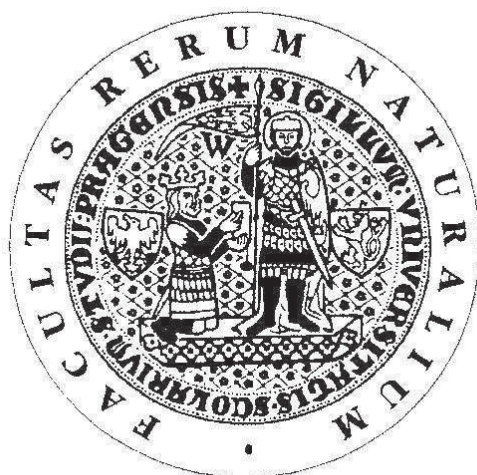


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie



**PŘÍSPĚVEK K VYUŽITÍ NOVÝCH TYPŮ
UHLÍKOVÝCH
PASTOVÝCH A VLÁKNOVÝCH ELEKTROD
PRO VOLTAMETRICKÉ A
AMPEROMETRICKÉ STANOVENÍ
5-AMINO-6-NITROCHINOLINU A
RESVERATROLU**

disertační práce

Praha 2012

Lenka Němcová

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. října 2012

Mgr. Lenka Němcová

Tato disertační práce vznikla v období 2008 až 2012 na Katedře analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy v Praze.

Chtěla bych vyjádřit poděkování všem, kteří podpořili můj výzkum během této doby. V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli **Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc.**, za veškerou pomoc a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat i jiným členům Katedry analytické chemie, jmenovitě **Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc.**, za odborné připomínky a cenné rady. Chtěla bych rovněž poděkovat všem členům Katedry analytické chemie za pomoc a příjemné prostředí, které mi poskytovali v průběhu celé mé práce. Rovněž bych chtěla poděkovat svému partnerovi Františku Dvořákovi za veškerou podporu a své rodině, přátelům a kolegům za morální podporu během mého studia.

Děkuji za finanční podporu mé práce následujícím organizacím a projektům: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 0021620857, KONTAKT (AMVIS) projekt ME10004 (NEMVAD)), Karlova univerzita v Praze (projekt SVV 2012-265201), Hlávkova nadace (Nadání).

Seznam použitých zkratek

5A6NQ	5-amino-6-nitrochinolin (5-amino-6-nitroquinoline)
α	hladina významnosti
A	absorbance
A_p	plocha píku
AdSDPV	adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie
AU, mAU	jednotky absorbance
BR	Brittonův-Robinsonův pufr
c	koncentrace
CAS	Chemical Abstracts Service
CFRE(s)	uhlíková vláknová tyčinková elektroda (Carbon Fiber Rod Electrode(s))
CPE(s)	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode(s))
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC (Direct Current) voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál
E_{in}	počáteční potenciál
E_p	potenciál píku
ED	elektrochemická detekce
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GCE(s)	elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode(s))
h_p	výška píku
HC	heterocyklické uhlovodíky
HCA	heterocyklické aminy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
IF	impakt faktor
I_{lim}	limitní proud
I_p	proud píku
λ	vlnová délka
L_D	mez detekce (Limit of detection)
MeOH	methanol
EtOH	ethanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	počet měření
p.a.	pro analýzu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity hydroxoniových iontů
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
R	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
t	čas
t_{acu}	doba akumulace

UV
 ν
VIS
 V/V

ultrafialová oblast
rychlost polarizace
viditelná oblast
objemový zlomek

ABSTRAKT (CZ)

V rámci této disertační práce byly studovány elektrochemické vlastnosti nových typů uhlíkových pastových elektrod (CPE) a uhlíkových vláknových tyčinkových elektrod (CFRE), které byly současně využity pro vývin vysoce citlivých a selektivních voltametrických a amperometrických metod pro stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu a *trans*- a *cis*- izomerů resveratrolu.

Uhlíkové pastové elektrody byly porovnány z hlediska velikosti mikrokuliček skelného uhlíku obsažených v pastě (průměry 0,4 – 12 μm , 10 – 20 μm , 20 – 50 μm) ve srovnání s uhlíkovou pastovou elektrodou z práškového grafitu a elektrodou ze skelného uhlíku. Elektrochemické vlastnosti byly zkoumány s použitím hexakynoželeznanu draselného ve vodném prostředí a 5-amino-6-nitrochinolinu (5A6NQ) v prostředí methanol-voda.

Dále byla uhlíková pastová elektroda využita v amperometrickém detektoru typu wall-jet zapojeném sériově za spektrometrický detektor k vývinu nové HPLC metody s elektrochemickou detekcí a spektrofotometrickou detekcí pro stanovení *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu ve vzorcích nažek, slupek a listech pohanky tatarské a obecné. Metoda byla optimalizována a využita pro zjištění skutečného obsahu resveratrolu ve vzorcích šesti variet pohanky obecné a dvou variet pohanky tatarské.

Elektrochemické vlastnosti uhlíkových vláknových tyčinkových elektrod byly sledovány u elektrod o různých průměrech (0,8 mm, 2 mm a 3 mm) pomocí porovnání stanovení vybraných analytů (hexakynoželeznan draselný, 5-amino-6-nitrochinolin) s využitím voltametrických metod (DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), cyklické voltametrie (CV), adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV)). Praktické použití optimalizovaných metod bylo demonstrováno na stanovení 5A6NQ na CFRE v modelových vzorcích pitné a rybniční vody.

V poslední části práce byla vyvinuta nová metoda stanovení *trans*-resveratrolu využívající voltametrické metody (DCV, DPV, DCV a AdSDPV) a průtokové injekční analýzy (FIA) s elektrochemickou detekcí na CFRE a tato byla porovnána se stanovením na CPE a v případě FIA i se spektrofotometrickou detekcí. Praktická aplikace metod byla testována na stanovení *trans*-resveratrolu v pastilkách přípravku Evelor.

ABSTRACT (EN)

This dissertation thesis is focused on the study of electrochemical properties of new type of carbon paste electrode (CPE) and carbon fiber rod electrode (CFRE), which were used for the development of new highly sensitive and selective voltammetric and amperometric methods for the determination of 5-amino-6-nitroquinoline and *trans*- and *cis*- isomers of resveratrol.

The carbon paste electrodes were compared in terms of size of the microparticles of glassy carbon contained in the paste (diameters 0.4 – 12 μm ; 10 – 20 μm ; 20 – 50 μm) in comparison with carbon paste electrode consisting of crystalline graphite and solid glassy carbon electrode. The electrochemical properties were tested using potassium hexacyanoferrate in an aqueous supporting electrolyte and 5-amino-6-nitroquinoline (5A6NQ) in a mixed methanol-water supporting electrolyte.

The carbon paste electrode was further used in an amperometric detector of a wall-jet type connected in series with a spectrophotometric detector for the development of a new HPLC method with electrochemical detection and spectrophotometric detection for the determination of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in samples of grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat. The method was optimized and used for the determination of resveratrol in samples of six varieties of common buckwheat and two varieties of tartary buckwheat.

The electrochemical properties of carbon fiber rod electrodes were tested for the electrodes of various diameters (0.8 mm; 2 mm and 3 mm) by comparing the parameters in the determination of selected analytes (potassium hexacyanoferrate and 5-amino-6-nitroquinoline) using voltammetric methods (DC voltammetry (DCV), differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV), adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV)). Practical use of optimized methods was demonstrated on the determination of 5A6NQ at CFRE in model samples of drinking and pond water.

In the last part of the thesis, a new method of determination of *trans*-resveratrol using voltammetric methods (DCV, DPV and AdSDPV) and flow injection analysis (FIA) with electrochemical detection at CFRE was developed and this detection was compared with electrochemical detection at CPE and in case of FIA also with spectrophotometric detection. Practical applications of the new methods were tested by determination of *trans*-resveratrol in Evelor pills.

Obsah

Seznam použitých zkratk	4
Abstrakt (CZ)	6
Abstract (EN)	7
1. Úvod	10
1.1 Stav problematiky	10
1.2 Cíl práce	11
1.3 Literatura	12
2. Resveratrol	13
2.1 Literatura	16
3. 5-Amino-6-nitrochinolin	21
3.1 Literatura	23
4. Elektrochemické metody a pracovní elektrody	24
4.1 Uhlíková pastová elektroda (CPE)	25
4.2 Uhlíková vláknová tyčinková elektroda (CFRE)	26
4.3 Literatura	28
5. Výsledky a diskuze	30
5.1 Voltametrické porovnání uhlíkových pastových elektrod z různě velkých mikrokuliček skelného uhlíku	30
5.1.1 Elektrochemická charakterizace CPEs	30
5.1.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na CPEs	31
5.2 Stanovení resveratrolu v nažkách, slupkách a listech pohanky tatarské a obecné pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě	32
5.2.1 Optimalizace metody	32
5.2.2 Reálné vzorky pohanek obecných a tatarských	33
5.3 Elektrochemické vlastnosti a stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na uhlíkových vláknových tyčinkových elektrodách	34
5.3.1 Elektrochemická charakterizace CFREs	34
5.3.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na CFREs	35
5.3.3 Reálné aplikace	35
5.4 Voltametrické a amperometrické stanovení <i>trans</i> -resveratrolu na uhlíkové vláknové tyčinkové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě	36

5.4.1 Voltametrické metody	36
5.4.2 Průtoková injekční analýza	37
5.4.3 Reálné vzorky	37
5.5 Literatura	38
6. Závěr	39
7. Příloha I	41
A Voltammetric comparison of the properties of carbon paste electrodes containing glassy carbon microparticles of various sizes	
8. Příloha II	49
Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode	
9. Příloha III	55
Voltammetric determination of 5-amino-6-nitroquinoline at a carbon fiber rod electrode	
10. Příloha IV	68
Determination of <i>trans</i> -resveratrol using voltammetric and amperometric methods at carbon fiber rod electrode and carbon paste electrode	
11. Příloha V - potvrzení účasti	80
12. Příloha VI – seznam publikací, orálních a plakátových prezentací	81

1. ÚVOD

Tato disertační práce je předkládána jako příspěvek ke stále významnější oblasti environmentální analýzy. Byla vypracována v rámci výzkumu v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí v Praze ve snaze proměřit a porovnat elektrochemické vlastnosti nových typů uhlíkových pastových a vláknových elektrod, které současně využít pro vývin vysoce citlivých a selektivních voltmetrických a amperometrických metod pro stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu a obou izomerů resveratrolu (*cis-* a *trans-*).

Práce je založena na připojených čtyřech vědeckých publikacích¹⁻⁴, které tvoří součást práce jako přílohy I až IV (Kapitoly 7 až 10). Publikace, které jsou součástí této disertační práce, jsou citovány jako tučný, podtržený horní index.

1.1 Stav problematiky

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) se běžně používají v moderních elektroanalytických metodách ke stanovení anorganických i organických analytů. Mezi výhody pasty patří snadná regenerace jejího povrchu, nízké hodnoty zbytkových proudů, šířka potenciálového okna srovnatelná s pevnými elektrodami a snadná modifikace pasty⁶. Meze stanovitelnosti na nemodifikovaných CPE jsou běžně 1×10^{-6} až 1×10^{-7} mol L⁻¹. Možnost využití CPE jako materiálu elektrochemického detektoru v průtokové injekční analýze (FIA) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) přineslo až využití mikrokuliček skelného uhlíku, jejichž pasta například s minerálním olejem je překvapivě stálá i v prostředí acetonitrilu a methanolu⁷.

Uhlíková vláknová tyčinková elektroda (CFRE) se řadí mezi kompozitní elektrody. Mezi výhody CFRE patří nízké pořizovací náklady, jednoduchá výroba, dostupnost nejrůznějších velikostí i tvarů. Přestože se nejedná o zcela novou elektrodu, vědeckých článků zabývajících se jejich elektrochemickými vlastnostem a použitím je jen málo^{7,8}.

