací rychlosti byly $0,1\text{V/s}$, $0,5 \text{ V/s}$ a $1,0 \text{ V/s}$. Na obrázku 4.2 je grafické zobrazení závislosti elektrického proudu na elektrickém napětí pro různé rychlosti skenu, kde je patrný nárůst elektrického proudu se zvyšující se skenovací rychlostí. Lze též pozorovat pohyb zlomového potenciálu směrem k vyšším hodnotám elektrického proudu v dopředném skenu a pohyb konečného potenciálu směrem k nižším hodnotám elektrického proudu u zpětného skenu. Roztok $K_3[Fe(CN)_6]$ byl doplněn roztokem chloridu draselného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který obsahoval nečistoty, jak již bylo zmíněno výše. Znečištění průběhu experimentu nebránilo, protože píky hexakaynoželezitanu draselného a nečistoty bylo možné dobře odlišit.

5.2 Hydrochinon

Cílem části týkající se hydrochinonu bylo ověření elektrochemické aktivity chinonové struktury, jež je součástí vitamínu K. Dle literatury se anodický pík hydrochinonu má vyskytovat v okolí $E = 0,2 - 0,3 \text{ V}$ v záporné oblasti elektrického napětí, zatímco katodický pík v oblasti $E = 0,4 - 0,5 \text{ V}$ též v této oblasti napětí. [57] Pro stanovení hydrochinonu byla volena rozpouštědla, jež budou následně využita i ke stanovování vitamínu K. Toto rozhodnutí bylo učiněno s úmyslem vytrdit organická a anorganická rozpouštědla, jež jsou pro stanovení vhodná, od rozpouštědel nevhodných. Jako pomocné roztoky byly zvoleny roztoky chloridu draselného a chloristanu draselného.

Nejprve byly proměřeny různé senzory za účelem určení vhodného senzoru pro následující experimenty. Byly zkoumány elektrochemické senzory se zlatou, platinovou, stříbrnou a grafitovou pracovní elektrodou. K měření byl použit roztok hydrochinonu o námi zvolené koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako pomocný roztok byl prvně použit $0,1\text{M}$ roztok chloridu draselného a následně $0,1\text{M}$ roztok chloristanu draselného. Naměřené voltamogramy pro oba pomocné roztoky byly vyhodnoceny identicky. Grafickou závislost elektrického proudu na elektrickém napětí pro různé senzory lze pozorovat na obrázku 4.3. Z této závislosti bylo usouzeno, že elektrochemický senzor se stříbrnou pracovní elektrodou nebude vhodný pro experimentální účely této práce, neboť na voltamogramu nebyly přítomné žádné píky. Jako nejvhodnější se jevil senzor,

jehož pracovní elektroda je tvořena uhlíkem. Senzor poskytoval interpretovatelná data a v porovnání s ostatními senzory dosahovaly píky vyšších hodnot elektrického proudu. Elektrochemické senzory, jejichž pracovní elektroda je tvořena zlatem a platinou, byly vyhodnoceny jako použitelné senzory. Nevýhodou použití těchto senzorů bylo možné spatřovat v katodických a anodických pících, které nedosahovaly takové výšky, jaká byla zaznamenána v případě použití senzoru s grafitovou pracovní elektrodou.

Měřeny byly roztoky hydrochinonu v různých rozpouštědlech. Nejprve byl hydrochinon rozpuštěn ve vodě a doplněn pomocnými roztoky. Pomocnými roztoky byly chlorid draselný a chloristan draselný o koncentracích $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Porovnání roztoků hydrochinonu o koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ s těmito pomocnými roztoky je možné pozorovat na obrázku 4.4. Z voltamogramu vyplývá, že oba tyto pomocné roztoky jsou vhodné pro měření, neboť píky byly prokazatelné. Na obrázku 4.5 je možné pozorovat nárůst elektrického proudu s rostoucí koncentrací hydrochinonu v analyzovaném vzorku. Jednalo se o roztoky hydrochinonu doplněné $0,1\text{M}$ chloristanem draselným o koncentracích $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nárůst výšky píků nebyl markantní kvůli koncentracím analyzovaného vzorku, které si byly blízké, a kvůli podmínkám měření, jež nebyly optimalizované. Aby bylo dosaženo dobrého rozlišení jednotlivých píků, bylo by nutné najít vhodnou výslednou koncentraci pomocného roztoku v analyzovaném vzorku. Tato koncentrace se musí pohybovat v rozmezí 30krát až 50krát větším, než je koncentrace zkoumané elektrochemicky aktivní látky. Experimenty s hydrochinonem byly provedeny s úmyslem ověřit elektrochemickou aktivitu chinonové struktury, a tudíž bylo možné výsledky interpretovat i za neoptimalizovaných podmínek měření. Hydrochinon bylo možné rozpustit ve vodě, avšak rozpustnost v organických rozpouštědlech byla mnohonásobně lepší, což mělo pozitivní vliv i na voltamogramy.

