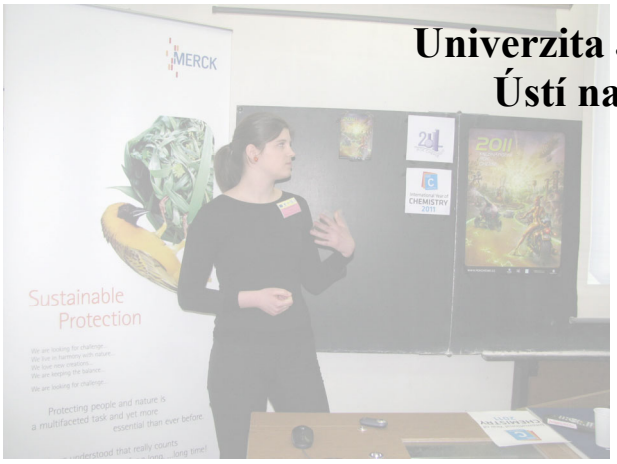
14. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE

„O CENU FIRMY MERCK 2011“

1. února 2011

Univerzita J. E. Purkyně
Ústí nad Labem



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Zdeňka Kolská
Karel Ventura
Vlastimil Vyskočil

14. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE „O CENU FIRMY MERCK 2011“

V úterý 1. února 2011 úspěšně proběhl v prostorách Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem již 14. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck 2011“ za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie. Pořadatelství se letos vynikajícím způsobem zhostila Ing. Zdeňka Kolská, PhD. z Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck spol. s. r. o. 22 účastníků z šesti českých vysokých škol velmi důstojně reprezentovalo svá pracoviště, která příkladným způsobem pečují o výchovu nastupující generace analytických chemiků a tím rozhodujícím způsobem přispívají k dalšímu úspěšnému rozvoji analytické chemie v České republice. Kvalita prezentací to rozhodně potvrdila a autor tohoto příspěvku by rád všem soutěžícím bez ohledu na jejich konečné umístění poděkoval za vynikající výsledky i jejich perfektní prezentaci.

Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2011“. Zleva Ing. Marcela Kubásková, Bc. Marek Papež, Annamarie Némethová, Bc. Olga Nykodýmová a Ing. Zdeňka Kolská, PhD.

1. místo získala **Annamarie Némethová** z Ústavu organické technologie VŠCHT Praha za práci *Příprava polymerních částic pro separaci biomarkerů z tělních tekutin jako předstupeň vývoje diagnostického proužku.*

2. místo získal **Bc. Marek Papež** z Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT Praha za práci *Nové organohalogenované kontaminanty ve vodním ekosystému.*

3. místo získala **Bc. Olga Nykodýmová** z Katedry analytické chemie Univerzity Pardubice za práci *Možnosti stanovení 2-ethylhexyl nitrátu v naftě.*

Všem oceněným srdečně blahopřejeme a všem účastníkům děkujeme za odvedenou práci i krásné prezentace.

Lze konstatovat, že letošní soutěž byla zorganizována naprosto dokonale a proběhla ve vynikající přátelské, byť vědecky náročné, atmosféře. Za to patří dík jak Ing. Zdeňce Kolské, PhD. a doc. RNDr. Jaroslavu Rejnkovi, CSc., tak i firmě Merck spol. s. r. o. a jejím zástupkyním přítomným na soutěži, jmenovitě Ing. Lence Ungrmanové, Ing. Marcele Kubáskové a RNDr. Renatě Švajdové, PhD. Vyvrcholení v podobě ocenění vítězů proběhlo v krásných prostorách vyhlídkové restaurace Větruše s následnou slavnostní večeří. Dík všech účastníků patří pochopitelně i porotě, která měla vzhledem k vysoké kvalitě soutěžících úkol v pravdě nelehký.

Na závěr nezbývá než sdělit, že jubilejní 15. ročník této soutěže se uskuteční v prostorách firmy Merck spol. s. r. o. v Praze pod odborným vedením pracovníků Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v souvislosti s 20. výročím působení firmy Merck v České republice. Těšíme se, že i jubilejní ročník bude stejně zajímavý a příjemný jako ročníky předcházející.

Jiří Barek

STANOVENÍ GENOTOXICKÉHO 4-NITROINDANU POMOCÍ POLAROGRAFICKÝCH A VOLTAMETRICKÝCH METOD NA RTUŤOVÝCH A STŘÍBRNÝCH PEVNÝCH AMALGÁMOVÝCH ELEKTRODÁCH

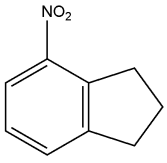
VENDULA BURDOVÁ, VLASTIMIL VYSKOČIL a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
Burdova.Vendula@seznam.cz

Úvod

4-Nitroindan (obr. 1; C.A.S. registry number: 34701-14-9; C.A.S. name: 1*H*-indene, 2,3-dihydro-4-nitro-) se řadí mezi potenciálně genotoxicky a karcinogenně nebezpečné látky s ne plně aromatickou strukturou. Prekurzorem 4-nitroindanu je uhlovodík indan – jedna ze složek benzinu[1,2]. U indanu byl prokázán mírný inhibující vliv na methanogenezi (anaerobní respirační metabolická dráha, využívající jako alternativní elektronový akceptor oxid uhličitý) půdních mikroorganismů[1,3,4], toxické působení a akumulace v tkáních mořských mlžů[5,6]. Od okamžiku, kdy bylo zjištěno, že mono- a dinitro-PAH vykazují několikanásobně větší mutagenitu či karcinogenitu než jejich matečné polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), stává se analýza těchto nebezpečných polutantů předmětem moderní environmentální analytické chemie[2]. V elektroanalytických metodách se využívá snadné elektrochemické redukce nitroskupiny na aromatickém jádře NPAH[7, 8].

Cílem této práce bylo nalezení optimálních podmínek s cílem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q) pro stanovení 4-nitroindanu na klasické rtuťové kapající elektrodě (DME) pomocí DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP); na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV); na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) pomocí metod DCV a DPV. Dalším cílem bylo srovnání meze stanovitelnosti nově vypracovaných polarografických a voltametrických metod s mezí stanovitelnosti dosaženou při stanovení 4-nitroindanu UV-VIS spektrofotometrií. Pro objasnění elektrochemického chování 4-nitroindanu byla použita cyklická voltametrie (CV) na HMDE a na m-AgSAE. Cílem práce byla také aplikace nově vyvinutých polarografických a voltametrických metod při stanovení 4-nitroindanu v modelových vzorcích pitné a říční vody.



Obr. 1. **Strukturní vzorec 4-nitroindanu**

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztok 4-nitroindanu (99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním 0,0163 g látky ve 100 ml methanolu (p.a., Lachema, Brno, ČR). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Zásobní roztok byl uchován ve tmě a chladu v lednici. Brittonovy-Robinsonovy pufry (BR pufry) o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol l^{-1} NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci 0,04 mol l^{-1} (všechny tyto chemikálie čistoty p.a., Lachema). Další chemikálie (kyselina chlorovodíková a chlorid draselný, vše čistota p.a.) byly zakoupeny od firmy Lachema. Použitá deionizovaná voda byla produkována systémem Milli-Q_{plus} (Millipore, Billerica, USA).

Aparatura

Při všech polarografických a voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kdy byla jako referentní použita argentochloridová elektroda (1 mol l^{-1} KCl) typu RAE 113, Monokrystaly, Turnov. Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji HP 8453 Diode Array Spectrophotometer (Hewlett-Packard, Amstelveen, Nizozemí) s ovládacím programem UV-Visible ChemStation (verze 9.01) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 a 0,1 cm.

Všechna měření pH byla prováděna na digitálním pH-metru Jenway 3510 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů.

Použité pracovní elektrody

Pro studium polarografického chování 4-nitroindanu byla použita jako pracovní elektroda DME. Při práci s DME za použití technik DCTP a DPP byla použita rych-

lost polarizace 4 mV s^{-1}, elektronicky řízená doba kapky 1 s a výška rezervoáru 64 cm.

Pro voltametrická měření (DCV, DPV) byla použita jako pracovní elektroda HMDE a m-AgSAE (obr. 2). Při DPV byly na elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms, modulační amplitudě –50 mV a rychlost polarizace byla zvolena pro DPV i DCV 20 mV s^{-1}. Před použitím m-AgSAE bylo nutné provést tři kroky – amalgamaci, aktivaci a regeneraci elektrody:

1) Amalgamace – byla prováděna jednou týdně, nebo když se vyskytly komplikace s reprodukovatelností či citlivostí měření. Ponořením dolní části elektrody do lahvičky s kapalnou rtutí a intenzivním mícháním lahvičkou po dobu asi 15 s se obnovil na povrchu elektrody rtuťový meniskus.

2) Elektrochemická aktivace – byla prováděna vždy na začátku pracovního dne, po přestávce v měřeních, která byla delší než 1 h, a po amalgamaci. Prováděla se v roztoku 0,2 mol l^{-1} KCl, který nebyl probublán dusíkem při vloženém potenciálu –2200 mV po dobu 300 s. V jejím průběhu dochází k odstranění oxidů a adsorbovaných látek z povrchu elektrody, čímž se zlepšuje citlivost a opakovatelnost následných měření.

3) Regenerace – byla prováděna v analyzovaném roztoku před každým měřením a spočívala ve skokovém střídání (150 cyklů) kladnějších $E_{1,reg}$ a zápornějších $E_{2,reg}$ regeneračních potenciálů v intervalu 0,05 s po dobu 30 s (optimální hodnotu $E_{1,reg}$ a $E_{2,reg}$ je pro každé prostředí nutno najít experimentálně).

Pracovní postupy

Při proměřování vlivu pH základního elektrolytu na polarografické chování 4-nitroidanu bylo postupováno tak, že do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o příslušném pH (prostředí o hodnotě pH 2,0 bylo vytvořeno nahrazením BR pufru roztokem 0,01 mol l^{-1} HCl), přidáno malé množství methanolu (1 až 2 ml, aby se vytvořilo vodně-methanolické prostředí bránící vysrážení 4-nitroindanu po přidání jeho methanolického zásobního roztoku do vodného pufru), odpipetován 1 ml roztoku 4-nitroindanu a roztok byl následně doplněn do 10 ml methanolem. Při proměřování závislosti polarografických odezev 4-nitroindanu na koncentraci byly připravovány vzorky tak, že do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o daném pH, přidáno malé množství methanolu, odpipetován příslušný potřebný objem zásobního roztoku 4-nitroindanu a vzniklý roztok byl doplněn do 10 ml methanolem.

Takto připravené vzorky byly po promíchání přelity do polarografické nádobky a zbaveny kyslíku probubláváním dusíkem po dobu 5 min. Před vstupem dusíku do polarografické nádobky byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném objemovém poměru jako analyzovaný roztok, tj. 1:1. Poté byl proveden záznam polarografické křivky. Všechny křivky byly proměřeny třikrát. Před každým měřením další křivky byl roztok probubláván dusíkem po dobu 30 sekund. Při voltametrických měřeních byl postup přípravy roztoků obdobný, pouze s tím rozdílem, že byl optimalizován poměr vodné a methanolické složky na 9:1.

Měření v modelových vzorcích pitné a říční vody bylo prováděno metodou standardního přídavku (zásobní roztok 4-nitroindanu o $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}). Měřený roztok byl připraven z 9 ml říční nebo pitné vody a 1 ml BR pufru o příslušném pH. Pro případné potlačení rušivých elementů v základním elektrolytu bylo přidáno 100 µl 0,1 mol l^{-1} chelatonu III.

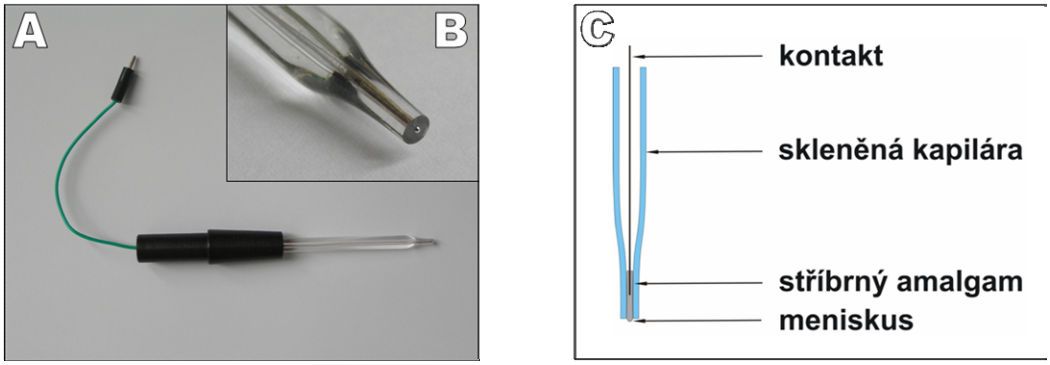
Pro proměřování spektrofotometrických křivek byly připravovány roztoky 4-nitroindanu o příslušné koncentraci tak, že do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobního roztoku 4-nitroindanu a doplněno do 10 ml methanolem. Takto připravené roztoky byly proměřovány oproti methanolu, a to vždy třikrát.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05) (cit.[9]) u kalibračních přímek byly vyhodnoceny a sestrojeny programem OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation). Mez stanovitelnosti (L_Q) byla počítána jako koncentrace studované látky odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (pro počet měření $n = 10$) stanovení sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky[10].

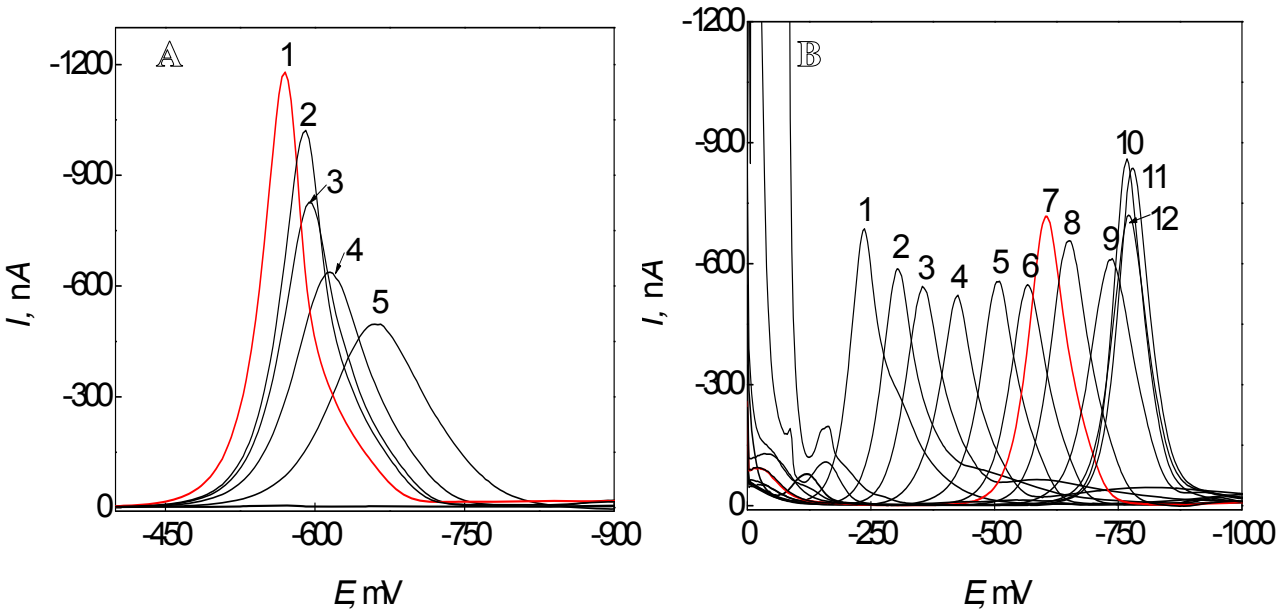
Výsledky a diskuse

Vliv pH na elektrochemické chování 4-nitroindanu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) při DCTP i DPP na DME byl sledován v prostředí BR pufru – methanolu (1:1). Pro sledování polarografického chování 4-nitroindanu v silně kyselém a zásaditém prostředí byly dále použity základní elektrolyty 0,01 mol l^{-1} HCl (pH 2,0) – methanol (1:1) a 0,1 mol l^{-1} NaOH (pH 13,0) – methanol (1:1). 4-Nitroindan poskytuje v celé oblasti pH jednu dobře vyvinutou polarografickou vlnu a v kyselém prostředí (pH BR pufru 2,4 až 5,0) ještě druhou polarografickou vlnu s negativnějším půlvlnovým potenciálem. To je v souladu s polarografickým chováním pozorovaným u podobných mononitroderivátů PAH, jejichž elektrochemická redukce na DME probíhá ve dvou krocích[11,12]. Půlvlnový potenciál všech vln se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám, v alkalických prostředích, BR pufr pH 10,0 až 13,0 – methanol (1:1), již půlvlnový potenciál první vlny na pH nezávisí. DP polarografické chování 4-nitroindanu je pak zcela v souladu s polarografickým chováním při DCTP na DME. Jako optimální prostředí pro DCT i DP polarografické stanovení 4-nitroindanu bylo zvoleno prostředí BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1). Nejnižší měřitelné koncentrační rozmezí bylo 0,2 až 1,0 µmol l^{-1}. Parametry kalibračních přímek pro DCTP a DPP stanovení 4-nitroindanu na DME jsou uvedeny v tabulce I.



Obr. 2. **Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (A), detail menisku (B) a schéma elektrody (C)**

Vliv pH na chování 4-nitroindanu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) při DCV a DPV na HMDE byl sledován v prostředí BR pufr – methanol (1:1), v pH škále BR pufru od 2,0 do 13,0 (obr. 3B). Opět se prokázala závislost potenciálu píku na pH prostředí. Potenciál píku se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám. Dále byl optimalizován poměr BR pufru o pH 8,0 : methanolu, kdy byl roztok 4-nitroindanu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) proměřován v prostředí o složení BR pufr : methanol 1:1, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 . Ze zjištěných závislostí hodnot proudu píku na poměru BR pufr : methanol, byl zvolen jako optimální poměr 9:1, prostředí v němž hodnota proudu píku byla nejvyšší (obr. 3A). Pro srovnání bylo chování 4-nitroindanu zkoumáno i v silně kyselém a silně zásaditém prostředí (směs vodné složky o pH 2,0 a 13,0 a methanolu o různém poměru). Voltametrické křivky v těchto prostředích jsou obdobné jako u prostředí s BR pufrem
o pH 8,0. Se snižujícím se obsahem methanolu roste hodnota proudu píku, pík se zužuje a jeho potenciál se posouvá k vyšším hodnotám. Chování 4-nitroindanu v prostředích o různém poměru BR pufru a methanolu bylo zkoumáno i spektrofotometricky, kdy během 14 minutového proměřování nebyl zaznamenán pokles absorbance. Pro proměření koncentračních závislostí bylo pro metodu DCV na HMDE vybráno jako optimální prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1); pro metodu DPV na HMDE prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Pro tato optimální prostředí byly koncentrační závis-



Obr. 3. **(A) Voltamogramy 4-nitroindanu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) měřené technikou DPV na HMDE** v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol 1:1 (5); 6:4 (4); 7:3 (3); 8:2 (2); 9:1 (1). **(B) Voltamogramy 4-nitroindanu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (1:1);** zobrazeny hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (12); 12,0 (11); 13,0 (10)

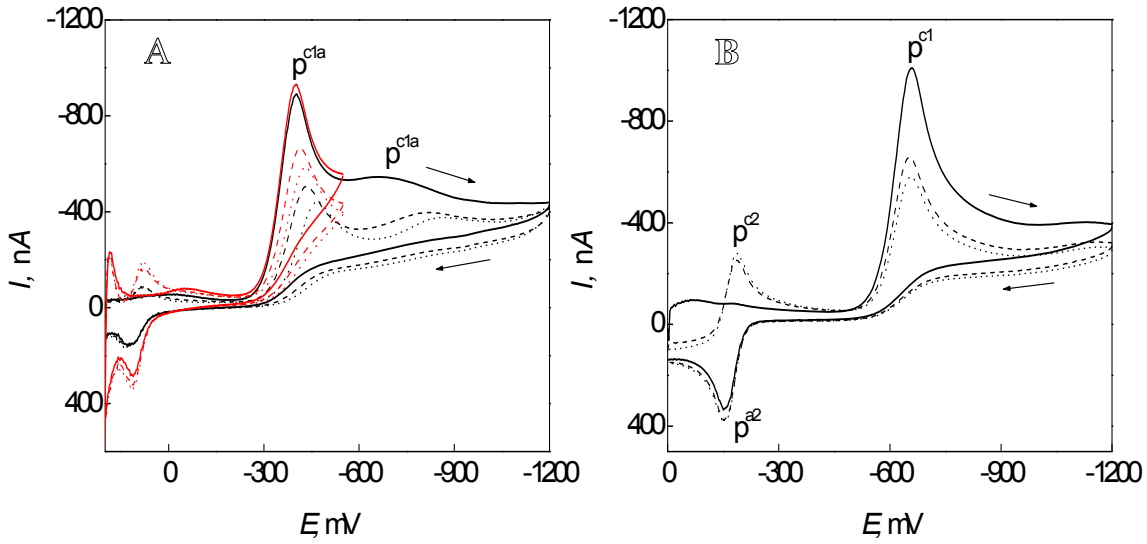
Tabulka I
Parametry kalibračních přímek stanovení 4-nitroindanu

Technika [optimální prostředí]	Koncentrace [μmol l^{-1}]	Směrnice [mA mol^{-1} l]	Úsek [nA]	R^2	L_Q[a] [mol l^{-1}]
DCTP na DME	20 – 100	–6,5	–22	0,9988	—
[BR pufr pH 12,0 – metanol (1:1)]	2 – 10	–4,3	–1,2	0,9990	$7\cdot10^{-7}$
DPP na DME	20 – 100	–6,5	–5	0,9988	—
[BR pufr pH 12,0 – metanol (1:1)]	2 – 10	–4,5	–2,9	0,9968	—
	0,2 – 1	–3,0	–0,3	0,9964	$1\cdot10^{-7}$
DCV na HMDE	20 – 100	–10,0	–134,2	0,9883	—
[BR pufr pH 9,0 – methanol (9:1)]	2 – 10	–16,6	9,6	0,9791	—
	0,2 – 1	–0,1	–13,2	0,9973	$7\cdot10^{-8}$
DPV na HMDE	20 – 100	–11,5	–88,7	0,9977	—
[BR pufr pH 8,0 – methanol (9:1)]	2 – 10	–16,4	–1,6	0,9939	—
	0,2 – 1	–18,4	–0,4	0,9920	$1\cdot10^{-7}$
DCV na m-AgSAE	20 – 100	–2,7	6	0,9993	—
[BR pufr pH 5,0 – methanol (1:1)]	2 – 10	–2,4	0,3	0,9991	—
	0,1 – 1	–1,7	–0,8	0,9970	$1\cdot10^{-7}$
DPV na m-AgSAE	20 – 100	–2,7	15	0,9957	—
[BR pufr pH 9,0 – methanol (1:1)]	2 – 10	–2,3	0,6	0,9996	—
	0,1 – 1	–1,2	0,0	0,9912	$1\cdot10^{-7}$
UV-VIS spektrofotometrie	20 – 100	7,5[b]	–11[c]	0,9995	—
[methanol]	2 – 10	6,7[b]	4[c]	0,9425	$4\cdot10^{-7}$
DPP na DME	2 – 10	–7,2	–2,9	0,9988	—
[BR pufr pH 12,0 – pitná voda (1:9)]	0,2 – 1	–7,6	–0,3	0,9981	$1\cdot10^{-7}$
DPV na HMDE	2 – 10	–13,5	0,2	0,9898	—
[BR pufr pH 8,0 – pitná voda (1:9)]	0,2 – 1	–9,5	0,1	0,9911	$7\cdot10^{-8}$
DPV na m-AgSAE [BR pufr pH 9,0 – pitná voda (1:9)]	1 – 10	–1,9	–0,6	0,9930	$1\cdot10^{-6}$
DPP na DME	2 – 10	–8,8	1,8	0,9996	—
[BR pufr pH 12,0 – říční voda (1:9)]	0,2 – 1	–7,4	–0,4	0,9965	$2\cdot10^{-7}$
DPV na HMDE	2 – 10	–7,2	–2,9	0,9988	—
[BR pufr pH 8,0 – říční voda (1:9)]	0,2 – 1	–11,6	0,4	0,9781	$3\cdot10^{-7}$
DPV na m-AgSAE [BR pufr pH 9,0 – říční voda (1:9)]	1 – 10	–1,4	0,3	0,9927	$2\cdot10^{-6}$

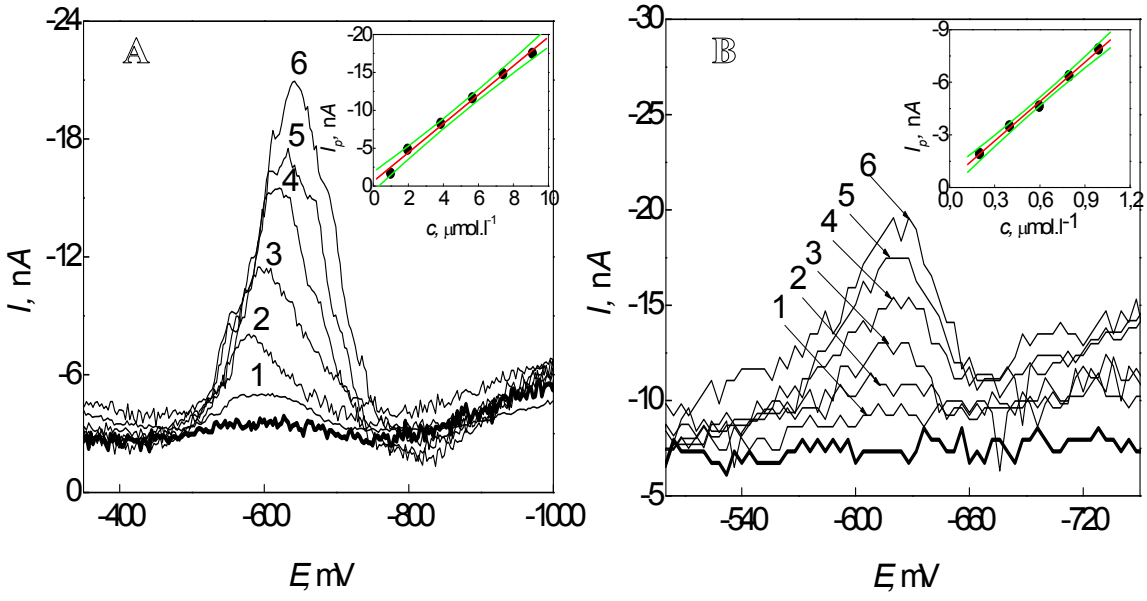
[a] Mez stanovitelnosti (10σ; $\alpha = 0,05$), [b] rozměr směrnice je mAU mol^{-1} l, [c] rozměr úseku je mAU

losti proměřeny v rozmezí 0,1–100 μmol l^{-1}. Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-nitroindanu metodami DCV a DPV na HMDE jsou uvedeny v tabulce I. Vypočtené hodnoty L_Q jsou nižší než nejnižší měřená (vyhodnotitelná) koncentrace 4-nitroindanu $2\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}; toto jest dáno způsobem výpočtu L_Q, který je počítán z opakovatelnosti měření koncentrací. Prakticky je však nejnižší stanovitelná koncentrace 4-nitroindanu $2\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}.

Voltametrické chování 4-nitroindanu při DCV a DPV na m-AgSAE je podobné jeho chování DPP na DME. Poloha píků opět závisí na pH. Prostředí BR pufr pH 5,0 – methanol (1:1) bylo zvoleno jako optimální pro DCV stanovení a BR pufr pH 9,0 – methanol (1:1) jako optimální pro DPV stanovení 4-nitroindanu na m-AgSAE. S použitím regeneračního kroku mezi jednotlivými měřeními na m-AgSAE v optimálním prostředí činila opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou ($n = 20$) vyhodnocené výšky voltametrického píku 4-nitroindanu ($c = 1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) 1,0 % pro DCV ($E_{1,reg} = –200$ mV a $E_{2,reg} = –1100$ mV) i DPV ($E_{1,reg} = –300$ mV a $E_{2,reg} = –$



Obr. 4. **(A) Voltamogramy 4-nitroindanu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) měřené technikou CV na HMDE v prostředí BR pufr pH 3,0 – methanol (1:1);** rychlost skenu 50 mV s^{-1}. **(B) Voltamogramy 4-nitroindanu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) měřené technikou CV na HMDE v prostředí BR pufr pH 8,0 – methanol (1:1);** rychlost skenu 50 mV s^{-1}. První sken (—); druhý sken (---); třetí sken (···)



Obr. 5. **(A) Polarogramy 4-nitroindanu měřené technikou DPP na DME v rozmezí koncentrací $2{\cdot}10^{-7}$ – $1{\cdot}10^{-6}$ mol l^{-1} v prostředí BR pufr o pH 12,0 – říční voda (1:9).** Koncentrace 4-nitroindanu (mol l^{-1}): $2{\cdot}10^{-7}$ (1), $4{\cdot}10^{-7}$ (2), $6{\cdot}10^{-7}$ (3), $8{\cdot}10^{-7}$ (4), $1{\cdot}10^{-6}$ (5); černá křivka náleží základnímu elektrolytu. Vložena příslušná kalibrační přímka. **(B) Voltamogramy 4-nitroindanu měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $1{\cdot}10^{-6}$ – $1{\cdot}10^{-5}$ mol l^{-1} v prostředí BR pufr o pH 9,0 – pitná voda (1:9).** Koncentrace 4-nitroindanu (mol l^{-1}): $1{\cdot}10^{-6}$ (1), $2{\cdot}10^{-6}$ (2), $4{\cdot}10^{-6}$ (3), $6{\cdot}10^{-6}$ (4), $8{\cdot}10^{-6}$ (5),$1{\cdot}10^{-5}$ (6); černá křivka náleží základnímu elektrolytu. Vložena příslušná kalibrační přímka

1300 mV). Rozsah měřených koncentrací 4-nitroindanu byl pro obě voltametrické techniky 0,1 až 100 μmol l^{-1}. Parametry příslušných kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce I.

Cyklická voltametrie byla použita pro objasnění elektrochemických reakčních mechanismů 4-nitroindanu v prostředích o různých pH. Měření bylo prováděno na elektrodách HMDE a m-AgSAE, při různých rychlostech skenu. Vliv různých rychlostí skenu (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 mV s^{-1}) na chování 4-nitroindanu (c = $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) při CV byl sledován v prostředí BR pufr – methanol (1:1), kde byl použit BR pufr o pH 3,0; 8,0 a 12,0. Z vyhodnocených závislostí proudů píku 4-nitroindanu na druhé odmocnině z rychlosti polarizace a ze závislosti na hodnotě rychlosti polarizace vyplývá, že rychlost elektrodové reakce při redukci 4-nitroindanu je řízena příspěvkem difuze i adsorpce a reakce je ireverzibilní.

Cyklické voltamogramy 4-nitroindanu v kyselém prostředí poskytují dva katodické voltametrické píky (p^{c1a}, p^{c1b}) (obr. 4A). První katodický pík (p^{c1a}) odpovídá 4-elektronové redukci nitroskupiny 4-nitroindanu na skupinu hydroxylaminovou, druhý katodický pík (p^{c1b}) pak odpovídá 2-elektronové redukci hydroxylaminové skupiny na skupinu aminovou.

V prostředí, kde byl použit BR pufr o pH 8,0 (obr. 4B), poskytuje 4-nitroindan oproti kyselému prostředí navíc ještě dobře vyvinutý anodický pík (p^{a1}) a další katodický pík (p^{c2}) ve druhém skenu. Zde redukce 4-nitroindanu neprobíhá ve dvou krocích, které by poskytovaly dva píky (p^{c1a}, p^{c1b}). V zásaditém prostředí je chování 4-nitroindanu obdobné jako v prostředí s BR pufrem o pH 8. Zde se projevuje posunutí křivek vlivem vyššího pH prostředí do zápornějších hodnot potenciálu. 4-Nitroindan poskytuje voltametrické píky ve všech třech prostředích při všech rychlostech polarizace. Chování 4-nitroindanu při měření CV na m-AgSAE je obdobné jako při CV na HMDE. Voltamogramy poskytují stejné počty píků ve stejných prostředích, pouze s tím rozdílem, že proudová odezva je na m-AgSAE nižší.

Stanovení 4-nitroindanu v modelových vzorcích pitné a říční vody (potok Botič, Praha; přefiltrována přes filtrační papír) byla prováděna metodami, které při stanovení v prostředích BR pufr – methanolu vykazovaly nižší meze stanovitelnosti. Optimální podmínky, zejména pH BR pufru, byly použity i pro vodná prostředí. Stanovením 4-nitroindanu metodou DPP na DME; DPV na HMDE a DPV na m-AgSAE v modelových vzorcích pitné a říční vody byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $(2–100)\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném rozsahu, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce I. Na obr. 5A jsou uvedeny polarogramy 4-nitroindanu v nejnižším dosaženém koncentračním řádu $(2–10)\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} v říční vodě zaznamenané technikou DPP na DME a na obr. 5B jsou uvedeny voltamogramy 4-nitroindanu v nejnižším koncentračním řádu $(1–10)\cdot10^{-6}$ mol l^{-1} v pitné vodě zaznamenané technikou DPV na m-AgSAE.

Pro porovnání bylo vypracováno i UV-VIS spektrofotometrické stanovení 4-nitroindanu v methanolu při vlnové délce absorpčního maxima 267 nm (l = 1,0 cm) v koncentračním rozmezí 2 až 100 μmol l^{-1}, parametry získaných koncentračních závislostí jsou rovněž shrnuty v tabulce I.

Závěr

Bylo prostudováno elektrochemické chování 4-nitroindanu a za nalezených optimálních podmínek bylo provedeno jeho stanovení pomocí DC tast polarografie (v koncentračním rozmezí $2\cdot10^{-6}$ až $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) a diferenční pulsní polarografie (v koncentračním rozmezí $2\cdot10^{-7}$ až $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) na klasické rtuťové kapající elektrodě.

Dále bylo stanovení provedeno DC voltametrií a diferenční pulsní voltametrií (obě v koncentračním rozmezí $1\cdot10^{-7}$ až $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě a na visící rtuťové kapkové elektrodě (obě v koncentračním rozmezí $2\cdot10^{-7}$ až $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}).

Dosažené meze stavitelnosti (L_Q) se u všech stanovení pohybují v řádu 10^{-7} mol l^{-1} a jsou srovnatelné nebo nižší než mez stanovitelnosti dosažená pomocí UV-VIS spektrofotometrického stanovení 4-nitroindanu při vlnové délce 267 nm proti methanolu. L_Q spektrofotometrického stanovení činí 0,4 μmol l^{-1}.

Metodou cyklické voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě a na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě bylo zjištěno, že rychlost elektrodové reakce při redukci 4-nitroindanu je řízena příspěvkem difuze i adsorpce a reakce je ireverzibilní.

Bylo provedeno přímé stanovení 4-nitroindanu za optimalizovaných podmínek ve vzorcích pitné a říční vody metodou diferenční pulsní polarografie na klasické rtuťové kapající elektrodě (L_Q = 0,1 a 0,2 μmol l^{-1}), metodou diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (L_Q = 0,2 a 0,3 μmol l^{-1}) a metodou diferenční pulsní voltametrie na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (L_Q = 1,0 a 0,3 μmol l^{-1}). Metody byly použity pro koncentrační rozmezí $1\cdot10^{-7}$ až $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63) a projektem SVV 2011-263204.

LITERATURA

1. Mormile M. R., Suflita J. M.: Anaerobe *2*, 299 (1996).
2. Zielinska B., Samy S.: Anal. Bioanal. Chem. *386*, 883 (2006).
3. Suflita J. M., Gibson S. A., Beeman R. E.: J. Indust. Microbiol. *3*, 179 (1988).
4. Borden R. C., Gomez C. A., Becker M. T.: Ground Water *33*, 180 (1995).

5. Booth A. M., Sutton P. A., Lewis C. A., Lewis A. C., Scarlett A., Chau W., Widdows J., Rowland S. J.: Environ. Sci. Technol. *41*, 457 (2007).
6. Rowland S., Donkin P., Smith E., Wraige E.: Environ. Sci. Technol. *35*, 2640 (2001).
7. Barek J., Pumera M., Muck A., Kadeřábková M., Zima J.: Anal. Chim. Acta *393*, 141 (1999).
8. Barek J., Mejstřík V., Muck A., Zima J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *30*, 37 (2000).
9. Matthias O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, 2. vyd., str. 194. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
10. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.
11. Zuman P.: Collect. Czech. Chem. Commun. *58*, 41 (1993).
12. Vyskočil V., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 173 (2009).

POVRCHEM ZESÍLENÁ VIBRAČNÍ SPEKTROMETRIE EXTRAKTŮ LISTOVÍ IBIŠKU (*Hibiscus* L.)

ZUZANA CIESLAROVÁ a PAVEL MATĚJKA

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Zuzana.Cieslarova@vscht.cz

Úvod

Metody povrchem zesílené vibrační spektrometrie (SEVS) – spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (ang. Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) a povrchem zesílené infračervené absorpce (ang. Surface Enhanced Infrared Absorption, SEIRA) – umožňují detekci látek ve vzorku ve velmi malých množstvích[1], a to díky výraznému zesílení naměřených spekter. Podstata zesílení obecně souvisí s excitací lokalizovaných povrchových plasmonů, které vznikají při interakci elektromagnetického záření s molekulami sorbovaných vzorků na kovových površích (zlato, stříbro, měď) vhodné morfologie[2].

Ramanovou spektrometrií byly již dříve studovány karotenoidy obsažené v listoví různých druhů dřevin[3]. Využitím extrakce jako separačního kroku lze získat vzorky obsahující různé zastoupení pigmentů dle použitého extrakčního činidla. Vzhledem k extrémně nízké koncentraci pigmentů v extraktu nebylo možno po odpaření rozpouštědla získat normální Ramanova spektra odparku nad úrovní šumu. Odpařením rozpouštědla z extraktu na zlatých površích by mělo být možné využít efekt povrchového zesílení spekter a získat tak požadovaná spektra extrahovaných látek.

Cílem této práce bylo vyzkoušet možnost analyzovat extrakty listoví povrchem zesílenými spektroskopickým technikami. Listy ibišku byly extrahovány čtyřmi různými extrakčními činidly (methanol, aceton, cyklohexan a hexan). Vzniklý extrakt byl deponován na zlatem pokovené terčíky tak, aby se vytvořil tenký film odparku extraktu na povrchu terčíku. Byla měřena Ramanova a infračervená spektra tenké vrstvy na terčících. Naměřená spektra byla porovnána a bylo sledováno, zda dochází k povrchovému zesílení.

Předkládaná práce se rovněž zabývá typem sorpce extrahovaných látek na povrchu. Aby došlo k zesílení vibračních spekter, je nutné, aby se molekula analytu nacházela v oblasti zesíleného elektromagnetického pole, vytvořeného rezonancí povrchových plasmonů. Tato podmínka může být zajištěna dvojím způsobem – chemisorpcí nebo fyzisorpcí analytu na kovovém povrchu[4]. K určení způsobu sorpce byl extrakt deponován v opakovaných cyklech na zlatý povrch a v každém cyklu byly naměřeny spektrální mapy povrchu.

Experimentální část

V této práci byl využit dříve vyvinutý postup přípravy zlatem pokovených terčíků[5], postupy extrakce listoví ibišku i podmínky měření infračervených a Ramanových spekter jsou blíže popsány v následujícím textu.

Jako podkladové materiály pro přípravu SEVS-aktivních substrátů sloužily platinové terčíky (Safina) o průměru 10 mm. Vyčištěný a vyleštěný terčík[5] byl elektrochemicky pokovován katodickou redukcí v elektrochemické lázni s obsahem dikyanozlatnanu draselného (Safina) dle dříve popsaného postupu[5]. Na elektrody byl postupně vkládán proud: prvních 15 min o hodnotě 5 mA, dalších 10 min proud 10 mA a posledních 5 min 15 mA. Pokovený terčík byl 5 h vyvařován v nasyceném roztoku peroxodisíranu amonného (LachNer) a poté důkladně opláchnut redestilovanou vodou.

Extrahovány byly vždy dva čerstvě utržené listy ibišku (*Hibiscus rosa-sinensis* L., rostliny pěstovány na Ústavu analytické chemie, VŠCHT Praha). Listy byly nastříhány na malé kousky (cca 10 × 10 mm), vloženy do achátové misky a přelity kapalným dusíkem. Pod parami kapalného dusíku byly listy rozetřeny na prášek a v této formě převedeny přímo do zvážené odměrné baňky o objemu 10 ml. Baňky s drtí byly pod atmosférou dusíku doplněny po rysku extrakčním činidlem. Jako extrakční činidla byly použity: methanol, cyklohexan, aceton a hexan (předem zbavené kyslíku probubláním plynným dusíkem).

Listová drť v extrakčním činidle byla vždy 15 min sonifikována (Transsonic 460/H, Elma), následně byla baňka s extraktem protřepána a znovu 15 min sonifikována. Extrakt byl od drti oddělen pomocí PVDF (polyvinyldifluorid) filtru (0,45 μm) přímo do vialky, do které byl předem vložen pozlacený terčík. Terčíky byly v extraktu ponechány minimálně 16 h v temnu. Poté byl terčík vyndán z extraktu, aby se volně odpařilo rozpouštědlo a vytvořil se na povrchu terčíku tenký odparek. Povrch terčíku byl profoukán plynným dusíkem.

Ramanova spektra byla měřena na spektrometru s Fourierovou transformací EQUINOX 55/S s Ramanovým modulem FRA 106/S (Bruker). Zdrojem budícího záření byl Nd-YAG laser (Coherent, 1064 nm, 280 mW). K mapování byl využit "mapovací TLC nástavec" (Bruker) s držákem terčíků (Mechanická dílna, VŠCHT Praha). Polohu nástavce lze softwarem OPUS (Bruker) řídit ve směru osy x a y, snímat tak uspořádanou sadu spekter a konstruovat spektrální mapy. Na každém terčíku bylo měřeno vždy celkem 81 Ramanových spekter (rozlišení 4 cm^{-1}, počet skenů 512) v 9 × 9 bodech vzdálených 0,5 mm od sebe.

Infračervená spektra byla měřena na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací Nicolet 6700 (Thermo). SEIRA spektra byla měřena difúzně-reflexní

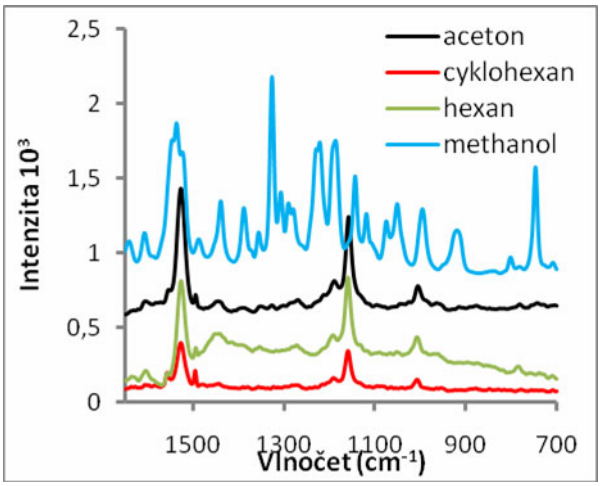
technikou, ke které byl využit nástavec Smart DRIFT (Thermo). Všechna spektra byla měřena s rozlišením 4 cm^{-1} a počtem akumulací 128 na jednotlivé spektrum. Před vlastním měřením terčíku bylo změřeno pozadí na referenčním pozlaceném zrcadle a pak následovalo měření difúzně-reflexních spekter terčíku vždy po jednom spektru na obou stranách terčíku.

V první části práce, zabývající se měřením extraktů ibišku v různých rozpouštědlech, byla měřena nejdříve Ramanova spektra (81 spekter na terčík) a po ní následovalo měření infračervených spekter (2 spektra na terčík). Ve druhé časti, zabývající se studiem typu sorpce deponovaných extraktů, byla měřena pouze Ramanova spektra (vždy 81 spekter na terčík). Na pozlaceném terčíku byla naměřena 1. série spekter, poté byl terčík ponechán 16 h v methanolovém extraktu listů, byla změřena 2. série, extrakt byl odstraňován ponecháním dalších 16 h v čistém methanolu a byla změřena 3. série spekter. Stejným způsobem byl na terčík znovu deponován čerstvě připravený extrakt (4. série) a pak byl odstraňován (5. série).

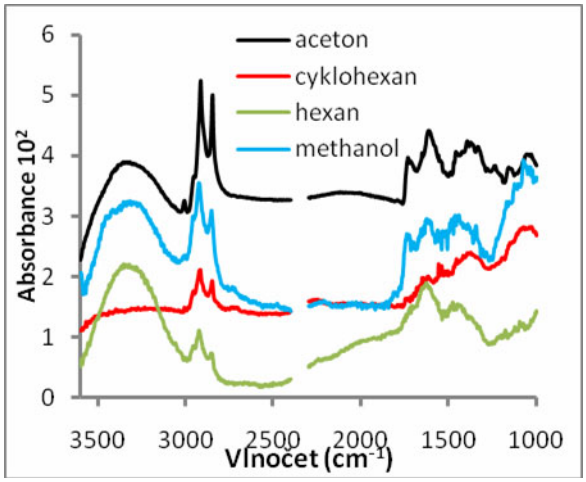
Výsledky a diskuse

Povrchem zesílená vibrační spektrometrie extraktů ibišku v různých rozpouštědlech

Naměřená Ramanova spektra (série 81 spekter) byla zprůměrována a průměrná spektra byla porovnána. Hlavním rysem všech spekter jsou signály příslušející vibracím rostlinných pigmentů (obr. 1). Jak již z podstaty výběru extrakčních činidel vyplývá, extrakcí listoví v různých rozpouštědlech došlo k zachycení různých pigmentů. V méně polárních rozpouštědlech, jako je aceton, a v nepolárním cyklohexanu a hexanu došlo k extrakci nepolárních karotenů (pásy 1528 a 1158 cm^{-1})[6]. Naopak extrakcí polárním methanolem došlo k extrakci chlorofylů (např. pásy 1320 a 743 cm^{-1}) a xanthofylů (1535 a 1143 cm^{-1}).



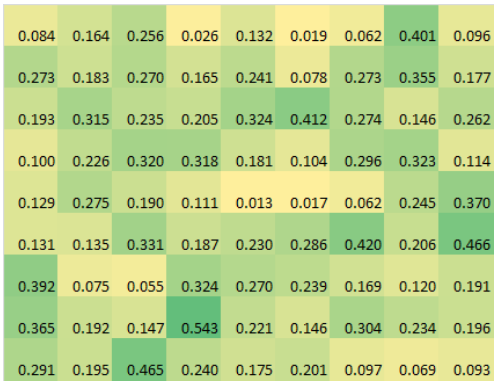
Obr. 1. **Průměrná Ramanova spektra**



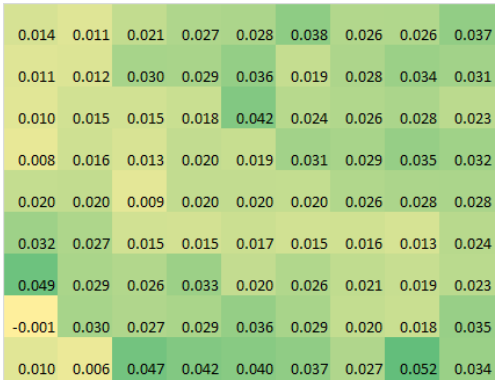
Obr. 2. **Průměrná infračervená spektra**

Naměřená infračervená spektra (vždy 2 na terčíku) byla od sebe odečtena. Porovnáním infračervených spekter (obr. 2) můžeme pozorovat změny v intenzitách některých pásů u spekter extraktů listoví v různých rozpouštědlech. Ve spektrech extraktů v methanolu a acetonu jsou patrné velmi intenzivní pásy okolo 2909 a 2844 cm^{-1} přiřazené nasyceným alifatickým řetězcům a pás okolo 1728 cm^{-1} patřící C=O vibraci esteru karboxylové kyseliny. Ve spektrech extraktů v méně polárním hexanu a cyklohexanu jsou mnohem slabší, pás okolo 1728 cm^{-1} zde zaniká, lze zde nalézt pásy dvojných C=C vazeb okolo 1629 cm^{-1}.

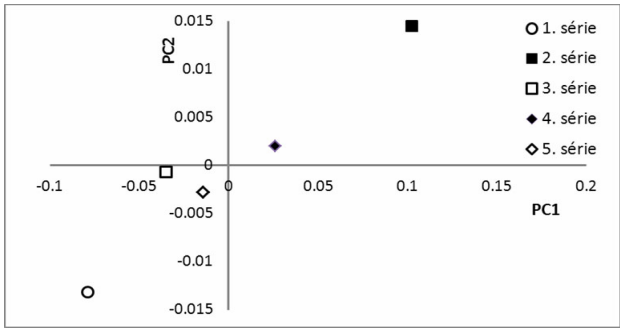
Z naměřených SERS spekter byly vytvořeny spektrální mapy povrchů terčíků z integrovaných hodnot ploch vybraných intenzivních pásů. Na obr. 3 a 4 jsou zobrazeny dvě výsledné odstínové spektrální mapy povrchů se zobrazenými hodnotami ploch nejintenzivnějšího pásu. Pro methanolové extrakty byl vybrán pás vibrace chlorofylů – od 1344 do 1315 cm^{-1} – a pro hexanové extrakty pás karotenů ležící mezi 1230 a 1110 cm^{-1}. Porovnáním hodnot ploch pásů pro obě extrakční činidla bylo zjištěno, že plo-



Obr. 3. **Spektrální mapa – extrakt v methanolu**



Obr. 4. **Spektrální mapa – extrakt v hexanu**



Obr. 5. **Analýza hlavních komponent – graf komponentního skóre těžišť modelů**

chy nejintenzivnějšího pásu v případě methanolu dosahují řádově vyšších hodnot, ale jejich rozložení po povrchu terčíku je mnohem více nehomogenní, než je tomu v případě depozice extraktu v hexanu.

Fyzisorpce *vs.* chemisorpce

Dále byl zjišťován způsob sorpce extrahovaných látek na zlatý povrch. K tomu bylo změřeno 5 výše popsaných sérií spekter pro methanol jako extrakční činidlo. Spektra byla zpracována analýzou hlavních komponent (PCA), graf skóre těžišť modelů je zobrazen na obr. 5. V grafu jsou symboly bez výplně vyznačeny předpokládané „čisté“ zlaté povrchy a plné symboly odpovídají povrchům, na kterých byl deponován extrakt. První nanesení extraktu (2. série vůči 1.) vyvolá největší spektrální změnu, odmytí methanolem pak návrat dat do kvadrantu se zápornými hodnotami 1. i 2. hlavní komponenty (PC), avšak je zřejmé, že nedochází k úplnému očištění terčíku. Další nanesení extraktu (4. série) znamená posun dat do kvadrantu s kladnou hodnotou 1. i 2. PC, ale v menší míře než při 1. nanesení. Odmytí (5. série) pak znamená návrat k hodnotám blízkým 3. sérii. Z uvedených výsledků vyplývá, že převážná část složek extraktu je na zlatý povrch zachycena pouze fyzisorpcí.