Oba izomery resveratrolu (*cis*- a *trans*-) představují velice zajímavé látky se stále rostoucím zájmem⁹⁻¹¹. Resveratrol patří do skupiny stilbenů a fytoalexinů, který lze nalézt ve velké řadě rostlin. Mezi vlastnosti, které jsou důvodem takového zájmu o oba izomery, patří antioxidační, kardioprotektivní, antikarcinogenní, neuroprotektivní, fungicidní a hepatoprotektivní účinky. Resveratrolu je věnována celá kapitola 2 v této disertační práci, ve které jsou rozvedeny vlastnosti, výskyt i přehled použitých metod pro stanovení.

Druhou látkou, kterou se zabývá tato disertační práce, je 5-amino-6-nitrochinolin (5A6NQ), který patří do skupiny nitro- a aminoderivátů heterocyklických uhlovodíků. Na rozdíl od resveratrolu o 5A6NQ neexistuje moc vědeckých publikací. 5A6NQ byl pro naši práci zajímavý především z hlediska předešlých zkušeností^{12,13} a možnosti jeho využití k otestování elektrod i v oblastech katodických potenciálů, kterou resveratrol neumožňuje. Rovněž 5A6NQ je věnována celá jedna kapitola v této práci (kapitola 3).

1.2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinutí elektrochemických metod především pro stanovení *cis*- a *trans*-resveratrolu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a uhlíkové vláknové tyčinkové elektrodě (CFRE) a porovnání vlastností obou typů použitých elektrod. Jelikož jsou oba izomery resveratrolu citlivé na světlo, byl pro testování elektrochemických vlastností elektrod použit hexakynoželeznan draselný a 5-amino-6-nitrochinolin (5A6NQ), který umožňuje studium i v katodické oblasti potenciálů. Cílem práce bylo porovnat i uhlíkové pastové elektrody z hlediska velikosti mikrokuliček skelného uhlíku obsažených v pastě (průměry 0,4 – 12 μm , 10 – 20 μm , 20 – 50 μm). Rovněž sledovat vlastnosti uhlíkové vláknové tyčinkové elektrody o různých průměrech (o průměrech 0,8 mm, 2 mm a 3 mm) pomocí porovnání stanovení výše uvedených analytů (hexakynoželeznan draselný, 5-amino-6-nitrochinolin a oba izomery resveratrolu) s využitím voltametrických metod (DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), cyklické voltametrie (CV), adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV)) a průtokové injekční analýzy (FIA), a to porovnáním s CPE a spektrofotometrií v UV/VIS oblasti.

Nově vyvinuté voltametrické a amperometrické metody stanovení *cis*- a *trans*-resveratrolu aplikovat na reálné vzorky pohanky obecné a tatarské (stanovení obsahu resveratrolu ve vzorcích nažek, slupek a listů) a farmaceutický přípravek Evalor.

1.3 Literatura

1. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, A Voltammetric Comparison of the Properties of Carbon Paste Electrodes Containing Glassy Carbon Microparticles of Various Sizes, *J. Electroanal. Chem.*, 675 (2012): 18-24.
2. **L. Němcová**, J. Zima, J. Barek, D. Janovská, Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode, *Food Chem.*, 126 (2011): 374-378.
3. **L. Němcová**, H. Dejmková, J. Barek, J. Zima, Voltammetric determination of 5-amino-6-nitroquinoline at a carbon fiber rod electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011): 6373-6384.
4. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, Determination of *trans*-resveratrol using voltammetric and amperometric methods at carbon fiber rod electrode and carbon paste electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012): 9221-9231.
5. I. Švancara, K. Váňas, Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod, *Chem. Listy*, 88 (1994): 138-146.
6. J. Wang, U. Anik, J. W. Mo, J. M. Lu, A. N. Kawde, A. Muck, Glassy carbon paste electrodes, *Electrochem. Commun.*, 3 (2001): 203-208.
7. L. Nacamulli, E. Gileadi, Electrochemical properties of graphite fiber epoxy composite electrodes, *J. App. Electrochem.*, 13 (1983): 73-78.
8. X. Xu, S. G. Weber, Carbon fiber/epoxy composite ring-disk electrode: Fabrication, characterization and application to electrochemical detection in capillary high performance liquid chromatography, *J. Electroanal. Chem.*, 630 (2009): 75-80.
9. J. Šmidrkal, V. Filip, K. Melzoch, I. Hanzlíková, D. Buckiová, B. Křisa, Resveratrol, *Chem. Listy*, 95 (2001): 602-609.
10. L. Pirola, S. Frojdo, Resveratrol: one molecule, many targets, *Life*, 60 (2008): 323-332.
11. B. B. Aggarwal, S. Shishodia, *Resveratrol in health and disease*, eds. Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2006. ISBN: 0-8493-3371-7.
12. **L. Němcová**, Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí, *Bakalářská práce*, UK, Praha (2006).
13. **L. Němcová**, Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na uhlíkové pastové elektrodě, *Diplomová práce*, UK, Praha (2008).

2. RESVERATROL

Již dlouhá léta je věnována pozornost názoru, že zvýšená konzumace ovoce a zeleniny může snižovat riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, některých typů rakoviny a některých dalších onemocnění. Předpokládá se, že je to díky vysokému obsahu **antioxidantů** (název složen z řeckého slova *anti* – proti a latinského *oxidatio* – oxidace), tedy látek, které mají schopnost ochrany buněk před působením volných radikálů (např. reaktivní formy kyslíku)¹. Volné radikály vznikají z vdechovaného kyslíku a rovněž v procesu oxidace v organismu. Chovají se velice agresivně, v organismech narušují buněčnou stěnu, a pokud se jim to povede, narušují dál i vnitřní základní strukturu buňky včetně DNA². Antioxidanty lze dělit na přirozené (přirozeně se vyskytující v přírodě) a syntetické (uměle připravené). Mezi účinné přirozené přírodní antioxidanty, jež jsou součástí naší potravy, patří vitamin C, vitamin E, β -karoten a velká skupina látek souhrnně označovaných jako polyfenoly³.

Doposud bylo identifikováno několik tisíc fenolických látek s velkou rozmanitostí struktur, které obsahují alespoň jeden aromatický kruh s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. **Polyfenoly** představují jednu z nejběžnějších a nejrozšířenějších skupin látek v rostlinách, jedná se o sekundární metabolity rostlin vyskytující se ve všech vegetativních orgánech, květech i plodech. Polyfenoly se klasifikují do několika kategorií: lignany, flavonoidy, fenolické alkoholy, fenolické kyseliny a stilbeny⁴.

Stilbeny⁵⁻⁸ představují malou skupinu fenylypropanoidů charakterizovanou 1,2-difenyloethylenovou skupinou. Samotný název pochází z řeckého *stilbos* – zářící. Stilbeny existují jako stereoizomery ve formě (*E*)-stilbenu (*trans*-stilben) a (*Z*)-stilbenu (*cis*-stilben), jehož konjugace je stericky bráněna, a tento izomer je méně stabilní. Nejznámějším a nejvíce studovaným stilbenem je právě **resveratrol**. Dalším stilbenem je **piceatannol**^{9,10} (*trans*-3,3',4,5'-tetrahydroxystilben) běžně se vyskytující v cukrové třtině, bobulových plodech (slupka hroznů) a oříšcích, vykazuje antikarcinogenní a kardioprotektivní vlastnosti. Studie prokázaly, že se jedná o jeden z metabolitů resveratrolu vznikajících pomocí enzymů

cytochromu P450. V několika druzích borovice (převážně v jádrovém dřevě a plísňemi napadeném jehličí) a eukalyptu byl nalezen **pinosylvin**¹¹ (*trans*-3',5'-dihydroxystilben), který má antibakteriální, antifungicidní, estrogení a potenciální antikarcinogenní efekt. V extraktu kořene asijské rostliny *rhenum undulatum* (reveň kadeřavá), jež je součástí tradiční medicíny v Koreji, Japonsku a Číně, byl identifikován **rhaponticin**, který je glykosylovaný stilben **rhapontigenin**^{7,12} (3,3',5-trihydroxy-4''-methoxystilben). Rhapontigenin inhibuje uvolňování histaminu z žírných buněk (léčba alergií), rovněž má protizánětlivé, antikarcinogenní a kardioprotektivní účinky. Většina dosud známých sloučenin prokazuje potenciální kardioprotektivní, protizánětlivý a chemopreventivní efekt. Dalšími známými stilbeny jsou **pterostilben** (vyskytující se v vinných hroznech, borůvkách, brusnici tyčinkovité)^{13,14}, **astringin**¹⁵ (vinných hroznech), glykosid resveratrolu **piceid**¹⁶ (vinných hroznech, chmelu, čokoládě), dehydrooligomery resveratrolu **ε-viniferin** a **δ-viniferin**¹⁷ (vinných hroznech), **amurensin**¹⁸ (révě amurské), a další.

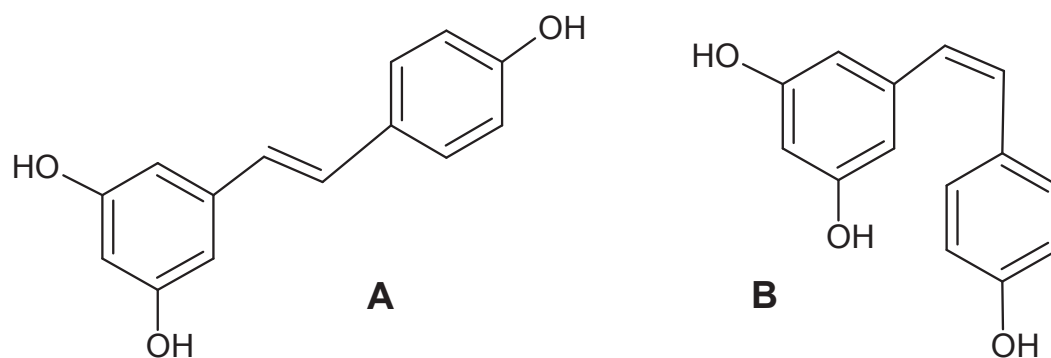
Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben, Obr. 2.1, jméno složené z latinských slov *res* – pocházející z „veratr“ od *veratrum* – čemeřice a koncovka „ol“ naznačuje přítomnost alkoholových skupin) byl poprvé izolován z kořenů čemeřice bílé (*Veratrum grandiflorum*) v roce 1940¹⁹, následně ze sušených kořenů křídlatky japonské (*Polygonum cuspidatum*) v roce 1963²⁰. Sušené kořeny křídlatky japonské byly využívány v tradiční čínské a japonské medicíně pod názvem „Ko-jo-kon“ k léčbě zánětů kůže, kvasinkových infekcí, poruch metabolismu tuků a onemocnění srdce. V roce 1976 byl resveratrol nalezen v listech a slupkách hroznového vína (*Vitis vinifera* L.)²¹. Od 90. letech 20. století vzrůstal zájem o jeho výskyt a vlastnosti, v důsledku epidemiologických studií²²⁻²⁵ prokazujících vztah mezi konzumací červeného vína a srdečními onemocněními, vysvětlující tzv. „Francouzský paradox“ (nižší četnost úmrtí v důsledku onemocnění koronárních tepen v některých částech Francie, navzdory vysoké spotřebě tuků).

Resveratrol, tak jak je charakteristické pro stilbeny, existuje ve dvou izomerních formách *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu. *Trans*-izomer je stabilnější forma, izomerizace *trans*- na *cis*-formu probíhá UV zářením a vysokými hodnotami pH, obrácený přechod izomerů z *cis*- na *trans*-formu probíhá působením světla ve viditelné oblasti, vysokými teplotami nebo nízkými hodnotami pH²⁶. V rostlinném materiálu se obvykle vyskytuje směs obou izomerů, ale množství *trans*-resveratrolu obvykle převažuje. Komerčně dostupný je pouze *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol je částečně možné z *trans*-formy připravit ozářením denním světlem, ale výsledkem bude vždy směs obou izomerů²⁷.

