

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



„O CENU FIRMY MERCK 2010“

2. února 2010

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích



Editoři sborníku:

Jiří Barek

Libor Grubhoffer

Karel Ventura

Vlastimil Vyskočil



13. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE „O CENU FIRMY MERCK 2010“

V úterý 2. února 2010 úspěšně proběhl v prostorách přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích již 13. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos výborně zorganizovali kolegové z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck spol. s r.o. Význam této akce podtrhlo i její slavnostní zahájení děkanem přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity panem profesorem Liborem Grubhofferem. Všech 18 účastníků z deseti předních analytických pracovišť v České republice příkladným způsobem prezentovalo své výsledky, které jednoznačně přispívají nejen k výchově nastupující generace analytických chemiků, ale i k úspěšnému rozvoji této discipliny v našem státě. Kvalita prezentací bezesporu snesla i náročné světové měřítko a všichni soutěžící důstojně reprezentovali vysílající pracoviště. Autor tohoto příspěvku by rád všem soutěžícím bez ohledu na jejich konečné umístění poděkoval za dobře odvedenou práci.

1. místo získal **Bc. Štěpán Eichler** z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha za práci *Speciální analýza selektu v moči spojením HPLC A ICP/MS*, 2. místo získala **Bc. Oksana Yosypchuk** z Katedry analytické chemie PŘF UK v Praze za práci *Elektrochemická detekce karcinogenických derivátů pyrenu a jejich metabolitů* a 3. místo získal **Bc. Martin Švidrnoch** z Katedry analytické chemie PŘF UP v Olomouci za práci *Identifikace biologicky aktivních látek v krevní stopě na pevném povrchu hmotnostní spektrometrií*.

Vzhledem k mimořádné kvalitě všech soutěžních prací se porota navíc rozhodla udělit tři mimořádné ceny poroty a to **Bc. Kateřině Diákové** z Katedry biologie ekosystémů PŘF JU v Českých Budějovicích za práci *Analytická chemie v hodnocení alternativních systémů pro čištění odpadních vod*, **Bc. Janu Přechevi** z Ústavu organické technologie VŠCHT v Praze za práci *In-situ NMR studie mechanismu asymetrické hydrogenace substituovaných dihydroisochinolinů na Ru-katalyzátorech Noyoriho typu* a **Bc. Kateřině Ježkové** z Katedry analytické chemie FCHT Univerzity Pardubice za práci *Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS*.

Navzdory pověrám se pořadové číslo 13 nijak neprojevilo a soutěž byla zorganizována naprosto dokonale a proběhla ve vynikající atmosféře. Za to patří dík celému týmu kolegů z Jihočeské univerzity, jmenovitě prof.



Foto: Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2010“. Zleva Mgr. Rudolf Vodička náměstek primátora Statutárního města České Budějovice, RNDr. Renata Švajdová, Ph.D., Bc. Štěpán Eichler z VŠCHT Praha (1. místo), Bc. Oxana Yosypchuk z PŘF UK v Praze (2. místo), Bc. Martin Švidrnoch z PŘF UP v Olomouci (3. místo), prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., děkan PŘF JU v Českých Budějovicích a předseda poroty

RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., Mgr. Janu Štěrbovi, doc. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D., doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. a RNDr. Janu Šimovi, Ph.D. Vyvrcholení v podobě ocenění vítězů proběhlo ve fascinujících prostorách českobudějovické radnice, s jejíž historií i půvaby byli všichni účastníci detailně seznámeni. Zde nelze než závidět jihočeským kolegům jejich nádhernou spolupráci s vedením města, která má k místní univerzitě příkladný vztah, který jí většina ostatních vysokých škol v našem státě může jen závidět. Vyhlášení výsledků bylo následováno příjemným posezením v tradiční budějovické restauraci Masné krámy s její neopakovatelnou atmosférou. Dík všem účastníkům patří pochopitelně i firmě Merck a jejím zástupcům přítomným na soutěži, jmenovitě Ing. Lence Ungrmanové, Bc., Ing. Marcele Kubáskové a RNDr. Renatě Švajdové, Ph.D., která také zasedla v odborné porotě.

Na závěr nezbyvá než sdělit, že 14. ročník této soutěže se uskuteční na Přírodovědecké fakultě Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem v únoru 2011 a těšit se, že bude stejně úspěšný a příjemný jako ročník letošní.

Jiří Barek

ANALÝZA NUKLEOTIDŮ V KREVNÍCH SKVRNÁCH

ANNA BAREŠOVÁ, DAVID FRIEDECKÝ
a TOMÁŠ ADAM

Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
anba@post.cz

Úvod

Nukleotidy patří mezi biologicky významné nízkomolekulární látky, poruchy jejich metabolismu mohou způsobit vážné zdravotní postižení pacienta. Některé dědičné poruchy metabolismu nukleotidů je možné rozpoznat jejich analýzou v krevních skvrnách.

V předkládané práci je popsána metoda stanovení nukleotidů v krevních skvrnách kapilární elektroforézou. Jde o novou aplikaci metody analýzy nukleotidů v erytrocytech¹. Popisovaná metoda stanovení nukleotidů v krevních skvrnách byla aplikována na vzorky simulující některé dědičné metabolické poruchy, pro jejichž screening by ji bylo možné využít.

Experimentální část

Použité chemikálie byly analytické čistoty. Chemikálie byly zakoupeny od Sigma (St. Louis, USA), mimo diethylether, který pocházel od Lach-Ner (Neratovice, ČR).

Vzorky byly analyzovány na kapilární elektroforéze skládající se z křemenné kapiláry (75 μ m, 90 / 97 cm), UV

detektoru (Jasco, Tokio, Japonsko) a zdroje vysokého napětí (Spellman, New York, USA). Ke zpracování dat byl použit software Clarity (DataApex).

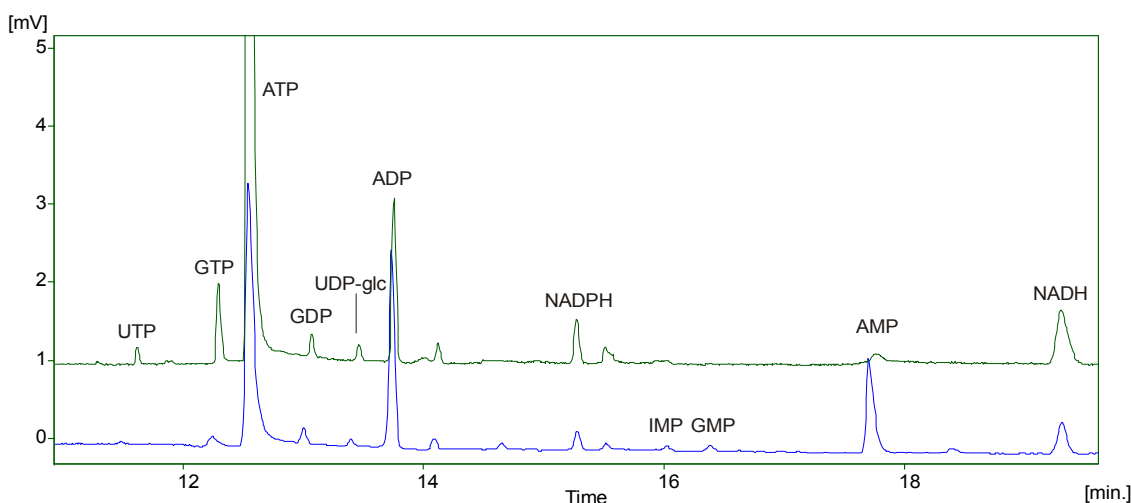
Separční pufr se skládal z 50mM kyseliny citronové a 0,8mM CTAB (cetyltrimethylammonium bromid), pH bylo upraveno na 4,3 kyselinou γ -aminomáselnou.

Vzorky byly připraveny z nesrážlivé krve. 40 μ l krve bylo nanášeno na kroužek vyznačený na krevním papírku, po zaschnutí byl kroužek vystřížen a extrahován 200 μ l vody (2 min, sonikováno). Extrakty (příp. vzorky čerstvé krve) byly deproteinovány 1M kyselinou trichloroctovou (TCA), centrifugovány (1 min, 7800 g) a nadbytečná TCA byla extrahována diethyletherem. Takto připravené vzorky byly skladovány při -20 °C.

Při simulaci metabolických poruch byly erytrocyty inkubovány 4 h při 37 °C v DMEM (Eaglovo médium

Tabulka I
Relativní směrodatné odchylky ploch

RSD v sérii [%]		RSD mezi dny [%]	
GTP	13,19	GTP	12,63
ATP	4,83	ATP	3,09
GDP	6,25	GDP	5,28
UDP-glc	43,18	UDP-glc	39,74
ADP	5,67	ADP	4,20
NADP	9,22	NADP	7,52
AMP	7,58	AMP	4,87
NAD	7,21	NAD	7,28



Obr. 1. Elektroferogramy vzorku čerstvé krve (zelená) a krevní skvrny (modrá)

modifikované podle Dulbecca) s nukleosidy (5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid AICAR, 2'-deoxyadenosin dAR, inosin HR, 2'-deoxyinosin dHR, 2'-deoxyguanosin dGR).

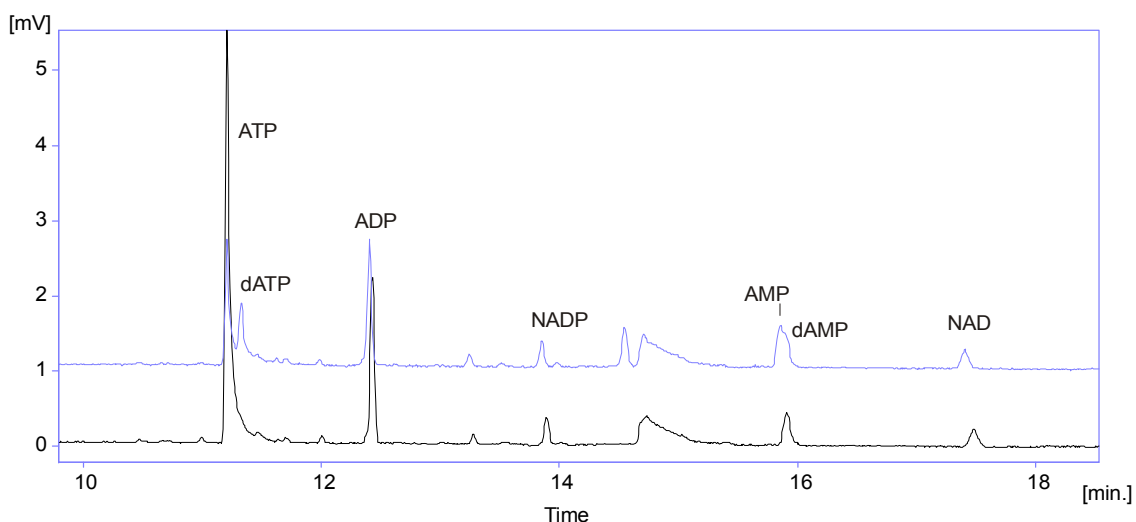
Hydrostatické dávkování vzorku bylo prováděno manuálně. Separace probíhala při napětí 24 kV, při laboratorní teplotě. Analyty byly detegovány fotometricky při 255 nm. Na začátku dne byla kapilára proplachována 0,1M-NaOH, 0,1M-HCl, 0,1M-SDS (dodecylsulfát sodný) a separačním pufrem, mezi měřeními pouze pufrem.

Výsledky a diskuse

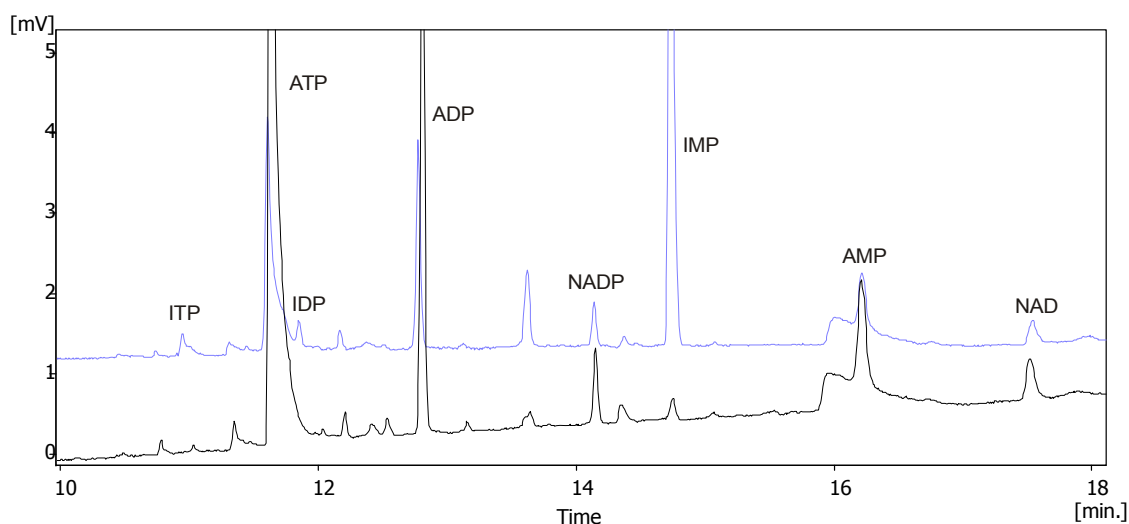
V krevních skvrnách dochází oproti čerstvé krvi ke snížení obsahu nukleosidtrifosfátů a zvýšení nukleosidmonofosfátů. Celkově jsou profily měřených nukleotidů srovnatelné (obr. 1).

Nukleotidy v krevní skvrně jsou relativně stálé. Nedochozí k významné změně během 5 dnů při laboratorní teplotě, srovnatelný profil bylo možno získat po 27 měsících při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Linearita, limit detekce a návratnost byly stanoveny pro UTP a IMP. Metoda je lineární v rozsahu 25 až



Obr. 2. Inkubace s dAR (modrá). Po inkubaci je patrná přítomnost deoxyATP a pravděpodobně deoxyAMP; černá linie – kontrola



Obr. 3. Inkubace s HR (modrá). Oproti kontrole (černá) došlo k výraznému zvýšení obsahu IMP a ITP, patrný je i IDP

1000 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$ pro UTP a 0,992 pro IMP). Limit detekce je 1,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Návratnost byla $43,8 \pm 4,5 \%$ pro UTP a $34,1 \pm 3,9 \%$ pro IMP. Vyšší návratnosti ($89,8 \pm 10,5 \%$ celkových adeninových nukleotidů) bylo dosaženo při extrakci 400 μl vody (15 s vortex, 45 s sonikováno).

Relativní směrodatné odchylky migračních časů jsou pod 3 % mezi vzorky, do 2 % v sérii a pod 5 % mezi různými dny. Relativní odchylky ploch pík jsou uvedeny v tab. I.

Při inkubaci byly nukleosidy transportovány do červených krvinek a konvertovány na příslušné nukleotidy. Získané elektroferogramy simulovaly obsah nukleotidů při deficitu adenosin deaminasy (inkubace s dAR, obr. 2), purin-nukleosid fosforylasy (dHR, dGR), AICAR transformylasy – IMP cyklohydrolasy (AICAR) nebo ITPasy (HR, obr. 3).

Závěr

Popsaná metoda je vhodná pro analýzu nukleotidů v krevních skvrnách. Separace sledovaných nukleotidů je dostatečně přesná a citlivá, doba měření nepřesahuje 20 min.

Pro malý objem odebrané krve, snadný transport a uchování a relativní stabilitu analytů představují krevní skvrny výhodný způsob odběru vzorku, metodu by proto bylo možné využít při screeningu dědičných metabolických poruch.

LITERATURA

1. Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janost'áková A., Procházka M., Adam T.: *Electrophoresis* 28, 373 (2007).