Dále byl hydrochinon rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v hydroxidu draselném o koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Grafické znázornění závislosti elektrického proudu na elektrickém napětí pro hydrochinon rozpuštěný v kyselině chlorovodíkové je na obrázku 4.6. Na voltamogramu je dominantní katodický pík odpovídající redukci, zatímco anodický pík odpovídající oxidaci dosahuje zhruba třetiny katodického elektrického proudu. Toto situace byla pravděpodobně zapříčiněna velmi nízkým pH roztoku, které zabraňovalo oxidaci v průběhu. Při nízkých hodnotách pH jsou v roztoku přítomny ve vysoké koncentraci ionty H^+ . Tyto ionty brání průběhu oxidace, protože průběhem oxidace by došlo k dalšímu navýšení koncentrace H^+ v analyzovaném vzorku. Vzorek hydrochinonu rozpuštěný v hydroxidu draselném nepřinesl žádné interpretovatelné výsledky.

Nakonec byla pro rozpuštění hydrochinonu použita organická rozpouštědla. Byl použit methanol, ethanol, propan-1-ol, butan-1-ol a trimethylbutan-1-ol. Funkci pomocných roztoků zastávaly roztoky chloridu draselného a chloristanu draselného o koncentracích $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Grafické zobrazení závislosti elektrického proudu na elektrickém napětí pro hydrochinon rozpuštěný v methanolu a doplněný pomocnými roztoky

je na obrázku 4.7. Oba roztoky, chlorid draselný i chloristan draselný byly vyhodnoceny jako potenciálně použitelné pro potřeby stanovování. Katodický pík však dosahoval vyšších hodnot elektrického proudu v případě použití 0,1M roztoku chloridu draselného, a proto byl v následujících experimentech upřednostněn před chloristanem draselným. Na obrázku 4.8 je možné pozorovat nárůst elektrického proudu při narůstající koncentraci hydrochinonu. Na provedení experimentu byly využity roztoky hydrochinonu rozpuštěné v ethanolu a doplněné na požadovanou koncentraci 0,1M chloridem draselným. Jednalo se o koncentrace $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nárůsty elektrického proudu jsou v anodické i katodické oblasti píku dobře viditelné. Grafickou závislost elektrického proudu na elektrickém napětí pro roztok hydrochinonu rozpuštěném v propan-1-olu a doplněném 0,1M chloridem draselným na koncentraci $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ lze pozorovat na obrázku 4.9. Závislost pro butan-1-ol je na obrázku 4.10. Za vhodná rozpouštědla lze označit methanol, ethanol a propan-1-ol, neboť rozpuštění hydrochinonu v těchto rozpouštědlech bylo snadné a na voltamogramech byly patrné katodické i anodické píky. Pro měření lze použít i butan-1-ol, pokud se dobře zvládne proces rozpouštění. Při rozpouštění se prvotně vytvoří nehomogenní roztok, který se po určitém čase a míchání zhomogenizuje. V trimethylbutan-1-olu se hydrochinon rozpustit nepodařilo. Hydrochinon všeobecně vykazoval vyšší rozpustnost v organických rozpouštědlech, než v rozpouštědlech anorganických, a tudíž vykazovala i lepší voltamogramy.

Všechna provedená experimentální měření potvrdila, že hydrochinon je elektrochemicky aktivní látka. Píky se vyskytovaly v oblastech shodných s oblastmi uváděnými v literatuře v anorganických i organických rozpouštědlech, přičemž lepších výsledků bylo dosaženo v případě použití organických rozpouštědel.

5.3 Vitamín K

Cílem části týkající se vitamínu K je jeho stanovování v různých organických i anorganických rozpouštědlech. Problémem vitamínu K je jeho hydrofobnost. Z tohoto důvodu jsou jako pomocné roztoky využívány roztoky organických solí jako např. tetrabutylamonium hexafluorofosfát (Bu_4NPF_6) a tetraethylamonium tetrafluoroborát (TEABF_4). Tyto organické soli mají vysokou rozpustnost v organických rozpouštědlech, ale pro biomedicínské využití nejsou vhodná kvůli svým toxickým vlastnostem. Z tohoto důvodu byl v experimentu použit jako pomocný roztok chlorid draselný. Jedinou nevýhodou tohoto pomocného roztoku je jeho omezená rozpustnost v anorganických rozpouštědlech. Pro měření byl využit senzor AC1.W4.RS s grafitovou pracovní elektrodou, protože v experimentech s hydrochinonem vyšel jako nejvhodnější.