Resveratrol patří do skupiny fytoalexinů (název složen z řeckých slov *phuto* – rostlina a *alexein* – chránit), což jsou sekundární metabolity rostlin, které se tvoří jako odpověď na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo po napadení rostliny bakteriemi, viry, plísněmi (např. *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*) či houbami. Jeho výskyt je velmi široký, udává se, že byl nalezen ve více jak 72 rostlinných druzích²⁸. Mezi rostliny pozitivně testované na resveratrol můžeme zařadit vinné hrozny (s obsahem 50 až 100 mg resveratrolu na kilogram sušiny)^{29,30}, červené víno (1 až 6 mg L⁻¹)^{31,32,33}, bílé víno (0,2 až 0,8 mg L⁻¹)^{34,35}, arašídů³⁶, moruše³⁷, rajčata³⁸, pistácie³⁹, červené zeli⁴⁰, brokolice⁴⁰, špenát⁴⁰, čekanka⁴¹, brusinky⁴², borůvky⁴³ a další. Resveratrol byl rovněž identifikován spolu s ostatními flavonoidy v pohance⁴⁴. Jelikož nebyl dosud znám konkrétní obsah resveratrolu v pohance, část této práce byla zaměřena právě na stanovení resveratrolu v nažkách, slupkách a listech ve vybraných varietách pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum* Mönch) a tatarské (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn)⁴⁵.

Ve velké řadě publikací byly prokázány protizánětlivé⁴⁶, fungicidní⁴⁷, antioxidační⁴⁸, neuroprotektivní⁴⁹, kardioprotektivní⁵⁰⁻⁵², antikarcinogenní⁵³⁻⁵⁵, hepatoprotektivní⁵⁶, fytoestrogenní⁵⁷ účinky. Pozitivní výsledky byly prokázány na civilizační choroby jako diabetes⁵⁸ a Alzheimerovu chorobu⁵⁹. Resveratrol prokázal jak *in vitro*, tak *in vivo* chemopreventivní a chemoterapeutické účinky, jelikož zasahuje do řízení buněčného cyklu a apoptózy^{60,61}.

Mezi metody využívané ke stanovení resveratrolu se řadí HPLC s UV/VIS^{62,63}, MS⁶⁴, fluorescenční⁶⁵ a elektrochemickou⁶⁶ detekcí, dále GC/MS^{67,68} a elektroforéza^{69,70}. Elektrochemické vlastnosti resveratrolu byly zkoumány na elektrodě ze skelného uhlíku⁷¹, kde byly pozorovány dva ireverzibilní oxidační píky odpovídající oxidaci jedné fenolové a jedné resorcinolové hydroxyskupině. Dále byla použita stříbrná elektroda⁷², kde byl zjištěn poměrně úzký lineární dynamický rozsah použité adsorpční rozpouštěcí voltametrie mezi koncentracemi 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol L⁻¹ a 1×10^{-8} až 9×10^{-8} mol L⁻¹. Na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) z grafitového prášku a parafinového oleje^{73,74} byl pozorován jeden ireverzibilní oxidační pík.



Obr.2.1 Struktura *trans*-resveratrolu (**A**) a *cis*-resveratrolu (**B**).

3.1 Literatura

1. A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez, J. C. Parajó, Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72 (2001): 145-171.
2. O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annal. Bot.*, 91 (2003): 179-194.
3. M. S. Brewer, Natural antioxidants: sources, compounds, mechanism of action, and potential application, *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 10 (2011): 221-247.
4. G. F. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, A. Pollio, plant polyphenols and their anti-carcinogenic properties: a review, *Molecules*, 16 (2011): 1486-1507.
5. J. Chong, A. Poutaraud, P. Huguency, Metabolism and roles of stilbenes in plants, *Plant Sci.*, 177 (2009): 143-155.
6. B. Sun, A. M. Ribes, M. C. Leandro, A. P. Belchior, M. I. Spranger, Stilbenes: quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation, *Anal. Chim. Acta*, 563 (2006): 382-390.
7. K. A. Roupe, C. M. Remsberg, J. A. Yáñez, N. M. Davies, Pharmacometrics of stilbenes : segueing towards the clinic, *Curr. Clin. Pharmacol.*, 1 (2006): 81-101.
8. V. Papper, G. I. Likhtenshtein, Substituted stilbenes: a new view on well-known systems new applications in chemistry and biophysics, *J. Photochem. Photobiol. A*, 140 (2001): 39-52.
9. Y. M. Lee, D. Y. Lim, H. J. Cho, M. R. Seon, J. K. Kim, B. Y. Lee, J. H. Y. Park, Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen-insensitive DU145 human prostate cells via the inhibition of CDK activity, *Cancer Lett.*, 285 (2009): 166-173.
10. W. P. Chen, L. M. Hung, C. H. Hsueh, L. P. Lai, M. J. Su, Piceatannol, a derivative of resveratrol, moderately slows I(Na) inactivation and exerts antiarrhythmic action in ischaemia-reperfused rat hearts, *Br. J. Pharmacol.*, 157 (2009): 381-391.
11. S. K. Lee, H. J. Lee, H. Y. Min, E. J. Park, K. M. Lee, Y. H. Ahn, Y. J. Cho, J. H. Pyee, Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine, *Fitoterapia*, 76 (2005): 258-260.
12. J. K. Kim, N. Kim, Y. H. Lim, Evaluation of the antibacterial activity of rhapontigenin produced from rhapontin by biotransformation against *Propionibacterium acnes*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (2010): 82-87.

13. R. Pezet, V. Pont, Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*, *Plant Physiol. Biochem.*, 26 (1988): 603-607.
14. R. J. Chen, C. T. Ho, Y. J. Wang, Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells, *Mol. Nutr. Food Res.*, 54 (2010): 1819-1832.
15. J. M. Merillon, B. Fauconneau, P. W. Tegu, L. Barrier, J. Vercauteren, F. Huguet, Antioxidant activity of the stilbene astrigin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures, *Clin. Chem.*, 43 (1997): 1092-1093.
16. A. I. Romero-Perez, M. Ibern-Gomez, R. M. Lamuela-Raventos, M. C. Torre-Boronat, Piceid, the major resveratrol derivative in grapes juices, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999): 1533-1536.
17. A. E. A. Bala, A. Kollmann, P. H. Ducrot, A. Majira, L. Kerhoas, P. Leroux, R. Delorme, J. Einhorn, Cis epsilon-viniferin: a new antifungal resveratrol dehydromer from *Cyphostemma crotalarioides* roots, *J. Phytopathol.*, 148 (2000): 29-32.
18. K. S. Huang, M. Lin, Y. H. Wang, Synthesis of Amurensin H, a new resveratrol dimer from the roots of *Vitis Amurensis*, *Chinese Chem. Lett.*, 10 (1999): 817-820.
19. M. J. Takaoka, Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.), *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial Univ.*, 3 (1940): 1-16.
20. S. Nonomura, H. Kanagawa, A. Makimoto, Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc), *Yakagaku Zasshi*, 83 (1963): 988-990.
21. P. Langcake, R. J. Pryce, Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of vitaceae as a response to infection or injury, *Phys. Plant Pathol.*, 9 (1976): 77-86.
22. S. Renaud, M. Delorgeril, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease, *Lancet*, 339 (1992): 1523-1526.
23. M. H. Criqui, B. L. Ringel, Does diet or alcohol explain the French paradox, *Lancet*, 344 (1994): 1719-1723.
24. M. L. Burr, Explaining the French paradox, *J. Roy. Soc. Health*, 115 (1995): 217-219.
25. J. Constant, Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox, *Clin. Cardiol.*, 20 (1997): 420-424.
26. B. C. Trela, A. L. Waterhouse, Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996): 1253-1257.
27. J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada, A. T. Sanches-Silva, M. A. Lage-Yusty, Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines, *Eur. Food Res. Technol.*, 225 (2007): 789-796.
28. J. Šmidrkal, V. Filip, K. Melzoch, I. Hanzlíková, D. Buckiová, B. Křisa, Resveratrol, *Chem. Listy*, 95 (2001): 602-609.
29. E. Fan, K. Zhang, S. Jiang, C. Yan, Y. Bai, Analysis of *trans*-resveratrol in grapes by micro-high performance liquid chromatography, *Anal. Sci.*, 24 (2008): 1019-1023.
30. X. D. Li, B. H. Wu, L. J. Wang, S. H. Li, Extractable amounts of *trans*-resveratrol in seed and berry skin in *Vitis* evaluated at the germplasm level, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006): 8804-8811.
31. T. G. Diaz, I. D. Meraz, D. A. Rodriguez, Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid-liquid extraction, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007): 1999-2007.

32. Y. Y. Peng, Q. C. Chu, J. N. Ye, Determination of phenolic constituents of biological interest in red wine by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004): 153-156.
33. S. A. S. S. Gomes, J. M. F. Nogueira, M. J. F. Rebelo, An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004): 1211-1216.
34. J. Lopez-Heznandez, P. Paseiro-Losada, A. T. Sanches-Silva, M. A. Lage-Yusty, Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines, *Eur. Food Res. Technol.*, 225 (2007): 789-796.
35. M. Spanila, J. Pazourek, M. Farkova, J. Havel, Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines, *J. Chromatogr. A*, 1084 (2005): 180-185.
36. F. Medina-Bolivar, J. Condori, A. M. Rimando, J. Hubstenberger, K. Shelton, S. F. O'Keefe, S. Bennett, M. C. Dolan, Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut, *Phytochem.* 68 (2007): 1992-2003.
37. W. Song, H. J. Wang, P. Bucheli, P. F. Zhang, D. Z. Wei, Y. H. Lu, Phytochemical profiles of different mulberry (*morus* sp.) species from China, *J. Agric. Food Chem.*, 57 (2009): 9133-9140.
38. Y. Peng, Y. Zhang, J. Ye, Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008): 1838-1844.
39. F. Grippi, L. Crosta, G. Aiello, M. Tolomeo, F. Oliveri, N. Gebbia, A. Curione, Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination, *Food Chem.*, 107 (2008): 483-488.
40. I. Kolouchova, K. Melzoch, J. Smidrkal, V. Filip, The content of resveratrol in vegetables and fruit, *Chem. Listy*, 99 (2005): 492-495.
41. D. A. Evans, J. B. Hirsch, S. Dushenkov, Phenolics, inflammation and nutrigenomics, *J. Sci. Food Agric.*, 86 (2006): 2503-2509.
42. Y. Wang, F. Catana, Y. N. Yang, R. Roderick, R. B. Breemen, An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002): 431-435.
43. A. M. Rimando, R. Cody, Determination of stilbenes in blueberries, *LcGc N. Am.*, 23 (2005): 1192-1200.
44. J. Y. Qian, D. Mayer, M. Kuhn, Flavonoids in fine buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) flour and their free radical scavenging activities, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 95 (1999): 343-349.
45. **L. Nemicova**, J. Zima, J. Barek, D. Janovska, Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode, *Food Chem.*, 126 (2011): 374-378.
46. J. A. Nichols, S. K. Katiyar, Skin protection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms, *Arch. Dermatol., Res.*, 302 (2010): 71-83.
47. L. Pirola, S. Frojdo, Resveratrol: one molecule, many targets, *Life*, 60 (2008): 323-332.
48. A. Matsuoka, Y. Kodama, K. Fukuhara, S. Honda, M. Hayashi, K. Sai, M. Hasebe, Y. Fujiwara, A pilot study of evaluation of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice, *Food Chem. Toxicol.*, 46 (2008): 1125-1130.
49. U. Sonmez, A. Sonmez, G. Erbil, I. Tekmen, B. Baykara, Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats, *Neurosci. Lett.*, 420 (2007): 133-137.

