

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Andrej Vikartovský

Testování možností aplikací průtokového duálního amperometrického detektoru

Testing of the possible applications of the flow-through dual amperometric
detector

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Bc. Andrej Vikartovský

Pod'akovanie

Rád by som chcel poďakovať mojej školiteľke RNDr. Hane Dejmkovéj, Ph.D., za každodenné diskusie najmä, ale nielen k téme práce, za strávený čas a podporu pri meraní a písaní práce. Ďalej by som rád poďakoval Mgr. Martinovi Barochovi, Ph.D., za technickú pomoc a duševnú podporu pri každodennej činnosti v labáku. V neposlednom rade by som rád poďakoval svojej rodine za každodennú podporu.

Tato práca bola finančne podporená Grantovou agentúrou České republiky (projekt č. 23-05688S)

Abstrakt

V tejto práci boli preskúvané možnosti využitia elektrochemického duálneho detektora v prietokovom usporiadaní pomocou prietokovej injekčnej analýzy. Duálny detektor bol najprv testovaný pre hexakynoželeznanat draselný pre jeho reverzibilnú oxidáciu na generačnej elektróde a následnej redukcii na detekčnej elektróde. Preskúvané boli možnosti stanovenia nitrolátok, kedy na generačnej elektróde vznikala redukciami nitroskupín hydroxylamín, ktorý bol následne oxidovaný na detekčnej elektróde. Vďaka stanoveniu v oxidačných potenciáloch sa podarilo vyhnúť šumu spôsobeného redukciami kyslíka a bol dosiahnutý limit detekcie pre dinitrofenol $0,47 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Boli overené možnosti využitia duálneho detektora pre detekciu v redukčných potenciáloch minimalizovaním vplyvu kyslíka, jeho redukciami na generačnej elektróde. Ďalej bola sledovaná možnosť využitia duálneho detektora pre stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej na základe reverzibilnej oxidácie dopamínu a ireverzibilnej oxidácie kyseliny askorbovej. Limity detekcie dopamínu pomocou redukcii na detekčnej elektróde boli v prítomnosti kyseliny askorbovej o koncentracii $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $0,31 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. V prítomnosti kyseliny askorbovej o koncentracii $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ klesal redukčný signál dopamínu a zároveň vznikal redukčný signál bez jeho pridania, čo zvýšilo limit detekcie dopamínu na $2,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Súčasťou práce bolo sledovanie elektrochemických vlastností analytov pomocou cyklickej voltametrie.

Kľúčové slová

duálny detektor, ampérometria, cyklická voltametria nitrolátky, dopamín, kyselina askorbová, redukcia kyslíka

Abstract

In this work, the possibilities of using an electrochemical dual detector in a flow arrangement were investigated using flow injection analysis. The dual detector was first tested for potassium ferrocyanide for its reversible oxidation at the generation electrode and subsequent reduction at the detection electrode. The possibilities of determination of nitro substances were explored, when hydroxylamine was formed by the reduction of nitro groups on the generation electrode, which was subsequently oxidized on the detection electrode. Thanks to determination in the oxidation potentials, it was possible to avoid the noise caused by oxygen reduction and the detection limit for dinitrophenol $0.47 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ was achieved. The possibilities of using a dual detector for detection in reduction potentials by minimizing the influence of oxygen, by reducing it on the generation electrode, were verified. Furthermore, the possibility of using a dual detector for the determination of dopamine in the presence of ascorbic acid based on the reversible oxidation of dopamine and the irreversible oxidation of ascorbic acid was investigated. The limits of dopamine detection using reduction on the detection electrode were $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ in the presence of ascorbic acid with a concentration of $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. In the presence of ascorbic acid with a concentration of $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, the reduction signal of dopamine decreased, and at the same time, a reduction signal was formed without its addition, which increased the detection limit of dopamine to $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Part of the work was monitoring the electrochemical properties of the analytes using cyclic voltammetry.

Key words

dual detector, amperometry, cyclic voltametry, nitrocompounds, dopamine, ascorbic acid,
Electrochemical oxygen reduction

Zoznam skratiek

AA – kyselina askorbová

BR – Brittonov-Robinsonov tlmivý roztok

CF – uhlíková plst'

CV – cyklická voltametria

DA – dopamín

DPV – diferenčná pulzná voltametria

E – elektrický potenciál

FIA – prietoková injekčná analýza

GCE – elektróda zo sklovitého uhlíku

I – elektrický prúd

LOD – limit detekcie

LOQ – limit kvantifikácie

LSV – lineárna voltametria

Q – elektrický náboj

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1. Ciele práce.....	9
2. Teoretická časť.....	10
2.1. Duálne elektrochemické detektory.....	10
2.2. Elektrochemické stanovenie nitroaromatických látok.....	11
2.2.1. Nitroaromatické látky	11
2.2.2 Elektrochemické vlastnosti nitrolátok	13
2.2.3 Elektrochemické stanovenie nitroaromatických látok	14
2.2.4 Stanovenie nitrolátok pomocou duálneho elektrochemického detektora.....	15
2.3. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej	16
2.3.1 Dopamín a jeho elektrochemické vlastnosti.....	16
2.3.2. Kyselina askorbová a jej elektrochemické vlastnosti	18
2.3.3. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej	19
3. Experimentálna časť.....	20
3.1. Použité chemikálie a príprava roztokov.....	20
3.1.1. Príprava základných elektrolytov	20
3.1.2. Príprava roztokov analytov	20
3.2. Meranie a použité vybavenie	21
3.2.1. Konštrukcia duálneho detektora a úprava jeho častí pred meraním	21
3.2.2. Cyklická voltametria.....	22
3.2.3. Prietoková injekčná analýza.....	22
3.2.4. Ďalšie použité vybavenie	22
3.3. Štatistické spracovanie výsledkov	23
4. Výsledky a diskusia	24
4.1. Overenie funkčnosti duálneho detektora v prietoku.....	24
4.1.1. Cyklické voltamogramy hexakynožeľeznatanu draselného	24
4.1.2 Optimalizácia potenciálov elektród v prietokovom usporiadaní	25
4.2. Stanovenie dinitrofenolu	27
4.2.1 Cyklické voltamogramy nitrobenzénu a dinitrofenolu	27
4.2.2 Hydrodynamické voltamogramy dinitrofenolu	30
4.2.3 Kalibračná závislosť pre dinitrofenol.....	33
4.3. Využitie duálneho detektora na redukciu kyslíka	36
4.4. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej	38
4.4.1 Cyklické voltamogramy dopamínu a kyseliny askorbovej	38
4.4.2 Hydrodynamické voltamogramy dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej.....	40

4.4.3. Kalibračná závislosť dopamínu v rôznych koncentráciách kyseliny askorbovej.....	42
5. Záver	46
6. Zoznam použitej literatúry.....	48

1. ÚVOD

1.1. Ciele práce

Hlavným cieľom práce je overiť funkčnosť elektrochemického duálneho detektora v prietokovom usporiadaní. V rámci toho je zvolené sledovanie možností použitia duálneho detektora jednak pri stanovení nitroaromatických látok elektrochemickou detekciou medziproduktov vzniknutých na generačnej elektróde a jednak pri aplikácii detektora pri selektívnom stanovení dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej. Ako tretia časť je skúmané, či je možnosť využiť generačnú elektródu na elektrochemickú redukciu kyslíka a minimalizovať vplyv kyslíka pri redukcii na detekčnej elektróde. Pre overenie elektrochemického chovania analytov na elektróde zo sklovitého uhlíku a elektródy z uhlíkovej plsti je použitá cyklická voltametria.

2. Teoretická časť

2.1. Duálne elektrochemické detektory

Duálny elektrochemický detektor je ampérometrický detektor s dvoma pracovnými elektródami buď v sériovom, alebo paralelnom zapojení pričom na elektródy je vložený nezávislý elektrický potenciál. V prípade sériového zapojenia pracovných elektród je elektróda, ktorá je proti prúdu a teda dostáva sa ako prvá do styku s analytom nazývaná „generačná elektróda“ a elektróda, ktorá je po prúde nazývaná „detekčná elektróda“. Na generačnej elektróde dochádza k elektrochemickej oxidácii, alebo redukcii analytu za vzniku medziproduktov, ktoré sú ďalej elektrochemicky oxidované, alebo redukované na detekčnej elektróde. Elektrochemická reakcia medziproduktov na detekčnej elektróde môže viesť k použitiu vhodnejších potenciálov oproti generačnej elektróde, čím umožňuje selektívnejšie stanovenie, alebo nižší prúd pozadia[1].

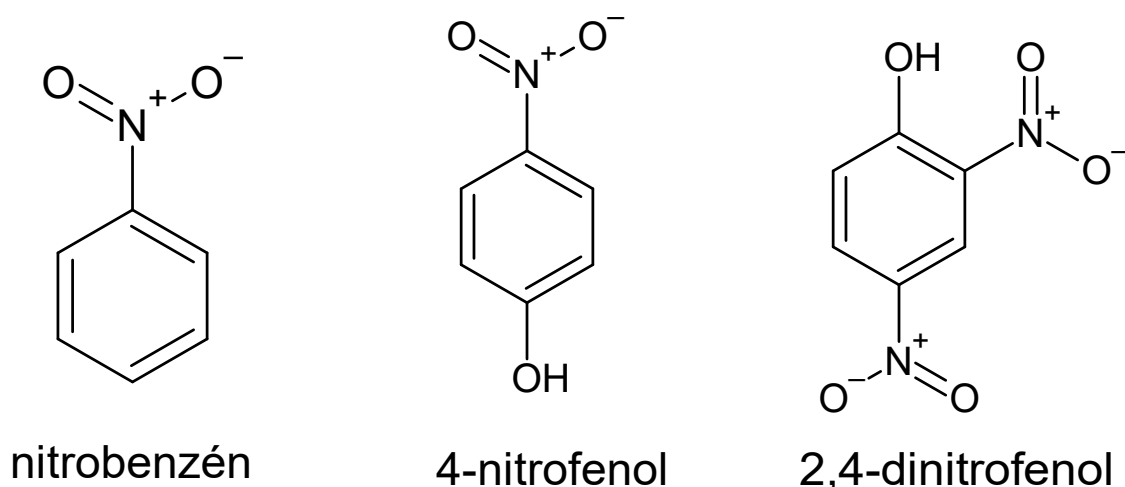
Duálny elektrochemický detektor má uplatnenie v prípade stanovenia látok, ktoré podliehajú elektrochemickej redukcii pri potenciáloch, kedy sa elektrochemicky redukuje kyslík. Príkladom sú nitrolátky [1-4], alebo azofarbiva [5]. Na generačnej elektróde sa analyt redukuje a následne produkt redukcie podlieha na detekčnej elektróde redukcii pri potenciáli bližšom 0 [2-3], alebo oxidácii [1-4] pri potenciáli v ktorom sa kyslík neredukuje.

Ďalšie využitie duálneho elektrochemického detektoru v separačných technikách ako HPLC [6,7], kedy je možné selektívne stanoviť analyty s veľmi blízkym retenčným časom, kde dostávame dva chromatogramy, jeden pre generačnú a druhý pre detekčnú elektródu. Príkladom je stanovenie aminokyselín, ktoré boli derivatizované a na generačnej elektróde sa oxidujú, ale na detekčnej elektróde nastáva redukcia sekundárnych aminokyselín, vďaka čomu dostávame chromatogram generačnej elektródy pre všetky aminokyseliny a druhý chromatogram detekčnej elektródy, na ktorom máme selektívnu redukcii sekundárnych aminokyselín [7]. Podobným príkladom je stanovenie katecholamínov v prítomnosti kyseliny askorbovej, kedy na generačnej elektróde získavame chromatogram spôsobený oxidáciou katecholamínov a kyseliny askorbovej a následne na chromatograme detekčnej elektródy, ktorá je nastavená v redukčnom potenciáli, kde nastáva redukcia produktov vzniknutých oxidáciou katecholamínov, ale produkty oxidácie kyseliny askorbovej nevznikajú a na chromatograme sa nenachádzajú [8].

2.2. Elektrochemické stanovenie nitroaromatických látok

2.2.1. Nitroaromatické látky

Nitroaromáty sú rozsiahlo využívané chemikálie so širokou aplikáciou ako napríklad vo farbivách, výbušnínach, herbicídoch, pesticídoch, plynárenskom priemysle, odevnom priemysle až po farmaceutický priemysel. Vzhľadom na ich početnosť a zároveň vysokú toxicitu je potrebné kontrolovať množstvo odpadných nitroaromatických látok nakoľko pri nesprávnom čistení vody už malá koncentrácia spôsobuje znečistenie životného prostredia a môže ohroziť zdravie ľudí [9-20]. Štruktúrne vzorce vybraných nitroaromatických látok sú zobrazené na obrázku 1.



Obrázok 1. Štruktúrne vzorce nitrobenzénu, 4-nitrofenolu, 2,4-dinitrofenolu.

Jednou z najčastejšie využívaných nitroaromatických látok je nitrobenzén. Je to látka kvapalného skupenstva so sladkou mandľovou vôňou. Jedná sa o jednu z najnebezpečnejších organických látok [9-14]. Človeku spôsobuje methemoglobinémiu (vyššie množstvo oxidovaného hemoglobínu) [9], poškodenie pečene a anémiu [10,14], jedná sa o karcinogénnu látku [11].