Závěr

V této práci byla vyzkoušena možnost měřit SERS a SEIRA spektra odparků z extraktů listoví ibišku ve čtyřech různých rozpouštědlech. V naměřených SERS spektrech lze nalézt pásy, které náleží vibracím rostlinných barviv, polárnějších chlorofylů a xanthofylů a málo polárních karotenů. V SEIRA spektrech jsou spíše pásy látek z kutikulární (voskové) vrstvy.

Z naměřených sérií SERS spekter extraktů opakovaně nanášených na zlatý povrch bylo prokázáno, že látky nejsou na zlatých površích chemisorbovány.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře České republiky, projekt P206/11/0951.

LITERATURA

1. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L. R., Itzkan I., Dasari R., Feld M. S.: Phys. Rev. Lett. *78*, 1667 (1997).
2. Otto AJ. J.: Raman Spectrosc. *36*, 497 (2005).
3. Cieslarová Z.: *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2010.
4. Haynes C. L., McFarland A. D., Van Duyne R. P.: *Anal. Chem. 77*, 338A (2005).
5. Prokopec V.: *Disertační práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2010.
6. Socrates G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. John Wiley&Sons, Chichester 2004.

ANALÝZA SLOŽEK SILIC V BYLINNÝCH NÁPOJÍCH S VYUŽITÍM METODY MIKROEXTRAKCE JEDNOU KAPKOU

ANDREA ČÍŽKOVÁ, MARTIN ADAM, PETRA PAVLÍKOVÁ a KAREL VENTURA

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
Martin.Adam@upce.cz

Úvod

Silice jsou složité směsi organických sloučenin obsažených v rostlinách. Vyskytují se prakticky ve všech částech (květy, plody, listy, stonky, kořeny). Hlavní složkou silic jsou terpenové sloučeniny (monoterpeny a seskviterpeny), které ale většinou nemají velký vliv na vůni a chuť silic, protože nositelem těchto vlastností jsou hlavně kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, estery atd.) [1,2]. Silice jsou významné především pro jejich pozitivní vliv na lidský organismus. Lidé využívali mnoho druhů bylin a koření k léčení různých nemocí (např. máta pro zažívání a bolest hlavy, levandule má protizánětlivý a analgetický účinek, meduňka proti kašli, pelyněk pro zažívání atd.)[3].

Nejčastěji používanými metodami pro izolaci silic z rostlin jsou destilace s vodní parou, lisování či extrakční metody. V poslední době se však stále častěji pro daný účel využívají mikroextrakční techniky, mezi které patří např. mikroextrakce jednou kapkou (SDME – single-drop microextraction). SDME je proces založený na ustavování rovnováhy mezi vzorkem a kapkou vhodného se vzorkem nemísitelného extrakčního rozpouštědla. Získaný extrakt obsahující zachycené sloučeniny je pak přímo nastříknut do nástřikového prostoru plynového chromatografu bez nutnosti zařazení desorpčního kroku[4].

Experimentální část

Pro SDME byla použita mikrostříkačka o objemu 10 μl Microliter 701 pro GC (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko) se sešikmenou jehlou.

Pro analýzu extraktů byl použit plynový chromatograf Hewlett-Packard 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) s plamenovým ionizačním detektorem (FID). Separace byla prováděna na kapilární koloně HP-5 o rozměrech 30 m × 0,32 mm, 1 μm film 5 % fenyl-methylsiloxan (J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

Při přípravě nápoje byly naváženy 3,0 g směsi bylin a následně rozdrceny. Vzorek byl přelit převařenou vodou z vodovodu (250 ml) ochlazenou na 90 °C. Po 5 min byl nápoj zfiltrován a ochlazen na pokojovou teplotu. Pro následnou extrakci metodou DI-SDME (direct immersion, přímé vzorkování) bylo odměřeno 12 ml vzorku do vzorkovací nádobky se septem. Do mikrostříkačky byl natažen 1 μl *p*-xylenu, jehlou bylo propíchnuto septum a hrot byl zasunut 2,5 cm pod hladinu míchaného vzorku. Po vytlačení kapky rozpouštědla probíhala extrakce při teplotě 30 °C po dobu 25 min (cit.[5]).

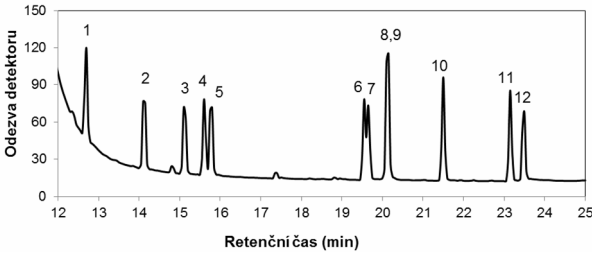
Získané extrakty byly analyzovány metodou GC-FID. Jako nosný plyn byl použit dusík o průtoku 1,5 ml min^{-1} (přetlak na vstupu kolony 50 kPa) Nástřik byl realizován s děličem toku 1:10 při teplotě 250 °C, teplota detektoru byla 250 °C. Teplotní program byl následující: 0–6 min 80 °C, nárůst 6 °C min^{-1} do 250 °C. Ke zjištění kvalitativního a kvantitativního obsahu silic ve vzorcích bylin bylo využito standardních přídavků.

Výsledky a diskuse

Pomocí metody mikroextrakce jednou kapkou ve spojení s plynovou chromatografií byly stanoveny silice v různých vzorcích bylinných nápojů. Pro dosažení přesných a reprodukovatelných výsledků byla optimalizována extrakční metoda i teplotní program pro GC. Sledované silice v bylinných nápojích byly identifikovány pomocí retenčních časů a standardních přídavků, které byly prováděny na samostatných bylinách. Na obr. 1 je uveden chromatogram směsi analyzovaných sloučenin.

Pro metodu DI-SPME byly optimalizovány: extrakční rozpouštědlo (*p*-xylen, *n*-hexan a petrolether), jeho objem (0,5, 1 a 1,5 μl), doba extrakce (1–30 min), teplota (10, 20, 25 a 30 °C), a ponor kapky (0,5, 1,5 a 2,5 cm). Na obr. 2 je znázorněna závislost ploch píků silic na extrakčním rozpouštědle, resp. době extrakce.

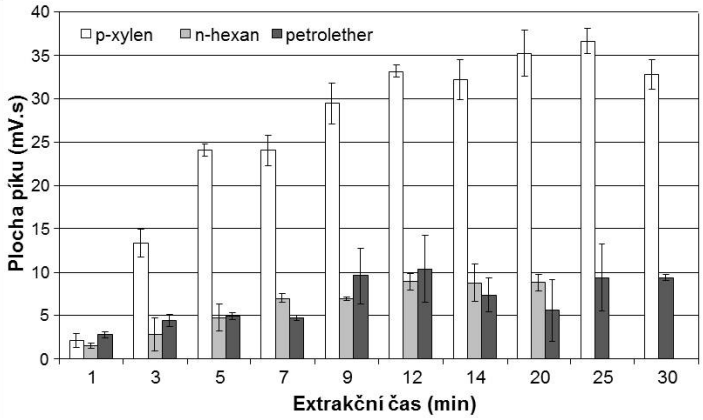
Pro další experimenty bylo zvoleno 25 min a vhodné rozpouštědlo *p*-xylen, jelikož poskytovalo nejvyšší odezvy zkoumané silice, což je patrné z grafu. Bylo rovněž zjištěno, že umístění (ponor) kapky nemá na extrakční účinnost



Obr. 1. **Chromatogram standardů silic;** 1 – α-pinen; 2 – myrcen; 3 – 1,4-cineol; 4 – limonen; 5 – eukalyptol; 6 – kamfor; 7 – menthon; 8 – borneol; 9 – menthol; 10 – nerol; 11 – thymol; 12 – karvakrol

Tabulka I
Mez stanovitelnosti a mez detekce metody DI-SDME vztažená na 1 ml nálevu

Silice	LOD [ng ml^{-1}]	LOQ [ng ml^{-1}]	Silice	LOD [ng ml^{-1}]	LOQ [ng ml^{-1}]
α-pinen	5,60	30,46	limonen	10,55	58,38
eukalyptol	8,35	42,62	nerol	10,15	55,13
menthon	8,38	43,81	kamfor	9,70	23,59
1,4-cineol	9,25	48,07	thymol	10,49	24,48

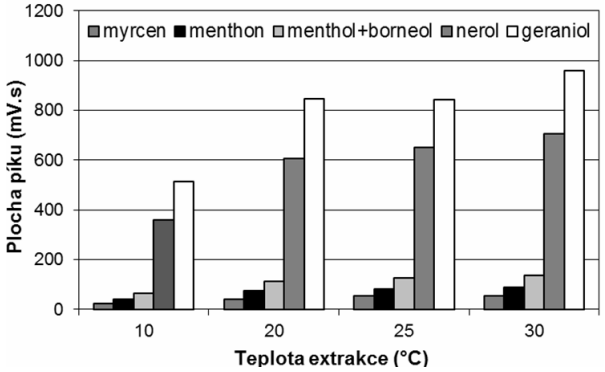


Obr. 2. **Závislost ploch píku myrcenu na době extrakce při DI-SDME;** $n = 3$

zásadní vliv. Pro další extrakce byl zvolen ponor 2,5 cm pod hladinu kapalného vzorku.

Dalším parametrem byla teplota extrakce (viz obr. 3). Pro další analýzy byla zvolena teplota 30 °C, při vyšší teplotě docházelo k ztrátě kapky rozpouštědla v důsledku zvýšené mísitelnosti obou fází.

V tab. I jsou uvedeny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) silic získané na základě poměru signálu a šumu (S/N), kdy LOD = 3×S/N, zatímco LOQ = 10×S/N.



Obr. 3. **Závislost plochy píků vybraných silic na teplotě extrakce při DI-SDME;** $n = 3$

Závěr

Bylo analyzováno 10 vzorků bylinných čajů. Čaj byl připraven z 3,0 g vzorku byliny, který byl přelit 250 ml převařené vody ochlazené na 90 °C a 5 min louhován. U těchto vzorků bylo moderní extrakční technikou (mikroextrakce jednou kapkou − SDME) zjišťováno zastoupení a obsah vybraných složek silic. Extrakce silic probíhaly při teplotě 30 °C po dobu 25 min do 1 ml *p*-xylenu zavěšeného na hrotu mikrostříkačky.

Bylinné nápoje byly extrahovány metodou přímého vzorkování. Získané extrakty byly analyzovány plynovou chromatografií s plamenovou ionizační detekcí. Množství izolovaných silic se lišilo zastoupením jednotlivých bylin ve vzorcích. Větší množství silic bylo zjištěno v bylině, do nápoje přešla pouze část tohoto množství, což je způsobeno špatnou rozpustností silic ve vodě. Pokud tomu bylo naopak, extrakce mohla být ovlivněna různým chováním silic při teplotě 90 °C a odlišnými charakteristikami vzorků.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantového projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).

LITERATURA

1. Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. Ossis, Tábor 2002.
2. Hálková J., Rumíšková M., Riedlová J.: *Analýza potravin*. Vydavatel RNDr. Ivan Straka, Újezd u Brna 2000.
3. Hajhashemi V., Sadraei H., Ghannadi A. R., Mohseni M.: J. Ethnopharmacol. *71*, 187 (2000).
4. Zhao E., Han L., Juany S., Wang Q., Zhou Z.: J. Chromatogr., A *1114*, 269 (2006).
5. Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: J. Sep. Sci. *31*, 356 (2008).

METABOLOMICKÉ PROFILOVÁNÍ TKÁNÍ RYB POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V OTEVŘENÉM PROSTORU

HANA DAŇHELOVÁ, TOMÁŠ ČAJKA a JANA HAJŠLOVÁ

Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Hana.Danhelova@vscht.cz

Úvod

Welfare ryb v akvakulturách je v poslední době věnována značná pozornost, neboť se zdaleka nejedná pouze o aspekty spojené s ochranou zvířat, ale tato problematika je velmi úzce spojena rovněž s kvalitou produkovaných ryb[1]. Stresovými faktory mohou být vnější a vnitřní podněty vyvolávající u organismu bolest, úzkost, nepohodu nebo jinou nepříznivou odezvu, která zpravidla ústí ve fyziologickou nerovnováhu. Fyziologická rovnováha látek, které se na stresové odezvě organismu podílejí, může být zhodnocena na základě komplexního vyšetření krevní plazmy a tkání[2].

Klasický přístup (bio)analytické chemie spočívající ve stanovení jednotlivých indikátorových látek je však značně pracný, ekonomicky nákladný a časově náročný. Ačkoliv se pro tyto účely aplikuje řada různých analytických metod, žádná z nich neposkytuje úplný obraz metabolomu (profil nízkomolekulárních metabolitů), který by mohl celkově welfare organismu výstižně dokumentovat[3]. Mezi různými bioindikátory mají v metabolomu zvláštní význam lipidy, jejichž koncentrace, složení a relativní zastoupení je závislé jak na stresových faktorech, tak na složení a formě krmiva.

V této práci byla pro získání obrazu metabolomu zvolena nová metoda hmotnostní spektrometrie pracující v otevřeném prostoru s využitím iontového zdroje pro přímou analýzu v reálném čase (Direct Analysis in Real Time – DART) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s analyzátorem doby letu iontů (TOFMS). Technika DART využívá plasmou excitované atomy helia a komponenty atmosféry (H_2O, O_2) k ionizaci složek vzorku. Následně jsou získána relativně jednoduchá hmotnostní spektra charakterizovaná $[M+H]^+$ (popř. $[M]^{+\bullet}$) v pozitivním módu, nebo $[M–H]^-$ (popř. $[M]^{-\bullet}$) v negativním módu. V kombinaci s průletovým analyzátorem s vysokým hmotnostním rozlišením (TOFMS) je možná identifikace ionizovaných látek, aniž by tyto byly nejprve separovány[4]. Jelikož je během analýz získáno značné množství informací (proměnných) pro velký počet vzorků (objektů), je využíváno matematických a statistických postupů (multivariační analýza) umožňujících získat maximum užitečných informací z daných dat[5].

Experimentální část

Analyzovaný materiál

Vzorky byly dodány ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích. Jednalo se o svalovinu sladkovodních ryb, všežravého kapra obecného *Cyprinus cardo* L. a rostlinožravého amura bílého *Ctenopharyngodon idella.*

Byly porovnávány ryby chované v různém prostředí (sádka / rybník) a různě krmené ryby (přirozená potrava / různě upravené tritikale).

Pracovní postup

Úprava vzorků

Analyzované vzorky se nechaly pozvolna rozmrazit a následně byla odebrána neznečištěná část svaloviny bez kostí a kůže. Do 50ml kyvety bylo přidáno k 2 g homogenátu svaloviny 10 ml destilované vody a 10 ml cyklohexanu. Směs v kyvetě byla zprudka protřepávána 10 s. Následovala 60 s extrakce Ultraturraxem (6000 rpm). Vzorek byl odstřeďován po dobu 10 min při teplotě 5 °C a otáčkách 11 000 rpm. Oddělené vrstvy – horní organická a spodní vodná byly separátně odebrány do vialek a ihned podrobeny analýze pomocí DART–TOFMS v pozitivním a negativním módu ionizace.

DART–TOFMS analýza

Optimalizované parametry DART–TOFMS systému použité pro analýzu extraktů rybí svaloviny shrnuje tabulka I.

Výsledky a diskuse

Obr. 1 uvádí ukázku metabolomického profilu získaný DART–TOFMS analýzou cyklohexanového extraktu svaloviny kapra v pozitivním módu DART ionizace za použití amoniaku jako dopantu, který slouží pro dosažení lepší intenzity triacylglycerolů (TAG) během ionizace.

Obr. 2 uvádí metabolomický profil získaný DART–TOFMS analýzou vodného extraktu svaloviny kapra v negativním módu DART ionizace.

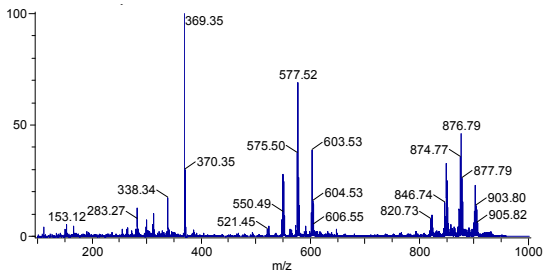
Chemometrická analýza byla provedena následujícím postupem:

(i) *Výběr proměnných*. Pro chemometrickou analýzu bylo vybráno 22 iontů (markerů) v případě DART(+) analýzy (cyklohexanová vrstva) a 28 iontů v případě DART(–) analýzy (vodná vrstva).

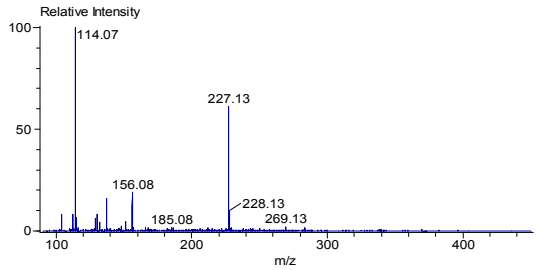
(ii) *Transformace proměnných.* Intenzity daných sloučenin byly následně transformovány tak, že markeru o nejvyšší intenzitě byla přiřazena hodnota „1“ a hod-

Tabulka I
Optimalizované parametry DART–TOFMS metody

Parametr	Positivní mód ionizace (analýza cyklohexanové fáze)	Negativní mód ionizace (analýza vodné fáze)
DART		
Ionizační plyn	helium	helium
Teplota ionizačního plynu	250 °C	250 °C
Průtok ionizačního plynu	3 l/min	3 l/min
Napětí na výbojové jehle	–3000 V	–3000 V
Napětí na elektrodě 1	+150 V	–150 V
Napětí na elektrodě 2	+250 V	–350 V
Doba desorpce	30 s	5 s
Dopant	amoniak	—
TOFMS		
Napětí iontové optiky	900 V	900 V
Napětí detektoru	–2400 V	+2300 V
Akviziční rychlost	5 spekter/s	5 spekter/s
Rozsah *m/z*	80–1000	80–500



Obr. 1. **Hmotnostní spektrum (DART–TOFMS) metabolomu rybí svaloviny, positivní mód ionizace s využitím dopantu (amoniak); analýza cyklohexanové fáze extraktu**



Obr. 2. **Hmotnostní spektrum (DART–TOFMS) metabolomu rybí svaloviny, negativní mód ionizace; analýza vodné fáze extraktu**

noty pro ostatní sloučeniny byly pak proporčně dopočítány.

(iii) *Redukce dimenze dat.* Pro snížení dimenze dat byla použita diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA). Získané skryté proměnné (LVs) pak byly použity pro klasifikaci vzorků pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA).

(iv) *Výběr optimálního počtu LVs.* Optimální počet LVs byl získán na základě lineární diskriminační analýzy s odlož-jeden-mimo příčnou validací (LOOCV).

(v) *Klasifikace vzorků.* Klasifikace vzorků se vyjádří predikční schopnost, tj. % vzorků v testovací sadě správně klasifikovaných za použití modelu vytvořeného z trénovacím kroku (v daném případě pomocí LOOCV).

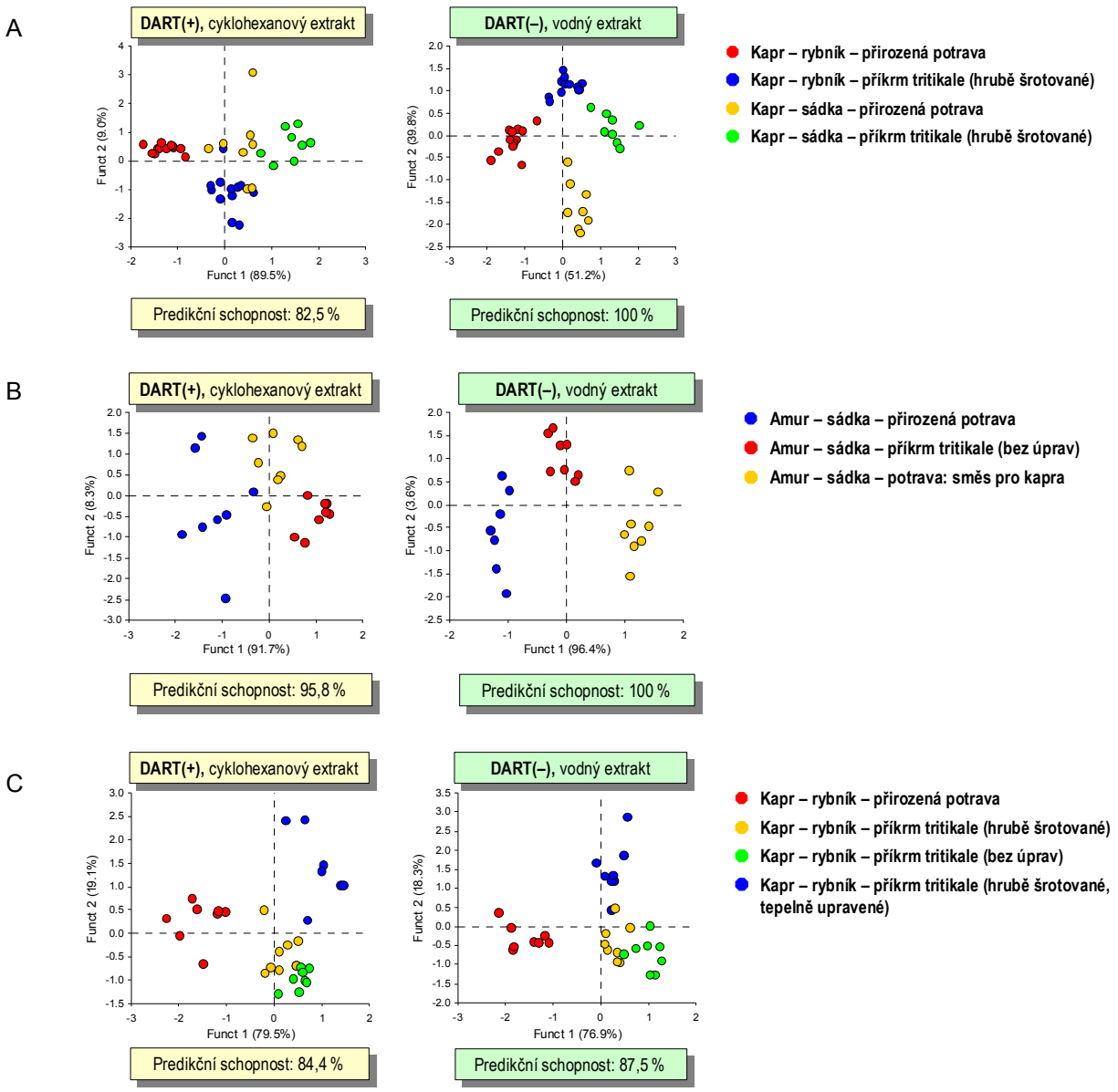
(vi) *Grafické znázornění shlukování.* Pro lepší vizualizaci byl vytvořen graf s prvními dvěma diskriminačními funkcemi (LDA) s vyznačenými skupinami ilustrujícími shlukování jednotlivých druhů ryb (obr. 3).

Závěr

Za účelem zhodnocení metabolomických profilů tkání ryb ve vztahu k vnějším faktorům při produkci ryb (kapr, amur) byla použita metoda využívající desorpční ionizační techniky přímé analýzy v reálném čase (Direct Analysis in Real Time – DART) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s analyzátorem doby letu iontů (TOFMS).

Pro izolaci nízkomolekulární látek (metabolomu) svaloviny ryb byla použita jednoduchá extrakční metoda umožňující izolaci širokého spektra analytů (aminokyseliny, dusíkaté báze, mastné kyseliny, triacylglyceroly, cholesterol).

Na základě provedené chemometrické analýzy bylo možné rozlišit dle profilu metabolomu svaloviny s relativně vysokou klasifikační účinností analyzované ryby ve vztahu k vnějším faktorům při jejich produkci.



Obr. 3. **Predikční schopnosti a grafy prvních dvou diskriminačních funkcí (LDA) s vyznačenými skupinami ilustrujícími shlukování analyzovaných kaprů ve vztahu k vnějším faktorům při jejich produkci**

Tato studie byla realizována v rámci projektů: (i) COST, Action 867 a (ii) MSM6046137305 financovaných Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

LITERATURA

1. Welfare of Fish in European Aquaculture, http://www.cost.esf.org/domains_actions/fa/Actions/Welfare_of_Fish, staženo 6.1.2010.
2. Huntingford F. A., Adams C., Braithwaite V. A., Kadri S., Pottinger T. G., Sandoe P., Turnbull J. F.: J. Fish Biol. *68*, 332 (2006).
3. Villas-Boas S. G., Roessner U., Hansen M. A. E., Semedsgaard J., Nielsen J.: *Metabolome Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons, Oxford 2007.
4. Cody R. B., Larmée J. A., Nilles J. M., Durst H. D.: JOEL News *40*, 1 (2005).
5. Berrueta L. A., Alonso-Salces R. M., Héberger K.: J. Chromatogr., A *1158*, 196 (2007).

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ NITROVANÝCH EKOTOXICKÝCH SLOUČENIN NA LEŠTĚNÉ STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODĚ

JAN DĚDÍK, VLASTIMIL VYSKOČIL a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
dedija@gmail.com

Úvod

Leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda (p-AgSA-CE) je poměrně nedávno vyvinutým typem senzoru[1], který představuje vhodnou náhradu za rtuťové elektrody[2]. Použitelnost p-AgSA-CE byla nově testována pro stanovení ekotoxických aromatických sloučenin obsahujících snadno elektrochemicky redukovatelnou nitroskupinu, konkrétně 5-nitrobenzimidazolu (5-NBIA) a kyseliny pikrové (2,4,6-trinitrofenolu). Toxikologické studie těchto látek prokázaly jejich nepříznivý vliv na živé organismy, v případě kyseliny pikrové i na lidské zdraví[3].

Cílem práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení uvedených analytů v pufrovaných vodných prostředích pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na p-AgSA-CE a ověřit použitelnost takto nově vyvinutých metod pro stanovení studovaných ekotoxických polutantů v modelových vzorcích pitné a říční vody.

Experimentální část

Reagencie

Studovanými látkami byly 5-nitrobenzimidazol (CAS Number 94-52-0; 98%, Sigma-Aldrich, SRN) a 2,4,6-trinitrofenol (kyselina pikrová) (CAS Number 88-89-1; p.a., Lachema, Brno). Zásobní roztoky 5-NBIA a kyseliny pikrové v deionizované vodě byly připraveny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}. Pro úplné rozpuštění 5-NBIA musela být použita sonifikace v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Roztoky o nižších koncentracích se získávaly přesným naředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě. Dále byly použity tyto chemikálie: kyselina trihydrogenfosforečná (85%, p.a., Lach-Ner, Neratovice), octová kyselina (99,8%, p.a., Lach-Ner), kyselina trihydrogenboritá (p.a., Lachema), chlorid draselný (p.a., Lach-Ner), hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner), deionizovaná voda (Milli-Q plus system, Milipore, Billerica, USA).

Kyselá složka Brittonova-Robinsonova pufru (B-R pufru) byla připravena obecně používaným postupem z kyseliny trihydrogenborité, octové kyseliny a kyseliny trihydrogenfosforečné (všechny ve výsledné koncentraci 0,04 mol l^{-1}). Zásaditá složka obsahovala hydroxid sodný o koncentraci 0,2 mol l^{-1}. BR pufry o daném pH se připravily smícháním kyselé a zásadité složky.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí počítačem řízeného přístroje Eco-Tribo Polarograf ovládaného programem Polar Pro 5.1 (vše Polaro-Sensors, Praha), který pracoval v operačním systému Microsoft Windows XP (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda (p-AgSA-CE; průměr disku 2,9 mm, povrch disku 6,6 mm^2; Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Praha). Jako referentní elektroda sloužila argentchloridová elektroda (3 mol l^{-1} KCl; typ RTP-CZ-00608) a jako pomocná elektroda se používala platinová drátková elektroda (obě Monokrystaly, Turnov).

K měření pH připravených pufrů sloužil pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou nakalibrovaný pomocí standardních roztoků pufrů.

Pracovní postupy

Předúprava pracovní elektrody

Před použitím elektrody k měření se provádí 3 kroky:

1. Mechanické čištění a leštění se používá, pokud dojde k výraznému zhoršení odezvy, např. zanesením aktivních míst na povrchu elektrody, kdykoli během měření. K mechanickému čištění se dá využít jemný smirkový papír, leštění se provádí aluminou na sametovém podkladu. Pro tento účel byla použita souprava PK-4 Polishing kit (BASi, West Lafayette, USA) a alumina s velikostí částic 1,1 μm.

2. Elektrochemická aktivace elektrody v roztoku KCl. Při aktivaci se postupuje tak, že voltametrickou nádobku naplníme 10 ml roztoku 0,2 mol l^{-1} KCl. Do něj ponoříme pracovní elektrodu v tříelektrodovém zapojení a vložíme na ni napětí –2200 mV po dobu 5 min bez probublávání dusíkem za stálého míchání. Při tomto potenciálu se z povrchu elektrody odstraňují oxidy a naadsorbované látky. Takto můžeme zlepšit opakovatelnost a citlivost stanovení. Elektrochemická aktivace byla prováděna na počátku každého dne, kdy se s elektrodou měřilo.

3. Regenerace elektrody byla zanesena do procedury v řídícím programu a prováděna před každým měřením vzorku. Probíhala tak, že na elektrodu byly střídavě v pulsech o délce 0,05 s vkládány regenerační potenciály po dobu 30 s (150 cyklů). Pro sledování chování látky při

různých pH bylo nezbytné nalézt regenerační potenciály pro každou hodnotu pH zvlášť. Pro získání regeneračních potenciálů bylo do voltametrické nádobky odpipetováno 9 ml B-R pufru o daném pH a 1 ml destilované vody, tzv. základní elektrolyt, elektrodová reakce se nechala probíhat až do okamžiku, kdy v anodické oblasti proudu začala křivka strmě klesat (nad hodnotu +1 μA) a v katodické oblasti proudu strmě stoupat (nad hodnotu –1 μA). Dvojice potenciálů počátku těchto nárůstů byly zvoleny jako potenciály regenerační; pro metody DPV a DCV byly použity stejné hodnoty. Nalezené hodnoty regeneračních potenciálů jsou zaznamenány v tab. I.

Voltametrická měření

Při měření odezvy studovaných látek v závislosti na měnícím se pH byl do 10ml odměrné baňky napipetován 1 ml vzorku a baňka byla doplněna po rysku pufrem o daném pH. Takto připravený vzorek byl přelit do voltametrické nádobky a probublán 5 min dusíkem, aby byl zbaven rozpuštěného kyslíku.

Při proměřování kalibrační závislosti byly do 10ml odměrných baněk připraveny roztoky o daných koncentracích odpipetováním příslušného množství zásobního roztoku stanovované látky a odměrná baňka byla doplněna po rysku pufrem o zjištěném optimálním pH.

Tato měření byla provedena pětkrát pro každou hodnotu pH i pro každou koncentraci vzorku. Měření opakovatelnosti stanovení s regeneračním krokem mezi měřeními a bez regeneračního kroku mezi měřeními byla provedena dvacetkrát.

Pro metodu DPV byly v řídícím programu nastaveny tyto parametry: výška pulsu –50 mV, šířka pulsu 100 mV, rychlost skenu 20 mV s^{-1} a počet regenerační cyklů 150. Rychlost skenu a počet regeneračních cyklů byly stejné i pro metodu DCV.

Tabulka I
Počáteční (E_{reg1}) a konečné (E_{reg2}) regenerační potenciály zjištěné měřením základního elektrolytu a použité při DCV i DPV měření pro daná pH ve vodném roztoku B-R pufru

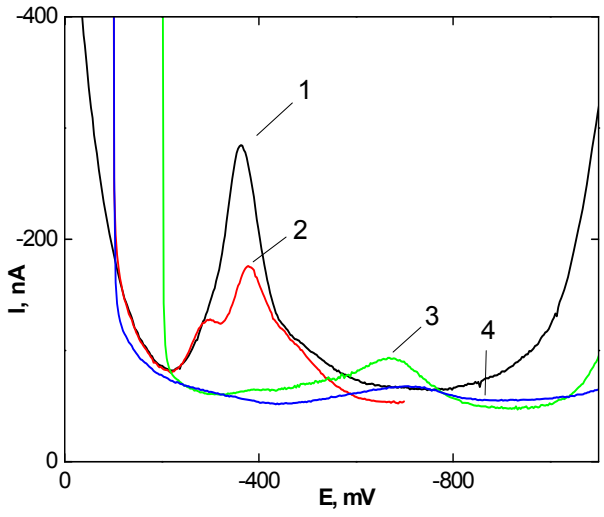
pH	E_{reg1} [mV]	E_{reg2} [mV]
2,0	200	–950
3,0	50	–1000
4,0	0	–1050
5,0	0	–1150
6,0	–50	–1200
7,0	–50	–1300
8,0	–100	–1350
9,0	–100	–1450
10,0	–150	–1450
11,0	–150	–1500
12,0	–200	–1500
12,9	–250	–1600

Modelové vzorky vody

Jako modelové vzorky vody byly zvoleny vzorky pitné vody z vodovodní sítě v budově Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a říční voda z Vltavy (odebraná v oblasti Výtoně v Praze, přefiltrovaná přes skleněnou fritu o pórovitosti S4), ke kterým bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku kyseliny pikrové. Vzorek pro voltametrická měření technikami DPV a DCV na p-AgSA-CE byl připraven z 9 ml pitné nebo říční vody obsahující příslušné množství kyseliny pikrové, které byly doplněny do 10 ml roztokem B-R pufru o pH 2,0. Vzorek byl před měřením probublán dusíkem.

Výsledky a diskuse

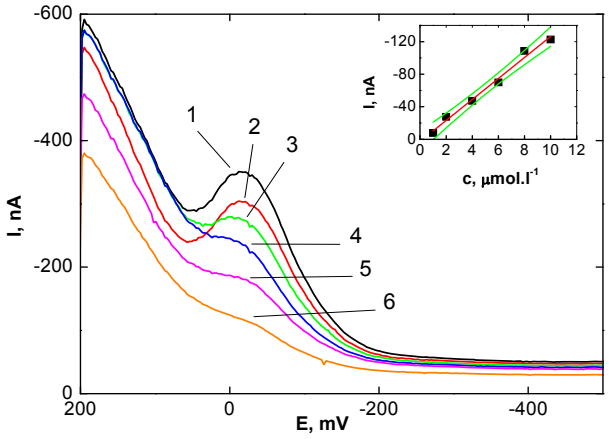
Pro 5-nitrobenzimidazol bylo při použití techniky DPV na p-AgSA-CE zjištěno, že s rostoucím pH se potenciál píku 5-nitrobenzimidazolu posunoval k zápornějším hodnotám potenciálu, jak popisuje tab. II. Pro další měření bylo jako vhodné vybráno prostředí vodného roztoku B-R pufru o pH 5, při kterém látka poskytovala nejlépe vyvinutý pík. Při vkládání regeneračních potenciálů (E_{reg1}= 0 mV, E_{reg2}= –1150 mV) na pracovní elektrodu docházelo ke zlepšení opakovatelnosti měření. Hodnota relativní směrodatné odchylky (s_r) odezvy dvaceti po sobě následujících stanovení 5-NBIA poklesla z 3,3 % při nevkládání regeneračních potenciálů na 2,3 % při jejich vkládání. Zlepšila se stabilita odezvy, ale došlo k poklesu odezvy sledované látky přibližně o 10 nA. Regenerační kroky byly zařazeny pro všechna následná měření. Pro 5-NBIA nebyly proměřeny kalibrační křivky, jelikož s časem docházelo k poklesu velikosti odezvy a ke zhoršení kvality píků, což



Obr. 1. **Vývoj odezvy 5-NBIA (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) v čase.** Měření ze dne 4.1.2010 (1), měření ze dne 11.1.2010 (2), měření ze dne 23.2.2010 (3), měření ze dne 24.2.2010 (4). Měřeno v roztoku B-R pufru o pH 5,0 na p-AgSA-CE technikou DPV

Tabulka II
Chování 5-NBIA (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) při různém pH v prostředí vodného roztoku B-R pufru, měřeno na p-AgSA-CE technikou DPV. Hodnota 1,9 je hodnota pH samotné kyselé složky B-R pufru, hodnota 13,2 je hodnota pH samotné zásadité složky B-R pufru

pH	EpI [mV]	IpI [nA]	EpII [mV]	IpII [nA]
1,9	–420	–20	–	–
3,0	–236	–38	–387	–38
4,0	–315	–92	–396	–71
5,0	–386	–122	–451	–89
6,0	–453	–133	–484	–122
7,0	–492	–94	–572	–109
8,0	–525	–66	–654	–90
9,0	–570	–66	–678	–93
10,0	–617	–67	–703	–85
11,0	–639	–66	–727	–81
12,0	–673	–57	–768	–58
13,2	–677	–72	–766	–110



Obr. 2. **DP voltamogramy kyseliny pikrové na p-AgSA-CE v prostředí B-R pufru o pH 2,0** (E_{reg1}= 200 mV, E_{reg2}= –950 mV). Koncentrace kyseliny pikrové: 10 (1); 8 (2); 6 (3); 4 (4); 2 (5) a 1 µmol l^{-1} (6). Odpovídající kalibrační závislost je znázorněna ve vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05

je znázorněno na obr. 1. Původní měřící schopnosti elektrody nebyly obnoveny ani po jiných aktivačních postupech, ani po hrubším mechanickém očištění smirkovým papírem. Také bylo zjištěno, že v průběhu měření došlo k úbytku elektrodového materiálu. Těmto zjištěním bude v budoucnu věnována hlubší pozornost, jelikož obdobné chování stanovované látky na p-AgSA-CE zatím nebylo popsáno[4].

Potenciál píku kyseliny pikrové se s rostoucím pH vodného roztoku B-R pufru také zvyšoval ve směru záporných hodnot. K uvedenému jevu docházelo při obou technikách. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při pH 2,0 jak při DPV, tak při DCV na p-AgSA-CE. Toto prostředí bylo zvoleno jako optimální pro voltametrické stanovení kyseliny pikrové. Hodnoty potenciálu píku v závislosti na pH pro obě techniky shrnuje tab. III. Vkládání regeneračních potenciálů (E_{reg1}= 200 mV a E_{reg2}= –950 mV) na pracovní elektrodu vedlo ke zlepšení opakovatelnosti měření. Hodnota s_r odezvy u DPV techniky pro dvacet po sobě následujících měření poklesla z 2,2 % při nevkládání regeneračních potenciálů na 1,0 % při jejich vkládání a u DCV techniky z 5,5 % při nevkládání regeneračních potenciálů na 2,0 % při vkládání regeneračních potenciálů. Při použití regeneračního kroku se také zvýšila odezva kyseliny pikrové u DPV přibližně o 130 nA a u DCV až o více než 200 nA. Regenerační kroky proto byly předřazeny každému dalšímu měření.

Technikou DCV a DPV byly pro kyselinu pikrovou proměřeny kalibrační závislosti. Voltamogramy nejnižších dosažených koncentračních řádů jsou ukázány na obr. 2 pro DPV a obr. 3 pro DCV techniku. Parametry kalibračních přímek jsou shrnuty v tab. IV.

Tabulka III
Chování kyseliny pikrové (c=1·10^{-4} mol l^{-1}) při různém pH v prostředí vodného roztoku B-R pufru, měřeno na p-AgSA-CE technikou DPV a DCV. Hodnota 12,9 je hodnota pH samotné zásadité složky B-R pufru

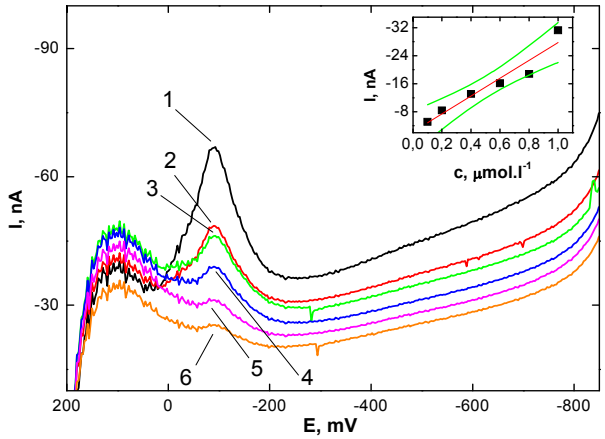
pH	DPV		DCV	
	Ep [mV]	Ip [nA]	Ep [mV]	Ip [nA]
2,0	–110	–651	–189	–908
3,0	–188	–602	–258	–828
4,0	–263	–578	–339	–800
5,0	–332	–483	–414	–769
6,0	–395	–425	–480	–712
7,0	–452	–326	–543	–613
8,0	–491	–188	–579	–506
9,0	–551	–184	–657	–464
10,0	–632	–121	–732	–324
11,0	–692	–130	–771	–336
12,0	–701	–150	–778	–377
12,9	–638	–209	–789	–306

Pro voltametrické stanovení kyseliny pikrové v modelových vzorcích pitné a říční vody byla použita technika DCV, se kterou bylo dosaženo nižší meze stanovitelnosti při vývoji vlastní metody. Pro proměření kalibrační závislosti byl použit roztok, který obsahoval 9 ml pitné nebo říční vody, ve kterém byl přídavek příslušného množství kyseliny pikrové, a 1 ml B-R pufru o pH 2,0. Na

Tabulka IV
Shrnutí parametrů kalibračních přímek získaných při měření kyseliny pikrové v B-R pufru pH 2,0, není-li uvedeno jinak

Technika	c [mol l^{-1}]	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	R	L_Q [mol l^{-1}]
DPV	$1\cdot10^{-5}$ – $1\cdot10^{-4}$	–11,1	–27	–0,999	–
	$1\cdot10^{-6}$ – $1\cdot10^{-5}$	–12,9	+2,6	–0,992	$1\cdot10^{-6}$
DCV	$1\cdot10^{-5}$ – $1\cdot10^{-4}$	–17,1	–64	–0,999	–
	$1\cdot10^{-6}$ – $1\cdot10^{-5}$	–24,4	–10	–0,997	–
	$1\cdot10^{-7}$ – $1\cdot10^{-6}$	–25,5	–2,3	–0,954	$1\cdot10^{-7}$
DCV[a]	$1\cdot10^{-5}$ – $1\cdot10^{-4}$	–15,0	–5,4	–0,996	–
	$6\cdot10^{-7}$ – $1\cdot10^{-5}$	–15,3	–1,1	–0,995	$6\cdot10^{-7}$
DCV[b]	$1\cdot10^{-5}$ – $1\cdot10^{-4}$	–12,1	–1,8	–0,996	–
	$1\cdot10^{-6}$ – $1\cdot10^{-5}$	–11,5	+0,5	–0,998	$2\cdot10^{-6}$

[a] Přímé stanovení kyseliny pikrové v modelovém vzorku pitné vody, [b] přímé stanovení kyseliny pikrové v modelovém vzorku říční vody

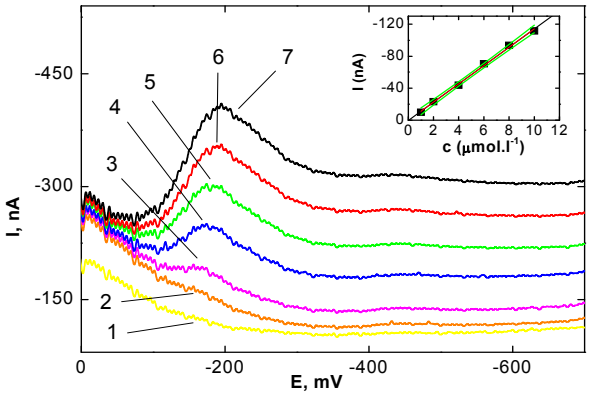


Obr. 3. **DC voltamogramy kyseliny pikrové na p-AgSA-CE v prosředí B-R pufru o pH 2,0** (E_{reg1}= 200 mV, E_{reg2}= –950 mV). Koncentrace kyseliny pikrové: 1 (1); 0,8 (2); 0,6 (3); 0,4 (4); 0,2 (5) a 0,1 µmol l^{-1} (6). Odpovídající kalibrační závislost je znázorněna ve vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05

obr. 4 jsou zaznamenány DC voltamogramy, které představují přímé stanovení kyseliny pikrové v říční vodě v koncentračním rozmezí 1–10 µmol l^{-1}. Parametry získaných kalibračních křivek jsou shrnuty v tab. IV.

Závěr

Byl proměřen vliv pH na voltametrické chování 5-nitrobenzimidazolu (NBIA) a kyseliny pikrové pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na leštěné stříbrné pevné amalgámové kompozitní elektrodě (p-AgSA-CE). Jako optimální prostředí pro stanovení 5-NBIA byl zvolen Brittonův-Robinsonův pufr (B-R pufr) o pH 5,0. Pro 5-NBIA nebyla proměřena kalibrační závislost, protože došlo k znehodnocení odezvy této látky pravděpodobně vlivem tvorby komplexu na povrchu elektrody a obsazením aktivních míst. Stanovení kyseliny pikrové technikou DCV a DPV na p-AgSA-CE probíhalo za nalezených optimálních podmínek ve vodném roztoku B-R pufru o pH 2,0. Technikou DPV byla kalibrační závislost změřena v rozsahu koncentrací $1\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}. Mez stanovitelnosti (L_Q) měla hodnotu $1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1}. Pro tech-



Obr. 4. **DC voltamogramy kyseliny pikrové na p-AgSA-CE v prostředí říční voda – B-R pufr o pH 2,0** (9:1) (E_{reg1}= 200 mV, E_{reg2}= – 950 mV). Koncentrace kyseliny pikrové v říční vodě: 0 (1); 1 (2); 2 (3); 4 (4); 6 (5); 8 (6) a 10 (7) µmol l^{-1}. Odpovídající kalibrační závislost je znázorněna ve vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05

niku DCV byla naměřena kalibrační závislost v rozmezí $1\cdot10^{-7}$–$1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1} s L_Q $1\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}. Vypracovaná DCV metoda patří mezi velmi citlivé metody stanovení kyseliny pikrové a je srovnatelná se spektrálními a chromatografickými technikami stanovení[5–11].

Vyvinutá DCV metoda stanovení kyseliny pikrové byla úspěšně aplikována na modelové vzorky pitné a říční vody. L_Q dosažená v pitné vodě činila $6\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} a ve vzorcích říční vody $2\cdot10^{-6}$ mol l^{-1}. Obě zjištěné hodnoty dokazují použitelnost p-AgSA-CE jako senzoru pro stanovení mikromolárních a submikromolárních koncentrací této látky.

Tato práce vznikla byla finančně podporována MŠMT ČR (projekty MSM 0021620857, LC 06035 a RP 14/63) a projektem SVV 2011-263204.

LITERATURA

1. Yosypchuk B., Navrátil T., Lukina A. N., Pecková K., Barek J.: Chem. Anal. (Warsaw) *52*, 897 (2007).
2. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 189 (2009).
3. Chiu C. W., Lee L. H., Wang C. Y., Bryan G. T.: Mutat. Res. *58*, 11 (1978).
4. Navrátil T., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 131 (2009).
5. Long L. P., Wang K. M., Yang R. H., Yang X. H.: Chin. J. Anal. Chem. *31*, 414 (2003).
6. Niu C. G., Li Z. Z., Zhang X. B., Lin W. Q., Shen G. L., Yu R. Q.: Anal. Bioanal. Chem. *372*, 519 (2002).
7. Ni R., Tong R. B., Guo C. C., Shen G. L., Yu R. Q.: Talanta *63*, 251 (2004).
8. Zeng H. H., Wang K. M., Yu R. Q.: Anal. Chim. Acta *298*, 271 (1994).
9. Wang X. G., Fan Y. J.: Russ. J. Electrochem. *45*, 1188 (2009).
10. Shankaran D. R., Gobi K. V., Matsumoto K., Imato T., Toko K., Miura N.: Sens. Actuators, B *100*, 450 (2004).
11. Pamme N., Steinbach K., Ensinger W. J., Schmidt T. C.: J. Chromatogr., A *943*, 47 (2002).

SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU S VYUŽITÍM HPLC A ICP/MS PRO VÝZKUM DISTRIBUCE SELENU V BARIÉRÁCH JADERNÉHO ÚLOŽIŠTĚ

ŠTĚPÁN EICHLER a OTO MESTEK

Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
stepan.eichler@email.cz

Úvod

Ukládání jaderného odpadu do jaderných úložišť hluboko pod zemí je problematika, která je v současné době značně diskutována. Realizaci takového projektu však předchází složitý výzkum, ve kterém musí být ověřeno, že jednotlivé štěpné produkty nebudou z místa úložiště v dlouhém časovém horizontu řádu tisíců let žádným způsobem distribuovány. Problematika sledování distribuce radionuklidů se týká zejména štěpných produktů ^{238}U, jenž mají dlouhý poločas rozpadu a nejsou zadržovány na inženýrských barierách jaderného úložiště. Mezi takové prvky patří také isotop selenu ^{79}Se. V případě modelování retence různých chemických forem radionuklidů je třeba znát složení a rozpustnost limitujících složek, což znamená zabývat se speciací příslušných prvků za daných podmínek[1]. Anorganický selen může existovat ve čtyřech mocenstvích jako selenan (Se (VI)), seleničitan (Se (IV)), elementární selen (Se(0)) a hydrogen selenid (Se(–II)). Z hlediska pohyblivosti platí, že migrace selenu roste s jeho mocenstvím (Se(–II) < Se(0) < Se(IV) < Se(VI)). Všechny dosud publikované práce se zabývají pouze rozlišením seleničitanu, selenanu a případně dalších organických specií selenu ve vodách[2–4]. Údaje o stanovení selenidu v odborné literatuře zatím zcela chybí.

Mezi hlavní cíle studie patřila optimalizace separačních podmínek a identifikace specií neradioaktivního selenu obsažených ve vzorcích vod za účelem sledovaní změny speciace radioaktivního selenu během průchodu bentonitovými bariérami jaderného úložiště. Stanovení bylo prováděno pomocí HPLC s ICP/MS detekcí.