50. D. Delmas, B. Jannin, N. Latruffe, Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49 (2005): 377-395.
51. F. Zhang, Y. Wu, Resveratrol may be an effective prophylactic agent for ischemic stroke, *J. Formos. Med. Assoc.*, 110 (2011): 485-486.
52. V. W. Dolinsky, J. R. B. Dyck, Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.*, 1812 (2011): 1477-1489.
53. A. Kueck, A. W. Opipari, K. A. Griffith, L. Tan, M. Choi, J. Huang, H. Wahl, J. R. Liu, Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cell, *Gynecol. Oncol.*, 107 (2007): 450-457.
54. S. B. Jones, S. E. DePrimo, M. L. Whitfield, J. D. Brooks, Resveratrol-induced gene expression profiles in human prostate cancer cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14 (2005): 596-604.
55. R. G. Mehta, G. Murillo, R. Naithani, X. J. Peng, Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come?, *Pharm. Res.*, 27 (2010): 950-961.
56. J. A. Rubiolo, G. Mithieux, F. V. Vega, Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes, *Eur. J. Pharmacol.*, 591 (2008): 66-72.
57. J. Moravcova, T. Kleinova, Fytoestrogeny ve výživě-přinášejí užitek nebo riziko?, *Chem. Listy*, 96 (2002): 282-289.
58. K. Szkudelka, T. Szkudelski, Resveratrol, obesity and diabetes, *Eur. J. Pharm.*, 635 (2010): 1-8.
59. B. K. Harikumar, B. B. Aggarwal, Resveratrol a multitargeted agent for age-associated chronic diseases, *Cell Cycle*, 7 (2008): 1020-1035.
60. B. B. Aggarwal, S. Shishodia, *Resveratrol in health and disease*, eds. Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2006. ISBN: 0-8493-3371-7.
61. M. Shakibaei, K. B. Harikumar, B. B. Aggarwal, Resveratrol addiction: to die or not to die, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53 (2009): 115-128.
62. H. L. Huang, J. Q. Zhang, G. T. Chen, Z. Q. Lu, X. M. Wang, N. Sha, B. Shao, P. Li, D. A. Guo, High performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of oxyresveratrol and resveratrol in rat plasma after oral administration of Smilax china extract, *Biomed. Chromatogr.*, 22 (2008): 421-427.
63. E. H. Siemann, L. L. Creasy, Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, 43 (1992): 49-52.
64. R. H. Liu, J. Y. Zhang, M. J. Liang, W. D. Zhang, S. K. Yan, M. Lin, Simultaneous analysis of eight bioactive compounds in Danning tablet by HPLC-ESI-MS and HPLC-UV, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007): 1007-1012.
65. R. Lopez, P. Dugo, L. Mondello, Determination of *trans*-resveratrol in wine by micro-HPLC with fluorescence detection, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007): 669-672.
66. I. Kolouchova-Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines, *Food Chem.*, 87 (2004): 151-158.
67. R. Montes, M. Garcia-Lopez, I. Rodriguez, R. Cela, Mixed-mode solid-phase extraction followed by acetylation and gas chromatography mass spectrometry for the reliable determination of *trans*-resveratrol in wine samples, *Anal. Chim. Acta*, 673 (2010): 47-53.
68. E. G. Fan, S. Lin, D. L. Du, Y. J. Jia, L. Kang, K. Zhang, Current separative strategies used for resveratrol determination from natural sources, *Anal. Sci.*, 3 (2011): 2454-2462.

69. Y. Y. Peng, Y. W. Zhang, J. N. Ye, Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008): 1838-1844.
70. S. Orlandini, L. Giannini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Multivariate optimization and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical, *Talanta*, 74 (2008): 570-557.
71. O. Corduneanu, P. Janeiro, A. M. O. Brett, On the electrochemical oxidation of resveratrol, *Electroanalysis*, 18 (2006): 757-762.
72. S. Y. Dong, J. B. Zheng, Y. L. Ning, H. Gao, Adsorptive voltammetric behavior of resveratrol and its application at silver electrode, *Chem. J. Chin. Univ.-Chin.*, 24 (2003): 428-430.
73. H. F. Zhang, L. F. Xu, J. B. Zheng, Anodic voltammetric behavior of resveratrol and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine, *Talanta*, 71 (2007): 19-24.
74. J. X. Liu, Y. J. Wu, F. Wang, L. Gao, B. X. Ye, Adsorptive voltammetric behaviors of resveratrol at graphite electrode and its determination in tablet dosage form, *J. Chin. Chem. Soc.*, 55 (2008): 264-270.

3. 5-AMINO-6-NITROCHINOLIN

5-Amino-6-nitrochinolin (5A6NQ, Obr. 4.1) patří do skupiny nitro- a aminoderivátů heterocyklických uhlovodíků (HC). Toxikologické vlastnosti 5A6NQ byly studovány na *Tetrahymena pyriformis* (IGC₅₀-koncentrace způsobující 50% pokles růstu), které jsou srovnatelné s 3,5-dinitroanilinem¹. Látka byla použita na syntézu nových druhů lokálních anestetik² a některých radioligandů³ s využitím v pozitronové emisní tomografii.

Obecně jsou heterocyklické aminy (HCA) skupinou škodlivých látek^{4,5}. Vznikají zejména při tepelném zpracování masa (nad 150 °C)^{6,7}, spalování fosilních paliv⁸ a nacházejí se v cigaretovém kouři⁹. Z potravy bylo izolováno nejméně 23 HCA, chemická struktura byla určena u 19 z nich a u 10 byly prokázány mutagenní a karcinogenní účinky¹⁰. Genotoxicita HCA závisí na metabolické aktivaci detoxikačními enzymy, hlavně jaterním cytochromem P 450. Enzym oxiduje aminoskupinu na hydroxyaminoskupinu, která je následně esterifikována a tato konečná forma tvoří adukty s DNA¹¹.

Karcinogenní a mutagenní vlastnostmi byly prokázány u 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-*f*] chinolinu a 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] chinolinu^{12,13}.

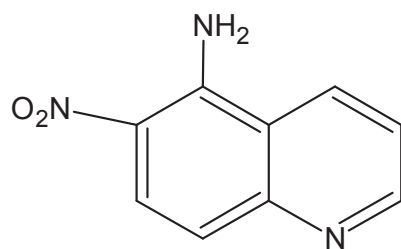
5-Amino-6-nitrochinolin byl využit k testování elektrochemických vlastností použitých nových elektrod. Elektrochemické vlastnosti 5A6NQ byly již studovány v předešlých pracích¹⁴⁻¹⁶. Z proměřených cyklických voltamogramů v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru o pH 2, 7 a 11 na CPE (s obsahem mikrokuliček skelného uhlíku s průměry 0,4 – 12 μm) vyplývá, že redukce i oxidace 5A6NQ při daných podmínkách probíhá ireverzibilně za kontroly nejen difúze a během měření dochází k pasivaci pracovní elektrody. Pro použité metody anodické a katodické DCV, DPV a AdSDPV byly nalezeny optimální podmínky a naměřeny meze detekce, které jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1 ^{15,16}

Optimální podmínky a meze detekce pro voltametrické metody stanovení 5A6NQ.

Voltametrická metoda stanovení 5A6NQ	L_D mol L ⁻¹
Anodická DPV v BR pufru o pH 11 s MeOH (1:1, <i>V/V</i>)	$2,0 \times 10^{-6}$
Anodická DCV v BR pufru o pH 11 s MeOH (1:1, <i>V/V</i>)	$3,1 \times 10^{-6}$
Katodická DPV 0,1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ o pH 1,6 s MeOH (1:1, <i>V/V</i>)	$1,3 \times 10^{-6}$
Katodická DPV v BR pufru o pH 11 s MeOH (1:1, <i>V/V</i>)	$1,9 \times 10^{-6}$
Katodická DCV v 0,1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ o pH 1,6 s MeOH (1:1, <i>V/V</i>)	$1,5 \times 10^{-6}$
Anodická AdSDPV v BR pufru o pH 11 s MeOH (95:5, <i>V/V</i>), $E_{aku} = 500$ mV, $t_{aku} = 5$ minut	$1,4 \times 10^{-6}$

Po získání poznatků z voltametrických metod bylo prostudováno chování 5A6NQ v průtokových systémech. Vyvinuta byla metoda stanovení 5A6NQ na HPLC-RP 18 s elektrochemickou detekcí na CPE (s obsahem mikrokuliček skelného uhlíku s průměry 0,4 – 12 μm) v porovnání se spektrofotometrickou detekcí (295 nm). V případě elektrochemické detekce byla využita jak oxidace, tak i redukce 5A6NQ na CPE. V případě oxidace byly nalezeny optimální podmínky: BR pufr pH 7 s methanolem v poměru 10:90 (*V/V*) a potenciál amperometrické detekce +1,2 V. Meze stanovitelnosti zjištěné pro spektrofotometrickou ($L_D = 1,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) a amperometrickou detekci ($L_D = 1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) jsou srovnatelné¹⁴. Pro redukci 5A6NQ byly zvoleny jako optimální mobilní fáze tvořená fosfátovým pufrům o pH 2 s methanolem v poměru 10:90 (*V/V*) a potenciál amperometrické detekce -0,9 V. Ze získaných mezí detekce pro spektrofotometrickou ($L_D = 1,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) a amperometrickou detekci ($L_D = 4,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) je patrné, že elektrochemická detekce s využitím redukce 5A6NQ nedosahuje takových výsledků jako pro využití oxidace 5A6NQ^{15,16}.



Obr.4.1 Struktura 5-amino-6-nitrochinolinu.

4.1 Literatura

1. M. P. Gonzalez, H. G. Diaz, M. A. Cabrera, R. M. Ruiz, A novel approach to predict a toxicological property of aromatic compounds in the *Tetrahymena pyriformis*, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004): 735-744.
2. F. E. Goda, A. Aziz, H. A. Ghoneim, Synthesis and biological evaluation of novel 6-nitro-5-substitued aminoquinolines as local anesthetic and anti-arrhythmic agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (2005) 3175-3183.
3. M. Karramkam, F. Dolle, W. Valette, L. Basret, Y. Bromouille, F. Hinnen, F. Vaufrey, C. Franklin, S. Bourg, C. Coulon, M. Ottaviani, M. Delaforge, C. Loc'h, M. Bottlaender, C. Crouzel, Synthesis of a fluorine-18-labelled of 6-nitroquipazine, as a radioligand for the in vivo serotonin transporter imaging with PET, *Bioorg. Med. Chem.*, 10 (2002): 2611-2623.
4. K. W. Cheng, F. Chen, M. F. Wang, Heterocyclic amines: chemistry and health, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50 (2006): 1150-1170.
5. R. J. Turesky, L. Le Marchand, Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines, *Chem. Res. Toxicol.*, 24 (2011): 1169-1214.
6. M. S. Alaejos, A. M. Afonso, Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 10 (2011): 52-108.
7. M. Murkovic, Analysis of heterocyclic aromatic amines, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007): 139-146.
8. L. L. Okumura, N. R. Stradiotto, Simultaneous determination of quinoline and pyridine compounds in gasoline and diesel by differential pulse voltammetry, *Electroanalysis*, 19 (2007): 709-716.
9. T. A. Sasaki, J. M. Wilkins, J. B. Forehand, S. C. Moldoveanu, Analysis of heterocyclic amines in mainstream cigarette smoke using a new NCI GC-MS technique, *Anal. Lett.*, 34 (2001): 1749-1761.
10. J. H. Weisburger, Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health, *Mut. Res.*, 511 (2002): 89-112.
11. T. Sugimura, Food and cancer, *Toxicology*, 181 (2002): 17-21.
12. L. R. Ferguson, Dietary influences on mutagenesis-Where is this field going?, *Environ. Mol. Mutagen.*, 51 (2010): 909-918.
13. K. Puangsombat, P. Gadgil, T. A. Houser, M. C. Hunt, J. S. Smith, Heterocyclic amine content in commercial ready to eat meat products, *Meat Sci.*, 88 (2011): 227-233.
14. **L. Němcová**, Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí, *Bakalářská práce*, UK, Praha (2006).
15. **L. Němcová**, Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na uhlíkové pastové elektrodě, *Diplomová práce*, UK, Praha (2008).
16. **L. Němcová**, J. Zima, J. Barek, Determination of 5-amino-6-nitroquinoline at a carbon paste electrode, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 74 (2009): 1477-1488.