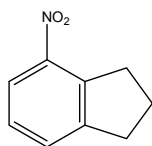
POLAROGRAFICKÉ A VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ GENOTOXICKÉHO 4-NITROINDANU NA RTUŤOVÉ KAPAJÍCÍ A STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGAMOVÉ ELEKTRODĚ

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 (CAS Name: 1*H*-indene, 2,3-dihydro-4-nitro-, CAS registry number: 34701-14-9, viz obr. 1) patří do skupiny nitrovaných polycyklických aromatických uhlovlodíků (NPAH). Jeho prekurzorem je indan – jedna ze složek benzínu¹. NPAH mohou vznikat přímo při spalovacích procesech, např. v benzinových či dieslových motorech, nebo v zemské atmosféře reakcí svých mateřských polycyklických aromatických uhlovlodíků (PAH) s OH či NO_x radikály². Mono- a dinitro PAH vykazují několikanásobně větší mutagenitu či karcinogenitu než jejich matečné PAH, takže jejich sledování je v popředí moderní environmentální analytické chemie². Do popředí se tak dostávají finančně nenákladné citlivé elektroanalytické metody vhodné pro velkoplošné monitorování, při nichž se využívá snadné elektrochemické redukce nitroskupiny na aromatickém jádře NPAH^{3,4}. Mimořádně významná je skutečnost, že představují nezávislou alternativu k převládajícím spektrometrickým a chromatografickým metodám^{2,5}. Určitou nevýhodu moderních polarografických a voltametrických metod, kterou je poněkud menší selektivita, lze úspěšně kompenzovat jejich kombinací s předběžnou separací pomocí kapalinové extrakce či extrakce tuhou fází^{3,6}. Přes obrovský pokrok ve vývoji nových typů elektrod a elektrodových materiálů zůstává faktem, že klasické rtuťové elektrody i 80 let po jejich zavedení do analytické chemie patří stále k nejspolehlivějším a nejcitlivějším senzorům. Klasická kapající rtuťová elektroda (DME) má proti jiným elektrodám výhodu naprosto čistého, atomárně hladkého a stále periodicky obnovovaného povrchu. Navíc je konstrukčně mimořádně jednoduchá a spolehlivá. Dvě hlavní nevýhody DME, tj. relativně velká spotřeba rtuti během vlastní analýzy a obtížné použití DME při analýzách



Obr. 1. Strukturální vzorec 4-nitroindanu

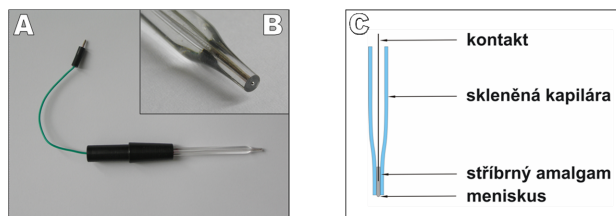
v polních podmínkách, byly vyřešeny zavedením pevných elektrod na bázi dentálního amalgamu⁴. Varianta, kdy leštěný povrch pevné amalgamové elektrody je modifikovaný rtuťovým meniskem (m-AgSAE; viz obr. 2), se již dříve osvědčila při voltametrickém stanovení stopových množství různých ekotoxických a genotoxických látek⁴. Navíc vzhledem k obavám z toxicity rtuti a jejích výparů⁷ představuje m-AgSAE vhodnou náhradu za rtuťové elektrody – stříbrný amalgam je netoxický a jeho elektrochemické vlastnosti se téměř neliší od vlastností rtuti.

Cílem této práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení mikromolárních a submikromolárních koncentrací 4-nitroindanu pomocí DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) na DME a pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na m-AgSAE s co nejnižší mezi stanovitelností. Nově vypracované polarografické a voltametrické metody byly porovnány s UV-VIS spektrofotometrickým stanovením 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 rozpustěním 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 (BR) pufrы o potřebném 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, Brno, ČR). Další chemikálie (kyselina chlorovodíková a chlorid draselný, vše čistota p.a.) byly zakoupeny od firmy Lachema, Brno, ČR. Použitá deionizovaná voda byla produkována systémem Milli-Q_{plus} (Millipore, Billerica, USA).



Obr. 2. Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda m-AgSAE (A), detail menisku (B) a schéma elektrody (C)

Aparatura

Při polarografických a voltametrických měřeních byl použit počítačem řízený systém Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (vše Polaro-Sensors, Praha, ČR). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla kapající rtuťová elektroda či stříbrná pevná amalgamová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem (EcoTrend Plus, Praha, ČR) o průměru amalgamového disku 0,52 mm. Jako referenční sloužila elektroda argenticchloridová typu RAE 113 (1 mol l⁻¹ KCl) a jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda typu PPE (obě Monokrystal, Turnov, ČR).

Při DCTP a DPP na DME byla používána polarizační rychlost 4 mV s⁻¹, elektronicky řízená doba kapky 1 s a výška rezervoáru 64 cm (doba kapky při zvolené výšce rezervoáru byla 3,3 s a průtoková rychlost rtuť byla 2,6 mg s⁻¹; měřeno při vloženém nulovém napětí v 0,1 mol l⁻¹ KCl). Při DC a DP voltametrii na m-AgSAE byla používána polarizační rychlost 20 mV s⁻¹, pulsy o šířce 100 ms a modulační amplituda -50 mV byly použity v pulsní technice. Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 řízeném počítačem pomocí ovládacího programu UV-Visible ChemStation 9.01 (vše Agilent Technologies, Santa Clara, USA) v křemenných kyvetách měrné tloušťky (*l*) 1,0 cm (Hellma, Müllheim, Německo). Hodnoty pH byly měřeny digitálním pH-metrem Jenway 4330 s kombinovanou skleněnou elektrodou typu 924 005 (vše Jenway, Chelmsford, Velká Británie).

Pracovní postupy

Při polarografických a voltametrických měřeních bylo do 10 ml odměrné baňky odpipetováno potřebné množství roztoku 4-nitroindanu v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 5 ml a roztok byl doplněn po značku BR pufrům o příslušném pH (prostředí o hodnotách pH 2,0 a 13,0 byla realizována nahrazením BR pufru roztoky 0,01 mol l⁻¹ HCl, resp. 0,1 mol l⁻¹ NaOH). Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby, zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) a byl zaznamenán příslušný polarogram či voltamogram. Všechny křivky byly měřeny třikrát a poté statisticky vyhodnoceny. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů bylo použito programů OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Konfidenční pásy byly sestaveny na hladině významnosti 0,05 (cit.⁸). Mez stanovitelnosti (*L_Q*) byla počítána jako desetinásobek směrodatné odchylky (pro počet měření *n* = 10) stanovení sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky⁹.

V rámci měření byly s m-AgSAE prováděny tři operace, kterými byl obnovován její povrch¹⁰:

1) Amalgamace – byla prováděna jednou týdně, nebo

když se vyskytly komplikace s reprodukovatelností či citlivostí měření. Ponořením dolní části elektrody do lahvičky s kapalnou rtuť 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 amalgamací. 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.

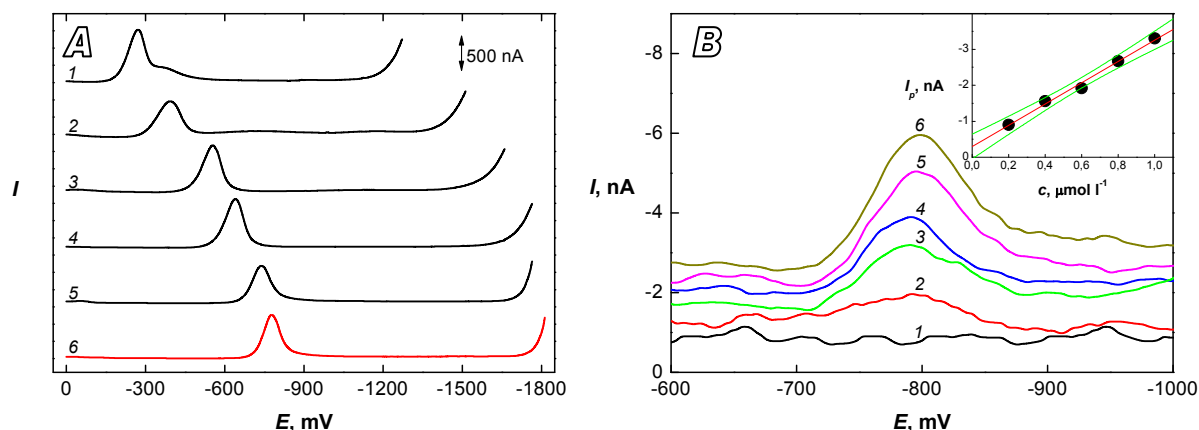
3) Regenerace – byla prováděna v analyzovaném roztoku před každým měřením a spočívala ve skokovém střídání kladnějších *E_{1,reg}* a zápornějších *E_{2,reg}* potenciálů daných použitým základním elektrolytem a stanovenou látkou, v intervalu 0,05 s po dobu 25 s. (Optimální hodnotu *E_{1,reg}* a *E_{2,reg}* je pro každou látku nutno najít experimentálně).

Výsledky a diskuse

Vliv pH na elektrochemické chování 4-nitroindanu (*c* = 1·10⁻⁴ mol l⁻¹) při DCTP i DPP na DME byl sledován v prostředí BR pufr – methanol (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 2,0 až 5,0) ještě druhou polarografickou vlnu s negativnějším půlplnovým potenciálem. To je v souladu s polarografickým chováním pozorovaným u podobných mononitroderivátů PAH, jejichž elektrochemická redukce na DME probíhá v kyselém prostředí rovněž ve dvou krocích¹¹. Půlplnový 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 půlplnový potenciál první vlny na pH nezávisí. DP polarografické chování 4-nitroindanu je pak zcela v souladu s polarografickým chováním při DCTP na DME. Zaznamenané DP polarografické křivky ukazují obr. 3A. Jako optimální prostředí pro DCT i DP polarografické stanovení 4-nitroindanu bylo zvoleno prostředí BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1). DP polarogramy v nejnižším měřitelném koncentračním rozmezí (0,2 až 1,0 μmol l⁻¹) jsou pro ilustraci zobrazeny na obr. 3B. Vypočtené parametry kalibračních přímek pro DCTP a DPP stanovení 4-nitroindanu na DME jsou uvedeny v tab. I.

Voltametrické chování 4-nitroindanu při DCV a DPV na m-AgSAE je podobné jeho chování při DPP na DME. Poloha píků opět závisí na pH (viz obr. 4A). 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)



Obr. 3 (A) DP polarogramy 4-nitroindanu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na DME v prostředí BR pufr – methanol (1:1); pH BR pufru 2,0 (1), 4,0 (2), 6,0 (3), 8,0 (4), 10,0 (5) a 12,0 (6); červená křivka značí vybrané optimální pH pro DPP stanovení 4-nitroindanu. (B) DP polarogramy 4-nitroindanu na DME v prostředí BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1); $c(4\text{-nitroindan})$: 0 (1), 0,2 (2), 0,4 (3), 0,6 (4), 0,8 (5) a 1,0 (6) $\mu\text{mol l}^{-1}$. Vložena odpovídající kalibrační přímka

Tabulka I
Parametry kalibračních přímek stanovení 4-nitroindanu

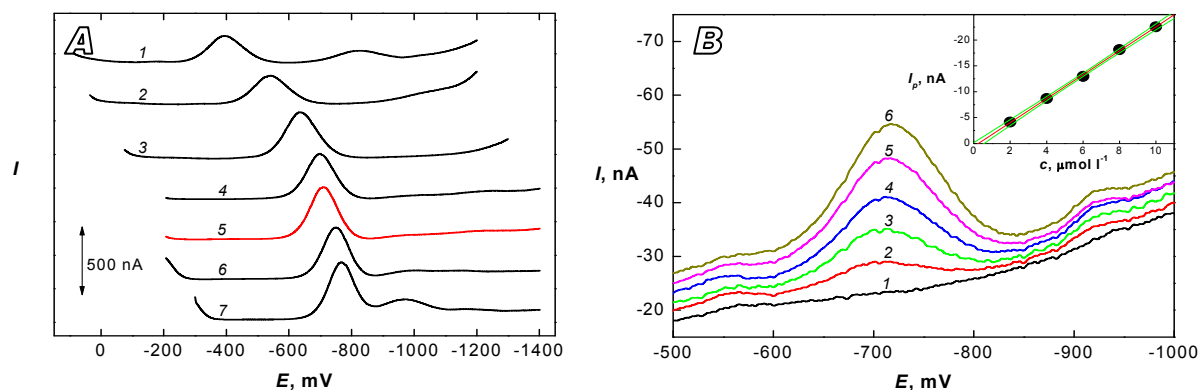
Technika [optimální prostředí]	Koncentrace [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Směrnice ^a [mA mol^{-1}]	Úsek ^a [nA]	Korelační koeficient	L_Q^b [mol l^{-1}]
DCTP na DME [BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1)]	20 – 100 2 – 10	$-6,5 \pm 0,6$ $-4,3 \pm 0,4$	22 ± 39 $-1,2 \pm 2,4$	$-0,9988$ $-0,9990$	— $7 \cdot 10^{-7}$
DPP na DME [BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1)]	20 – 100 2 – 10 0,2 – 1	$-6,5 \pm 0,6$ $-4,5 \pm 0,7$ $-3,0 \pm 0,5$	5 ± 39 $-2,9 \pm 4,4$ $-0,3 \pm 0,3$	$-0,9988$ $-0,9968$ $-0,9964$	— — $1 \cdot 10^{-7}$
DCV na m-AgSAE [BR pufr pH 5,0 – methanol (1:1)]	20 – 100 2 – 10 0,1 – 1	$-2,7 \pm 0,2$ $-2,4 \pm 0,2$ $-1,7 \pm 0,2$	6 ± 13 $0,3 \pm 1,3$ $-0,8 \pm 0,1$	$-0,9993$ $-0,9991$ $-0,9970$	— — $1 \cdot 10^{-7}$
DPV na m-AgSAE [BR pufr pH 9,0 – methanol (1:1)]	20 – 100 2 – 10 0,1 – 1	$-2,7 \pm 0,5$ $-2,3 \pm 0,1$ $-1,2 \pm 0,2$	15 ± 31 $0,6 \pm 0,8$ $0,0 \pm 0,1$	$-0,9957$ $-0,9996$ $-0,9912$	— — $1 \cdot 10^{-7}$
UV-VIS spektrofotometrie methanol	20 – 100 2 – 10	$7,5 \pm 0,5^c$ $6,7 \pm 4,3^c$	-11 ± 30^d 4 ± 29^d	$0,9995$ $0,9425$	— $4 \cdot 10^{-7}$

^a Intervalové hodnoty reprezentují horní a dolní mez intervalu spolehlivosti, ^b mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^c rozměr směrnice je mAU mol^{-1} , ^d rozměr úseku je mAU

jako optimální pro DPV stanovení 4-nitroindanu na m-AgSAE.

S použitím regeneračního kroku mezi jednotlivými měřeními v optimálním prostředí činila opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou ($n = 20$) vyhodnocené výšky voltametričeského píku 4-nitroindanu ($c =$

$1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) 1,0 % pro DCV ($E_{1,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{2,\text{reg}} = -1100 \text{ mV}$) i DPV ($E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$ a $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$) na m-AgSAE. Rozsah měřených koncentrací 4-nitroindanu byl pro obě voltametričeské techniky 0,1 až $100 \mu\text{mol l}^{-1}$. DP voltamogramy v koncentračním řádu $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ jsou pro ilustraci zobrazeny na obr. 4B a parametry příslušných



Obr. 4. (A) DP voltamogramy 4-nitroindanu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí BR pufru – methanol (1:1); pH BR pufru 2,0 (1), 4,0 (2), 6,0 (3), 8,0 (4), 9,0 (5), 10,0 (6) a 12,0 (7); červená křivka značí vybrané optimální pH pro DPV stanovení 4-nitroindanu. (B) DP voltamogramy 4-nitroindanu na m-AgSAE v prostředí BR pufru pH 9,0 – methanol (1:1); $E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$; c (4-nitroindan): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5) a 10 (6) $\mu\text{mol l}^{-1}$. Vložena odpovídající kalibrační přímka

kalibračních přímkou jsou uvedeny v tab. I.

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

Závěr

Bylo prostudováno elektrochemické chování 4-nitroindanu a za nalezených optimálních podmínek bylo provedeno jeho stanovení pomocí DC tast polarografie (v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) a diferenční pulsní polarografie ($2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na klasické rtuťové kapající elektrodě a pomocí DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie (obě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě. Dosažené meze stavitelnosti se u všech stanovení pohybují v řádu $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a jsou srovnatelné nebo nižší než mez stavitelnosti dosažené pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 267 nm.

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

LITERATURA

- Mormile M. R., Suflita J. M.: *Anaerobe* 2, 299 (1996).
- Zielinska B., Samy S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 883 (2006).
- Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
- Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
- Barek J.: *Chem. Listy* 91, 1038 (1997).
- Vyskočil V., Barek J., Jiránek I., Zima J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M. M., ed.), kap. 5, str. 171. Nova Science Publishers, New York 2008.
- Boyd A. S., Seger D., Vannucci S., Langley M., Abraham J. L., King L. E.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, 81 (2000).
- Matthias O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, 2. vydání, str. 194. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.
- Yosypchuk B., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1733 (2002).
- Zuman P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58, 41 (1993).