Experimentální část

Chemikálie a základní roztoky

Roztok porovnávacího prvku (IS) o koncentraci 60 μg l^{-1} Rh byl připraven z roztoku obsahující 1,000±0,002 g l^{-1} Rh (Merck). Mobilní fáze[5] pro chromatografii na obrácené fázi obsahovala: 2,5 mmol l^{-1} butansulfonát sodný (Sigma Aldrich, USA), 4 mmol l^{-1} kyselinu malonovou (Merck), 8 mmol l^{-1} hydroxid tetramethyl amonia (Sigma Aldrich), 0,05 % methanolu (Merck), doplněna demineralizovanou vodou (Milli-Q, Millipore, USA) a výsledné pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou (Merck) na hodnotu 3,0. Mobilní fáze[6] pro iontově výměnnou chromatografii obsahovala 5 mmol l^{-1} citrát amonný (Merck), 2 % methanolu (Merck) a směs byla doplněna demineralizovanou vodou. Výsledné pH bylo upraveno kyselinou citronovou (Merck) na hodnotu 5,0. Obě mobilní fáze obsahovaly 0,1 g l^{-1} azidu sodného (Merck) k zabránění růstu mikroorganismů. Pro identifikaci specií byly použity tyto standardy: seleničitan sodný, selenan sodný (Sigma Aldrich), selenid sodný (MP Biomedicals, Francie). Z jednotlivých standardů byly připraveny základní roztoky (ZRS) o koncentraci 1000 μg l^{-1}. Všechny roztoky byly připraveny z redestilované a demineralizované vody. Roztok HSe^- (ZRSH) byl následně připraven také o koncentraci 20 mg l^{-1} v roztoku 0,01 % (V/V) hydrazinu (Merck) pro zajištění redukčního prostředí. Roztoky simulující matrice bentonitové vody jsou dodávány z Ústavu jaderného výzkumu v Řeži.

Roztoky pro speciační analýzu

Roztoky pro speciační analýzu Se(IV) a Se(VI) byly připraveny ředěním roztoků ZRS. Pro vlastní identifikaci specií byly připraveny roztoky o koncentraci 10 μg l^{-1} Se pipetováním 50 μl příslušného roztoku ZRS do 5 ml bentonitové vody. Pro ověření linearity kalibrace bylo pipetováno postupně 25–500 μl ZRS každé specie a doplněny modelovou bentonitovou vodou rovněž do objemu 5 ml. Pro přípravu roztoku na stanovení meze detekce byl nejdříve připraven zásobní roztok (ZRS2) od každé specie o koncentraci 100 μg l^{-1} ředěním ZRS (pipetováno 10 ml do 100ml odměrné baňky). Z tohoto roztoku byly následně připraveny pipetováním 25 μl do 5 ml modelové bentonitové vody roztoky. Výsledný přídavek odpovídal 0,5 μg l^{-1} Se. Pro speciační analýzu HSe^- byl připraven roztok o koncentraci 200 μg l^{-1} ředěním roztoku ZRSH v 0,01% hydrazinu pro zajištění redukčního prostředí.

Instrumentace

Všechna měření metodou ICP/MS byla prováděna na spektrometru Elan DRC-e (Perkin Elmer, Concord, Kanada) vybaveném koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou a reakční/kolizní celou (DRC) pro eliminaci interferencí. Speciace selenových specií probíhala na aparatuře HPLC. V případě chromatografie na obrácené fázi byla použita kolona RP-C08 (Lichrocart 250 × 4,6 mm, náplň Purospher STAR RP-8e 5 μm, Merck). V případě aniontové iontověvýměnné chromatografie byla použita kolona PRP X100 (250 × 4,6 mm, 5 μm, Hamilton).

Výsledky a diskuse

Optimalizace parametrů DRC

Nejvíce zastoupený isotop selenu ^{80}Se tvoří značné interference s dimerem argonu $^{40}Ar_2^+$. Proto byla k potlačení těchto interferencí provedena optimalizace DRC pomocí změny průtoku methanu a parametru Rpq. Optimalizačním kritériem byla citlivost a odstup signálu od pozadí, tzv. koncentrace ekvivalentní pozadí (BEC). Výsledky optimalizace již byly popsány v předchozí studii[7], kde pro průtok methanu byla vybrána hodnota 0,7 ml min^{-1} a pro parametr Rpq hodnota 0,4.

Separace selenových specií pomocí RP-HPLC

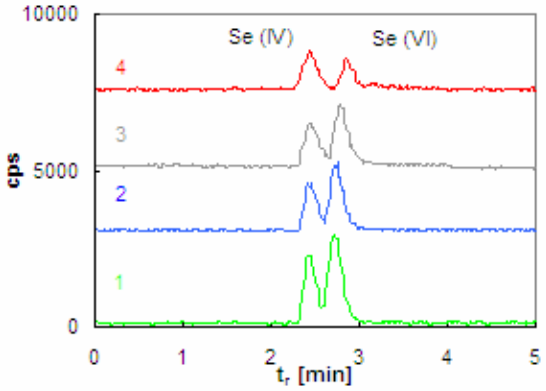
Pomocí chromatografie s obrácenou fází byly analyzovány roztoky s přídavkem 10 mg l^{-1} Se(IV) a Se(VI) v bentonitové vodě. Separace byla prováděna v rozmezí pH 5,5 až pH 3,0. Snížením pH se podařilo specie Se(IV) a Se(VI) oddělit (obr. 1), ale retenční časy jsou stále velmi blízké, navíc dochází k rozmývání píků. Další snížení pH nebylo prováděno s ohledem na vlastnosti kolony.

Separace selenových specií pomocí IEC-HPLC

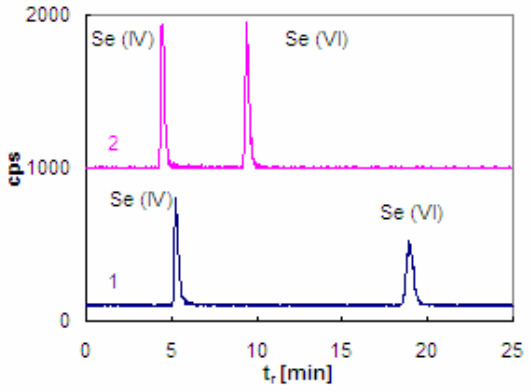
Pro speciaci Se(IV) a Se(VI) byly připraveny směsné roztoky standardů o koncentraci 10 μg l^{-1} v matrici bentonitové vody. Prvním krokem byla optimalizace pH mobilní fáze. Nejdříve byla použita hodnota pH 5,0 získaná z odborné studie[6]. Při této hodnotě se specie podařilo spolehlivě oddělit, přičemž celkový čas analýzy dosahoval téměř 20 min. Následně byla snaha o separaci v zásaditější oblasti s ohledem na očekávané hodnoty pH vzorků bentonitových vod. Jak lze pozorovat (obr. 2), zvýšením pH došlo ke zkrácení doby analýzy při zachování dostatečného rozdílu v retenčních časech jednotlivých specií. Při této hodnotě ale docházelo k ucpávání kolony, a proto byla pro další separaci vybrána předchozí hodnota pH. Stanovení další specie HSe^- se ukázalo jako velmi problematické, poněvadž se velmi snadno oxiduje na elementární selen, který z aniontově výměnné kolony není eluován. Z tohoto důvodu byl roztok standardu o koncentraci 200 μg l^{-1} připraven v 0,1% roztoku hydrazinu pro zajištění redukčního prostředí. Jak je patrné (obr. 3), toto opatření zamezilo z části oxidaci přidaného selenidu, ovšem výtěžnost této metody odpovídá přibližně 2 %, což je velmi nízká hodnota. Hydrazin byl rovněž se stejným zastoupením přidán do mobilní fáze, ale nebylo docíleno výraznějšího zlepšení. Naopak došlo ke zhoršení separační schopnosti kolony. S ohledem na tento fakt nebyla s touto specií testována linearita ani měřena mez detekce.

Ověření linearity pro Se(IV) a Se(VI)

Pro ověření linearity byla připravena kalibrační řada roztoků specií Se(IV) a Se(VI) s obsahem 0–100 μg l^{-1}

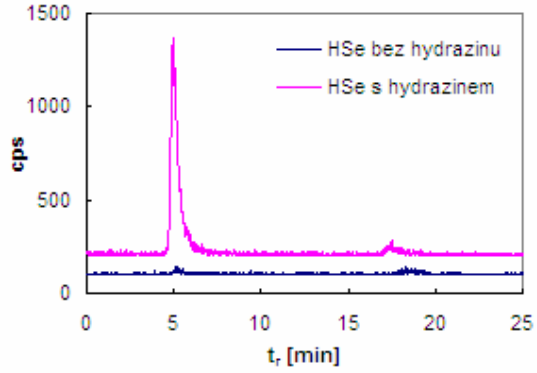


Obr. 1. **Chromatogram specií selenu v matrici bentonitové vody**; 1 – pH 5,5; 2 – pH 4,5; 3 – pH 3,5; 4 – pH 3,0; koncentrace každé specie 10 μg l^{-1} Se, kolona RP C08

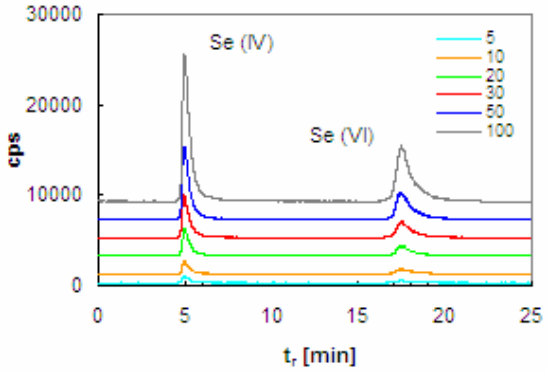


Obr. 2. **Chromatogram specií selenu v matrici bentonitové vody;** 1 – pH 5, 2 – pH 7, koncentrace Se v případě obou specií 10 μg l^{-1}, kolona PRP X100

Se. Měření nejdříve probíhalo s užitím vnitřního standardu Rh, jehož roztok byl dopravován peristaltickým čerpadlem a T spojkou byl spojen s efluentem vycházejícím z kolony. Průtok roztoku vnitřního standardu byl 0,2 ml min^{-1}, a aby byla udržena optimální hodnota celkového průtoku zmlžovačem 1 ml min^{-1}, musel být průtok kolonou snížen na 0,8 ml min^{-1}. Tato změna způsobila rozmytí píků a snížení separační schopnosti. Z tohoto důvodu byla linearita ověřena pro srovnání i bez přisávání roztoku vnitřního standardu za podmínek průtoku mobilní fáze kolonou 1 ml min^{-1} (obr. 4). Z naměřených dat byly vytvořeny kalibrační závislosti a linearita se testovala Mandelovým testem[8]. Pro obě specie i pro obě použité techniky vyhodnocování (s a bez použití vnitřního standardu) byla linearita prokázána. S ohledem na výše uvedené problémy metody s přisáváním vnitřního standardu byla pro kvantifikaci zvolena metoda bez vnitřního standardu.



Obr. 3. **Chromatogram HSe– v matrici bentonitové vody při pH 5;** 1 – bez hydrazinu, 2 – s hydrazinem, koncentrace 200 μg l^{-1} Se–, kolona PRP X100, pH 5



Obr. 4. **Chromatogram specií Se(IV) a Se(VI) pro různé koncentrační hladiny**; 5–100 μg ml^{-1} s metodou bez IS

Stanovení meze detekce pro Se(IV) a Se(VI)

Stanovení meze detekce (LOD) bylo provedeno na pěti roztocích bentonitové vody, do kterých byl přidán roztok standardu Se(IV) a Se(VI) odpovídající zvýšení koncentrace o 0,5 μg l^{-1} Se. Výsledné meze detekce pro Se (IV) a Se(VI) byly 0,12 a 0,16 μg l^{-1} Se.

Závěr

Pro simulaci změny speciace radioaktivních prvků během průchodu inženýrskými bariérami jaderných úložišť je třeba vyvíjet analytické metody pro stanovení jednotlivých specií ve stopovém množství. Jako vhodný prostředek pro stanovení selenových specií seleničitanu, selenanu a selenidu se jeví on-line spojení aniontově výměnné chromatografie a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem. Specie seleničitanu a selenanu se podařilo spolehlivě rozdělit. Kalibrace vykazovala lineární trend a bylo rovněž dosaženo nízkých detekčních limitů. Selenid však vykazoval velkou nestabilitu a velmi rychle se oxidoval na elementární selen i v případě analýzy v redukčním prostředí. Proto bude třeba v budoucnu vyvinout metodu, při které by k samovolné oxidaci nedocházelo.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307 a projektu MPO FR-TI1/362.

LITERATURA

1. Glasser F. P.: Mater. Res. Soc. Symp. Proc. *556*, 1225 (1996).
2. Chatterjee A., Tao H., Shibata Y., Morita M.: J. Chromatogr., A *997*, 249 (2003).
3. Ipolyi I., Corns W., Stockwell P., Fodor P.: J. Autom. Method. Manag. *23*, 167 (2001).
4. Dumont E., De Cremer K., Van Hulle M., Chery C. C., Vanhaecke F., Cornelis R.: J. Anal. At. Spectrom. *19*, 167 (2004).
5. Zhang J., Masaki O., Naoki F.: J. Anal. At. Spectrom. *17*, 730 (2002).
6. Ge H., Cai X. J., Tyson J. F., Uden P. C., Denoyer E. R., Block E.: Anal. Commun. *33*, 279 (1996).
7. Eichler Š., Mestek O.: Chem. Listy, v tisku.
8. Massart D. L., et al.: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam 1997.

VYUŽITÍ DYNAMICKÉ REAKČNÍ CELY PRO STANOVENÍ ŽELEZA METODOU ICP-MS

ANTONÍN KAŇA a OTO MESTEK

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
kanaa@vscht.cz

Úvod

Železo se řadí mezi nejrozšířenější prvky na Zemi a jako takové má rozsáhlý význam, ať už v biologii organismů, nebo ve výrobě konstrukčních materiálů. V lidském organismu se železo vyskytuje ve sloučeninách zajišťujících fyziologické funkce. I přesto je pro člověka mikronutrientem. Rizikem tak může být nadměrný příjem, který má za následek řadu onemocnění[1]. Obsah železa v potravinách se pohybuje v jednotkách až desítkách mg kg^{-1} (cit.[2]). Aby bylo možné obsah železa v potravinách kontrolovat, je nutné mít vhodné analytické nástroje. Tím může být např. hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), která nabízí možnost simultánního stanovení velkého množství prvků ve vzorku, široký rozsah linearity a nízké detekční limity.

Stanovení železa metodou ICP-MS je však znesnadněno přítomností spektrálních interferencí polyatomických iontů. Ačkoli existují čtyři isotopy železa, více či méně závažné interference se vyskytují na všech čtyřech liniích. Nejvíce zastoupený isotop je ^{56}Fe, na jehož linii m/z = 56 se však zároveň vyskytují dvě nejintenzivnější interference v podobě iontů $^{40}Ar^{16}O^+$ a $^{40}Ca^{16}O^+$ (cit.[3]). Předmětem studia se stal také draslík, jehož isotop ^{39}K by mohl být potenciálním zdrojem polyatomických iontů $^{39}K^{17}O^+$ a $^{39}K^{16}O^1H^+$ rušících stanovení železa na linii m/z = 56. Možným řešením, jak redukovat interference, je použití dynamické reakční cely (DRC). Jde o kvadrupólový filtr uzavřený uvnitř cely udržované pod tlakem průtokem reakčního nebo kolizního plynu. Cela je umístěna mezi iontovou optikou a kvadrupólovým hmotnostním analyzátorem[4]. V této práci byly zvoleny dva plyny zaváděné do cely: kolizní plyn helium a reakční plyn methan.

Cílem experimentů bylo vyvinout metodiku vhodnou pro analýzu železa optimalizací parametrů dynamické reakční cely a průtoku argonu zmlžovačem. U získané metodiky byla stanovena mez detekce a linearita. Správnost stanovení byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu.

Experimentální část

Měření byla realizována na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem PerkinElmer Sciex Elan DRC-e (Concord, Kanada) vybaveným dynamickou reakční celou s Axial field technologií. Hmotnostním analyzátorem je zde kvadrupól. Kvantitativní měření byla prováděna metodou vnitřního standardu.

Roztoky použité pro veškeré experimenty byly připraveny ředěním roztoků 65% HNO_3 (Suprapur, Merck, Darmstadt, SRN), 1,000±0,002 g l^{-1} Fe (ČMI, Brno, ČR), 999±5 mg l^{-1} K a 1001±2 mg l^{-1} Ca (oba CertiPur, Merck, Darmstadt, SRN). Roztok pro měření spekter obsahující Ti, Cu, V, Co, Cr, Zn, Mn a Ni byl připraven ze standardů o koncentraci uvedených prvků 1 g l^{-1}. K ředění byla používána demineralizovaná voda Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Zásobní roztok vnitřního standardu obsahoval 2,5 μg l^{-1} Rh v 0,5 mol l^{-1} HNO_3 a byl připraven ředěním roztoku obsahujícího Rh o koncentraci 1,000±0,005 g l^{-1} (Analytika, Praha, ČR). V DRC byl jako reakční plyn použit methan (čistota 5.5, Siad, Braňany u Mostu, ČR) a jako kolizní plyn helium (čistota 5.0, Siad, Braňany u Mostu, ČR).

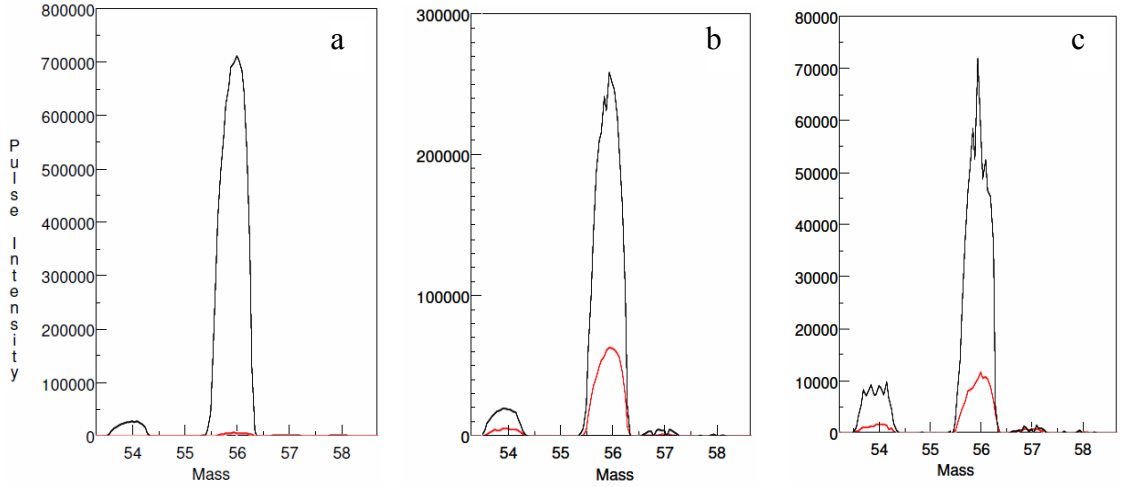
Pro ověření správnosti stanovení byl analyzován certifikovaný referenční materiál rýžové mouky Rice Flour NIST 1568a (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA) s obsahem železa 7,4±0,9 μg g^{-1}, vápníku 0,118±0,006 mg g^{-1} a draslíku 1,280±0,008 mg g^{-1}. Certifikovaný referenční materiál byl rozložen pomocí HNO_3 v mikrovlnném mineralizátoru (Uniclever BM1-Z, Plazmatronika, Polsko) a převeden do roztoku.

Výsledky a diskuse

Hmotnostní spektra

K určení intenzity interferencí byla změřena hmotnostní spektra zahrnující linie všech isotopů železa. Roztok kyseliny dusičné byl měřen jako pozadí, protože HNO_3 je používána jako činidlo při rozkladu reálných vzorků. Samotná HNO_3 však není zdrojem iontů interferujících na liniích železa, zejména pak na linii m/z=56. Při měření spektra roztoku HNO_3 se dá tedy očekávat, že pozadí je vytvářeno především ionty $^{40}Ar^{16}O^+$ na linii m/z=56 a $^{40}Ar^{14}N^+$ na linii m/z=54 (cit.[5]). Hmotnostní spektrum HNO_3 je ukázáno v obr. 1a. Je na něm patrný velmi intenzivní signál iontu $^{40}Ar^{16}O^+$ i méně intenzivní signál $^{40}Ar^{14}N^+$, jestliže se pracuje ve standardním módu bez použití DRC. Naopak při použití DRC intenzita signálu prudce klesá a pozadí se výrazně redukuje na obou liniích. Intenzita signálu na linii m/z=57 dosahuje velmi nízkých úrovní v obou režimech měření. Iont $^{40}Ar^{16}O^1H^+$ tedy neprodukuje závažné interference. Z tohoto důvodu bylo testováno i stanovení železa na linii m/z=57 bez použití DRC.

Na obr. 1b je zobrazeno spektrum roztoku železa. Od



Obr. 1. **Hmotnostní spektra (a) HNO_3, (b) Fe, (c) Ca bez použití DRC (černá křivka) a s použitím DRC (červená křivka).** Podmínky DRC: F_{He} 1 ml min^{-1} He a RPq = 0,7

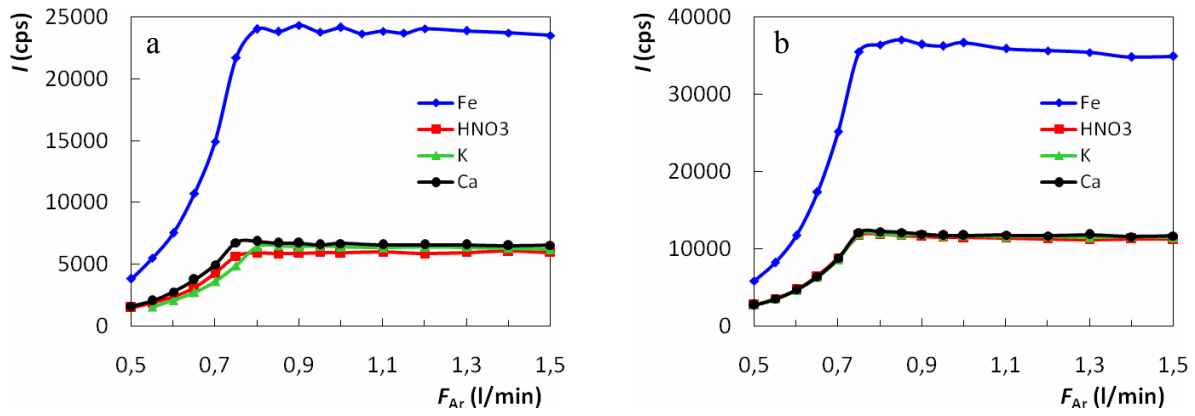
obou původních spekter bylo odečteno pozadí v daném režimu měření, a byl tak získán signál patřící pouze železu. Spektrum ukazuje, že použitím DRC dochází i k redukci signálu analytu, která nastává v důsledku kolizí a reakcí analytu v cele s přiváděným plynem. Ke snížení citlivosti dochází při použití DRC vždy a patří k jedné z mála nevýhod. Z hlediska citlivosti byl pro optimalizaci DRC využit pouze iont $^{56}Fe^+$, kde zůstává citlivost i přesto dostatečná.

Hmotnostní spektrum roztoku vápníku je na obr. 1c. I zde je od původních spekter odečteno pozadí. To znamená, že na linii m/z=56 je přítomen signál iontu $^{40}Ca^{16}O^+$. Aplikací DRC dochází k jeho redukci na nižší úroveň.

K ověření, zda nedochází k případným dalším interferencím, bylo změřeno hmotnostní spektrum kovů, jejichž m/z je blízké železu. Jedná se o K, Ti, Cu, V, Co, Cr, Zn, Mn a Ni. Ve spektru byl na linii m/z=56 pozorován signál, který nepatří žádnému z těchto prvků. Nejpravděpodobnější variantou je, že tyto ionty vytváří draslík v podobě $^{39}K^{17}O^+$ a $^{39}K^{16}O^1H^+$.

Optimalizace průtoku argonu zmlžovačem

Průtok argonu zmlžovačem bylo třeba optimalizovat při parametrech DRC, kdy je dosaženo maximálního signálu analytu a co nejnižšího signálu pozadí. Z těchto důvodů byla provedena předběžná optimalizace průtoku helia F_{He} celou a parametru RPq. Kromě průtoku argonu zmlžovačem bylo dalším testovaným parametrem chlazení mlžné komory. Na obr. 2a a 2b je zobrazena závislost signálu na průtoku argonu pro chlazenou mlžnou komoru i pro komoru bez chlazení. Ze závislosti je patrné, že při průtocích argonu nad 0,8 l min^{-1} dochází ke stabilizaci signálu a dále již neroste. Jako optimální průtok byla vybrána hodnota 1 l min^{-1}, kdy je signál již plně ustálený.



Obr. 2. **Optimalizace průtoku Ar zmlžovačem (a) s chlazením mlžné komory, (b) bez chlazení mlžné komory**; při průtoku helia F_{He} 1,8 ml min^{-1} a RPq=0,8

Tato hodnota byla nastavena při všech dalších měřeních, stejně jako byla používána mlžná komora bez chlazení. Bez chlazení mlžné komory dosahujeme vyšší intenzity signálu a tím i citlivosti, ale také nižší úrovně interferencí. Pro methan byl průběh závislosti intenzity signálu na průtoku argonu zmlžovačem stejný jako pro helium, proto byly totožné parametry zvoleny i pro tento plyn.

Optimalizace parametrů DRC

Cílem optimalizace DRC bylo nalézt takovou kombinaci parametrů nastavení, při které je dosaženo maximálního signálu analytu a minimálního signálu interferujících iontů. Optimalizačním parametrem byla koncentrace ekvivalentní pozadí (*BEC*) a falešně pozitivní signál interferentu. Závislosti byly zpracovány formou map. Výsledná optimalizace byla provedena při průtoku argonu zmlžovačem 1 l min^{-1} v rozsahu průtoku helia 0,5–2,0 ml min^{-1} s krokem 0,1 ml min^{-1} a *RPq* 0,30–0,90 s krokem 0,05. Pro methan byl rozsah průtoku 0,1–1,0 ml min^{-1} a *RPq* 0,1–0,9 se stejným krokem. Jako nejvhodnější kombinace byl vybrán F_{He}=2 ml min^{-1} a *RPq*=0,75 pro helium a F_{CH4}=0,5 ml min^{-1} a *RPq*=0,70 pro methan.

Linearita, mez detekce a správnost stanovení

Linearita kalibrační závislosti byla testována v koncentračním rozsahu 0–300 μg l^{-1} Fe pro oba použité plyny. Testovaný rozsah koncentrací je dostatečný pro analýzu většiny potravin, aniž by bylo potřeba vzorek výrazně ředit. Lineární závislost byla zjištěna u helia i methanu v celém rozsahu testovaných koncentrací.

Mez detekce byla stanovena na linii *m*/*z*=56 za použití helia a methanu jako DRC plynů a na linii *m*/*z*=57 ve standardním režimu bez použití DRC. Pro ^{56}Fe za použití helia byla stanovena na 1,36 μg l^{-1} a za použití methanu na 26,2 ng l^{-1}. Na linii ^{57}Fe byla mez detekce stanovena na 0,64 μg l^{-1}.

Správnost stanovení byla zjištěna měřením na linii *m*/*z*=56 pro oba plyny. Obsah železa stanovený při použití helia byl 7,48±0,32 μg g^{-1} a obsah stanovený při použití methanu byl 7,35±0,32 μg g^{-1}. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s certifikovanou hodnotou. Správnost stanovení byla prokázána také měřením na linii *m*/*z*=57, kde byl stanovený obsah železa 6,69±0,29 μg g^{-1}. Tato hodnota již však není v tak dobré shodě s certifikovanou hodnotou. Navíc má měření na linii *m*/*z*=57 mnohem nižší citlivost než měření na linii *m*/*z*=56.

Závěr

Optimalizací parametrů nastavení dynamické reakční cely se podařilo eliminovat interference na úroveň vhodnou pro analýzu železa na linii *m*/*z*=56. Vhodnými parametry pro helium jsou průtok F_{He}=2 ml min^{-1} a *RPq*=0,75 a pro methan průtok F_{CH4}=0,5 ml min^{-1} a *RPq*=0,70. Hodnota optimálního průtoku argonu zmlžovačem je 1 l min^{-1}. Při uvedeném nastavení byla pro oba plyny zjištěna linearita kalibrační závislosti v rozsahu 0–300 μg l^{-1} Fe. Mez detekce byla za použití helia stanovena na 1,36 μg l^{-1} a za použití methanu dokonce na 26,2 ng l^{-1}. Stanovena byla také mez detekce na linii *m*/*z*=57 ve standardním režimu bez použití DRC, a to na 0,64 μg l^{-1} Fe. Správnost stanovení byla zjištěna pro oba plyny na linii *m*/*z*=56 i pro měření na linii *m*/*z*=57 bez použití DRC. Měření na linii *m*/*z*=57 však není příliš vhodné z hlediska citlivosti měření.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307.

LITERATURA

1. Horák J. et al.: *Hemochromatóza*. Grada Publishing, Praha 2010.
2. Souci S. W., Fachmann W., Kraut H.: *Food Composition and Nutrition Tables*. Medpharm Scientific Publishers, 6. vydání, Stuttgart 2000.
3. May T. W., Wiedmeyer R. H.: At. Spectrosc. *19*, 150 (1998).
4. Tanner S. D., Baranov V. I.: At. Spectrosc. *20*, 45 (1999).
5. Tan S. H., Horlick G.: Appl. Spectrosc. *40*, 445 (1986).

Chem. Listy *105*, s30−s32 (2011) Cena Merck 2011

STUDIUM KOMPLEXŮ KYSELINY LISTOVÉ S BIOGENNÍMI KOVY CHIROPTICKÝMI METODAMI

MARTIN KROUPA a IRYNA GONCHAROVA

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Martin.Kroupa@vscht.cz

Úvod

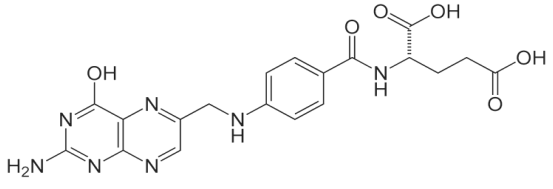
Kyselina listová je ve vodě rozpustný vitamin B-komplexu a poprvé byla izolována v roce 1941 ze špenátu. Název jejích solí folátů pochází z latinského názvu pro list – folium, protože tento vitamin je bohatě zastoupen v listové zelenině. Aktivní forma kyseliny listové, tetrahydrofolát, je koenzym transferas, které se podílejí na syntéze nukleotidů, proto kyselina listová umožňuje vznik nukleových kyselin[1]. Bylo prokázáno, že se významně uplatňuje také při krvetvorbě a její nedostatek způsobuje megaloblastickou anémii, při níž jsou červené krvinky zdeformované a jejich schopnost přenášet kyslík je omezená[1,2]. Kromě toho její nedostatek zvyšuje riziko onemocnění cév, srdce, osteoporózy či rakoviny. Její zvýšený příjem je třeba zvláště v době těhotenství, kdy snižuje výskyt vrozených vad nervového systému i jiných[2]. Chemicky se kyselina listová skládá z pteridinového kruhu, *p*-aminobenzoové a glutamové kyseliny. Jelikož obsahuje dvě karboxylové skupiny, je dvojsytnou kyselinou. Kyselina listová se vstřebává v závislosti na pH převážně v horní části tenkého střeva a vstřebávání je závislé na funkčním stavu zažívacího traktu, věku, ale i na chemické struktuře folátových komplexů. V běžných dávkách je netoxická. Jediný prokázaný toxický efekt se projevuje u lidí nemocných perniciózní anemií, u kterých zvýšený příjem kyseliny listové maskuje některé projevy této nemoci[2]. Podezření na jistou toxicitu bylo pozorováno ve vztahu kyseliny listové a zinku, kde docházelo k poruchám vstřebávání zinku ve střevech při zvýšeném příjmu kyseliny listové[3]. Jako příčina je předpokládán vznik komplexu kyseliny listové se zinkem.

Komplexní sloučeniny kyseliny listové s některými přechodnými kovy, jako jsou například železo či měď, jsou planární, symetrické a opticky neaktivní. Bylo prokázáno, že kyselina listová podporuje, na rozdíl od zinku, jejich vstřebávání[4]. Provedenou UV-vis a IČ spektroskopickou studií žádný prokazatelný rozdíl mezi komplexy kovů pozorován nebyl[5]. Další možností tedy zůstává jistá odlišnost v prostorové struktuře tohoto komplexu, která nebyla uvedenými metodami detegována. Účinným nástrojem studia prostorové struktury chirálních molekulárních systémů je spektroskopie cirkulárního dichroismu[6]. Tato metoda byla též s úspěchem použita při studiu kovových komplexů biologicky významných molekul[7,8]. Proto byla spektroskopie cirkulárního dichroismu, a to jak elektronového (ECD), tak i vibračního (VCD), spolu s IČ a UV-vis spektroskopií použita k řešení cíle této práce, kterým je analýza prostorové struktury komplexu kyselina listová – zinek a jeho srovnání s komplexy některých dalších biogenních kovů. V předkládané práci je kyselina listová studována v komplexech se zinkem, a dále s mědí a železem ve vodném roztoku. K určení stechiometrie komplexů byla použita Jobova metoda, přímá a obrácená spektrofotometrická a ECD titrace. Dále byla změřena koncentrační závislost celého komplexu a závislost na pH a časová závislost spektrálních charakteristik, z které lze usuzovat na samoskladbu daného komplexu.

Experimentální část

Kyselina listová (*N*-[-4[[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridi-nyl)methyl]amino] benzoyl]-L-glutamová kyselina), (Sigma) byla použita ve formě disodné soli (Na_2Fol). Kovové kationty byly použity ve svých síranech jako $ZnSO_4 \cdot 6\ H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ a $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (vše Penta). Měření bylo prováděno ve vodných roztocích a v závislosti na spektrálním oboru byla použita H_2O (pro UV-vis) a D_2O (Isosar), (pro IČ). Koncentrace folátu disodného byla pro měření v IČ oblasti $4 \cdot 10^{-2} – 1 \cdot 10^{-1}$ mol l^{-1} při pH 5,3–9,2, pro měření v UV-vis oblasti $5 \cdot 10^{-5} – 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} při pH 7,4–8,5. Koncentrace kovu byla dána požadovaným poměrem kyseliny listové a kovu. Pro měření VCD a absorpčních spekter v infračervené oblasti 1750 až 1250 cm^{-1} byl použit spektrometr s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo), vybavený VCD/IRRAS modulem PMA 37 (Bruker, Německo) s BaF_2 polarizátorem, ZnSe fotoelastickým modulátorem (Hinds Instruments), MCT detektorem (InfraRed Associates) a lock-in zesilovačem SR830 (Stanford Research Systems).

Měření v IČ oblasti bylo prováděno ve skládaných kyvetách typu A145 (Bruker, Německo) s okny z CaF_2 a teflonovou distanční folií. Délka optického prostředí, tedy tloušťka distanční folie, byla 25 μm a 50 μm v závislosti na koncentraci daného vzorku. Spektra byla



Obr. 1. **Strukturní vzorec kyseliny listové**

naměřena s rozlišením 8 cm^{-1} ve dvacetiminutových blocích. Výsledná spektra jsou průměrem z 6–12 bloků, každý měřený 20 min. U spektrálních měření byla provedena korekce na nulovou linii (odečteno spektrum rozpouštědla). Spektra ECD byla měřena na spektrofotometru J-810 (Jasco, Japonsko), s rozlišením 0,5 nm, časovou konstantou 1 s a rychlostí záznamu 100 nm s^{-1}. K měření byly použity křemenné kyvety o tloušťce 0,1 a 1 cm.

Výsledky a diskuse

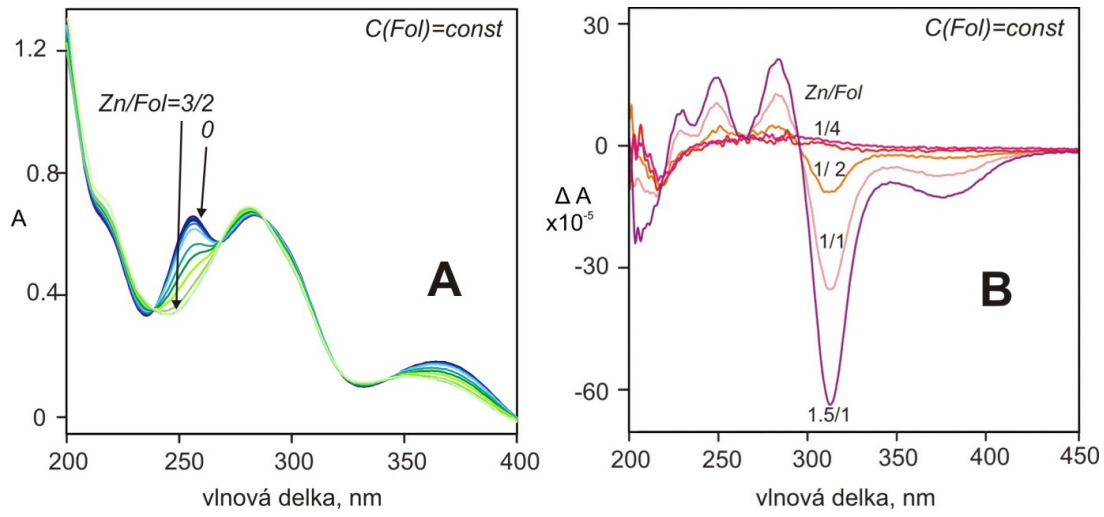
UV-vis absorpční spektra sodné soli kyseliny listové ve vodě jsou uvedena na obr. 2. Ve spektru jsou čtyři široké absorpční pásy kolem 225, 251, 286 a 375 nm. Pásy u 225 a 251 nm byly identifikovány jako π-π* přechody v aromatických kruzích, zatímco ostatní byly přiřazeny π-π* a n-π* přechodům v skupinách COOH, C=N a C=O. Při komplexaci kyseliny listové se zinkem dochází k výrazným změnám ve spektru, mizí pás u 251 nm, což může svědčit o vazbě zinku v těsné blízkosti benzenového kruhu, a pásy kolem 286 a 375 nm jsou modře posunuty o 10 a 15 nm. To vypovídá o komplexaci kovu přes karboxylové skupiny kyseliny listové.

Ke zjištění stechiometrie komplexu byla využita spektrofotometrická titrace za podmínek zachování stálé koncentrace kyseliny listové v prvním případě a zachování stálé koncentrace kovu v druhém. Kromě toho jsem použil i metodu kontinuálních variací (Jobova metoda). Všechny tři metody ukazují na vznik komplexu v poměru kov:folát jako 3:2. Tato data souhlasí s ECD titrací, která za stálé koncentrace folátu sodného ukazuje maximum signálu v systému s poměrem Fol:Zn = 2:3. ECD titrace je uvedena na obr. 2B.

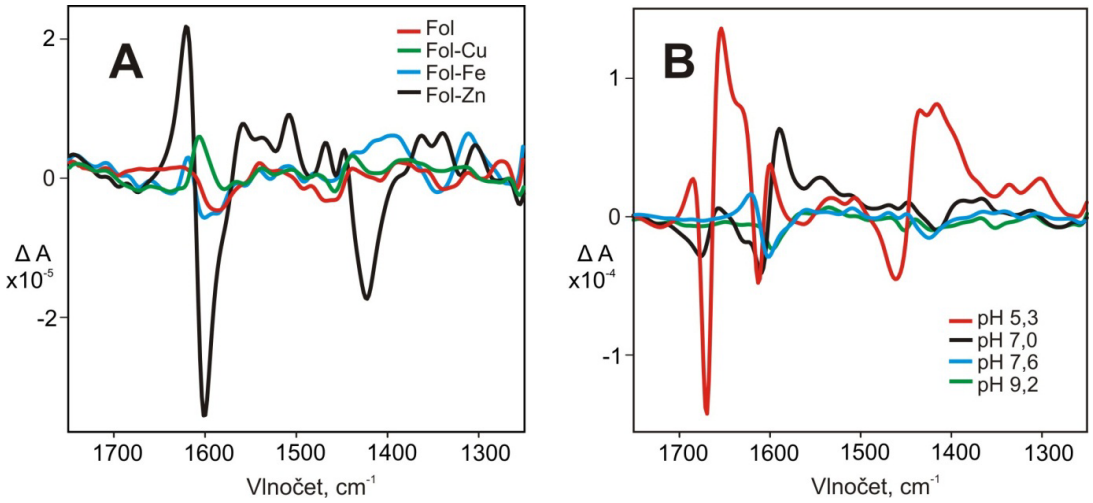
Další informace o komplexaci kyseliny listové s kovy byla získána s použitím spektroskopie VCD. Na obr. 3A jsou VCD spektra kyseliny listové a jejich komplexů s jednotlivými zkoumanými kovy. Je patrné, že odlišnost spektra samotné kyseliny a jejího komplexu s železem a mědí není, až na drobné zvětšení pásu komplexu se železem kolem 1400 cm^{-1} a komplexu s mědí okolo 1600 cm^{-1}, příliš velká. Z toho lze usuzovat, že Fe nebo Cu v komplexu s kyselinou listovou příliš nemění její prostorové uspořádání, tedy ani tzv. vnitřní chiralitu. Naopak ve spektru komplexu kyseliny listové se zinkem lze pozorovat výraznou dvojici pásů s opačnými znaménky, tzv. couplet, s maximy kolem 1645(+) a 1595(–) cm^{-1}, a dále záporný pás okolo 1420 cm^{-1}. Tyto výrazné pásy svědčí o tom, že komplexace kyseliny listové se zinkem mění její prostorové uspořádání a výrazně zvyšuje její chiralitu. Reálnost signálu byla potvrzena měřením při různých koncentracích komplexu.

Obr. 3B ukazuje spektra VCD kyseliny listové se zinkem (molární poměr 2/3) pro různé hodnoty pH. Za pH<7 vznikal roztok oranžové barvy s gelovou konzistencí a příslušné VCD spektrum vykazuje odlišné rysy od spektra při fyziologickém pH a pH vyšším. Porovnáním s předchozími VCD studiemi samoskladných systémů[9] lze usuzovat, že při pH<7 vytvářejí foláty samoskladné uspořádané systémy charakterizované silným signálem VCD. Kromě toho, že vznik větších asociátů byl pozorován za sníženého pH, byl tento jev pozorován též za pH ~ 7 s časovým odstupem nad 8 hodin. Vznikající asociáty překvapivě poskytly VCD spektrum opačné původnímu spektru komplexu Zn-Fol.

Získaná data jsou prvním krokem k navržení struktury



Obr. 2. **(A) UV-vis absorpční spektra spektrofotometrické titrace za podmínek stálé koncentrace kyseliny listové** (c(Fol) = $5 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}, pH 7,8). **(B) ECD spektra titrace kyseliny listové síranem zinečnatým** (c(Fol)=$5 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}, pH 7,8)



Obr. 3. **(A) VCD spektra kyseliny listové a jejích komplexů s mědí, železem a zinkem.** (c(Fol)=0,04 mol l^{-1}, pH 7,6, spacer 0,05 mm). **(B) VCD spektra komplexu kyseliny listové se zinkem za různých pH uvedených v obrázku** (c(Fol) = 0,04 mol l^{-1})

komplexu foliové kyseliny se zinkem. Studium bude dále rozšířeno využitím NMR a Ramanovy spektroskopie, spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu s fluorescenční detekcí a využitím kvantově mechanických metod.

Závěr

Spektroskopické studium kompelxů kovů s kyselinou listovou ukázalo jednoznačně, že komplexy se Zn se významně liší od komplexů se Fe a Cu: dochází k vytvoření chirálního uspořádní se zesíleným spektrem ECD a VCD, které je charakteristické pro vysoce uspořádané struktury. Je možné předpokládat, že tento rozdíl ve struktuře asociátů hraje důležitou roli v procesu inhibice transportu zinku a kyseliny listové. Pomocí Jobovy metody a ECD a spektrofotometrické titrace byla stanovena stechiometrie komplexu folát/Zn = 2/3. Bylo ukázáno, že i za fyziologického pH (~7,4) dochází k samoskladbě komplexu folátu, která může být důvodem odlišného chování zinku od ostatních kovů v komplexu s kyselinou listovou v těle.

Tento výzkum byl finančně podporován Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/11/0836).

LITERATURA

1. Herbert V.: J. Infect. Dis. *128*, S601 (1973).
2. Butterworth C. E., Tamura T.: Am. J. Clin. Nutr. *50*, 353 (1989).
3. Ghishan F. K., Said H. M., Wilson P. C., Murrell J. E., Greene H. L.: Am. J. Clin. Nutr. *43*, 258 (1986).
4. Hamed E., Attia M. S., Bassiouny K.: Bioinorg. Chem. Appl. (2009) [DOI: 10.1155/2009/979680].
5. El-Wahed M. G. A., Refat M. S., El-Megharbel S. M.: Spectrochim. Acta, Part A *70*, 916 (2008).
6. Urbanová M., Maloň P., v knize: *Circular Dichroism Spectroscopy in Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Schalley C., ed.), kap. 8, str. 265. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
7. Goncharova I., Sykora D., Urbanova M.: Tetrahedron-Asymmetry *21*, 1916 (2010).
8. Goncharova I., Urbanova M.: Anal. Biochem. *392*, 28 (2009).
9. Setnicka V., Novy J., Bohm S., Sreenivasachary N., Urbanova M., Volka K.: Langmuir *24*, 7520 (2008).

STANOVENÍ HERBICIDŮ S KARBOXYLOVOU FUNKČNÍ SKUPINOU TECHNIKOU LC-MS/MS

RADKA KŘÍŽOVÁ, JANA URBANOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Radka.Krizova@vscht.cz

Úvod

Skupina herbicidů s karboxylovou funkční skupinou („kyselé herbicidy“) tvoří skupinu analytů se specifickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tato skupina pesticidů je průmyslově vyráběna již desítky let. První z nich (2,4-D) byl syntetizován počátkem čtyřicátých let 20. století a je považován za první masově používaný herbicid a i dnes patří mezi nejpoužívanější herbicidy. Během následujících desetiletí byly postupně vyvinuty další herbicidy obsahující karboxylovou skupinu. Jejich levná výroba a dobrá selektivita účinku je předurčila k použití na plodiny pěstované na rozsáhlých plochách. V našich zeměpisných šířkách patří kyselé herbicidy mezi základní látky k regulaci dvouděložných plevelů při pěstování především ozimých obilovin. Charakteristickou vlastností kyselých herbicidů je to, že jejich karboxylová funkční skupina je často zapojená do pevných vazeb se složkami matrice. Nejčastějším typem jsou esterové vazby s hydroxylovou skupinou sacharidů, dalším často se vyskytujícím druhem vazeb jsou vazby s aminoskupinou aminokyselin v bílkovinách a peptidech. Vázané formy jsou u některých látek zahrnuty i do definice rezidua, což značně komplikuje jejich analýzu v rámci multireziduálních metod[1].

Tato práce se zabývá dvěma dílčími úkoly: (*i*) optimalizace stanovení analytů kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS) a (*ii*) modifikace extrakční metody QuEChERS (akronym ze slov *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)[2] tak, aby poskytla spolehlivou kontrolu legislativních limitů. Při modifikaci extrakční metody byl kladen důraz především na uvolnění vázaných forem analytů pomocí alkalické hydrolýzy.

Experimentální část

Předmětem studie bylo celkem 20 herbicidů s karboxylovou funkční skupinou. Ke všem experimentům byly použity vzorky kukuřice, pšenice a žita v bio kvalitě. Vzorky byly homogenizovány a posléze byla ověřena nepřítomnost reziduí pesticidů.

Postup extrakce vycházel z hojně používané extrakční metody QuEChERS, která byla v průběhu práce modifikována[2,3]. K realizaci studie byl jako kapalinový chromatograf použit Separation Module 2695 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Quattro Premier XE (Waters, USA), podmínky stanovení viz tab. I. Pro každý analyt byly sledovány dva MS/MS přechody, čímž byly splněny požadavky dokumentu SANCO/10684/2009 pro konfirmaci měření. Naměřené výsledky byly dále zpracovány softwarem MassLynx 4.1.

Výsledky a diskuse

V rámci optimalizace stanovení daných analytů metodou LC-MS/MS byly optimalizovány následující parametry: (*i*) přepínání polarit, (*ii*) mobilní fáze a (*iii*) objem nástřiku.

Při samostatných měřeních látek ionizujících v pozitivním a negativním módu elektrospreje bylo dosaženo lepší opakovatelnosti v porovnání s jednou analýzou všech látek s přepínáním polarit. Hlavním důvodem pro separátní měření však byla rozdílná volba mobilních fází pro obě skupiny. Zejména na základě intenzity odezev (dalším kritériem byl tvar chromatografických píků) v různých mobilních fázích byl pro látky ionizující v negativním módu elektrospreje jako vodná složka zvolený 10mM octan amonný ve vodě, organickou fázi tvořil čistý methanol. Pro látky ionizující v pozitivním módu elektrospreje se jako nejvhodnější ukázala mobilní fáze v podobě 0,5% kyseliny octové ve vodě a 0,1% kyselina octová v methanolu. Optimální objem nástřiku acetonitrilového extraktu na kolonu byl 5 µl, při vyšších objemech došlo již k rozmytí píků prvně se eluujících analytů. Z hlediska citlivosti stanovení byla pro látky ionizující v ESI– použita hodnota napětí na kapiláře 0,5 kV a pro látky ionizující v ESI+ 3,5 kV. Na obr. 1 je uvedena ukázka chromatografických píků některých analytů po optimalizaci uvedených parametrů.

Druhá část práce se zabývala vývojem extrakčního postupu. Při optimalizaci přípravy vzorku se vycházelo z originální metody QuEChERS, která byla pro stanovení těchto látek modifikována. Při analýze suchých matric metodou QuEChERS je k zlepšení účinnosti extrakce doporučován přídavek vody[4]. V této práci byla porovnána výtěžnost extrakce po přídavku vody nebo kyseliny mravenčí o koncentraci 1 % nebo 5 % ve vodě. Vzhledem k charakteru cílových analytů se ukázalo okyselení cereálních vzorků jako nezbytné k dosažení dobrých pracovních charakteristik, zejména výtěžností. Lepších výsledků bylo dosaženo při použití 5% kyseliny mravenčí ve vodě.