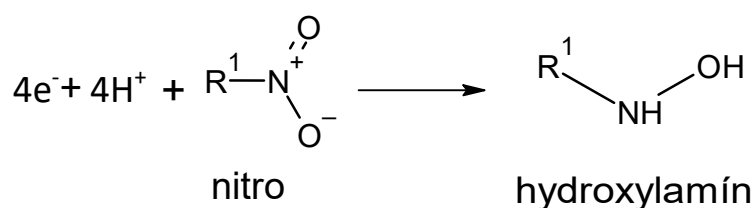
Ďalšou často sa vyskytujúcou skupinou sú nitrofenoly, z ktorých je ako najtoxickejší považovaný 4-nitrofenol, u ktorého sú preukázané karcinogénne a teratogénne účinky [15,16]. Jeho nebezpečenstvo spočíva v pomerne dobrej rozpustnosti vo vode oproti iným nitroaromatickým látkam [15].

Nebezpečenstvo nitroaromatických látok spôsobuje aj aktívne užívanie ľuďmi. Príkladom je dinitrofenol, ktorý bol používaný ako prostriedok na chudnutie, kde dinitrofenol prerušuje oxidačnú fosforyláciu v dýchacom reťazci pri tvorbe ATP, čím zrýchľuje metabolizmus a spaľovanie tukov. Vedľajším účinkom je však šedý zákal a zvýšenie telesnej teploty, ktorá

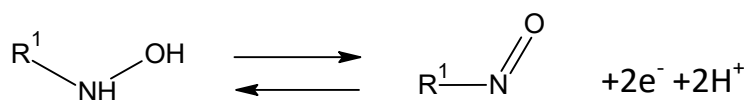
v niekoľkých prípadoch viedla k extrémnemu prehriatiu organizmu a následne k smrti, preto bol tento prostriedok zakázaný pre užívanie u ľudí [21,22].

2.2.2 Elektrochemické vlastnosti nitrolátok

Nitroskupina sa elektrochemicky redukuje na všetkých základných elektródach 4 elektrónovým a 4 protónovým prenosom na hydroxylamín pričom táto reakcia je ireverzibilná a na cyklických voltamogramoch sa objavuje v záporných potenciáloch jedna katodická vlna. Hydroxylamín sa však reverzibilne oxiduje 2 elektrónovým a 2 protónovým prenosom na nitrozoskupinu [3,11,15,16,19]. V prípade látok s viacerými naviazanými nitroskupinami ako je dinitrofenol, je možné pozorovať 2 katodické vlny a celkovo 8 elektrónový a 8 protónový prenos [19]. Elektrochemické reakcie nitroskupiny sú zobrazené na obrázku 2. a 3.

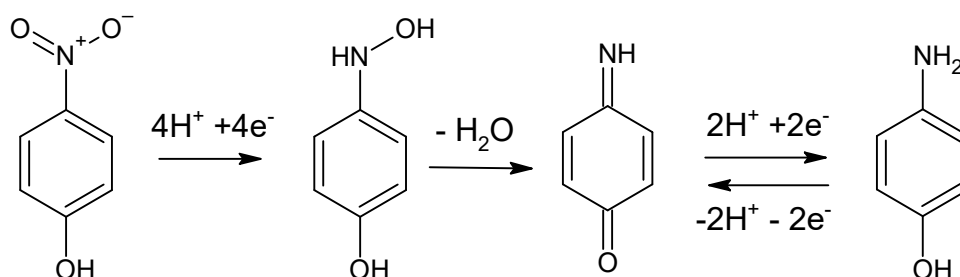


Obrázok 2. Oxidácia nitroskupiny na hydroxylamín.



Obrázok 3. Reverzibilná reakcia hydroxylamínu na nitrózo.

V prípade, kedy je v organickej zlúčenine skupina, ktorá môže odstúpiť vodíkový kation môže po redukcii nitroskupiny na hydroxylamín dôjsť ku samovoľnému odštiepeniu vody a môže pokračovať ďalšia elektrochemická redukcia [1,4]. Príkladom takejto reakcie je redukcia 4-nitrofenolu, ktorá je zobrazená na obrázku 4. [1].



Obrázok 4. Mechanizmus redukcie 4-nitrofenolu [1].

2.2.3 Elektrochemické stanovenie nitroaromatických látok

Z dôvodu potreby monitorovania nitroaromatických látok kvôli ich nebezpečnosti a častosti výskytu boli vyvinuté citlivé techniky na princípe separácie kvapalinovou chromatografiou a následnou detekciou ako napríklad hmotnostná spektrometria, UV- detekcia, fluorescenčná detekcia. Ako rýchle, finančne výhodné analýzy sa ukázali elektrochemické techniky. [13]

Elektrochemické techniky využívajú elektrochemickú redukciu nitroskupiny. Najčastejšie používanými technikami sú diferenčná pulzná voltametria [11,12,15,17,18,19] a lineárna voltametria [9,10]. Najčastejšie používanými elektródami sú rôzne modifikované sklovité uhliky, ktoré majú oproti bežnému sklovitému uhlíku vyššie signály a teda nižšie limity detekcie. Analýzy najčastejšie prebiehajú v neutrálnom, alebo mierne kyslom prostredí. Vybrané elektrochemické stanovenia nitroaromatických látok sú zobrazené v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Vybrané elektrochemické stanovenia nitroaromatických látok.

Technika	Prostredie a pH	Typ elektródy a potenciál pri redukcii	Analyt, LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Zdroj
LSV	fosfátový tlmivý roztok, 7,2	modifikovaný GCE -0,65 V	nitrobenzén 2,2	[9]
LSV	ftalátový tlmivý roztok, 5,2	visiaca kvapková ortuťová elektróda -0,8 V	nitrobenzén 5	[10]
DPV	fosfátový tlmivý roztok, 7,0	modifikovaný GCE -0,5 V	nitrobenzén 0,14	[11]
DPV	fosfátový tlmivý roztok, 7,02	modifikovaný GCE -0,752 V	nitrobenzén 1,68	[12]
DPV	fosfátový tlmivý roztok, 7,0	Sietotlačová elektróda potiahnutá grafitickým poréznym nitridom uhlíka -0,75 V	nitrofenol 0,000075	[15]
CV	acetátový tlmivý roztok 4,6	modifikovaný GCE -0,65 V	nitrofenol 0,062	[16]
DPV	fosfátový tlmivý roztok 7,0	modifikovaná zlatá elektróda -0,6 V	nitrofenol 0,1	[17]
DPV	acetátový tlmivý roztok 5,8	modifikovaný GCE	dinitrofenol 0,24	[18]
DPV	acetátový tlmivý roztok 3,0	modifikovaný GCE	dinitrofenol 0,4	[19]

2.2.4 Stanovenie nitrolátok pomocou duálneho elektrochemického detektora

Duálne detektory využívajú generačnú elektródu v redukčnom móde, kde sa v záporných potenciáloch redukuje nitroskupina na hydroxylamín a následne sa na detekčnej elektróde oxiduje hydroxylamín vzniknutý na generačnej elektróde. Vďaka tomuto usporiadaniu je možné elektrochemicky stanovovať nitrolátky v oxidačných potenciáloch a vyhnúť sa nežiadúcej redukcii kyslíka v záporných potenciáloch. [2,3]. Duálny detektor môže pracovať aj v redukčnom móde pri detekčnej elektróde. Ide o prípady kedy sa po redukcii nitroskupiny na hydroxylamín samovoľne odštiepi voda a látka sa ďalej na detekčnej elektróde redukuje (obrázok 4). Redukčný-redukčný mód je využitý napríklad pri stanovení nitrofenolu [1], alebo liečiv ako je nitrazepam, flunitrazepam [4]. V oboch prípadoch však môžeme pozorovať, že detekčná elektróda pracuje pri potenciáli bližšom nule, čím sa vyhyba redukcii kyslíka. Elektrochemickej detekcii predchádza kvapalinová chromatografia vďaka ktorej je možné selektívne stanoviť dané analyty. Duálnym detektorom je možné stanoviť priamo nitrolátky, ale aj látok derivatizovanou nitroskupinou, vďaka ktorej je látka elektrochemicky aktívna. Príkladom sú aminokyseliny derivatizované Sangerovým činidlom, vďaka ktorému obsahujú nitroskupiny [2,3]. Prehľad vybraných stanovení nitrolátok pomocou duálneho detektora je zobrazený v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Prehľad stanovení nitrolátok pomocou elektrochemického duálneho detektora.

Analyt	Generačná elektróda, potenciál elektródy oproti AgCl	Detekčná elektróda, potenciál elektródy oproti AgCl	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Prostredie, pH	Zdroj
3-nitrotyrozín	zlatá amalgánová -0,7 V redukcia	sklovitý uhlík 0,6 V oxidácia	0,0001	acetátový tlmivý roztok 4,7	[2]
derivatizované aminokyseliny Sangerovým činidlom prolín valín isoleucin	sklovitý uhlík -1,2 V redukcia	sklovitý uhlík 0,35 V oxidácia	(0,001-0,01)	citrátový tlmivý roztok, metanol 4,5	[3]
nitrofenol	sklovitý uhlík -1,0 V redukcia	sklovitý uhlík -0,1 V redukcia	0,15	fosfátový tlmivý roztok, metanol 6,0	[1]
nitrazepam flunitrazepam	uhlíkové vlákno -2,4 V redukcia	sklovitý uhlík -0,25 V redukcia	0,35 0,32	acetátový tlmivý roztok, acetonitril 4,1	[4]

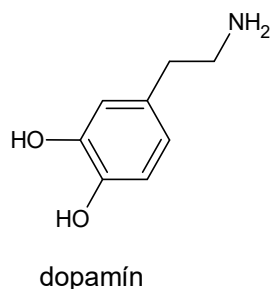
2.3. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej

2.3.1 Dopamín a jeho elektrochemické vlastnosti

Sumárny vzorec: $C_8H_{11}NO_2$

Molekulová hmotnosť: $153,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

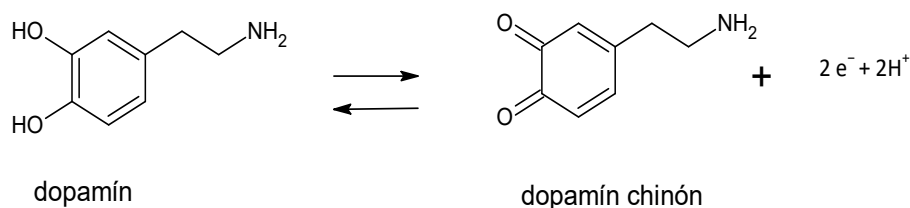
Dopamín (DA, obrázok 5), je neurotransmitter a hormón, ktorý sa podieľa na regulácii metabolizmu, centrálného nervového systému a kardiovaskulárneho systému. Jeho nedostatok môže spôsobiť onemocnenia ako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, alebo schizofrénia [25,26,32].



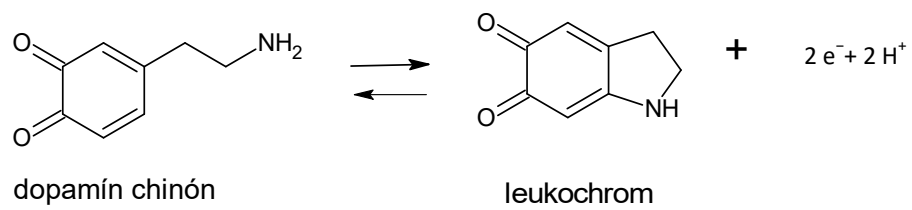
Obrázok 5. Štruktúrny vzorec dopamínu

Dopamín sa oxiduje 2 elektrónovým prenosom na dopamín chinón, ktorý sa môže ďalej oxidovať 2 elektrónovým prenosom na leukochrom. Elektrochemické reakcie oxidácie dopamínu sú zobrazené na obrázku 6. a 7. Reakcie sú reverzibilné a z cyklických voltamogramov vyplýva možnosť elektrochemicky redukovať produkty, ktoré vznikli elektrochemickou oxidáciou dopamínu [23,24,25].

Dopamín je v zásaditom prostredí nestabilný, pretože dochádza k samovoľnej oxidácii dopamínu na tmavohnedú látku polydopamín. Túto oxidáciu je možné pozorovať približne od pH 6 a so zvyšujúcim sa pH rýchlosť tejto reakcie narastá [23].



Obrázok 6. Elektrochemická reakcia dopamínu na dopamín chinón [23,24].



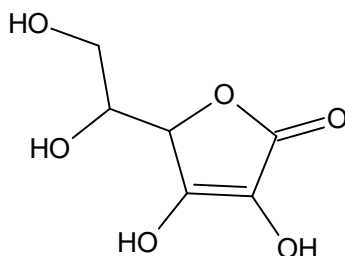
Obrázok 7. Elektrochemická reakcia dopamín chinónu na leukochrom [24,25].