ANALYTICKÁ CHEMIE V HODNOCENÍ ALTERNATIVNÍCH SYSTÉMŮ PRO ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

KATEŘINA DIÁKOVÁ^a, JAN ŠÍMA^b,
CARLOS A. ARIAS^c a HANS BRIX^c

^a Katedra biologie ekosystémů, ^b Ústav chemie a biochemie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^c Plant Biology, Department of Biological Sciences, University of Aarhus, Ole Worms Allé, Bldg 1135, 8000 Århus C, Denmark
katka.diakova@gmail.com

Úvod

Čištění odpadních vod, a tedy prevence kontaminace půd a vodních toků splašky, je jednou z povinností moderní civilizace vůči životnímu prostředí i vůči společnosti samé. Odpadní vody jsou v České republice z velké části sváděny do centrální kanalizace, která zpravidla ústí do velkých, energeticky náročných mechanicko-biologických čistíren odpadních vod (ČOV). Tyto čistící systémy využívající aktivovaného kalu navíc potřebují stálou zátěž, tj. kontinuální přísun organického znečištění. Z výše uvedeného je zřejmé, že nejsou vhodné k čištění odpadních vod z izolovaných či sezónních zařízení.

V současné době jsou však již dostupné ekonomické, vysoce účinné a ekologicky šetrné technologie, které tento problém řeší. Například v Dánsku jsou takové alternativní systémy malých měřitek nutností v důsledku řídkého osídlení země a přísných legislativních limitů pro látky obsažené ve vypouštěné přečištěné vodě¹.

Tato studie využívá metod moderní analytické chemie k hodnocení účinnosti odstraňování znečišťujících látek ve čtyřech typech malých ČOV. Ve spolupráci s dánským vědeckým kolektivem byly sledovány běžné parametry znečištění jako obsah nutrientů, nerozpuštěné látky a fyzikálně-chemické charakteristiky. Zvláštní pozornost byla věnována oxidačním stavům síry. Sírany patří mezi akceptory elektronů v anaerobní respiraci mikroorganismů podílejících se na odstraňování nutrientů, při němž jsou redukovány na elementární síru až sulfidy. Proto poměr oxidačních forem síry může sloužit jako anorganický indikátor oxidačně redukčních podmínek v jednotlivých systémech. Získané poznatky přispějí k lepšímu porozumění procesům uvnitř systému.

Experimentální část

Popis systémů a experimentální uspořádání

Předmětem studie bylo 13 malých systémů pro čištění odpadní vody z jednotlivých domácností nebo malých

vesnic nacházejících se v blízkosti dánského města Århus. Ty byly vybrány jako zástupci čtyř typů malých ČOV běžně užívaných pro decentralizované čištění odpadních vod v Dánsku:

- tři umělé mokřady s horizontálním podpovrchovým tokem (horizontal flow constructed wetlands HFCW), (obr. 1a),
- čtyři umělé mokřady s vertikálním tokem (vertical flow constructed wetlands VFCW), (obr. 1b),
- tři biologické pískové filtry (biological sandfilters BSF), (obr. 1c),
- tři biofiltry (biofilters BF) využívající jako substrát lehký expandovaný jíla, (obr. 1d,e).

Vzorky byly odebírány na přítoku a odtoku každého systému třikrát v zimním období (listopad – prosinec 2008) a třikrát v letním období (červenec – srpen 2009). Během odběru byly v každém vzorku měřeny pH, teplota, vodivost, redoxní potenciál a rozpuštěný kyslík. Vzorky byly přepravovány a uchovávány za nepřístupu vzduchu.

Analytické metody

Sulfidy byly stanoveny spektrofotometrickou metodou založenou na jejich reakci s okyseleným roztokem 4-amino-*N,N*-dimethylanilinu (*N,N*-dimethylbenzen-1,4-diaminu), kde za přítomnosti Fe^{3+} vzniká methylenová modř^{2,3}. Sírany byly stanoveny turbidimetrickou metodou vycházející z reakce síranů s ionty Ba^{2+} , kde vzniká bílý zákal (BaSO_4)^{3,4}. Metody byly optimalizovány a řádně zvalidovány (tabulka I). Pro všechna spektrofotometrická

Tabulka I
Charakteristiky analytických metod pro stanovení oxidačních forem síry

Charakteristika	S^{2-}	SO_4^{2-}
LOD ^a , mg l^{-1}	0,04	2,18
LOQ ^b , mg l^{-1}	0,13	7,26
LDR ^c , mg l^{-1}	LOQ – 4,0	LOQ – 200
Korelační koeficient	0,9998	0,9947
Citlivost, 1/mg)	0,342	0,009
Opakovatelnost kalibračního standardu, %	0,90	3,08
Opakovatelnost reálného vzorku, %	5,34	3,87
Správnost, %	101,37	96,78

^a LOD – mez detekce, ^b LOQ – mez stanovitelnosti,

^c LDR – lineární dynamický rozsah

stanovení byl použit PharmaSpec UV-1700 spektrofotometr (Shimadzu, Japan).

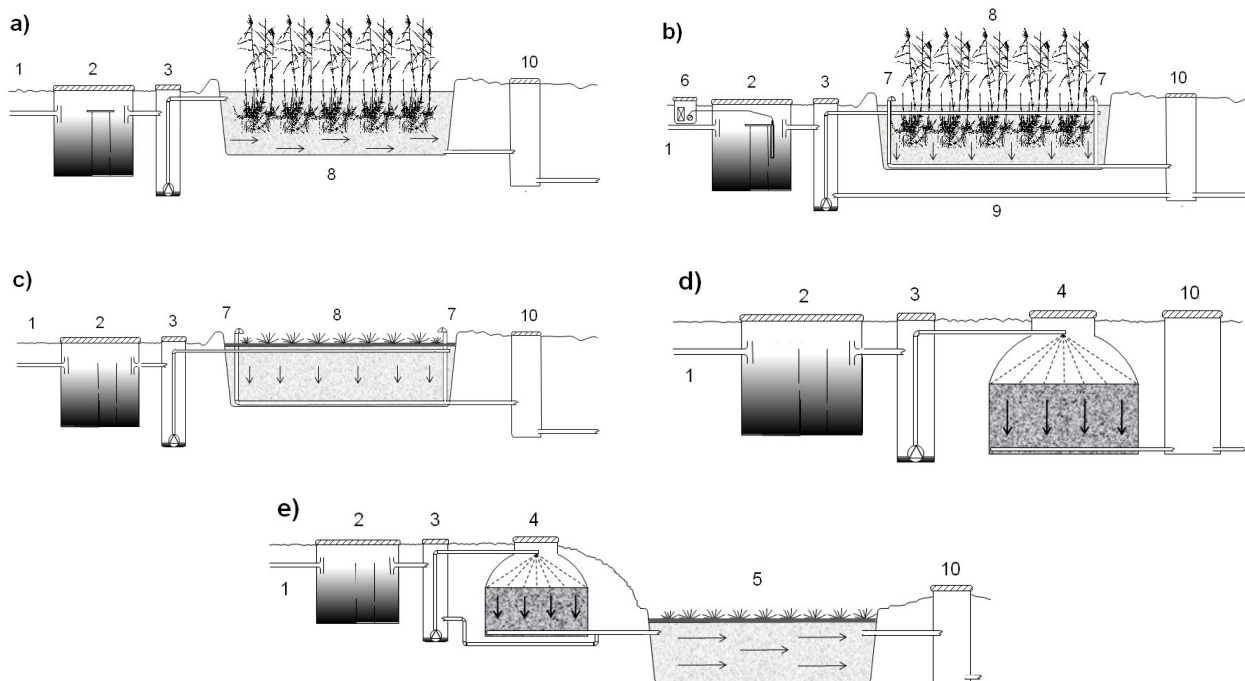
V nefiltrovaných vzorcích byla dále titračně stanovena chemická spotřeba kyslíku (CHSK_{Cr}), suma organického a amoniakálního dusíku (TKN) Kjeldahlovou metodou a celkový fosfor (TP) spektrofotometrickou metodou s molybdenem amonným, vinanem antimonylodraselným a kyselinou askorbovou⁴. Nerozpuštěné látky (NL) byly stanoveny gravimetricky. Ve filtrovaných vzorcích byla analyzována suma dusičnanů a dusitanů ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), amoniakální dusík ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) a fosforečnany (PO_4^{3-}) (cit.⁴) za použití přístroje QuickChem FIA 8000 Series (Lachat Instruments, USA). Některé kovy (Ca, Na, Fe, Zn, Cd, Ni, Cr, Cu) a celková síra byly stanoveny plazmovou emisní spektrometrií (ICP-OES, Plasma II Emission Spectrometer, Perkin Elmer, USA). Získaná data byla statisticky zpracována v programech Statistica 8 a Canoco for Windows 4.5.

Výsledky a diskuse

Výsledky analýz oxidačních stavů síry spolu s parametry měřeními *in-situ* ukázaly, že během procesu čištění je dosaženo zvýšeného efektu prokysličené čišťené vody. Odpadní voda na přítoku má ve většině případů silné anaerobní vlastnosti, zatímco přečištěná voda na odtoku neobsahuje významné množství redukovaných forem

látek, které mohou v životním prostředí působit škodlivě⁵ (stanovené koncentrace $\text{NH}_4^+\text{-N}$ a sulfidů se pro upravenou vodu většinou pohybovaly pod mezí detekce). Pro případ skupiny umělých mokřadů s horizontálním tokem jsou tyto výsledky v souladu se závěry, vyplývajícími z několikaletého monitorování umělého mokřadu při jihočeské obci Slavošovice, kde byla prokázána schopnost aerace intersticiální vody ve štěrkovém loži na základě analýz různých anorganických indikátorů redoxních podmínek^{6–9}.

Nezávisle na konstrukčním uspořádání monitorovaných systémů, každý z nich spolehlivě odstraňuje nerozpuštěné látky (NL), organické znečištění (CHSK) a amoniakální dusík ($\text{NH}_4^+\text{-N}$). Všechny splňují legislativně stanovené limity pro odtékající přečištěnou vodu ve všech povinných parametrech. Nejvyšší schopnost odstraňování tří zobrazených parametrů prokazují umělé mokřady s vertikálním tokem. V tomto systému protéká voda nenasaturovaným štěrkovým ložem ve vertikálním směru (obr. 1b). Dochází v něm tedy, v porovnání s ostatními typy, k nejlepšímu okysličování, a proto je zde proces nitrifikace (transformace NH_4^+ na NO_2^- , NO_3^-) nejintenzivnější¹. Naopak v saturovaném štěrkovém loži umělého mokřadu s horizontálním tokem (obr. 1a) je schopnost prokysličování omezena na kořenovou zónu rostlin¹⁰ a rozhraní vody a vzduchu, takže nitrifikace zde není tak intenzivní. Nejvíce zatížené jsou systémy skupiny biofiltrů, neboť jsou využívány pro jednotlivé domácnosti



Obr. 1. Schémata čtyř sledovaných typů systémů k čištění odpadní vody; a) HFCW, b) VFCW, c) BSF, d) BF Natusan[®], e) BF Filtralite-P[®], 1 – přítok, 2 – septik, 3 – studna s čerpadlem, 4 – dóm s rozprašovačem a substrátem z expandovaného jílu, 5 – filtrační lože, 6 – dávkovač příměsí, 7 – aerační trubice, 8 – štěrkové lože s rákosem, 9 – recirkulace, 10 – odtok

a přitékající odpadní voda není zředěna. I přesto prokazují vysokou účinnost odstraňování sledovaných znečišťujících látek.

Závěr

Moderní analytická chemie disponující vysoce citlivými a selektivními instrumentálními metodami je progresivní interdisciplinární vědní obor, který nám umožňuje získat velice cenné informace o vlastnostech mokřadních systémů využívaných k úpravě kvality odpadních vod i o procesech v nich probíhajících. Výrazně tak napomáhá nejenom k charakterizování zmíněných ekosystémů, ale rovněž k efektivní a systematické péči o životní prostředí.

Experimentální činnost byla finančně podpořena programem Erasmus, nadací Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových a rozvojovým projektem MŠMT na podporu mobility studentů. Uvedené studie byly též sponzorovány z výzkumného záměru MSM 6007665801. Poděkování patří i mému školiteli Janovi Šímovi a celému oddělení Plant Biology, Århus University, DK, speciálně jeho vedoucímu Hansovi Brixovi a Carlosovi A. Ariasovi.

LITERATURA

1. Brix H., Arias C. A.: *Ecological Engineering* 25, 491 (2005).
2. Malát M.: *Absorpční anorganická fotometrie*. Academia, Praha 1973.
3. Horáková M., Lischke P., Grünwald A.: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. SNTL, Praha 1986.
4. APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20. vyd. American Public Health Association, Washington, DC 1998.
5. van der Welle M. E. W., Roelofs J. G. M., Lamers L. P. M.: *Sci. Total Environ.* 406, 426 (2008).
6. Šíma J., Holcová V., Dušek J., Diáková K.: *Chem. Listy* 100, 911 (2006).
7. Diáková K., Holcová V., Šíma J., Dušek J.: *Chemistry & Biodiversity* 3, 1288 (2006).
8. Šíma J., Diáková K., Holcová V.: *Chemistry & Biodiversity* 4, 2900 (2007).
9. Šíma J., Diáková K., Pavelcová L., Havelka M.: *Chemistry & Biodiversity* 6, 341 (2009).
10. Choi J. H., Park S. S., Jaffé P. R.: *Environ. Pollut.* 140, 286 (2006).

SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V MOČI SPOJENÍM HPLC A ICP/MS

ŠTĚPÁN EICHLER a OTO MESTEK

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

Úvod

Selen je nepostradatelný prvek pro lidský organismus. Váže se do selenoproteinů, z nichž nejznámější je glutathionperoxidasa (GPx)¹, která chrání buňky proti oxidačnímu poškození. Je tedy důležitý při prevenci nádorových a kardiovaskulárních onemocnění a předcházení poruchám štítné žlázy a reprodukční funkce. Pro populaci ČR jsou doporučené dávky 55 µg/den pro dospělého člověka. Intoxikace nastává již při příjmu 1000 µg/den a dávka vyšší než 5 mg kg⁻¹ je již smrtelná². Nadbytečné množství příjmu selenu je z organismu vylučováno močí. Dle studií jsou v moči obsaženy tyto formy selenu: seleničitan (Se(IV)), selenan (Se(VI)), methylselenol, methylseleničitan, trimethylselenium (TMSe⁺), selenomethionin (SeMet), selenogluthation, selenocystin (Se-Cys₂), selenomočovina (SeUr), selenoethionin (SeEt), selenocystein (SeCys), methylselenomethionin, selenocystamin (SeCya), selenoadenosyl-methionin a selenocukry 1, 2 a 3 (cit.³).

Mezi hlavní cíle studie patřila separace a identifikace specií selenu obsažených ve vzorcích moči. Další oblastí výzkumu bylo ověření stanovení celkového obsahu selenu pro různé porovnávací prvky. Posledním bodem je sledování změn specií selenu zastoupených v moči po požití potravinových doplňků bohatých na selen u zdravých jedinců a u kriticky nemocných pacientů (sepsa, stádium akutního selhání orgánů), kterým je selen podáván kontinuálně společně s umělou výživou.

Experimentální část

Chemikálie a základní roztoky

Základní roztok selenu (ZR) o koncentraci 2 mg l⁻¹ Se byl připraven ředěním roztoku o koncentraci 1,000 ± 0,002 g l⁻¹ Se (Merck). Roztok porovnávacích prvků (IS) o koncentraci 2,5 mg l⁻¹ Ge, In a Rh byl připraven z roztoků obsahujících 1,000 ± 0,002 g l⁻¹ daných prvků (Merck). Byla připravena mobilní fáze⁴ s obsahem: 2,5 mmol l⁻¹ butansulfonát sodný (Sigma-Aldrich), 4 mmol l⁻¹ kyselina malonová (Merck), 8 mmol l⁻¹ hydroxid tetramethyl amonia (Sigma-Aldrich, USA) a 0,05% methanol (Merck) v demineralizované vodě (Milli-Q, Millipore, USA). Pro identifikaci specií v moči byly použity tyto sloučeniny selenu: seleničitan sodný, selenan sodný, selenomethionin,

selenocystin a selenomočovina, vše Sigma-Aldrich. K okyselování roztoků byla použita kyselina dusičná (Suprapur, Merck). Všechny roztoky byly připraveny z redestilované a demineralizované vody (Milli-Q, Millipore, USA).