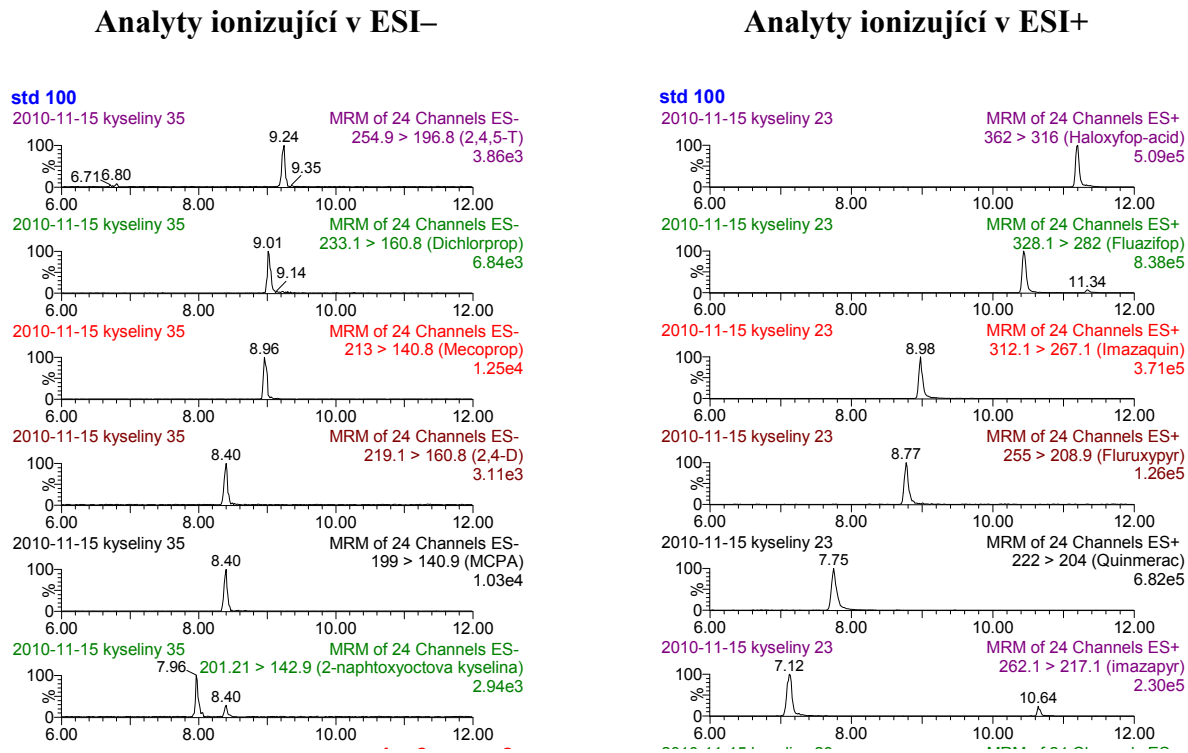
Následně byl před samotnou extrakci zařazen krok zásadité hydrolýzy, aby bylo možné stanovit i vázané formy studovaných herbicidů. Během optimalizace se vycha-

Tabulka I
Podmínky pro stanovení HPLC-MS/MS

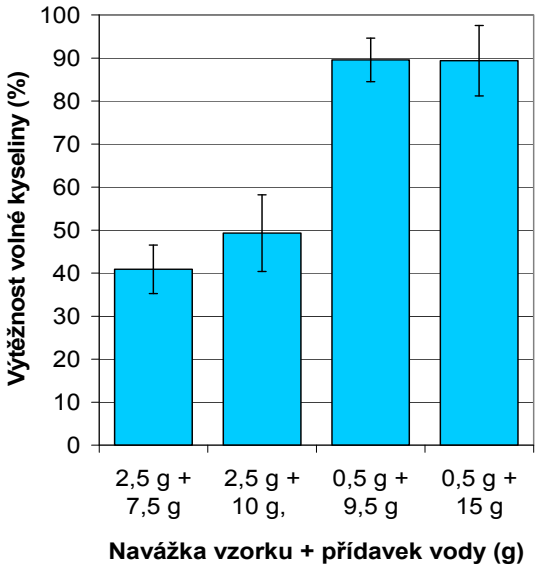
Parametr	Hodnota	
	HPLC	
Kolona	Atlantis T3 C18 (100×2,1mm, 3 μm, Waters (USA))	
Ionizace	ESI–	ESI+
Složení mobilní fáze	A: 10 mM octan amonný	A: 0,5% kyselina octová
	B: methanol	B: 0,1% kyselina octová v methanolu
Gradient mobilní fáze	0. min	5 % B, průtok 0,3 ml min^{-1}
	0.–8. min	lineární změna z 5 na 100 % B, průtok 0,3 ml min^{-1}
	8.–12. min	100 % B, průtok 0,3 ml min^{-1}
	12. min	100 % B, změna skokem na průtok 0,5 ml min^{-1}
	15. min	5 % B, změna skokem na průtok 0,4 ml min^{-1}
	21. min	konec analýzy
Objem nástřiku	5 μl	
Teplota kolony	30 ºC	
Teplota autosampleru	10 ºC	
	Iontový zdroj	
Typ	API - typ ESI	
Ionizace	ESI–	ESI+
Napětí na kapiláře	0,5 kV	3,5 kV
Desolvatační plyn	N_2, průtok 700 l h^{-1}	
Plyn na „cone“	N_2, průtok 100 l h^{-1}	
Teplota zdroje	120 °C	
Desolvatační teplota	350 °C	
	Hmotnostní analyzátor	
Typ	tandemový kvadrupól	
1Q – LM/HM/ion energy	15/15/0,5	
Entrance/exit	30/0,3	
2Q – LM/HM/ion energy	15/15/0,5	
Multiplier	650 V	
Kolizní plyn	argon, průtok: 0,20 ml min^{-1}	

zelo z postupu doporučeného evropskými referenčními laboratořemi[5]. Vycházelo se z přídavku 200 μl 5M-NaOH ke 2,5 g vzorku a 7,5 g vody, přičemž vzorek se nechal 30 min odstát, následně proběhla neutralizace ekvimolárním množstvím H_2SO_4 a extrakce QuEChERS. Účinnost alkalické hydrolýzy byla ověřena na esterové vazbě v látce haloxyfop-2-ethoxyethyl. Výtěžnost dle výchozího postupu však byla nízká (tj. 42 %), proto bylo přistoupeno ke změně třech parametrů během hydrolýzy: (*i*) změna poměru navážek vzorek/voda, (*ii*) množství přidaného NaOH a (*iii*) doba hydrolýzy. Jako nejzásadnější parametr se ukázal přídavek vody k navážce vzorku (viz obr. 2). Po přídavku většího množství hydroxidu k původně zkoušené variantě nebylo možné realizovat následnou extrakci, protože během hydrolýzy vznikla z matrice „hrudka“, se kterou již dále nešlo pracovat. Byl vyzkoušen také delší čas hydrolýzy, ale výsledky byly srovnatelné pro 30 min i pro hodinu.

Na základě výše popsaných experimentů byl zvolen postup: navážka 0,5 g vzorku s přídavkem 9,5 g vody, přídavek 200 μl 5M-NaOH, doba hydrolýzy 30 min. Tento postup byl poté validován pro všechny sledované volné



Obr. 1. **Záznam z měření standardu pesticidů o koncentraci 100 ng ml^{-1}**



Obr. 2. **Vliv přídavku vody a snížení navážky vzorku na výtěžnost volné kyseliny (haloxyfop) po přídavku haloxyfop-2-ethoxyethylu** (koncentrace 0,4 mg kg^{-1}, *n*=3)

kyseliny a pracovní charakteristiky byly v souladu s kritérii dokumentu SANCO/10684/2009 (výtěžnost v rozmezí 70–120 %, RSD do 20 %).

Závěr

Výsledkem práce je validovaná metoda pro stanovení jak volných, tak vázaných forem herbicidů s karboxylovou funkční skupinou, pro tento účel byla použita alkalická hydrolýza následovaná extrakcí originální metodou QuEChERS (vázané formy) anebo pouze originální metoda QuEChERS po okyselení vzorku (volné formy). Jako analytická koncovka byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Optimalizované metody byly validovány a výsledky byly v souladu s požadavky dokumentu SANCO/10684/2009.

Tento výzkum byl finančně podporován Fondem pro rozvoj vysokých škol (součást projektu 1222/2010).

LITERATURA

1. EU Pesticides Database, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection, staženo 30. srpna 2010.

2. Anastassiades M., Lehotay S. J.: J. AOAC Int. *86*, 412 (2003).
3. Lehotay S., Ae Son K., Kwon H., Koesukwiwata U., Fu W., Mastovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N.: J. Chromatogr., A *1217*, 2548 (2010).
4. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed: Document No. SANCO/10684/2009, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf, staženo 3. srpna 2010.
5. Analysis of Acidic Pesticides in Wheat Four Samples by LC-MS(/MS) Using the QuEChERS Method, http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/acidicpesticides_wheat_quechers.pdf, staženo

MOŽNOSTI PŘÍPRAVY VYBRANÝCH KONDENZOVANÝCH ANTHOKYANINŮ V MODELOVÝCH PODMÍNKÁCH A STUDIUM JEJICH VLASTNOSTÍ

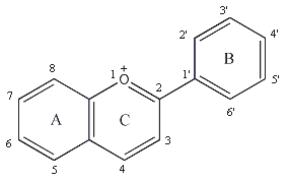
ONDŘEJ KURKA, RENÁTA MYJAVCOVÁ a PETR BEDNÁŘ

RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
ondrejkurka@seznam.cz

Úvod

Anthokyaniny, kterým je věnována tato práce, patří mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou to barviva přítomná nejčastěji v květech a plodech, kterým propůjčují barvy od oranžové přes červenou a fialovou až po modrou. V poslední době roste jejich využití v potravinářství jako náhrada za syntetická barviva. Jsou také významné svým efektem na lidské zdraví. Vyznačují se silnými antioxidačními účinky, mají příznivý vliv při prevenci některých rakovinových a kardiovaskulárních onemocnění a cukrovky[1].

Anthokyaniny, které jsou řazeny mezi flavonoidy, mají základní (flavyliovou) strukturu, která je uvedena na obr. 1 a která je v přírodních látkách dále substituována.



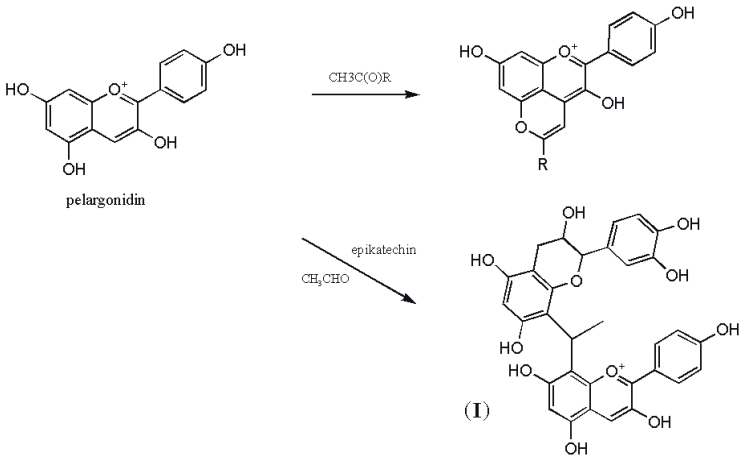
Obr. 1. **2-Fenylchromenylium, strukturní základ anthokyaninů**

Hlavním problémem při využití anthokyaninů v potravinářství je jejich malá stabilita při zvýšení pH, teploty, přítomnosti oxidovatel apod. Z tohoto důvodu se zkoumají možnosti, kterými by bylo možné v potravinářských produktech barvu zajištěnou přítomností anthokyaninů stabilizovat, a prodloužit tak dobu, po kterou si tyto látky uchovávají své vlastnosti. Jednou z cest, která by mohla zvyšovat chemickou stabilitu těchto látek, je jejich kondenzace s jinými molekulami za vzniku složitějších barviv.

Cílem této práce je syntetizovat vybrané deriváty pelargonidinu vznikající kondenzací tohoto anthokyanidinu (v čisté a neglykosylované formě) s malými organickými molekulami a s jinými flavonoidy (viz obr. 2). Pelargonidin je anthokyanin, vyskytující se ve větší míře v některých barevných plodech, např. v jahodách[2] a produktech z nich vyráběných. Pozornost je věnována kondenzacím pelargonidinu s acetaldehydem, acetonem a epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu. Reaktivita těchto látek s jinými flavonoidy je již částečně popsána v literatuře[3,4], kde jsou však reakce studovány především v komplexních extraktech z rostlinného materiálu. Připravená barviva identifikujeme s využitím HPLC-MS^2 a UPLC-MS^2. V současné době optimalizujeme semipreparativní purifikaci získaných produktů.

Experimentální část

Vzorky byly připraveny ve dvou sadách: první sada obsahovala 5 ml destilované vody, okyselené kyselinou mravenčí na pH 3,08, ve které byl rozpuštěn pelargonidinium-chlorid a kondenzační činidlo tak, aby jejich výsledné koncentrace byly 1 mmol l^{-1} resp. 10 mmol l^{-1}. V případě



Obr. 2. **Pelargonidin a jeho kondenzační produkty reakcí s malými molekulami a s epikatechinem**

epikatechinu vzorek obsahoval 5 ml destilované vody, okyselené kyselinou mravenčí na pH 3,08, ve které byl rozpuštěn pelargonidium-chlorid, epikatechin (oba v koncentraci 1 mmol l^{-1}) a acetaldehyd (v koncentraci 10 mmol l^{-1}).

Druhá sada vzorků obsahovala vždy 0,1 mg pelargonidium-chloridu v 50% roztoku cyklizačního činidla v methanolu, roztok činidla byl okyselen 0,1% H_3PO_4 (m/m, změna způsobu okyselení byla provedena na základě úspěšného přístupu známého z literatury[5]). Vzorek zaměřený na reaktivitu epikatechinu obsahoval 0,1 mg pelargonidium-chloridu a 0,1 mg epikatechinu v 50% roztoku acetaldehydu v methanolu opět okyseleném 0,1% (m/m) H_3PO_4. Vzorky druhé sady byly připraveny vždy v objemu 1 ml.

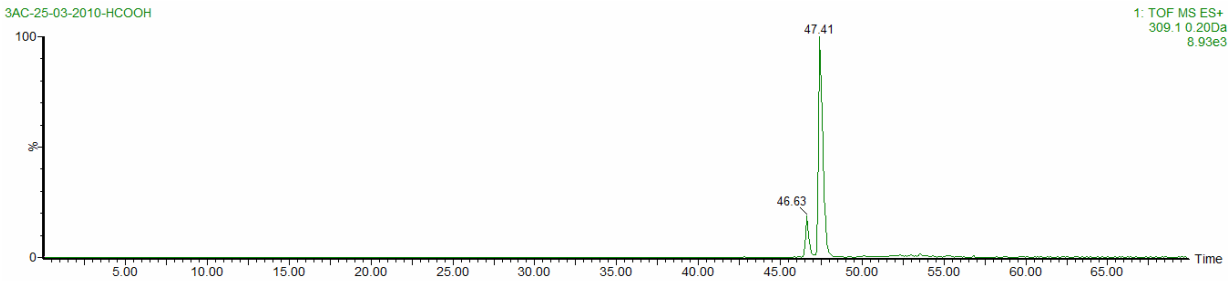
Připravené směsi byly ponechány za laboratorní teploty v temnu a po daných intervalech byla vždy část vzorku odebrána a analyzována. Chromatografické analýzy probíhaly na kapalinových chromatografech Cap LC (Waters, Milford, USA), HPLC (Knauer, Berlín, Německo) a Acquity UPLC (Waters) s DAD a tandemovou MS detekcí. Pro identifikaci byl použit hmotnostní spektrometr vybavený ionizací elektrosprejem (Z-spray) a hybridním analyzátorem typu QqTOF (Q-TOF Premier, Waters). Dále byla prováděna analýza s využitím MALDI ionizace na tomtéž přístroji. Studie je doplněna i měřením na přístroji LCQ s analyzátorem na principu iontové pasti (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) vybaveném ionizací elektrosprejem. Frakcionace produktů kondenzace s acetonem je prováděna na kapalinovém chromatografu Knauer osazeném semipreparativní pumpou a s využitím semipreparativní kolony Gemini C-18 (100 × 10 mm i.d.; d_p=5 μm, Phenomenex, USA).

Výsledky a diskuse

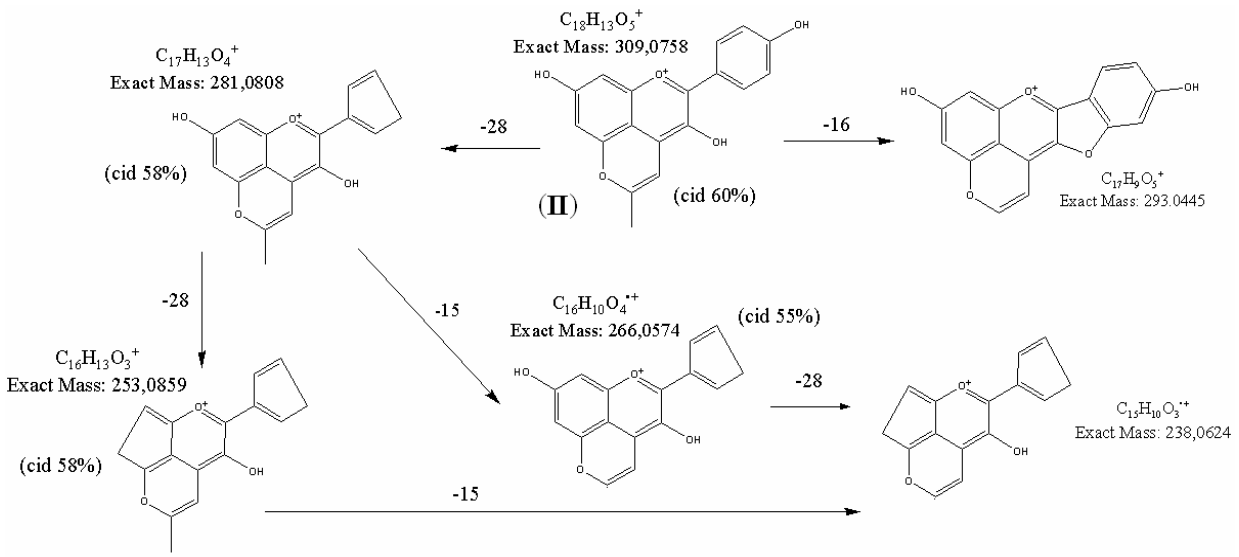
Vzorky připravené ve vodném prostředí byly analyzovány pomocí LC i přímého zavádění do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Nález předpokládaného barviva se prokázal pouze v případě kondenzace s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu. Tento produkt **I** (viz obr. 2) však vznikal pouze ve stopách a identifikace je nejednoznačná. Prezentovaná struktura je tak navržena na základě porovnání s výsledky získanými použitím derivátu malvidinu[4]. Vzhledem k tomu, že reakce neposkytly očekávané produkty, byla nasazena druhá sada vzorků, tentokrát v koncentrovanějším kondenzačním médiu a v prostředí methanolu, který byl přidán za účelem zvýšení rozpustnosti pelargonidinu.

Zde bylo dosaženo dobrých výtěžků v případě kondenzace s acetonem. Už po prvním dnu reakce byl pomocí MS zjištěn molekulový ion produktu s předpokládanou strukturou **II** (viz obr. 3) s intenzitou cca 15 % oproti molekulovému iontu pelargonidinu. Po třech dnech se poměr produkt/substrát zvýšil na 1:1, po 6 týdnech už produkt dominuje (poměr 20:1 ve prospěch produktu; všechny údaje brány podle odezvy příslušných iontů v MS). HPLC/MS analýza potvrzuje, že použitým postupem vznikají dvě látky s rozdílnou retencí na reverzní fázi (obr. 3) a téměř shodnou fragmentací po izolaci iontu a jeho kolizí indukované disociaci v kolizní cele. Jedná se zřejmě o isomery, oba produkty se liší jen relativními intenzitami fragmentových iontů. Zkombinováním tandemových spekter (MS^2-MS^4) z iontové pasti a měření přesné a správné hmoty z QqTOF bylo navrženo hypotetické fragmentační schéma žádaného produktu (obr. 4). V současné době probíhá chromatografická frakcionace složek reakční směsi. Struktura izolovaných isomerů bude dále studována nukleární magnetickou rezonancí.

U ostatních vzorků nebyl ani za změněných podmínek ion předpokládaného barviva pozorován, a to ani v případě kondenzace s epikatechinem, kde při použití vodného prostředí ion aspoň v malé míře vznikal. Experimenty ukázaly, že při použití koncentrovaného roztoku acetaldehydu v methanolu dochází k rozpadu pelargonidinového skeletu – pravděpodobně na kyselinu 4-hydroxybenzoovou a floroglucinaldehyd (tomuto nasvědčují nálezy iontů odpovídajících hodnot *m*/*z* v chromatogramu). Takovýto rozpad pelargonidinu za odlišných experimentálních podmínek byl již popsán v literatuře[6]. V případě, že reakční směs obsahovala kromě acetaldehydu i epikatechin, byl ve hmotnostním spektru nalezen ion odpovídající hmotě dvou jednotek epikatechinu spojených ethylidenovým můstkem.



Obr. 3. **Chromatogram produktu II a jeho isomeru**



Obr. 4. **Produkt kondenzace s acetonem (II) a jeho fragmentační schéma**

I takováto struktura byla již v literatuře popsána[7]. Tvorba heterogenní můstkové sloučeniny typu pelargonidin-acetaldehydový můstek-epikatechin je v tomto případě minoritním procesem.

Závěr

V roztoku pelargonidinu ve směsi aceton-methanol dochází poměrně rychle ke vzniku 5-methyl-pyranopelargonidinu, který byl prostudován LC/ESI-MS^2 a MALDI technikami. Vedle očekávaného produktu vzniká v tomto médiu ještě jeden isomer s identickou hmotou i fragmenty v tandemových MS spekterech. Pro isomer s majoritním výskytem byla na základě analogie s jinými anthokyaniny popisovanými v literatuře navržena struktura a fragmentační schéma. V současné době je prováděna purifikace obou látek s cílem určení jejich absolutní konfigurace nukleární magnetickou rezonancí.

Dále se podařilo zjistit, že kondenzační reakce na elektrofilním centru molekuly pelargonidinu neprobíhají ve vodném prostředí dostatečně efektivně pro získání produktů v požadovaném výtěžku. V omezené míře dochází ke kondenzaci pelargonidinu s epikatechinem přes ethylidenový můstek, zajištěný přítomností acetaldehydu v reakční směsi. V případě použití koncentrovaného roztoku acetaldehydu v reakční směsi dochází preferenčně ke štěpení C-kruhu anthokyaninu a vzniku floroglucinaldehydu a fenolické kyseliny. Tyto informace jsou klíčové pro další optimalizaci syntézy můstkových anthokyaninových barviv.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (P206/10/0625).

LITERATURA

1. Konczak I., Zhang W.: J. Biomed. Biotechnol. *5*, 239 (2004).
2. da Silva F. L., Escribano-Bailon M. T., Alonso J. J. P., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C.: LWT–Food Sci. Technol. *40*, 374 (2007).
3. Morata A., Calderon F., Gonzalez M. C., Gomez-Cordoves M. C., Suarez J. A.: Food Chem. *100*, 1144 (2007).
4. Pissarra J., Lourenco S., Gonzalez-Paramas A. M., Mateus N., Buelga C. S., Silva A. M. S., De Freitas V.: Food Chem. *90*, 81 (2005).
5. Myjavcová R., Marhol P., Křen V., Šimánek V., Ulrichová J., Palíková I., Papoušková B., Lemr K., Bednář P.: J. Chromatogr., A *1217*, 7932 (2010).
6. Patras A., Brunton N. P., O'Donnell C., Tiwari B. K.: Trends Food Sci. Technol. *21*, 3 (2010).
7. Es-Safi N. E., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M.: J. Agric. Food Chem. *47*, 2096 (1999).

Chem. Listy *105*, s40–s42 (2011) Cena Merck 2011

STUDIUM ANODICKÉ OXIDACE POLYBROMOVANÝCH FENOLŮ

EVA MARKOVÁ

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc
markova.e@email.cz

Úvod

Denně se setkáváme s produkty spotřebního průmyslu, jako jsou automobily, počítače, oděvy a další výrobky z polymerních materiálů. S používáním takovýchto produktů je spojeno i riziko vzniku požárů. Za účelem ochrany a snížení tohoto nebezpečí na minimum jsou užívány již při technologických výrobách tzv. zpomalovače (retardéry) hoření. V posledních letech se upírá pozornost, vzhledem k celosvětové produkci, zejména na bromované zpomalovače hoření (brominated flame retardants – BFR), které obsahují 50 až 80 hm.% bromu[1]. Většina BRF má hydrofobní charakter, a tudíž i schopnost akumulovat se v tukových tkáních. Toxicita je specifická pro jednotlivé skupiny BFR, objevuje se neurotoxicita, vliv na reprodukci[2], apod. K nejpoužívanějším BFR se řadí polybromované fenoly. Jsou to sloučeniny málo chemicky reaktivní, avšak podléhají poměrně snadno oxidaci. Oxidační přeměny hrají obecně klíčovou roli při degradaci a metabolismu většiny organických sloučenin. BRF navíc mohou při hoření v atmosféře kyslíku poskytovat produkty toxičtější než původní látky. U polybromovaných fenolů byly studovány mechanismy jejich fotooxidace[3], oxidace singletovým kyslíkem[4], možnosti jejich odbourání hydroxylovým radikálem produkovaným Fentonovou reakcí[5] i rychlost jejich chemické oxidace manganistanem draselným[6]. Dosud však nebyla v literatuře popsána jejich elektrochemická oxidace.

Cílem této práce je sledovat elektrochemickou oxidaci 2,4,6-tribromfenolu (TBP) v závislosti na aciditě prostředí a identifikovat produkty jeho anodické oxidace. TBP je běžně používán jako meziprodukt při výrobě dalších BFR, ale také jako fungicid. Je také produktem fotodegradace tetrabrombisfenolu A, který je v současnosti celosvětově nejpoužívanějším BFR[1].

Experimentální část

Chemikálie

2,4,6-Tribromfenol (99%, Sigma-Aldrich), methanol (p.a., Penta, Chrudim), kyselina boritá, kyselina fosforečná, kyselina octová, octan ethylnatý (vše p.a., Lachema, Brno), hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice).

Přístroje

Pro voltmetrická měření byl použit Eco-Tribo-Polarograf (Polaro-Sensors Praha). Elektrolýza byla prováděna na potenciostatu OH404 (Radelkis, Budapešť, Maďarsko). Analýza produktů byla realizována na plynovém chromatografu HP 6890 s hmotnostním detektorem Agilent 5973 N (Agilent, Palo Alto, CA, USA) s kolonou ZB-5 ms 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm a heliem jako nosným plynem.

Pracovní postupy

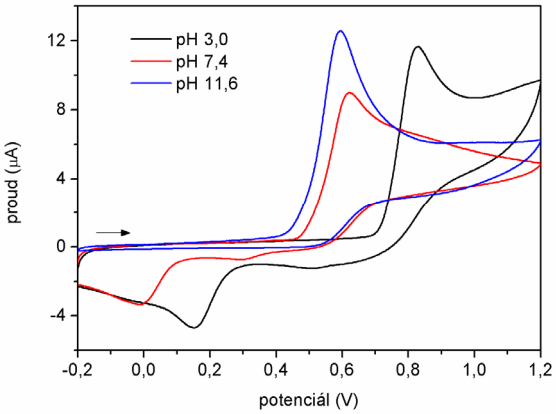
Voltametrická měření byla provedena v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, referentní kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův pufr (pH 2–12) s 50 % (v/v) methanolu. Koncentrace TBP v měřeném roztoku byla 1 mmol l^{-1}. Měření bylo provedeno metodou cyklické voltametrie v potenciálovém rozsahu od –0,2 V do +1,2 V rychlostí polarizace 50 mV s^{-1}.

Při potenciostatické elektrolýze roztoku TBP (c = 1 mmol l^{-1}) byla jako pracovní použita síťková platinová elektroda, jako referentní nasycená kalomelová elektroda, pomocnou elektrodou byla platinová spirála v odděleném katodovém prostoru. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův pufr o pH 9,5, resp. 6,6 s 50 % (v/v) methanolu a 0,2 mol l^{-1} $NaClO_4$. Elektrolýza probíhala při potenciálu E = +1,0 V po dobu 60 min. Po ukončení elektrolýzy byly produkty elektrolýzy adsorbované na povrchu platinové síťkové elektrody rozpuštěny v ethylacetátu a tento roztok byl vysušen proudem dusíku za laboratorní teploty. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml ethylacetátu a přenesen do vialky pro GC/MS analýzu.

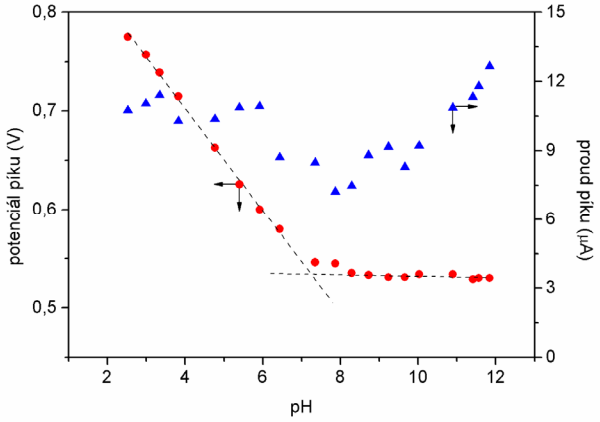
Výsledky a diskuse

Obr. 1 ukazuje cyklické voltamogramy TBP v prostředí o různém pH. Je z nich patrné, že TBP se oxiduje v celé sledované oblasti pH 2–12. Po přepnutí směru polarizace při +1,2 V jsou na voltamogramech pro kyselé a neutrální prostředí zřetelné proudové signály, které odpovídají redukci produktů oxidace TBP. Potenciál anodického píku se s pH rostoucím až do neutrální oblasti posouvá k nižším hodnotám, v alkalickém prostředí se dále nemění (obr. 2). Průsečík dvou lineárních úseků závislosti potenciálu píku na pH odpovídá zdánlivé disociační konstantě TBP (pK = 7,2). Výška anodického píku je maximální v silně alkalických roztocích (obr. 2).

Dále byla provedena elektrolýza roztoku TBP při potenciálu +1,0 V v zásaditém a neutrálním prostředí po dobu 60 min. V průběhu elektrolýzy byla pozorována změ-



Obr. 1. **Cyklické voltamogramy 2,4,6-tribromfenolu v Britton-ových-Robinsonových pufrech o různém pH**



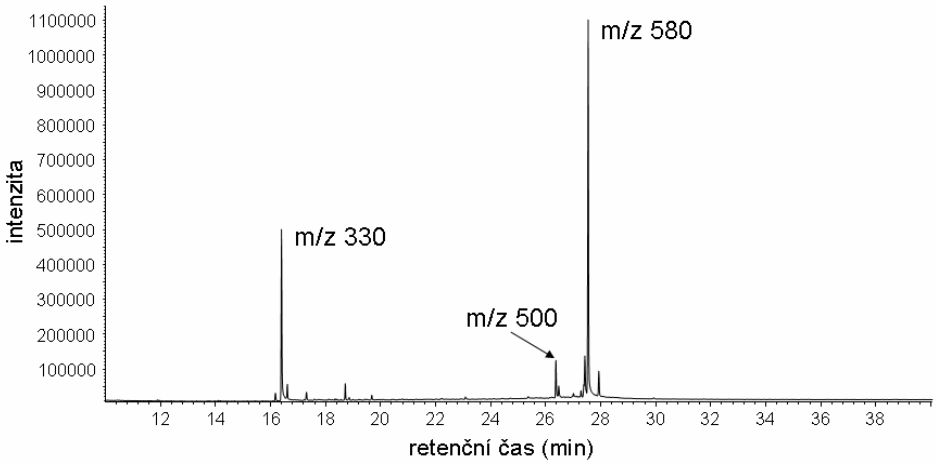
Obr. 2. **Graf závislosti potenciálu a proudu anodického CV-píku TBP na pH**

na zbarvení roztoku a tvorba nažloutlého povlaku na pracovní elektrodě. Po elektrolýze byl metodou GC-MS analyzován jak ethylacetátový extrakt elektrolyzátu, tak povlak elektrody rozpuštěný v octanu ethylnatém. Referenčním vzorkem byl ethylacetátový extrakt roztoku TBP ve stejném základním elektrolytu. Na chromatogramu extraktu elektrolyzátu nebyly kromě píku původního TBP pozorovány žádné další výraznější píky. Chromatogram povlaku rozpuštěného z elektrody (obr. 3) poskytl kromě píku TBP (t_r = 16,40 min) intenzivní pík v retenčním čase 27,55 min a menší pík v čase 26,38 min. Na základě hmotnostních spekter byly navrženy strukturní vzorce produktů oxidace TBP (obr. 4).

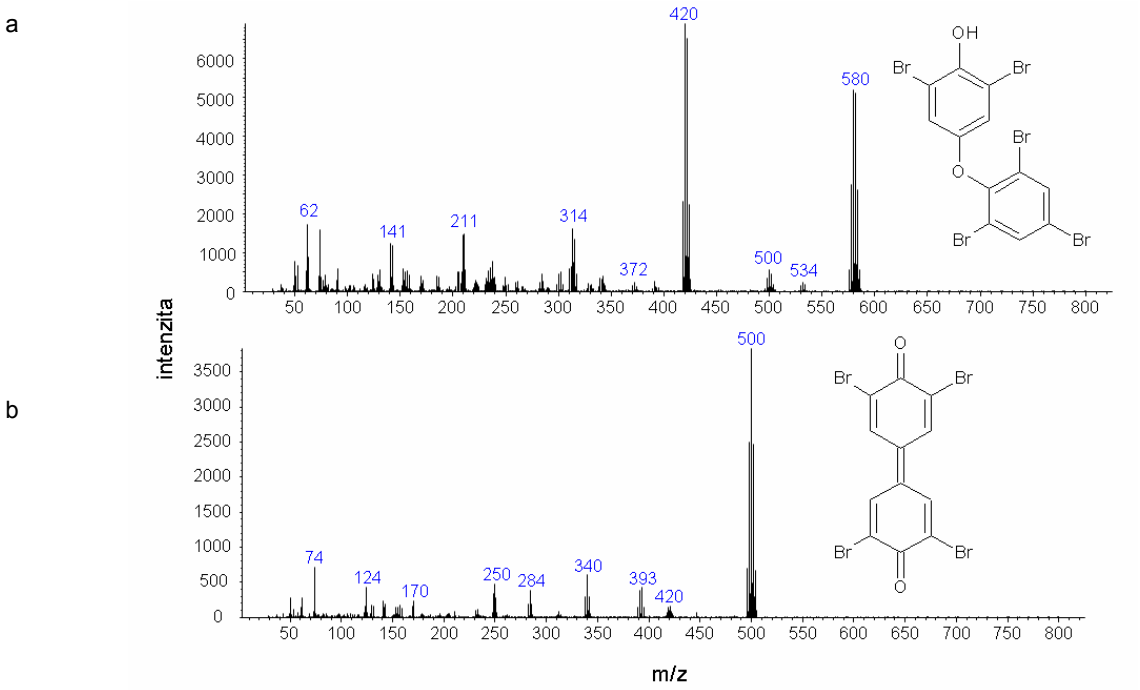
Závěr

TBP podléhá anodické oxidaci v širokém aciditním rozmezí. V alkalickém prostředí, kde je TBP ve formě aniontu, probíhá oxidace snáze, tj. při nižším potenciálu. Fenoxylový radikál vznikající při anodické oxidaci[7] podléhá následným reakcím, zejména dimeraci spojené se substitucí atomu Br. Některé oxidační produkty jsou redukovatelné na elektrodě ze skelného uhlíku. Při elektrolýze na velkoplošné platinové elektrodě jsou hlavními produkty dimerní sloučeniny, které se silně adsorbují na povrch elektrody. Strukturní vzorce dvou hlavních oxidačních produktů byly navrženy na základě jejich hmotnostních spekter.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 6198959216) a Univerzitou Palackého (studentský projekt PRF_2010_028).



Obr. 3. **Chromatogram oxidačních produktů TBP adsorbovaných na Pt-elektrodě**



Obr. 4. **Hmotnostní spektra produktů oxidace TBP s t_r = 27,55 min (a) a t_r = 26,37 min (b)**

LITERATURA

1. Poustka J., Hajšlová J., Kazda R.: Bromované retardátory hoření: environmentální xenoestrogeny. http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-03-04.pdf, staženo 25. listopadu 2010.
2. de Wit C. A., Herzke D., Vorkamp K.: Sci. Total Environ. *408*, 2885 (2010).
3. Han S. K., Sik R. H., Motten A. G., Chignell C. F., Bilski P. J.: Photochem. Photobiol. *85*, 1299 (2009).
4. Han S. K., Bilski P. J., Karriker B., Sik R. H., Chignell C. F.: Environ. Sci. Technol. *42*, 166 (2008).
5. Contreras D., Oviedo C., Valenzuela R., Freer J., Rojo K., Rodriguez J.: J. Chil. Chem. Soc. *54*, 141 (2009).
6. Bastos P. M., Eriksson J., Vidarson J., Bergman A.: Environ. Sci. Pollut. Res. *15*, 606 (2008).
7. Lund H., Hammerich O.: *Organic electrochemistry*, str. 590, 4. vyd. Marcel Dekker, New York 2001.

PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH ČÁSTIC PRO SEPARACI BIOMARKERŮ Z TĚLNÍCH TEKUTIN JAKO PŘEDSTUPEŇ VÝVOJE DIAGNOSTICKÉHO PROUŽKU

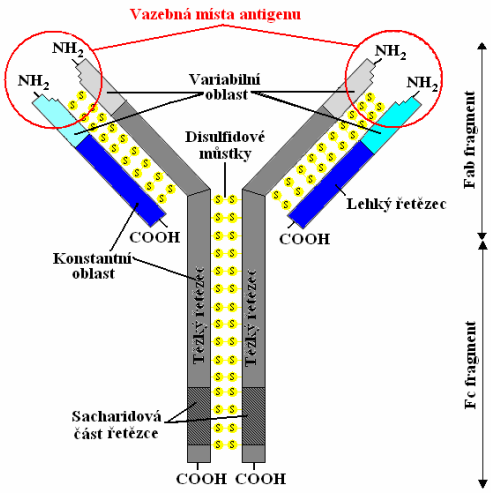
ANNAMARIE NÉMETHOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER

Ústav organické technologie, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
nemethoa@vscht.cz

Úvod

Pro úspěšnou léčbu pacienta je nutná správná a včasná diagnóza onemocnění. O úspěšnosti léčby rozhoduje řada faktorů. Mezi nejdůležitější lze zařadit včasný příchod pacienta k ošetřujícímu lékaři a stanovení rychlé a správné diagnózy lékařem. Vyšetření a následná léčba se řídí zobecněnými postupy a jen velice málo se přihlíží k individuálnímu stavu organismu jedince a jeho specifickým vlastnostem (věk, pohlaví, výška, váha, strava, životní prostředí ad.), což může u závažnějších průběhů onemocnění mít i fatální následky. Nedostatky těchto postupů při vyšetření a následné samotné terapii se snaží řešit tzv. personalizovaná medicína, která se neomezuje jen na hledání nových, rychlých a včasných postupů diagnóz, ale i monitoruje průběh samotné léčby, kterou upravuje podle specifické odpovědi organismu pacienta na danou terapii. Personalizovaná medicína využívá genomických a molekulárních analýz tělních tekutin (moč, plasma, kondenzát vydechovaného vzduchu, mozkomíšní mok) a tkání[1]. Pro její širší rozšíření do rutinní lékařské praxe je potřeba vytipovat specifické látky charakteristické pro konkrétní onemocnění – tzv. "biomarkery"[2] a vytvořit vhodnou standardizovanou analytickou metodu pro jejich detekci a kvantifikaci. V nedávné době byly pro řadu nemocí vytipovány vhodné biomarkery, které vznikají v průběhu daného patologického procesu. Při kvantifikaci těchto biomarkerů v krevní plazmě anebo moči jsou získané informace většinou odrazem patologického procesu odehrávajícího se v rámci celého organismu. Naproti tomu analýza specifických tělních tekutin (např. kondenzát vydechovaného vzduchu, mozkomíšní mok) přináší informaci o dějích odehrávajících se na konkrétním místě (plíce, centrální nervový systém). V uvedených tělních tekutinách se sledované biomarkery vyskytují ve velice nízkých koncentracích (femto-, pikogramy), což spolu se značnou komplexností matrice klade vysoké nároky na vyvíjené analytické metody. Předkládaná práce se zabývá přípravou a charakterizací pórovitých polymerních imunočástic vhodných k separaci biomarkerů z tělních tekutin a jako mezikrok k přípravě tzv. diagnostického proužku, který by se měl stát vhodnou pomůckou pacientů pro orientační stanovení biomarkerů v moči. Diagnostický proužek by umožňoval včasné a snadné rozpoznání patologických procesů odehrávajících se v organismu.

Principem je příprava polymerních imunočástic, v jejichž struktuře jsou imobilizovány vysoce specifické protilátky proti zvoleným antigenům (biomarkerům). Zvolené protilátky – primární imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, jsou přirozenou součástí imunitního systému[3]. Nejčetnější třídou protilátek přítomnou v krvi a tkáňovém moku savců jsou imunoglobuliny G (IgG). Jedná se o glykoproteiny složené ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Řetězce protilátek lze rozdělit na dvě podoblasti: variabilní část a konstantní část. Variabilní oblast je zakončena jedinečnou strukturou ramen, do kterých antigen zapadá jako klíč do zámku[4,5]. Konstantní oblast lze modifikovat, aniž by došlo k ovlivnění vazebné schopnosti protilátky vůči danému antigenu, a využít k imobilizaci na různé nosiče[6]. Této skutečnosti bylo využito při vývoji polymerního materiálu, v jehož struktuře jsou zakotveny uvedené protilátky tak, aby nedošlo ke ztrátě jejich biologické aktivity. Zároveň je struktura polymeru vytvořena tak, aby póry polymeru splňovaly podmínky nemožnosti průchodu protilátky z polymerního materiálu do biologické matrice a zároveň snadné difuze biomarkeru k zakotvené protilátce s minimálním difuzním omezením.



Obr. 1.**Schéma protilátky imunoglobulinu**

Experimentální část

Chemikálie

Polyvinylalkohol (PVA), polyethylenglykol (PEG), deionizovaná voda, protilátky proti 8-isoprostanu (IgG),

8-isoprostaglandin $F_{2\alpha}$, fosfátový pufr, borátový pufr, síran sodný (Aldrich, USA).

Příprava polymerních nosičů

PEG byl rozpuštěn v deionizované vodě a za současného zahřívání byl postupně přimícháván PVA. Směs byla zahřívaná na teplotu 95−98 °C na vodní lázni, dokud nedošlo k vyčeření roztoku. Po vychladnutí směsi na teplotu 35 °C byly do viskózního gelu vneseny protilátky. Následujícím krokem byla samotná příprava polymerních částic. Směs byla nanesena ve tvaru čoček na předem zváženou Petriho misku. Čočky byly vysušeny na definovanou hmotnost a promyty fosforečnanovým pufrem. Promytím částic došlo k jejich rebobtnání a k vymytí PEG ze struktury, čímž bylo docíleno požadované porézní struktury. Takto připravené polymerní imunočástice byly použity k samotné separaci biomarkerů z tělních tekutin. Vlastní imunoseparace pak byla realizována následujícím způsobem: částice byly přidány k analyzovanému vzorku (tělní tekutiny – moč, krevní plazma, dechový kondenzát ad.), kde došlo k vytvoření komplexu mezi antigenem a protilátkou. Částice s vytvořeným komplexem byly separovány z biologické matrice kombinací centrifugace a dekantace. Separované částice obsahující komplex antigen – protilátka byly po promytí vodou vloženy do roztoku glycinu (100 mM), čímž došlo k rozvolnění komplexu a uvolnění antigenu (sledovaný biomarker) do roztoku, který byl použit pro HPLC/MS kvalitativní a kvantitativní analýzu. Polymerní imunočástice byly po regeneraci znovu použity k další separaci bez výraznější ztráty vazebné kapacity. Pro kvantifikaci bylo využito principu ředění vzorku isotopicky značeným standardem biomarkeru (Stable-Isotope Dilution Assay).

Výsledky a diskuse

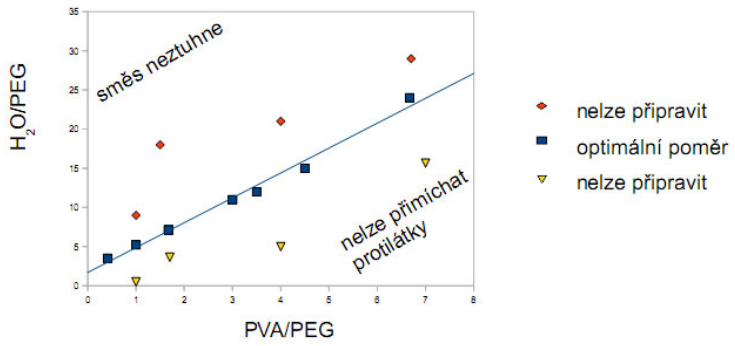
Stěžejní část předkládané práce byla věnována přípravě a optimalizaci parametrů přípravy polymerních imunočástic, přičemž byly monitorovány kroky, které by mohly způsobit zejména deaktivaci (denaturaci) protilátky (např. teplota potřebná k polymeraci monomerů, pH, přítomnost solí ad.).

Prvním ze zkoumaných parametrů přípravy byl poměr výchozích látek pro přípravu polymerních částic, tj. poměr deionizované vody, PVA a PEG. Experimentálně bylo zjištěno, že optimální poměr PVA a vody pro přípravu polymerních částic je 1:5 (za konstantního množství PEG). Důvodem ke stanovení tohoto poměru byl fakt, že při nízké teplotě nutné k přidávání protilátek do polymerního roztoku a následném tuhnutí se vyskytly dva problémy – (*1*) v přítomnosti většího množství vody ve směsi nedochází ke tvorbě gelu a naopak (*2*) při malém množství vody roztok tvoří pevnou fázi, kdy je principiálně nemožné vnesení protilátky (viz obr. 2).

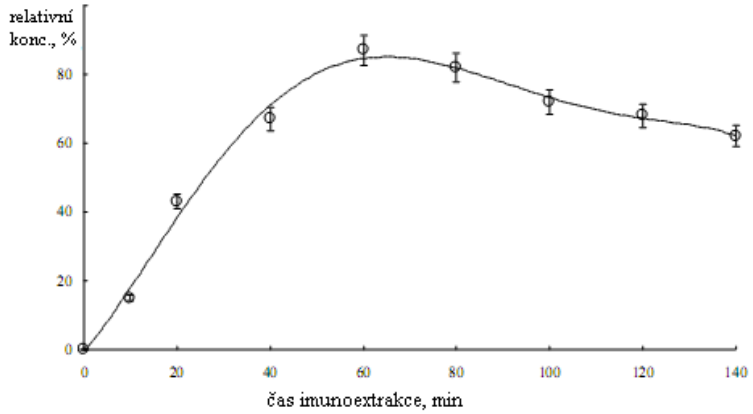
Dalším ze zkoumaných parametrů byl vliv použitého roztoku na rebobtnání polymerních částic po vysušení. Bylo zjištěno, že roztok musí mít vhodné pH, aby nedošlo ke ztrátě biologické aktivity protilátek. Rovněž bylo zjištěno, že pH má výrazný vliv na stabilizaci povrchu polymerních čoček a vznikající morfologii polymeru, kdy jemným laděním hodnoty pH lze ovlivňovat difuzní vlastnosti připraveného materiálu. Zkoumanými roztoky byla voda, roztok síranu sodného, fosforečnanový a borátový pufr. Jako optimální se osvědčil roztok síranu sodného.

Polymerní částice byly charakterizovány i řadou instrumentálních technik. Při FTIR analýze (v kombinaci s mikroskopickým nástavcem) bylo potvrzeno, že z čoček se v průběhu rebobtnání vymývá PEG a celá kostra porézní částice je tvořena pouze zesíťovaným PVA. Metodou konfokální mikroskopie a TEM (mikrořezy polymeru) byl analyzován povrch částic a tím potvrzen pórovitý povrch, stejně jako stanovena závislost distribuce velikosti pórů na podmínkách přípravy.

Funkčnost čoček byla ověřena separací biomarkerů z komplexních biologických matric, přičemž obsahy markerů byly následně stanoveny vyvinutou HPLC/MS analýzou. U polymerních imunočástic byly stanoveny následující parametry: (*1*) vazebná kapacita a (*2*) optimální čas



Obr. 2. **Stanovení optimálního poměru výchozích surovin**



Obr. 3. **Stanovení optimálního času extrakce částicemi**

imunoextrakce biomarkerů z roztoku (viz obr. 3). Jako optimální čas imunoextrakce byla stanovena doba 60 min. Po uplynutí této doby dochází ke snižování detegovaného množství 8-isoprostanu, které je způsobeno jeho teplotní labilitou za laboratorních podmínek.

Výsledky klinické studie potvrdily funkčnost čoček i na reálných vzorcích. Byly zkoumány 3 skupiny pacientů: osoby s diagnózou silikóza, azbestóza a kontrolní skupina zdravých jedinců. Jako paralelní výstup předkládané práce byl v klinické studii potvrzen zvýšený výskyt biomarkeru 8-isoprostanu u pacientů diagnostikovaných s výše uvedenými onemocněními oproti zdravým jedincům.

Závěr

Byly vytvořeny porézní polymerní imunočástice určené k separaci biomarkerů z tělních tekutin. Jejich funkčnost byla potvrzena klinickou studií. Výhodou těchto polymerních částic je snadná manipulace, jednoduchá příprava, vysoká efektivita a biokompatibilita materiálu s tělními tekutinami (nedochází k degradaci protilátek). Na této práci se bude dále intenzivně pracovat ve snaze vyvinout tzv. diagnostický proužek, který by sloužil jako orientační pomůcka nejen pro lékaře, ale i pro laickou veřejnost. Cílem je vytvořit nástroj personalizované medicíny, který by jedincům s predispozicí k určitým onemocněním dovoloval monitorovat přítomnost určitých biomarkerů ve snadno odebíratelných tělních tekutinách (moč, sliny ad.), přičemž nákladný analytický detekční systém by měl být nahrazen kolorimetrickou změnou proběhnutou v polymerním materiálu v případě pozitivní reakce protilátka-biomarker (vyvázání barviva z protilátek v důsledku vyšší afinity biomarkeru k protilátce), což by poskytnulo jasný signál k návštěvě lékaře.

Na závěr bych chtěla poděkovat Ing. Janu Mernovi, PhD. za laskavé konzultace v oblasti chemie polymerů. Tato práce byla finančně podporována Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví (IGA MZ NS/10298-3/2009) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 604 613 7301).

LITERATURA

1. Lesko L.: Clin. Pharmacol. Ther. *81*, 807 (2007).
2. Teng P. N., Bateman N. W., Hood B. L., Conrads T. P.: J. Proteom Res. *9*, 6091 (2010).
3. Monoclonal Antibodies. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7. vyd. Wiley, http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a16_699.pub2/pdf, staženo 15. ledna 2009.
4. Šilhánková L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology,* str. 189, 3. vyd. Academia, Praha 2008.
5. Fukal L., Holubová B.: *Imunochemie a imunoanalýza*. VŠCHT Praha, Praha 2007.
6. Turková J.: J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. *722*, 11 (1999).
7. Immunologie Structurale. Institut Pasteur FR. http://www.pasteur.fr/recherche/unites/ImmStr/images/igg-avectext-afterphotoshop.JPG, staženo 5. ledna 2010.