V rámci experimentů byly jako rozpouštědla vyzkoušeny některé anorganické kyseliny dle článku [59], hydroxid draselný a vybraná organická rozpouštědla. Z anorganických kyselin byla použita kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a kyselina dusičná, všechny o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Grafická závislost elektrického proudu

na elektrickém napětí pro různě koncentrované roztoky vitamínu K rozpuštěné v 0,1M kyselině chlorovodíkové je na obrázku 4.11. Pro stanovení byly využity roztoky o koncentracích $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro měření byl připraven roztok o koncentraci $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, která byly využita v experimentální části týkající se hydrochinonu, a do kterého bylo přidáváno po 20 μl přípravku Kanavitu. Koncentrace v řádu $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla zvolena, neboť se v předcházející části osvědčila, a protože cílem experimentů bylo zjištění vhodných rozpouštědel pro vitamín K. Z tohoto důvodu nebylo nutné dodržet koncentraci vitamínu K v krevním řečišti. S narůstající koncentrací vitamínu K byl zaznamenán markantní nárůst katodického píku a minimální, téměř žádný nárůst anodického píku. Situace byla pravděpodobně zapříčiněna nízkým pH roztoku, které bránilo průběhu oxidace stejně jako v případě hydrochinonu. Na obrázcích 4.12 a 4.13 je možné pozorovat voltamogramy vitamínu K rozpuštěného v kyselině sírové a dusičné. Pro stanovení byly využity roztoky vitamínu K o koncentracích $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V obou případech byly zaznamenány znatelné nárůsty elektrického proudu se zvyšující se koncentrací vitamínu K, jak v oblasti katodických, tak v oblasti anodických proudů. Katodický pík byl opět vyhodnocen jako dominantní, oproti anodickému, který zaznamenal pouze malý nárůst. Situace byla pravděpodobně zapříčiněna nízkým pH roztoku, které bránilo průběhu oxidace vitamínu K. Anodický pík byl v případě použití anorganických kyselin jako rozpouštědla přítomen v oblasti $E = 0,2 - 0,3 \text{ V}$ v záporných hodnotách napětí, zatímco katodický pík se pohyboval v oblasti $E = 0,7 - 0,9 \text{ V}$ též v záporném napětí. Jako další anorganické rozpouštědlo byl využit hydroxid draselný o koncentracích $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě použití 2M hydroxidu draselného nebyly výsledky měření interpretovatelné, což bylo pravděpodobně zapříčiněno vysokou iontovou silou. Aby měření poskytovalo interpretovatelné výsledky, pak musí iontová síla pomocného roztoku dosahovat maximálně 3 % celkové iontové síly roztoku. Tato podmínka byla v případě 2M roztoku hydroxidu draselného porušena. Grafickou závislost elektrického proudu na elektrickém napětí pro vitamín K rozpuštěný v 0,1M hydroxidu draselném lze pozorovat na obrázku 4.14. Pro stanovení byly využity roztoky vitamínu K o koncentracích $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. S postupným navyšováním koncentrace byl zaznamenán nárůst elektrického proudu a pohyb anodického i katodického píku směrem k hodnotě napětí $E = -0,5 \text{ V}$. Pohyb píku byl pravděpodobně zapříčiněn změnami pH roztoku.

Následně byl vitamín K rozpuštěn v organických rozpouštědlech a jako pomocný roztok byl využit chlorid draselný o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako rozpouštědlo byl využit methanol, ethanol, propan-1-ol, acetonitril a chloroform. Pro stanovení za pomoci rozpouštědla methanolu, etanolu a propan-1-olu byly využity roztoky vitamínu K o koncentracích $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Grafické zobrazení elektrického proudu na elektrickém napětí pro vitamín K rozpuštěný v methanolu je možné pozorovat na obrázku 4.15. Jsou zde dobře patrné píky v oblasti $E = -0,2 \text{ V}$ a $E = -0,7 \text{ V}$, které odpovídají vitamínu K. Na voltamogramu lze nalézt i další pík na hodnotě

$E = 0,2 \text{ V}$, jehož vznik byl pravděpodobně zapříčiněn chemickými interakcemi v analyzovaném roztoku. Při využití ethanolu jako rozpouštědla (obrázek 4.16) je možné pozorovat dominantní anodický pík v oblasti $E = 0,2 \text{ V}$, který není v oblasti, v níž se nachází anodický pík pro vitamín K. Z toho lze usuzovat, že v roztoku s ethanolem dochází k interakcím s vitamínem K. Cyklický voltamogram vitamínu K rozpuštěného v propan-1-olu lze pozorovat na obrázku 4.17. S narůstající koncentrací vitamínu K je zde patrný nárůst anodického píku. Nepatrné nárůsty, popřípadě nulové nárůsty elektrického proudu při navyšování koncentrace vitamínu K v analyzovaném roztoku byly pravděpodobně zapříčiněny celkovou koncentrací pomocného roztoku. Aby bylo dosaženo lepších výsledků, bylo by nutné provést další experimenty pro určení vhodné koncentrace pomocného roztoku. Pro rozpuštění vitamínu K byl využit také acetonitril s pomocným 0,1M roztokem chloridem draselným. Měřená koncentrace vitamínu K byla $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Závislost elektrického proudu na elektrickém napětí je na obrázku 4.18. Anodický i katodický pík je dobře patrný v oblasti $E = -0,4 \text{ V}$ a $E = -0,8 \text{ V}$. Jako nevhodné rozpouštědlo byl vyhodnocen chloroform. Došlo k vysrážení vitamínu K, a tudíž nebylo možné vzorek analyzovat.