Roztoky pro stanovení

Roztoky pro ověření linearit byly připraveny ředěním roztoku ZR. Do 50ml odměrných baněk s 5 ml roztoku syntetické moči, 1 ml kyseliny dusičné a 1 ml roztoku IS byly připraveny roztoky o koncentraci 20, 40, 60, 80 a 100 ng ml⁻¹ Se. Roztoky pro určení meze detekce byly připraveny do 50ml odměrných baněk s postupným přidáváním 3–7 ml roztoku syntetické moči, 1 ml kyseliny dusičné, 1 ml roztoku IS baňky a doplněny demineralizovanou vodou. Pro ověření správnosti byly do 50 ml odměrných baněk připraveny ředěním roztoku ZR dva kalibrační roztoky o koncentraci 0 a 20 ng ml⁻¹ Se. Oba roztoky byly okyseleny 1 ml kyseliny dusičné a obsahovaly přírůstek 1 ml roztoku IS. Analýza reálných vzorků moči probíhala po jejím naředění. Pipetovalo se 1 nebo 2 ml moči do 25ml odměrné baňky, roztoky byly okyseleny 0,5 ml kyseliny dusičné a obsahovaly přírůstek 0,5 ml roztoku IS. Byl použit vzorek reálné moči, který byl rozdělen na dva podíly. První byl analyzován neupravený, druhý po přidávku roztoku ZR odpovídajícímu celkovému zvýšení koncentrace o 80 ng ml⁻¹.

Vzorky

Vzorky moči pro speciální analýzu byly před analýzou přefiltrovány (Nylon syringe filter 0,45 µm, Chromservis, Praha, ČR). Vzorky moči obohacené speciemi selenu byly připraveny tak, že z jednotlivých specií selenu byly nejprve v demineralizované vodě připraveny základní roztoky o koncentraci odpovídající cca 20 mg l⁻¹ Se. Z těchto základních roztoků byly následně připraveny roztoky o koncentraci cca 20 ng ml⁻¹. Moč pocházející od dárce po konzumaci potravinového doplňku bohatého na selen (100 µg Se v jedné tabletě, Nature's Bounty, USA) byla odebírána 12 h po požití a okamžitě přefiltrována. Moč od pacientů v kritickém stavu, kterým je selen podáván kontinuálně (max 120 µg selenu/den), byla rovněž upravena jako v předchozím případě. Vzorky moči byly skladovány v chladničce při -35 °C.

Instrumentace

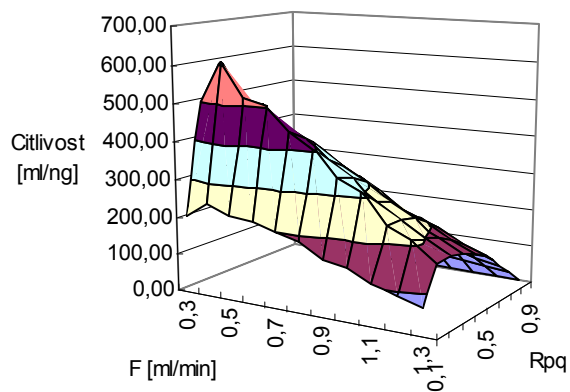
Všechna měření metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP/MS) byla prováděna na spektrometru Elan DRC-e (Perkin Elmer, Concord, Kanada) vybaveném koncentrickým zmlžovačem

s cyklonickou mlžnou komorou a reakční/kolizní celou (DRC) pro eliminaci interferencí. Pro stanovení selenu byl monitorován nejvíce zastoupený izotop ^{80}Se , který poskytuje silné interference s dimerem argonu vznikající v proudu plazmatu. Analýza selenových specií probíhala na aparatuře vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC), která se skládala z vysokotlaké pumpy (Series 200, Perkin Elmer, USA), dávkovače Rheodyne 9125 vybaveného 50 μl nástřikovou smyčkou z materiálu PEEK, stejně jako kapiláry spojující jednotlivé části aparatury, a kolony RP-C18e (Lichrocart 250 \times 4,6 mm).

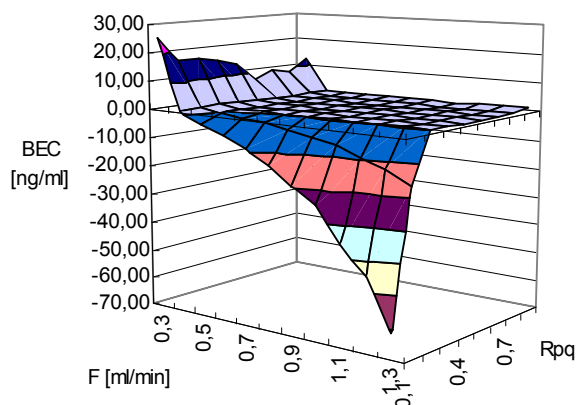
Výsledky a diskuse

Optimalizace parametrů DRC

Nejvíce zastoupený izotop selenu ^{80}Se tvoří značné interference s dimerem argonu. Proto byla k potlačení



Obr. 1. Graf závislosti citlivosti stanovení na průtoku methanu a parametru Rpq



Obr. 2. Graf závislosti parametru BEC na průtoku methanu a parametru Rpq

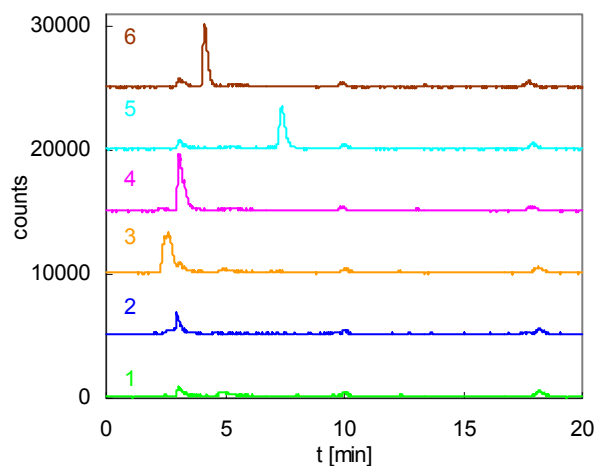
těchto interferencí provedena optimalizace DRC pomocí změny průtoku methanu v rozsahu 0,3–1,3 ml min^{-1} a nastavením parametru Rpq v rozmezí 0,1–1. Optimalizačním kritériem byla citlivost a odstup signálu od pozadí tzv. koncentrace ekvivalentní pozadí (BEC). Z grafů závislosti průtoku methanu a parametru Rpq na citlivosti (obr. 1) a BEC (obr. 2) byla vybrána optimální hodnota průtoku 0,7 ml min^{-1} a Rpq 0,4.

Výběr vhodného porovnávacího prvku

Výběr vhodného porovnávacího prvku byl prováděn na základě stanovení meze detekce a ověření linearity a správnosti. Stanovené detekční limity selenu s porovnávacím prvkem ^{72}Ge , ^{114}In , ^{103}Rh byly 0,462; 0,709 a 0,693 ng ml^{-1} . Na základě vyhodnocení linearity Mandelovým testem⁵ byla ověřena lineární kalibrace pro všechny tři porovnávací prvky ^{72}Ge , ^{103}Rh , ^{114}In . Pro ověření správnosti byla použita metoda standardního přidavku s dvojitým způsobem ředění (1 a 2 ml moči do 25 ml odměrné baňky) a dvěma průtoky argonu zmlžovačem (0,63 a 0,7 l min^{-1}). Pro vyhodnocení správnosti byl použit test shodnosti výsledků⁵, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití ^{73}Ge a ^{74}Ge při ředění 2 ml do 25 ml a průtoku argonu zmlžovačem 0,7 l min^{-1} .

Identifikace separovaných specií v reálných vzorcích moči

Pro speciální analýzu byly analyzovány vzorky odebrané reálné moči obohacené 20 ng ml^{-1} pěti speciemi selenu (Se(VI), Se(IV), SeMet, SeUr, SeCys₂). Jak je patrné (obr. 3), specie Se(VI), SeMet, SeUr se podařilo na koloně spolehlivě oddělit. Pouze SeCys₂ a Se(IV) se nepodařilo separovat. Vzhledem k pravděpodobnému obsahu

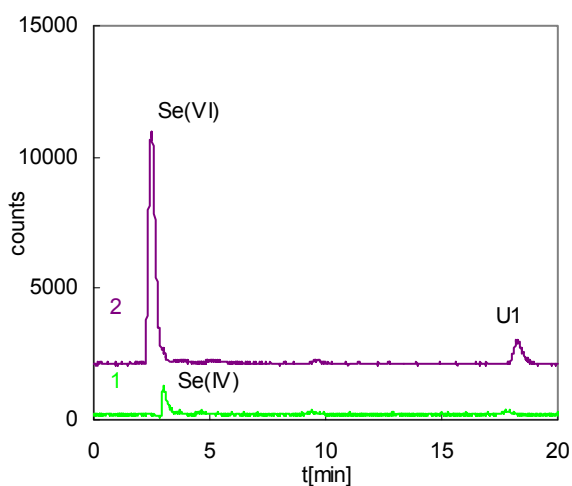


Obr. 3. Separace jednotlivých specií selenu v moči; 1 – čistá moč; 2 – Moč+Se(IV) $t_r=2,57$ min; 3 – Moč+Se(VI) $t_r=2,98$ min; 4 – Moč+SeCys₂ $t_r=3,02$ min; 5 – Moč+SeMet $t_r=7,52$ min; 6 – Moč+SeUr $t_r=4,02$ min

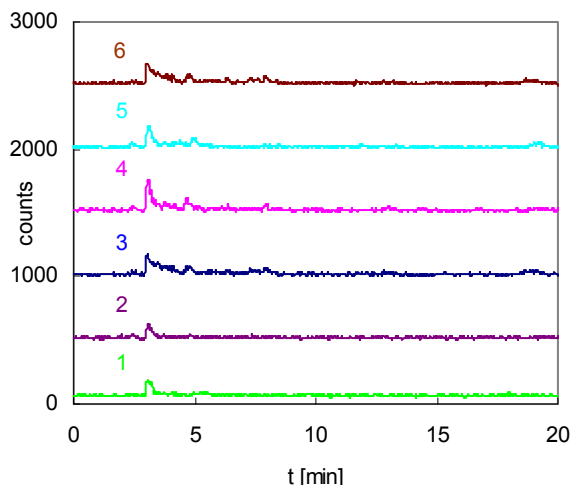
jedné či obou těchto forem selenu v moči bude třeba optimalizovat proces separace, zejména složením mobilní fáze a volbou gradientové eluce.

Analýza specií selenu v moči u jedinců se zvýšeným příjmem selenu

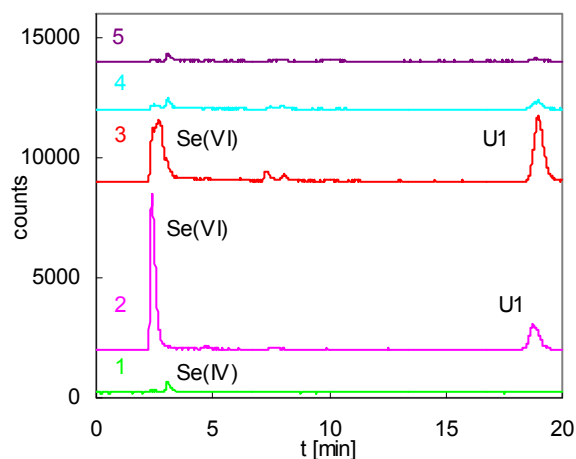
Speciační analýza selenu byla prováděna v moči zdravých jedinců po požití potravinového doplňku s obsahem selenu (100 µg selenu/den) a u kriticky nemocných pacientů, kterým je selen podáván kontinuálně v umělé výživě



Obr. 4. Vzorek moči zdravého jedince po požití tablety potravinového doplňku s obsahem selenu; 1 – moč před požitím tablety; 2 – moč zřed. 1:3, 12 h po požití tablety – 100 µg selenu na 1 tabletu



Obr. 5. Vzorek moči kriticky nemocných pacientů, kterým je selen přidáván do umělé výživy; 1,2 – pacient bez zatížení; 3,4,5,6 – pacient se zatížením 32–120 µg selenu na den



Obr. 6. Vzorek moči zdravého jedince po požití tablety; 1 – moč před požitím; 2 – moč 3 h po požití; 3 – moč 9 h po požití; 4 – moč 12 h po požití; 5 – moč 15 h po požití

(max 120 µg selenu/den). Z obr. 4 je patrné, že ve vzorku čisté moči zdravého jedince je majoritně zastoupena pouze specíe Se(IV), přičemž požití jedné tablety vede k prudkému nárůstu obsahu Se(VI) a mírného nárůstu zatím neznámé specíe (U1) s retenčním časem 18,3 min. V moči pacientů (obr. 5) s přibližně stejným denním příjmem selenu dochází k malé změně a pouze v malé míře vzniku nových zatím blíže neidentifikovaných specií. Organismus těchto pacientů zřejmě veškerý přijatý selen začlenil do svého metabolismu, zatímco organismus zdravého jedince nepotřebný selen okamžitě vyloučil. Z obr. 6 je rovněž patrné, že prudký nárůst selenanu u zdravého jedince se projevuje již v moči odebrané 3 h po požití tablety, zatímco prudký nárůst neznámé specíe (U1) můžeme pozorovat až ve vzorku moči odebraném 9 h po požití.

Závěr

Speciační analýza selenu je velmi důležitá pro objasnění jeho metabolické funkce v organismu. Ve vzorcích moči zdravých jedinců odebrané po požití potravinového doplňku s obsahem selenu byl prokázán velký nárůst selenanu, který se v nezátížených vzorcích moči vůbec nevykytoval. Rovněž došlo ke vzniku nových specií, které bude třeba s použitím vhodného standardu v budoucnu identifikovat. U moči pacientů, kterým je podávána stejná denní dávka, nedošlo k žádné radikální změně v obsahu a speciaci selenu v moči a tedy se lze domnívat, že organismus těchto nemocných pacientů veškerý přijatý selen začlenil do svého metabolismu. V budoucnu bude tedy třeba vyvinout a optimalizovat podmínky separace i pro další specíe, jejichž přítomnost je v moči očekávána.

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

LITERATURA

1. Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C.: *Sci. Total. Environ* 400, 115 (2008).
2. Střítecká H., Hlúbik P.: Nutriční problematika selenu. Ve sborníku (Helán V., ed.). *Mikroelementy 2007. Kouty, 3-5.9. 2007*, str. 126-132.
3. Francesconi K., Panier F.: *Clin. Chem.* 50, 2240 (2004).
4. Zheng J., Masaki O., Naoki F.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 730 (2002).
5. Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke, J.: *Handbook of Chemometrics and Qalimetrics*. Elsevier, Amsterdam 1997.

ANALÝZA KYSELINY L-ASKORBOVÉ V NÁPOJÍCH S VYUŽITÍM TECHNIKY MEPS

KATEŘINA JEŽKOVÁ, PETRA PAVLÍKOVÁ,
PETR DOBIÁŠ, MARTIN ADAM a KAREL
VENTURA

$$I\% = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \cdot 100 \quad (1)$$

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

Úvod

Kyselina askorbová patří mezi přírodní antioxidanty. Tyto látky chrání buňky před účinky volných radikálů, tj. aktivních forem kyslíku, které v organismu vznikají např. působením výfukových plynů, kouření, UV záření atd. Převaha volných radikálů způsobuje tzv. oxidační stres^{1,2}. Kyselina askorbová se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, stimuluje transport sodných a chloridových iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu a v řadě dalších reakcí³.

Mikroextrakce tuhou fází v mikrostríkačce – MEPS (MicroExtraction by Packed Sorbent) je moderní mikroextrakční technikou izolace zkoumaného analytu z matrice. Zvolená tuhá fáze je umístěna do bloku v injekční jehle, která je vsunuta do injekční stříkačky. Přes tento blok je nasáván vzorek a sledované analyty jsou sorbovány a převedeny. Po promytí jsou zachycené analyty eluovány organickým rozpouštědlem na chromatografickou kolonu. MEPS je výsledkem snahy o miniaturizaci extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction – SPE). Oproti SPE ovšem pracuje s mnohem nižšími objemy vzorků (až do 10 µl) i rozpouštědel a lze ji plně automatizovat. Dále může být bez jakýchkoliv modifikací spojena on-line s LC nebo GC. Mezi další výhody MEPS patří rychlost, nízká cena, přesnost, citlivost a selektivita⁴⁻⁶.