2.3.2. Kyselina askorbová a jej elektrochemické vlastnosti

Sumárny vzorec: $C_6H_8O_6$

Molekulová hmotnosť: $176,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

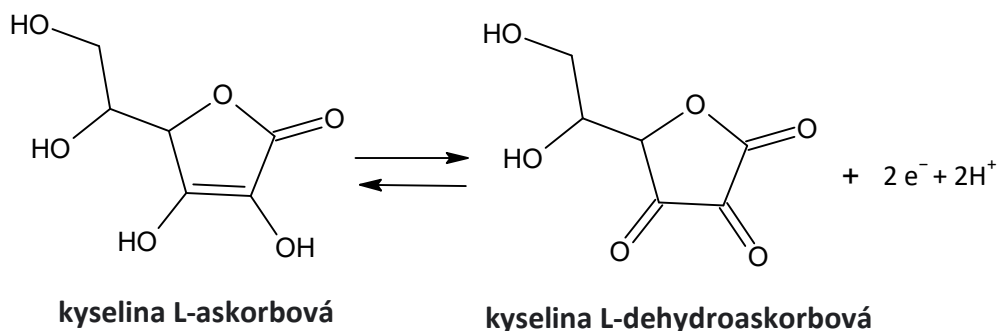
Kyselina L-askorbová (vitamín C, obrázok 8.) je vo vode rozpustný vitamín, ktorý sa ľahko oxiduje na kyselinu L-dehydroaskorbovú vďaka čomu má silné redukčné vlastnosti a je antioxidant. Ako antioxidant sa využíva aj v potravinárskom priemysle, kde bráni nežiaducim zmenám farby alebo chuti. V ľudskom tele je potrebný pri syntéze kolagénu, alebo na imunitnej odpovedi. Rovnako sa podieľa pri hojení rán a vstrebávaní železa. Človek si ho ako jeden z mála živočíchov nevie syntetizovať a musí ho prijať v potrave [27,28,29]. Jeho mierny nedostatok môže viesť k únave alebo depresiám. Vysoký deficit vitamínu C vedie k chorobe skorbut čo spôsobuje krvácanie ďasien, vypadávanie zubov alebo zníženú tvorbu červených krviniek [29].



kyselina L-askorbová

Obrázok 8. Štruktúrny vzorec kyseliny L-askorbovej.

Kyselina askorbová je elektrochemicky aktívna látka, ktorá sa oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovú (obrázok 9). Samotná reakcia je reverzibilná, ale kyselina dehydroaskorbová podlieha rýchlej ireverzibilnej solvatačnej reakcii za vzniku kyseliny 2,3-diketogulonovej. Celkový proces je teda ireverzibilný a v prípade cyklickej voltametrie neposkytuje redukčný signál [27,30].



Obrázok 9. Oxidácia kyseliny L-askorbovej na kyselinu L-dehydroaskorbovú [27,30].

2.3.3. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej

Koncentrácia dopamínu v biologických vzorkách je dôležitý parameter pri diagnostike ochorení [25,27,31]. Problém stanovenia dopamínu spôsobujú elektrochemicky aktívne látky vyskytujúce sa v rovnakých biologických vzorkách ako kyselina askorbová, alebo kyselina močová. Tieto látky majú podobný oxidačný potenciál a nachádzajú sa vo vzorkách v mnohonásobne vyššej koncentrácii [31-38].

Prehľad elektrochemických stanovení dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej je zobrazený v tabuľke 3. Pri elektrochemickom stanovení DA v prítomnosti AA je najčastejšou použitou technikou DPV [32-37]. Pri použití tejto techniky však nie je možné na bežnej elektróde ako je sklovitý uhlík selektívne stanoviť DA, pretože DA je skrytý v oxidačnej vlne AA a pre jeho stanovenie je nutné modifikovať povrch elektródy, vďaka ktorému sú oxidačné potenciály dostatočne rozdielne [32-38].

Tabuľka 3. Prehľad vybraných elektrochemických stanovení DA v prítomnosti AA.

Technika	Typ elektródy	pH	Koncentrácia		Prostredie	Zdroj
			AA mM	LOD μM		
DPV	modifikovaný sklovitý uhlík	7,0	1,0	0,25	fosfátový tlmivý roztok	[32]
DPV	modifikovaný sklovitý uhlík	7,0	0,5	0,2	fyziológický roztok	[33]
DPV	modifikovaná uhlíková pasta	7,0	5,0	0,7	fosfátový tlmivý roztok	[34]
DPV	modifikovaný sklovitý uhlík	7,4	1,0	2,6	fyziológický roztok s fosfátovým tlmivým roztokom	[35]
DPV	modifikovaná grafitová elektróda	5,0	0,4	0,1	fosfátový tlmivý roztok	[36]
DPV	modifikovaný sklovitý uhlík	7,0	8,0	0,29	fosfátový tlmivý roztok	[37]
LSV	modifikovaný sklovitý uhlík	3,5	10	5,4	fosfátový tlmivý roztok	[38]

3. Experimentálna časť

3.1. Použité chemikálie a príprava roztokov

3.1.1. Príprava základných elektrolytov

Brittonov-Robinsonov tlmivý roztok bol pripravený z dvoch zložiek, kyslá zložka tlmivého roztoku bola pripravená odpipetovaním potrebného množstva kyseliny fosforečnej (85%, p.a., Penta, Česká republika), kyseliny octovej (99%, p.a., Penta, Česká republika) a odvážením kyseliny boritej (Lachema, Česká republika) a následným doplnením destilovanou vodou na požadovanú koncentráciu $0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ každej kyseliny. Kyslá zložka bola titrovaná $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztokom hydroxidu sodného (Penta, Česká republika) pri použití pH metra na požadované pH.

Ako ďalší roztok základného elektrolytu bol pripravený $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztok KCl, ktorý vznikol rozpustením pevného KCl (p.a., Penta, Česká republika) v destilovanej vode.

3.1.2. Príprava roztokov analytov

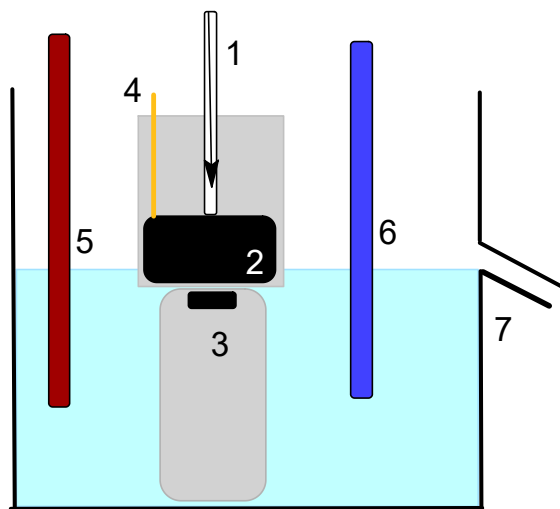
Roztoky analytov dopamínu a kyseliny askorbovej boli pripravené vždy v deň merania série a roztoky ostatných analytov boli pripravené v týždeň merania série navážením na analytických váhach a rozpustením navážok v roztoku základného elektrolytu na požadovanú koncentráciu, ktorá bola pri použití FIA $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pri meraní cyklických voltamogramov $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Použitými chemikáliami boli: hexakvanoželeznatan draselný (Lachema, Česká republika), nitrobenzén, dinitrofenol (obe p.a., Fluka), dopamín hydrochlorid (Sigma-Aldrich) a kyselina askorbová (Sigma-Aldrich).

3.2. Meranie a použité vybavenie

3.2.1. Konštrukcia duálneho detektora a úprava jeho častí pred meraním

Do prepadovej nádoby so základným elektrolytom bola zo spodnej časti nádoby vopred namontovaná detekčná elektróda zo sklovitého uhlíka s priemerom 3 mm (Metrohm). Čo najbližšie k povrchu sklovitého uhlíka bola z vrchnej strany priložená kapsula s generačnou elektródou z uhlíkovej plsti (Karbotechnik, ČR) [39]. Do kapsuly bola z vrchnej strany pripojená kapilára tak, aby nosný elektrolyt tiekol smerom ku uhlíkovej plsti a následne na detekčnú elektródu. Referenčná argentochloridová (3M KCl) elektróda (Monokrystaly Turnov, ČR) a pomocná platínová elektróda (Monokrystaly Turnov, ČR) boli vložené do zvyšného objemu prepadovej nádoby. Schéma zapojenia elektród je zobrazená na obrázku 10.

Pred každou sériou meraní bola vložená nová uhlíková plst', ktorá bola najprv namočená do metanolu. Elektróda zo sklovitého uhlíka bola pred meraniami leštená suspenziou oxidu hlinitého po dobu 10 minút.



Obrázok 10. Schéma duálneho detektora: 1. kapilára 2. uhlíková plst' 3. sklovitý uhlík 4. platínový drôt 5. pomocná elektróda 6. referenčná elektróda 7. prepadová nádobka

3.2.2. Cyklická voltametria

Cyklické voltamogramy boli prevedené na zostave Autolab PGSTAT204 (Metroohm Autolab, Holandsko) riadenej softwarom NOVA (2.1) v trojelektrodovom usporiadaní s rovnakými elektródami ako v prietokovom meraní, zvlášť pre sklovitý uhlík a zvlášť pre uhlíkovú plst'. Pri meraní CV sklovitého uhlíku nebola do prepadovej nádoby vložená generačná elektróda. Pri meraní CV pre elektródu z uhlíkovej plsti bola uhlíková plst' vybratá z kapsule a vodivo spojená zavesením na platinový drôt.

Pred meraniami bol 10 minút roztok základného elektrolytu prebublávaný dusíkom. Vždy bola najprv zmeraná CV základného elektrolytu a následne s pridaním analytu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Každý cyklický voltamogram obsahoval 5 cyklov.

3.2.3. Prietoková injekčná analýza

Pri využití duálneho detektora v prietoku bolo usporiadanie elektród v prepadovej nádobke podľa obrázka 10. Tok kvapaliny cez kapiláru do duálneho detektora bola zaistená pomocou zostavy (Agilent InfinityLab LC Series 1260 Infinity II Quaternary System). Zostava bola zložená z pumpy (Quaternary Pump G7111B), dávkovača (Vialsampler G7129A) a termostatu (Multicolumn Thermostat G7116A). V priebehu merania bol prietok nastavený na rýchlosť $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a objem dávkovania bol $20 \mu\text{l}$.

3.2.4. Ďalšie použité vybavenie

pH meter (Jenway, UK) s kombinovanou sklenenou elektródou

Magnetická miešačka (Microstirrer Magnetic Stirrer, VELP Scientifica, Europe)

Analytické váhy Sartorius 2004 MP (Sartalex, Česká republika)

Ultrazvuková čistička: PS 02000A (Powersonic, USA)

3.3. Štatistické spracovanie výsledkov

Stredná hodnota bola vypočítaná ako medián nameraných hodnôt. Smerodajná odchýlka bola vypočítaná zo súčinu Deanovho-Dixonovho koeficientu pre smerodajnú odchýlku pre daný počet meraní a rozpätia výsledkov. Interval spoľahlivosti $L_{1,2}$ bol vypočítaný ako súčin rozpätia výsledkov a Deanovho-Dixonovho koeficientu na hladine významnosti 0,05 pri danom počte meraní.

Hodnoty kalibračnej závislosti boli preložené trendovou spojnicou, ktorej parametre boli stanovené v programe Origin metódou najmenších štvorcov. Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) bol vypočítaný podľa vzťahov:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s}{m},$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s}{m},$$

Kde s je smerodajná odchýlka vypočítaná z výsledkov najmenej meranej koncentrácie $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a m je hodnota smernice kalibračnej závislosti.

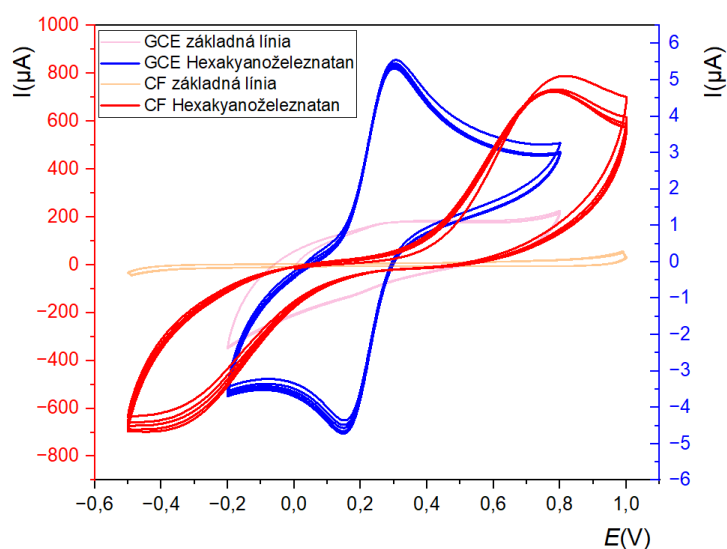
4. Výsledky a diskusia

4.1. Overenie funkčnosti duálneho detektora v prietoku

Pre overenie funkčnosti duálneho detektora v prietoku bol vybraný analyt hexakynoželesnatan draselný, ktorý sa na generačnej elektróde z uhlíkovej plsti oxidoval na hexakynoželesitan draselný a následne redukoval na detekčnej elektróde zo sklovitého uhlíku späť na hexakynoželesnatan draselný. Pred použitím duálneho detektora v prietokovej injekčnej analýze bolo pomocou cyklickej voltametrie overené elektrochemické správanie analytu na oboch elektródach.

4.1.1. Cyklické voltamogramy hexakynoželesnatanu draselného

Cyklická voltametria bola prevedená v $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku KCl pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ s piatimi opakovaniami. Cyklický voltamogram bol prevedený najprv len v prítomnosti elektrolytu a následne aj s pridaním analytu. V prípade cyklického voltamogramu elektródy zo sklovitého uhlíku sa maximum oxidačnej vlny nachádzalo pri $0,3 \text{ V}$ a redukčné minimum pri $0,15 \text{ V}$. Pre elektródu z uhlíkovej plsti polohy vln boli oproti sklovitému uhlíku posunuté do oboch strán, kde maximum oxidačnej vlny sa nachádzalo pri potenciáli $0,8 \text{ V}$ a minimum redukčnej vlny pri $-0,4 \text{ V}$. Cyklické voltamogramy hexakynoželesnatanu draselného pre obe elektródy sú zobrazené na obrázku 11.