MOŽNOSTI STANOVENÍ 2-ETHYLHEXYL NITRÁTU V NAFTĚ

OLGA NYKODÝMOVÁ, BOHUSLAV DVOŘÁK, PETRA BAJEROVÁ, ALEŠ EISNER a KAREL VENTURA

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická,Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
NykodymovaOlga@seznam.cz

Úvod

Motorová nafta má stejně jako benzín ukazatel kvality. Tomuto parametru se říká cetanové číslo (CN). Na cetanovém čísle závisí spousta parametrů motoru, jako je studený start, emise, hlučnost motoru nebo spotřeba paliva. Protože rostou požadavky na emisní normy a spotřebu, je třeba zvyšovat i cetanové číslo nafty. Pro budoucnost je nutné, aby cetanové číslo nafty bylo minimálně 56. Procesně toho lze dosáhnou např. dearomatizací, jenže to je dost obtížné. Proto se uplatňuje používání aditiv[1–3].

Existují dva základní druhy aditiv pro zvýšení cetanového čísla. Jsou to nitráty a peroxidy. Obě skupiny látek jsou silnými oxidovadly poskytujícími volné radikály. Tyto radikály nastartují reakci nafty při startu, a urychlují tak vlastní start motoru[1].

2-EHN je nejčastěji užívaným aditivem. Do nafty se přidává v koncentracích 0,03–0,4 % (v/v) (cit.[4]). Koncentrace 2-EHN se v ČR stanovuje metodou podle státní normy[5]. Tato metoda je založená na hydrolýze nitrátu silnou kyselinou. Uvolněná kyselina dusičná se nechá reagovat s 2,4-dimethylfenolem. Reakční produkt se extrahuje 2,2,4-trimethylpentanem a poté hydroxidem sodným. Intenzita zabarvení se měří při 452 nm.

Cílem této práce je nalezení alternativní metody pro metodu normovanou, která je časově velice náročná.

Experimentální část

Chemikálie

Kyselina sírová (96%) a hydroxid sodný p.a. (Penta, Chrudim, ČR), kyselina octová p.a. a propan-2-ol p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR), 2-ethylhexylnitrát (97%), 2,4-dimethylfenol (98%), *o*-nitrotoluen a 2,2,4-trimethylpentan (spectrophotometric grade) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), čistá nafta bez obsahu nitrátů (Paramo, Pardubice, ČR).

Instrumentace a chromatografické podmínky pro HS-GC/MS

Pro práci byl použit plynový chromatograf GC-17A spojený s hmotnostním detektorem QP 5050A (Shimadzu, Tokio, Japonsko) a autosampler Pal-Combi (CTS Analytics, Zwingen, Švýcarsko). Chromatograf byl vybaven kolonou DB5-MS, délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium 5.0 (Linde, Praha, ČR) s konstantní lineární rychlostí 30 cm s^{-1}. Nástřikový port byl vyhříván na 180 °C, interface na 230 °C. Kolona byla zahřívána podle následujícího teplotního programu: 100 °C (10 min), 25 °C min^{-1} → 280 °C (13 min).

Jako vnitřní standard byl použit *o*-nitrotoluen. Jako reakční plyn pro chemickou ionizaci byl použit methan 3.5 (Linde, Praha, ČR)

Instrumentace a chromatografické podmínky pro MDGC/MS

Byla použita sestava dvou plynových chromatografů GC-2010 spojených s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus a autosamplerem AOC-20i (Shimadzu, Tokio, Japonsko). K separaci v první dimenzi byla použita kolona DB5-MS a teplotní program: 150 °C (8 min), 25 °C min^{-1} do 280 °C (17 min). Nástřikový port byl vyhříván na 180 °C, FID na 295 °C. Ve druhé dimenzi byla použita kolona HP-INNOWAX a teplotní program: 50 °C (5 min), 10 °C min^{-1} do 150 °C (15 min).

Stanovení 2-EHN normovanou metodou

Nejprve byla sestavena kalibrační křivka. Do 100ml odměrné baňky bylo odpipetováno 1; 3; 5; 8 a 10 ml 2-EHN a baňka byla doplněna čistou naftou. 1 ml tohoto roztoku byl převeden do 10ml odměrné baňky a ta byla doplněna propan-2-olem. 1 ml připraveného roztoku by převeden do dělící nálevky a byl přidán 1 ml 4% roztoku dimethylfenolu v kyselině octové a 40 ml kyseliny sírové (500 ml koncentrované kyseliny sírové + 270 ml vody). Roztok byl 30 min protřepáván na třepačce (250 kmitů za minutu) a poté bylo přidáno 25 ml trimethylpentanu. Po 1 min třepání bylo přidáno 25 ml destilované vody a opět 1 min třepáno. Poté bylo přidáno 10 ml roztoku hydroxidu sodného (50 g NaOH v 1000 ml vody) a celá směs byla 1 min třepána. Vodná fáze byla převedena do kyvety a byla změřena absorbance při 452 mn.

Optimalizace HS podmínek

Pro optimalizaci podmínek pro HS byl použit reálný vzorek motorové nafty se známým obsahem 2-EHN

(0,15 % (v/v) – určeno normovanou metodou). Optimalizovanými podmínkami byly teplota a doba inkubace a objem vzorku.

Validace metod

Linearita kalibrační křivky byla stejně jako u normované metody sledována v koncentračním rozsahu 0,03 až 0,3 % (v/v) 2-EHN v motorové naftě. Kalibrace byla připravena přidáváním standardu 2-EHN do nitrátů prosté nafty v koncentracích 0,03; 0,09; 0,15; 0,24 a 0,3 % (v/v). Každý kalibrační bod byl připraven šestkrát. Jako kalibrační závislost byl do grafu vynášen poměr ploch píků 2-EHN a vnitřního standardu v závislosti na koncentraci 2-EHN.

Dále byla ověřena přesnost a správnost obou metod a byl určen limit detekce a kvantifikace.

Analýza vzorků

Aby bylo možné vyhodnotit použitelnost navrhovaných chromatografických metod pro kvantifikaci 2-EHN v naftě pro běžné použití, byly tyto metody použity na analýzu uměle obohacených vzorků motorové nafty.

Výsledky a diskuse

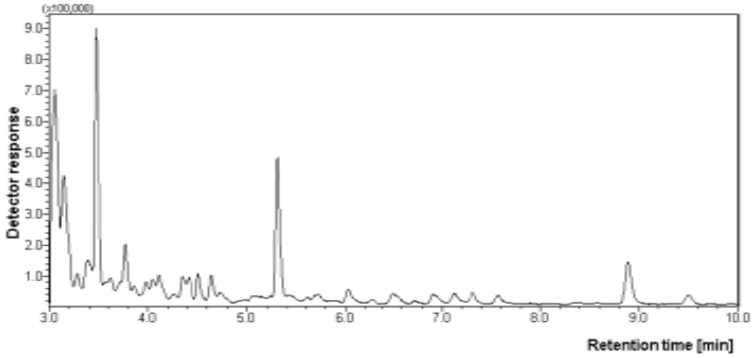
V této práci bylo provedeno porovnání nových metod pro stanovení alkylnitrátů v motorové naftě s metodou normovanou. Nejprve byly optimalizovány chromatografické podmínky. Jediným problémem byla detekce. Jak je vidět na obr. 1, EI detekce není ani v SIM modu dostatečně citlivá. Nafta je velice složitá matrice, a proto je při EI ionizaci vysoká odezva pozadí. To znemožňuje vlastní detekci nitrátů.

Proto byla použita chemická ionizace s methanem jako reakčním plynem. Tento typ ionizace redukuje počet detegovaných látek pouze na pík 2-EHN a pík vnitřního standardu (obr. 2).

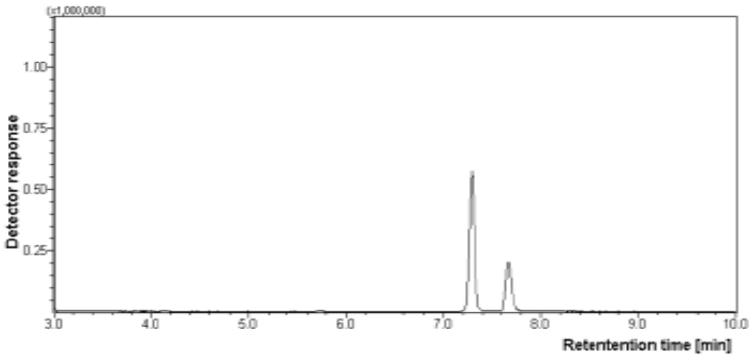
Optimalizace podmínek pro HS-GC/MS

Optimalizace doby inkubace

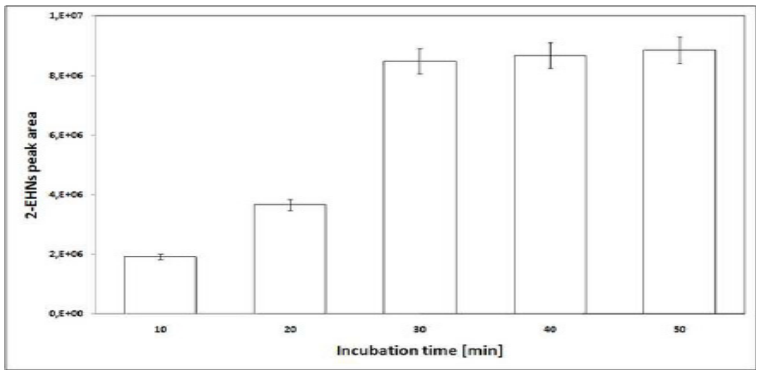
Jako první parametr HS podmínek byla optimalizována doba inkubace. Optimalizace byla prováděna v rozsahu 10–50 min s krokem 10 min. Z obr. 3 je vidět, že plocha píku roste do třicáté minuty. Po této době je plocha píku téměř konstantní.



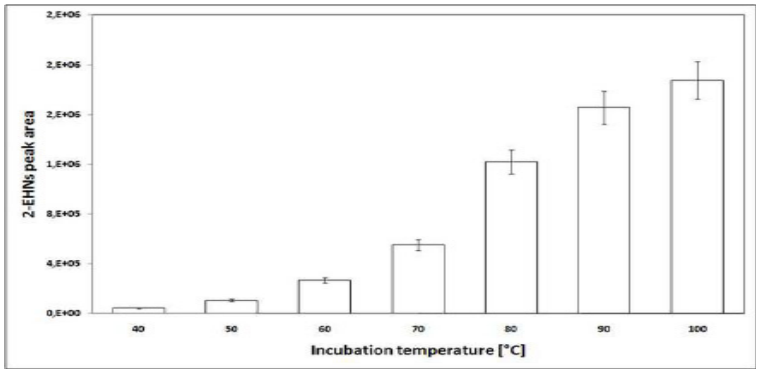
Obr. 1. **GC analýza reálného vzorku motorové nafty s použitím MS detekce** (EI-SIM)



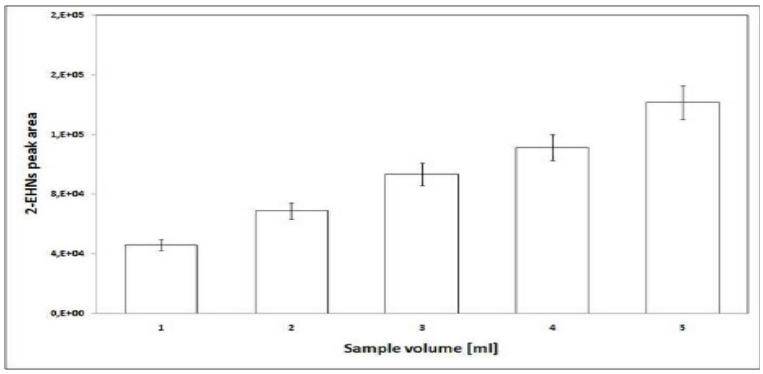
Obr. 2. **GC analýza reálného vzorku motorové nafty s použitím MS detekce** (NCI-SIM)



Obr. 3. **Optimalizace doby inkubace** (objem vzorku 5 ml, teplota 60 °C)



Obr. 4. **Optimalizace teploty inkubace** (objem vzorku 5 ml, čas 30 min)



Obr. 5. **Optimalizace objemu vzorku** (teplota 100 °C, čas 30 min)

Optimalizace teploty inkubace

Druhým optimalizovaným parametrem HS podmínek byla teplota inkubace. Teplota byla optimalizována v rozsahu 40–100 °C s krokem 10 °C. Z obr. 4 je patrné, že plocha píku 2-EHN roste v celém rozsahu optimalizace. Teplota vyšší než 100 °C by mohla být pro inkubaci lepší, ale z bezpečnostních důvodů nebyla raději zkoušena.

Optimalizace objemu vzorku

Posledním parametrem v optimalizaci HS podmínek byl objem vzorku. Vliv objemu vzorku byl ověřován s optimalizovanou teplotou a dobou inkubace v rozsahu 1 až 5 ml s krokem 1 ml. Na obr. 5 je vidět, že plocha píku roste v celém testovaném rozsahu. Pro vlastní práci bylo vybráno 5 ml vzorku. Větší objem vzorku by pravděpodobně poskytl větší pík, ale z důvodu redukce potřebného

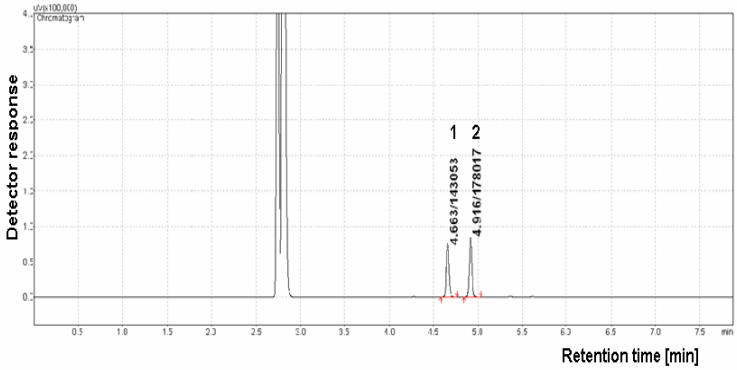
množství vzorku toto nebylo dále testováno.

Optimalizace MDGC/MS

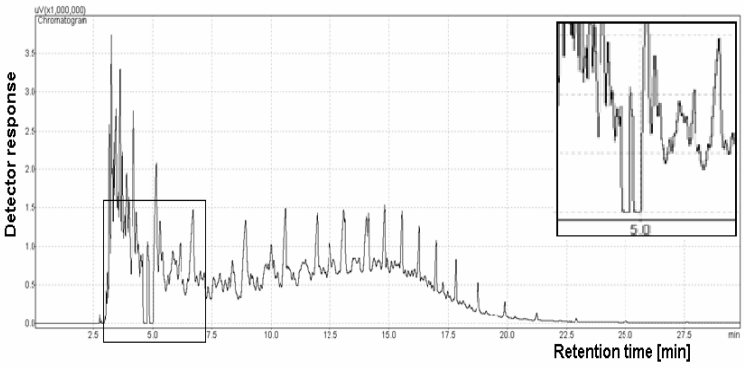
Optimalizace podmínek pro MDGC spočívala v nalezení vhodného teplotního programu na obou kolonách. Na kolonu první byl použit teplotní program podobný programu pro stanovení pomocí HS-GC/MS, jen byl urychlen zvýšením počáteční teploty. Retenční časy sledované látky a vnitřního standardu v první dimenzi byly určeny pomocí standardů (obr. 6). V úzkém okolí těchto časů byly provedeny výřezy (obr. 7), které byly odeslány na druhou kolonu. K detekci ve druhé dimenzi byl použit hmotnostní detektor (obr. 8).

Validace chromatografických metod

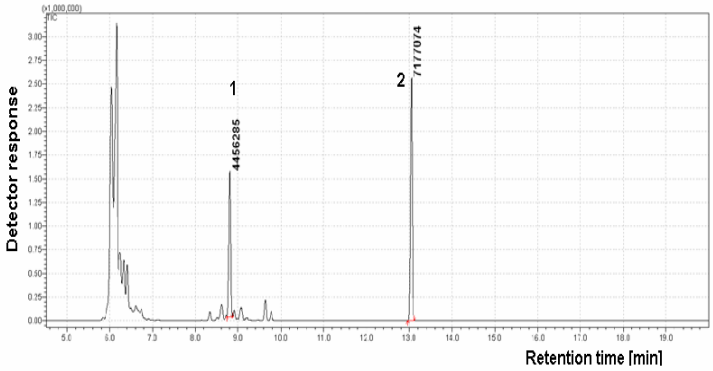
Obsah 2-EHN ve vzorcích motorové nafty byl u obou nových metod určován metodou kalibrační křivky. Jak je uvedeno v Experimentální části, byla sestavena pětibodová



Obr. 6. **Analýza standardu 2-EHN a *o*-nitrotoluenu** (1. dimenze, FID); 1: 2-EHN, 2: *o*-nitrotoluen



Obr. 7. **Analýza vzorku nafty s vnitřním standardem** (1. dimenze, FID, výřezy odeslané na druhou kolonu)



Obr. 8. **Analýza vzorku nafty s vnitřním standardem** (2. dimenze, SIM-MS); 1: 2-EHN, 2: *o*-nitrotoluen

Tabulka I
Analýza vzorků motorové nafty – výsledky získané jednotlivými metodami

Metoda Koncentrace (% (v/v))	L-L extrakce	Chyba [%]	HS-GC/MS	Chyba [%]	MDGC/MS	Chyba [%]
0,06	0,0630	4,98	0,0549	–8,43	0,0628	4,72
0,10	0,0961	–3,95	0,1114	11,40	0,1048	4,85
0,12	0,1322	10,16	0,1316	9,69	0,1288	7,3
0,12	0,1672	11,45	0,1441	–3,92	0,1576	5,09
0,20	0,1865	–6,77	0,2257	12,83	0,2072	3,61

kalibrace. Linearita byla sledována v rozsahu 0,03–0,3 % (v/v) 2-EHN. Obě kalibrační křivky byly v tomto rozsahu lineární s korelačním faktorem 0,9971 (HS-GC/MS), resp. 0,9995 (MDGC/MS). Zároveň byly určeny limity detekce (0,009 % (v/v)) a kvantifikace (0,03 % (v/v)). Těmito metodami by šlo dosáhnout mnohem nižších koncentrací, ale protože v práci se vyšlo z normovaného postupu pro stanovení nitrátů, byla i kalibrace provedena podle této normy, tzn. v normovaném rozsahu koncentrací.

Analýza vzorků

Použitelnost chromatografických metod pro analýzu obsahu nitrátů v motorové naftě byla ověřena na uměle obohacených vzorcích motorové nafty. Získané výsledky shrnuje tab. I.

Závěr

Byly vyvinuty a validovány dvě nové metody pro stanovení 2-EHN v motorové naftě. První metodou je HS-GC/MS s negativní chemickou ionizací, druhou je MDGC/MS s klasickou elektronovou ionizací. V porovnání s normovanou metodou obě metody redukují přípravu vzorku pro analýzu pouze na přídavek vnitřního standardu. Proto jsou mnohem rychlejší a snadnější a méně náchylnější na chyby v procesu přípravy vzorku. Použitelnost obou chromatografických metod bude dále zkoumána přímo na reálných vzorcích motorové nafty, odebrané ze stojanu benzínové pumpy.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021627502).

LITERATURA

1. V. Matějovský: *Automobilová paliva*. Grada Publishing, Praha 2005.
2. Ghosh P.: Energy Fuels *22*, 1073 (2008).
3. Suppes G. J., Chen Z., Rui Y., Mason M., Heppert J. A.: Fuel *78*, 73 (1999).
4. Solano-Serena F., Nicolau E., Favreau G., Jouanneau Y., Marchal R.: Biodegradation *20*, 85 (2009).
5. European Committee for Standardization, EN ISO 13759 Petroleum products – Determination of alkyl nitrate in diesel fuels – Spectrometric method, in, Management Centre, rue de Stassart *36*, B 1050 Bruxelles (1996).

´NOVÉ´ ORGANOHALOGENOVANÉ KONTAMINANTY VE VODNÍM EKOSYSTÉMU

MAREK PAPEŽ, ONDŘEJ LACINA, DARINA LANKOVÁ, JANA PULKRABOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
marek018@seznam.cz

Úvod

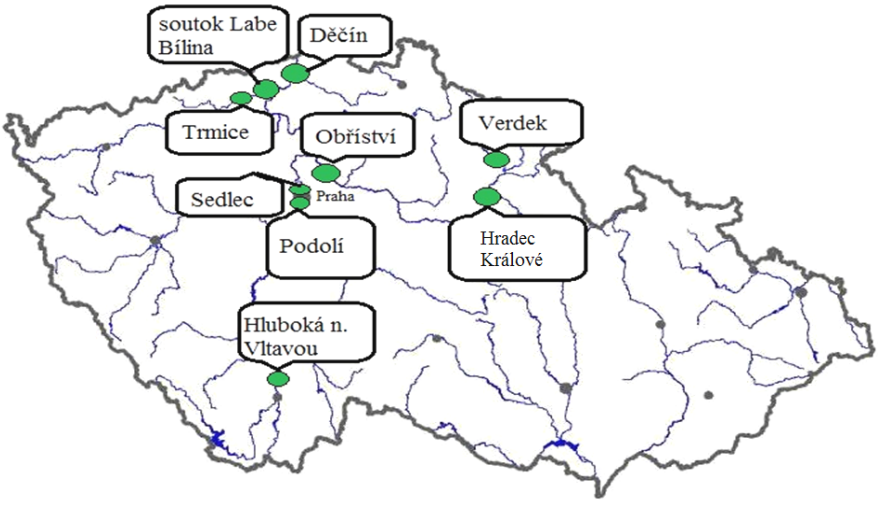
Bromované retardátory hoření (BFR) a perfluorované sloučeniny (PFC) patří mezi perzistentní halogenované kontaminanty, které jsou v současnosti hojně sledovány jak v životním prostředí, tak v potravinách. Tyto látky vznikají antropogenní činností. BFR se používají k prevenci vzniku požárů. Jedná se o poměrně pestrou skupinu látek vyznačující se vysokou stabilitou a bioakumulačním potenciálem[1]. PFC se využívají např. při výrobě pokovovaných předmětů, ve fotografickém průmyslu nebo jako aditiva do hasících pěn a hydraulických kapalin. Jedná se o chemicky inertní látky rezistentní hydrolýze, fotolýze a biodegradaci. PFC jsou povrchově aktivní látky, zároveň oleofobní i hydrofobní. Díky vyšší polaritě se váží zejména na proteiny a kumulují se především v krevní plasmě a v játrech[2]. Hlavním zdrojem expozice člověka BFR i PFC je dietární příjem (ryby, tučné potraviny), dále inhalací a dermální příjem[2,3]. V poslední době jsou tyto látky v centru pozornosti nejen v Evropě, ale i USA a Kanadě. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) vydal v minulém roce doporučení sledovat výskyt PFC i BFR, včetně jejich metabolitů v potravinách pro získání informací o expozici člověka.

Cílem této studie bylo zjistit kontaminaci vodního ekosystému České republiky vybranými zástupci obou skupin, tj. BFR a PFC, kdy jako vhodné bioindikátory znečištění byly využity různé druhy ryb. Pro stanovení organohalogenovaných polutantů ve svalovině ryb byla použita nově vyvinutá analytická metoda založená na modifikovaném extrakčním postupu QuEChERS (akronym z Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Přednosti metody jsou rychlost, nízké náklady na přípravu vzorku a především současné stanovení obou skupin analytů s detekčními limity na hladině jednotek až desítek ng kg^{-1}. K dosažení takto nízkých detekčních limitů je rovněž nutná nejmodernější instrumentace zahrnující ultra účinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC) ve spojení s novou generací hmotnostních spektrometrů na principu trojitého kvadrupólu (MS/MS).

Experimentální část

Analyzované vzorky

V rámci této studie byly odloveny různé druhy ryb ve vybraných oblastech na 2 největších řekách ČR, sledováno bylo 5 lokalit na řece Labe a 3 lokality na Vltavě. Dále byla vzorkována lokalita Trmice (Bílina), kde byla již v předchozích letech zjištěna vyšší hladina PFOS (viz



Obr. 1. **Přehled vzorkovaných lokalit**

obr. 1). Celkem bylo analyzováno 59 vzorků rybí svaloviny. Nejčastěji vyskytující se rybí druh byl jelec tloušť (25 vzorků), cejn velký (23), dále bolen dravý (4), plotice obecná (3), karas obecný (2), kapr obecný (1), ostroretka stěhovavá (1).

Sledované látky

V průběhu této práce bylo sledováno celkem 32 analytů, 25 ze skupiny PFC a 7 BFR (viz tab. I).

Analytická metoda

Pro extrakci analytů ze svaloviny ryb byla použita modifikovaná metoda QuEChERS. Extrakce zahrnuje několik kroků spočívajících v izolaci analytů acetonitrilem, jejich vysolení do organické fáze po přídavku NaCl a $MgSO_4$, přečištění extraktu pomocí disperzní SPE s využitím C18 sorbentu a zakoncentrování přečištěného vzorku na rotační vakuové odparce. Po rozpuštění v acetonitrilu a přefiltrování přes mikrofiltr je vzorek připraven na LC-MS analýzu.

Tabulka I
Přehled sledovaných analytů

#	Analyt				
1	PFC	PFCA	C4	PFBA	kyselina perfluorobutanová
2			C5	PFPeA	kyselina perfluoropentanová
3			C6	PFHxA	kyselina perfluorohexanová
4			C7	PFHpA	kyselina perfluoroheptanová
5			C8	PFOA	kyselina perfluoroktanová
6			C9	PFNA	kyselina perfluorononanová
7			C10	PFDA	kyselina perfluorodekanová
8			C11	PFUdA	kyselina perfluoroundekanová
9			C12	PFDoA	kyselina perfluorododekanová
10			C13	PFTrDA	kyselina perfluorotridekanová
11			C14	PFTeDA	kyselina perfluorotetradekanová
12			C15	PFPeDA	kyselina perfluoropentadekanová
13			C18	PFODA	kyselina perfluorooktadekanová
14		PFSA	C4	PFBS	perfluorobutansulfonová kyselina
15			C6	PFHxS	perfluorohexansulfonová kyselina
16			C8	PFOS	perfluoroktansulfonová kyselina
17			C10	PFDS	perfluorodekansulfonová kyselina
18		PFAPA	C6	PFHxPA	kyselina perfluorohexylfosfonová
19			C8	PFOPA	kyselina perfluorooktylfosfonová
20			C10	PFDPA	kyselina perfluorodecylfosfonová
21		FOSA, FOSE	C8	FOSA	perfluoroktansulfonamid
22			C8	N-MeFOSA	*N*-methylperfluoro-1-oktansulfonamid
23			C8	N-EtFOSA	*N*-ethylperfluoro-1-oktansulfonamid
24			C8	N-MeFOSE	2-(*N*-methylperflouro-1-oktansulfonamid)-ethanol
25			C8	N-EtFOSE	2-(*N*-ethylperflouro-1-oktansulfonamid)-ethanol
26	bromované látky	metabolity	bromované fenoly		2,4,6-tribromfenol
27					2,4-dibromfenol
28					pentabromfenol
29			tetra Br OH-BDE		# 47, 49, 68
30			penta Br OH-BDE		# 99
31		BFR	HBCD		hexabromcyklododekan
32			TBBPA		tetrabrombisfenol A

Analytická koncovka byla ultra účinná kapalinová chromatografie na přístroji Acquity UPLC™ (Waters, USA) s kolonou Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm) ve spojení s hmotnostní detekcí na hmotnostním analyzátoru QTRAP® 5500 Systems, AB Sciex (Kanada) s ionizací elektrosprejem v záporném módu. K eluci analytů byla použita gradientová eluce s mobilní fází 5 mM octan amonný ve vodě a methanol. Následovala hmotnostní detekce.

Výsledky a diskuse

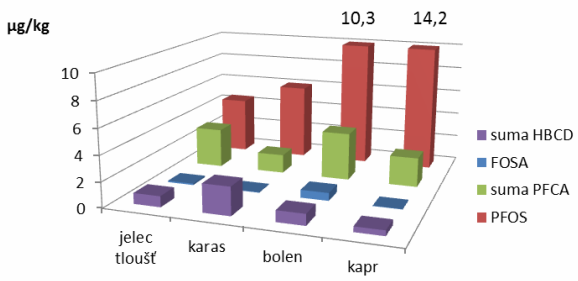
Z celkového počtu 32 sledovaných analytů nebylo detegováno v žádném vzorku 15 analytů (6 BFR a 9 PFC). Ve všech vzorcích byly detegovány C9–C14 perfluorované karboxylové kyseliny (PFCA), PFOS, FOSA a α-HBCD. PFOS se vyskytoval na výrazně vyšších hladinách (1,4–85,3 μg kg^{-1}) v porovnání s dalšími sledovanými polutanty PFCA (1,4–40,2 μg kg^{-1}), FOSA (0,01 – 4,0 μg kg^{-1}) a HBCD (0,4–1,9 μg kg^{-1}).

Obr. 2 dokumentuje hladiny nejvíce zastoupených polutantů ve všech 9 monitorovaných lokalitách. Z výsledků vyplývá, že po toku Vltavy koncentrace látek narůstá, naopak v případě Labe obsah polutantů v rybách odebíraných po toku řeky spíše kolísá (s výjimkou PFOS, jehož koncentrace po toku narůstá). Nejméně kontaminovanou lokalitou je dle očekávání Hluboká nad Vltavou (Vltava), která byla vybrána jako kontrolní (čistá) lokalita. Nejvíce zatíženou oblastí byly Trmice (Bílina), u které byly potvrzeny vysoké nálezy PFC zjištěné už v předešlých studiích. Především hladiny analytu PFOS byly v této lokalitě vysoké. Vysoká kontaminace perfluorokarboxylovými kyselinami byla zjištěna v první sledované lokalitě na Labi – Verdek. Vzhledem k tomu, že PFC se v ČR nevyráběly, ani nevyrábějí a ani není přesně známo jejich použití na našem území, nelze zatím přesně určit místo původu / úniku těchto látek, což bude předmětem dalšího výzkumu.

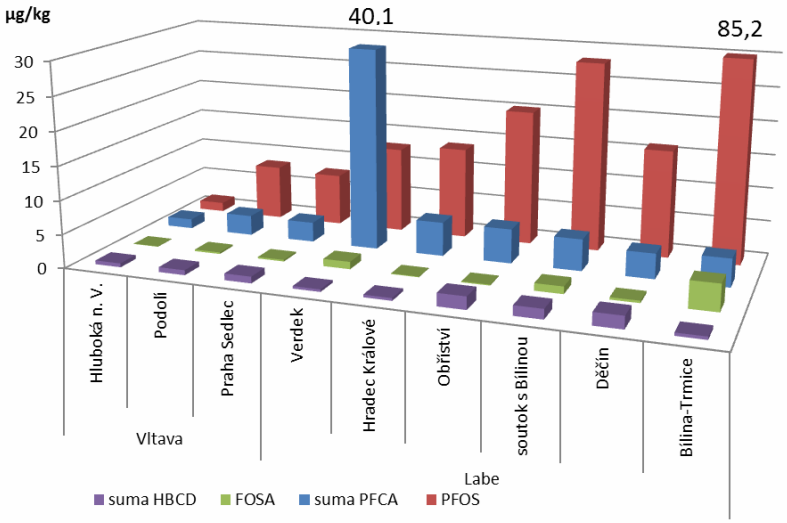
V průběhu studie nebyla porovnávána pouze kontaminace v jednotlivých lokalitách, ale i v různých druzích ryb, jak je ukázáno na obr. 3 na příkladu oblasti Praha – Sedlec (Vltava). Z obrázku je patrné, že mezi 4 odlovenými druhy ryb byly velké rozdíly v hladinách všech skupin polutantů, nejvyšší obsah sledovaných látek byl zjištěn v kapru obecném a bolenu dravém.

Závěr

Jedná se o první kompletní studii provedenou v ČR sledující výskyt PFC v tomto rozsahu a rovněž většina BFR byla sledována poprvé. Nejčastěji se vyskytujícím analytem byl PFOS, dále perfluorované karboxylové kyse-



Obr. 3. **Hladiny jednotlivých skupin polutantů v různých druzích ryb v lokalitě Praha – Sedlec (Vltava)**



Obr. 2. **Výskyt jednotlivých skupin polutantů ve všech monitorovaných lokalitách na Vltavě a Labi**

liny, FOSA a HBCD. Byla potvrzena vysoká kontaminace PFOS v lokalitě Trmice (Bílina) a nově identifikovaná zátěž v lokalitě Verdek (Labe), kde byly zjištěny vysoké hladiny PFCA. V případě HBCD nebyly mezi jednotlivými místy ČR velké rozdíly.

Tato studie byla realizována za podpory česko-norského projektu EMERCON (č. A/CZ0046/2/0026), grantu MSM 604637305 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a EU projektu (7FP) PERFOOD (227525).

LITERATURA

1. Alaee M., Arias P., Sjodin A., Bergman A.: Environ. Int. *29*, 683 (2003).
2. Jensen A. A., Poulsen P. B., Bossi R.: *Survey of Chemical Substances in Consumer Products*, sv. 99. The Danish EPA, Copenhagen 2008.
3. Frederiksen M., Vorkamp K., Thomsen M., Knudsen L. E.: Int. J. Hyg. Environ. Health *212*, 109 (2009).

VALIDACE FOTOMETRICKÝCH STANOVENÍ DUSITANŮ A CHSK-CR POMOCÍ SETŮ SPECTROQUANT® V ZASOLENÝCH VODÁCH

VĚRA PILAŘOVÁ, JOSEF TRÖGL a VÁCLAV SYNEK

Katedra technických věd, Fakulta životního prostředí, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí n. L.
Králova výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem

Úvod

Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK) i dusitanů patří mezi základní ukazatele hodnocení biologického čištění odpadních vod (OV). Pro analytické metody existují limitující podmínky (rušivé vlivy), které je třeba pro získání spolehlivého výsledku respektovat. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat rozborům OV, u kterých může být matrice atypická nebo proměnlivá. Naše pracoviště se již několik let podílí na aplikovaném výzkumu biologického odstraňování dusíku z vod pomocí mikroorganismů imobilizovaných do polyvinylalkoholové matrice (Biotechnologie lentikats) se zaměřením na vody s vysokou salinitou (eluáty iontoměničových kolon, OV z odsiřování spalin)[1]. Při experimentech jsou sledovány koncentrace NO_3^-, NO_2^-, rozpuštěného O_2, pH, teplota a obsah organických látek (CHSK), které jsou limitujícími faktory denitrifikace. Pro stanovení těchto parametrů bylo nutné zvolit takové analytické metody, které poskytují výsledky s potřebnou přesností a správností s přihlédnutím k matrici vzorků, vybavení laboratoře, náročnosti analýz[2] apod. Pro NO_2^- a CHSK-Cr bylo vybráno spektrofotometrické stanovení pomocí komerčních analytických souprav MERCK Spectroquant (*Test pro stanovení dusitanů v mořské vodě,* rozsah 0,07 až 3,28 mg l^{-1} NO_2^-, k.č.: 1.14776.0002, *Test pro stanovení CHSK, roztok A + B,* pro rozsah 10 až 150 mg l^{-1}, k.č.: 1.14538.0065 + 1.14682.0495).

Cílem práce byla validace těchto metod pro účely monitorování denitrifikace v zasolených vodách (20 g l^{-1} NaCl + 2 g l^{-1} Na_2SO_4, NO_3^- až 10 g l^{-1}, NO_2^- až 2,5 g l^{-1}).

Experimentální část

Pro validaci byla provedena série měření zahrnující kalibrační křivky (KK) s odlišným složením matrice (tabulka I a II) a opakovaná měření (10×) roztoků s koncentracemi odpovídajícími vybraným kalibračním bodům KK. S každou sérií měření bylo provedeno slepé stanovení. Roztoky byly připravovány ředěním standardních zásobních roztoků (100 mg l^{-1} NO_2^-, resp. 1000 mg l^{-1} CHSK-Cr) a zásobních roztoků pro simulaci matrice (20 g l^{-1} NaCl, 2 g l^{-1} Na_2SO_4, 10 g l^{-1} NO_3^-, 2 g l^{-1} NO_2^-). Pro přípravu roztoků byly použity chemikálie s čistotou p.a. (Lach-Ner), předem vysušené při 105 °C, a demineralizovaná voda (Demi Ultra 20, Goro). Absorbance roztoků byla měřena ve skleněné kyvetě s optickou dráhou 1 cm pomocí spektrofotometru UV–VIS (Cary 50 Conc, VARIAN).

Z naměřených absorbancí roztoků byly vyhodnoceny:

Tabulka I
Stanovení dusitanů – relativní vychýlení středních hodnot opakovatelnosti

	Matrice měřených roztoků			Relativní vychýlení [%] [a]			
	NaCl	Na_2SO_4	NO_3^-	opakovaně měřené roztoky NO_2^- [mg l^{-1}]			
	[mg/]	[mg/]	[mg/]	0,05	0,10	0,20	1,00
1	demineralizovaná voda			4,90	1,18	–0,34	1,32
2	40	4	0	4,87	1,53	0,90	2,29
3	200	20	0	6,27	0,89	0,30	1,41
4	800	80	0	6,50	1,45	0,54	0,50
5	4 000	400	0	14,49	4,67	3,42	4,64
6	4 000	400	2 000	10,73	9,79	1,94	3,09
7	800	80	400	4,19	1,60	1,23	1,07
8	800	80	100	5,35	–0,33	–1,42	–0,44
9	800	80	20	4,77	–0,37	–0,25	–0,17

[a] RV= (x – r) / r · 100 (x = aritmetický průměr hodnot opakovatelnosti, r = referenční hodnota)

Tabulka II
Stanovení $CHSK_{Cr}$ – relativní vychýlení středních hodnot opakovatelnosti

	Matrice měřených roztoků				Relativní vychýlení [%] [a]	
	NaCl	Na_2SO_4	NO_3^-	NO_2^-	opakovaně měřené roztoky $CHSK_{Cr}$ [mg l^{-1}]	
	[mg/]	[mg/]	[mg/]	[mg/]	20	250
1	0	0	0	0	–10,60	–3,24
2	2 000	200	0	0	–9,59	–0,85
3	1 000	100	0	0	4,44	–1,30
4	0	0	1 000	0	–14,83	–3,22
5	0	0	500	0	–2,89	–1,98
					opakovaně měřené roztoky $CHSK_{Cr}$ [mg l^{-1}]	
					20	200
6	0	0	0	200	–10,52	–4,61
7	0	0	0	100	–16,74	–1,95

[a] RV= (x – r) / r · 100 (x = aritmetický průměr hodnot opakovatelnosti, r = referenční hodnota)

a) Korelace koncentrací a naměřených absorbancí jednotlivých bodů kalibračních roztoků pro všechny druhy matrice ($\alpha = 0,05$).
b) Pracovní rozsah metody, linearita porovnáním reziduálního součtu čtverců přímkového a kvadratického modelu (F-test, $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$) (cit.[3,4]).
c) Selektivita porovnáním směrnice regresních přímek s proměnlivým složením matrice s regresní přímkou připravenou v demineralizované vodě. Testován byl parametr „b“ přímkové rovnice regrese (t-test, $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$) (cit.[3,4]). Testovány byly regresní přímky v lineárním rozsahu kalibrace.
d) Základní statistické parametry vyhodnocené z opakovatelnosti.

Koncentrace roztoků měřených pro opakovatelnost byla odečítána z KK připravené v demineralizované vodě. Pro další statistická vyhodnocení byly z výsledků jednotlivých souborů opakovatelnosti vyloučeny odlehlé hodnoty, k jejichž zjištění byl použit Grubbsův test (T-test) (cit.[4,5]).

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočítány z kvadratického průměru výběrových směrodatných odchylek (SD) vyhodnocených z hodnot opakovatelnosti roztoků s koncentrací 0,05 mg l^{-1} NO_2^- a 20 mg l^{-1} CHSK-Cr všech testovaných matric (mez detekce: 3× SD, mez stanovitelnosti: 10× SD) (cit.[2]).

Dále bylo vyhodnoceno relativní vychýlení (RV) středních hodnot opakovatelnosti roztoků vybraných koncentrací připravených ve všech testovaných matricích. Významnost RV byla vyhodnocena t-testem porovnáním střední hodnoty opakovatelnosti s referenční hodnotou ($\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$) (cit.[3]).

Výsledky

Validace zvolené metody pro stanovení dusitanů (testovaný rozsah 0,05 až 3,00 mg l^{-1})

- Přímkový regresní model je vhodný pro všechny testované druhy matrice v rozsahu 0,05 až 1,00 mg l^{-1} NO_2^- ($\alpha = 0,05$).
- Nebyla nalezena shoda regresních přímek pro kalibrační roztoky, které byly připraveny v prostředí matrice č. 4 až 6 (tabulka I) s regresní přímkou, jejíž kalibrační roztoky byly připraveny v demineralizované vodě.
- Mez detekce = 0,004 mg l^{-1} NO_2^-, mez stanovitelnosti = 0,014 mg l^{-1} NO_2^-.
- RV (tabulka I) pro koncentraci 0,05 mg l^{-1} NO_2^- několikanásobně převyšuje hodnoty RV opakovatelnosti s vyšší koncentrací dusitanů, a to ve všech matricích. RV je vyšší i u všech testovaných koncentrací opakovatelnosti v roztocích s matricí č. 5 a 6.
- Byla prokázána významnost RV středních hodnot opakovatelnosti NO_2^- pro většinu výsledků RV uvedených v tabulce I, a to i na hladině významnosti $\alpha = 0,01$.

Validace zvolené metody pro stanovení CHSK-Cr (testovaný rozsah 10 až 300 mg l^{-1})

- Přímkový regresní model pro matrici č. 1 platí v rozsahu 20 až 250 mg l^{-1} CHSK-Cr ($\alpha = 0,05$), a proto byl tento model v daném rozsahu testován i pro ostatní matrice. Analýza prokázala vhodnost přímkového regresního modelu v uvedeném rozsahu pro

matrice č. 2 a 3. U matric obsahujících NO_2^- (č. 6 a 7) byl regresní přímkový model testován i pro rozsah 20 až 200 mg l^{-1} CHSK-Cr, neboť dichroman draselný, jehož přebytek je stanovován, je částečně spotřebován na oxidaci dusitanů a při koncentraci 250 mg l^{-1} CHSK je jeho dávkované množství nedostatečné pro oxidaci všech látek přítomných v roztoku. Výsledky prokázaly, že pro tyto matrice je přímkový regresní model ve zkoumaném rozsahu vhodný.

- Nebyla nalezena shoda regresních přímek pro kalibrační roztoky, které byly připraveny v prostředí matrice č. 4 a 5 s regresní přímkou, jejíž kalibrační roztoky byly připraveny v demineralizované vodě.
- Mez detekce = 5,64 mg l^{-1} CHSK-Cr, mez stanovitelnosti = 18,8 mg l^{-1} CHSK-Cr.
- Relativní vychýlení (tabulka II) pro koncentraci 20 mg l^{-1} CHSK-Cr několikanásobně převyšuje hodnoty RV opakovatelnosti s vyšší koncentrací CHSK-Cr.
- Byla prokázána významnost RV středních hodnot opakovatelnosti CHSK-Cr pro většinu výsledků RV uvedených v tabulce II, a to i na hladině významnosti $\alpha = 0{,}01$.

Diskuse

Validovaná metoda pro stanovení dusitanů je výrobcem určena pro rozsah 0,07 až 3,28 mg l^{-1} NO_2^- (kyveta 1 cm). Regresní analýza ale prokázala vhodnost regresního přímkového modelu pro rozsah koncentrací 0,05 až 1,00 mg l^{-1} NO_2^-. Přestože mez stanovitelnosti je pouze 0,014 mg l^{-1} NO_2^-, z výsledků RV vyplývá, že reálná mez stanovitelnosti (při srovnatelných hodnotách RV na různých koncentračních hladinách) je 0,1 mg l^{-1}. Z výsledků RV dále vyplývá, že pro eliminaci rušivého vlivu solí je vzorky nutné ředit 25× (dle testovaného ředění matrice). Mez stanovitelnosti se tak zvýší na 2,5 mg l^{-1} NO_2^-.

Analytický set pro stanovení CHSK-Cr je určen pro rozsah koncentrací 10 až 150 mg l^{-1}, ale validací metody byla prokázána vhodnost regresního přímkového modelu pro rozsah koncentrací 20 až 250 mg l^{-1} CHSK-Cr. Relativní vychýlení pro koncentraci 20 mg l^{-1} CHSK-Cr se pohybuje v rozmezí 5 až 17 % v závislosti na složení matrice a jejím ředění. Výsledky na této koncentrační hladině jsou tedy méně přesné. Vzhledem k vysokému obsahu chloridů, které ruší stanovení, je nutné vzorky při obsahu 20 g l^{-1} NaCl ředit minimálně 10×, v případě vysokých koncentrací dusitanů ve vzorku až 20×. Mez stanovitelnosti se tím zvýší na 200, resp. 400 mg l^{-1} CHSK-Cr. Přesnost výsledků CHSK-Cr v matrici obsahující dusitany, které se také činidlem oxidují, je po korekci na jejich obsah srovnatelná s přesností stanovení v ostatních matricích.

Závěr

Zvolené analytické metody pro stanovení dusitanů a CHSK-Cr jsou pro sledování průběhu denitrifikace ve slaných vodách (až 20 g l^{-1} NaCl) dostatečně přesné, nicméně vysoké koncentrace solí jsou příčinou vyšší meze stanovitelnosti, neboť vzorky je nutné pro rušivý vliv solí ředit, a to pro stanovení dusitanů 25× a pro stanovení CHSK-Cr 10×, respektive 20×.

Poděkování patří doc. Ing. Pavlu Janošovi, CSc. za konzultace při validaci analytických metod.

LITERATURA

1. Trögl J., Pilařová V., Dáňová P., Holíček R., Krudencová J., Měchurová J., Kohlová M., Krhůtková O., Bouška A., Mrákota J., Stloukal R.: Chemag. *5*, 9 (2010).
2. Suchánek M. (ed.).: *Kvalimetrie 9. Vhodnost analytických metod pro daný účel*. Eurachem ČR, Praha 1999.
3. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat.* Academia, Praha 2004.
4. Popelka J., Synek V.: *Úvod do statistické analýzy dat*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Ústí nad Labem 2009.
5. Suchánek M., Plzák Z., Šubrt P., Koruna I.: *Kvalimetrie 7. Validace analytických metod*. Eurachem ČR, Praha 1997.

STUDIUM DISTRIBUCE PRVKŮ V MOČOVÝCH KAMENECH S VYUŽITÍM LASEROVÉ ABLACE VE SPOJENÍ S ICP-MS SPEKTROMETRIÍ

KATEŘINA PROKSOVÁ, KAREL NOVOTNÝ, MICHAELA GALIOVÁ, TOMÁŠ VACULOVIČ a VIKTOR KANICKÝ

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
Katerina.Proksova@seznam.cz

Úvod

Tvorba močových konkrementů ve vylučovacím ústrojí je nemoc známá jako urolitiáza. Jedná se o velmi bolestivé onemocnění, které postihuje v Evropě 5–12 % populace a často se opakuje, až z 50 % do deseti let[1]. Formování kamenů většinou nastává v důsledku metabolické poruchy, kde jsou v nadměrně vysokém obsahu některé prvky, např. Ca, Mg, K, Pb a jiné[2]. Ovšem některé kovy jsou přirozeně přítomny v lidském těle a jsou nezbytné pro jeho zdraví. Více než 40 chemických prvků má vliv na biologické funkce lidského těla. Tyto prvky mají různou koncentraci a funkci. Nízký obsah některých stopových prvků negativně ovlivňuje biologické procesy v těle. V poslední době je věnována pozornost právě studiu koncentrací stopových prvků v těle a jejich vlivu na procesy, mezi které patří i urolitiáza[3].

Močové kameny se zařazují do několika skupin podle jejich polohy v močovém ústrojí a chemického složení. Podle rozmístění to jsou nefrolithiáza, kalikolithiáza, pyelolithiáza, ureterolithiáza, cystolithiáza, prostatolithiáza a uretrolithiáza. Mezi nejčastější typy kamenů patří vápenaté oxaláty a fosfáty. Dalším typem jsou méně časté struvitové kameny tvořeny při infekci močových cest. Mezi méně časté než struvitové se řadí urátové kameny a ke vzácným kamenům patří cystinové. Aby se zabránilo dalšímu tvoření ledvinových kamenů, je důležité zjistit jejich složení[4].

K identifikaci je možno použít řadu spektrometrických metod, jak pro zjištění struktury, tak i elementárního složení. Pro strukturální analýzu byla použita infračervená a Ramanova spektrometrie, rentgenová difrakce[5,6], zatímco pro prvkové složení byly použity metody indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní nebo optickou emisní detekcí, dále pak atomová absorpční spektrometrie[7]. Nevýhodou metod je příprava a odběr reprezentativního vzorku a také velká spotřeba vzorku.

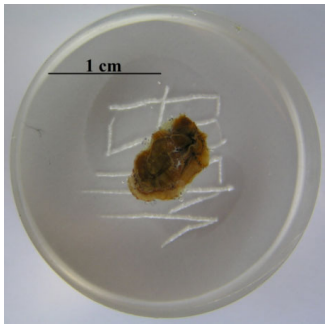
Nejvýznamnější nevýhodou je ztráta informací o prostorovém rozložení prvků v těchto kamenech. Znalost o prostorové distribuci elementárních složek ledvinových kamenů je nezbytné pro pochopení vzniku, mechanismu růstu a pro následnou diagnózu. Za tímto účelem byla použita metoda LA-ICP-MS (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) pro detekci a určení korelace prostorově distribuovaných majoritních a stopových prvků přítomných v ledvinových konkrementech[8,9].

Experimentální část

Pro LA byl použit ablační systém UP213 (New Wave Research, USA) vybavený laserem Nd:YAG emitujícím záření 213 nm na páté harmonické frekvenci. Vytvořený aerosol byl vnášen pomocí He do indukčně vázaného plazmatu s hmotnostním kvadrupólovým analyzátorem a detektorem elektronovým násobičem Agilent 7500ce (Agilent, Japan). Optimalizované parametry, během měření byly neměnné: integrační čas 0,01 s, frekvence 5 Hz, rychlost posuvu vzorku 40 μm s^{-1}, hustota zářivého toku 6,56 J cm^{-2} a průměr laserového paprsku 65 μm. Byla použita kolizní cela v heliovém a vodíkovém módu. Průtok H_2 byl 1 ml min^{-1} a He 2 ml min^{-1}.

Měřenými isotopy vybraných prvků byly: ^{12}C, ^{23}Na, ^{24}Mg, ^{31}P, ^{39}K, ^{43}Ca, ^{44}Ca, ^{55}Mn, ^{56}Fe, ^{63}Cu, ^{66}Zn, ^{88}Sr, ^{109}Ag, ^{118}Sn, ^{208}Pb.