Antioxidační kapacita je míra, jakou jsou antioxidanty schopné eliminovat volné radikály. Metody měření antioxidační kapacity dělíme na chemické a fyzikální. Mezi chemické metody patří metody založené na eliminaci syntetických radikálů DPPH (2,2-difenyl-pikrylhydrazyl) nebo ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)), případně na eliminaci kyslíkových radikálů (ORAC – oxygen radical absorbance capacity), dále pak metody využívající redukci železitých komplexů (FRAP – ferric reduction antioxidant power). Inhibice radikálu DPPH (*I*) se dá vyjádřit v procentech vztahem (*I*), kde A_{blank} odpovídá absorbanci získané při slepém pokusu a A_{sample} absorbanci analyzované sloučeniny^{7,8}.

Experimentální část

Analyzováno bylo 10 vzorků nealkoholických nápojů od českých, slovenských a rakouských výrobců zakoupených v maloobchodní síti. Z rozpouštědel a činidel byly použity následující: ethanol (pro UV), methanol (pro HPLC), kyselina L-askorbová p.a., kyselina octová p.a., volný radikál DPPH (vše Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a redestilovaná voda (Univerzita Pardubice).

K nalezení vhodné vlnové délky pro detekci kyseliny askorbové a pro stanovení antioxidační kapacity byl použit HELIOS Gamma UV-VIS spektrometr (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA USA). K izolaci kyseliny askorbové z matrice byla použita mikroextrakce tuhou fází v mikrostríkačce MEPS s kapacitou 100 µl a sada BIN (barrel insert and needle assembly) jehel s náplněmi (vše Chromservis s.r.o, Praha, Česká republika).

Pro analýzu extraktů byl použit kapalinový chromatograf GBC LC 1445, vybaven pumpou LC 1150, degasem ERC-3415, autosamplerem LC 1650 a UV detektorem LC 1210 (vše GBC, Regents Park, Austrálie). K separaci byla použita kolona LiChrospher® 100 RP-18e (250 × 3 mm i.d., 5 µm) a předkolonka LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm), vše Merck (Darmstadt, Německo).

Po zjištění vhodných podmínek pro MEPS (jehla BIN, extrakční rozpouštědlo, objem rozpouštědla) byly vzorky nealkoholických nápojů extrahovány přes silikagelovou jehlu (BIN) a eluovány 10% methanolem. Vzorek nealkoholického nápoje o objemu 100 µl byl natažen do mikrostríkačky MEPS se silikagelovou jehlou a následně vypuštěn do odpadu. Poté bylo přes jehlu nataženo 60 µl 10% methanolu. Získaný extrakt byl analyzován pomocí HPLC-UV.

Pro vlastní analýzu byl na kolonu dávkován objem 20 µl standardu, resp. extraktu. Byly použity dvě mobilní fáze: redestilovaná voda okyselená kyselinou octovou, pH 2,94 (MF A) a methanol (MF B). Bylo pracováno s isokratickou elucí s 80% MF A po dobu 20 min. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml min⁻¹. Pro detekci kyseliny L-askorbové byla použita vlnová délka 258 nm. Každý extrakt byl proměřen 3×. Kvalitativní vyhodnocení bylo provedeno porovnáním retenčních časů se standardem. Následovalo vyhodnocení kvantitativní, ke kterému byla použita metoda kalibrační křivky.

Při stanovení antioxidační kapacity byla nejprve změřena absorbance čerstvě připraveného roztoku DPPH (o koncentraci 0,025 g l⁻¹). Následně bylo k 5 ml roztoku

DPPH přidáno 200 μ l 10 \times zředěného nealkoholického nápoje a po 5 min stání na temném místě byla opět změřena absorbance. Měření probíhalo při vlnové délce 517 nm. Antioxidační kapacita byla vyhodnocena v % dle vztahu (*I*) jako množství inhibovaného radikálu DPPH.

Výsledky a diskuse

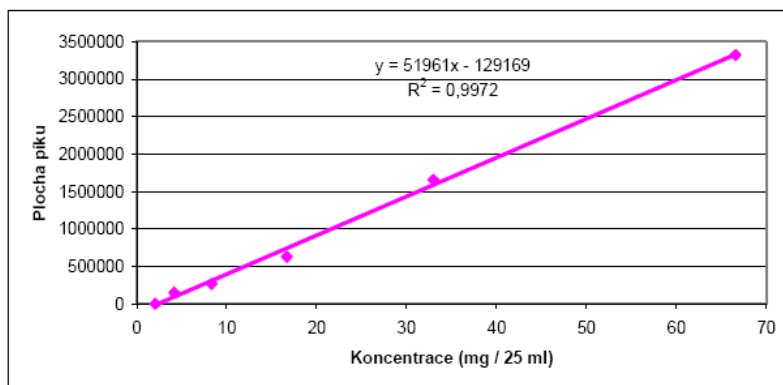
Byly zjišťovány vhodné podmínky pro mikroextrakci MEPS: jehla BIN (C2, C8, C18, Silikagel a M1), extrakční rozpouštědlo (5%, 10%, 20% a 100% methanol, 5%, 10%, 20% a 96% ethanol, destilovaná voda a 2,5% kyselina octová) a objem extrakčního rozpouštědla (10–100 μ l). Jako vhodné byly nalezeny tyto hodnoty: silikagelová jehla (BIN) a 60 μ l 10% methanolu.

Pro možnost kvantitativního vyhodnocení byla proměřena kalibrační řada (obr. 1), a to v rozsahu 2,08 až 66,6 mg kyseliny L-askorbové v 25ml odměrných baň-

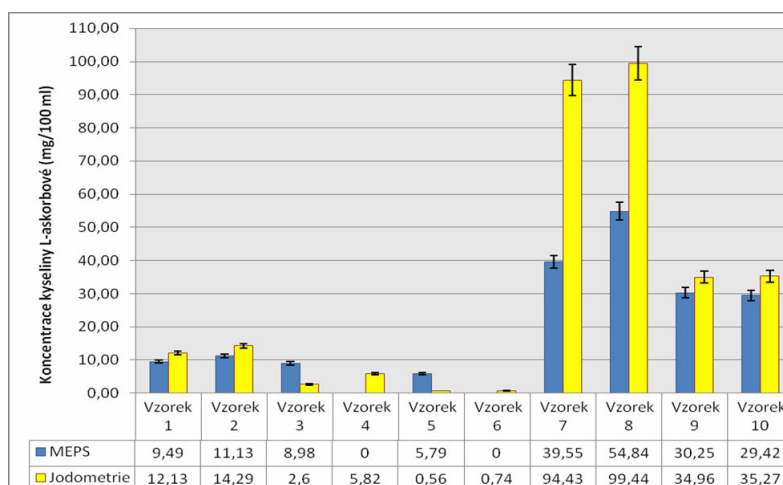
kách, při aplikaci metody MEPS s použitím eluce 60 μ l 10% methanolu. Z grafu je patrné, že metoda poskytuje lineární odezvu v celém sledovaném koncentračním rozsahu. Křivka protíná osu x v bodě 2,49 mg/25 ml, což lze považovat za experimentálně zjištěnou hodnotu detekčního limitu. Kalibrační řada ve stejném rozsahu koncentrací byla proměřena také s přidavkem 2,5 g/25 ml cukru, avšak nebyla pozorována žádná změna v odezvě.

Na obr. 2 jsou hodnoty získané při aplikaci optimalizované MEPS na 10 reálných vzorků. Pouze u vzorků číslo 7, 8, 9 a 10 stanovená hodnota obsahu kyseliny L-askorbové odpovídala hodnotám udávaným výrobcem nealkoholického nápoje.

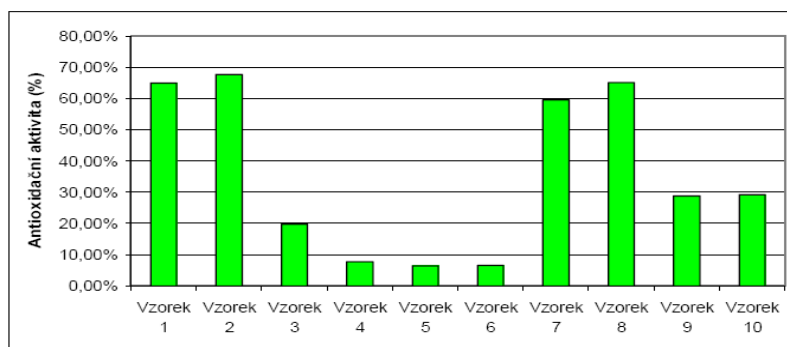
Pro zjištění antioxidační kapacity vzorků byla použita metoda využívající redukci volného radikálu DPPH. Tato metoda je jednoduchá na provedení a časově nenáročná. K výpočtu antioxidační kapacity byl použit vztah (*I*). Získané hodnoty antioxidačních kapacit nealkoholických nápojů jsou graficky znázorněny na obr. 3.



Obr. 1. Kalibrační řada kyseliny L-askorbové pro optimalizovanou metodu MEPS



Obr. 2. Stanovený obsah kyseliny L-askorbové ve 100 ml nealkoholického nápoje



Obr. 3. Antioxidační kapacita analyzovaných nealkoholických nápojů

Zjištěná antioxidační kapacita nekorresponduje pouze s obsahem kyseliny L-askorbové, ale s celkovým obsahem všech antioxidantů ve vzorku. U vzorků číslo 7, 8, 9 a 10, kde je hlavním antioxidantem kyselina L-askorbová, souvisí vyšší antioxidační kapacita s obsahem právě této kyseliny. Naopak u vzorků číslo 1 a 2 souvisí především s obsahem polyfenolů.

Závěr

Na závěr experimentu lze konstatovat, že byly nalezeny vhodné podmínky pro aplikaci mikroextrakce tuhou fází v mikrostříkačce na stanovení kyseliny L-askorbové v nealkoholických nápojích. Tato nová metoda se jeví jako vhodná pro izolaci látek s antioxidačním charakterem. Dále byly stanoveny antioxidační kapacity studovaných vzorků. Nejvyšší hodnoty inhibice volného radikálu poskytují vzorky čajového původu, což souvisí i s přítomností polyfenolických látek.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502) a Grantové agentury ČR (projekt 203/08/1536).

LITERATURA

- Ortembergová A.: *Mládneme s antioxidanty*. Nakladatelství Ivo Železný, Praha 2002.
- Hu Ch. Ch., Lin J. T., Lu F. J., Chou F. P., Yang D. J.: *Food Chem.* 109, 439 (2008).
- Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. OSSIS, Tábor 1999.
- Altun Z., Abdel-Rehim M.: *Anal. Chim. Acta* 630, 116 (2008).
- Vita M., Skansen P., Hassan M., Abdel-Rehim M.: *J. Chromatogr., B* 817, 303 (2005).
- Abdel-Rehim M.: *J. Chromatogr., B* 801, 317 (2004).
- Es-Safi N., Kollmann A., Khelifi S., Ducrot P.: *Food Sci. Technol. INT* 40, 1246 (2007).
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Yumrutas O., Sokmen A.: *Food Chem.* 98, 9 (2006).

STANOVENÍ FOSFORU METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

ANTONÍN KAŇA a OTO MESTEK

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

Úvod

Fosfor je jedním z hlavních prvků vyskytujících se v organismech. Je součástí skeletu, nukleových kyselin, energetických fosfátů (ATP, ...), fosfolipidů a mnoha dalších důležitých látek. Významně se tak podílí na metabolismu¹. Z toho plyne potřeba kvantitativního stanovení fosforu, ať už z důvodu nutnosti studia metabolických dějů nebo monitorování jeho výskytu např. v potravinách či životním prostředí.

Vhodnou metodou pro prvkovou analýzu je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Přímá aplikace na stanovení fosforu je však komplikována přítomností spektrálních interferencí polyatomických iontů². Tyto ionty mají téměř stejný poměr hmotnosti a náboje (m/z) jako analyt, takže u ICP-MS s nízkým rozlišením dochází k překryvu signálů těchto iontů a analytu. Polyatomické ionty odvozené od atomů uhlíku, kyslíku, vodíku, dusíku a dalších prvků pocházejí převážně z matrice vzorku³. V případě fosforu měřeného na linii $^{31}\text{P}^+$ se jedná především o ionty $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ a $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+\text{H}_3^{16}\text{O}^+$. Z dalších potenciálních interferentů lze uvést seskupení $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^+\text{H}^+$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$ nebo $^{30}\text{Si}^+\text{H}^+$ (cit.²⁻⁹). Situace je navíc ztížena tím, že je fosfor monoizotopický prvek, a tak k jeho stanovení nelze zvolit jiný izotop^{2,6}. Proto byla testována také možnost stanovení fosforu ve formě oxidu $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, kterou ve své práci uvádí Bandura a spol.³, využívající reakce fosforu s kyslíkem v dynamické reakční cele (DRC). Jeho práce popisuje možnost výrazné redukce interferencí a ukazuje dobré výsledky v dosažených detekčních limitech³. Ani seskupení $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ však není zcela bez interferencí. Více či méně závažných interferencí je zde celá řada: $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{30}\text{Si}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$ a mnoho dalších²⁻⁹.

Průběh reakce kyslíku s fosforem v DRC lze ovlivnit nastavením řady parametrů, z nichž nejvýznamnější jsou parametr a (RPa), parametr q (RPq) a průtok reakčního plynu. RPa a RPq jsou parametry úzce související s intenzitou elektrického pole na tyčích kvadrupólu uvnitř DRC. Změnou těchto parametrů lze docílit destabilizace prekurzorů interferujících iontů a částečně tak zabránit jejich vzniku³.

Cílem práce bylo tedy optimalizovat metodiku stanovení fosforu. K dosažení tohoto cíle bylo nutné kvantifiko-

vat interference na liniích $m/z = 31$ a $m/z = 47$, najít optimální podmínky tvorby iontu $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ a nakonec stanovit parametry získané metody jako jsou linearita a mez detekce. Správnost metody byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu a vzorku fazolí, ve kterých byl obsah fosforu stanoven spektrofotometricky.

Experimentální část

Vzorky pro kvantifikaci interferencí a optimalizaci DRC obsahující fosfor, dusík, uhlík a chlor byly připravovány ředěním roztoků 99,999% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$, Analytika, spol. s r.o., Praha, ČR), 65% HNO_3 , HCl 1:10 (obě Suprapur, Merck, Darmstadt, SRN) a CH_3OH (Uvasol, Merck, Darmstadt, SRN). K ředění byla používána demineralizovaná voda Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Zásobní roztok vnitřního standardu obsahoval 2 mg l^{-1} Ge, Rh a 1 mg l^{-1} In v $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ HNO_3 a byl připraven ředěním roztoků obsahujících dané kovy o koncentraci $1,000 \pm 0,005 \text{ g l}^{-1}$ (Analytika, spol. s r.o., Praha, ČR). V DRC byl jako reakční plyn použit kyslík čistoty 5.0 (Siad, Braňany u Mostu, ČR).

Pro ověření správnosti stanovení byl použit vzorek fazolí s obsahem fosforu $4,77 \pm 0,47 \text{ mg g}^{-1}$. Daný obsah fosforu v nich byl stanoven spektrofotometricky metodou molybdenové modři¹³. Dále byl analyzován certifikovaný referenční materiál sušeného mléka BCR 063R (IRMM, Geel, Belgie) s obsahem fosforu $11,10 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$.

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. Vzorek je zaváděn koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou. Hmotnostním analyzátozem je zde kvadrupól.

Parametry DRC byly optimalizovány v následujících rozsazích: RPq 0,1–0,9; RPa 0,01–0,10 a průtok reakčního plynu kyslíku 0,3–1,5 ml min^{-1} .

Kvantitativní stanovení fosforu bylo realizováno na linii $m/z = 31$ odpovídající iontu $^{31}\text{P}^+$ a $m/z = 47$ odpovídající iontu $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$. Vnitřní standardy byly měřeny na liniích $m/z = 72$ (Ge), $m/z = 103$ (Rh) a $m/z = 115$ (In). Veškerá kvantitativní měření byla realizována metodou vnitřního standardu.

Výsledky a diskuse

Kvantifikace interferencí polyatomických iontů

Pozadí vytvářené interferujícími ionty bylo měřeno při $m/z = 31$ a $m/z = 47$ ve standardním režimu bez aplika-

ce DRC. K určení původu interferencí byl měřen zvlášť roztok obsahující HNO_3 a zvlášť roztok obsahující HCl s CH_3OH . Methanol simuluje zbytkový uhlík po rozkladu vzorku.