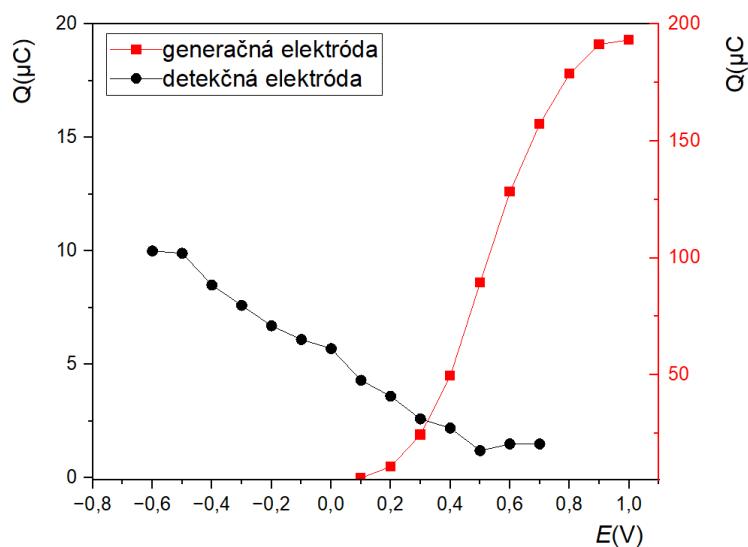
Obrázok 11. Cyklický voltamogram hexakynoželesnatanu draselného ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) v roztoku KCl pri použití GCE a CF pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridanía hexakynoželesnatanu draselného.

4.1.2 Optimalizácia potenciálov elektród v prietokovom usporiadaní

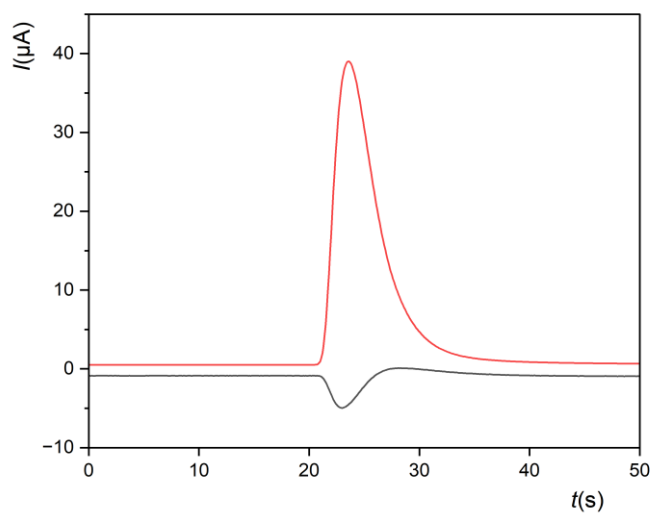
S cieľom nájdenia optimálnych elektrických potenciálov pre generačnú a detekčnú elektródu boli premerané hydrodynamické voltamogramy. V prvom rade bol premeraný hydrodynamický voltamogram generačnej elektródy a následne detekčnej elektródy pri optimálnych podmienkach generačnej elektródy. So zvyšujúcim sa potenciálom sa plochy píkov postupne zvyšovali, kým nedosiahli pri 0,9-1,0 V hodnotu maximálnej plochy 193 μC , čo odpovedá náboju úplnej konverzie pri reakcii Fe^{2+} na Fe^{3+} . Maximum bolo mierne posunuté do vyšších potenciálov oproti zmeraným CV a ako najvhodnejší potenciál pre generačnú elektródu bol vybraný 0,9 V. Hydrodynamické voltamogramy pre generačnú a detekčnú elektródu sú zobrazené na obrázku 12.

Nárast plochy píku pri hydrodynamickom voltamograme pre detekčnú elektródu bol oproti nameraným CV značne posunutý do nižších potenciálov, kedy maximálna odozva nastala až pri $-0,6$ V a zároveň bol nárast prúdu pozvoľný. Efektivita elektrochemickej redukcie na sklovitom uhlíku z Fe^{3+} na Fe^{2+} dosahovala okolo 5 %. Okrem všeobecne nízkeho stupňa konverzie pri wall-jet usporiadania, môže byť nízka efektivita elektrochemickej redukcie spôsobená nedokonalým tvarom a spojením generačnej a detekčnej elektródy. Záznam merania pri optimálnych podmienkach je zobrazený na obrázku 13.

Prítomnosť redukčného píku na detekčnej elektróde, ktorý vznikol redukciou vzniknutého medziproduktu na generačnej elektróde, ukazuje funkčnosť duálneho detektora a možnosť jeho využitia pri stanovení ďalších analytov v prietokových metódach.



Obrázok 12. Hydrodynamický voltamogram hexakynoželeznanu draselného ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pre generačnú CF a detekčnú GCE s mobilnou fázou roztoku KCl pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obrázok 13. Záznam merania pri použití generačnej elektródy z CF pri potenciáli 0,9 V a detekčnej elektródy GCE $-0,6$ V pre hexakynoželeznan draselný ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s mobilnou fázou KCl pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.2. Stanovenie dinitrofenolu

V rámci stanovenia dinitrofenolu pomocou duálneho detektora boli ako prvé zmerané cyklické voltamogramy nitrobenzénu a dinitrofenolu za účelom objasnenia elektrochemického správania na elektróde z uhlíkovej plsti a elektródy zo sklovitého uhlíku. Boli prevedené hydrodynamické voltamogramy za účelom nájdenia optimálnych podmienok potenciálov oboch elektród a pH mobilnej fázy. Následne bola premeraná kalibračná závislosť plochy píku od koncentrácie dinitrofenolu a spočítané parametre kalibračnej závislosti.

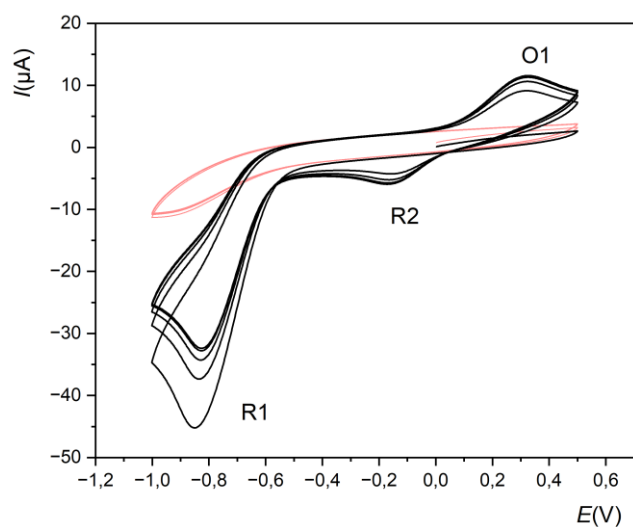
4.2.1 Cyklické voltamogramy nitrobenzénu a dinitrofenolu

Cyklické voltamogramy boli namerané s rovnakými podmienkami ako v prípade hexakynoželeznatanu draselného, ako základný elektrolyt bol však použitý Brittonov-Robinsonov tlmivý roztok o pH 5,0. Pred každým meraním bol 5 minút prebublavaný dusíkom za účelom odstránenia rozpusteného kyslíka a teda odstránenia redukčnej vlny spôsobenej redukciou kyslíka.

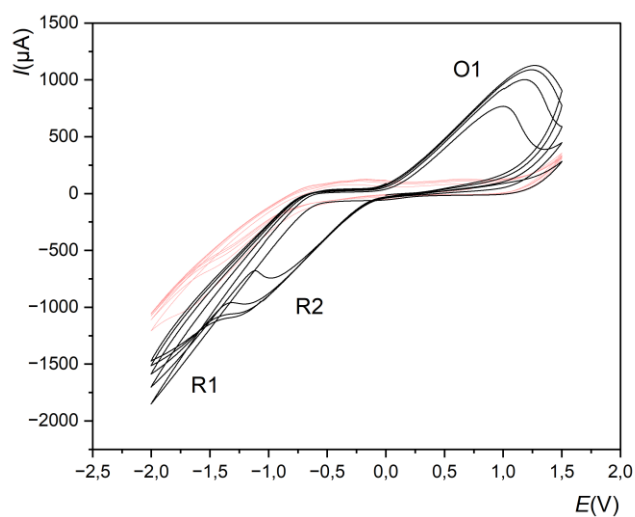
Ako prvý bol zmeraný cyklický voltamogram nitrobenzénu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pri meraní CV na sklovitom uhlíku (obrázok 14.) pozorujeme redukčnú vlnu (R1) v oblasti okolo $-0,9 \text{ V}$, ktorá je spôsobená redukciou nitroskupiny na hydroxylamín. Následne môžeme pozorovať oxidačnú vlnu (O1) v okolí potenciálu $0,3 \text{ V}$ spôsobenú oxidáciou hydroxylamínu na nitrózoskupinu, ktorá je následne reverzibilne redukovaná (R2) späť na hydroxylamín. Redukcia sa objavuje v okolí potenciálu $-0,2 \text{ V}$. V prípade cyklického voltamogramu pre uhlíkovú plst' (obrázok 15.) nie je možné pozorovať redukčnú vlnu nitroskupiny na hydroxylamín, ale len pokles prúdu oproti pozadiu základného elektrolytu. V prípade reverzibilnej reakcie hydroxylamínu na nitrózoskupinu je redukčná a oxidačná vlna posunutá výrazne od seba ($-1,1$ a $1,2 \text{ V}$).

Meranie cyklických voltamogramov dinitrofenolu bolo prevedené rovnako ako v prípade s nitrobenzénu. V prípade cyklického voltamogramu meranom elektródou zo sklovitého uhlíku (obrázok 16) pozorujeme dve redukčné vlny R1a v okolí $-0,6 \text{ V}$ a R1b v okolí $-0,9 \text{ V}$ spôsobené redukciami dvoch nitroskupín na hydroxylamíny. V oxidačnej oblasti vidíme nárast prúdu oproti pozadiu približne od $-0,2 \text{ V}$ s maximom oxidačnej vlny pri $0,2 \text{ V}$ (O1) a dve malé redukčné vlny (R2) v okolí $-0,2 \text{ V}$, ktoré sú reverzibilnou reakciou skupín hydroxylamínu na nitrózoskupinu. V prípade elektródy z uhlíkovej plsti (obrázok 17) je rovnako ako v prípade nitrobenzénu nemožné pozorovať redukčnú vlnu nitroskupiny, ale len pokles prúdu oproti pozadiu základnej línie. Avšak pozorujeme oxidačnú a redukčnú vlnu

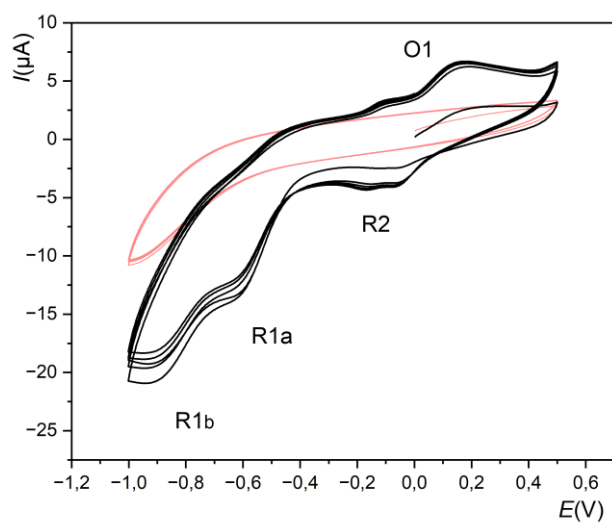
spôsobenú reverzibilnou reakciou hydroxylamínu a nitrózskupiny, ktoré sa nachádzajú približne pri rovnakých potenciáloch ako v prípade elektródy zo sklovitého uhlíka



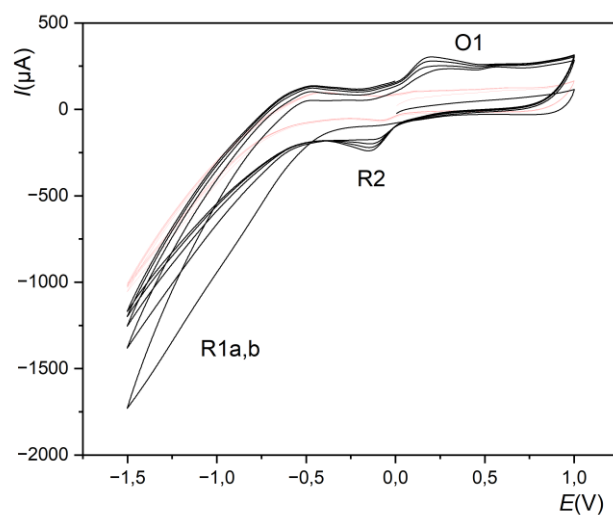
Obrázok 14. Cyklický voltamogram nitrobenzénu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 5,0 pri použití GCE pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania nitrobenzénu.



Obrázok 15. Cyklický voltamogram nitrobenzénu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 5,0 pri použití elektródy z CF pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania nitrobenzénu.



Obrázok 16. Cyklický voltamogram dinitrofenolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 5,0 pri použití GC pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania dinitrofenolu.



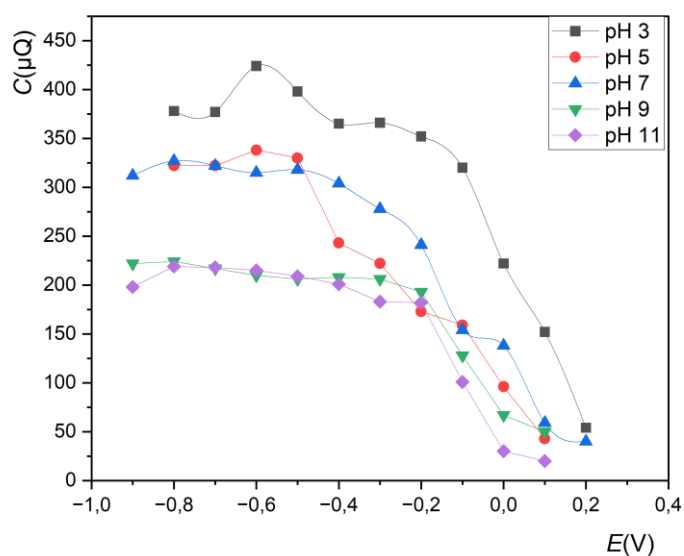
Obrázok 17. Cyklický voltamogram a dinitrofenolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 5,0 pri použití elektródy z CF pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania dinitrofenolu.