Obr. 1. **Neupravený močový konkrement**



Obr. 2. **Vyleštěný řez močového konkrementu zalitého v epoxidové pryskyřici**

Všechny vzorky močových kamenů analyzovaných LA-ICP-MS byly chirurgicky vyjmuty z těla pacienta. Poté, co je kámen vyjmut, je opláchnut vodou a osušen. Část vzorku je analyzována infračervenou spektroskopií, díky které se zjistí hlavní složení močového konkrementu. Výsledky jsou zaevidovány a vzorek i s evidenčním číslem poslán na univerzitu. Všechny vzorky pocházejí ze sbírky prof. Petra Martince, ÚGN Ostrava. Pro analýzu pomocí LA-ICP-MS je nutné celé vzorky (obr. 1) rozříznout, nejlépe přes krystalizační jádro, aby složení přírůstových linií byla kompletní, dále zalít do epoxidové pryskyřice a vyleštit řez (obr. 2).

Byly vybrány vzorky 11726 a 11684.

Vzorek 11726 je močový konkrement béžové barvy. Na povrchu je whewellit pokrytý vrstvičkou apatitu. V průřezu nejsou viditelné koncentrické vrstvy, ani zde není viditelné krystalizační jádro, jsou zde viditelné póry na několika místech. Hlavními složkami je whewellit se stopami apatitu.

Vzorek 11684 má skořicové hnědé jádro, pórovité, s tmavším hnědým okrajem, ze kterého vyrůstají krystaly radiálně se světle krémovou barvou. Hlavními složkami je weddellit (95 %) a kyselina močová (5 %).

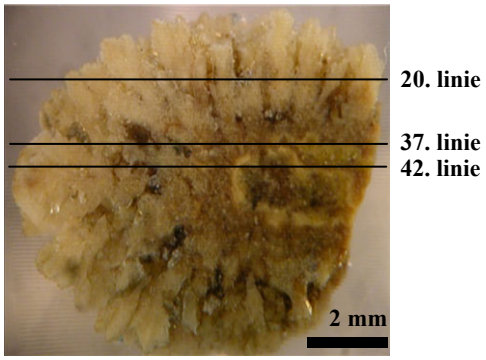
Výsledky a diskuse

Z rozložení matricových a stopových prvků a korelací mezi sebou lze pomocí LA-ICP-MS určit mineralogické složení.

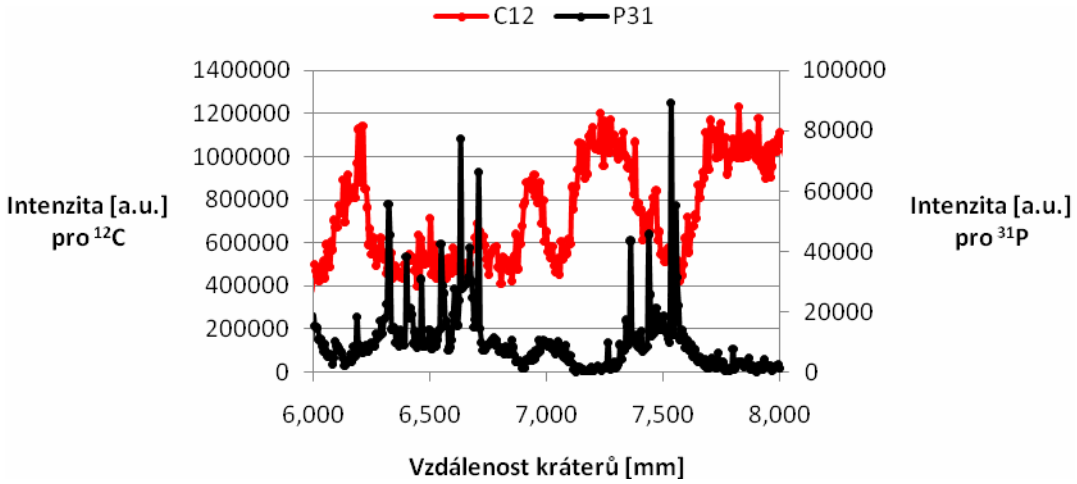
Na vzorku 11684 (obr. 3) byla provedena analýza jednotlivých linií a určeno minerální složení.

Z obr. 4 vyplývá, že maximální intenzita ^{12}C odpovídá minimální intenzitě ^{31}P, což je způsobeno rozdílným složením močového konkrementu v příslušné linii. Maximální hodnoty intenzit ^{12}C odpovídají obsahu kyseliny močové nebo oxalátů a maximální hodnoty ^{31}P obsahu apatitu nebo struvitu. Je zde prokázána korelace mezi ^{43}Ca a ^{31}P, což dokazuje na přítomnost apatitu (obr. 5). Korelace mezi ^{24}Mg a ^{31}P ukazuje na obsah struvitu, ale je pouze jen v některých místech, proto bude pravděpodobně zastoupen v nižším obsahu než apatit (obr. 5). Pokud srovnáme průběh intenzit pro ^{88}Sr a ^{43}Ca, zjistíme, že maxima ^{88}Sr odpovídají minimům ^{43}Ca a naopak. Pravděpodobným důvodem je náhrada Ca^{2+} v krystalové mřížce za Sr^{2+}, který má podobný iontový poloměr a náboj (obr. 6).

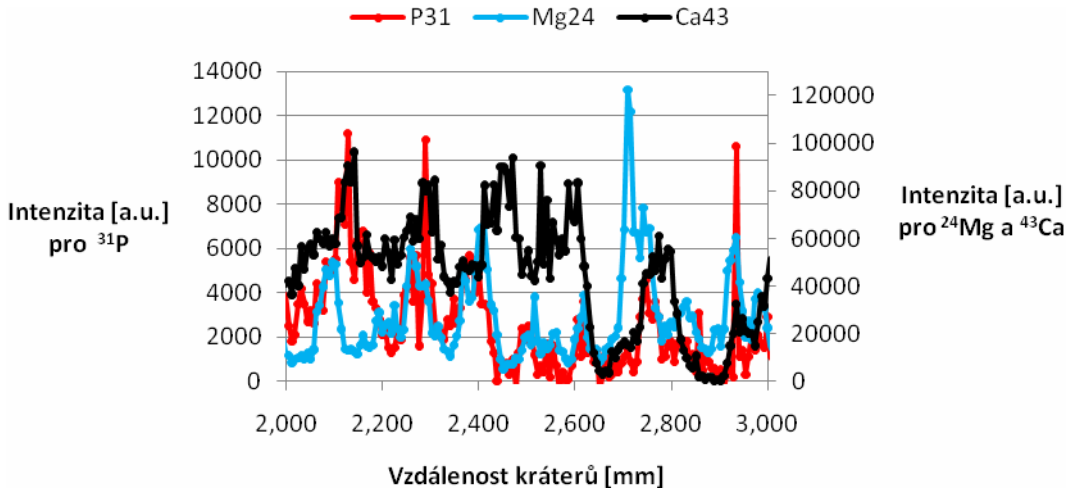
Abychom získali lepší představu o prostorovém rozložení matricových a stopových prvků, byly vytvořeny 2D mapy pro jednotlivé měřené isotopy pro močový konkre-



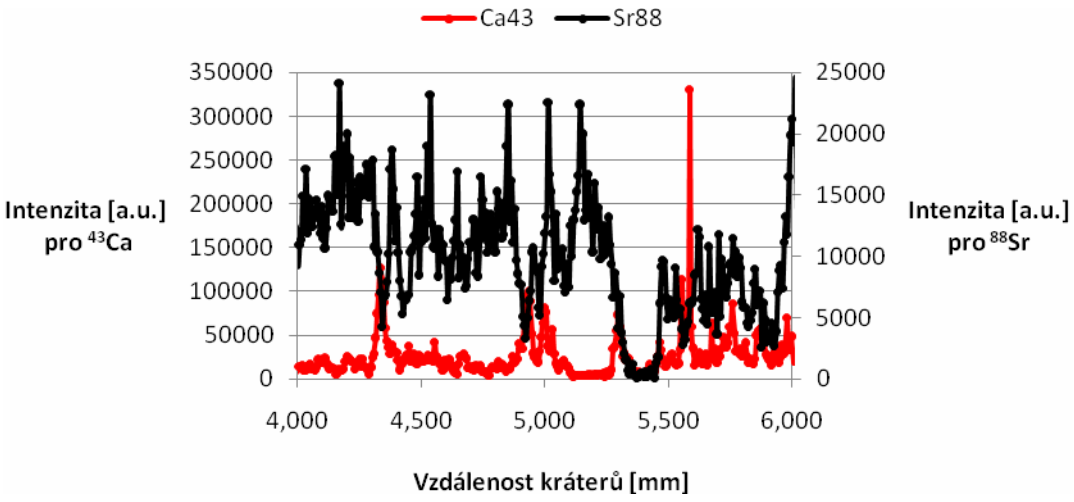
Obr. 3. **Analyzovaný vzorek 11684**



Obr. 4. **Graf znázorňující rozložení isotopu ^{12}C a ^{31}P v 37. linii močového kamene 11684**



Obr. 5. **Graf znázorňující rozložení isotopů ^{24}Mg, ^{43}Ca a ^{31}P v 42. linii močového kamene 11684**



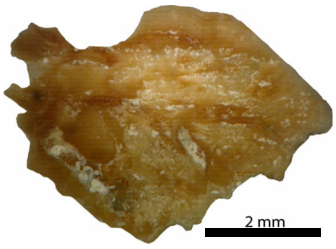
Obr. 6. **Graf znázorňující rozložení isotopů ^{88}Sr a ^{43}Ca v 20. linii močového kamene 11684**

ment 11726 (obr. 7). Mapy jsou zhotoveny z 59 linií vzdálených od sebe 0,1 mm.

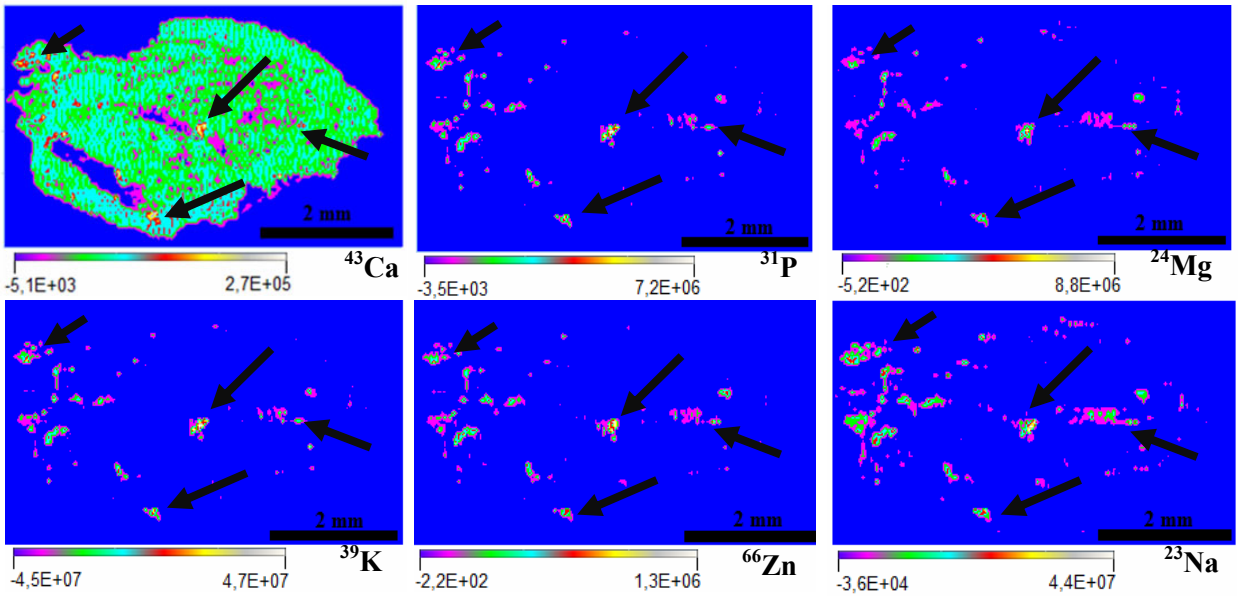
V úlomku tohoto močového konkrementu můžeme pozorovat korelaci některých prvků.

Jako matricový prvek lze zvolit vápník, který je rozložen téměř homogenně. Pokles intenzit v 2D mapě vápníku je způsoben pórovitou strukturou vrstvy močového konkrementu.

Pokud se podíváme na rozložení jednotlivých prvků, je zde jistá korelace. Korelace mezi vápníkem a fosforem



Obr. 7. **Analyzovaný vzorek 11726**



Obr. 8. **Intenzitní 2D mapy pro vzorek 11726**

je lehce vysvětlitelná, protože se jedná o hlavní složky apatitů. Stejně je tomu i u korelace mezi hořčíkem a fosforem, což jsou složky struvitů. Ovšem je zajímavé, že bychom očekávali vyšší intenzitu u hořčíku. Pravděpodobně byla v moči vysoká koncentrace vápníku, což zapříčinilo vazbu na anion kyseliny fosforečné místo hořčíku. Z literatury[10] se potvrdily korelace mezi isotopy prvků sodík-fosfor, sodík-draslík, sodík-zinek, zinek-fosfor, zinek-draslík. Pravděpodobně se jedná o prvky, které jsou v asociaci s apatity (obr. 8).

Závěr

Metoda LA-ICP-MS se ukázala jako vhodná pro mapování prvků v biominerálech, jako jsou močové konkrementy. Je zkoumána závislost obsahu stopových prvků a těžkých kovů v závislosti na matricových prvcích. Výsledky získané metodou infračervené spektrometrie byly potvrzeny i 2D mapováním pomocí LA-ICP-MS. Tyto výsledky budou doplněny výsledky dalších metod, a to elektronové mikrosondy, Ramanovy spektrometrie a roztokových metod, a dle chorobopisu pacientů budou podkladem pro komplexní zhodnocení příčin vzniku a růstu močových konkrementů. Bylo zde ukázáno, že LA-ICP-MS může být použita přímo, nebo současně s jinou metodou, pro výzkum biominerálů.

Děkujeme Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za výzkumné projekty ME08002 a MSM0021622412.

LITERATURA

1. Fang X., Ahmad S. R., Mayo M., Iqbal S.: Lasers Med. Sci. *20*, 132 (2005).
2. Kasidas G. P., Samuell C. T., Weir T. B.: Ann. Clin. Biochem. *41*, 91 (2004).
3. Wandt M. A. E., Underhill L. G.: Br. J. Urol. *61*, 474 (1988).
4. Moroz T. N., Palchik N. A., Dar'in A. V.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A *603*, 141 (2009).
5. Carmona P., Bellanato J., Escolar E.: Biospectroscopy *3*, 331 (1997).
6. Tunney M. M., Bonner M. C., Keane P. F.: Biomaterials *17*, 1025 (1996).
7. Perk H., Serel T. A., Kosar A.: Urol. Int. *68*, 286 (2002).
8. Singh V. K., Rai A. K., Rai P. K.: Lasers Med. Sci. *24*, 749 (2009).
9. Chaudhri M. A., Watling J., Khan F. A.: J. Radioanal. Nucl. Chem. *271*, 713 (2007).
10. Abboud I. A.: Jordan J. Earth Environ. Sci. *1*, 73 (2008).

ELEKTROCHEMICKÉ STUDIUM DEGRADACE PŘÍRODNÍCH BARVIV POUŽÍVANÝCH NA UMĚLECKÝCH PAMÁTKÁCH

ŠÁRKA RAMEŠOVÁ[a,b], ROMANA SOKOLOVÁ[b] a KAROLINA PECKOVÁ[a]

[a] *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř environmentální elektrochemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2,*
[b] *Ústav Fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8*
sarka.tce@seznam.cz

Úvod

Předmětem této práce je studium oxidace flavonoidů, které se používaly již od počátku 16. století jako přírodní barviva pro barvení tapisérií a dalších uměleckých děl. Jejich zástupci jsou quercetin, luteolin a apigenin (obr. 1), které se vyskytují v bylinách (smetanka lékařská, srpice barvířská) a stromech (dub černý) pocházejících ze Severní Ameriky[1]. Působením vnějších vlivů a procesů stárnutí se originální barva, ale i samotný textilní materiál, často mění a porušuje vlákna uměleckého díla.

Byla studována oxidace quercetinu elektrochemickými metodami ve vodném prostředí. Oxidační produkty po elektrolýze byly identifikovány pomocí analytických metod HPLC-DAD a LC-MS. Při oxidaci hraje důležitou úlohu přítomnost vodíkových iontů v roztoku. V literatuře se vyskytuje mnoho rozdílných hodnot disociační konstanty quercetinu. Tento rozptyl je dán nestabilitou quercetinu ve vodném prostředí za přítomnosti vzdušného kyslíku. Jedním z cílů bylo tudíž stanovení disociační konstanty v inertní atmosféře.

Experimentální část

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon), luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavon) a apigenin (3',5,7-trihydroxyflavon) byly zakoupeny od firmy Fluka (Německo). Pro přípravu základních elektrolytů byly použity chemikálie: H_3PO_4 (Lachema, Brno, ČR), CH_3COOH (Lachema, Brno, ČR), H_3BO_3 (Sigma-Aldrich, min 99,5%, ČR), NaOH (Lachema, Brno, ČR), ethanol (AppliChem, Německo), KCl (Lachema, Brno, ČR), KOH (Lachema, Brno, ČR). Brittonovy-Robinsonovy pufry v rozmezí pH 1,9–11,4 byly připraveny z 0,04 M základních roztoků H_3PO_4, CH_3COOH, H_3BO_3 a 0,2 M-NaOH. Všechny chemikálie byly použity bez dalšího čištění.

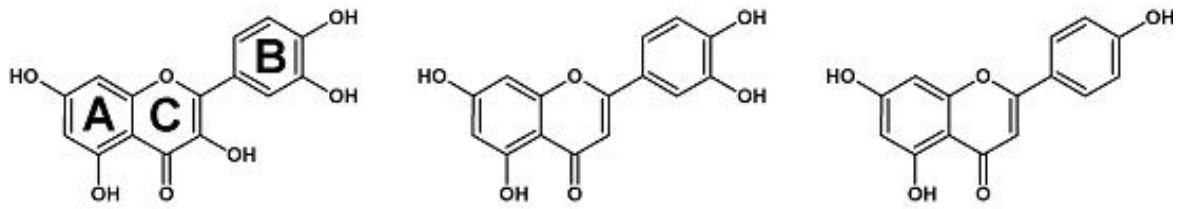
Elektrochemické techniky byly kombinovány se separačními technikami a absorbční spektrofotometrií. Pro elektrochemická měření byl použit rychlý potenciostat s elektrochemickou celou v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektrody byly použity platinová mikroelektroda a elektroda ze skelného uhlíku. Referentní argentchloridová elektroda Ag|AgCl|1M LiCl byla oddělena od roztoku elektrolytu solným můstkem. Jako pomocná elektroda byla použita platinová síťka. Elektrolýza a coulometrie při konstantním potenciálu byla prováděna na potenciostatu Autolab PGStat 30 (Ecochemie, Holandsko).

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru HP 8452A (Hewlett Packard, USA) s křemennými kyvetami s tloušťkou absorbující vrstvy 1 cm. Pro měření pH byl použit pH-metr pH 340 s kombinovanou skleněnou elektrodou (WTW, Německo). Všechna spektrofotometrická měření a titrační stanovení byla prováděna v inertní atmosféře argonu. Při titraci byly použity acidobazické indikátory fenolftalein a bromthymolová modř (Lachema).

Produkty elektrolýzy byly identifikovány metodou HPLC na přístroji Waters 1525μ Binary HPLC pump s detektorem Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector a Waters® Quattro PremierTM (Waters, Velká Británie), kolona HyPurity C8, 150 × 3 mm, 5 μm (Thermo, USA).

Výsledky a diskuse

Molekula quercetinu obsahuje ve své chemické struktuře pět hydroxylových skupin (obr. 1). Porovnáním elek-



quercetin luteolin apigenin

Obr. 1. **Chemická struktura quercetinu, luteolinu a apigeninu**

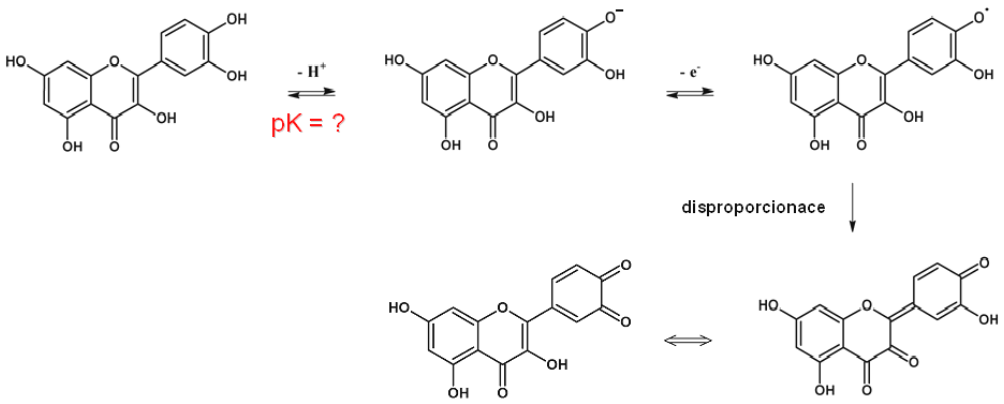
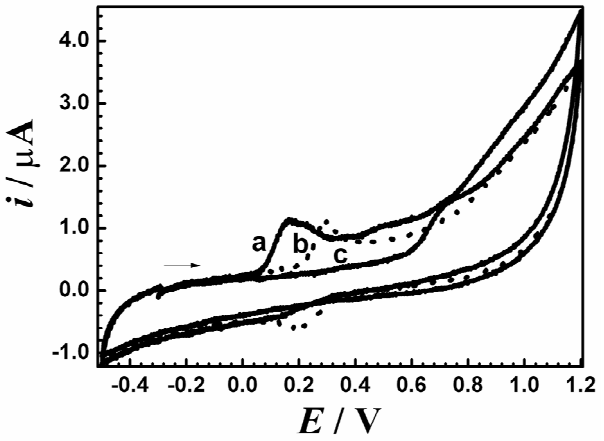


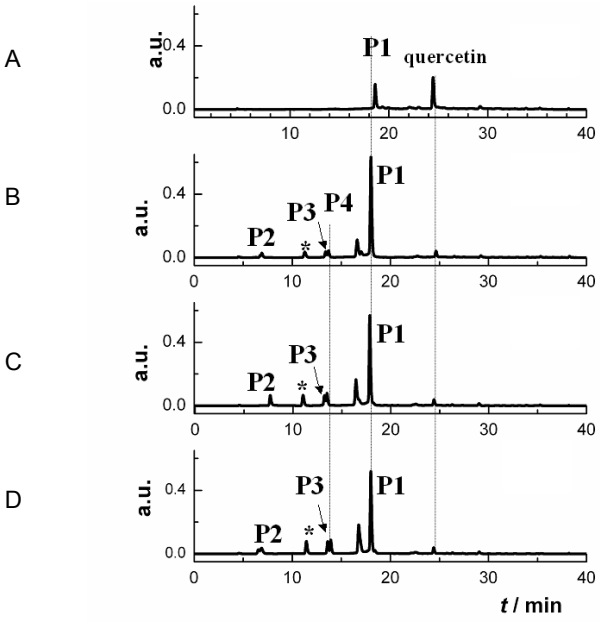
Schéma 1. **Mechanismus oxidace quercetinu**

trochemických vlastností chemicky příbuzných látek, tj. luteolinu a apigeninu, lze určit elektroaktivní místo v molekule quercetinu. Cyklická voltametrie quercetinu na elektrodě ze skelného uhlíku vykazuje tři oxidační vlny v rozmezí potenciálu –0,5 až 1,2 V (křivka a, obr. 2). Cyklický voltamogram strukturně podobného luteolinu, který má pouze čtyři hydroxylové skupiny, vykazuje pouze dvě oxidační vlny (křivka b, obr. 2). Je patrné, že druhá oxidační vlna quercetinu u 0,5 V souvisí s přítomností C3-OH, tj. hydroxylové skupiny na kruhu C, která u luteolinu chybí. Apigenin obsahuje pouze tři hydroxylové skupiny a oxiduje se při nejvyšším potenciálu ze studovaných látek. Porovnáním cyklických voltamogramů lze říci, že první oxidační vlna quercetinu a luteolinu je způsobena oxidací 3',4'-dihydroxybenzylu v jejich molekule[2,3]. K oxidaci hydroxylových skupin na kruhu A v molekule quercetinu dochází při hodnotách potenciálu vyšších než 0,6 V obdobně jako u apigeninu.

První oxidační vlna quercetinu je jednoelektronová a quasireverzibilní. S rostoucí hodnotou pH dochází k posunu potenciálu všech oxidačních vln k nižším hodnotám. Z toho je patrné, že při celkovém mechanismu oxidace hraje důležitou úlohu disociace hydroxylových skupin (schéma 1). Chinon vznikající disproporcionací podléhá



Obr. 2. **Cyklický voltamogram na elektrodě ze skelného uhlíku pro 0,2 mM a) quercetin, b) luteolin, c) apigenin ve směsi Brittonův – Robinsonův pufr pH 6,9 a ethanol (3:2; v/v).** Rychlost polarizace 0,25 V s^{-1}



Obr. 3. **LC-MS quercetinu v závislosti na době vystavení roztoku přístupu vzdušného kyslíku.** A) 10 min, B) 50 min, C) 90 min, D) 130 min, *) nečistota z kolony

Tabulka I
Oxidační produkty quercetinu

Označení	Látka	Molekulová hmotnost	*m*/*z*
P1	2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-on	318	317 [M-1]
P2	2-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-oxooctová kyselina	182	181 [M-1]
P3	2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina	170	169 [M-1]
P4	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	154	153 [M-1]

hydroxylaci a následné chemické reakci za vzniku 2-(3,4--dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3-onu (P1, tabulka I).

Hodnoty pK_1 uvedené v literatuře[4–7] se výrazně liší: 5,7; 7,03; 7,7 a 8,21. Proto byla studována stabilita quercetinu ve vodném prostředí. Bylo zjištěno, že quercetin podléhá rozkladu za přístupu vzdušného kyslíku. Tento jev byl sledován LC-MS analýzou. Roztok quercetinu byl vystaven působení kyslíku po dobu 130 min. Během této doby bylo sledováno zastoupení oxidačních produktů (obr. 3). Degradační produkty jsou shrnuty v tabulce I. Hlavní oxidační produkt P1 se vlivem přítomnosti kyslíku rozkládá na řadu dalších hydroxyderivátů (P2-P4).

Hodnota disociační konstanty byla určena spektrofotometricky z absorpčních spekter quercetinu. Předem vybublané roztoky byly převedeny do kyvety za inertní atmosféry. Za inertní atmosféry byla prováděna také titrační stanovení ve speciálně upravené aparatuře. Byla zjištěna hodnota $pK_1 = 5{,}87 \pm 0{,}14$.

Závěr

Při řešení oxidačního mechanismu byly elektrochemické techniky kombinovány se spektrofotometrií a produkty elektrolýz byly analyzovány metodami HPLC a GC-MS. Při oxidaci v inertní atmosféře vzniká hlavní oxidační produkt 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-on. Tento produkt se v přítomnosti vzdušného kyslíku rozkládá na další hydroxysloučeniny.

Byla stanovena hodnota disociační konstanty quercetinu dvěma nezavislými metodami. Jak ukázalo studium vlivu kyslíku na absorpční spektrum, je nezbytné provádět měření v inertní atmosféře. Tím lze vysvětlit výrazně rozdílné hodnoty pK_1 nalezené v literatuře.

Tento výzkum byl finančně podporován z projektů GA ČR 203/09/1607 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857). Dále bych poděkovala Janu Žabkovi za vedení při práci na LC-MS.

LITERATURA

1. Colombini M. P., Andreotti A., Baraldi C., Degano I., Łucejko J. J.: Microchem. J. *85*, 174 (2007)
2. Zare H. R., Namazian M., Nasirizadeh N.: J. Electroanal. Chem. *584*, 77 (2005).
3. Hendrickson H. P., Kaufman A. D., Lunte C. E.: J. Pharm. Biomed. Anal. *12*, 325 (1994).
4. Escandar G. M., Sala L. F.: Can. J. Chem. *69*, 1994 (1991).
5. Milane H. A., Ubeaud G., Vandamme T. F., Jung L.: Bioorg. Med. Chem. *12*, 3627 (2004).
6. Georgievskii V. P.: Chem. Nat. Compd. *16*, 136 (1980).
7. Sauerwald N., Schwenk M., Polster J., Bengsch E.: Z. Naturforsch. *53*, 315 (1998).

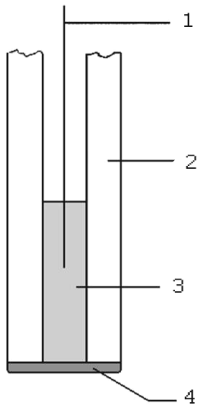
ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ 5-NITROCHINOLINU POMOCÍ UHLÍKOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

TEREZA RUMLOVÁ, IVAN JIRÁNEK a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
rumlova@natur.cuni.cz

Úvod

Studovaná látka 5-nitrochinolin (5-NQ) patří mezi nitrované aromatické heterocyklické sloučeniny a je řazena mezi cytotoxické látky[1,2]. Heterocyklické sloučeniny jsou doposud méně prostudovány než nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky, ale jejich chování je analogické a způsob vzniku i výskyt obou skupin látek je podobný. Vznikají zpravidla při spalování organické hmoty, s čímž souvisí i jejich výskyt v životním prostředí (emise, dehet, apod.)[3]. 5-NQ je žlutá krystalická látka, dobře rozpustná v organických rozpouštědlech, ale i ve vodě. Za normálních podmínek je stabilní[4]. Skupina chinolinů je široce využívána jako základní směs k výrobě léčiv, fungicidů, biocidů, alkaloidů a barviv. Vykazují antiseptické a antipyretické účinky. Chinoliny jsou také užívány jako katalyzátory, látky zabraňující korozi a jako příměs do roztoků pro pryskyřice a terpeny[5]. Elektrochemicky byl 5-NQ stanoven v rámci studie Tachibany, Kawazoe a spol., kteří se zabývali polarografií nitrochinolinů a jejich derivátů[6]. Byly proměřeny redukční půlvlnové potenciály u 35 různých nitrochinolinů. Studiem mechanismu redukce nitrochinolinů a jejich derivátů se zjistilo, že první dobře definovaná vlna zahrnující výměnu 4 elektronů je pozorovatelná od -0,1 V až k -0,5 V a odpovídá redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu u všech studovaných nitrochinolinů. Další dvě vlny, spojené s následnou redukcí na aminoskupinu a deoxidací *N*-oxidové skupiny (u derivátů s *N*-oxidovou skupinou), jsou výrazně vzdáleny od první a odpovídají výměně 2 elektronů. Půlvlnové potenciály jsou silně závislé na pH (cit.[6]). Chinolinový skelet je elektrochemicky redukovatelný, dochází u něj k redukci na dihydro- a následně na tetrahydrochinolin ve dvou dvouelektronových vlnách[7]. V rámci separačních a spektrálních metod byl 5-NQ detegován, spolu se skupinou nitrovaných polyaromatických uhlovodíků, pomocí HPLC na reverzní fázi v mobilní fázi acetonitril-voda. Porovnávány byly tři druhy detekce, a to detekce pomocí diodového pole (UV/VIS), fluorescenční a chemiluminescenční. Při použití diodového pole bylo dosaženo detekčních limitů 2 až 12 ng nastříknuté látky. Fluorescenční a chemiluminescenční detekce vykazovala větší citlivost, bylo dosaženo detekcí mezi 10 až 15 pg pro monosubstituované nitrosloučeniny[8]. Plynovou chromatografií byly studovány retenční charakteristiky 56 nitrovaných aromatických sloučenin, včetně 5-NQ, s použitím křemenné kapiláry[9]. Byla rovněž vyvinuta metoda extrakce na tuhou fázi na kolonkách plněných silikagelem s vázanou kyanopropylovou skupinou, díky níž lze rozdělovat miligramová množství organických polárních látek, včetně 5-NQ (cit.[10]).



Obr. 1. **Schéma uhlíkové filmové elektrody (CFE);** elektrický kontakt (1); skleněná kapilára (2); Ag amalgám (3); uhlíkový film (4)

Jako uhlíková filmová elektroda (CFE) je označován uhlíkový film nanesený na pevnou elektrodu (v tomto případě stříbrnou tuhou amalgámovou elektrodu, AgSAE) s níž je vodivě spojen[11]. Pevná elektroda zde slouží pouze jako vodič a elektrochemické vlastnosti elektrody jsou dány uhlíkovým materiálem filmu. Mezi přednosti této elektrody patří velké potenciálové okno v anodické i katodické oblasti (cca 3 V), vysoká citlivost a nízký šum měření. Velkými výhodami této elektrody jsou také rychlá a snadná obnovitelnost filmu, fakt, že elektroda je schopná po lehkém upravení vykazovat vlastnosti mikroelektrody, a v neposlední řadě ekonomická nenáročnost a nízká zátěž pro životní prostředí[12]. Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení submikromolárních koncentrací 5-NQ použitím moderních voltametrických metod a prokázat použitelnost CFE pro stanovení 5-NQ na základě katodické redukce přítomné nitroskupiny.

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztok 5-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním 0,01742 g čisté látky (99%, Sigma-Aldrich) ve 100 ml deionizované vody pomocí ultrazvukové lázně. Roztoky o nižších koncentracích byly připravo-

vány přesným ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou. Veškeré roztoky byly uchovávány při laboratorní teplotě ve tmě, ve skleněných nádobách.

Brittonovy–Robinsonovy tlumivé roztoky (BR pufry) o příslušném pH byly připravovány smísením 0,2 mol l^{-1} NaOH s roztokem obsahujícím směs kyseliny borité, fosforečné a octové, každé o koncentraci 0,04 mol l^{-1} (vše v čistotě p.a., Lachema Brno). Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore, Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Aparatura

Při voltametrických měřeních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1. (PolaroSensors, Praha). Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Jako měrná elektroda byla použita uhlíková filmová elektroda (viz obr. 1), připravená postupem popsaným v práci[12], jako referentní byla použita argentchloridová elektroda typu RAE 113 (1 mol l^{-1} KCl, Monokrystaly, Turnov) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (Monokrystaly, Turnov).

Pro měření průtokové injekční analýzy byl elektrochemický wall-jet detektor tvořen přepadovou nádobkou, která obsahovala nosný roztok. Pracovní elektroda byla fixována proti ústí výtokové trubičky. Jednotlivá měření byla prováděna obdobně jako u voltametrie v tříelektrodovém zapojení. Pro elektrochemickou detekci byl použit ampérometrický detektor ADLC 1 (Laboratorní přístroje, Praha). Pro spektrofotometrickou detekci byl použit detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Praha). Signál byl sledován při vlnové délce 318 nm. Jako pumpa bylo použito lineární vysokotlaké čerpadlo HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha). Měření probíhalo za použití softwaru Clarity Lite (DataApex, USA).

Pracovní postupy

Při voltametrických měřeních byly roztoky o příslušné koncentraci připravovány v odměrných baňkách, v kterých byl odpovídající objem zásobního rozotku 5-NQ doplněn BR pufrem o příslušném pH do 10 ml.

Pro přímá stanovení ve vodě byly roztoky o příslušných koncentracích připravovány v 10 ml pitné a říční vody jako modelové metrice. Následně bylo odebráno 9 ml tohoto roztoku a doplněno BR pufrem o pH 11,0 do 10 ml.

Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Z měřených roztoků byl odstraňován kyslík probublávání dusíkem po dobu 5 minut.

Výšky píků 5-NQ byly vyhodnocovány od spojnice minim před a za měřeným píkem. Mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočítána podle vztahu LOQ = 10σ/a, kde σ je směrodatná odchylka deseti po sobě jdoucích měření nejnižší měřitelné koncentrace, a a je směrnice kalibrační závislosti v rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1}.

Výsledky a diskuse

Stálost zásobního roztoku

Stálost zásobního roztoku byla sledována spektrofotometrickým měřením absorbance v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm v průběhu 5 měsíců. Během této doby nedošlo k žádným statisticky významným změnám v hodnotách absorbance zásobního roztoku.

Regenerace

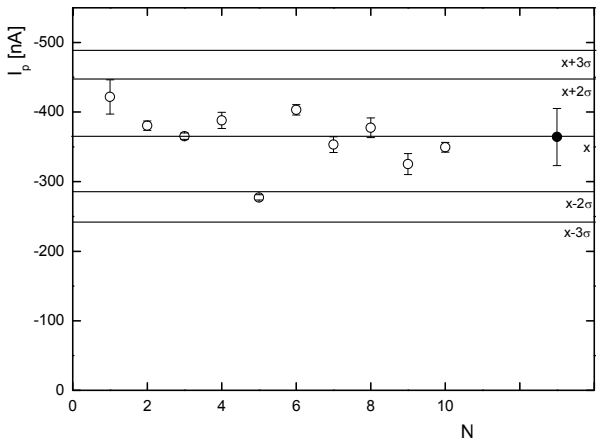
Pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) byla provedena studie závislosti výšky píku stanovení 5-NQ (c = 1·10^{-5} mol l^{-1}) na počtu měření při použití různých regeneračních potenciálů v prostředí BR pufru o pH 11,0 (optimalizováno metodou DPV). Na elektrodu byly vkládány různé regenerační potenciály E_{in} a E_{fin}. Bylo též testováno měření bez regenerace a s vloženým nulovým potenciálem (tzn. E_{in} = 0 mV, E_{fin} = 0 mV). Pro každé testované podmínky bylo provedeno 10 měření. Cílem bylo nalézt takové podmínky, při kterých by bylo dosaženo co nejlepší opakovatelnosti měření. Regenerační potenciály byly vybírány systematicky v rámci potenciálového okna CFE. Vzhledem k tomu, že se jedná o stanovení na základě katodické redukce 5-NQ, bylo pracováno v katodické části potenciálového okna CFE. Jednotlivé dvojice potenciálů E_{in} a E_{fin} byly po otestování zaměněny, aby se zjistilo, zda záměna ovlivní regeneraci. Nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo při vložení nulového potenciálu, kde relativní směrodatná odchylka (RSD) byla 0,7 %. Optimalizované podmínky regenerace byly použity pro další měření.

Opakovatelnost měření a obnovitelnosti filmu

Při zvolených podmínkách regenerace byla testována opakovatelnost měření a opětovného obnovení filmu. Byla měřena série deseti po sobě jdoucích DPV stanovení 5-NQ (c = 1·10^{-5} mol l^{-1}) na CFE na deseti různých filmech stejného složení. Měření bylo prováděno v prostředí BR pufru o pH 11,0. Z jednotlivých sérií měření byly vypočítány průměry proudu píku a vyneseny do regulačního diagramu v závislosti na pořadovém číslu filmu (N). Jelikož devět z deseti měření nepřekročilo první regulační mez (tzv. varovnou), byla opakovatelnost obnovení filmu považována za uspokojivou (obr. 2). Parametry získané na různých filmech byly mezi sebou porovnány, aby byla zjištěna statistická variabilita opakovatelnosti měření při obnovování filmu. Lze konstatovat, že RSD nepřekročila 6 % a průměrně se pohybovala okolo 3 %.

DC voltametrie 5-nitrochinolinu

U této metody byl nejprve sledován vliv pH prostředí na elektrochemické chování 5-nitrochinolinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na CFE v prostředí o pH 2,0 až 12,0. Látka poskytovala jeden pík v celém měřeném rozsahu pH. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 11,0, kde

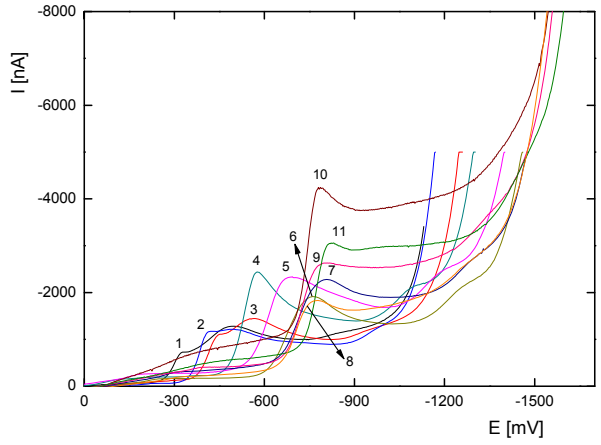


Obr. 2. **Závislost průměrů I_p 10-ti sérií DPV stanovení 5-NQ (c = 1·10^{-5} mol l^{-1}) měřených na různých filmech (pořadové číslo filmu N) na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0**

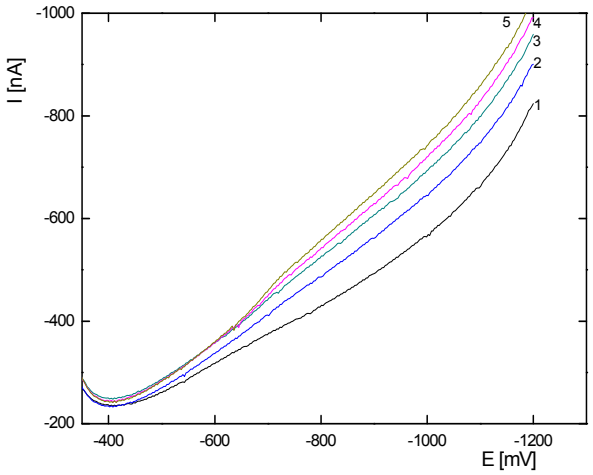
látka poskytovala nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Z obr. 3 je patrné, že potenciál píku nabývá s rostoucím pH záporněji hodnot. Zpracováním hodnot metodou lineární regrese byl získán vztah E [mV] = –87,31 pH – 137,75 (R = 0,9924), v rozmezí pH 2,0–7,0 a vztah E [mV] = –11,5 pH – 667 (R = 0,6559) a v rozmezí pH 8,0–12,0.

Koncentrační závislosti

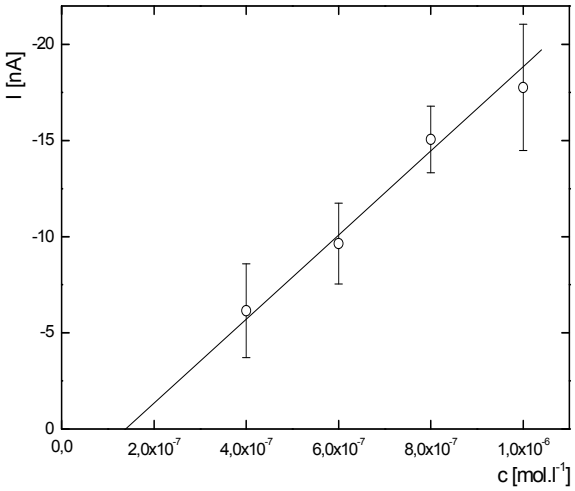
Koncentrační závislosti 5-NQ byly proměřeny metodou DC voltametrie (DCV) na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0 v koncentračním rozmezí (4–10)·10^{-7} mol l^{-1} (viz obr. 4), (2–10)·10^{-6} mol l^{-1} a (2–10)·10^{-5} mol l^{-1}. Měřené kalibrační závislosti byly lineární (viz obr. 5) v koncentračním rozmezí 4·10^{-7} až 6·10^{-5} mol l^{-1}, hodnoty směrnic v jednotlivých řádech v daném koncentračním rozmezí nevykazovaly významný rozptyl. Testované úseky nebyly statisticky významné na hladině významnosti 95 %. Při vysokých koncentracích analytu (8–10·10^{-5} mol l^{-1}) opakovaně docházelo k odchylce od přímky, tj. signál byl vyšší než by odpovídalo lineární závislosti. RSD deseti po sobě jdoucích stanovení při nejnižší měřitelné koncentraci (4·10^{-7} mol l^{-1}) byla 39,6 %. Pro nejvyšší koncentraci v lineárním dynamickém rozsahu (6·10^{-5} mol l^{-1}) byla RSD 3,7 %. Metodou DCV bylo dosaženo meze stanovitelnosti 1·10^{-6} mol l^{-1}.



Obr. 3. **Voltamogramy 5-NQ (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) měřené technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru** o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10); 12,0 (11)



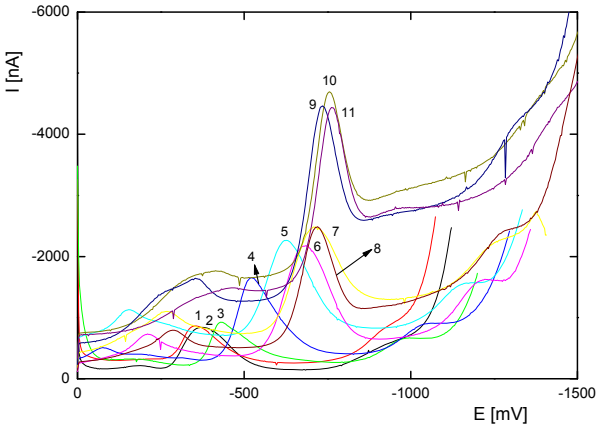
Obr. 4. **Voltamogramy 5-NQ měřené technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0.** Koncentrace 5-NQ: 0 (1); 4·10^{-7} (2); 6·10^{-7} (3); 8·10^{-7} (4); 10·10^{-7} (5) mol l^{-1}



Obr. 5. **Závislost proudu vlny I na koncentraci 5-NQ v rozmezí (4–10)·10^{-7} mol l^{-1}.** Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0

Diferenční pulsní voltametrie 5-nitrochinolinu

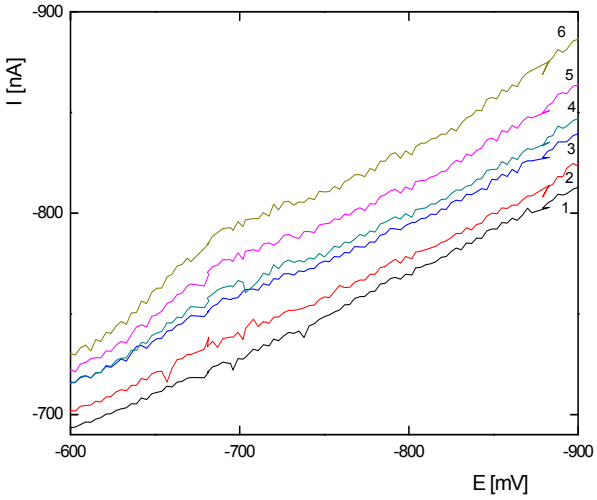
Obdobně jako u metody DCV byl nejprve sledován vliv pH na elektrochemické chování 5-NQ na CFE při pH 2,0 až 12,0 (viz obr. 6). Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 11,0, jelikož v tomto prostředí látka poskytovala nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. S rostoucím pH se potenciál píku posunuje do zápornějších hodnot. Zpracováním hodnot závislosti E_p na pH metodou lineární regrese byl získán vztah E_p [mV] = – 44,45 pH – 293,55 (R = – 0,9836) v rozmezí pH 2,0–7,0 a vztah E_p [mV] = –16,1 pH –571 (R = – 0,9228) a v rozmezí pH 8,0–12,0.



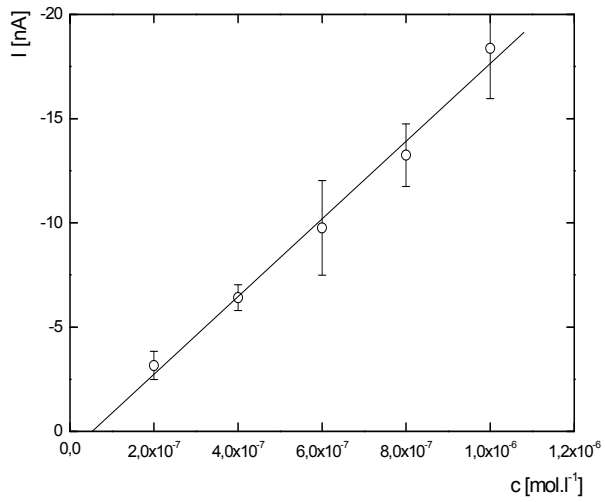
Obr. 6. **Voltamogramy 5-NQ (c = 1.10^{-4} mol l^{-1}) měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru** o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10); 12,0 (11)

Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti 5-NQ byly proměřeny metodou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0 v koncentračním rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1} (viz obr. 7), (2–10)·10^{-6} mol l^{-1} a (2 až 10)·10^{-5} mol l^{-1}. Měřené kalibrační závislosti byly lineární v koncentračním rozmezí 2·10^{-7} až 6·10^{-5} mol l^{-1} (viz obr. 8). Hodnoty směrnic v jednotlivých řádech v tomto koncentračním rozmezí navykazovaly významným rozptyl. Testované úseky nebyly statisticky významné na hladině významnosti 95 %. Při vysokých koncentracích analytu (8–10·10^{-5} mol l^{-1}) opakovaně docházelo k odchylce od přímky, což se projevovalo zvýšením signálu. RSD deseti po sobě jdoucích stanovení při nejnižší měřitelné koncentraci (2·10^{-7} mol l^{-1}) byla 10,4 %. Pro nejvyšší koncentraci v lineárním dynamickém rozsahu (c = 6·10^{-5} mol l^{-1}) byla RSD 2,3 %. Metodou DPV bylo dosaženo meze stanovitelnosti 4·10^{-7} mol l^{-1}.



Obr. 7. **Voltamogramy 5-NQ měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0.** Koncentrace 5-NQ: 0 (1); 2·10^{-7} (2); 4·10^{-7} (3); 6·10^{-7} (4); 8·10^{-7} (5); 10·10^{-7} (6) mol l^{-1}



Obr. 8. **Závislost proudu píku I_p na koncentraci 5-NQ v rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1}.** Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0

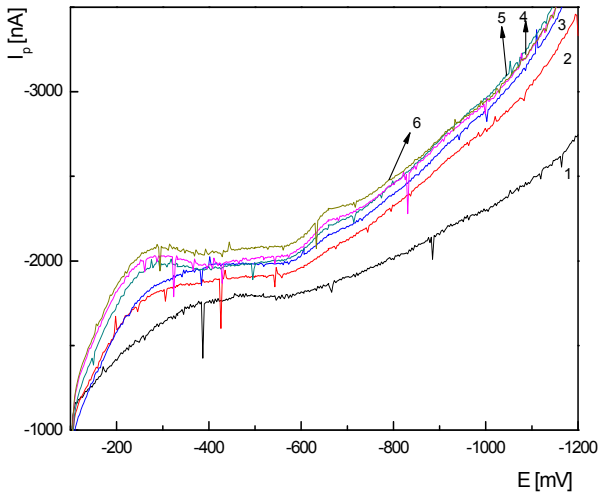
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Vzhledem k výsledkům dosažených metodou DPV bylo pro stanovení metodou AdSV na CFE zvoleno prostředí BR pufru o pH 11,0, při kterém se pík látky vyskytoval při E_p = –756 mV. Koncentrace 5-NQ byla 1·10^{-5} mol l^{-1}.