4. ELEKTROCHEMICKÉ METODY A PRACOVNÍ ELEKTRODY

Historicky první záznam polarogramu (voltamogramu) byl uskutečněn 9. února 1922 Jaroslavem Heyrovským, který za objev polarografie 10. prosince 1959 převzal Nobelovu cenu. Od té doby voltametrické (polarografii je historicky označována voltametrická metoda s pracovní kapající rtuťovou elektrodou) metody prošly značným vývojem. Se vzrůstajícím nárokem na citlivost obzvláště ve farmaceutické a biochemické praxi byla polarografie nahrazována citlivějšími a nákladnějšími metodami spektrálními, chromatografickými, a dalšími. V šedesátých letech z tohoto důvodu zájem o polarografii poklesl, ale už v sedmdesátých letech lze zaznamenat obrovskou vlnu opětovného zájmu, který byl vyvolán dostupností citlivých pulzních polarografů¹. Výhody polarografických a voltametrických technik jako jsou: nízké pořizovací náklady a provozní náklady, široký dynamický lineární rozsah, široké spektrum elektrochemicky aktivních látek, vysoká citlivost (často stanovení i subnanomolárních koncentrací elektrochemicky aktivních látek), vysoká rychlost a snadná automatizovatelnost a v řadě případů postačující selektivita, často umožňují použití i v konkurenci převládajících spektrometrických a separačních metod. V neposlední řadě jsou voltametrické metody nezávislými analytickými metodami (z pohledu legislativních požadavků pro nutnost použití několika nezávislých metod jako důkaz přítomnosti určité látky v analyzovaném vzorku), kde molekula analytu je přímo zdrojem měřeného signálu způsobeného proudem vznikajícím při výměně elektronů mezi pracovní elektrodou a molekulou samotné látky².

V této práci byly využity následující techniky: DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), cyklická voltametrie (CV) a adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV). Elektrochemický detektor (amperometrický) byl rovněž použit v kombinaci s HPLC a FIA spolu se spektrofotometrickým detektorem zapojeným v sérii. Principy, možnosti a omezení výše uvedených technik jsou popsány v monografiích³⁻⁵.

4.1 Uhlíková pastová elektroda (CPE)

Uhlíkové pastové elektrody (carbon paste electrode, CPE, Obr. 4.1 A) byly vyvinuty profesorem Ralphem Normanem Adamsem v roce 1958⁶ ve snaze nalézt uhlíkovou alternativu ke kapající rtuťové elektrodě s obnovitelným povrchem využitelnou pro anodické oxidace. Realizace této „kapající uhlíkové elektrody“ se neosvědčila, avšak hustší směs práškového uhlíku a organické kapaliny se ukázala jako velmi vhodný materiál pro konstrukci elektrod se zajímavými vlastnostmi⁷.

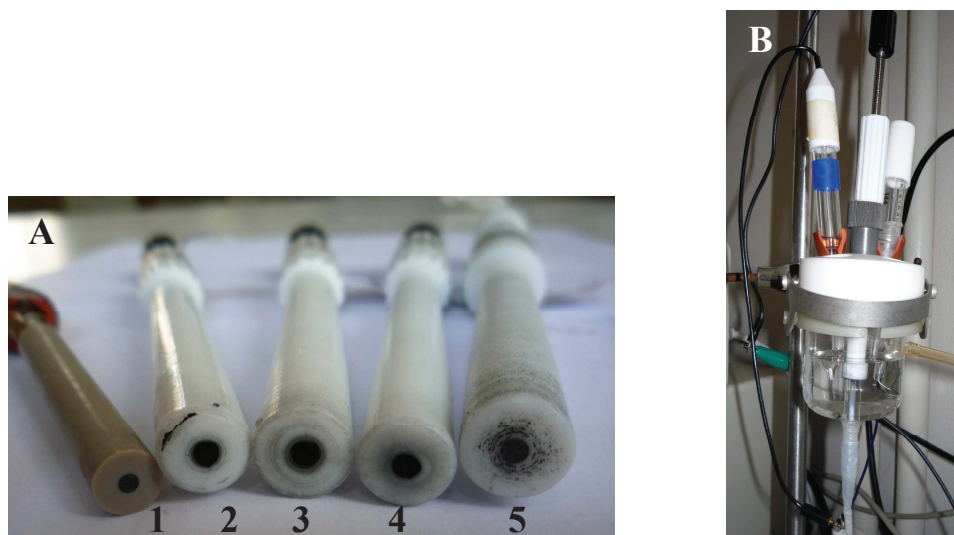
Uhlíková pastová elektroda patří mezi heterogenní uhlíkové elektrody⁸, připravuje se důkladným smíšením uhlíkového prášku s vhodným pojivem a naplněním do elektrodového pouzdra⁹. Jako uhlíkové materiály se používají nejčastěji grafitový prášek nebo mikrokuličky skelného uhlíku¹⁰⁻¹², které umožňují práci i v prostředích s vysokým obsahem organického rozpouštědla. Požadovanými vlastnostmi uhlíkového materiálu je stejná velikost částic a nízká adsorpční schopnost⁹. Jako pojivo se používají převážně chemicky inertní, elektrochemicky neaktivní a málo těkavé látky, nejčastěji organické kapaliny jako např. minerální, silikonový nebo parafinový olej (Nujol). Elektrochemické vlastnosti CPEs se odvíjejí od jednotlivých komponent uhlíkové pasty. Ač by mohly být jako elektroda brány pouze uhlíkové částice a nikoli elektricky nevodivé organické pojivo (pastovací kapalina), v řadě případů bývají elektrodové děje komplikovány přítomností pastovací kapaliny, neboť tato se může účastnit dějů spojených s přenosem elektronu a rovněž se podílet na fyzikálních a chemických interakcích s analytem či jinými složkami roztoku. Tenký film kapaliny, ať téměř spojitý nebo nesouvislý, zpomaluje v řadě případů přenos náboje (hmoty) na elektrodovém povrchu, což se jako výsledek projevuje vyšším přepětím některých redoxních systémů na CPEs ve srovnání s pevnými uhlíkovými elektrodami. Chování řady připravených past se mnohdy ustálí až po určité době (asi 24 hodin), zřejmě v důsledku následné samovolné homogenizace čerstvě připravené směsi. Na základě těchto zkušeností se zdá vhodnější nechat elektrody naplněné čerstvou pastou v klidu ustálit alespoň přes noc. Naplněná elektroda se přechovává ponořena koncovým otvorem v nádobce s destilovanou vodou, aby se zabránilo pozvolnému vysychání pasty¹³.

Mezi výhody CPE patří velice snadná modifikace pasty¹⁴, snadná regenerace povrchu (postačuje pootočení pístu a otření pasty do vlhkého filtračního papíru), nízké hodnoty zbytkových proudů a šířka potenciálového okna srovnatelná s pevnými elektrodami.

Pokud zde popisujeme vlastnosti CPEs, musíme uvést i nevýhody, mezi které patří nižší reprodukovatelnost odezvy daná heterogenitou povrchu pasty a nezanedbatelný proud,

způsobený elektrodovou redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě, který se projevuje rušivě v oblasti katodických potenciálů¹⁵.

Při analýzách složitých směsí organických látek separačními metodami se CPEs rovněž uplatnily při konstrukcích elektrochemických detektorů¹⁶, např. při spojení HPLC nebo FIA s amperometrickým detektorem typu wall-jet (Obr. 4.1 B), které bylo použito i v této práci^{17,18}. U těchto detektorů jsou pozitivně hodnoceny hlavně mechanické vlastnosti pasty a jednoduchost regenerace jejího povrchu.



Obr.4.1 Fotografie A) CPE z grafitového prášku a minerálního oleje (5), CPE z mikrokuliček skelného uhlíku a minerálního oleje (2-4) a elektroda ze skelného uhlíku (1), B) elektrochemický detektor typu wall-jet s pracovní CPE.

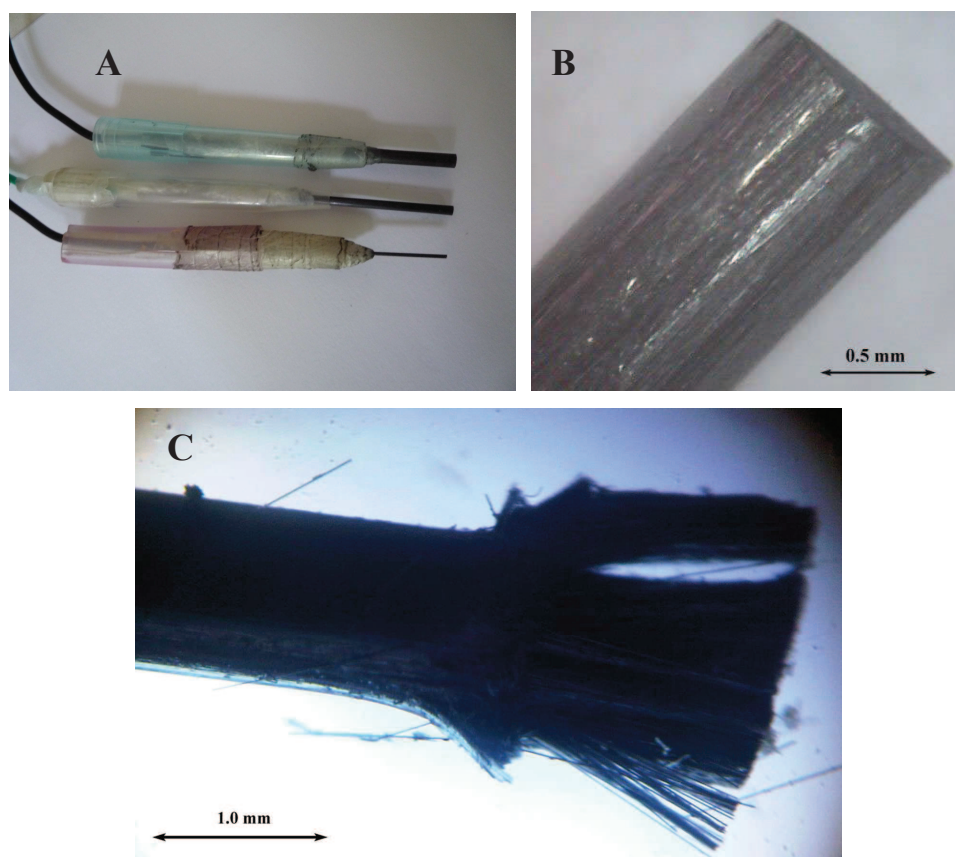
4.2 Uhlíková vláknová tyčinková elektroda (CFRE)

Uhlíková vláknová tyčinková elektroda (carbon fiber rod electrode, CFRE, Obr. 4.2 A) se řadí mezi kompozitní elektrody. Konstrukce elektrody z uhlíkové vláknové tyčinky (Obr. 4.2 B, C) je poměrně jednoduchá, obnáší připojení elektrického kontaktu (v našem případě vodivý lak a měděný drát) k několikacentimetrovému kousku tyčinky. Uhlíkové vláknové tyčinky se vyrábějí průmyslově procesem označovaným jako pultruze, ve kterém se souběžně orientovaná uhlíková vlákna vedou do vany s pryskyřicí a protlačují se do požadovaného tvaru za zvýšeného tlaku a teploty. Použití uhlíkových vláknových tyčinek je velice široké, všude tam, kde je zapotřebí lehký, ale pevný materiál (modelářství).

Samostatná uhlíková vlákna jsou v elektrochemii známa už delší dobu¹⁹. Své využití mají především v oblastech, kde je potřeba měřit ve velmi malých objemech (*in vivo*). Jejich průměr se pohybuje v rozmezí 5-50 μm a vyrábějí se tepelným zpracováním z výchozího

polymeru (polyakrylonitrilu) nebo z ropné pryskyřice. Uhlíková vlákna byla použita do různých kompozitních elektrod, např. náhodně orientovaná nasekaná vlákna s polymery jako nylon^{20,21}.