Vzhledem k tomu, že k měření byl použit přípravek Kanavit, který obsahuje kromě vitamínu K i kyselinu sorbovou, bylo nutné provést doplňující experiment a prověřit elektrochemickou aktivitu kyseliny sorbové. Výrobce neudává koncentraci kyseliny sorbové v přípravku, proto byla zvolena koncentrace $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jež byla v experimentu převážně používána. Kyselina sorbová byly rozpuštěna v methanolu a doplněna roztokem chloridu draselného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Voltamogram kyseliny sorbové je na obrázku 4.19. Z obrázku je patrné, že kyselina sorbová nemohla mít vliv na stanovení vitamínu K, protože její anodický pík nebyl v oblasti, ve které se nachází pík vitamínu K.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla řešena problematika stanovení vitamínu K, klíčového kofaktoru hemokoagulace, použitím cyklické voltametrie, návržení a zprovoznění vhodného zapojení přístroje EmStat3 od firmy PalmSens.

V Teoretické části byly podrobně diskutovány výhody, využití i současné trendy voltametrických metod. Pozornost byla věnována také typům používaných elektrod a jejich zapojení. V metodologické části byly jednotlivé komponenty měřící aparatury.

Byly provedeny experimenty s elektrochemicky aktivní látkou $K_3[Fe(CN)_6]$ a byla ověřena funkčnost voltametrického přístroje EmStat3. Pomocí cyklické voltametrie hydrochinonu byla ověřena elektrochemická aktivita chinonové struktury, která je také součástí vitamínu K. Součástí experimentů s hydrochinonem bylo i určení vhodných organických rozpouštědel, pomocných roztoků a vhodného elektrochemického senzoru. Z výsledků provedených experimentů vyplynulo, že pro uvažovanou aplikaci není vhodné používat jako rozpouštědlo trimethylbutan-1-ol a 2M roztok KOH. Naopak jako vhodná rozpouštědla se jeví methanol, ethanol, propan-1-ol, butan-1-ol a kyselina chlorovodíková. Chlorid draselný byl určen jako nejvhodnější pomocný roztok. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití senzoru AC1.W4.RS jehož součástí je grafitová pracovní elektroda. Obdobné experimenty byly provedeny s vitamínem K. Mezi použitelná anorganická rozpouštědla byla zařazena kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina dusičná a hydroxid draselný o koncentracích $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vhodným organickým rozpouštědlem se jevil methanol, propan-1-ol a acetonitril. Naopak nevhodné bylo použití chloroformu a ethanolu. Součástí experimentu bylo vyloučení vlivu kyseliny sorbové obsažené ve zkoumaném léčivém přípravku na provedená měření. Provedené experimenty sloužily pro základní ověření metodiky rozpouštění studovaných látek a v následných pracích by bylo vhodné provést optimalizaci podmínek.

Na základě provedených experimentů byl vypracován návod pro použití přístroje EmStat3, který je součástí této přílohy této práce.

Seznam použité literatury

- [1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.
- [2] BRDIČKA, Rudolf a Jiří DVOŘÁK. *Základy fyzikální chemie*. 2. vydání. Praha: Academia, 1977.
- [3] ŠRÁMEK, Jaromír. *Nanotechnologie v medicíně* [online]. Masarykova univerzita v Brně: Lékařská fakulta - Biofyzikální ústav, 2009 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/nanotech.pdf>
- [4] HEYROVSKÝ, Michael. Polarografická prehistorie. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 1997, **91**(12), 1034 - 1037 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_12_1034-1037.pdf
- [5] KRŮŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie* [online]. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014 [cit. 2017-05-15]. ISBN 978-80-7414-873-6. Dostupné z: http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e_final_tisk.pdf
- [6] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II* [online]. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2015 [cit. 2017-05-15]. ISBN 978-80-248-3734-5. Dostupné z: http://katedry.fmmi.vsb.cz/617/Analyticka_chemie_II.pdf
- [7] ZUTSCHI, Kamala. *Introduction to Polarography and Allied Techniques*. 2. edition. New Age International Publishers, 2008. ISBN 8122417914.
- [8] *Cyklická voltametrie aplikovaná na přírodní polyfenoly a antioxidanty* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/16232478-Cyklicka-voltametrie-aplikovana-na-prirodni-polyfenoly-a-antioxidanty.html>
- [9] YOSYPCHUK, Bogdan a Jiří BAREK. Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009, **103**(4), 284 - 290 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_284-290.pdf
- [10] TVRDÍKOVÁ, Jana, Aleš DAŇHEL a Jiří BAREK. Voltametrické stanovení dinitronaftalenů na stříbrné tuhé amalgámové pastové elektrodě. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2010, **104**(s1), 57 - 60 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_s1_s57-s60.pdf