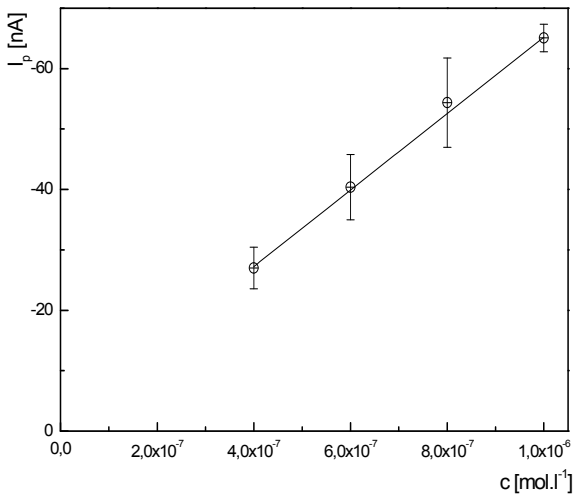
Byl proměřen vliv potenciálu akumulace E_{acc} na výšku píku I_p v rozmezí –100 až –650 mV v prostředí BR pufru o pH 11,0 s dobou akumulace t_{acc} = 60 s. Následně

byl proměřen vliv doby akumulace t_{acc} na výšku píku I_p pro t_{acc}= 0, 10, 3, 60, 90, 120, 180 a 300 s při zvoleném potenciálu akumulace E_{acc} = – 600 mV. Akumulace probíhala v míchaném roztoku a po jejím skončení byla dodržována klidová doba 10 s.

Při studium vlivu doby akumulace a potenciálu akumulace na výšku píku stanovované látky nebylo pozorováno významné zvýšení odezvy 5-NQ, které by umožňovalo snížení meze stanovitelnosti. Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $5\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}. Této problematice bude nutné věnovat další pozornost.



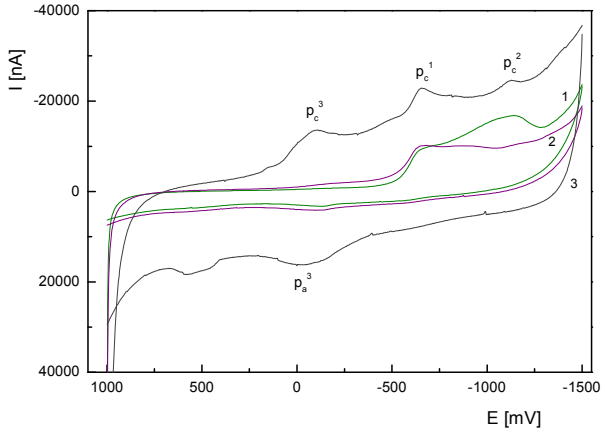
Obr. 9. **DP voltamogramy 5-NQ měřené technikou DPV na CFE v pitné vodě, BR pufru o pH 11,0.** Koncentrace 5-NQ: 0 (1) ; $2\cdot10^{-7}$ (2); $4\cdot10^{-7}$ (3); $6\cdot10^{-7}$ (4); $8\cdot10^{-7}$ (5); $10\cdot10^{-7}$ (6) mol l^{-1}



Obr. 10. **Závislost proudu píku I_p na koncentraci 5-NQ v rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1}.** Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 11,0

Cyklická voltametrie

Elektrochemické chování 5-NQ bylo studováno cyklickou voltametrií v kyselém (pH 2,0), neutrálním (pH 7,0) (viz obr. 11) a zásaditém (pH 12,0) prostředí. Cyklické voltamogramy byly zaznamenávány od pozitivnějšího k negativnějšímu potenciálu a zpět. První katodický pík p_c^1 odpovídá pravděpodobně čtyřelektronové redukci nitro skupiny na hydroxylaminovou skupinu. Druhý katodický pík p_c^2 odpovídá dvouelektronové redukci chinolinového skeletu na dihydrochinolin. Třetí katodický, resp. anodický pík p_c^3/p_a^3, který se vyskytuje až v pozdějších cyklech, odpovídá pravděpodobně dvouelektronové kvazireverzibilní redukci/oxidaci hydroxylamino skupiny na nitroso skupinu.



Obr. 11. **Cyklický voltamogram 5-NQ (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0.** Znázorněn 1. cyklus (1), 2. cyklus (2) a 24. cyklus (3)

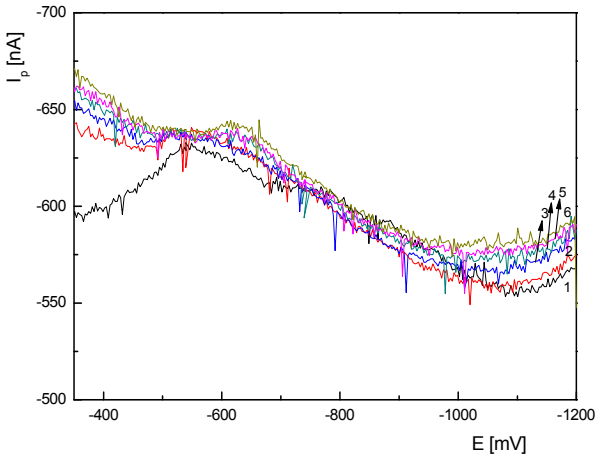
Přímé stanovení v pitné vodě

Vzhledem k předpokládané čistotě pitné vody, a tudíž nízké pravděpodobnosti výskytu píků nečistot, které by ovlivňovaly výsledky stanovení, byla prověřena možnost přímého stanovení 5-NQ.

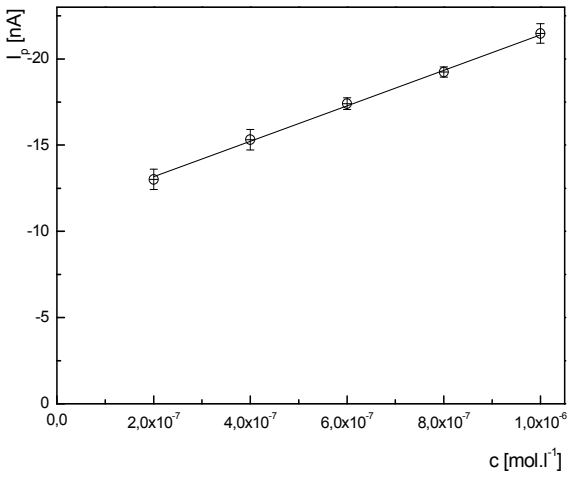
Pro stanovení byly připraveny roztoky o koncentracích v rozmezí $2\cdot10^{-7}$ až $1\cdot10^{-5}$ mol l^{-1} smísením 9 ml vzorku pitné vody, obsahující danou koncentraci 5-NQ, doplněné v odměrné baňce roztokem 0,01 mol l^{-1} NaOH na 10 ml. V tomto případě nemohl být použit BR pufr obsahující kyselou složku, jelikož při použití pitné vody docházelo ke tvorbě sraženin.

Připravený roztok byl převeden do voltametrické nádobky a promíchán. Následně byl roztok probublán dusíkem a zaznamenán voltamogram.

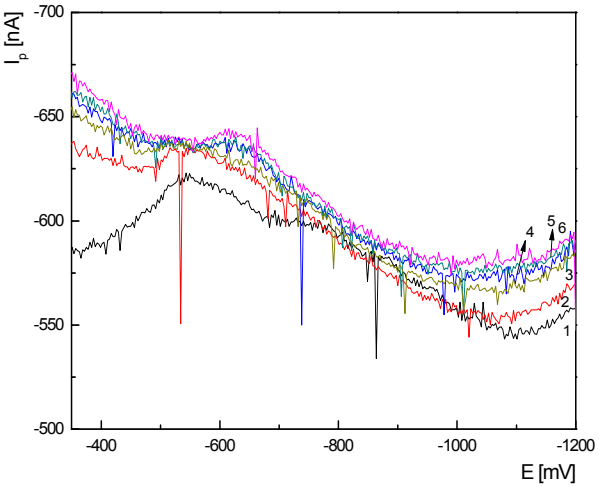
Touto metodou (DPV) bylo dosaženo meze stanovitelnosti 5-NQ v pitné vodě $5{,}6\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}. Odpovídající voltamogramy a kalibrační závislosti jsou uvedeny na obr. 9, 10, 13 a 14.



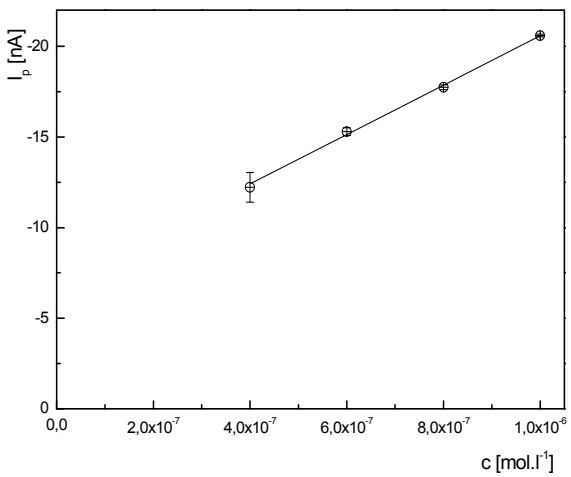
Obr. 12. **DP voltamogramy 5-NQ měřené technikou DPV na CFE v prostředí pitná voda – 0,01 mol l^{-1} NaOH (9:1).** Koncentrace 5-NQ: 0 (1); 2·10^{-7} (2); 4·10^{-7} (3); 6·10^{-7} (4); 8·10^{-7} (5); 10·10^{-7} (6) mol l^{-1}



Obr. 13. **Závislost proudu píku I_p na koncentraci 5-NQ v rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1}.** Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí pitná voda – 0,01 mol l^{-1} NaOH (9:1)



Obr. 14. **DP voltamogramy 5-NQ měřené technikou DPV na CFE v prostředí říční voda – 0,01 mol l^{-1} NaOH (9:1).** Koncentrace 5-NQ: 0 (1) ; 2·10^{-7} (2); 4·10^{-7} (3); 6·10^{-7} (4); 8·10^{-7} (5); 10·10^{-7} (6) mol l^{-1}



Obr. 15. **Závislost proudu píku I_p na koncentraci 5-NQ v rozmezí (2–10)·10^{-7} mol l^{-1}.** Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí říční voda – 0,01 mol l^{-1} NaOH (9:1)

Přímé stanovení v říční vodě

Pro stanovení byla odebrána voda z řeky Vltavy v oblasti Výtoně. Voda byla odebírána z úrovně hladiny.

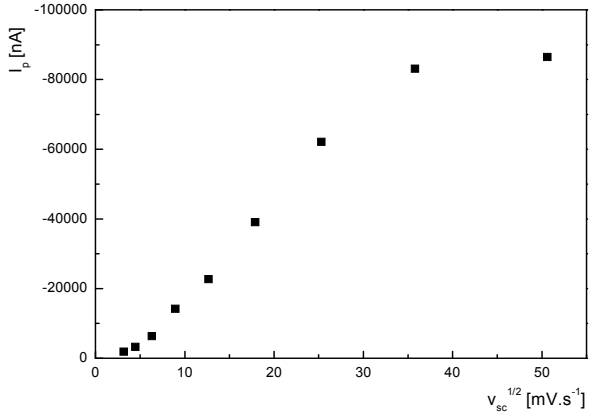
Říční voda byla přefiltrována přes fritu S4. Následně bylo postupováno jako při stanovení ve vodě pitné. Byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí (2–10)·10^{-6} mol l^{-1} a (2–10)·10^{-7} mol l^{-1} 5-NQ v říční vodě.

Stanovením v říční vodě bylo dosaženo meze detekce 6·10^{-7} mol l^{-1}. Odpovídající voltamogramy a kalibrační závislosti jsou uvedeny na obr. 14 a 15.

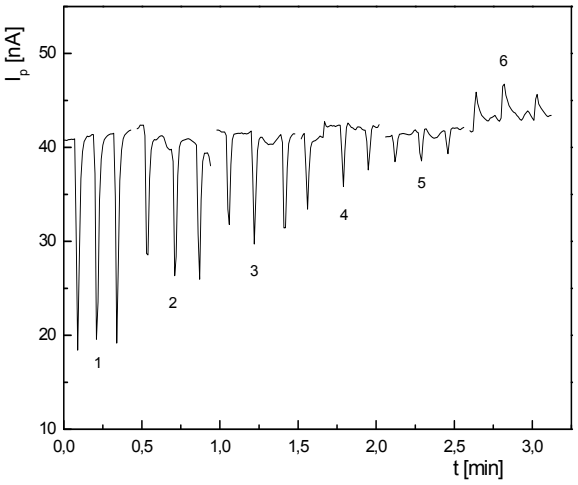
Ověření difuzního charakteru limitního proudu

Difuzní charakter byl ověřován cyklickou voltametrií v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí BR pufru. Rychlost skenu byla při měření měněna vždy na dvojnásobnou hodnotu než u měření předchozího v rozmezí 10–2560 mV s^{-1}.

Redukce je řízena difuzí v případě, že je závislost lineární a prochází počátkem os souřadnic. V žádném ze studovaných prostředí nebyla pozorována linearita (viz obr. 16), tudíž redukce 5-NQ na CFE nebyla řízena difuzí.



Obr. 16. **Závislost velikosti proudu píku I_p 5-NQ na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc}.** Měřeno metodou CV na CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0

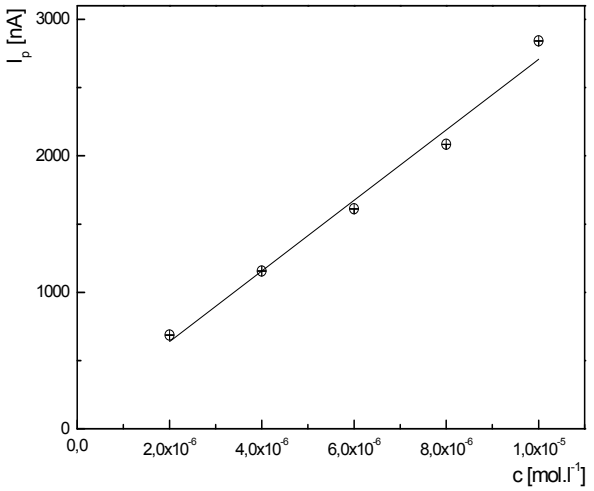


Obr. 17. **Záznam píků FIA stanovení 5-NQ s elektrochemickou detekcí, nosný roztok BR pufr o pH 11,0.** Koncentrace 5-NQ: 0 (1) ; $2\cdot10^{-6}$ (2); $4\cdot10^{-6}$ (3); $6\cdot10^{-6}$ (4); $8\cdot10^{-6}$ (5); $10\cdot10^{-6}$ (6) mol l^{-1}

Průtoková injekční analýza

Pro stanovení 5-NQ v průtoku s elektrochemickou detekcí na CFE bylo použito optimalizované prostředí z voltametrických metod, tzn. jako nosný roztok byl použit BR pufr o pH 11. Pro porovnání byla použita i UV detekce. V rámci optimalizace metody byl nejprve zjišťován vliv polarizačního potenciálu vkládaného na elektrodu na odezvu elektrochemického detektoru v rozsahu –400 až –1600 mV. Jako optimální byl zvolen potenciál –1400 mV, při němž byl pík nejvyšší a nejlépe vyvinutý. Následně byl měřen vliv průtokové rychlosti nosného roztoku na odezvu elektrochemického detektoru a UV detektoru v rozsahu 0,5 až 9 ml min^{-1}. Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost 4 ml min^{-1}. Dále byl měřen vliv dávkovaného objemu na odezvu elektrochemického a UV detektoru. Proměřeny byly smyčky 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 a 1000 µl. Jako optimální byla zvolena velikost dávkovaného objemu 50 µl. Při volbě průtokové rychlosti a velikosti dávkovaného objemu bylo přihlíženo jak k tvaru a výšce píku, tak i ke spotřebě nosného roztoku a vzorku. Dále byla proměřena opakovatelnost signálu elektrochemického detektoru 20 po sobě jdoucích nástřicích. Opakovatelnost byla považována za uspokojivou.

Kalibrační závislosti byly proměřovány v rozmezí řádů 10^{-6} a 10^{-5} mol l^{-1}. Touto metodou bylo dosaženo meze stanovitelnosti $1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1} (viz obr. 17 a 18) .



Obr. 18. **Závislost proudu píku I_p na koncentraci 5-NQ v rozmezí (2-10)·10^{-6} mol l^{-1}.** Měřeno technikou FIA v prostředí BR pufru o pH 11,0

Závěr

V rámci této práce byly vypracovány DCV a DPV metody stanovení 5-NQ na CFE s mezemi stanovitelnosti $1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1} u DCV a $4\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} u DPV. Byla provedena optimalizace podmínek. Díky relativně dobré rozpustnosti 5-NQ bylo možné pracovat v čistě vodném prostředí. Látka poskytovala u obou metod 1 pík (vlnu) v celém rozsahu pH (2,0–12,0). Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru pH 11,0, kde látka poskytovala nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný signál.

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozsahu $2\cdot10^{-7}$ – $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1} u DPV a $4\cdot10^{-7}$ – $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1} u DCV. Lineární dynamický rozsah u metod byl následující: DPV: $2\cdot10^{-7}$ – $6\cdot10^{-5}$ mol l^{-1}; DCV: $4\cdot10^{-7}$ – $6\cdot10^{-5}$ mol l^{-1}. Při vysokých koncentracích analytu ($8\cdot10^{-5}$ – $1\cdot10^{-4}$ mol l^{-1}) docházelo u obou metod, z ne zcela jasného důvodu, opakovaně k nelineárnímu nárůstu proudu píku

(vlny). Nárůst může souviset například s adsorpcí analytu na povrch elektrody.

Metodou DPV byla prověřena možnost stanovení 5-NQ v pitné a říční vodě. V těchto matricích bylo dosaženo mezí stanovitelnosti, pro pitnou vodu $5{,}6\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} a pro říční vodu $6\cdot10^{-7}$ mol l^{-1}.

Byla též provedena optimalizace regeneračních podmínek CFE, v jejímž rámci byly zvoleny následující podmínky: $E_{reg} = 0$ mV, $t_{reg} = 150$ s.

Dále byla testována opakovatelnost stanovení při zvolených podmínkách sérií deseti stanovení na deseti různých filmech. Relativní směrodatná odchylka jednotlivých sérií deseti měření nepřesahovala 6 % a průměrně dosahovala hodnoty 3 %. Relativní směrodatná odchylka průměrů stanovení mezi jednotlivými filmy byla 11 %. Opakovatelnost stanovení mezi jednotlivými filmy byla považována za uspokojivou, neboť v rámci regulačního diagramu jen jedna průměrná hodnota stanovení z deseti překročila varovnou mez, ale nepřekročila mez kritickou.

U AdSV se nepodařilo dosáhnout výsledků, které by umožňovaly snížení meze stanovitelnosti oproti DPV. Příčinou špatné adsorpce na povrch CFE mohla být čistota prostředí měření nebo poměrně vysoká polarita nitroskupiny 5-NQ. Této problematice bude třeba v budoucnu věnovat další pozornost.

Dále byl prostudován cyklickou voltametrií mechanismus redukce na CFE.

Cyklickou voltametrií byl také ověřován charakter limitního proudu. Vzhledem k nelinearitě měření bylo zřejmé, že redukce v tomto případě není řízena difuzi.

Metodou FIA byla prověřena možnost stanovení 5-NQ v průtoku s elektrochemickou detekcí. Po optimalizaci metody byly proměřeny řády 10^{-6} a 10^{-5} mol l^{-1}.

Závěrem lze tedy konstatovat, že byla prokázána použitelnost CFE pro stanovení mikromolárních koncentrací 5-NQ na základě katodické redukce přítomné nitroskupiny.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63) a projektem Specifického vysokoškolského výzkumu 2011–263204.

LITERATURA

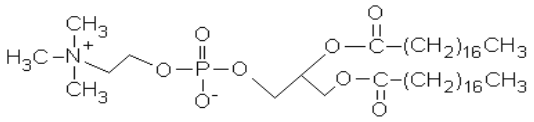
1. Siim B. G., Atwell G. J., Anderson R. F., Wardman P., Pullen S. M., Wilson W. R., Denny W. A.: J. Medicinal Chem. *40*, 1381 (1997).
2. Siim B. G., Atwell G. J., Wilson W. R.: Biochem. Pharm. *48*, 1593 (1994).
3. Paputa–Peck M. C., Marano R. S., Schuetzle D., Riley T. L., Hampton C. V., Prater T. J., Skewes L. M., Jensen T. E., Ruehle P. H.: Anal. Chem. *55*, 1946 (1983).
4. IARC: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans,* sv. 33. IARC, Lyon 1983.
5. http://chemicalland21.com/lifescience/phar/5–nitroquinoline.htm, staženo 23.10.2008.
6. Tachibana M., Shoei S., Kawazoe Y.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 1112 (1967).
7. Pech J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *6*, 126 (1934).
8. Liu T. Y., Robbat A., Jr.: J. Chromatogr. *539*, 1 (1991).
9. White, C. M., Robbat A., Jr., Hoes R. M.: Chromatographia *17*, 605 (1983).
10. Gundel L. A., Mahanama K. R. R., Daisey J. M.: J. Chromatogr. 629, *75* (1993).
11. Novotný L., Yosypchuk B.: Chem. Listy *94*, 1118 (2000).
12. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: Electroanalysis *18*, 1126 (2006).

Chem. Listy *105*, s73−s75 (2011) Cena Merck 2011

STUDIUM AGREGACE FOSFOLIPIDOVÝCH MOLEKUL

HANA ŠVECOVÁ, JITKA SOUČKOVÁ a JANA SKOPALOVÁ

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci,
17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
hanka.svec@seznam.cz



Obr. 1. **Struktura 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DSPC)**

Úvod

Fosfolipidy jsou v přírodě nejvíce zastoupené složené lipidy. Jsou základní stavební jednotkou biologických membrán. Vyskytují se např. v myelinových obalech nervových buněk, v semenech nebo vejcích. Tyto molekuly mají amfifilní charakter, tzn. obsahují polární (hydrofilní) skupinu („hlavu“) a nepolární (hydrofobní) uhlovodíkový řetězec („ocas“). Ve vodném prostředí mají tendenci na základě hydrofobních interakcí agregovat do útvarů nazývaných micely. Hydrofobní uhlovodíkové řetězce se orientují k sobě a hydrofilní „hlavy“ do vodného prostředí. Koncentrace, při níž začne docházet k tomuto seskupování, se nazývá kritická micelární koncentrace (cmc) (cit.[1]). Při zvyšování koncentrace fosfolipidových molekul ve vodném prostředí dochází ke shlukování těchto látek do dvojvrstev, které se pak uzavírají do sférických vesikul, tzv. liposomů[2]. Ty pak mohou nabývat velikostí od 25 nm do 150 μm. Jako modely biologických membrán se používají především v lékařství, kosmetice a farmacii[3].

Tato práce je zaměřená na studium agregace fosfolipidových molekul, především na stanovení kritické micelární koncentrace, jako důležité charakteristiky povrchově aktivních látek, a stanovení kritické koncentrace vzniku liposomů. Studovanou látkou byl 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin (DSPC, lecithin). Jeho agregace byla sledována cyklickou voltametrií, z níž byly vyhodnoceny závislosti proudu a potenciálu kapacitního píku na koncentraci fosfolipidu. Proces agregace fosfolipidových molekul byl současně sledován i nefelometricky. Metoda cyklické voltametrie byla dále použita ke sledování kinetiky tvorby fosfolipidových micel a liposomů v procesu spontánní revesikulace[4].

Experimentální část

Voltametrické měření probíhalo podle následujícího schématu. Ze studované látky, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DSPC, 99%, Sigma-Aldrich), jejíž struktura je uvedená na obr. 1, byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,8 g l^{-1} v redestilované vodě. Ten byl postupně dávkován (automatická byreta ABU 80, Radiometer, Kodaň, Dánsko) do 10 ml 1 mmol l^{-1} fosfátového pufru, pH 7,0 (základní elektrolyt). Po každém přídavku byl roztok důkladně promíchán (1 min) a probublán dusíkem (1 min) a poté byl změřen cyklický voltamogram na přístroji Eco-Tribo-Polarograf (Polaro-Sensors, Praha). Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení s pracovní rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE), referentní argentchloridovou elektrodou (Ag/AgCl/1M-KCl) a pomocnou platinovou elektrodou. Pracovní elektroda byla polarizována v rozsahu +0,2 až −2,0 V, rychlostí 0,5 V s^{-1}.

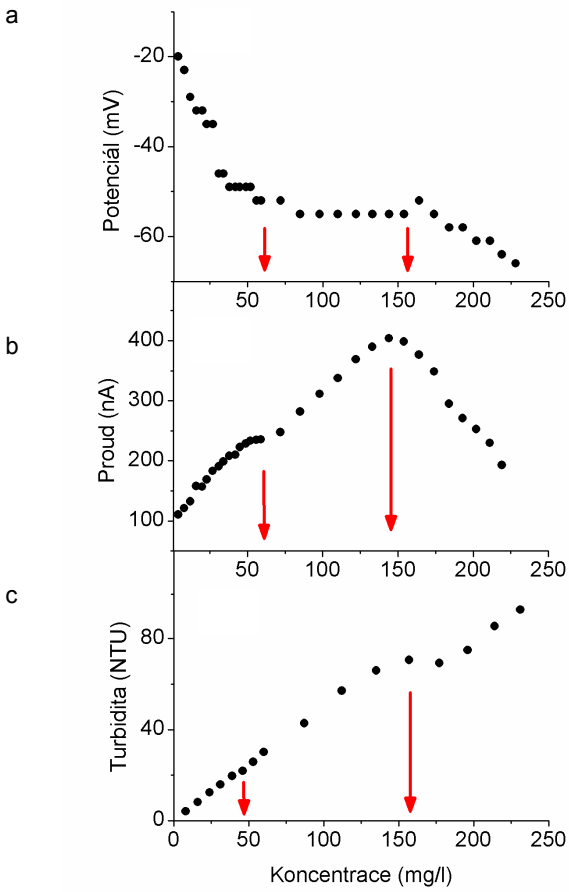
Stejný postup dávkování koncentrovaného roztoku DSPC do fosfátového pufru byl použit při nefelometrickém měření. Po každém přídavku byla změřena intenzita rozptýleného světla pod úhlem 90° (turbidimetr TN-100, Eutech Instruments, Singapur).

Pro sledování kinetiky formování micel, resp. liposomů, byl použit následující pracovní postup: do 10 ml 1 mmol l^{-1} fosfátového pufru, pH 7,0 byl postupně nadávkován zásobní roztok DSPC (0,8 g l^{-1}) do výsledné koncentrace DSPC 0,11 g l^{-1}, resp. 0,26 g l^{-1}. V průběhu 60 min byly v pravidelných časových intervalech měřeny cyklické voltamogramy za experimentálních podmínek uvedených výše.

Všechna měření byla prováděna při 25 ± 0,5 °C (termostat Haake C10-B3, Karlsruhe, Německo).

Výsledky a diskuse

Metodou cyklické voltametrie byl studován proces agregace fosfolipidu 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DSPC) v neutrálním roztoku fosfátového pufru. Obr. 2a ukazuje průběh závislosti potenciálu katodického kapacitního píku DSPC na jeho koncentraci v roztoku. Na této závislosti jsou patrné dva zlomy, první v oblasti nižší koncentrace 50–60 mg l^{-1}, druhý při vyšší koncentraci (150 mg l^{-1}). Přibližně při stejných koncentracích DSPC byly zaznamenány zřetelné změny také v průběhu závislosti proudu kapacitního píku na koncentraci (obr. 2b). Sledované zlomy v obou závislostech jsou vyvolány náhlou změnou kapacity elektrodové dvojvrstvy HMDE, která

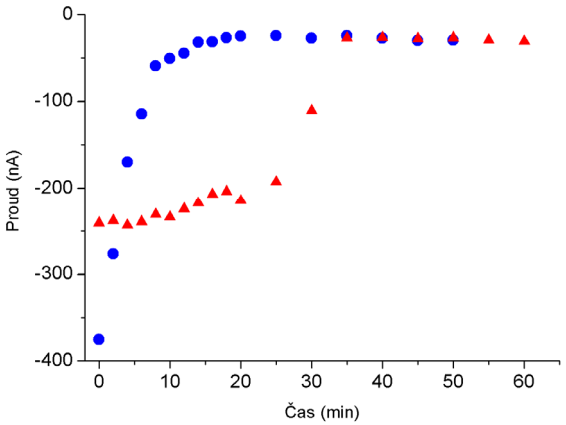


Obr. 2. **Závislost potenciálu kapacitního píku (a), proudu kapacitního píku (b) a turbidity (c) na koncentraci DSPC v roztoku fosfátového pufru** (pH 7,0)

může být způsobena reorientací molekul adsorbovaných na povrchu elektrody, např. v důsledku jejich agregace. Podobné zlomy na závislostech potenciálů kapacitních píků na koncentraci surfaktantů v roztoku byly využity k určení jejich kritických micelárních koncentrací[5]. V případě DSPC tedy první zlom může odpovídat koncentraci, při níž se tvoří micely fosfocholinu (cmc), druhý zlom při vyšší koncentraci patrně souvisí s tvorbou fosfolipidových dvojvrstev (liposomů).

Agregace surfaktantů bývá provázena také změnami v rozptylu světla. Závislost intenzity rozptýleného světla na koncentraci DSPC (obr. 2c) vykazuje zlomy zhruba při stejných hodnotách koncentrace jako závislosti měřené cyklickou voltametrií (obr. 2a, 2b). To potvrzuje, že agregace DSPC sledovaná cyklickou voltametrií jako změny v kapacitě elektrodové dvojvrstvy probíhá při stejných koncentracích i v celém objemu roztoku fosfolipidu.

Je-li koncentrovaný roztok fosfolipidu obsahující liposomy dostatečně zředěn vodou či vodným roztokem



Obr. 3. **Závislost kapacitního proudu na čase.** Koncentrace DSPC: 110 mg l^{-1} (▲) a 260 mg l^{-1} (●)

elektrolytu, dochází k rozpadu liposomů. Při následném postupném zvyšování koncentrace fosfolipidu se formují nové agregáty, nejprve micely a následně liposomy[4]. Cyklickou voltametrií bylo sledováno ustalování rovnováhy v popsaném procesu tzv. spontánní revesikulace[4]. Obr. 3 ukazuje závislost kapacitního proudu na čase při konstantním potenciálu –231 mV měřenou pro dvě různé koncentrace DSPC. Koncentrace 110 mg l^{-1} představuje roztok obsahující micely fosfolipidu. V tomto roztoku kapacitní proud klesal během 35 min. Po této době se pokles zastavil v důsledku ustavení rovnováhy a proud se již dále neměnil. V roztoku s koncentrací DSPC 260 mg l^{-1}, v němž by měly převládat fosfolipidové liposomy, došlo k ustavení rovnováhy již po 20 min. Při vyšší koncentraci fosfolipidu se tedy rovnováha ustavuje rychleji.

Závěr

Metodou cyklické voltametrie a nefelometrie byla nalezena kritická micelární koncentrace a kritická koncentrace tvorby liposomů 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu. Z výsledků vyplývá, že cmc je v oblasti kolem 50–60 mg l^{-1} (tj. 0,06–0,07 mmol l^{-1}) a kritická koncentrace tvorby liposomů v oblasti koncentrace 150 mg l^{-1} (0,19 mmol l^{-1}). V procesu tzv. spontánní revesikulace se rovnováha ustavuje rychleji v roztoku obsahujícím liposomy DSPC než v roztoku micelárním.

Tento výzkum byl finančně podpořen MŠMT ČR (projekt MSM 6198959216).

LITERATURA

1. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, Chichester 2003.
2. Bangham A. D.: Prog. Biophys. Mol. Biol. *18*, 29 (1968).
3. Švecová H.: *Liposomy a kapilární elektroforéza*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2009.
4. Megová M., Müller L., Barták P.: Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica *47*, 1 (2007).
5. Shinozuka N., Suzuki H., Havano S.: Kolloid Z. Z. Polym. *248*, 959 (1971).

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1,5-DINITRONAFTALENU NA KRYSTALOVÉ STŘÍBRNÉ AMALGAMOVÉ ELEKTRODĚ

JANA TVRDÍKOVÁ, ALEŠ DAŇHEL a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
tvrdikova22@seznam.cz

Úvod

Tato práce se zabývá testováním nového elektrodového materiálu, krystalu stříbrného amalgamu, v rámci kterého byla vyvinuta voltametrická metoda stanovení 1,5-dinitronaftalenu (1,5-DNN), která byla následně použita pro jeho stanovení v modelovém vzorku pitné vody.

Studovaný analyt je jedením z polohových isomerů dinitronaftalenu, patří do skupiny nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH), významných kontaminantů životního prostředí a látek podezřelých z genotoxicity[1]. Tyto látky vznikají zejména při spalovacích procesech ve stacionárních zdrojích, dieselových a benzinových motorech nebo fotochemickou reakcí polycyklických aromatických uhlovodíků s oxidy dusíku (NO_x) (cit.[2–4]). Jelikož byla prokázána karcinogenita dinitronaftalenů na zvířatech, je pravděpodobná také u lidí[5,6], a je tedy žádoucí věnovat pozornost vývoji nových analytických metod pro stanovení těchto látek v životním prostředí.

Novým typem amalgamových elektrod je krystalová stříbrná amalgamová elektroda (CAgAE), která představuje novou alternativu „toxické“ rtuti pro stanovení elektrochemicky redukovatelných organických látek pomocí moderních voltametrických metod. Výhodnými vlastnostmi tohoto elektrodového materiálu jsou především srovnatelné elektrochemické vlastnosti se rtutí, jeho stálost, hladký povrch krystalu s vysokým poměrem signálu k šumu při jeho použití ve voltametrii a v neposlední řadě rozměry „vypěstovaných“ krystalů (délka < 20 mm, průměr < 100 μm), které nabízí nové možnosti konstrukce detekčních cel využitelných pro mikroobjemovou analýzu pomocí voltametrických metod a průtokových cel pro amperometrickou detekci v kombinaci s metodami HPLC či FIA. Nevýhodou CAgAE je její křehkost a poměrně krátká životnost[7–9].

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztok studovaného 1,5-DNN o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním 0,02182 g 1,5-DNN (97 %; Sigma-Aldrich) ve 100 ml methanolu (MeOH, 99,9 %, Merck, Německo). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku uvedeným rozpouštědlem. Roztok byl uchován ve skleněné nádobě. UV/VIS spektrofotometrií bylo zjištěno, že zásobní roztok 1,5-DNN je stálý po dobu 6 měsíců[10].

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením směsi kyseliny borité, fosforečné (85 %) a octové (99,8 %), každé o koncentraci 0,04 mol l^{-1}, s roztokem 0,2 mol l^{-1} NaOH (všechny tyto chemikálie byly čistoty p.a., Lach Ner, ČR). Pro přípravu BR pufru byla používána deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Na přípravu stříbrného amalgamového krystalu byla použita rtuť (99,999 %, Polarografie, Praha), práškové stříbro (2−3,5 μm; 99,9 %; Sigma-Aldrich) a dusičnan stříbrný p.a. (Safina Vestec, ČR).

Kyslík byl před měřením z roztoků odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha).

Aparatura

Pro voltametrická měření byla použita aparatura Eco-Tribo Polarograph ovládaná softwarem PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha) pracující pod operačním systémem Windows XP (Microsoft Corporation, USA) s použitím technik: DC voltametrie (DCV), diferenční pulsní voltametrie (DPV) s výškou pulzu –50 mV a jeho šířkou 100 ms, cyklická voltametrie (CV) a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV), všechny s rychlostí polarizace 20 mV s^{-1}, pokud není uvedeno jinak.

Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení s referentní argentchloridovou elektrodou (Ag|AgCl, 3 mol l^{-1} KCl) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (obě Monokrystaly, Turnov). Krystalová stříbrná amalgamová elektroda (CAgAE) byla použita jako pracovní elektroda.

Přesné hodnoty pH tlumivých roztoků byly zjišťovány digitálním pH-metrem Jenway (typ 3510) s kombinovanou skleněnou elektrodou. pH metr byl kalibrován standardními vodnými pufry za běžné teploty v laboratoři.

Pracovní postupy

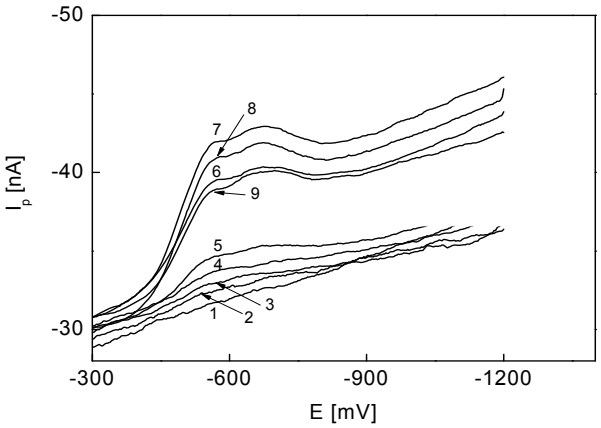
Při sledování vlivu pH na voltametrické chování 1,5-DNN na CAgAE a při sledování reprodukovatelnosti signálu 1,5-DNN pomocí DCV a DPV při zvoleném optimálním pH byly pracovní roztoky připravovány do 10ml odměrných baněk smísením daného množství zásobního roztoku 1,5-DNN s odpovídajícím množstvím MeOH do objemu 5 ml a doplněním BR pufrem po rysku. Při měření kalibračních závislostí bylo pracováno metodou standard-

ního přídavku a příslušné koncentrace byly přepočítány na skutečné koncentrace. Při použití metody adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) byly pracovní roztoky připravovány do 10ml odměrných baněk smísením daného množství zásobního roztoku 1,5-DNN a doplněním daným pufrem po rysku. V případě stanovení 1,5-DNN v pitné vodě jako modelové matrici byly pracovní roztoky připravovány do 10ml odměrných baněk smísením 9 ml pitné vody z vodovodního řádu (PřF UK, budova chemických kateder, Hlavova 8, lab. 113) se 100 μl 0,05 mol l^{-1} chelatonu 3 a doplněny daným pufrem o příslušném pH po rysku. Měření bylo prováděno metodou standardního přídavku a příslušné koncentrace byly přepočítány na skutečné koncentrace. Analyzované roztoky byly zbaveny kyslíku 10 minutovým probubláním dusíkem, který byl před vstupem do polarografické nádobky veden promývačkou plynů obsahující v případě DCV a DPV směs MeOH a deionizované vody o stejném poměru jako analyzovaný roztok (t.j. 1:1 (v/v)), v případě AdSV a stanovení 1,5-DNN v pitné vodě jako modelové matrici obsahující pouze deionizovanou vodu. Poté byly provedeny záznamy voltametrických křivek. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Výsledky a diskuse

Nejprve byl sledován vliv pH na voltametrické chování 1,5-DNN v prostředí MeOH – BR pufr (1:1) o různých hodnotách pH, resp. pH^f (tj. pH směsi MeOH – BR pufr) na CAgAE pomocí DCV a DPV. Jako optimální bylo zvoleno prostředí MeOH – BR pufr (1:1) o pH BR pufru 12,0 (pH^f 12,3) pro DCV i DPV. Volba byla provedena z hlediska výšky, snadné vyhodnotitelnosti, reprodukovatelnosti a dobrého oddělení vln (resp. píků) při opakovaných měřeních.

Dále byla sledována stabilita signálu 1,5-DNN ($1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) při deseti následných měřeních ve výše uvedeném optimálním prostředí na CAgAE bez elektrochemické regenerace, často používané pro tuhé amalgamové elektrody, která, jak bylo zjištěno, nemá vliv na stabilitu signálu. Metodou DCV byla prokázána stabilita signálu 1,5-DNN pro 1. i 2. vlnu s RSD do 1 % pro všech deset následných měření a metodou DPV byla prokázána stabilita signálu s RSD do 1 % (1. pík) a do 2 % (2. pík) pro všech deset následných měření.

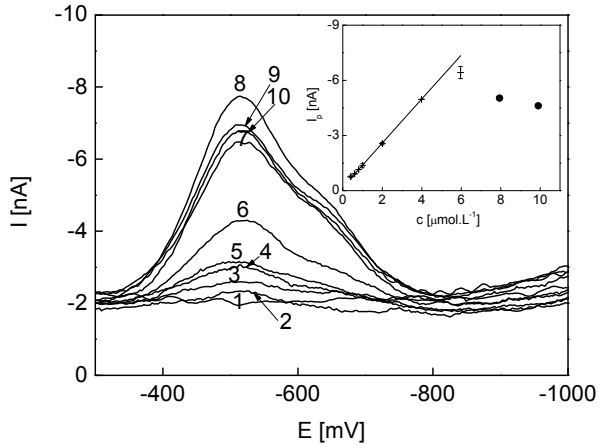


Obr. 1. **DC voltamogramy 1,5-DNN na CAgAE v modelovém vzorku pitné vody ve směsi s BR pufrem o pH 12,0 (9:1) se 100 μl 0,1 mol l^{-1} chelatonu 3**; c [μmol l^{-1}]: (1) 0-základní elektrolyt; (2) 0,6; (3) 0,8; (4) 1; (5) 2; (6) 4; (7) 6; (8) 8; (9) 10; E *vs*. Ag|AgCl; vložena odpovídající kalibrační přímka

Tabulka I
Parametry kalibračních přímek pro stanovení 1,5-DNN pomocí DCV a DPV na CAgAE v prostředí BR pufr – MeOH (1:1) a pitné vodě jako modelové matrici

Metoda	Prostředí	Koncentrace [μmol l^{-1}]	Směrnice [nA l μmol^{-1}]	Úsek [nA]	R^2	LoQ [μmol l^{-1}]
DCV	MeOH – BR pufr pH 12,0	10 – 100[a]	–0,97	3,41	0,9968	–
		10 – 100[b]	–0,29	1,36	0,9984	–
		2 – 10[a]	–0,63	–0,06	0,9991	2
		2 – 10[b]	–0,24	0,26	0,9938	2
	pitná voda – BR pufr H12,0	0,6 – 6*[a]	–1,41	0,42	0,9977	0,6
DPV	MeOH – BR pufr pH 12,0	10 – 100[a]	–0,79	3,45	0,9999	–
		10 – 100[b]	–0,40	2,77	0,9974	–
		2 – 10[a]	–1,12	0,59	0,9982	1
		2 – 10[b]	0,69	0,26	0,9841	4
	pitná voda – BR pufr pH 12,0	0,5 – 6*[a]	–1,20	–0,20	0,9999	0,5

* 1,5-DNN začíná vypadávat z roztoku od koncentrace 6 μmol l^{-1}, [a] první vlna/pík 1,5-DNN; [b] druhá vlna/pík 1,5-DNN



Obr. 2. **DP voltamogramy 1,5-DNN na CAgAE v modelovém vzorku pitné vody ve směsi s BR pufrem o pH 12,0 (9:1) se 100 µl 0,1 mol l^{-1} chelatonu 3**; c [µmol l^{-1}]: (1) 0-základní elektrolyt; (2) 0,4; (3) 0,6; (4) 0,8; (5) 1; (6) 2; (7) 4; (8) 6; (9) 8; (10) 10; E *vs*. Ag|AgCl; vložena odpovídající kalibrační přímka

V optimálním prostředí MeOH – BR pufru (1:1) byly naměřeny DC a DP voltamogramy v závislosti na koncentraci 1,5-DNN v intervalu 2–100 µmol l^{-1}, pro který jsou parametry kalibračních přímek a meze stanovitelnosti (LoQ) shrnuty v tabulce I.

Metodou cyklické voltametrie (CV) byly rovněž studovány děje, kterými je řízena elektrochemická redukce 1,5-DNN probíhající na CAgAE. Byly proměřeny cyklické voltamogramy 1,5-DNN při zvolených rychlostech polarizace ve zvoleném optimálním prostředí. Ze závislosti výšek katodického a anodického píku na rychlosti polarizace, resp. odmocnině z rychlosti polarizace, lze usuzovat, že se při elektrodovém ději zřejmě uplatňuje difuze i adsorpce a jedná se o ireverzibilní elektrodovou reakci.

Využitím adsorpce 1,5-DNN na CAgAE by případně bylo možno stanovit nižší koncentrace analytu metodou AdSV. Vzhledem k rušivému vlivu MeOH na adsorpci 1,5-DNN bylo pracováno pouze ve vodném prostředí. Nejprve bylo tedy pracováno v prostředí 0,01 mol l^{-1} hydroxidu sodného (NaOH), avšak k adsorpci 1,5-DNN na CAgAE v tomto prostředí nedocházelo, a proto byla rovněž testována prostředí: 0,01 mol l^{-1} kyselina chlorovodíková (HCl) a 0,05 mol l^{-1} fosfátový pufr (NaH_2PO_4). Jelikož nedošlo k významnému nárůstu signálu ani v jednom z výše uvedených prostředí, metodu AdSV ke snížení meze stanovitelnosti 1,5-DNN v tomto případě použít nelze.

Vyvinutá metoda stanovení 1,5-DNN pomocí DCV a DPV na CAgAE byla následně použita ke stanovení 1,5-DNN v pitné vodě jako modelové matrici. Tato stanovení byla prováděna v prostředí BR pufru. Docházelo však k vysrážení pravděpodobně vápenatých, hořečnatých či zinečnatých kationtů z pitné vody v podobě fosforečnanů pocházejících z kyselé složky BR pufru, proto byl do pracovního roztoku přidáván nadbytek roztoku chelatonu 3, který s těmito kationty vytvořil komplexy a zabránil jejich vysrážení. Byly tedy proměřeny DC a DP voltamogramy v závislosti na koncentraci 1,5-DNN v koncentračním rozmezí 0,2–10 µmol l^{-1} (pro ilustraci obr. 1 a obr. 2). Při vyšších koncentracích 1,5-DNN, nad 6 µmol l^{-1}, byl však patrný pokles signálu, zlom v kalibrační přímce, kde docházelo k vypadávání 1,5-DNN z roztoku kvůli jeho nízké rozpustnosti ve vodě. Parametry kalibračních závislostí a meze stanovitelnosti (LoQ) vyvinutých metod stanovení 1,5-DNN pomocí DCV a DPV na CAgAE v pitné vodě jako modelové matrici jsou shrnuty v tabulce I.

Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení genotoxického 1,5-dinitronaftalenu pomocí DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie na krystalové stříbrné amalgamové elektrodě a zjištěny meze stanovitelnosti 2, resp. 1 µmol l^{-1}. Snížit mez stanovitelnosti 1,5-DNN pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie na krystalové stříbrné amalgamové elektrodě v tomto případě nelze. Pomocí cyklické voltametrie byly objasněny elektrodové děje probíhající na pracovní elektrodě a 1,5-DNN byl dále stanoven pomocí DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie v pitné vodě jako modelové matrici a byly určeny meze stanovitelnosti 0,6, resp. 0,5 µmol l^{-1}.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LC 06035, RP 14/63 a MSM 0021620857), Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (89710/2010/B-Ch/PřF) a projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2011–263204.

LITERATURA

1. Daňhel A., Pecková K., Čížek K., Barek J., Zima J., Yosypchuk B., Navrátil T.: Chem. Listy *101*, 144 (2007).
2. URL: http://www.who.int/ipcs/publications/part-1.pdf, staženo 22. října 2010.
3. Barek J., Bencko V., Cvačka J., Mejstřík V., Slámová A., Švagrova I., Zima J.: Chem. Listy *91*, 871 (1997).
4. URL: http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf, staženo 20. dubna 2009.
5. Lewis R. J. Sr.: *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, str. 1483. John Wiley & Sons, 11. vyd. New York 2004. Online verze přístupná na: http:///knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1332&VerticalID=0, staženo 21. listopadu 2009.
6. Gangolli, S.: *Dictionary of Substances and Their Effects*. Royal Society of Chemistry, 3. elektronické vyd. London 2005. Online verze přístupná na: http://

knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=527&VerticalID=0, staženo 21. listopadu 2009.
7. Daňhel A., Barek J., Yosypchuk B.: *6th International Conference on Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications, Athens, 4-8 Oct. 2009,* Book of Abstracts, str. 256. National and Kapodistrian University of Athens, Athens 2009.
8. Danhel A., Yosypchuk B., Barek J.: *XXIX. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 25. - 29. května 2009*, Sborník přednášek (Barek J., Navrátil T., ed.), str. 15−16. BEST Servis, Ústí nad Labem 2009.
9. Danhel A., Tvrdikova J., Barek J.: *XXX. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice*, *24. – 28. května 2010*, Sborník přednášek (Barek J., Navrátil T., ed.), str. 22−25. BEST Servis, Ústí nad Labem 2010.
10. Shanmugan K.: *Disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2004.
11. URL: http://statistics4u.info/fundstat_eng/cc_outlier_tests_dixon.html,
12. staženo 27. dubna 2009.

IN SITU MONITORING ASYMETRICKÉ TRANSFER HYDROGENACE IMINŮ POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

JIŘÍ VÁCLAVÍK[a], MAREK KUZMA[b] a PETR KAČER[a]

[a] *Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,*
[b] *Laboratoř charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20, Praha 4*
jiri.vaclavik@vscht.cz

Úvod

Molekuly na bázi isochinolinového skeletu patří k nejvýznamnějším přírodním alkaloidům a tvoří jednu z ústředních skupin biologicky aktivních látek. Patří mezi ně i tetrahydroisochinoliny substituované v poloze 1, což jsou chirální látky vyvolávající farmakologický účinek zpravidla ve formě jediného enantiomeru[1]. Přítomnost druhého enantiomeru může žádaný účinek snižovat, nebo dokonce způsobit jiný, pro organismus škodlivý efekt. Vzhledem k velkému množství synteticky připravovaných aktivních farmaceutických substancí (API), založených právě na této cyklické struktuře, je žádoucí vývoj a optimalizace sofistikovaných, enantioselektivních metod jejich přípravy.

Takovou je mimo jiné asymetrická transfer hydrogenace (ATH) na rutheniových organokovových sloučeninách. Z celé řady používaných systémů[2] byl náš výzkum zaměřen na Noyoriho polosendvičový komplex (*S*,*S*)-[RuCl(η^6-*p*-cymen)(*N*-Ts-difenylethylendiamin)] (*S*,*S*)-**1**, který v přítomnosti azeotropu HCOOH/triethylamin (zdroj vodíku) velmi efektivně redukuje dihydroisochinoliny, a poskytuje tak vysoce opticky čisté (*R*)-tetrahydroisochinoliny (obr. 1) (cit.[3,4]). Výhodou této reakce je snadné provedení bez nutnosti zvyšování teploty či tlaku a především přímý vznik žádaného enantiomeru.

Průběh hydrogenace byl intenzivně studován pomocí NMR spektroskopie a plynové chromatografie. Propracovaná metodika umožnila sledování důležitých parametrů reakce (kinetický průběh, dosažitelná konverze, stereoselektivita) a následnou optimalizaci reakčních podmínek. Zvláště pro stanovení enantioselektivity byly vyvinuty dvě účinné, dosud nepopsané metody využívající komerčně dostupných chirálních činidel.

Experimentální část

Instrumentace

NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian ^{UNITY}*Inova*-400 (^{1}H 399,89 MHz a ^{13}C 100,55 MHz) a Bruker Avance III 400 MHz (^{1}H 400,13 MHz a ^{13}C 100,61 MHz) v CD_3CN (δ_H 1,931 ppm, δ_C 1,265 ppm) a DMSO-d_6 (δ_H 2,500 ppm, δ_C 39,60 ppm), jejichž residuální signály (δ_H 1,931 ppm, δ_C 1,265 ppm) sloužily jako reference pro chemický posun. U obou spektrometrů byl používán standardní software dodávaný se spektrometry (Varian Inc., Palo Alto, U.S.A., resp. Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo).