U roztoku s obsahem HCl a CH_3OH byla naměřena nízká úroveň falešně pozitivní koncentrace $^{31}\text{P}^+$. Z toho lze usoudit, že interference způsobené ionty obsahující uhlík jsou zanedbatelné. Naproti tomu falešně pozitivní signál $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ je u daného roztoku o tři řády vyšší a výrazně závislý na koncentraci HCl . To znamená, že interference iontů kombinujících uhlík s chlorem jsou významné.

Měřením roztoku HNO_3 byla zjištěna velmi podobná úroveň interferencí pro $^{31}\text{P}^+$ i $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$. Polyatomické ionty obsahující dusík tedy vznikají v přibližně stejném množství, které však u $^{31}\text{P}^+$ výrazněji závisí na koncentraci HNO_3 .

Optimalizace DRC

Cílem optimalizace reakční cely bylo nalézt takovou kombinaci hodnot parametrů, při které by bylo dosaženo maximálního signálu fosforu ve formě iontu $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ a zároveň co nejnižšího falešně pozitivního signálu interferentů. Falešně pozitivní signál byl stejně jako v případě kvantifikace měřen pro roztok obsahující dusík a roztok obsahující chlor s uhlíkem zvlášť. Velikost falešně pozitivního signálu byla charakterizována koncentrací ekvivalentní pozadí (*BEC*).

Maximum signálu fosforu bylo dosaženo při průtoku kyslíku $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, $RPq = 0,4$ a $RPa = 0$. Při těchto parametrech je však pozorována rovněž zvýšená *BEC*. Ta je způsobena tím, že ve stejné oblasti leží také maximum intenzity signálu interferentů. Úroveň *BEC* dosahuje hodnot srovnatelných s hodnotami získaných při kvantifikaci interferencí bez použití DRC.

Jelikož se nepodařilo významně snížit intenzitu interferencí oproti měření bez použití reakční cely, bylo jako vhodnější zvoleno měření bez tohoto prvku. V dalších měřeních tak nebyla DRC využita.

Linearita a mez detekce

Linearita kalibrační závislosti byla testována v koncentračním rozsahu $0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$ P pro analyt $^{31}\text{P}^+$ a v rozsahu $0\text{--}50 \text{ mg l}^{-1}$ P pro $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ za použití Mandelova F-testu¹⁰. Současně byla testována vhodnost tří různých vnitřních standardů (IS): Rh, Ge, In. Lineární závislost byla u $^{31}\text{P}^+$ zjištěna pouze pro IS Ge, a to v celém rozsahu $0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$. Pro $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ byla zjištěna linearita jen pro IS In, avšak v rozsahu koncentrací fosforu $0\text{--}30 \text{ mg l}^{-1}$.

Mez detekce byla také stanovena za použití vnitřních standardů Rh, Ge a In, a to jako průměr koncentrace plus trojnásobek směrodatné odchylky. Mez detekce se na rozdíl od linearity v rámci různých vnitřních standardů téměř neliší. Pro $^{31}\text{P}^+$ byla stanovena na $33 \mu\text{g l}^{-1}$ a pro $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ na $29 \mu\text{g l}^{-1}$. Takto nízká mez detekce se jeví jako zcela

dostačující, protože v běžných biologických materiálech se koncentrace fosforu pohybuje v desítkách až tisících mg kg^{-1} resp. mg l^{-1} (cit.¹¹). Lze tak analyzovat i poměrně hodně zředěné roztoky. To je praktické zejména z hlediska eliminace nespektrálních interferencí¹².

Správnost stanovení

Analýzou certifikovaného referenčního materiálu sušeného mléka BCR 063R a vzorku fazolí byla ověřena správnost stanovení fosforu metodou ICP-MS. Obsah fosforu ve vzorcích byl stanoven za použití již uvedených vnitřních standardů na liniích $m/z = 31$ a $m/z = 47$.

Vyhodnocení správnosti stanovení obsahu P ve vzorku bylo provedeno testem výtěžnosti. Ten ukázal, že stanovení ve formě iontu $^{31}\text{P}^+$ poskytuje výsledky, které nejsou statisticky významně odlišné od certifikované hodnoty. Naopak stanovení formy $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ dává výsledky vyšší, které jsou již významně odlišné od certifikované hodnoty.

Závěr

Optimalizací nastavení reakční cely nebylo dosaženo významného snížení intenzity interferencí u iontu $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$. Pozadí se pohybuje na téměř stejné úrovni, jako při měření bez použití reakční cely. Nebylo dosaženo ani zvýšení citlivosti měření. Z tohoto důvodu bylo za vhodnější zvoleno stanovení bez DRC. Z forem iontů byl pak vybrán $^{31}\text{P}^+$, který trpí méně závažnými interferencemi než $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$. Pro měření $^{31}\text{P}^+$ bez DRC byla stanovena linearita kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu $0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$ pro vnitřní standard ^{72}Ge a mez detekce $33 \mu\text{g l}^{-1}$. Analýzou certifikovaného referenčního materiálu sušeného mléka a vzorku fazolí analyzovaného kontrolní metodou byla potvrzena správnost stanovení.

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

LITERATURA

- Jabor A. (ed.): *Vnitřní prostředí*. Grada Publishing a.s., Praha 2008.
- Yang Ch. H., Jiang S. J.: *Spectrochim. Acta*, B 59, 1389 (2004).
- Bandura D. R., Baranov V. I., Tanner S. D.: *Anal. Chem.* 74, 1497 (2002).
- Pröfrock D., Leonhard P., Wilbur S., Prange A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 623 (2004).
- Tan S. H., Horlick G.: *Appl. Spectrosc.* 40, 445 (1986).
- Yang L., Sturgeon R. E., Lam J. W. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 1302 (2001).
- Kovačević M., Leber R., Kohlwein S. D., Goessler W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 80 (2004).

8. Wu M. CH., Jiang S. J., Hsi T. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 154 (2003).
9. Kovačević M., Goessler W., Mikac N., Veber M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 145 (2005).
10. Funk W., Dammann V., Donnevert G., Iannelli S.: *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Applications in Environmental, Food, and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering*, 2. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
11. Velický I.: *Mikroelementy v teórii a praxi: úvod do biochémie a fyziológie stopových prvkov u zvierat a rastlín*. Slovenské vydavateľ'stvo pôdohospodárskej literatúry, Bratislava 1964.
12. Grotti M., Frache R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1481 (2007).
13. Valášková M.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2009.

ANALÝZA AROMATICKÝCH NITROSLOUČENIN ANEB NENÍ NITRO JAKO NITRO

ALAN LIŠKA^{a,b} a JIŘÍ LUDVÍK^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra anorganické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2,

^b Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
alanliska@centrum.cz

Úvod

Aromatické nitroslooučeniny představují z enviromentálního hlediska důležité polutanty. Proto jsou často předmětem elektrochemických analýz, neboť nitroskupina je snadno redukovatelná. Nicméně pro nalezení, pochopení a správné využití vhodného analytického postupu je dobré znát mechanismus příslušné analytické reakce a okolnosti (struktura, substituce, prostředí), které jej ovlivňují. Z toho pak mohou vyplývat i informace o případných strukturních omezeních, interferujících reakcích apod.

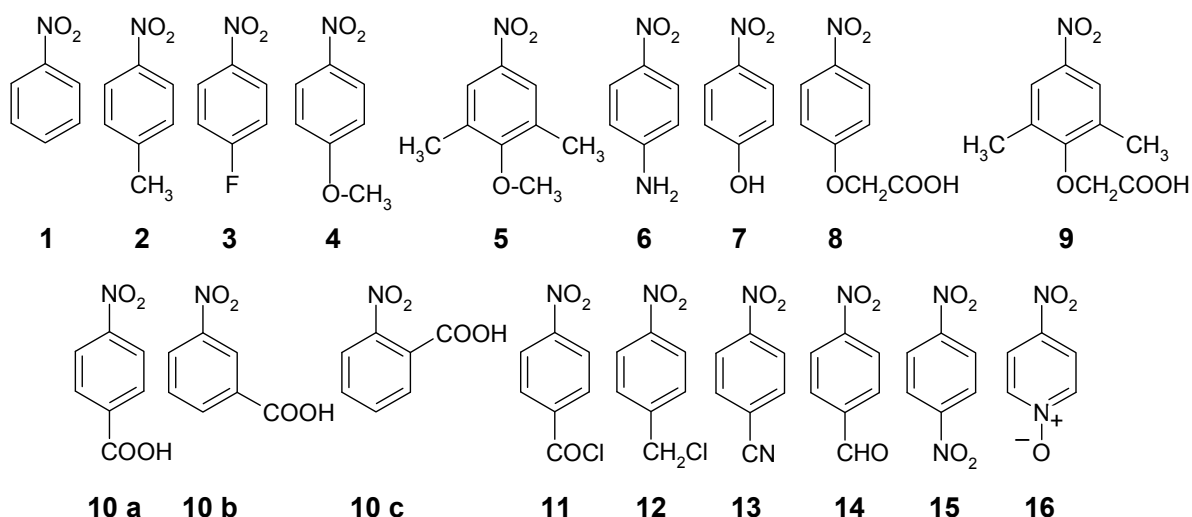
Pro detailní elektroanalytické studium mechanismu redukce organických látek obecně je výhodné pracovat v bezvodém prostředí, protože umožňuje sledovat signály některých radikálových meziproduktů, které jsou v něm stabilizovány. Obecně se předpokládá, že mechanismus elektrochemické redukce nitroslooučenin v bezvodém prostředí je již dávno znám, ale není to tak zcela pravda. Přehledná práce srovnávající chování různých aromatických látek není v literatuře k dispozici. Ve specializovaných monografiích se uvádí vždy pouze nejčastější redukční mechanismus zahrnující jednoelektronovou reverzibilní

redukcí na radikálový anion, která je následována tříelektronovou redukcí za vzniku příslušného hydroxylaminového derivátu. U těchto látek se neprojevuje (nebo není uvažována) interakce nitroskupiny s dalším substituentem či s dalším reakčním centrem. Elektrochemická studie 18 aromatických nitrolátek různě substituovaných v *para*-poloze ukázala, že se zde jedná o několik typů reakcí v závislosti na přítomnosti dalších substituentů, a umožnila jejich konzistentní porovnání. Právě tato analýza různých mechanismů elektrochemické redukce různých typů aromatických nitroslooučenin je předmětem mého příspěvku.

Experimentální část

Série aromatických nitroslooučenin (vzorce látek – viz obr. 1) substituovaných v *p*-poloze byla podrobena elektrochemickým měřením, které zahrnovaly DC-polarografii a cyklickou voltametrii na visící rtuťové kapkové elektrodě. Stejně experimenty byly provedeny i s několika analogickými deriváty, které obsahovaly kromě substituentu v *p*-poloze ještě jednu nebo více dalších skupin v jiných polohách, a v případě kyseliny nitrobenzoové pro kontrolu ještě s *m*- a *o*-izomerem.

DC-polarografie i cyklická voltametrie byla provedena v tříelektrodovém zapojení (rtuťová kapková pracovní elektroda, nasycená kalomelová referenční elektroda a platinová pomocná elektroda). K měření byl použit potenciostat (POLAROGRAFIC ANALYZER PA 3) a výstup byl zaznamenáván analogovým zapisovačem (XY RECORDER 4103, vše Laboratorní přístroje Praha).



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných nitroslooučenin

Tabulka I
Elektrochemická data zkoumaných nitrolátek

Číslo látky	Substituenty v polohách vzhledem k nitroskupině			Půlvalnové potenciály [V]					Poměry proudů
	<i>o</i> -	<i>m</i> -	<i>p</i> -	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	
1			H			-1,12		-2,10	$E_3:E_5$ 1:3
2			CH ₃			-1,18		-2,23	$E_3:E_5$ 1:3
3			F			-1,09		-2,24	$E_3:E_5$ 1:3
4			OCH ₃			-1,16		-2,24	$E_3:E_5$ 1:3
5		2×CH ₃	OCH ₃			-1,16		-2,13	$E_3:E_5$ 1:3
6			NH ₂			-1,38		-2,35	$E_3:E_5$ 1:5
7			OH			-1,73	-2,02		$E_3:E_4$ 1/2:1/2
8			OCH ₂ COOH		-1,06	-1,33		-2,57	*
9		2×CH ₃	OCH ₂ COOH		-1,03	-1,23	-1,87	-2,36	*
10 a			COOH		-0,81	-1,17		-2,18	$E_2:E_3:E_5$ 0,8:1:2
10 b		COOH			-0,87	-1,24		-2,42	$E_2:E_3:E_5$ 0,8:1:2
10 c	COOH				-0,81	-1,48		-2,34	$E_2:E_3:E_5$ 0,8:1:2
11			COCl	-0,64	-0,78	-1,10		-2,10	$E_1:E_2:E_3:E_5$ 1:0,8:1:2
12			CH ₂ Cl		-0,80	-1,14		-2,26	$E_2:E_3:E_5$ 0,8:1:2
13			CN			-0,77		-1,51	$E_3:E_5$ 1:3
14			CHO			-0,79	-1,33		$E_3:E_4$ 1:1
15			NO ₂			-0,55	-0,94		$E_3:E_4$ 1:1
16	4-nitropyridin-1-oxid					-0,74		-1,56	$E_3:E_5$ 1:3

* část křivky u silně negativních potenciálů byla obtížně vyhodnotitelná

Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý *N,N*-dimethylformamid (vyčištěný azeotropickou destilací s následnou vakuovou frakcionací). Základní elektrolyt byl 0,1M tetrabutylamonium hexafluorofosfát (Fluka, rekrytalizovaný z ethanolu).

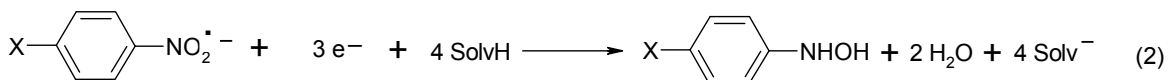
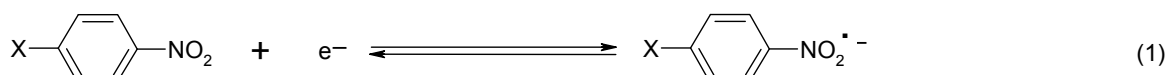
Naměřená experimentální data (půlvalnové potenciály E) a poměry proudů (výšek) vln u jednotlivých derivátů jsou shrnuty v tab. I.

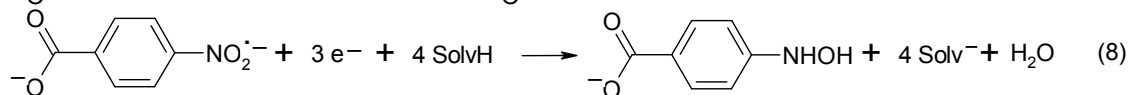
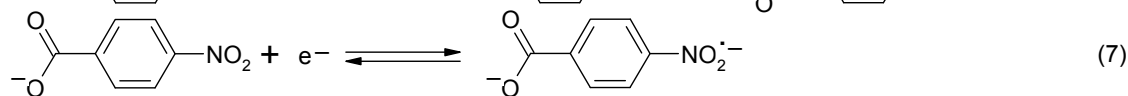
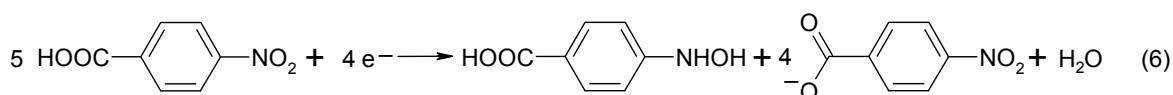
Výsledky a diskuse

Pro toto studium byla zvolena série *p*-substituovaných nitrobenzenů a 4-nitropyridin oxidu. U všech látek byla potvrzena lineární závislost proudu na koncentraci, jedná se tedy vždy o děje řízené difuzí.

Dále se ukázalo, že část ze studovaných sloučenin (látky **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **13** a **16**; v níže uvedeném schématu (1), (2) jsou příslušné *p*-substituenty označeny X) se skutečně redukuje podle předpokládaného mechanismu¹, tedy ve dvou krocích. První děj (1) zahrnuje reverzibilní vznik radikálového aniontu, který je následně dále (2) redukován (ireverzibilně) za vzniku konečného produktu, kterým je příslušný *N*-substituovaný hydroxylamin. Protony potřebné pro tuto redukci jsou získány vytržením z molekul rozpouštědla (ve schématu SolvH).