Mezi výhody CFRE patří především nízká cena, jednoduchá výroba, dostupnost nejrůznějších velikostí a tvarů. I přes to, že se nejedná o zcela novou elektrodu, pracích věnujících se elektrochemickým vlastnostem kompozitních elektrod na bázi uhlíkových vláken a epoxidu není mnoho²²⁻²⁴ a jen jedna práce je věnována jejich využití v kapilární HPLC²⁵. Z našich prací, které jsou rovněž součástí této práce, byly zjištěny zajímavé elektrochemické vlastnosti CFRE^{26,18}. Stěny uhlíkové tyčky jsou elektrochemicky neaktivní a síla signálu nezávisí na hloubce ponoření elektrody. Šířka potenciálového okna je mírně užší než u GCE. Povrch elektrody lze obnovovat mechanicky přešetněním na jemném brusném papíře nebo pomocí suspenze aluminy. Opakovatelnost signálu při obnovování povrchu po každém měření je pod 4,5 %.



Obr.4.2 Fotografie **A)** vyrobené uhlíkové vláknové tyčinkové elektrody s průměrem 0,8 mm, 2,0 mm a 3,0 mm, **B)** uhlíkové vláknová tyčinka s průměrem 0,8 mm, **C)** úmyslně poškozený konec uhlíkové vláknové tyčinky s průměrem 0,8 mm.

4.3 Literatura

1. R. Kalvoda, J. Kůta, Moderní polarografické a voltametrické metody, *Chem. Listy*, 74 (1980): 674-693.
2. J. Barek, K. Pecková, V. Vyskočil, Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii, *Chem. Listy*, 103 (2009): 889-893.
3. J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, skriptum, Karolinum 2005.
4. R. N. Adams, *Electrochemistry at solid electrodes*, M. Dekker, New York 1969.
5. Z. Samec, *Elektrochemie*, skriptum, Karolinum 1999.
6. R. N. Adams, Carbon paste electrodes, *Analytical Chemistry*, 30 (1958): 1576.
7. J. Zima, I. Švancara, J. Barek, K. Vytras, Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 39 (2009): 204-227.
8. J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková, B. Yosypchuk, J. Zima, Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds, *Electroanalysis*, 19 (2007): 2003-2014.
9. I. Švancara, K. Vytřas, Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod, *Chem. Listy*, 88 (1994): 138-146.
10. J. Barek, A. Muck, J. Wang, J. Zima, Study of voltammetric determination of carcinogenic 1-nitropyrene and 1-aminopyrene using a glassy carbon paste electrode, *Sensors*, 4 (2004): 47-57.
11. J. Wang, U. Anik, J. W. Mo, J. M. Lu, A. N. Kawde, A. Muck, Glassy carbon paste electrodes, *Electrochem. Commun.*, 3 (2001): 203-208.
12. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, A Voltammetric Comparison of the Properties of Carbon Paste Electrodes Containing Glassy Carbon Microparticles of Various Sizes, *J. Electroanal. Chem.*, 675 (2012):18-24.
13. I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, Carbon paste electrodes in the new millennium, *Cent. Eur. J. Chem.*, 7 (2009): 598-656.
14. K. Kalcher, Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis, *Electroanalysis*, 2 (1990): 419-433.
15. J. Zima, H. Dejmková, **L. Němcová**, Praktické aplikace uhlíkových pastových elektrod, *Chem. Listy*, 104 (2010): s528-s532.
16. K. Vytřas, I. Švancara, Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze, *Chem. Listy*, 88 (1994): 412-422.
17. **L. Němcová**, J. Zima, J. Barek, D. Janovská, Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode, *Food Chem.*, 126 (2011): 374-378.
18. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, Determination of *trans*-resveratrol using voltammetric and amperometric methods at carbon fiber rod electrode and carbon paste electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012): 9221-9231.
19. A. H. Swiergiel, V. S. Palamarchouk, A. J. Dunn, A new design of carbon fiber microelectrode for vivo voltammetry using fused silica, *J. Neurosci. Methods*, 73 (1997): 29-33.
20. T. Navratil, J. Barek, Analytical applications of composite solid electrodes, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 39 (2009): 131-147.
21. A. Mylonakis, A. Economou, P. R. Fieldem, N. J. Goddard, A. Voulgaropoulos, A study of the determination of Cu(II) by anodic stripping voltammetry on a novel nylon/carbon fiber electrode, *Electroanalysis*, 16 (2004): 524-531.

22. L. Nacamulli, E. Gileadi, Electrochemical properties of graphite fiber epoxy composite electrodes, *J. App. Electrochem.*, 13 (1983): 73-78.
23. S. M. Lipka, G. L. Cahen, G. E. Stoner, L. L. Scribner, E. Gileadi, The electrochemical-behavior of graphite fiber-epoxy composite electrodes containing varying fiber orientations, *J. Electrochem. Soc.*, 135 (1988): 368-372.
24. F. Coeuret, E. O. Vilar, E. B. Cavalcanti, Carbon fibre cloth as an electrode material: electrical conductivity and mass transfer, *J. Appl. Electrochem.*, 32 (2002): 1175-1182.
25. X. Xu, S. G. Weber, Carbon fiber/epoxy composite ring-disk electrode: Fabrication, characterization and application to electrochemical detection in capillary high performance liquid chromatography, *J. Electroanal. Chem.*, 630 (2009): 75-80.
26. **L. Němcová**, H. Dejmková, J. Barek, J. Zima, Voltammetric determination of 5-amino-6-nitroquinoline at a carbon fiber rod electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011): 6373-6384.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Voltametrické porovnání uhlíkových pastových elektrod z různě velkých mikrokuliček skelného uhlíku

Uhlíkové pastové elektrody obsahující mikrokuličky skelného uhlíku jsou běžně známy a používají se hlavně v prostředích s vyšším obsahem organického modifikátoru (methanol, acetonitril)^{1,2}. Jelikož doposud nebyly systematicky porovnávány elektrochemické vlastnosti elektrod připravených z různě velkých mikrokuliček skelného uhlíku, tato část práce se zaměřila na tuto tematiku. Testované byly uhlíkové pasty s obsahem 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku s průměry 0,4 – 12 μm , 10 – 20 μm , 20 – 50 μm nebo krystalický grafit s průměrem částic 2 μm a ve všech případech byl použit minerální olej jako pastovací kapalina. Elektrochemické vlastnosti byly zkoumány s použitím hexakynoželeznanu draselného ve vodném prostředí a 5-amino-6-nitrochinolinu (5A6NQ) v prostředí methanol–voda.

5.1.1 Elektrochemická charakterizace CPEs

Povrchy připravených past byly fotografovány pod mikroskopem. Ze získaných snímků je zřejmé, že povrch past připravených z mikrokuliček skelného uhlíku je logicky tím hrubší, čím jsou kuličky větší. Rovněž během přípravy past bylo zjištěno, že příprava pasty je nejjednodušší s nejmenšími mikrokuličkami uhlíku, jelikož promíchání prášku a minerálního oleje je mnohem snazší a rychlejší. Prvním krokem bylo proměření potenciálních oken všech použitých elektrod v prostředích NaOH, KCl, HClO₄, H₂SO₄ (všechny 0,1 mol L⁻¹) a v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru o pH 2, 7 a 12. Potenciálová okna všech tří past z mikrokuliček skelného uhlíku jsou v alkalických prostředích užší než u elektrody ze skelného uhlíku. Elektroda z krystalického grafitu vykazovala nejužší potenciálové okno ze všech použitých elektrod. Elektrochemické vlastnosti elektrod byly zkoumány s využitím

metod cyklické voltametrie (CV), DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) v roztoku hexakynoželeznanu draselného o různých koncentracích v prostředí 1 mol L^{-1} KCl. Pomocí cyklické voltametrie bylo zjištěno, že oxidační proces $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na všech elektrodách je kontrolován difúzí. Stabilita signálu byla kontrolována z 20 po sobě jdoucích DP voltamogramů v roztoku $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v 1 mol L^{-1} KCl. Nejhorší stabilitu prokázala pasta z krystalického uhlíku (RSD 53 %). Všechny tři elektrody z mikrokuliček skelného uhlíku měly signál stabilní s RSD okolo 4,5 %. Kalibrační křivky hexakynoželeznanu draselného byly proměřeny v koncentračním rozmezí $6 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí 1 mol L^{-1} KCl. Meze detekce pro testované elektrody (pro DPV $L_D = 9,3$ až $10,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, pro DCV $L_D = 5,7$ až $9,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) jsou srovnatelné s mezemi detekce získanými na elektrodě ze skelného uhlíku (DPV $L_D = 6,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, DCV $L_D = 9,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Můžeme pozorovat slabý klesající trend v hodnotách mezí detekce se snižující se velikostí mikrokuliček skelného uhlíku v použitých pastových elektrodách. Všechny proměřené kalibrační křivky byly lineární. Podrobnější výsledky uvedeny v publikaci³ v příloze I.

5.1.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na CPEs

K testování elektrod v prostředí s obsahem 50% methanolu a 50% vody byl použit 5A6NQ. Nejdříve byl proměřen vliv pH BR pufru (2–12) na voltametrické chování stanovované látky. Z porovnání voltamogramů 5A6NQ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) je patrný pokles výšky píku se vzrůstající velikostí mikrokuliček skelného uhlíku v pastové elektrodě nezávisle na hodnotě pH. Nejhorší výsledky byly dosaženy na elektrodě z krystalického uhlíku, čímž se potvrdila její nevhodnost v prostředí s vyšším obsahem organické složky. Jako optimální podmínky pro DCV i DPV byly vybrány BR pufr o pH 10 s methanolem v poměru 1:1 (V/V). Při těchto podmínkách byly proměřeny rovněž cyklické voltamogramy pro 5A6NQ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) v rozsahu potenciálu 0 až +1,2 V při rychlostech polarizace 2 až 1000 mV s^{-1} . Z výsledků plyne, že oxidace 5A6NQ je ireverzibilní pro všechny testované elektrody, kontrolována difúzí pro elektrody z mikrokuliček skelného uhlíku a pro elektrodu z krystalického grafitu je kontrolována jak difúzí, tak adsorpcí. V důsledku vlivu pasivace je nutné u všech testovaných elektrod obnovovat povrch po každém měření. Opakovatelnost byla proměřena pro 5A6NQ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) a z výsledků vyplývá, že z testovaných elektrod má nejnižší hodnotu relativní směrodatné odchylky (RSD 4,6 %) elektroda z nejmenších mikrokuliček skelného uhlíku a to srovnatelnou s elektrodou ze skelného uhlíku

(RSD 4,5 %). Kalibrační křivky 5A6NQ byly proměřeny v koncentračním rozmezí 1×10^{-6} – 1×10^{-4} mol L⁻¹ v optimálním prostředí. Z výsledků můžeme pozorovat klesající trend v hodnotách mezi detekce se snižující se velikostí mikrokuliček skelného uhlíku v použitých pastových elektrodách. Všechny proměřené kalibrační křivky byly lineární a koeficient determinace byl vysoký. Více výsledků je uvedeno v publikaci³ v příloze I.

5.2 Stanovení resveratrolu v nažkách, slupkách a listech pohanky tatarské a obecné pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě

Dalším možným využitím výhod uhlíkové pastové elektrody je v amperometrickém detektoru při průtokových metodách (HPLC), kde je jako pracovní elektroda v uspořádání typu wall-jet v tříelektrodovém uspořádání spolu s referentní elektrodou (argentchloridovou elektrodou s 3 mol L⁻¹ KCl) a pomocnou elektrodou (platinovou plíškovou elektrodou). Amperometrický detektor byl v naší práci zapojen sériově za spektrofotometrický detektor, který sloužil jako kontrola a porovnání našeho elektrochemického detektoru. Konec kapiláry ze spektrofotometrického detektoru byl přiveden k povrchu pracovní uhlíkové pastové elektrody, jenž byla s pomocnou a referentní elektrodou umístěna v mobilní fázi. Toto uspořádání má kromě samotných výhod uhlíkové pastové elektrody i výhodu v neustálém omývání povrchu pracovní elektrody mobilní fází, které většinou umožňuje měřit stále na stejném povrchu pracovní elektrody bez obnovování povrchu, jako je většinou nutné ve vsádkových voltmetrických metod.