4.2.2 Hydrodynamické voltamogramy dinitrofenolu

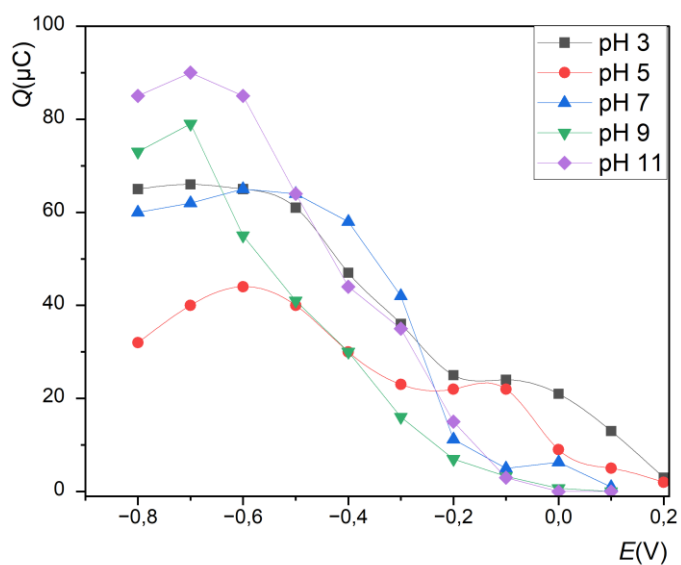
Pri hľadaní optimálnych podmienok funkčnosti duálneho detektora pre stanovenie dinitrofenolu bol skúmaný vplyv vloženého potenciálu na obe pracovné elektródy pre pH mobilnej fázy Brittonov-Robinsonovho tlmivého roztoku 3,0., 5,0., 7,0., 9,0 a 11,0 s prietokom $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Ako prvý bol vždy testovaný vplyv vloženého potenciálu na generačnú elektródu od elektrického potenciálu kedy nastala prúdová odozva smerom k zápornejším potenciálom až kým prestal nárast prúdovej odozvy. Potenciál detekčnej elektródy bol testovaný pri maximálnej odozve generačnej elektródy, kedy sa predpokladalo najvyššie množstvo vzniknutého medziproduktu, ktorý vznikol redukciou nitroskupín na hydroxylamíny. Meranie bolo vždy prevedené 3-krát a meraným parametrom bola plocha píku. Hydrodynamické voltamogramy dinitrofenolu pre generačnú elektródu sú zobrazené na obrázku 18.

S vloženým záporným potenciálom na pracovnú elektródu z CF sa elektrochemicky neredukoval len dinitrofenol, ale aj rozpustený kyslík. Z dôvodu zisťovania množstva zredukovaného analytu a redukovaného kyslíka boli premerané hydrodynamické voltamogramy bez pridania analytu, z ktorých vyplynulo, že pri optimálnom elektrickom potenciáli $-0,6 \text{ V}$ pri použití mobilnej fázy o pH 3,0 tvorila redukcia kyslíka 15 % celkového signálu a pri pH 11,0 dokonca 40 %. Hydrodynamické voltamogramy bez pridania analytu sú zobrazené na obrázku 19.

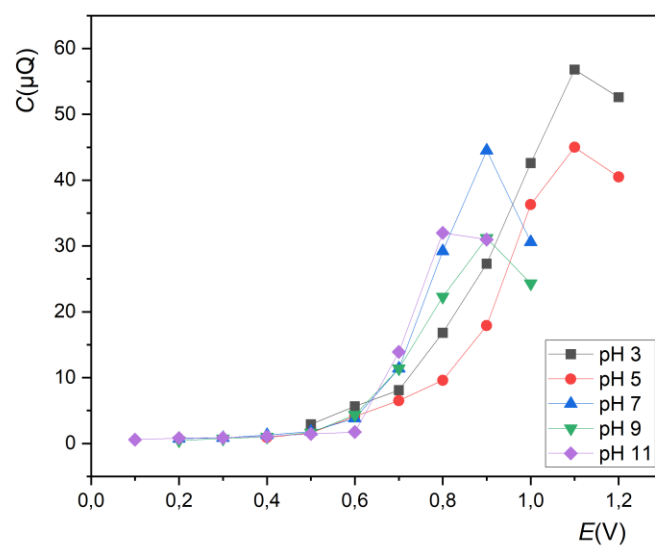
Hydrodynamické voltamogramy dinitrofenolu pre detekčnú elektródu, ktoré boli merané pri vloženom potenciáli $-0,6 \text{ V}$ na generačnú elektródu sú zobrazené na obrázku 20. So znižujúcim sa pH narastala plocha píkov, ktorá však bola zapríčinená tvorbou medziproduktu na generačnej elektróde. Zároveň sa so znižujúcim pH posúvalo maximum plochy píku smerom k vyšším potenciálom. Vzhľadom na cyklické voltamogramy sa potenciály pri maximálnej odozve nachádzali prekvapivo pri vysokých potenciáloch. Podmienky, pri ktorých bol zaznamenaný najvyšší signál pre detekčnú elektródu boli pri pH 3,0 a potenciáli 1,1 V.



Obrázok 18. Hydrodynamické voltamogramy pre generačnú elektródu z CF pre dinitrofenol ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pri pH 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 s mobilnou fázou BR pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obrázok 19. Hydrodynamické voltamogramy bez pridania analytu pre generačnú elektródu z CF pri pH 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 s mobilnou fázou BR pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



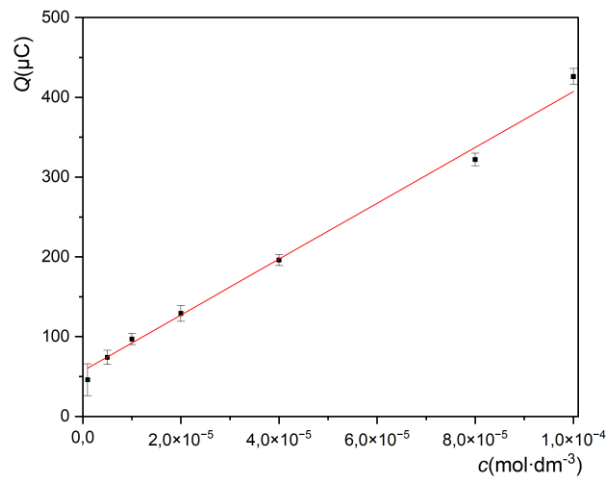
Obrázok 20. Hydrodynamické voltamogramy pre detekčnú elektródu GCE pre dinitrofenol ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pri pH 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 s mobilnou fázou BR pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Pri stálom potenciáli generačnej elektródy z CF – 0,6 V.

4.2.3 Kalibračná závislosť pre dinitrofenol

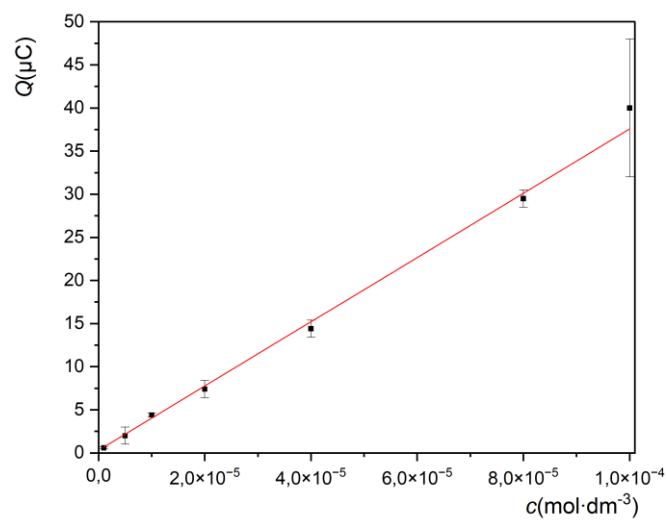
Bola premeraná kalibračná závislosť plochy píku od koncentrácie dinitrofenolu pre generačnú a detekčnú elektródu v rozmedzí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ pričom pri každej hladine koncentrácie bolo meranie prevedené 3-krát. Pre meranie kalibračnej závislosti bola vybraná mobilná fáza o pH 3,0., elektrický potenciál generačnej elektródy bol nastavený na -0,6 V a detekčnej na 1,1 V. Kalibračné závislosti generačnej a detekčnej elektródy sú zobrazené na obrázkoch 21. a 22. a vypočítané parametre oboch kalibračných závislostí v tabuľke 4. Na obrázku 23. je zobrazený záznam merania pre obe elektródy pri koncentrácii dinitrofenolu $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³, na ktorom môžeme pozorovať deformáciu píku. Táto deformácia je pravdepodobne spôsobená geometriou duálneho detektoru a zároveň viacerými elektrochemickými reakciami. V prípade generačnej elektródy pozorujeme výrazný úsek kalibračnej závislosti 57 μ C, čo približne súhlasí s plochou píku bez pridania analytu pri meraní hydrodynamických voltamogramov (obrázok 19.). Tento signál je spôsobený redukciou rozpusteného kyslíka a pri oxidácii na detekčnej elektróde sa nevyskytuje, čo môžeme pozorovať na obrázku 24., kde v prípade generačnej elektródy je signál bez pridania analytu v podstate totožný so signálom pri pridaní dinitrofenolu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Generačná elektróda z uhlíkovej plsti ohľadom na jej väčšiu plochu je zaťažená vyšším šumom a napriek násobne vyšším signálom má vyšší limit detekcie dinitrofenolu oproti detekčnej elektróde. Pomocou duálneho detektora, ktorý umožňuje stanoviť nitrolátky nepriamo v oxidačnej oblasti sa teda podarilo znížiť šum spôsobený redukciou kyslíka a detekčný limit dinitrofenolu sa pre detekčnú elektródu znížil na $4,7 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ z pôvodných $1,1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ na generačnej elektróde

Tabuľka 4. Vypočítané parametre kalibračnej závislosti pre dinitrofenol.

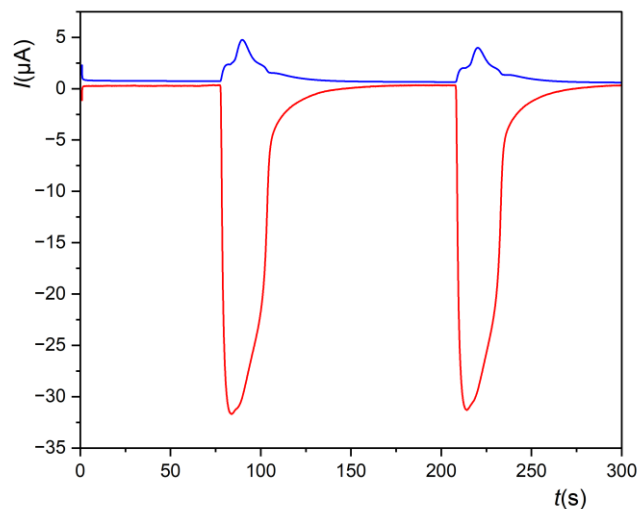
typ elektródy	smernica [C·dm ³ mol ⁻¹]	Úsek μ C	R^2	LOD [μ mol·dm ⁻³]	LOQ [μ mol·dm ⁻³]
Generačná elektroda CF	3,5	57	0,9935	1,1	3,7
Detekčná elektroda GCE	0,37	0,3	0,9959	0,47	1,6



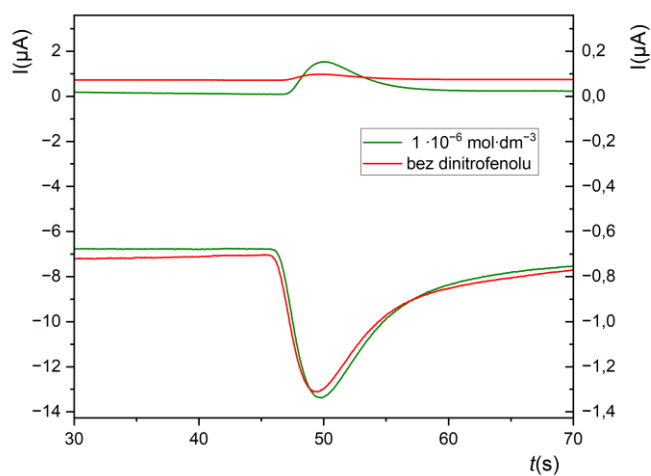
Obrázok 21. Kalibračná závislosť plochy píkovej od koncentrácie dinitrofenolu pre generačnú elektródu CF s nastaveným potenciálom $-0,6$ V.



Obrázok 22. Kalibračná závislosť plochy píkovej od koncentrácie dinitrofenolu pre detekčnú elektródu GCE s nastaveným potenciálom $1,0$ V a s potenciálom generačnej elektródy CF $-0,6$ V .



Obrázok 23. Záznam merania pri optimálnych potenciáloch pre generačnú elektródu z CF $-0,6$ V a detekčnej GCE $1,1$ V s mobilnou fázou BR o pH $3,0$ s prietokom $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pre dinitrofenol ($c = 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).