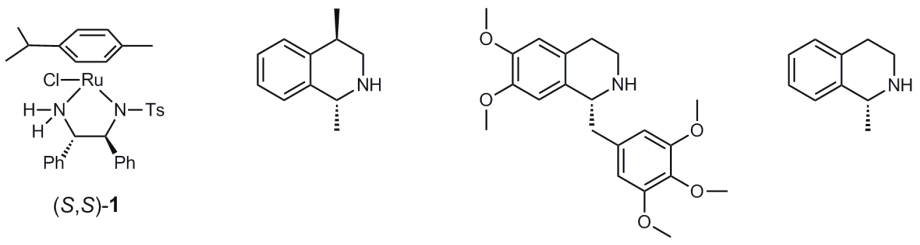
Pro plynovou chromatografii byl použit přístroj Varian CP-3800 s FID detektorem vybavený nepolární 60m kolonou Varian VF-1 o vnitřním průměru 0,25 mm s polydimethylsiloxanovou stacionární fází o tloušťce 0,25 μm. Jako nosný plyn sloužil dusík.

Chemikálie

Triethylamin, kyselina mravenčí, (1*R*)-(−)-menthylchloroformát, (*S*,*S*)[RuCl(η^6-*p*-cymen)(*N*-Ts-difenylethylendiamin)] a (*R*)-(−)-(2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Diethylether byl zakoupen od firmy Penta, DMSO-d_6 a CD_3CN od firmy Chromservis.

Příprava substrátů

1-methyl-3,4-dihydroisochinolin, (*R*)-1,4-dimethyl-3,4-dihydroisochinolin a 6,7-dimethoxy-1-(3,4,5-trimetho-



(*S*,*S*)-**1**

Obr. 1. **Struktura Noyoriho katalyzátoru (*S*,*S*)-[RuCl(*p*-cymen)TsDPEN] (*S*,*S*)-1 a studované (*R*)-tetrahydroisochinoliny jako produkty ATH**

xybenzyl)-3,4-dihydroisochinolin byly připraveny podle dostupné literatury[5].

Kinetické experimenty

Triethylamin a kyselina mravenčí (azeotropická směs) byly v poměru 2:5 předem smíchány v CD_3CN, resp. DMSO-d_6. Do roztoku byl následně přidán katalyzátor rozpuštěný v témž rozpouštědle jako azeotrop a v případě provedení v NMR kyvetě bylo změřeno spektrum směsi. Reakce byla zahájena přídavkem roztoku substrátu tak, aby byl poměr substrát/katalyzátor roven 100. Při reakci v NMR spektrometru byl průběh monitorován pomocí ^{1}H NMR spekter, která byla akumulována v pravidelných intervalech. Pokud byly vzorky analyzovány pomocí GC, byly odebírány z reakční směsi a ihned zpracovávány. Pro zastavení reakce byl používán nasycený roztok Na_2CO_3, případně koncentrovaný roztok NaOH. Vzorky byly ze zalkalizované reakční směsi extrahovány etherem, organická fáze byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědlo vystripováno argonem a po rekonstituování do acetonitrilu byly zanalyzovány pomocí GC.

Určení enantioselektivity

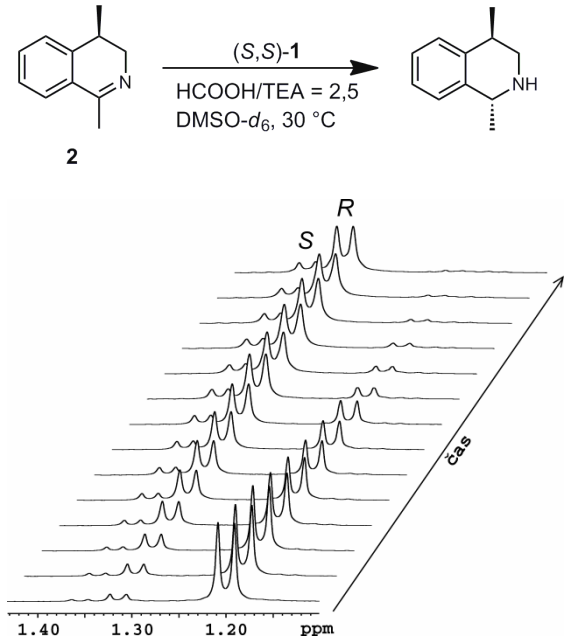
Chirální solvatace Pirklovým alkoholem: Ke zpracovanému vzorku výše uvedeným způsobem byl přidán (*R*)-(−)-(2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol) (Pirklův alkohol) v molárním poměru činidlo:amin nejméně 3:1. Vzhledem k neznámému množství aminu ve vzorku byl poměr kontrolován integrací spektra.

Derivatizace (1*R*)-(−)-menthylchloroformátem: ke zpracovanému vzorku, který obsahoval do 2 mg aminu, bylo přidáno 20 μl triethylaminu a 10 μl (1*R*)-(−)-menthylchloroformátu.

Výsledky a diskuse

Asymetrická transfer hydrogenace pomocí Noyoriho katalyzátoru (*S*,*S*)-[RuCl(η^6-*p*-cymen)(*N*-Ts-difenylethylendiamin)] (*S*,*S*)-**1** (obr. 1), zkráceně (*S*,*S*)-[RuCl(*p*-cymen)TsDPEN], byla testována na třech modelových substrátech, z nichž každý vyžadoval odlišný způsob analýzy stereoselektivity reakce. Zatímco v případě chirálního (*R*)-1,4-dimethyl-3,4-dihydroisochinolinu **2** byla situace relativně jednoduchá díky snadno odlišitelným diastereomerním produktům, pro 6,7-dimethoxy-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-3,4-dihydroisochinolin **3** a 1-methyl-3,4-dihydroisochinolin **4** dosud neexistovaly účinné metody určení enantioselektivity mimo GC či HPLC na chirální koloně, které jsou obecně nákladnější než způsoby využívající předkolonovou derivatizaci a také časově náročnější v porovnání s ^{1}H NMR spektroskopií.

ATH substrátu **2** byla studována *in situ* v NMR kyvetě (obr. 2). Dublet u 1,199 ppm odpovídá methylové skupině v poloze 4 substrátu **2** a na 1,314 a 1,355 ppm s časem narůstají dublety téhož methylu od obou diastereomerních produktů. Jelikož je substrát čistým enantiomerem chirální

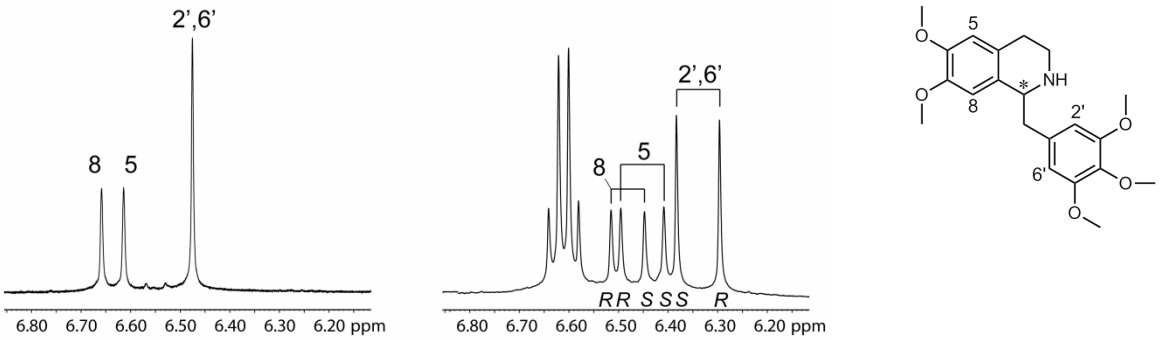


Obr. 2. **ATH (*R*)-1,4-dimethyl-3,4-dihydroisochinolinu 2 a její *in situ* monitoring pomocí NMR**

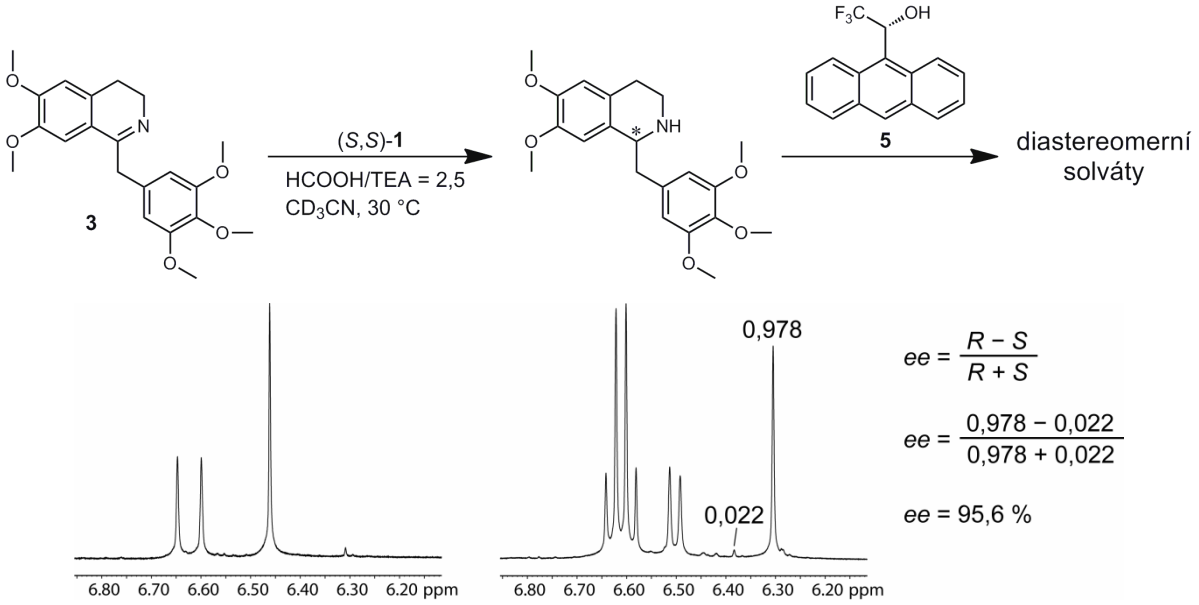
molekuly, vznikající diastereomery lze pozorovat přímo díky jejich rozdílným fyzikálním i chemickým vlastnostem. Optická čistota je tedy měřitelná bez jakýchkoliv dalších úprav vzorku, což umožnilo například ověření důležité skutečnosti, že stereoselektivita je v průběhu reakce konstantní. Takový experiment je v případě enantiomerních produktů mnohem komplikovanější vzhledem k individuálnímu zpracovávání velkého množství vzorků.

Hydrogenace substrátu **3** byla opět monitorována v reálném čase pomocí NMR, ovšem enantioselektivita musela být určena až po zastavení reakce, vzhledem k nerozlišitelnosti vznikajících enantiomerů. Využili jsme skutečnosti, že produkt tvoří diastereomerní solváty s Pirklovým alkoholem **5**, a tím dochází k úplnému rozdělení obou jeho optických isomerů – na obr. 3 jsou zobrazeny odpovídající části NMR spekter racemátu před a po chirální solvataci (aromatické signály molekuly). Pozorovaný kvartet přísluší methinu solvatačního činidla **5**, který je štěpen sousední CF_3 skupinou. Obr. 4 zobrazuje schéma asymetrické hydrogenace substrátu **3** a spektra použitá k určení stereoselektivity. Enantiomerní přebytek (*ee*) byl v tomto případě velmi vysoký (95,6 %) a signál (*S*)-isomeru byl jen nepatrný.

Substrát **4** má ve své molekulové hmotnosti tu výhodu, že jej lze analyzovat také pomocí plynové chromatografie. Pro takové molekuly byla vypracována metoda derivatizace (1*R*)-(−)-menthylchloroformátem **6**, který s produkty ATH tvoří diastereomerní karbamáty (obr. 5). Dochází k úplné separaci píků na chromatogramu (obr. 6) a metoda byla aplikována na řadu dalších, strukturně podobných substrátů.



Obr. 3. **NMR spektra před a po chirální solvataci racemického 6,7-dimethoxy-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinu Pirklovým alkoholem 5**



Obr. 4. **Schéma hydrogenace 6,7-dimethoxy-1-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-3,4-dihydroisochinolinu 3; NMR spektra produktu před a po chirální solvataci Pirklovým alkoholem 5 a výpočet *ee* z integrálních intenzit**

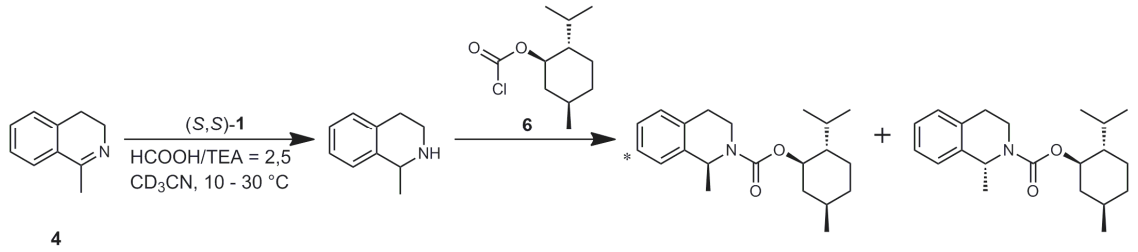
Tento substrát byl popsanými metodami podroben systematické studii vlivu teploty na rychlost a enantioselektivitu ATH. Ukázalo se, že zatímco při snižování teploty rychlost reakce výrazně klesá, selektivita naopak mírně roste. Dále byl studován vliv záměny triethylaminu v azeotropické směsi za jiný amin a vliv pořadí přidávaných komponent.

Závěr

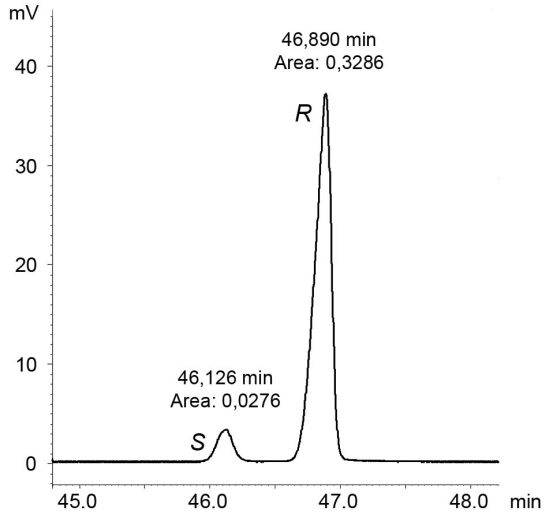
Cílem práce bylo vypracovat účinný aparát pro monitorování parametrů asymetrické transfer hydrogenace dihydroisochinolinů na chirálních Ru komplexech. Produkty této reakce jsou významné biologicky aktivní molekuly, což má nezpochybnitelný význam zejména pro farmaceutický průmysl, kde opticky čisté substance hrají nezastupitelnou roli.

Průběh reakce, která probíhá *in situ* přímo v NMR kyvetě, lze komfortně sledovat v reálném čase, což dovoluje přesné stanovení reakční rychlosti. Tímto způsobem byl změřen např. vliv teploty a vliv použitého aminu v H_2-donorové směsi na rychlost reakce.

Byly vyvinuty dvě nové metody určení enantioselektivity asymetrické reakce. Tetrahydroisochinoliny, jež je možné z hlediska molekulové hmotnosti analyzovat pomocí plynové chromatografie, byly úspěšně derivatizovány (1*R*)-(−)-menthylchloroformátem. U produktů reakce s vyšší molekulovou hmotností se osvědčila chirální solvatace Pirklovým alkoholem a následné určení enantiomerního přebytku NMR spektroskopií. Aplikace těchto metod opět vedla ke screeningu vlivu teploty a dalších parametrů



Obr. 5. **Schéma hydrogenace 1-methyl-3,4-dihydroisochinolinu 4, následná derivatizace (1*R*)-(−)-menthylchloroformátem**



Obr. 6. **GC chromatogram směsi diastereomerních karbamátů odvozených od produktů hydrogenace substrátu 1-methyl-3,4-dihydroisochinolinu 4**

na selektivitu reakce. Byl tak například potvrzen obecně platný poznatek, že s rostoucí teplotou enantioselektivita klesá.

Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou České republiky (GA ČR 104-09-1497) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 604 613 7301) a výzkumným záměrem (AV0Z50200510).

LITERATURA

1. Kaufman T. S.: Tetrahedron: Asymmetry *15*, 1203 (2004).
2. Wang C., Wu X., Xiao J.: Chem. Asian J. *3*, 1750 (2008).
3. Fujii A., Hashiguchi S., Uematsu N., Ikariya T., Noyori R.: J. Am. Chem. Soc. *118*, 2521 (1996).
4. Uematsu N., Fujii A., Hashiguchi S., Ikariya T., Noyori R.: J. Am. Chem. Soc. *118*, 4916 (1996).
5. Gulamhussen A. M., Kačer P., Přech J., Kuzma M., Červený L.: React. Kinet. Catal. Lett. *97*, 335 (2009).

MAPOVÁNÍ POVRCHŮ KOVOVÝCH MATERIÁLŮ POMOCÍ LA-ICP-MS

TEREZA WARCHILOVÁ[a], TOMÁŠ VACULOVIČ[a], OLDŘICH MATAL[b], TOMÁŠ ŠIMO[b] a VIKTOR KANICKÝ[a]

[a] Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, [b] Energovýzkum, Ltd., Božetěchova 17, 612 00 Brno
warchilovatereza@gmail.com

Úvod

Reaktor s tavenými solemi MSR (Molten Salt Reactor) je typ reaktoru navržený mezinárodní organizací GIV (Generation IV International Forum)[1]. Jedná se o nový typ reaktorového systému, který umožní efektivnější využití jaderného paliva a zároveň sníží objem i míru radioaktivity jaderného odpadu. Pro tento typ jaderného reaktoru je typická tekutá forma paliva. Skládá se z fluoridové soli, v níž je rozpuštěn štěpný materiál. Tato směs cirkuluje mezi aktivní zónou reaktoru a tepelným výměníkem. V MSR pracujícím jako jaderný transmutor by se jako palivo používala směs fluoridů plutonia a transuranů (Np, Am, Cm) s fluoridovou solí. Jako velice slibný se jeví ^{232}Th - ^{233}U cyklus, který minimalizuje množství odpadních aktinoidů s dlouhým poločasem rozpadu. V tomto cyklu vzniká z ^{232}Th vlastní štěpný materiál ^{233}U. Pak tedy mluvíme o množivém reaktoru[2]. Přebytek tepelné energie vznikající při výrobě elektřiny by sloužil k produkci vodíku a odsolování mořské vody, případně k dalším průmyslovým účelům. Fluoridové soli charakterizuje vysoká teplota varu, velká objemová tepelná kapacita, radiační stabilita a dobrá rozpustnost pro aktinoidy. Díky těmto výhodným fyzikálním a chemickým vlastnostem mohou být použity jako medium pro přenos tepla při vysoké teplotě, chladivo aktivní zóny s pevným nebo tekutým palivem nebo jako transmutor pro spalování vyhořelého jaderného paliva[3,4]. Použití tavených solí v jaderné energetice představuje nemalý konstrukční problém. Je velmi obtížné najít vhodný konstrukční materiál, který by snesl teploty přesahující 500 °C a odolával korozním prostředí, které tekuté soli představují[5].

Předkládaná práce se zaměřuje na studium interakcí mezi taveninou alkalické fluoridové soli a možným konstrukčním materiálem tepelného výměníku v systému MSR. Korozní testy byly prováděny na testovacích ampulích vyrobených ze slitin niklu. Tyto ampule byly ponořeny v tavenině alkalické fluoridové soli o teplotě 680 °C. Byly zjišťovány korozní změny materiálu pomocí LA-ICP-MS.

Experimentální část

Laterální mapování koroze bylo prováděno komerčním ablačním systémem UP 213 (New Wave, USA) s Nd:YAG laserem emitujícím záření o vlnové délce 213 nm (5. harmonická frekvence) a pracujícím v režimu Q-switch s opakovací frekvencí 20 Hz a délkou pulzu 4,2 ns. Vzorek byl při měření umístěn v pohyblivé ablační cele Supercell o objemu 33 cm^3. Jako nosný plyn bylo použito helium. Ablační cela byla polyuretanovými trubičkami spojena s ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent, Japonsko) s kvadrupólovým analyzátorem. Jako plazmový plyn byl použit argon. Parametry LA-ICP-MS jsou uvedeny v tabulce I.

Korozní testy byly prováděny na ampulkách vyrobených z různých materiálů (výška ampulky 185 mm, vnitřní průměr 21,3 mm, tloušťka stěny 2 mm). Tato práce se zabývá sledováním korozních změn slitiny INCONEL686 a železa potaženého vrstvou niklu. Vzorek INCONEL686 byl ponořen v tavenině fluoridové soli o molárním složení 42 % LiF, 29 % NaF, 29 % ZrF_4 a konstantní teplotě 680 ° C po dobu 1000 hodin. Vzorek železa potažený vrstvou niklu byl ponořen v tavenině o molárním složení 60 % LiF, 40 % NaF a konstantní teplotě 680 °C taktéž po dobu 1000 hodin. Po ochlazení byly ampulky rozřezány podél osy a diamantovou pilou byly získány jednotlivé výřezy. Ty byly vloženy do epoxidové pryskyřice (Araldite) a vyleštěny diamantovou pastou do vysokého lesku. Takto upravený vzorek byl vložen do ablační cely.

Podmínky pro měření metodou LA-ICP-MS byly zjišťovány pomocí nastavovacího standardu oceli F/4 (0,46 % Mn, 0,19 % Si, 25,5 % Cr, 7,4 % Ni, 3,5 % Mo, 0,58 % Cu, 62,37 % Fe). Pro účely mapování byl použit ablační mód – ablace do bodu (line of spots). V rámci optimalizace podmínek ablace bylo nutné zjistit ideální průměr laserového paprsku, frekvenci laseru, hustotu zářivého výkonu a rychlost pohybu ablační cely. Optimalizované parametry jsou uvedeny níže (tabulka II). U vzorků

Tabulka I
Pracovní parametry LA-ICP-MS

Parametr	Hodnota
Vnější plazmový plyn (Ar)	15 l min^{-1}
Střední plazmový plyn (Ar)	1 l min^{-1}
Nosný plyn (He)	1 l min^{-1}
Pomocný plyn (Ar)	0,6 l min^{-1}
Příkon generátoru	1500 W

Tabulka II
Parametry LA

Parametr	Hodnota
Hustota zářivého výkonu	25 J cm^{-2}
Frekvence	20 Hz
Rychlost pohybu ablační cely	6 μm s^{-1}
Průměr laserového paprsku	8 μm

byl sledován obsah lithia, sodíku, případně zirkonia (prvkové složení soli) a konstitučních prvků slitiny – nikl, železo, mangan a chrom. Pro kvantifikaci byla použita normalizační metoda, která využívá součtu signálů měřených isotopů prvků přítomných ve vzorku. Energie argonového plazmatu (1. ionizační energie 15,75 eV) není dostatečná pro excitaci elektronů fluoru (1. ionizační energie 17,42 eV) (cit.[6]). Signál fluoru byl tedy získán součtem signálů sodíku, lithia, případně zirkonia (pokud bylo složkou fluoridové soli).

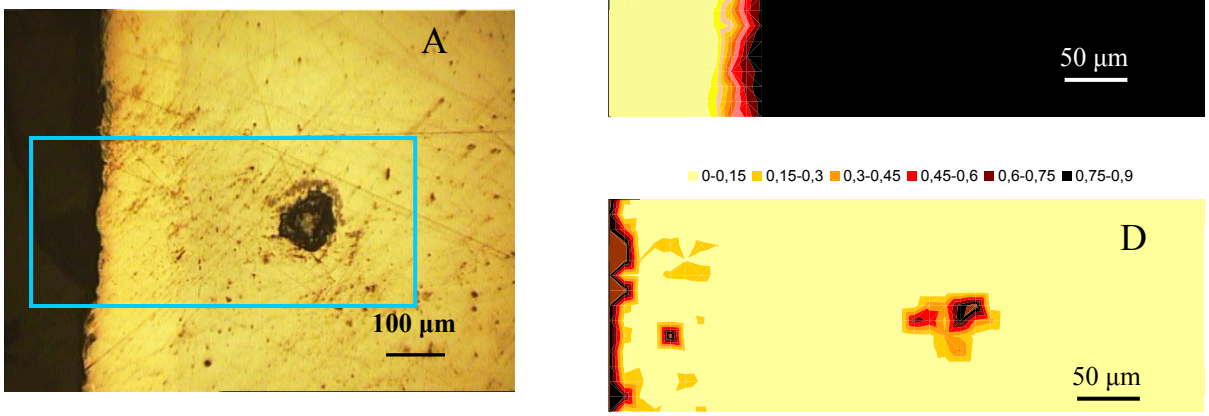
Výsledky a diskuse

Metodou LA-ICP-MS byly sledovány korozní změny slitiny INCONEL686 a vzorku železa potaženého vrstvou niklu po expozici v tavenině alkalické fluoridové soli při teplotě 680 °C. Ablatována byla ta část vzorku, která byla ve styku s taveninou a jevila největší míru poškození (tmavá anomálie ve vzorku železa potaženého vrstvou niklu obr. 1A). Jako poškozená byla vyhodnocena ta část vzorku, která obsahovala lithium, sodík nebo zirkonium. Tyto prvky totiž nejsou v měřených vzorcích primárně obsaženy. Na jednotlivých mapách (obr. 1, obr. 2) lze vysledovat nerovnoměrnost koroze. Můžeme také vidět ohraničenou korozi uvnitř materiálu. U vzorku železa potaženého cca 100 μm vrstvou niklu ("iron coated by nickel") je viditelné proniknutí sodíku dovnitř vzorku (obr. 1D).

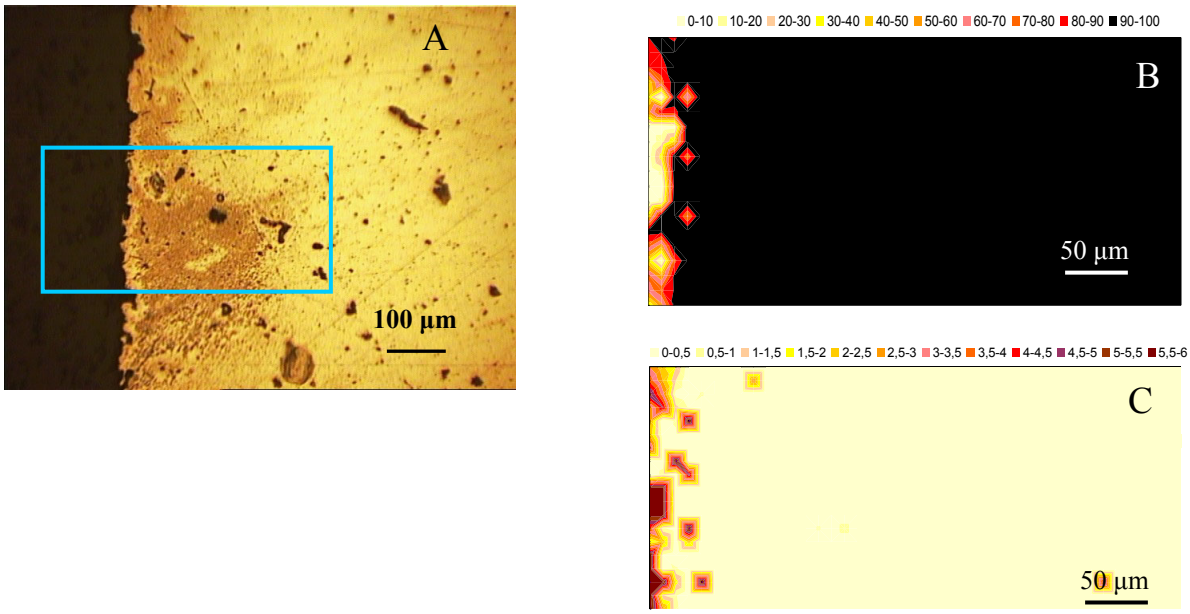
Závěr

Pro mapovaní zkorodovaného povrchu vzorku z INCONEL686 a železa potaženého vrstvou niklu byl použit systém LA-ICP-MS. Koroze eventuálního konstrukčního materiálu tepelného výměníku v MSR technologii byla způsobena taveninou alkalické fluoridové soli, která byla ve styku s tímto materiálem při teplotě 680 °C po dobu 1000 hodin. Výsledkem zpracování naměřených dat jsou 2D mapy povrchu kovového materiálu, které sledují procentuální zastoupení jednotlivých konstrukčních elementů v neporušené a v korozně ovlivněné vrstvě.

Velký vliv na korozi má technologický postup výroby konstrukčního materiálu, neboť i velmi nepatrné poškození (mikrokanálky, škrábnutý materiál apod.) může ve svém konečném důsledku způsobit fatální degradaci materiálu.



Obr. 1. **Železo potažené vrstvou niklu;** A) modrý obdélník ohraničuje místo ablace, B) laterální rozložení Ni ve vzorku železa potaženého vrstvou niklu *, C) laterální rozložení Fe ve vzorku železa potaženého vrstvou niklu *, D) laterální rozložení Na ve vzorku železa potaženého vrstvou niklu *, * legenda vyjadřuje obsah prvku v %



Obr. 2. **INCONEL686,** A) modrý obdélník ohraničuje místo ablace, B) laterální rozložení Ni ve vzorku INCONEL686*, C) laterální rozložení Na ve vzorku INCONEL686*, * legenda vyjadřuje obsah prvku v %

Pokud analýzu LA-ICP-MS podpoříme daty EPMA, získáme tak cenné informace týkající se struktury materiálu. Srovnáním vzorků vyrobených z různých slitin můžeme vyvozovat závěry týkající se odolnosti materiálu vůči taveninám solí. K těmto závěrům však vede ještě dlouhá cesta plná měření a zpracování experimentálních dat.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR za finanční podporu grantu GAČR 101/08/1100 a Ministerstvu mládeže a tělovýchovy za finanční podporu výzkumných záměrů MSM0021622411 a MSM0021622412.

LITERATURA

1. Aram T., Ion S.: Energy Policy *36*, 4323 (2008).
2. Uhlíř J.: J. Nucl. Mater. *360*, 6 (2007).
3. Le Brun Ch.: J. Nucl. Mater. *360*, 1 (2007).
4. Williams D. F., Toth L. M., Clarno K. T.: *Assessment of Candidate Molten Salt Coolants for the Advanced High-Temperature Reactor (AHTR)*, ORNL/TM-2006/12.
5. Murty K. L., Charit I.: J. Nucl. Mater. *383*, 189 (2008).
6. Russo R. E., Mao X. L., Liu H. C., Gonzalez J., Mao S. S.: Talanta *57*, 443 (2002).

AMPÉROMETRICKÁ A SPEKTROFOTOMETRICKÁ DETEKCE AMINOBIFENYLŮ A AMINONAFTALENŮ V HPLC

JAROSLAVA ZAVÁZALOVÁ, HANA DEJMKOVÁ, JIŘÍ BAREK a KAROLINA PECKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
zavazal1@natur.cuni.cz

Úvod

Aminobifenyly (AB) a aminonaftaleny (AN), stejně jako další aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků, jsou podezřelé nebo prokázané karcinogeny[1,2]. 4-Aminobifenyl (4-AB) a 2-aminonaftalen (2-AN) jsou obzvláště nebezpečné látky, podle IARC klasifikace jsou zařazeny do skupiny 1 (prokázané karcinogeny pro člověka)[3]. Výskyt AB a AN v životním prostředí je spojen s jejich využitím v chemickém průmyslu[4,5]. Kromě toho jsou produkovány během spalování fosilních paliv a kouření cigaret[6]. Nepříznivý vliv těchto látek na lidské zdraví vede ke snaze nalézt vhodné analytické metody pro jejich stanovení.

V minulosti bylo zkonstruováno několik tubulárních detektorů využívajících platinu, zlato nebo grafit jako elektrodový materiál[7-10]. Detektor používaný v této práci a zavedený Cvačkou a spol.[11] se skládá z platinové trubičky s vloženým napětím zasunuté do teflonové kapiláry. Navzdory relativně velkému geometrickému objemu je efektivní objem detektoru malý, protože pouze malá část na konci platinové trubičky se uplatňuje při elektrooxidaci analytů. Spojuje výhody jednoduché a robustní konstrukce s vysokou citlivostí stanovení.

Cílem této práce bylo stanovení 2-aminobifenylu (2-AB), 4-aminobifenylu (4-AB), 1-aminonaftalenu (1-AN) a 2-aminonaftalenu (2-AN) metodou HPLC se spektrofotometrickou a ampérometrickou detekcí na platinové tubulární elektrodě. Praktické použití této metody bylo testováno při analýze modelových vzorků moči po předběžné separaci a prekoncentraci studovaných analytů pomocí extrakce na tuhé fázi.

Experimentální část

Studované látky a ostatní chemikálie

Zásobní roztoky 2-AB, 4-AB (obě Sigma-Aldrich, 97%), 1-AN (Sigma-Aldrich, 98%), a 2-AN (Sigma-Aldrich, 95%) o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v deionizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Fosforečnanový pufr byl připraven z roztoku 0,01 mol l^{-1} hydrogenfosforečnanu disodného, jehož pH bylo upraveno přídavkem koncentrované kyseliny fosforečné (obě látky p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Dále byly použity tyto chemikálie: acetonitril (chromatografická čistota, Merck, Německo), methanol (p.a., Merck, Německo), ethylacetát, hydroxid sodný a koncentrovaná kyselina sírová (vše p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

Aparatura

HPLC systém se skládal z vysokotlaké pumpy HPP 5001 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), předkolonky LiChroCART® PAH 4-4 (Merck, Německo), kolony LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm, 125×4 mm (Merck, Německo), UV spektrofotometrického detektoru LCD 2083 (ECOM, Praha, Česká republika) a ampérometrického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika). Ampérometrický detektor byl sériově zapojen za UV spektrofotometrický detektor (detekční vlnová délka 290 nm). Dávkovaný objem byl 10 μl a průtoková rychlost F_M 1 ml min^{-1}.

Ampérometrický detektor pracoval v tříelektrodovém uspořádání s platinovou tubulární pracovní elektrodou. Tato elektroda je tvořena 15mm platinovou trubičkou (300 μm o.d., 150 μm i.d.) potaženou teflonovou kapilárou (1/16" o.d., 0,010" i.d.) (cit.[11]). Pracovní elektroda byla ponořena v přepadové nádobce společně s Ag/AgCl (3 mol l^{-1} KCl) referentní elektrodou (ETP CZ-R00408) a platinovou pomocnou elektrodou (obě Elektrochemické detektory, Turnov, Česká republika). Na začátku pracovního dne byla tubulární elektroda aktivována v $5 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1} H_2SO_4 střídavým vkládáním potenciálu –0,3 V a +1,4 V po dobu 10 s.

Pracovní postupy

Extrakce na tuhé fázi (SPE) byla prováděna na extrakčních kolonkách LiChrolut® EN 200 mg/3 ml (Merck, Německo) na bázi poly(styren-divinylbenzenu) následujícím způsobem: tuhá fáze extrakční kolonky byla aktivována bez použití podtlaku postupným promytím 3 ml ethylacetátu, 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody. Poté bylo na kolonku naneseno 100 ml analyzované moči, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu pH 9,0 roztokem 5 mol l^{-1} NaOH, a prosáto za pomoci podtlaku rychlostí cca 1 ml min^{-1}. Následně byla kolonka promyta 3 ml deionizované vody a 1 min sušena vzduchem. Zachycené aminobifenyly a aminonaftaleny byly eluovány 6 ml acetonitrilu bez použití podtlaku. Nakonec byl použit podtlak po dobu

1 min pro odsátí zbytku acetonitrilu z kolonek. 10 µl eluátu bylo nastříknuto do HPLC systému.

Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Meze stanovitelnosti byly určeny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna desetinásobku absolutní hodnoty šumu ($S/N = 10$).

Výsledky a diskuse

Optimalizace podmínek analýzy

Pro úspěšnou separaci 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN je nutné nalézt vhodné separační podmínky. Velký vliv na retenci v reverzním systému má pH mobilní fáze, jelikož v kyselém prostředí dochází k protonizaci aminoskupiny a tím k slabší retenci na koloně. Optimalizace pH fosforečnanového pufru byla prováděna v rozmezí od pH 2,5 do pH 7,0 s mobilní fází o složení acetonitril a fosforečnanový pufr daného pH (50:50; V/V). Jako optimální pro další měření byla zvolena hodnota pH 2,5. Optimalizace obsahu acetonitrilu byla proměřována v mobilní fázi o složení acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru od 60:40 (V/V) do 30:70 (V/V); poměr 40:60 (V/V) byl vybrán jako kompromis mezi dobou trvání analýzy a rozlišením separovaných látek.

Dalším krokem byla optimalizace potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu. Optimální potenciál byl získán na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek v rozmezí od +0,5 V do +1,3 V za optimálních separačních podmínek. Vzhledem k maximálnímu poměru výšky píku a proudu pozadí byl jako optimální zvolen potenciál +1,0 V. Chromatogramy analytů naměřené za optimálních detekčních podmínek jsou znázorněny na obr. 1.

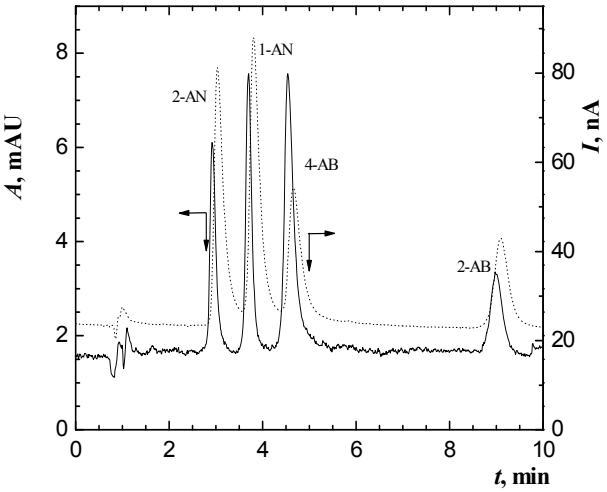
Koncentrační závislosti

Nalezené optimální podmínky separace a detekce byly využity pro změření kalibračních závislostí. Koncentrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí pro spektrofotometrickou detekci a pro ampérometrickou detekci do koncentrace $8\cdot10^{-6}$ mol l^{-1}. Meze stanovitelnosti dosahují hodnot mezi $8{,}5\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} a $3{,}1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1} pro spektrofotometrickou detekci a mezi $2{,}6\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} a $8{,}9\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} pro ampérometrickou detekci (tab. I). Ve srovnání se spektrofotometrickým detektorem jsou meze stanovitelnosti získané pomocí elektrochemického detektoru přibližně o řád nižší.

Extrakce ze vzorku moči

Optimalizovaná HPLC-ED metoda byla následně použita ke stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN v modelových vzorcích moči. Stanovované látky byly z matrice předběžně separovány a prekoncentrovány metodou extrakce na tuhé fázi.

Pro eluci adsorbovaných analytů bylo použito 6 ml acetonitrilu, při 100% výtěžku extrakce je tedy prekoncentrační faktor roven 17. Pro koncentraci analytů $1\cdot10^{-6}$



Obr. 1. **Chromatogramy 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN ($c = 1\cdot10^{-5}$ mol l^{-1} každé látky) naměřené za optimálních podmínek pomocí spektrofotometrické (plná čára, $\lambda_{det} = 290$ nm) a ampérometrické (čárkovaně, $E_{det} = +1{,}0$ V) detekce.** Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr pH 2,5 (40:60; V/V), dávkovaný objem 10 µl, $F_M = 1$ ml min^{-1}

Tabulka I
Meze stanovitelnosti 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při stanovení analytů v deionizované vodě a ve vzorcích moči (po SPE) využívající HPLC se spektrofotometrickou a ampérometrickou detekcí. Podmínky měření viz obr. 1

Analyt	Meze stanovitelnosti, mol l^{-1}			
	spektrofotometrická detekce		ampérometrická detekce	
	deionizovaná voda	vzorek moči (po SPE)	deionizovaná voda	vzorek moči (po SPE)
2-AB	$3{,}1\cdot10^{-6}$	$1{,}7\cdot10^{-7}$	$8{,}9\cdot10^{-8}$	$2{,}7\cdot10^{-8}$
4-AB	$8{,}5\cdot10^{-7}$	$3{,}9\cdot10^{-8}$	$5{,}4\cdot10^{-8}$	$1{,}7\cdot10^{-8}$
1-AN	$1{,}0\cdot10^{-6}$	$5{,}5\cdot10^{-8}$	$2{,}6\cdot10^{-8}$	$7{,}2\cdot10^{-9}$
2-AN	$1{,}3\cdot10^{-6}$	$6{,}3\cdot10^{-8}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$9{,}1\cdot10^{-9}$

mol l^{-1} bylo dosaženo těchto výtěžků: 97 % pro 2-AB, 73 % pro 4-AB, 86 % pro 1-AN a 71 % pro 2-AN.

Po optimalizaci extrakčních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti. Pro spektrofotometrickou detekci byly měřeny v koncentračním rozmezí od $1\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} do $1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1} a pro ampérometrickou detekci od $7{,}5\cdot10^{-9}$ mol l^{-1} do $1\cdot10^{-6}$ mol l^{-1}. Koncentrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí pro oba detektory. Meze stanovitelnosti dosahují hodnot mezi $3{,}9\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} a $1{,}7\cdot10^{-7}$ mol l^{-1} pro spektrofotometrickou detekci a mezi $7{,}2\cdot10^{-9}$ mol l^{-1} a $2{,}7\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} pro ampérometrickou detekci. Měření je komplikováno přítomností širokého píku látek přítomných v matrici a koeluujících spolu s analyty, ale větší selektivita ampérometrické detekce tento nežádoucí vliv zmírňuje.

Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN s využitím HPLC s ampérometrickou detekcí na platinové tubulární elektrodě a se spektrofotometrickou detekcí: kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm, 125×4 mm, mobilní fáze složená z acetonitrilu a 0,01 mol l^{-1} fosforečnanového pufru o pH 2,5 (40:60, V/V), detekční potenciál +1,0 V a vlnová délka 290 nm. Při využití ampérometrické detekce jsou koncentrační závislosti lineární v rozsahu od $8\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} do $8\cdot10^{-6}$ mol l^{-1}. Meze stanovitelnosti dosahují hodnot mezi $2{,}6\cdot10^{-8}$ mol l^{-1} a $8{,}9\cdot10^{-8}$ mol l^{-1}, což představuje o více než řád větší citlivost než v případě spektrofotometrické detekce. Metoda byla využita při stanovení analytů v modelových vzorcích lidské moči po předběžné separaci a prekoncentraci technikou SPE pomocí sorbentu LiChrolut® EN. Meze stanovitelnosti dosahují hodnot od $7{,}2\cdot10^{-9}$ mol l^{-1} do $2{,}7\cdot10^{-8}$ mol l^{-1}. Ampérometrická detekce je ve srovnání se spektrofotometrickou citlivější i selektivnější, což potvrzuje kvality použité pracovní elektrody.

Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt 92010), projektem Specifického vysokoškolského výzkumu 2011–263204 a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekty MSM 0021620857, RP14/63 a LC06035).

LITERATURA

1. Masson H. A., Ioannides C., Gorrod J. W., Gibson G. G.: Carcinogenesis *4*, 1583 (1983).
2. Cheung Y., Lewis D. F. V., Ridd T. I., Gray T. J. B., Ioannides C.: Toxicology *118*, 115 (1997).
3. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Vols. 1 to 42. Supp. 7, IARC, Lyon 1987.
4. Kirk O.: *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley, New York 1978.
5. Iglesias S. L., Desimone M. F., Copello G. J., Bertinatto J. A., Giorgieri S. A., Diaz L. E.: J. Anal. Chem. *61*, 588 (2006).
6. Gan J., Skipper P. L., Gago-Dominguez M., Arakawa K., Ross R. K., Yu M. C., Tannenbaum S. R.: J. Natl. Cancer Inst. *96*, 1425 (2004).
7. Štulík K., Hora V.: J. Electroanal. Chem. *70*, 253 (1976).
8. Blaedel W. J., Iverson D. G.: Anal. Chem. *49*, 1563 (1977).
9. Armentrout D. N., McLean J. D., Long M. W.: Anal. Chem. *51*, 1039 (1979).
10. Li T., Coufal P., Opekar F., Štulík K., Wang E.: Anal. Chim. Acta *360*, 53 (1998).
11. Cvačka J., Opekar F., Barek J., Zima J.: Electroanalysis *12*, 39 (2000).

OBSAH PŘÍSPĚVKŮ

Vendula Burdová, Vlastimil Vyskočil a Jiří Barek	Stanovení genotoxického 4-nitro-indanu pomocí polarografických a voltametrických metod na rtuťových a stříbrných pevných amalgámových elektrodách	s3
Zuzana Cieslarová a Pavel Matějka	Povrchem zesílená vibrační spektrometrie extraktů listoví ibišku (*Hibiscus* L.)	s10
Andrea Čížková, Martin Adam, Petra Pavlíková a Karel Ventura	Analýza složek silic v bylinných nápojích s využitím metody mikroextrakce jednou kapkou	s13
Hana Daňhelová, Tomáš Čajka a Jana Hajšlová	Metabolomické profilování tkání ryb pomocí hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru	s16
Jan Dědík, Vlastimil Vyskočil a Jiří Barek	Voltametrické stanovení nitrovaných ekotoxických sloučenin na leštěné stříbrné pevné amalgámové kompozitní elektrodě	s19
Štěpán Eichler a Oto Mestek	Speciační analýza selenu s využitím HPLC a ICP/MS pro výzkum distribuce selenu v bariérách jaderného úložiště	s24
Antonín Kaňa a Oto Mestek	Využití dynamické reakční cely pro stanovení železa metodou ICP-MS	s27
Martin Kroupa a Iryna Goncharova	Studium komplexů kyseliny listové s biogenními kovy chiroptickými metodami	s30
Radka Křížová, Jana Urbanová a Jana Hajšlová	Stanovení herbicidů s karboxylovou funkční skupinou technikou LC-MS/MS	s33
Ondřej Kurka, Renáta Myjavcová a Petr Bednář	Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností	s37
Eva Marková	Studium anodické oxidace polybromovaných fenolů	s40
Annamarie Némethová, Kamila Syslová a Petr Kačer	Příprava polymerních částic pro separaci biomarkerů z tělních tekutin jako předstupeň vývoje diagnostického proužku	s43
Olga Nykodýmová, Bohuslav Dvořák, Petra Bajerová, Aleš Eisner a Karel Ventura	Možnosti stanovení 2-ethylhexyl nitrátu v naftě	s46
Marek Papež, Ondřej Lacina, Darina Lanková, Jana Pulkrabová a Jana Hajšlová	´Nové´ organohalogenované kontaminanty ve vodním ekosystému	s51
Věra Pilařová, Josef Trögl a Václav Synek	Validace fotometrických stanovení dusitanů a CHSK-Cr pomocí setů Spectroquant® v zasolených vodách	s55
Kateřina Proksová, Karel Novotný, Michaela Galiová, Tomáš Vaculovič a Viktor Kanický	Studium distribuce prvků v močových kamenech s využitím laserové ablace ve spojení s ICP-MS spektrometrií	s58
Šárka Ramešová, Romana Sokolová a Karolina Pecková	Elektrochemické studium degradace přírodních barviv používaných na uměleckých památkách	s62
Tereza Rumlová, Ivan Jiránek a Jiří Barek	Elektrochemické stanovení 5-nitrochinolinu pomocí uhlíkové filmové elektrody	s65
Hana Švecová, Jitka Součková a Jana Skopalová	Studium agregace fosfolipidových molekul	s73
Jana Tvrdíková, Aleš Daňhel a Jiří Barek	Voltametrické stanovení 1,5-dinitronaftalenu na krystalové stříbrné amalgamové elektrodě	s76
Jiří Václavík, Marek Kuzma a Petr Kačer	*In situ* monitoring asymetrické transfer hydrogenace iminů pomocí NMR spektroskopie	s80
Tereza Warchilová, Tomáš Vaculovič, Oldřich Matal, Tomáš Šimo a Viktor Kanický	Mapování povrchů kovových materiálů pomocí LA-ICP-MS	s84
Jaroslava Zavázalová, Hana Dejmková, Jiří Barek a Karolina Pecková	Ampérometrická a spektrofotometrická detekce aminobifenylů a aminonaftalenů v HPLC	s87

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Adam Martin s13

Bajerová Petra s46
Barek Jiří s3, s19, s65, s76, s87
Bednář Petr s37
Burdová Vendula s3

Cieslarová Zuzana s10

Čajka Tomáš s16
Čížková Andrea s13

Daňhel Aleš s76
Daňhelová Hana s16
Dědík Jan s19
Dejmková Hana s87
Dvořák Bohuslav s46

Eichler Štěpán s24
Eisner Aleš s46

Galiová Michaela s58
Goncharova Iryna s30

Hajšlová Jana s16, s33, s51

Jiránek Ivan s65

Kačer Petr s43, s80
Kaňa Antonín s27
Kanický Viktor s58, s84
Kroupa Martin s30
Křížová Radka s33
Kurka Ondřej s37
Kuzma Marek s80

Lacina Ondřej s51
Lanková Darina s51

Marková Eva s40
Matal Oldřich s84
Matějka Pavel s10
Mestek Oto s24, s27
Myjavcová Renáta s37

Némethová Annamarie s43
Novotný Karel s58
Nykodýmová Olga s46

Papež Marek s51
Pavlíková Petra s13
Pecková Karolina s62, s87
Pilařová Věra s55
Proksová Kateřina s58
Pulkrabová Jana s51

Ramešová Šárka s62
Rumlová Tereza s65

Skopalová Jana s73
Sokolová Romana s62
Součková Jitka s73
Synek Václav s55
Syslová Kamila s43

Šimo Tomáš s84
Švecová Hana s73

Trögl Josef s55
Tvrdíková Jana s76

Urbanová Jana s33

Václavík Jiří s80
Vaculovič Tomáš s58, s84
Ventura Karel s13, s46
Vyskočil Vlastimil s3, s19

Warchilová Tereza s84

Zavázalová Jaroslava s87

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 105 (S), čís./no. Symposia • LISTY CHEMICKÉ roč./vol. 135, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 121 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze), ISSN 1803-2389 (CD verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohlav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámostný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/ MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/ INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: http://www.chemicke-listy.cz • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují • Redakce čísla Symposia (ISSUE EDITOR) J. Barek, Z. Kolská, K. Ventura, V. Vyskočil • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2011 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2011 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2011 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na http://www.chemicke-listy.cz , zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz http://cassi.cas.org/search.jsp) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 16.2.2011.