Cílem této práce bylo vyvinutí nové HPLC metody s elektrochemickou detekcí a spektrofotometrickou detekcí pro stanovení *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu ve vzorcích nažek, slupek a listech pohanky tatarské a obecné. Resveratrol byl mezi dalšími flavonoidy doposud pouze identifikován v mouce pohanky obecné⁴, proto se tato část práce věnovala nejenom vyvinutí metody pro jeho stanovení, ale také zjištění skutečných obsahů obou izomerů resveratrolu ve vzorcích šesti variet pohanky obecné a dvou variet pohanky tatarské.

5.2.1 Optimalizace metody

Nejdříve byly zjištěny optimální podmínky pro stanovení standardů *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu (standard připraven z *trans*-resveratrolu izomerizací denním světlem po 48 hodin s konverzí 85 %⁵). Mobilní fáze obsahující acetonitril a zředěný BR pufr v poměru 1:1 (V/V) umožnila separaci na použité koloně (Kromasil C-18 (7 μm), 125 × 4 mm) obou izomerů resveratrolu ve 4,5 minutách s rozlišením 1,6. Jelikož je separace izomerů nezávislá

na hodnotě pH BR pufru v rozmezí pH 3 až 7, byla hodnota pH optimalizována na základě hydrodynamických voltamogramů. Hydrodynamické voltamogramy byly naměřeny v BR pufru o pH 3, 5 a 7 s acetonitrilem (1:1, *V/V*) v rozmezí potenciálů od 0 do +1,4 V. Jako optimální byl vybrán BR pufr o pH 7 s acetonitrilem (1:1, *V/V*) při potenciálu +1,2 V. Optimální vlnová délka pro spektrofotometrický detektor byla vybrána 306 nm pro *trans*-resveratrol a 286 nm pro *cis*-resveratrol (ze spekter při měření stability zásobních roztoků). Při těchto podmínkách byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $4 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Meze detekce byly pro *trans*-resveratrol $L_D = 3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro elektrochemický detektor, $L_D = 3,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro spektrofotometrický detektor (306 nm) a pro *cis*-resveratrol $L_D = 1,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro elektrochemický detektor, $L_D = 6,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro spektrofotometrický detektor (286 nm). Z výsledků je patrné, že obě detekce jsou srovnatelné pro *trans*-resveratrol a pro *cis*-resveratrol je elektrochemický detektor mírně lepší než spektrofotometrický. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v publikaci⁶ v příloze II.

5.2.2 Reálné vzorky pohanek obecných a tatarských

V prvním kroku byla provedena extrakce resveratrolu do ethanolu. Vzorek pohankových nažek (12 g), slupek (4 g) nebo listů (12 g) byl vždy navážen a spolu s 300 mL ethanolu extrahován 2 hodiny pod refluxem, přefiltrován a zakoncentrován za sníženého tlaku na 5 mL koncentrovaného extraktu. Optimalizace separace *cis*- a *trans*-resveratrolu v reálných vzorcích byla provedena změnou složení mobilní fáze (50:50, 40:60, 35:65, 30:70 a 20:80 acetonitril : zředěný BR pufr, *V/V*) v isokratickém módu. Jako optimální podmínky byly zvoleny: mobilní fáze s obsahem acetonitrilu: zředěný BR pufr pH 7 v poměru 30:70 (*V/V*) pro vzorky nažek a slupek nebo 20:80 (*V/V*) pro vzorky listů při potenciálu elektrochemického detektoru + 1,2 V. *Trans*-resveratrol byl stanoven ve všech reálných vzorcích, ale druhý izomer *cis*-resveratrol nebyl nalezen v žádném analyzovaném vzorku (přítomnost a obsah *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu byla zjišťována standardním přidavkem analytu). Obsah *trans*-resveratrolu v nažkách pohanky obecné je u jednotlivých analyzovaných varietách podobný (0,98 – 1,72 mg kg⁻¹), ale velký rozdíl byl zaznamenán v porovnání s obsahem v nažkách pohanek tatarských (3,43 – 3,50 mg kg⁻¹), kde je téměř trojnásobně větší. Na druhou stranu obsah *trans*-resveratrolu v listech pohanky obecné (1,81 mg kg⁻¹) byl téměř desetkrát vyšší než v listech pohanky tatarské (0,19 mg kg⁻¹). Nejnižší obsah *trans*-resveratrolu byl stanoven ve slupkách pohanky obecné (0,16 – 0,66 mg kg⁻¹), jelikož u pohanky tatarské není technicky možné oddělení nažek od slupek, byly vzorky

pohanky tatarské stanovovány jako nažky i se slupkami. Z těchto výsledků vyplývá, že vysoký obsah *trans*-resveratrolu v nažkách (i se slupkami) pohanky tatarské není způsoben přítomností slupek. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v publikaci⁶ v příloze II

5.3 Elektrochemické vlastnosti a stanovení 5-amino-6-nitrichinolinu na uhlíkových vláknových tyčinkových elektrodách

Uhlíková vláknová tyčinková elektroda (CFRE) patří mezi kompozitní elektrody. Elektroda je vyrobena z uhlíkové vláknité tyčinky, která představuje spojení shodně orientovaných uhlíkových vláken a epoxidové pryskyřice výrobním procesem nazývaným pultruze. Ač se nejedná o elektrody zcela nové, studium jejich elektrochemických vlastností bylo věnováno poměrně málo⁷⁻¹⁰. Z tohoto důvodu je tato část práce zaměřena na studium elektrochemických vlastností těchto elektrod (porovnávány elektrody o průměru 0,8 mm, 2 mm a 3 mm) s použitím hexakyanoželeznatanu draselného ve vodném prostředí a následném elektrochemickém stanovení 5A6NQ v anodické i katodické oblasti. Praktické použití je demonstrováno na stanovení 5A6NQ na CFRE v modelových vzorcích pitné a rybníční vody.

5.3.1 Elektrochemická charakterizace CFREs

Jako první byly povrchy připravených CFRE fotografovány pod mikroskopem. Ze získaných obrázků¹¹ je patrné, že epoxidová pryskyřice se nachází jednak mezi jednotlivými vlákny na průřezu uhlíkové vláknité tyčinky, a jednak po celé délce pokrývá tenkou vrstvou stěny uhlíkové vláknové tyčinky. Z následného měření závislosti výšky píku $K_4[Fe(CN)_6]$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) metodou DPV v 1 mol L^{-1} KCl na hloubce ponoření (1 – 20 mm) CFRE (průměr 0,8 mm) do měřeného roztoku vyplývá, že elektrochemicky aktivní je pouze konec elektrody a stěny elektrody se elektrochemické reakce neúčastní pravděpodobně z důvodu dobrého pokrytí nevodivou epoxidovou pryskyřicí. U sestrojených CFRE byl proměřen potenciálový rozsah v roztocích NaOH, KCl, HClO₄, H₂SO₄ (všechny $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru o pH 2, 7 a 12. Získané voltamogramy byly porovnány z výsledky na GCE (2 mm průměr). Šířka potenciálových oken CFRE je téměř srovnatelná s GCE, kromě katodické oblasti v alkalických prostředích, kde je potenciálové okno CFRE užší. Anodický a katodický potenciál píku systému $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ v 1 mol L^{-1} KCl je téměř nezávislý na rychlosti polarizace. Ze závislosti výšky píku na rychlosti polarizace v rozsahu 2 až 1000 mV s^{-1} vyplývá, že je děj reverzibilní a kontrolován difuzí. Více výsledků je uvedeno v publikaci¹¹ v příloze III.

5.3.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu na CFREs

Vývoj metody stanovení 5A6NQ byl zahájen optimalizací podmínek měření. Proměřen byl vliv pH BR pufru v rozsahu 2 až 12 ve směsi s methanolem v poměru 1:1 (*V/V*) pro DCV a DPV v anodické i katodické oblasti na CFRE o průměru 0,8 mm, 2 mm a 3 mm. Všechny testované elektrody vykazovaly podobné chování. Optimální podmínky pro DCV a DPV v anodické i katodické oblasti byly BR pufr pH 12 s methanolem (1:1, *V/V*). Efekt pasivace elektrod byl studován metodou DPV v roztoku 5A6NQ (1×10^{-4} mol L⁻¹) při optimálních podmínkách. Z výsledků je patrné (20 voltamogramů proměřených za sebou bez obnovení povrchu), že pasivace je významná v anodické oblasti (pokles výšky píku o 28 %). Vyzkoušeny byly různé způsoby regenerace povrchu (jemný brusný papír, alumina, elektrochemická aktivace), ale nejlepší výsledky měla regenerace povrchu CFRE pomocí suspenze aluminy (20 měření za sebou – anodická oblast RSD = 5,5 %, katodická oblast RSD = 2,2 %), proto byla tato regenerace použita i v dalších měřeních.

Při optimálních podmínkách byly proměřeny cyklické voltamogramy 5A6NQ v rozsahu polarizačních rychlostí 2 až 1000 mV s⁻¹. Oxidace i redukce 5A6NQ je na CFRE ireverzibilní, řízena difuzí i adsorpcí. Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí 4×10^{-7} – 1×10^{-4} mol L⁻¹. Nejnižší mez detekce byla naměřena na CFRE o průměru 2 mm $L_D = 4,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ pro katodickou DPV. Nejlepší poměr signálu k šumu měla CFRE o průměru 2 mm. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v publikaci ¹¹ v příloze III.

5.3.3 Reálné aplikace

Praktické využití elektrody bylo demonstrováno na stanovení 5A6NQ v modelových vzorcích pitné a rybníční vody na CFRE o průměru 2 mm. Parametry kalibračních závislostí uvedeny v Tab.5.1. Výsledné směrnice kalibračních křivek jsou srovnatelné pro měření v deionizované vodě. Meze detekce v pitné a rybníční vodě jsou mírně vyšší, což může být způsobeno vyšším šumem v modelových vzorcích. Více výsledků je uvedeno v publikaci ¹¹ v příloze III.

Tab.5.1

Parametry kalibračních závislostí anodického a katodického voltmetrického stanovení 5A6NQ na CFRE o průměru 2 mm v modelových vzorcích pitné a rybníční vody, základní elektrolyt BR pufr pH 12 s methanolem v poměru 1:1 (V/V).

Metoda		Koncentrační rozmezí mol L ⁻¹	Směrnice mA L mol ⁻¹	Úsek nA	R ² ^a	L _D ^b mol L ⁻¹
Pitná voda						
Anodic	DCV	0,4 – 10 × 10 ⁻⁵	19,7	83,8	0,9931	3,9 × 10 ⁻⁶
	DPV	0,4 – 10 × 10 ⁻⁵	9,2	-9,6	0,9986	3,6 × 10 ⁻⁶
Cathodic	DCV	0,1 – 10 × 10 ⁻⁵	-65,1	-46,2	0,9986	1,4 × 10 ⁻⁶
	DPV	0,04 – 10 × 10 ⁻⁵	-87,4	-291,5	0,9974	5,3 × 10 ⁻⁷
Rybníční voda						
Anodic	DCV	0,4 – 10 × 10 ⁻⁵	21,0	92,0	0,9938	3,8 × 10 ⁻⁶
	DPV	0,2 – 10 × 10 ⁻⁵	11,4	4,2	0,9953	2,1 × 10 ⁻⁶
Cathodic	DCV	0,1 – 10 × 10 ⁻⁵	-65,0	-26,8	0,9961	1,2 × 10 ⁻⁶
	DPV	0,04 – 10 × 10 ⁻⁵	-84,2	-324,5	0,9968	4,8 × 10 ⁻⁷

^a R² koeficient determinace, ^b L_D mez detekce.