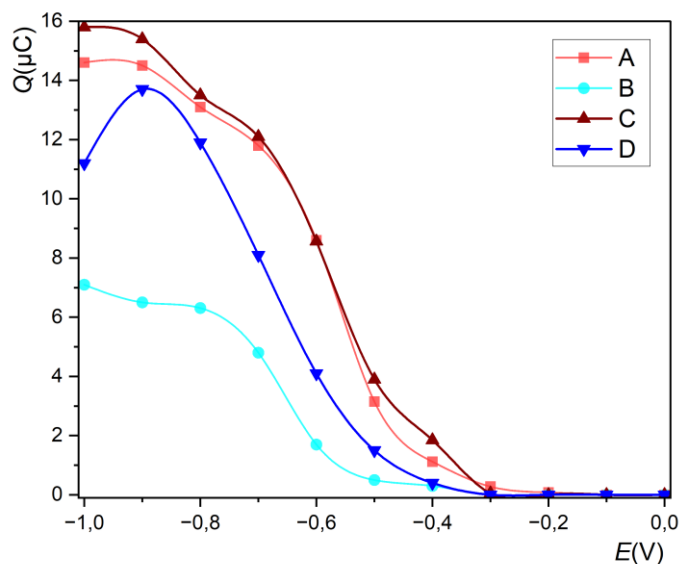
Obrázok 24. Záznam merania pri optimálnych potenciáloch pre generačnú $-0,6$ V (ľavá os) a detekčnej elektródy $1,1$ V (pravá os) s mobilnou fázou BR o pH $3,0$ s prietokom $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pre dinitrofenol ($c = 1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a bez pridania analytu.

4.3. Využitie duálneho detektora na redukciu kyslíka

Možnou aplikáciou duálneho detektora je využiť prvú elektródu na redukciu kyslíka a následne na detekčnej elektróde pracovať v redukčnom móde bez interferencie kyslíkového signálu. Elektrický potenciál prvej elektródy z CF musí byť dostatočný na to, aby sa redukoval kyslík a zároveň sa neredukoval NB. Z hydrodynamických voltamogramov pre CF bez prídania analytu vypláva, že maximum redukcie kyslíka nastáva pri potenciáli $-0,6$ V. Z cyklických voltamogramov CF pre nitrobenzén (obrázok 15.) vypláva, že sa NB začína redukovať pri potenciáloch okolo $-0,6$ V - $-0,7$ V. Potenciál elektródy z CF bol teda nastavený na $-0,7$ V.

Najprv boli premerané hydrodynamické voltamogramy nitrobenzenu pre sklovitý uhlík bez zapojenia generačnej elektródy a zrovnané s voltamogrammi bez prídania analytu, kedy bol redukovaný len kyslík. Následne bol postup zopakovaný pri zapojení generačnej elektródy pri potenciáli $-0,7$ V.

Z obrázku 25. vypláva, že bez použitia CF elektródy signál po prídání analytu kopíroval krivku redukcie kyslíka s minimálnym nárastom, čo znemožňuje stanovenie NB elektrochemickou redukciou.



Obrázok 25. Hydrodynamické voltamogramy NB pre GCE s mobilnou fázou BR tlmivý roztok o pH 5,0 pri prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. (A: bez prídania NB, bez generačnej elektródy. B: bez prídania NB, s generačnou elektródou. C: s NB, bez generačnej elektródy. D: s NB, s generačnou elektródou.)

V prípade použitia CF s vloženým potenciálom $-0,7$ V pozorujeme výrazný pokles signálu bez prídania NB. Zároveň môžeme pozorovať zvýšenie rozdielu medzi prídáním NB a bez prídania, ktorý je spôsobený poklesom signálu, ktorý zodpovedá redukcii kyslíka. Redukcie kyslíka sa však nepodarilo zbaviť a stále tvorila podstatnú časť redukcie. Pri nastavení nižšieho potenciálu na CF sa znižoval signál na detekčnej elektróde, čo bolo pravdepodobne spôsobené redukciou NB na CF.

Pri overení možnosti použitia duálneho elektrochemického detektora pre redukciu kyslíka a následnej elektrochemickej detekcie v redukčnej oblasti sa podarilo znížiť signál spôsobený redukciou kyslíka, avšak redukcia kyslíka stále tvorila podstatnú časť signálu.

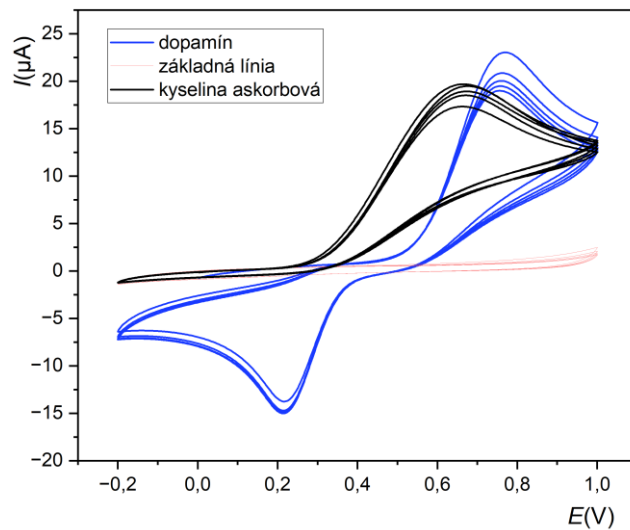
4.4. Stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej

Z elektrochemických vlastností dopamínu a kyseliny askorbovej v kapitole 2.3. vyplýva možnosť selektívne stanoviť dopamín v prítomnosti kyseliny askorbovej tým, že sa sleduje signál na detekčnej elektróde odpovedajúci redukcii produktov oxidácie zatiaľ čo kyselina askorbová takýto signál neposkytuje. Generačná elektróda pracuje v oxidačnom móde, kde sa oxidujú obe analyty DA a AA a následne detekčná elektróda v redukčnom móde, kedy sa redukujú len produkty oxidácie dopamínu. Ako prvé boli zmerané cyklické voltamogramy analytov za účelom zistenia elektrochemických vlastností na oboch elektródach a následne zmerané hydrodynamické voltamogramy za účelom zistenia optimálnych potenciálov. Po stanovení optimálnych podmienok bola meraná kalibračná závislosť pre oba detektory. Hydrodynamické voltamogramy a kalibračná závislosť bola meraná pre rôzne hladiny koncentrácie AA.

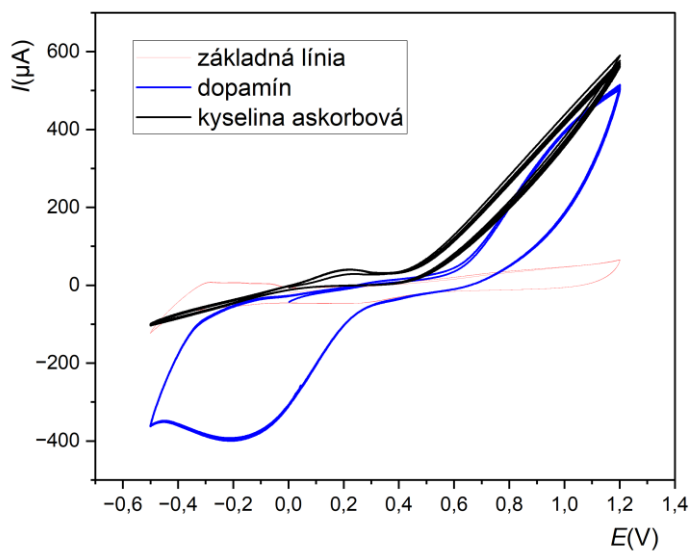
4.4.1 Cyklické voltamogramy dopamínu a kyseliny askorbovej

Cyklické voltamogramy boli premerané zvlášť pre dopamín a kyselinu askorbovú na elektróde zo sklovitého uhlíka a elektródy z uhlíkovej plsti v základnom elektrolyte BR o pH 7,0. Zmerané cyklické voltamogramy sú zobrazené na obrázku 26. (sklovitý uhlík) a na obrázku 27. (uhlíková plst').

V prípade dopamínu pozorujeme pri oboch elektródach oxidačnú a redukčnú vlnu. Pri použití sklovitého uhlíku sa oxidačná vlna nachádza približne pri elektrickom potenciáli 0,75 V a redukčná približne pri 0,2 V. S použitím elektródy z uhlíkovej plsti narastá rozdiel potenciálov oxidačnej a redukčnej vlny, ktoré sú zároveň rozťahnutejšie. Rovnaký trend bol pozorovaný pri všetkých CV. Maximum oxidačnej vlny sa nachádza približne pri 1,2 V a redukčnej pri -0,2 V. Cyklické voltamogramy kyseliny askorbovej obsahovali jednu oxidačnú vlnu pri sklovitom uhlíku pri 0,65 V a nárast pozadia oproti základnej línii pri uhlíkovej plsti. Prítomnosť oboch vln v CV pre DA a jednej pre AA potvrdzuje teoretické poznatky zhrnuté v kapitole 2.3. a otvára možnosť stanoviť dopamín v prítomnosti kyseliny askorbovej duálnym detektorom.



Obrázok 26. Cyklický voltamogram dopamínu a kyseliny askorbovej ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 7,0 pri použití GCE pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania analytov.

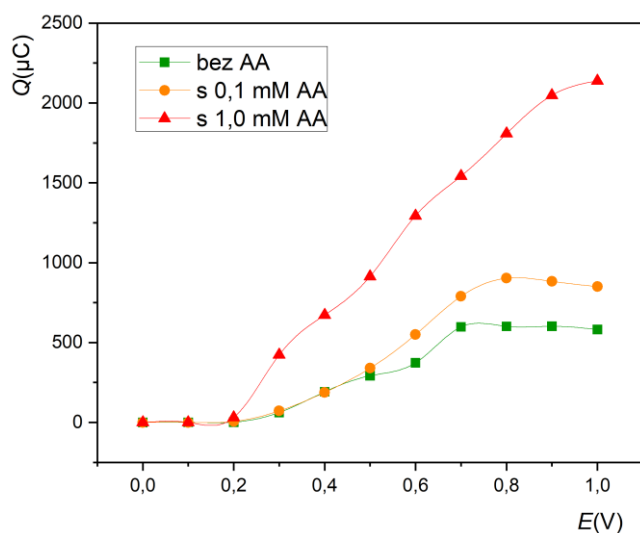


Obrázok 27. Cyklický voltamogram dopamínu a kyseliny askorbovej ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s BR o pH 7,0 pri použití CF pri rýchlosti skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a rovnako zmeraný cyklický voltamogram bez pridania analytov.

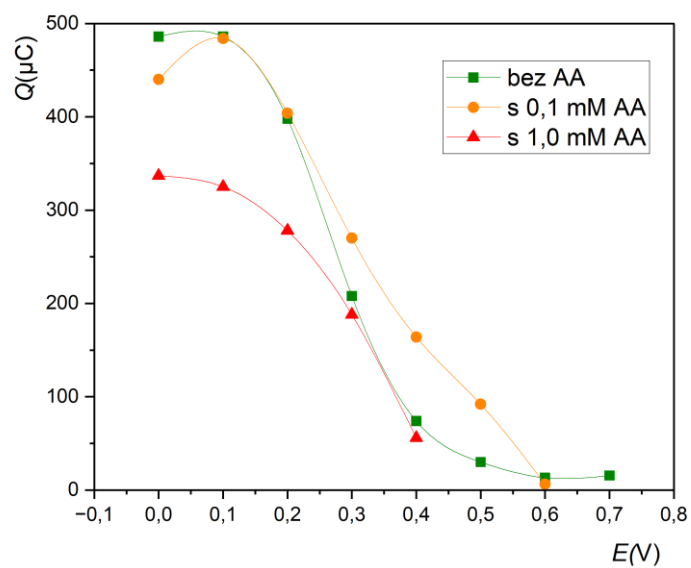
4.4.2 Hydrodynamické voltamogramy dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej

Boli hľadané optimálne potenciály pre oxidáciu dopamínu na generačnej elektróde z uhlíkovej plsti a následnú redukciu produktov oxidácie dopamínu na detekčnej elektróde v prietokovej injekčnej analýze pri použití BR tlmivého roztoku o pH 7,0 v prítomnosti kyseliny askorbovej. Hydrodynamický voltamogram DA s rôznymi koncentraciami AA, meraný na generačnej elektróde je zobrazený na obrázku 28. Pri DA bez AA vidíme maximálnu odozvu pri 0,7 - 0,8 V. S pridaním AA nastáva zvýšenie plochy pík, kedy pri koncentrácii 1,0 mM AA sa deformuje krivka získaná pri samotnom DA a môžeme pozorovať lineárny nárast odozvy s pribúdajúcim potenciálom.

Na obrázku 29. môžeme pozorovať hydrodynamický voltamogram pre detekčnú elektródu, zatiaľ čo generačná elektróda pracuje pri potenciáli 0,8 V. Hydrodynamický voltamogram DA bol meraný od 0,7 V smerom k nižším potenciálom až kým neprestal nárast odozvy detektora. V maxime odozvy bola plocha redukčného signálu na úrovni 90 % oxidácie. Pri meraní s kyselinou askorbovou boli premerané až nižšie potenciály, nakoľko pri vyšších potenciáloch prevládala oxidácia AA nad redukciou produktov DA. Na detekčnej elektróde môžeme pozorovať, že so stúpajúcou koncentráciou kyseliny askorbovej sa plocha píku v maxime nezvyšuje a naopak mierne klesá, čo mohlo byť spôsobené zníženou oxidáciou DA na generačnej elektróde z dôvodu jeho vytesnenia AA. Záznam meraní v optimálnych podmienkach je zobrazený na obrázku 32.