- [11] PRCHAL, Vít, Vlastimil VYSKOČIL, Aleš DAŇHEL, Jiří BAREK a Joseph WANG. Využití visící rtuťové kapkové elektrody modifikované oktan-1-thiolem ve voltametrické analýze genotoxických environmentálních polutantů. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2011, **105**(3), 217 - 224 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_03_217-224.pdf
- [12] MUSILOVÁ, Jana, Jiří BAREK a Karolina PECKOVÁ. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009, **103**(6), 469 - 478 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_06_469-478.pdf
- [13] BAREK, Jiří. Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 1997, **91**(12), 1038 - 1042 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_12_1038-1042.pdf
- [14] KALVODA, Robert. Netradiční použití polarografie/voltametrie. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2000, **94**(1), 2 - 9 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2000_01_01.pdf
- [15] SKLÁDAL, Petr a Lumír MACHOLÁN. Biosenzory - současný stav a perspektivy. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 1997, **91**(2), 105 - 113 [cit. 2017-05-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_02_105-113.pdf
- [16] KALOUS, Vítěz. K 50. výročí udělení Nobelovy ceny profesoru Jaroslavu Heyrovskému. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie* [online]. Praha: Jednota českých matematiků a fyziků, 2009, **54**(2), 89 - 93 [cit. 2017-05-15]. ISSN 0032-2423. Dostupné z: http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/141892/PokrokyMFA_54-20092_1.pdf
- [17] Voltammetric Methods. *CHEMISTRY: LibreTexts* [online]. [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods)
- [18] GRÖTSCHELOVÁ, Sylvie, Pavel KURÁŇ a Jaroslav REJNEK. *Vybrané úlohy z instrumentální analýzy* [online]. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2007 [cit. 2017-05-15]. ISBN 978-80-7044-852-6. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/aktuality/navodyLaboratore.pdf>

- [19] PStTrace4 Manual. PalmSens Compact Electrochemical Interfaces. [cit.2016-11-12].
- [20] WANG, Joseph. *Analytical Electrochemistry* [online]. Third edition. Inc., Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2006 [cit. 2017-05-15]. ISBN 978-0-471-67879-3. Dostupné z:
[https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ZgUa4WbLMKkC&oi=fnd&pg=PR7&dq=J.+Wang,+Analytical+electrochemistry+3rd+ed.,+John+Wiley+%26+Sons,+Inc.,+Hoboken,+New+Jersey+\(2006\).df&ots=J9gN6snN5z&sig=zsxtQ_PrDSGd977RHElh_OY2Yi8&redir_esc=y#v=onepage&q=cyclic&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ZgUa4WbLMKkC&oi=fnd&pg=PR7&dq=J.+Wang,+Analytical+electrochemistry+3rd+ed.,+John+Wiley+%26+Sons,+Inc.,+Hoboken,+New+Jersey+(2006).df&ots=J9gN6snN5z&sig=zsxtQ_PrDSGd977RHElh_OY2Yi8&redir_esc=y#v=onepage&q=cyclic&f=false)
- [21] Cyklická voltametrie. *Univerzita Palackého v Olomouci: KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE* [online]. [cit.2017-01-07]. Dostupné z:
http://fch.upol.cz/skripta/pok1/Cyklicka_voltametrie.pdf
- [22] EmStat: Description. PalmSens Compact Electrochemical Interfaces [online]. [cit.2016-11-12]. Dostupné z: <http://www.palmsens.com/product/emstat>
- [23] EmStat series description. PalmSens Compact Electrochemical Interfaces [online]. [cit.2016-11-12]. Dostupné z:
<http://www.palmsens.com/shared/content/uploads/2016/11/EmStat-series-description.pdf>
- [24] KA1 Connector. *BVT Technologies* [online]. [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: www.bvt.cz/_ftp/Konektory/KA1.pdf
- [25] HARPER, Charles A. *Handbook of Thick Film Hybrid Microelectronics*. London: The Kingsport Press, 1974.
- [26] GOLONKA, Leszek. New application of LTCC technology. *28th International Spring Seminar of Electronic Technology* [online]. Wiener Neustadt (Austria), 2005, 148 - 152 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1109/ISSE.2005.1491020. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1491020/>
- [27] BUJALOBOKOVÁ, Magdaléna a Pavel TRNKA. Progresivní tlustovrstvé technologie v elektronických aplikacích. *ELEKTRO* [online]. 2008, **2008**(1), 6 - 8 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.odbornecasopisy.cz/res/pdf/36505.pdf>
- [28] GARROU, Philip E. a Iwona TURLIK. *Multichip module technology handbook*. New York: McGraw-Hill, 1998.
- [29] AC1 sensor. *BVT Technologies* [online]. [cit.2016-12-29]. Dostupné z: http://www.bvt.cz/_ftp/Senzory%20new/AC1n.pdf
- [30] Potassium Ferricyanide. *Pubchem: Open chemistry database* [online]. [cit.2016-12-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26250#section=Top>