U dalších substituentů byly však shledány odchylky od tohoto mechanismu, proto byly detailně studovány. Protože se jedná o 1,4-disubstituované monocyklické aromatické, je možné pro posouzení mechanismu elektrochemické redukce využít Hammetovu funkci, která koreluje vliv





d) 4-nitrobenzoová kyselina se redukuje ve třech krocích. První děj je autoprotonační reakce², při které 4 další molekuly kyseliny 4-nitrobenzoové disociací poskytnou 4 protony potřebné pro redukcí jedné její molekuly na příslušný derivát hydroxylaminu. Vlna je proto ireverzibilní a výška vlny odpovídá výměně 0,8 elektronu (6). V druhém reverzibilním kroku (7) dochází ke vzniku radikálového aniontu odvozeného od benzoátového aniontu, který je v závěrečném kroku (8) dále redukován. Analogické chování bylo potvrzeno i u *m*- a *o*-izomerů. Obdobný mechanismus byl pozorován i u 4-nitrobenzylchloridu, který při autoprotonačním ději hraje roli C-kyseliny, a u 4-nitrobenzoylchloridu, který vykazuje jednoelektronovou ireverzibilní vlnu (reduktivní hydrolyza na kyselinu 4-nitrobenzoovou) a dále 3 vlny odpovídající kyselině 4-nitrobenzoové. Obecně lze shrnout, že s autoprotonací je potřeba počítat u všech derivátů, které obsahují v molekule „kyselé“ atomy vodíku.

Závěr

U redukce aromatických nitrosloúčenin hraje velmi důležitou roli intramolekulární interakce nitroskupiny se

substituentem přes aromatické (benzenové nebo pyridinové) jádro. Toto ovlivnění elektronové struktury molekuly může mít za následek změnu mechanismu. V předkládané práci se podařilo ukázat na čtyři odlišné mechanismy a vzájemně je porovnat. I když jde o studii v bezvodém prostředí, je pravděpodobné, že odlišné elektronické vlastnosti některých molekul se mohou projevit i při analytických stanoveních ve vodných prostředích, a je tedy třeba s nimi počítat.

Detailní znalost mechanismu elektrochemického redox chování aromatických mononitrosloúčenin navíc umožňuje se pustit i do složitějších systémů s více redox centry. Tuto situaci lze ilustrovat například při studiu redox vlastností mono-, di-, tri a tetranitrokalix-[4]-arenů.

LITERATURA

1. Lund H.: *Cathodic Reduction of Nitro and related Compounds, in Organic electrochemistry* (Lund H., Baizer M. M., ed.), str. 413. Marcel Dekker, New York 1991.
2. Brillas E., Farnia G., Severin M.G, Vianello E.: *Electrochim. Acta* 31, 759 (1986).

VYUŽITÍ COULOMETRICKÉHO DETEKTORU PRO ANALÝZU FENOLICKÝCH LÁTEK

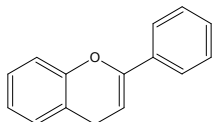
KATEŘINA MARCANÍKOVÁ
a BLANKA BEŇOVÁ

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

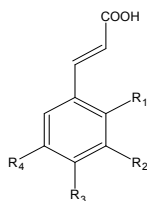
Úvod

Fenolické látky patří do široké skupiny antioxidantů. Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Záměrně se proto přidávají do potravin, kde svým antioxidačním působením prodlužují jejich stálost. Hlavní význam fenolických látek spočívá v tom, že působí jako prevence proti koronárním chorobám, snižují riziko rakovinových onemocnění a působí proti virům^{1,2}.

Fenolické látky jsou přírodní antioxidanty a můžeme je proto najít v přírodě. Nachází se v různých částech rostlin, např. kořeny, listy, plody. Podle struktury rozdělujeme fenolické látky do několika skupin³. První skupinu tvoří flavanoly odvozené od heterocyklického flavanu (obr. 1). Další skupinu tvoří aromatické hydroxykyseliny, kam patří deriváty kyseliny skořicové (obr. 2) a kyseliny benzoové (obr. 3).

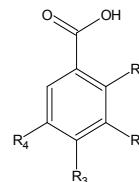


Obr. 1. Struktura flavanu



k. kávová: $R_2 = R_3 = \text{OH}$
k. *o*-kumarová: $R_1 = \text{OH}$
k. *m*-kumarová: $R_2 = \text{OH}$
k. *p*-kumarová: $R_3 = \text{OH}$
k. ferulová: $R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$

Obr. 2. Kyselina skořicová a její deriváty



k. gallová: $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
k. gentisová: $R_1 = R_4 = \text{OH}$
k. vanilová: $R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$
k. syringová: $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$

Obr. 3. Kyselina benzoová a její deriváty

Pro stanovení fenolických látek se v posledních letech začalo využívat vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s coulometrickým detektorem. Coulometrická detekce s elektrodovým polem je velmi citlivý způsob detekce, ve které je využita série 4–16 průtočných coulometrických cel, ve kterých dochází k elektrochemické přeměně analytu. Na každou celu je vložen jiný, ale konstantní potenciál a každá látka se oxiduje (nebo redukuje) při jiném potenciálu, ten je pak nazýván tzv. dominantním potenciálem⁵.

CoulArray detektor, používaný v této práci, je coulometrický multielektrodový detektor, který byl zkonstruován pro použití v HPLC a který se používá pro detekci elektroaktivních látek. Umožňuje charakterizaci látek na základě poměru odezvy signálu velkého počtu kanálů⁵.

Experimentální část

Standardy, chemikálie a vzorky

Standardy fenolických látek: kyselina gallová, kyselina protokatechuová, protokatechaldehyd, kyselina 4-hydroxyfenyloctová, kyselina vanilová, kyselina kávová, ethylvanilin a vanilin byly získány od firmy Fluka (Buchs, Switzerland). Kyselina ferulová, gentisová a syringová byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Ostatní používané chemikálie byly: octan amonný (Fluka, Buchs, Switzerland), kyselina mravenčí (Lachema, Brno, ČR), acetonitril (Merck, Darmstadt, Německo). Redestilovaná voda byla připravena na přístroji Ultraclear na Univerzitě Pardubice.

V aplikační části této práce bylo analyzováno 14 vzorků medoviny. Mezi vzorky byly jak medoviny přírodní (vzorky 5, 7 a 9), tak i s přidávkem ovocných šťáv, koření i bylin, např. medovina mandlová (vzorky 4

Tabulka I

Meze detekce a stanovitelnosti standardních látek

Fenolické látky	Mez detekce [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Mez stanovitelnosti [$\mu\text{g l}^{-1}$]
Kyselina gallová	5,4	18,0
Kyselina protokatechuová	6,5	21,6
Kyselina gentisová	2,8	9,3
Protokatechaldehyd	4,8	16,1
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	4,2	13,9
Kyselina vanilová	5,3	17,6
Kyselina kávová	4,4	14,8
Kyselina syringová	4,4	14,8
Vanilin	2,2	7,3
Kyselina ferulová	5,3	17,6
Ethylvanilin	1,9	6,5
Kyselina kumarová	4,0	13,3

a 10), ořešková (vzorky 2, 6 a 11), višňová (vzorek 14), sherry (vzorek 1), hořká (vzorek 3), bylinná (vzorky 12 a 13) nebo černorybízová (vzorek 8). Tyto vzorky byly dodány českými a moravskými včelaři. Medoviny byly zavřené uchovávány v ledničce, po otevření byly ihned analyzovány.

RP-HPLC analýza

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu s elektrochemickým CoulArray detektorem, který se skládal z následujících součástí:

- CoulArray detektor s 8 elektrochemickými celami,
- chromatografické pumpy,
- termostat pro kolonu, směšovač, tlumič pulzů a šesticestný dávkovací ventil,

vše od ESA, Chelmsford, MA, USA.

- odplyňovač Vacuum Degasser DG 3014, ECOM, ČR.

Podmínky vlastního měření byly následující. Byla připravena dvousložková mobilní fáze. Mobilní fáze A (MF A), kterou představoval 5 mM vodný roztok octanu amonného, byla připravena rozpuštěním příslušné navážky octanu amonného v 1 dm⁻³ redestilované vody. Požadované pH ~ 3 bylo dosaženo přidáním několika kapek koncentrované kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B (MF B) byla připravena smícháním 80 % acetonitrilu a 20 % MF A. Takto připravené mobilní fáze byly vždy filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Při optimalizaci separace jednotlivých fenolických látek byly používány pracovní roztoky o koncentraci 5 mg l⁻¹, které byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 100 mg l⁻¹. K separaci byla použita kolona Gemini 3u C18 110A (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm , Phenomenex, USA). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,4 ml min⁻¹, byla použita gradientová eluce, dávkovaný objem vzorku byl 10 μl a teplota kolony 35 °C.

Látky byly detegovány při potenciálech 200–900 mV s krokem po 100 mV.

Příprava vzorků k analýze zahrnovala ředění medovin v poměru 1:5 až 1:30 a filtraci přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Výsledky a diskuse

Cílem studie bylo vyvíjení metody pro analýzu fenolických látek a její následná aplikace na reálné vzorky medovin. Složení mobilních fází, optimální pH mobilní fáze a velikost průtoku bylo převzato z literatury⁵. Dalším úkolem bylo tedy optimalizovat eluci. Nejprve byla vyzkoušena izokratická eluce, při níž ale nedošlo k rozdělení látek. Proto bylo nutné optimalizovat gradient mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno několik gradientových programů, jako optimální vyšel: 0–10 min (2 % MF A), 20–30 min (10 % MF A), 30–35 min (20 % MF A), 35–40 min (40 % MF A) a po 40 min (100 % MF A). Při zvoleném gradientu byly rozděleny všechny standardní látky. Byly odečteny jejich retenční časy a následně byly připraveny kalibrační závislosti standardních látek v rozsahu, který byl očekáván ve vzorcích. Pro standardní látky byly také vyhodnoceny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Tyto hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Optimalizované podmínky byly aplikovány na analýzu reálných vzorků medovin. Porovnáním retenčních časů standardů s časy vzorků medovin bylo v medovinách identifikováno celkem 12 fenolických látek. Dále byl na základě kalibračních závislostí zjištěn jejich obsah.

Na obr. 4 a 5 jsou zobrazeny ukázkové chromatogramy přírodní a černorybízové medoviny.

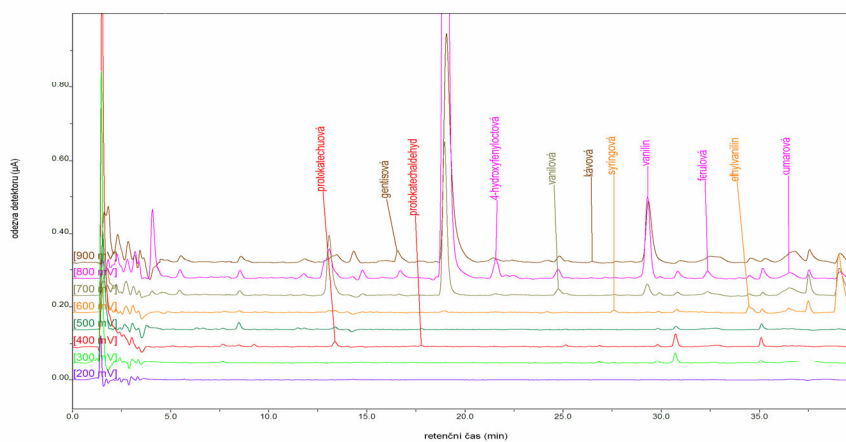
Na první pohled je patrný rozdíl mezi těmito dvěma ukázkovými chromatogramy, přírodní medovina neobsa-

Tabulka II
Obsah fenolických sloučenin v medovinách

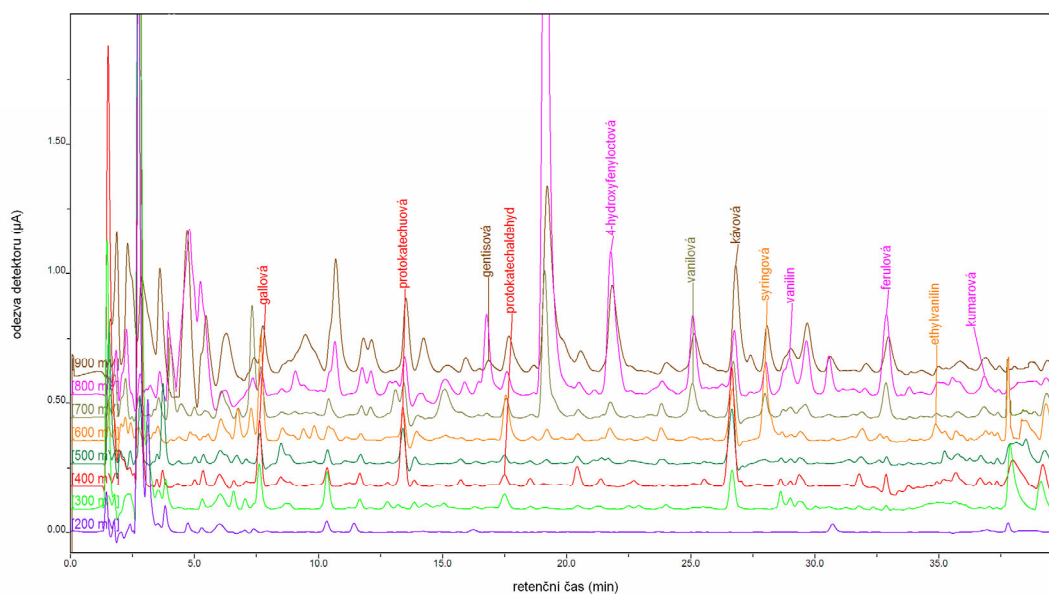
Fenolické látky [mg l ⁻¹]	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6	vzorek 7
Kyselina gallová	0,805	0,100	0,099	0,084			0,096
Kyselina protokatechuová	0,344	0,020	0,146	0,054	0,058	0,053	0,013
Kyselina gentisová	0,039		0,026	0,022	0,023	0,017	0,014
Protokatechaldehyd	0,029	0,048	< LOQ	0,027	< LOQ	0,022	0,023
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	0,057	0,060	0,088	0,054	0,041	< LOQ	< LOQ
Kyselina vanilová	0,152	< LOQ	0,071	0,114	0,051	< LOQ	0,076
Kyselina kávová	0,087	0,081	0,060	< LOQ	0,028	< LOQ	0,029
Kyselina syringová	0,038	0,088	0,057	< LOQ	0,035	0,030	0,029
Vanilin	4,126	0,312	2,214	40,403	1,195	2,378	65,856
Kyselina ferulová	0,224	0,059	0,079	0,085	0,090	0,121	0,111
Ethylvanilin	0,075	0,063	0,084	0,028	0,039	0,065	0,034
Kyselina kumarová	2,335	0,097	0,073	0,057	0,112	0,107	0,175
Fenolické látky [mg l ⁻¹]	vzorek 8	vzorek 9	vzorek 10	vzorek 11	vzorek 12	vzorek 13	vzorek 14
Kyselina gallová	3,367		0,092		0,570		0,472
Kyselina protokatechuová	1,525	0,129	0,033	0,079	0,084	0,242	0,600
Kyselina gentisová	0,191	0,024	0,022	0,109	0,054	0,015	
Protokatechaldehyd	0,272	0,062	0,042	0,030	0,064	0,027	0,238
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	1,867	< LOQ	0,025	0,042	0,615	0,248	0,494
Kyselina vanilová	0,724	< LOQ	0,071		0,376	0,222	0,369
Kyselina kávová	2,998	0,031		0,427	1,339	0,797	1,317
Kyselina syringová	2,443	0,089	0,072		0,040	0,066	0,271
Vanilin	1,297	0,270	0,324	5,171	1,167	1,548	0,868
Kyselina ferulová	1,701	0,154	0,108	0,071	2,556	1,919	2,418
Ethylvanilin	0,332	0,036		0,054	0,985	0,091	1,496
Kyselina kumarová	0,273	0,083	0,022	0,028	0,059	0,110	0,109

< LOQ

látka nebyla ve vzorku nalezena
látka ve vzorku přítomna, ale její obsah byl pod mezi stanovitelnosti



Obr. 4. Ukázkový chromatogram přírodní medoviny



Obr. 5. Ukázkový chromatogram černorybízové medoviny

huje tolik látek ani v takovém množství jako medovina černorybízová, tedy s přidavkem ovocné šťávy.