Obrázok 28. Hydrodynamické voltamogramy pre generačnú elektródu z CF pre dopamín ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prítomnosti rôznych koncentracii kyseliny askorbovej s mobilnou fázou BR, pH 7,0 a prietokom $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obrázok 29. Hydrodynamické voltamogramy pre detekčnú elektródu GCE pre dopamín ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prítomnosti rôznych koncentrácií kyseliny askorbovej s mobilnou fázou BR, pH 7,0 a prietokom $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ s nastaveným potenciálom generačnej elektródy CF 0,8 V.

4.4.3. Kalibračná závislosť dopamínu v rôznych koncentráciách kyseliny askorbovej

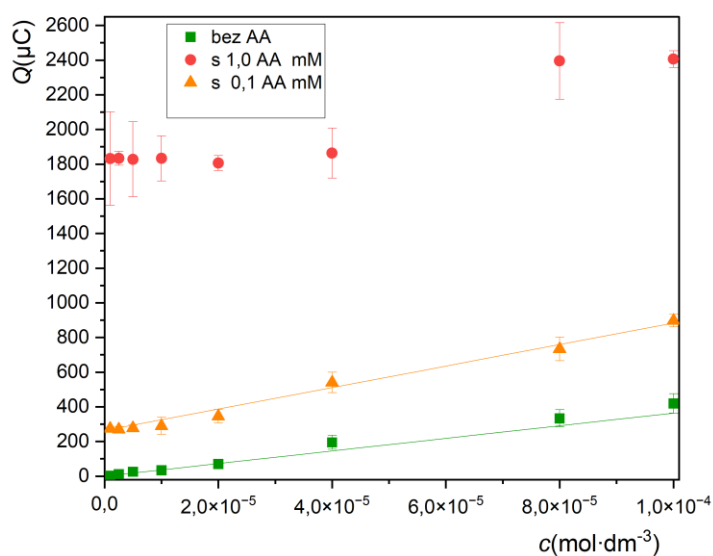
Kalibračná závislosť plochy píku pre generačnú a detekčnú elektródu od koncentrácie dopamínu bola premeraná v rozmedzí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ bez prítomnosti kyseliny askorbovej a v jej prítomnosti v koncentrácii 0,1 a 1,0 mol·dm⁻³ s BR tlmivým roztokom o pH 7,0 s nastaveným potenciálom CF 0,8 V a GC 0,1 V. Kalibračné závislosti sú zobrazené na obrázkoch 30 a 31. Vypočítané parametre kalibračnej závislosti sú zobrazené v tabuľke 5. V prípade merania bez AA vykazoval generátor aj detektor lineárnu odozvu oproti koncentrácii s minimálnym úsekom, pričom detekčná elektróda zaznamenávala cca. 90 % signálu generačnej elektródy.

S pridaním kyseliny askorbovej sa výrazne zvyšoval úsek kalibračnej závislosti pri generačnej elektróde, pričom pri koncentrácii 1,0 mol·dm⁻³ už nebolo možné zmysluplne preložiť kalibračnou priamkou, keďže väčšinu signálu spôsobovala oxidácia AA. V prípade detekčnej elektródy sa s pridaním kyseliny askorbovej menil úsek oproti generačnej elektróde len minimálne. Funkčnosť preukázala aj v prítomnosti AA o koncentrácii 1,0 mol·dm⁻³ kedy v prípade generátoru nebolo možné stanovovať DA. Pri 1,0 mol·dm⁻³ AA bol pozorovaný pokles signálu pri vyšších koncentráciách DA, čo bolo pozorované aj v prípade hydrodynamických voltamogramov.

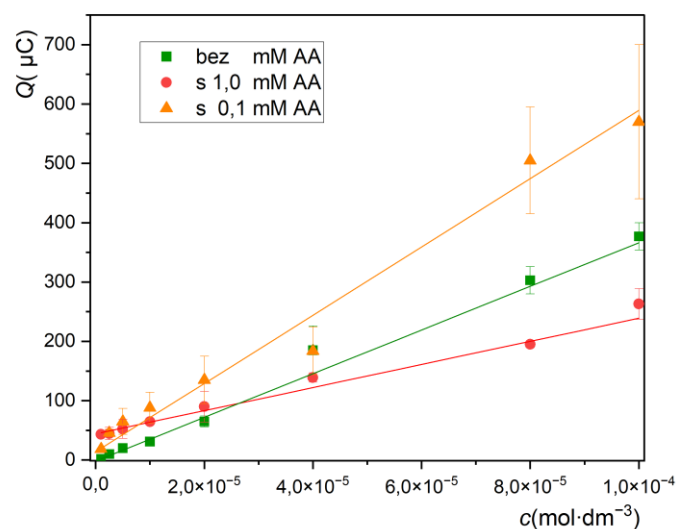
Limity detekcie a kvantifikácie sa pri stanovení DA bez prídania kyseliny askorbovej zhodovali pre obe elektródy, nakoľko mierne vyšší signál pri CV bol kompenzovaný mierne nižším šumom prípade GC. Po pridaní AA sa však preukázala výhodnosť duálneho zapojenia kedy limity detekcie a stanoviteľnosti ukazovali lepšiu možnosť stanovovania dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej. Záznam meraní detekčnej elektródy pre DA o koncentrácii $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ je zobrazený na obrázku 33.

Tabuľka 5. Vypočítané parametre kalibračnej závislosti pre DA v rôznych koncentráciách AA.

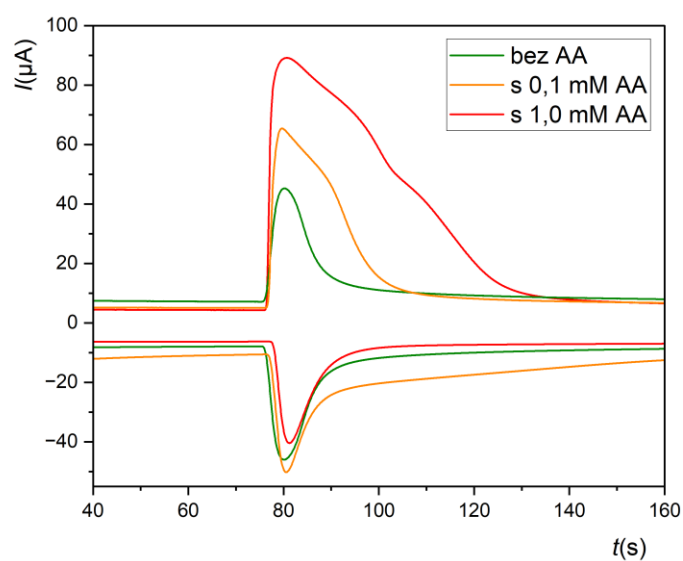
Typ elektródy	Koncentrácia AA [mmol·dm ⁻³]	Smernica [C·dm ³ mol ⁻¹]	Úsek μC	R ²	LOD [μmol·dm ⁻³]	LOQ [μmol·dm ⁻³]
Generačná elektróda CF	0,0		-0,4	0,9669	0,27	0,89
		3,6				
	0,1	6,2	263,6	0,9830	1,4	4,7
	1,0	-	-	-	-	-
Detekčná elektróda GCE	0,0		-1,7	0,9892	0,26	0,86
		3,6				
	0,1	5,8	13,4	0,9823	0,31	1,0
	1,0	1,9	44,2	0,9900	2,8	9,3



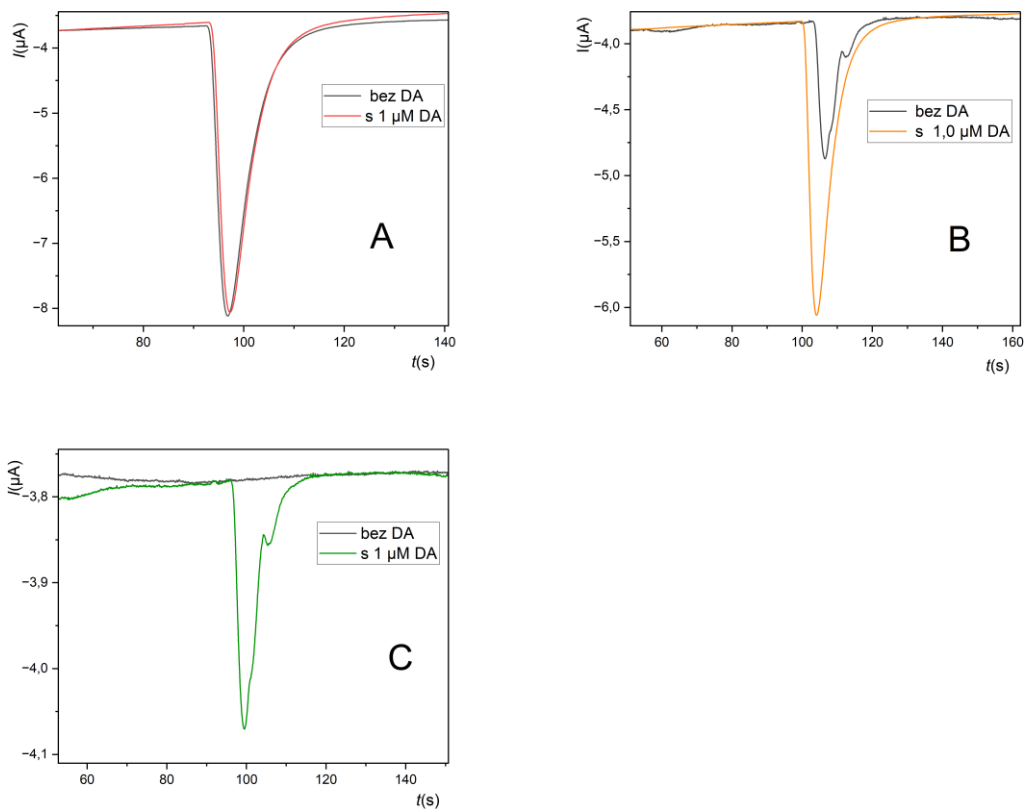
Obrázok 30. Kalibračná závislosť plochy píkov od koncentrácie DA v prítomnosti AA pre generačnú elektródu CF s nastaveným potenciálom 0,8 V.



Obrázok 31. Kalibračná závislosť plochy píkovej od koncentrácie DA v prítomnosti AA pre detekčnú elektródu GCE s nastaveným potenciálom 0,1 V pri nastavenom potenciáli generačnej elektródy CF 0,8 V.



Obrázok 32. Záznam merania pri použití generačnej elektródy z CF pri potenciáli 0,8 V a detekčnej elektródy z GCE 0,1 V pre dopamín ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prítomnosti kyseliny askorbovej v prietoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obrázok 33. Záznam merania detekčnej elektródy z GCE pri potenciáli 0,1 V pre dopamín ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a bez pridania dopamínu (A: s 1,0 mM AA , B: s 0,1 mM AA, C: bez AA).

5. Záver

V tejto práci boli skúmané možnosti využitia elektrochemického duálneho detektora s generačnou elektródou z uhlíkovej plsti a detekčnej elektródy zo sklovitého uhlíku v prietokovom usporiadaní pomocou prietokovej injekčnej elektródy. V prvom rade boli pomocou cyklickej voltametrie overované elektrochemické vlastnosti analytov na oboch elektródach pre ich ďalšie možné využitie pri stanovení pomocou duálneho detektora.

V prípade všetkých analytov (hexakynožeľeznatán draselný, nitrobenzén, dinitrofenol, dopamín, kyselina askorbová) boli premerané cyklické voltamogramy, ktorých výsledky sa zhodovali s teoretickými poznatkami a bolo možné pokračovať elektrochemickým stanovením pomocou duálneho detektora. V prípade elektródy z uhlíkovej plsti boli pozorované vyššie redukčné a oxidačné vlny oproti elektróde zo sklovitého uhlíku. Zároveň boli zaznamenané posuny elektrických potenciálov, kedy si oxidačné aj redukčné vlny pre uhlíkovú plst' žiadali extrémnejšie potenciály.

Elektrochemický duálny detektor bol najprv testovaný na hexakynožeľeznatane draselnom, ktorý sa oxidoval na generačnej elektróde a následne redukoval na detekčnej elektróde. Pomocou hydrodynamických voltamogramov bol stanovený optimálny potenciál pre generačnú elektródu 0,9 V a detekčnú elektródu -0,6 V pri prietoku 1 ml·min⁻¹. V optimálnych podmienkach pracovala generačná elektróda s úplnou elektrochemickou konverziou, ale detekčná elektróda pracovala s efektivitou redukcie okolo 5 %, čo bolo pravdepodobne spôsobené zlou geometriou duálneho detektora.

Po overení funkčnosti duálneho detektora v prietoku, bola testovaná možnosť stanovenia nitrolátok oxidáciou produktov na detekčnej elektróde vzniknutých redukciami na generačnej elektróde a tým sa vyhnúť stanoveniu pri redukcii kyslíka. Stanovovaným analytom bol dinitrofenol, pre ktorý boli zmerané hydrodynamické voltamogramy pre obe elektródy pre pH 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 a 11,0. Ako optimálne podmienky pre stanovenie dinitrofenolu bolo vybraté pH 5,0 s nastaveným potenciálom generačnej elektródy na -0,6 V a detekčnej na 1,1 V. Generačná elektróda poskytovala približne 10-krát vyšší signál ako detekčná, avšak tento signál bol spôsobený do veľkej miery redukovaným kyslíkom, ktorý sa prejavil ako šum a zároveň ako 100-násobne väčší úsek oproti detekčnej elektróde pri kalibračnej závislosti. Vďaka tomu bol limit detekcie 0,47 μmol·dm⁻³ pre detekčnú elektródu nižší ako pre generačnú elektródu.