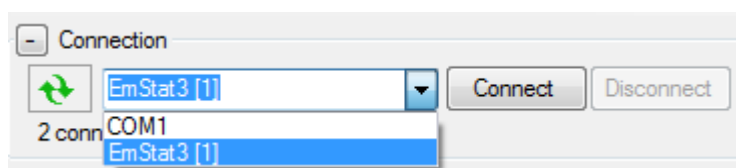
- [31] *Cyclic Voltammetric Study of ferrocyanide/ferricyanide Redox Couple* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: http://web.mnstate.edu/marasing/CHEM480/labs/LABS/CV/Cyclic%20voltammetric%20study%20of%20ferrocyanide_ferricyanide%20redox%20couple.pdf
- [32] HYDROCHINON: Bezpečnostní list. *VERKON: Společnost pro Vaši laboratoř* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.verkon.cz/laboratorni-chemikalie-lachner/hydrochinon>
- [33] Hydroquinone. *PubChem: Open chemistry database* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/785#section=Top>
- [34] DU, Haijun, Jainshan YE, Jiaqi ZHANG, Xiaodan HUANG a Chengzhong YU. A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2011, **650**(2), 209 - 213 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665710003899>
- [35] BRODY, T. *Nutritional Biochemistry*. Second edition. San Diego: Academic Press, 1999. ISBN 978-0121348366.
- [36] SHEARER, MJ. *Vitamin K* [online]. 1995, **345**, 229 - 345 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673695902279?via%3Dihub>
- [37] Vitamin K. *Oregon State University* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://ipi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-K>
- [38] WEBER, Peter. Vitamin K and bone health. *Nutrition* [online]. 2001, **17**(10), 880 - 887 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701007092>
- [39] SHRESTHA, Jaya P. Synthesis, Structure-Activity Relationship Study, and Mode of Action Study of 1,4-Naphthoquinone Based Anticancer and Antimicrobial Agents. Utah, 2016. Utah State University.
- [40] Phylloquinone. *PubChem: Open chemistry database* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280483#section=Top>
- [41] Menatetrenone. *PubChem: Open chemistry database* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282367#section=Top>
- [42] Menadione. *PubChem: Open chemistry database* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4055#section=Top>

- [43] AHMED, Sameh, Naoya KISHIKAWA, Kenichiro NAKASHIMA a Naotaka KURODA. Determination of vitamin K homologues by high-performance liquid chromatography with on-line photoreactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **591**(2), 148 - 154 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007006526>
- [44] PARONI, Rita, Elena Maria FAIONI, Cristina RAZZARI, Gessica FONTANA a Marco CATTANEO. Determination of vitamin K1 in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(3), 351 - 354 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023208009379>
- [45] FAULER, G., H. J. LEIS, J. SCHALAMON, W. MUNTEAN a H. GLEISPACH. Method for the Determination of Vitamin K₁₍₂₀₎ in Human Plasma by Stable Isotope Dilution/Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of MASS SPECTROMETRY* [online]. 1996, **31**(6), 655 - 660 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199606\)31:6%3C655::AID-JMS339%3E3.0.CO;2-T/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9888(199606)31:6%3C655::AID-JMS339%3E3.0.CO;2-T/abstract)
- [46] OTLES, Semih a Ozlem CAGINDI. Determination of vitamin K₁ content in olive oil, chard and human plasma by RP - HPLC method with UV - Vis detection. *Food chemistry* [online]. 2007, **100**(3), 1220 - 1222 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460501040X>
- [47] FU, Xueyan, James W. PETERSON, Mona HDEIB, Sarah L. BOOTH, Michael A. GRUSAK, Alice H. LICHTENSTEIN a Gregory G. DOLNIKOWSKI. Measurement of Deuterium-Labeled Phylloquinone in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* [online]. 2009, **81**(13), 5421 - 5425 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733890/>
- [48] SONG, Qinxin, Aidong WEN, Li DING, Li DAY, Lin YANG a Xiemin QI. HPLC–APCI–MS for the determination of vitamin K1 in human plasma: Method and clinical application. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **875**(2), 541 - 545 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023208007563>
- [49] ABDOLLAHI, Hamid a Leila BAGHERI. Simultaneous spectrophotometric determination of Vitamin K₃ and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection-partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2004, **514**(2), 211 - 218 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267004003733>