5.4 Voltametrické a amperometrické stanovení *trans*-resveratrolu na uhlíkové vláknové tyčinkové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě

V této části práce byla vyvinuta nová metoda stanovení *trans*-resveratrolu využívající voltametrické metody (DCV, DPV, DCV a AdSDPV) a průtokovou injekční analýzu (FIA) s elektrochemickou detekcí na CFRE a tato byla porovnána se stanovením na CPE a v případě FIA i se spektrofotometrickou detekcí. Praktická aplikace metod byla testována na stanovení *trans*-resveratrolu v pastilkách přípravku Evalor.

5.4.1 Voltametrické metody

Vliv pH BR pufru byl sledován v rozsahu 2 až 12 s methanolem v poměru 1:1 (V/V) pro DCV, DPV a CV v anodické oblasti na CFRE a CPE. Jako optimální byly zvoleny BR pufr o pH 2 s methanolem (1:1, V/V) pro všechny použité metody pro obě elektrody. Cyklická voltametrie byla proměřena v roztoku *trans*-resveratrolu (1 × 10⁻⁴ mol L⁻¹) v rozsahu polarizačních rychlostí 2 až 1000 mV s⁻¹ pro potenciálový rozsah 0 až +1,5 V. Oxidace *trans*-resveratrolu je ireverzibilní a kontrolována difuzí na obou elektrodách.

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí $6 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na CFRE a CPE (obě průměr 2 mm). Kalibrační křivky jsou lineární v celém měřeném rozsahu s obdobnými mezemi detekce v rozmezí $7,3 - 9,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Akumulace analytu na povrchu CFRE a CPE byla sledována s cílem zvýšit citlivost metody. Akumulace proběhla v roztoku *trans*-resveratrolu ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) při potenciálech v rozsahu 0 až 0,6 V s dobou akumulace od 30 s do 10 min v prostředí BR pufru o pH 2, 7, 10 a 12 vždy ve směsi s methanolem v poměru (95:5, *V/V*). Na CPE nebyla pozorována významná akumulace narozdíl od CFRE, kde byla akumulace významná a jako optimální podmínky akumulace byly vybrány: BR pufr pH 10 s methanolem (95:5, *V/V*) při potenciálu 100 mV po dobu 10 min. Při těchto podmínkách byla pomocí AdSDPV naměřena kalibrační závislost v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na CFRE. Mez detekce byla $2,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v publikaci¹² v příloze IV.

5.4.2 Průtoková injekční analýza

Optimální podmínky stanovení *trans*-resveratrolu pomocí FIA na CFRE a CPE (obě s průměrem 3 mm) byly zvoleny z naměřených hydrodynamických voltamogramů v rozsahu potenciálů od +0,1 do +1,6 V v prostředí BR pufru o pH 2 až 12 s methanolem (1:1, *V/V*). Nejvyšší a nejlépe vyvinutý signál byl získán v prostředí BR pufr pH 10 s methanolem (1:1, *V/V*) při potenciálu +1,0 V na CFRE i CPE. Vliv průtokové rychlosti byl proměřen v rozsahu od 1 do 7 mL min⁻¹. Jako optimální průtoková rychlost byla zvolena rychlost 3 mL min⁻¹. Stabilita a opakovatelnost signálu byla testována desetinásobným nadávkování roztoku *trans*-resveratrolu ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) při optimálních podmínkách. Relativní standardní odchylka měření byla 4,5 % pro CFRE, 5,4 % pro CPE a 2,3 % pro spektrofotometrický detektor (306 nm).

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí $8 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na obou elektrodách. Dosažené meze detekce pro FIA s elektrochemickou detekcí byly $L_D = 9,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro CFRE, $L_D = 5,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ pro CPE a $L_D = 8,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro spektrofotometrickou detekci. Více výsledků je uvedeno v publikaci¹² v příloze IV.

5.4.3 Reálné vzorky

Praktické využití vyvinutých metod bylo testováno na pastilkách Eveloru s deklarovaným obsahem *trans*-resveratrolu 50 mg v každé pastilce. Stanovení *trans*-

resveratrolu bylo provedeno metodou standardního přídávku (tři přídávky) při zjištěných optimálních podmínkách vyvinutými metodami (DPV, FIA) na CFRE a porovnáno s výsledky získanými voltametrickými na CPE, spektrofotometrickými a pomocí FIA na CPE a spektrofotometrickou detekcí (306 nm). Všechny obdržené výsledky z analýzy tří tablet Evelor jsou v dobré shodě s deklarovaným obsahem *trans*-resveratrolu (49,0 až 50,9 mg). Další výsledky jsou uvedeny v publikaci¹² v příloze IV.

5.5 Literatura

1. J. Barek, A. Muck, J. Wang, J. Zima, Study of voltammetric determination of carcinogenic 1-nitropyrene and 1-aminopyrene using a glassy carbon paste electrode, *Sensors*, 4 (2004): 47-57.
2. J. Wang, U. Anik, J. W. Mo, J. M. Lu, A. N. Kawde, A. Muck, Glassy carbon paste electrodes, *Electrochem. Commun.*, 3 (2001): 203-208.
3. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, A Voltammetric Comparison of the Properties of Carbon Paste Electrodes Containing Glassy Carbon Microparticles of Various Sizes, *J. Electroanal. Chem.*, 675 (2012): 18-24.
4. J. Y. Qian, D. Mayer, M. Kuhn, Flavonoids in fine buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) flour and their free radical scavenging activities, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 95 (1999): 343-349.
5. B. C. Trela, A. L. Waterhouse, Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996): 1253-1257.
6. **L. Němcová**, J. Zima, J. Barek, D. Janovská, Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode, *Food Chem.*, 126 (2011): 374-378.
7. L. Nacamulli, E. Gileadi, Electrochemical properties of graphite fiber epoxy composite electrodes, *J. Appl. Electrochem.*, 13 (1983): 73-78.
8. S. M. Lipka, G. L. Cahen, G. E. Stoner, L. L. Scribner, E. Gileadi, The electrochemical-behavior of graphite fiber-epoxy composite electrodes containing varying fiber orientations, *J. Electrochem. Soc.*, 135 (1988): 368-372.
9. F. Coeuret, E. O. Vilar, E. B. Cavalcanti, Carbon fibre cloth as an electrode material: electrical conductivity and mass transfer, *J. Appl. Electrochem.*, 32 (2002): 1175-1182.
10. X. Xu, S. G. Weber, Carbon fiber/epoxy composite ring-disk electrode: Fabrication, characterization and application to electrochemical detection in capillary high performance liquid chromatography, *J. Electroanal. Chem.*, 630 (2009): 75-80.
11. **L. Němcová**, H. Dejmková, J. Barek, J. Zima, Voltammetric determination of 5-amino-6-nitroquinoline at a carbon fiber rod electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011): 6373-6384.
12. **L. Němcová**, J. Barek, J. Zima, Determination of *trans*-resveratrol using voltammetric and amperometric methods at carbon fiber rod electrode and carbon paste electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012): 9221-9231.

6. ZÁVĚR

Tato předkládaná disertační práce se zabývá vývinem elektrochemických metod především pro stanovení *cis*- a *trans*-resveratrolu na uhlíkové pastové elektrodě a uhlíkové vláknové tyčinkové elektrodě a porovnáním vlastností obou typů elektrod. Jelikož oba izomery resveratrolu jsou citlivé na světlo, byl pro testování vlastností použitých elektrod využit hexakynoželeznatán draselný a 5-amino-6-nitrochinolin (5A6NQ), který umožňuje otestování elektrod i v katodických oblastech potenciálů. Využité byly metody voltametrické (DCV, DPV, CV, AdSDPV), FIA i HPLC s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí. Práce je založena na připojených čtyřech vědeckých publikacích uvedených jako součást práce v přílohách I až IV (Kapitoly 7 až 10).

Všechny získané výsledky můžeme shrnout do následujících bodů:

- Z testovaných uhlíkových pastových elektrod s obsahem mikrokuliček skelného uhlíku s průměry 0,4 – 12 μm, 10 – 20 μm, 20 – 50 μm vychází elektroda s nejmenšími mikrokuličkami jako elektroda s nejlepšími elektrochemickými vlastnostmi (nejnižší mez detekce, opakovatelnost 4,6 %).
- Byla optimalizovaná metoda HPLC stanovení resveratrolu. Optimální byla mobilní fáze o složení BR pufr o pH 7 s acetonitrilem (1:1, *V/V*) při potenciálu elektrochemické detekce +1,2 V na CPE. Optimální vlnová délka pro spektrofotometrický detektor byla 306 nm pro *trans*-resveratrol a 286 nm pro *cis*-resveratrol. Meze detekce byly pro *trans*-resveratrol $L_D = 3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro elektrochemický detektor, $L_D = 3,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro spektrofotometrický detektor (306 nm) a pro *cis*-resveratrol $L_D = 1,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro elektrochemický detektor, $L_D = 6,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ pro spektrofotometrický detektor (286 nm).

- Byla vyvinuta nová HPLC metoda pro stanovení resveratrolu (*trans*-, *cis*-) v nažkách, slupkách a listech pohanky obecné a tatarské pomocí elektrochemického detektoru s CPE. Optimální podmínky byly: mobilní fáze acetonitril: zředěný BR pufr pH 7 v poměru 30:70 (*V/V*) pro vzorky nažek a slupek nebo 20:80 (*V/V*) pro vzorky listů při potenciálu elektrochemického detektoru + 1,2 V (CPE). Obsah *trans*-resveratrolu v nažkách pohanky obecné 0,98 – 1,72 mg kg⁻¹, v nažkách pohanky tatarské 3,43 – 3,50 mg kg⁻¹, což je téměř trojnásobně větší množství. Obsah *trans*-resveratrolu v listech pohanky obecné (1,81 mg kg⁻¹) byl téměř desetkrát vyšší než v listech pohanky tatarské (0,19 mg kg⁻¹). Nejnižší obsah *trans*-resveratrolu byl stanoven ve slupkách pohanky obecné (0,16 – 0,66 mg kg⁻¹).
- Z připravených CFRE (0,8 mm, 2 mm a 3 mm) má nejlepší výsledky při stanovení 5A6NQ CFRE o průměru 2 mm (DPV $L_D = 4,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). Oxidace i redukce 5A6NQ je na CFRE ireverzibilní, řízena difuzí i adsorpcí. Praktické stanovení bylo úspěšně demonstrováno na stanovení 5A6NQ v modelových vzorcích pitné a rybníční vody na CFRE o průměru 2 mm.
- Byly vyvinuty jednoduché, citlivé voltametrické a FIA metody pro stanovení *trans*-resveratrolu na CFRE. Optimální podmínky byly BR pufr pH 2 s methanolem (1:1, *V/V*) pro voltametrické metody (kromě AdSDPV) a BR pufr o pH 10 s methanolem (1:1, *V/V*) při pracovním potenciálu +1,0 V nebo 306 nm pro FIA.
- Na CPE nebyla pozorována významná akumulace *trans*-resveratrolu narozdíl od CFRE, kde byly vybrány optimální podmínky akumulace: BR pufr pH 10 s methanolem (95:5, *V/V*) při potenciálu 100 mV po dobu 10 min ($L_D = 2,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹).
- Vyvinuté voltametrické a FIA metody stanovení *trans*-resveratrolu na CFRE byly úspěšně aplikovány na farmaceutický přípravek Evelor (deklarovaný obsah *trans*-resveratrolu 50 mg). Stanovený obsah se pro všechny použité metody (DPV na CPE a CFRE, spektrometrie, FIA s elektrochemickou detekcí na CPE a CFRE a spektrofotometrickou detekcí) pohyboval v rozpětí od 49,0 do 50,9 mg.