Ďalšou testovanou aplikáciou duálneho detektora bola možnosť redukcie kyslíka elektródou z uhlíkovej plsti a následná elektrochemická redukcia nitrobenzénu na detekčnej elektróde bez rušiaceho vplyvu redukovaného kyslíka. Pri hydrodynamickom voltamograme NB na GC pri zapojení elektródy z CF s potenciálom $-0,7$ V sa zmenšil redukčný signál spôsobený kyslíkom oproti nezapojenou CF približne na polovicu, avšak nepodarilo sa zredukovať všetok kyslík.

Poslednou testovanou aplikáciou duálneho detektora v tejto práci bolo stanovenie dopamínu v prítomnosti kyseliny askorbovej, kedy sa na generačnej elektróde oxidovali oba analyty, ale dopamín sa na rozdiel od kyseliny askorbovej redukoval na detekčnej elektróde. DA o koncentrácii $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bol testovaný v prítomnosti AA o koncentráciách $0,1$ a $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pomocou hydrodynamických voltamogramov bol pre generačnú elektródu $0,8$ V a detekčnú elektródu $0,1$ V. Problémom stanovenia DA bol pokles redukčného signálu v prítomnosti vyššej koncentrácie kyseliny askorbovej a zároveň vyšší signál pri redukcii bez pridania DA, úsek na kalibračnej závislosti. Limit detekcie dopamínu pomocou redukcie na detekčnej elektróde bol v prítomnosti $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $0,31 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a v prítomnosti $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $2,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Elektrochemický duálny detektor potvrdil možnosť aplikácie pre stanovenie. Pre jeho ďalšie používanie je potrebné vylepšiť geometriu detektora.

6. Zoznam použitej literatúry

1. Honeychurch K. C., Hart J. P.: Voltammetric Behavior of p-Nitrophenol and Its Trace Determination in Human Urine by Liquid Chromatography with a Dual Reductive Mode Electrochemical Detection System. *Electroanalysis*, 19: 2176-2184. (2007) DOI: [10.1002/elan.200703989](https://doi.org/10.1002/elan.200703989)
2. S. Sodum R. S., Akerkar S. A., Fiala S. E.: Determination of 3-Nitrotyrosine by High-Pressure Liquid Chromatography with a Dual-Mode Electrochemical Detector. *Analytical Biochemistry*, 280: 278-285. (2000) DOI: [10.1006/abio.2000.4528](https://doi.org/10.1006/abio.2000.4528).
3. Balasingam M., Becker J. D., Guerrero-Almaraz P., Sun H., Koppang M. D.: Dual Electrode Detection in LC-EC Analysis of Sanger-tagged Amino Acids: Electrochemical Reduction of Aromatic Nitro Groups. *Electroanalysis*, 34: 1854-1868. (2022) DOI: [10.1002/elan.202100433](https://doi.org/10.1002/elan.202100433)
4. Honeychurch K.C., Hart J.P.: Determination of flunitrazepam and nitrazepam in beverage samples by liquid chromatography with dual electrode detection using a carbon fibre veil electrode. *Journal of Solid State Electrochem* 12: 1317–1324. (2015) DOI: [10.1007/s10008-008-0536-0](https://doi.org/10.1007/s10008-008-0536-0)
5. Radzik D., Brodbelt J. S., Kissinger P. T.: Determination of Toxic Azo Dye Metabolites in Vitro by Liquid Chromatography/Electrochemistry with a Dual-Electrode Detector. *Analytical Chemistry*, 56: 2927-2931. (1984) DOI: [10.1021/ac00278a069](https://doi.org/10.1021/ac00278a069)
6. Dorris M. K., Lunte C. E.: Determination of Co-Q10 in plasma samples by dual-electrode amperometric detection and liquid chromatography. *Analytical Methods*, 3: 161-167. (2011) DOI: [10.1039/C0AY00520G](https://doi.org/10.1039/C0AY00520G)
7. Williams C., Koppang M.: Selective Analysis of Secondary Amines Using Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (LC-EC). *Electroanalysis* 18: 2121-2127. (2006) DOI: [10.1002/elan.200603638](https://doi.org/10.1002/elan.200603638)
8. Scott M. R., Gawron A. J., Lunte S. M., Henry Charles S.: Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. *Analytical Chemistry*, 72: 3196-3202. (2000) DOI: [10.1021/ac000160t](https://doi.org/10.1021/ac000160t)
9. S. Vinoth, P. Mary Rajaiitha, A. Pandikumar.: In-situ pyrolytic processed zinc stannate incorporated graphitic carbon nitride nanocomposite for selective and sensitive electrochemical determination of nitrobenzene. *Composites Science and Technology*, 195, 108192. (2020) DOI: [10.1016/j.compscitech.2020.108192](https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2020.108192).
10. Liang S. X., Zhang H. K., Lu, D.: Determination of Nitrobenzene in Wastewater Using a Hanging Mercury Drop Electrode. *Environmental Monitoring and Assessment*, 129: 331–337. (2007). DOI: [10.1007/s10661-006-9366-7](https://doi.org/10.1007/s10661-006-9366-7).

11. Subbiramaniyan K., Subramanian S., Shen-Ming Ch., Tamizhdurai K. S., Chelladurai K.,: Green reduction of reduced graphene oxide with nickel tetraphenyl porphyrin nanocomposite modified electrode for enhanced electrochemical determination of environmentally pollutant nitrobenzene. *Journal of Colloid and Interface Science*, 497: 207-216. (2017) [DOI:10.1016/j.jcis.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.003).
12. Kariuki V. M., Fasih-Ahmad S. A., Osonga F. J., Sadik O. A.: An electrochemical sensor for nitrobenzene using π -conjugated polymer-embedded nanosilver. *Analyst*, 141: 2259-2269. (2016) [DOI: 10.1039/C6AN00029K](https://doi.org/10.1039/C6AN00029K)
13. Rasu R., Tse-Wei Ch., Shen-Ming Ch., Thangaraj B., Ramanjam k., Perumal E., Paulsamy R., Tharini J., Kannaiyan D., Kumar G, George P.: A review of the advanced developments of electrochemical sensors for the detection of toxic and bioactive molecules. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 6: 3418-3439. (2019) [DOI: 10.1039/C9QI00602H](https://doi.org/10.1039/C9QI00602H)
14. Partha S. M., Gupta K.: Hybrid reactor for priority pollutant nitrobenzene removal. *Water Research*, 37: 4331-4336. (2003) [DOI:10.1016/S0043-1354\(03\)00436-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00436-6).
15. Ramalingam M., Ponnusamy V. K., Sangilimuthu S. N.: Electrochemical determination of 4-nitrophenol in environmental water samples using porous graphitic carbon nitride-coated screen-printed electrode. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 17481–17491. (2020) [DOI: 10.1007/s11356-019-05494-3](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05494-3)
16. Yuehua Z., Lihua W., Wu L., Xifeng X., Mingzhu X., Qingli H.: Electrochemical determination of 4-nitrophenol at polycarbazole/N-doped graphene modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 14 : 568-576. (2014) [DOI:10.1016/j.electacta.2014.08.153](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.08.153).
17. Xu G., Yang L., Zhong M.: Selective recognition and electrochemical detection of p-nitrophenol based on a macroporous imprinted polymer containing gold nanoparticles. *Microchimica Acta* 180: 1461–1469 (2013) [DOI:10.1007/s00604-013-1090-8](https://doi.org/10.1007/s00604-013-1090-8)
18. Xiao-Gang W., Qing-Sheng W., Wang-Zhuan L., Ya-Ping D.: Simultaneous determination of dinitrophenol isomers with electrochemical method enhanced by surfactant and their mechanisms research, *Electrochimica Acta*, 52: 589-594. (2006) [DOI:10.1016/j.electacta.2006.05.038](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.05.038).
19. Yun L., Lihua Z., Yingying Z., Heqing T.: Electrochemical sensing of 2,4-dinitrophenol by using composites of graphene oxide with surface molecular imprinted polymer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172: 1151-1158. (2012) [DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.054](https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.054).
20. Yongnian N., Wang L., Kokot S.: Simultaneous determination of nitrobenzene and nitro-substituted phenols by differential pulse voltammetry and chemometrics, *Analytica Chimica Acta*, 431: 101-113. (2001) [DOI:10.1016/S0003-2670\(00\)01319-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01319-2)
21. Ito E., Sakihama H., Toyama K., Matsui K.: Effects of 2,4-dinitrophenol and other metabolic inhibitors on the thermograms of Ehrlich ascites carcinoma cells registered with a microcalorimeter. *Cancer research*, 44: 1985-1990. (1984) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6713397/>

22. Miranda E., McIntyre I. M., Parker DR, Gary R. D., Logan B. K.: Two deaths attributed to the use of 2,4-dinitrophenol. *Journal of Analytical Toxicology*, 3: 219-222. (2006)
[DOI:10.1093/jat/30.3.219](https://doi.org/10.1093/jat/30.3.219).
23. Schindler S., Thomas B.: Mechanistic insights into the electrochemical oxidation of dopamine by cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 836: 94-101. (2019)
[DOI:10.1016/j.jelechem.2019.01.069](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.01.069)
24. Chen S. M., Peng K. T.: The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547: 179–189. (2003)
[DOI: 10.1016/S0022-0728\(03\)00220-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(03)00220-1)
25. Breczko J., Plonska-Brzezinska M. E., Echegoyen L.: Electrochemical oxidation and determination of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids using a carbon nano-onion and poly(diallyldimethylammonium chloride) composite. *Electrochimica Acta*, 72: 61-37. (2012) [DOI:10.1016/j.electacta.2012.03.177](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.177)
26. Pavličková M., Lorencová L., Hatala M., Kováč M., Tkáč J., Gemeiner P.: Facile fabrication of screen-printed MoS₂ electrodes for electrochemical sensing of dopamine. *Scientific Reports*, 12:1, 12(1), 1–11.(2022) [DOI: 10.1038/s41598-022-16187-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-16187-2)
27. Aurelia M. P., Aneta P., Andreea I. S., Cornelia F.: Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121: 443-460. (2014)
[DOI:10.1016/j.electacta.2013.12.127](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.127)
28. Davey M. W., Montagu M. V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I. J., Strain J. J., Favell D. and Fletcher J.: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of Science of Food Agriculture*., 80: 825-860.(2000) [DOI:10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<825](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825)
29. Carr C. A., Pullar M. J., Bozonet S. M., Vissers C. M.: Marginal Ascorbate Status (Hypovitaminosis C) Results in an Attenuated Response to Vitamin C Supplementation. *Nutrients*, 8: 341. (2016) [DOI:10.3390/nu8060341](https://doi.org/10.3390/nu8060341)
30. Erdurak-Kiliç C.S., Uslu B., Dogan B.: Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey. *Journal of Analytical Chemistry*, 61: 1113–1120. (2006)
[DOI:10.1134/S106193480611013X](https://doi.org/10.1134/S106193480611013X)
31. Muhammad S., Mazen K. N., Muhammad M., Abdalnaser A., Shehzada M. S. J., Chanbasha B.: Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76: 15-29. (2016) [DOI:10.1016/j.trac.2015.09.006](https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.006).
32. Tian-Qi X., Qian-Li Z., Jie-Ning Z., Zhang-Ying L., Jie W., Ai-Jun Wang, Jiu-Ju Feng: Simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid using Pt nanoparticles supported on reduced graphene oxide. *Electrochimica Acta*, 115: 109-115. (2014) [DOI:10.1016/j.electacta.2013.10.147](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.147).

33. Nan-nan S., Yin-zhu W., Xue-yun Y., Hui-long Z., Ya-xian Ch., Zhen M., Chuan-xiang Ch.: A novel electrochemical biosensor for the determination of dopamine and ascorbic acid based on graphene oxide /poly(aniline-co-thionine) nanocomposite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 873,114352. (2020) [DOI:10.1016/j.jelechem.2020.114352](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114352).
34. Manohara V. R. Y., Prabhakara R. V., Bhaskar V. R. A., Lavanya M., Venu M., Lavanya M., Madhavi G.: Determination of Dopamine in Presence of Ascorbic Acid and Uric Acid Using Poly (Spands Reagent) Modified Carbon Paste Electrode. *Materials Science and Engineering* 57: 378–386. (2015) [DOI: 10.1016/j.msec.2015.08.005](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.005)
35. Kim Y. R., Bong S., Kang Y. J., Yang Y., Mahajan R. K., Kim J. S., Kim H.: Electrochemical Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Graphene Modified Electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2366–2369. (2010) [DOI:10.1016/J.BIOS.2010.02.031](https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.02.031).
36. Wang Z., Liu J., Liang Q., Wang Y., Luo G.: Carbon Nanotube -Modified Electrodes for the Simultaneous Determination of Dopamine and Ascorbic Acid. *Analyst*, 127: 653–658. (2002) [DOI:10.1039/B201060G](https://doi.org/10.1039/B201060G).
37. Lian Q., He Z., He Q., Luo A., Yan K., Zhang D., Lu X., Zhou X.: Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid Based on Tryptophan Functionalized Graphene. *Analytica Chimica Acta* 823: 32–39. (2014) [DOI:10.1016/J.ACA.2014.03.032](https://doi.org/10.1016/J.ACA.2014.03.032).
38. Balwinder K., Thangarasu P., Biswarup S., Rajendra S.: Simultaneous and sensitive determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, and tryptophan with silver nanoparticles-decorated reduced graphene oxide modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111: 97-106. (2013) [DOI:10.1016/j.colsurfb.2013.05.023](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.023)
39. Dejmková H., Baroch M., Krejčová M., Barek J., Zima J.: Coulometric detector based on carbon felt. *Applied Materials Today*, 9: 482-486. (2017) [DOI:10.1016/j.apmt.2017.09.012](https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.09.012).