- [50] WEBSTER, Richard D. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *THE CHEMICAL RECORD: A Journal of the Chemical Society of Japan* [online]. 2012, **12**(1), 188 - 200 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.201100005/full>
- [51] HEIDI, Thomas, Robert HEIDE a Andreas TERFORT. Thin film reference electrodes for aqueous and organic media. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2012, **171 - 172**, 155 - 164 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400512002201>
- [52] SIMAO, J. E., M. H. LOPEZ a J. de O. SABRAL. VOLTAMMETRIC STUDIES OF VITAMIN K₃ IN ACID AQUEOUS SOLUTION. *Revista Portuguesa de Química* [online]. 1980, **22**(103), 103 - 107 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.spq.pt/magazines/RPQ/302/article/981/pdf>
- [53] YANG, JeeEun, Jang-Hee YOON, Mi-Sook WON a Yoon-Bo SHIM. Electrochemical and Spectroelectrochemical Behaviors of Vitamin K₁/Lipid Modified Electrodes and the Formation of Radical Anion in Aqueous Media. *Bulletin of the Korean Chemical Society* [online]. 2010, **31**(11), 3133 - 3138 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj7gsyb7PTTAhVIOxQKHVNub5cQFggoMAA&url=http%3A%2F%2Fjournal.kcsnet.or.kr%2Fmain%2Fj_search%2Fj_download.htm%3Fcode%3DB101114&usq=AFQjCNEUH19chvJzCIJA0VLbpP3bAVP8ig
- [54] WAIN, Andrew J., Jay D. WADHAWAN a Richard G. COMPTON. Electrochemical Studies of Vitamin K₁ Microdroplets: Electrocatalytic Hydrogen Evolution. *ChemPhysChem* [online]. 2003, **4**(9), 974 - 982 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphc.200300765/full>
- [55] *Příbalový leták Kanavit* [online]. [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.pribalovy-letak.cz/291-kanavit>
- [56] DAVIDSON, Michael P., John F. SOFOS a A. L. BRANEN. *ANTIMICROBIALS IN FOOD* [online]. Third edition. CRC Press, Taylor&Franciss Group, 2005 [cit. 2017-05-16]. ISBN 0-8247-4037-8. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=OU9sBgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [57] GAMBOA-VALERO, Nadia, Pablo D. ASTUDILLO, Miguel A. GONZÁLES-FUENTES, Marco A. LEYVA, Maria de J. ROSALES-HOZ a Felipe J. GONZÁLES. Hydrogen bonding complexes in the quinone-hydroquinone system and the transition to a reversible two-electron transfer mechanism. *Electrochimica Acta* [online]. 2016, **188**, 602 - 610 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468615309841>

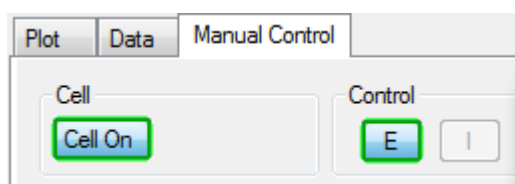
Příloha A: Návod k použití

1. Zkontrolujte připojení přístroje EmStat3 k počítači a zapněte jej.
2. K EmStatu3 připojte konektor KA1C.*. Do distálního konce konektoru vložte Vámi zvolený senzor, který při měření bude ponořen do zkoumaného analytického vzorku.
3. Spusťte program PStTrace4 dvojitým kliknutím na ikonu na ploše.
4. Pod lištou základních operací lze najít záložku Connection. Zde naleznete možnosti výběru vstupních USB portů. Vyberte zařízení, s nímž pracujete a potvrďte jej stisknutím tlačítka Connect.



Obrázek A.1: Záložka Connection a její možnosti

- * Pokud v liště výběru není nabídnut přístroj, s nímž pracujete, pak vypněte program PStTrace4. Odpojte a připojte USB kabel EmStatu3 a opět spusťte program PStTrace4. Nyní by program měl v liště nabídnout přístroj, s nímž pracujete. Dále postupujte dle výše popsaného kroku 4.
5. Vedle lišty Connection jsou tři záložky. Jedná se o okna: Plot, Data a Manual Control. V liště Manual Control naleznete ve vrchní části tlačítko Cell on. Stiskněte jej. Tímto krokem jste propojili měřicí senzor s přístrojem EmStat3. Následně přepněte na záložku Plot.



Obrázek A.2: Zaktivované tlačítko Cell on

6. V levé části pracovního okna je zobrazeno okno se třemi záložkami: Measurement, Info a Peak. V záložce Measurement zvolíte Vámi požadovanou metodu. Zde naleznete veličiny, které dané měření charakterizují. Jedná se o proudový rozsah Current range, počáteční potenciál E begin, vrcholový potenciál E vertex1 a E vertex2, krokový potenciál E step, rychlost skenování Scan rate a počet skenů Number of scans.

Measurement **Info** Peaks

Technique: Cyclic Voltammetry ?

Sample: This method is used to check the noise level

Sensor: Testsensor

Current range

1 nA 10 nA 100 nA 1 μ A 10 μ A 100 μ A 1 mA 10 mA

— Pretreatment settings

E condition: -1,2 V

t condition: 0 s

E deposition: -1,0 V

t deposition: 0 s

— Cyclic Voltammetry settings

t equilibration: 8 s

E begin: -0,5 V

E vertex1: -0,5 V

E vertex2: 0,5 V

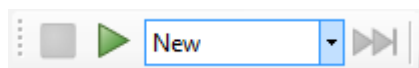
E step: 0,005 V

Scan rate: 1,0 V/s

Number of scans: 5

Obrázek A.3: Parametry měření a zvolená metoda

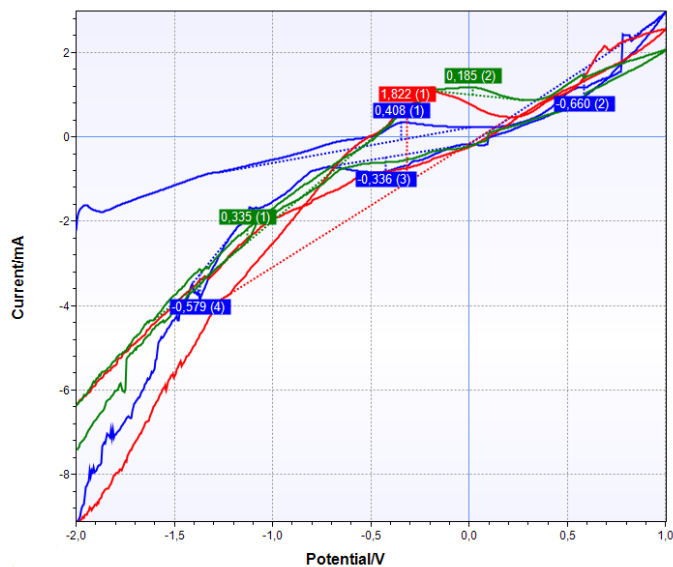
- * EmStat3 je schopen vyhodnotit, jaký elektrický proud bude při měření přítomný. Proto je vhodné zaktivovat veškerá tlačítka v oblasti Current range, aby se předešlo incidentu, kdy měření nebude moci proběhnout kvůli nedostatečnému proudovému rozsahu.
- Vložte senzor do zkoumaného analytického vzorku. Ujistěte se, že skleněná ampulka obsahující vzorek se kvůli váze konektoru nepřevrhne.
 - Pod lištou základních operací naleznete skupinu tlačítek týkajících se samotného měření. Jedná se o tlačítko Stop, Start a výběr z možností, kde zvolíte New. Poté stisknete tlačítko Start a měření započne.



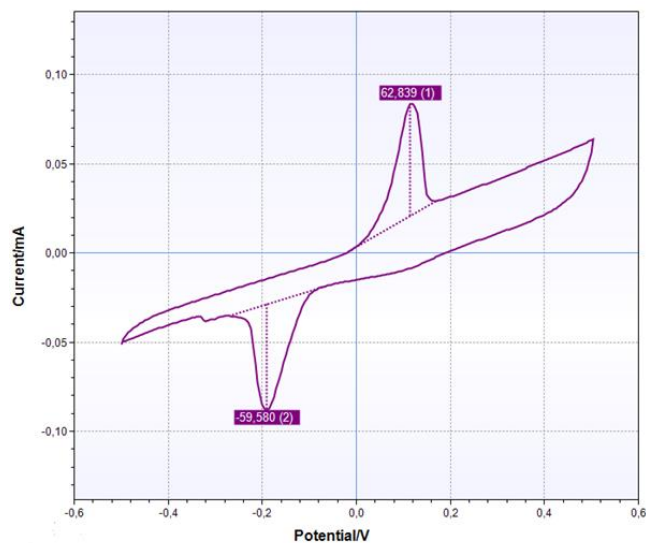
Obrázek A.4: Tlačítka týkající se měření

* Tato tlačítka naleznete i v liště základních operací pod záložkou Measure.


9. Po ukončení samotného měření se v okně Plot zobrazí graf, v němž jsou zaznamenány veškeré proběhlé cykly. Tyto cykly jsou barevně rozlišené a pomocí okna v pravé části vykreslovacího okna Plot může být provedena jejich selekce.
10. Pokud výsledek nebude připomínat křivku charakteristickou pro cyklickou voltometrii, pak zvýšte počet skenů. Je možné, že senzor byl znečištěný a potřebuje se vyčistit.



Obrázek A.5: Výsledná závislost i na E znečištěného senzoru



Obrázek A.6: Křivka charakteristická pro cyklickou voltometrii

11. Tlačítkem Save uložte Vámi nastavené parametry pro měření a grafické zobrazení závislosti elektrického proudu na vloženém napětí exportujte do Excelu pomocí stisknutí tlačítka , které naleznete vedle grafického vyobrazení.

Příloha B: Obsah přiloženého CD

Datový nosič obsahuje následující soubory:

- Klíčová slova v českém a anglickém jazyce
- Abstrakt v českém jazyce
- Abstrakt v anglickém jazyce
- Zadání bakalářské práce
- Kompletní bakalářskou práci