Závěr

V této práci byl použit kapalinový chromatograf vybavený CoulArray detektorem. Bylo prakticky ověřeno, že technika kapalinové chromatografie s coulometrickou detekcí je selektivní a velmi citlivá. Meze detekce analyzovaných látek se pohybovaly řádově v jednotkách, maximálně desítkách $\mu\text{g l}^{-1}$. Optimalizovaná metoda, kterou bylo separováno 12 látek během 40 min, byla použita pro stanovení obsahu těchto látek ve vzorcích medovin. Bylo zjištěno, že látky s přidavkem ovocné šťávy či bylinných extraktů zpravidla obsahují větší množství fenolických látek než medoviny přírodní, tedy bez jakéhokoliv přidavku.

Tato práce byla realizována za podpory projektu MSM 0021627502.

LITERATURA

1. Slanina J., Táborská E.: Chem. Listy 98, 239 (2004).
2. Čepička J., Karabon M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
3. Škeříková V., Grynová L., Jandera P.: Chem. Listy 98, 343 (2004).
4. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*. Osis, Tábor 2002.
5. Beňová B.: *Disertační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2008.

STANOVENÍ HLADINY TYROSINKINASOVÝCH INHIBITORŮ METODOU UHPLC-MS/MS

KATEŘINA MIČOVÁ^{a*}, DAVID FRIEDECKÝ^{a*},
ADRIANA POLÝNKOVÁ^a, EDGAR FABER^b
a TOMÁŠ ADAM^a

^aLaboratoř dědičných metabolických poruch, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, ^bHemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
K.Micova@seznam.cz

* autoři přispěli práci stejným dílem

Klíčová slova: tyrosinkinasové inhibitory, karcinom prsu, leukemie, vysokoučinná kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie

Úvod

Díky novým poznatkům v biologii a patofyziologii některých onemocnění byla v poslední době vyvinuta řada léků působících přímo na molekulární úrovni více-méně selektivně v cílových buňkách. K těmto lékům se řadí také inhibitory tyrosinkinas (TKI), které způsobily průlom v léčbě některých nádorových onemocnění, jako například imatinib (Glivec) v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST). Imatinib společně s dasatinibem (Sprycel)

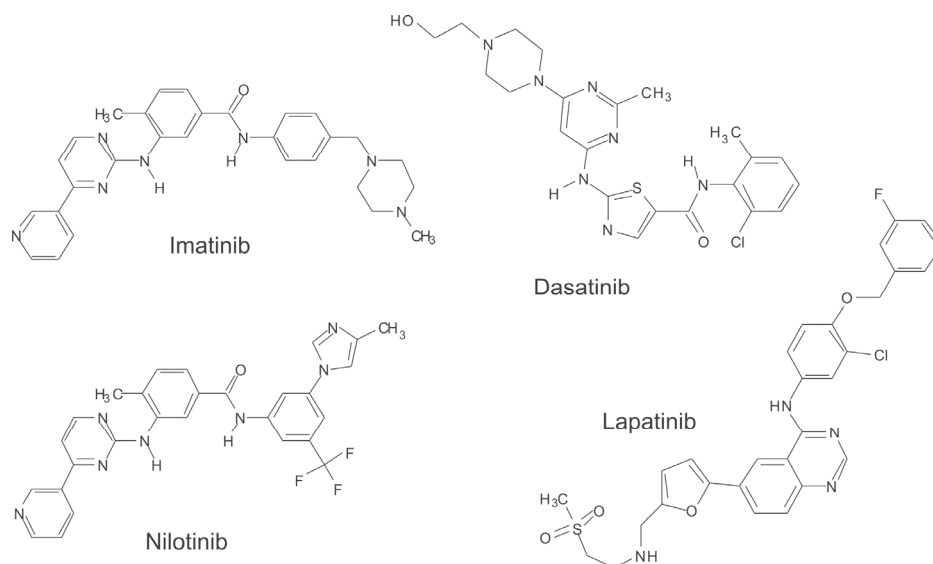
a nilotinibem (Tasigna) zaznamenal rovněž velký úspěch v léčbě chronické myeloidní leukemie (CML) a lapatinib (Tykerb) v léčbě karcinomu prsu (obr. 1). Ukazuje se, že léčebná odpověď na TKI může souviset s jejich dosaženými plasmatickými hladinami.

Práce byla zaměřena na stanovení TKI v krevní plasmě pacientů s CML a karcinonem prsu na terapii imatinibem, nilotinibem, dasatinibem a lapatinibem technikou vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Chronická myeloidní leukemie

CML je klonální myeloproliferativní onemocnění vznikající transformací hemopoetické kmenové buňky. Toto onemocnění tvoří 1/4 všech leukemií dospělého věku. Fúzí genu *BCR* na 22. chromosomu s genem *ABL* na 9. chromosomu vzniká tzv. chromosom Philadelphia (Ph) obsahující onkogen *BCR/ABL1*, který exprimuje protein p210 – konstitutivně aktivní tyrosinkinasu aktivující řadu signálních transdukčních drah, které podporují množení buněk a blokují apoptózu. Dřívější možnosti léčby (interferon alfa, alogenní transplantace krvetvorných buněk) nezaznamenaly takový úspěch jako v posledních letech nově vyvinuté selektivní TKI cíleně inhibující proliferaci nádorového klonu. K těmto novým přípravkům řadíme deriváty 2-fenylaminopyrimidinu imatinib, dasatinib a nilotinib^{3,4}.

Imatinib (IM) a nilotinib jsou účinné inhibitory tyrosinkinasy Bcr/Abl. IM dále interferuje s receptorem pro



Obr. 1. Strukturální vzorce TKI

stem cell factor (c-kit) a receptorem pro růstový faktor odvozený z destiček (PDGF platelet-derived growth factor), proto se využívá i v léčbě GIST, systémové mastocytosy, hypereozinofilního syndromu a chronické eozinofilní leukemie^{5,6,8,9}. Dasatinib je navíc účinný inhibitor kinas rodiny Src, které mohou přispívat k proliferaci a přežívání myeloidní řady buněk exprimujících *BCR/ABL1* (cit.^{7,9}).

Karcinom prsu

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších zhoubných onemocnění postihující ženskou část populace. Jeho incidence neustále stoupá, ovšem díky novým diagnostickým a terapeutickým možnostem dochází ve vyspělých zemích včetně ČR k poklesu úmrtí způsobených tímto onemocněním. Pro cílenou molekulární biologickou léčbu je nutné znát strukturu molekuly proteinu, jehož inhibicí dochází k narušení základních signálních drah vedoucích k maligní transformaci buňky. Tento typ léčby již není pouze předmětem výzkumu, ale je již s úspěchem používán v klinické praxi. Základními nástroji terapie jsou monoklonální protilátky a nízkomolekulární tyrosinkinasové inhibitory, jako např. lapatinib¹.

Lapatinib je selektivní duální inhibitor tyrosinkinas ErbB-1 (EGFR; je zodpovědný za regulaci normálního buněčného růstu, jeho porucha vede k neregulovatelné proliferaci a potenciální malignizaci procesu) a ErbB-2 (HER2; onkogen zaručující predispozici ke karcinomu, je pomalu aktivovatelný a má dlouhodobý vliv na proliferaci). Řadí se mezi cytostatika účinná v léčbě mozkových metastáz díky tomu, že prochází hematoencefalitickou bariérou^{1,2,9}.

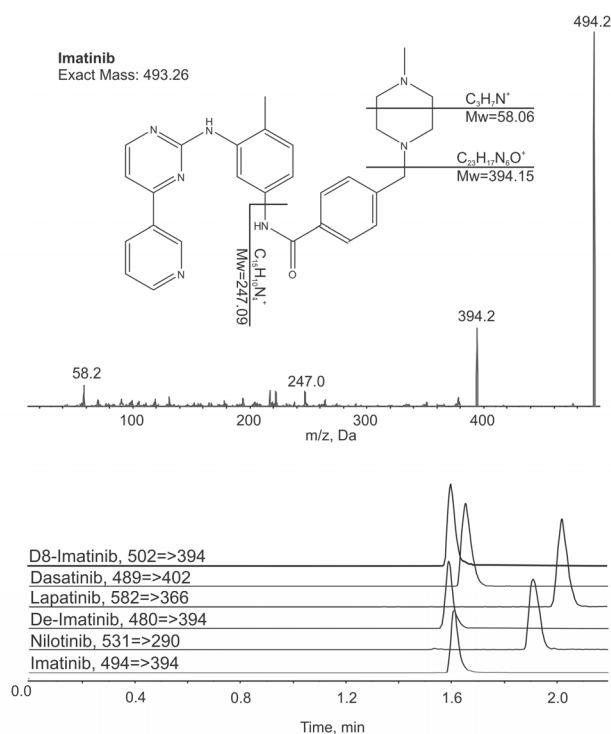
Mechanismus účinku TKI spočívá v reverzibilní vazbě na intracelulární cytoplasmatické ATP-vazebné místo tyrosinkinasové Abl domény a zablokování fosforylace tyrosinu bílkovin, které patří k substrátům onkoproteinů, čímž dochází ke znemožnění přenosu signálů vedoucích k maligní transformaci a proliferaci buněk^{1–7}.

Experimentální část

Pacientům s CML ($n = 682$, Hemato-onkologické oddělení FN Olomouc) byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s EDTA v průměru 24 ± 6 hodin po užití poslední dávky léku. Krev byla poté zcentrifugována a získaná plazma byla zamrazena na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Imatinib, deuterovaný imatinib, desmethylovaný imatinib (Novartis; Curych, Švýcarsko), dasatinib, nilotinib a lapatinib (LC Laboratories; Woburn, MA, USA) byly rozpuštěny v methanolu na výslednou koncentraci $10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$. Tyto standardní roztoky byly použity pro přípravu všech ostatních standardů. Všechny reagentie měly analytický stupeň čistoty a byly získány od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA).

Plazma (20 μl) byla deproteinována methanolem (180 μl) s přidavkem interního standardu – deuterovaného



Obr. 2. Fragmentace IM, separace standardů jednotlivých TKI

imatinibu (D8IMA). Poté byl vzorek 3 min třepán na vortexu a následně 5 min centrifugován při 14 000 RPM. Supernatant byl analyzován technikou UHPLC-MS/MS.

Analýzy byly prováděny na přístroji UHPLC (Dionex Ultima 3000 RS). Studované analyty byly separovány na koloně s reverzní fází Acquity BEH C18 $1,7\text{ }\mu\text{m}$ ($2,1 \times 50\text{ mm}$; Waters). Mobilní fáze se skládala z formiátu amonného o koncentraci 4 mmol l^{-1} a pH 3,2 (A) a acetonitrilu (B). V čase 0–1 min bylo složení mobilní fáze 17 % B; 1 až 2 min byl aplikován gradient 17–50 % B; 2,0–2,1 obsahovala mobilní fáze 50 % B a v 2,1–2,2 min byly nastaveny iniciační podmínky. Na koloně termostátované na $40\text{ }^\circ\text{C}$ byla nastavena průtoková rychlost $0,5\text{ ml min}^{-1}$. Pro detekci a kvantifikaci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr (API 4000, Applied Biosystems) s ionizací elektrosprejem. Podmínky sběru dat jsou shrnuty v tab. I. Za optimálních podmínek byly separovány standardy TKI s celkovou dobou analýzy 2,2 min (obr. 2).

Výsledky

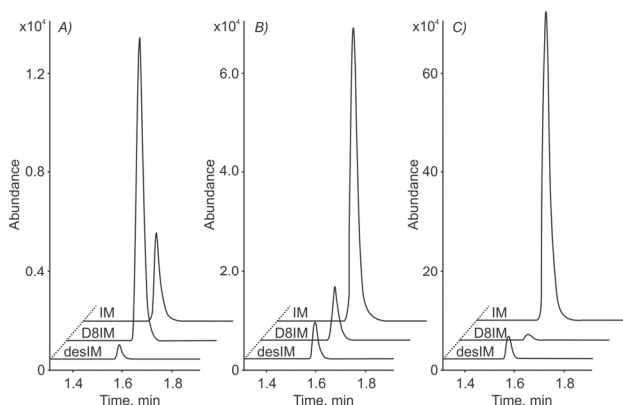
Metoda byla aplikována na vzorky pacientů s CML a karcinomem prsu na terapii imatinibem (obr. 3), nilotinibem, dasatinibem a lapatinibem. Analyty byly kvantifikovány pomocí interního standardu D8IM. Dále byla práce zaměřena na stanovení korelace mezi plasmatickou hladinou

Tabulka I
Optimalizace MS/MS

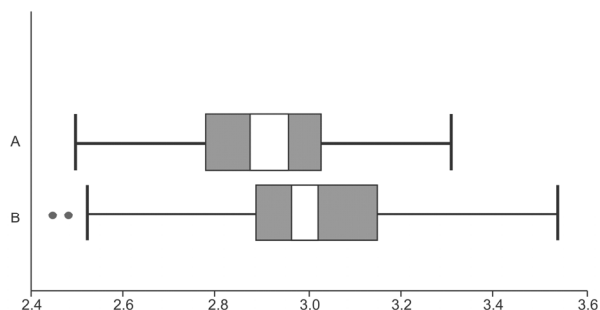
Analyt	MRM přechod [m/z]	Čas měření [ms]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	CAD: 6,00 psi CUR: 20,00 psi GS1: 50,00 psi GS2: 50,00 psi IS: 5500,00 V TEM: 500,00 °C EP 10,00 V Typ skenu: MRM Polarita: pozitivní Iontový zdroj: Turbo Spray
IM	494→394	50,00	116,00	37,00	26,00	
D8IM	502→394	50,00	116,00	37,00	26,00	
desIM	480→394	5,00	126,00	37,00	28,00	
NIL	531→290	50,00	101,00	41,00	20,00	
LAP	582→366	50,00	111,00	47,00	24,00	
DAS	489→402	100,00	86,00	45,00	28,00	

nou imatinibu a molekulární odpovědi. Bylo zpracováno 600 vzorků od 120 pacientů, jimž byla krev odebírána v průměru 24 ± 6 hodin od poslední podané dávky 400 mg. Data byla zlogaritmována za účelem dosažení normálního rozdělení a poté byla porovnána pomocí dvou

nezávislých výběrů (QC Expert, $P = 0,05$). Skupina pacientů s dobrou odpovědí na léčbu vykazovala statisticky významně vyšší hladiny IM v plasmě; průměrné hodnoty byly 1010 ng ml^{-1} pro optimální a 785 ng ml^{-1} pro suboptimální odpověď (obr. 4).



Obr. 3. Analýzy reálných vzorků pacientů s CML na terapii IM; pacient s nízkou (A), střední (B) a vysokou hladinou (C)



Obr. 4. Krabicové grafy logaritmu koncentrací imatinibu v plasmě u pacientů s optimální (A) a suboptimální molekulární odpovědí (B)

Závěr

Tato práce byla zaměřena na vývoj nové metody pro stanovení TKI v krevní plasmě pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií a rakovinou prsu, a to technikou ultračinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Metoda se v současné době dostává do rutinní praxe v laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc. Výsledky plasmatických hladin pomáhají při individuálním rozhodování o změně dávkování léčby především u pacientů se suboptimální odpovědí a nízkou hladinou IM nebo na druhé straně u pacientů s vysokou hladinou IM při úplné molekulární odpovědi. Provádění stanovení hladin TKI má velmi důležitou roli v posouzení compliance nemocných.

Další výzkum bude směřován do oblasti stanovení imatinibu v leukocytech pacientů s CML. Předpokládá se, že stanovení hladiny intracelulárního IM a v kombinaci se stanovením plasmatické hladiny při současném vyšetření aktivity transportních systémů umožní lépe předpovědět vznik rezistence na IM a bude mít lepší praktický dopad na rozhodování o léčbě u nemocných s CML léčených IM.

Nově vyvinutá metoda pro stanovení TKI v krevní plasmě metodou UHPLC-MS/MS je vysoce účinná a časově nenáročná.

Autoři děkují za finanční podporu projektům IGA MZCR NS9627, MSM 6198959205 a A/CZ0046/2/0011.

Zkratky

ABL Abelson tyrosin kinase gen
BCR breakpoint cluster region

CAD	kolizní plyn
CE	kolizní energie
CML	chronická myeloidní leukemie
CUR	„curtain gas“
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
D8IM	deuterovaný imatinib
DAS	dasatinib
desIM	desmethylovaný imatinib
DP	deklasterizační pitenciál
Dwell	čas přechodu
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EP	vstupní potenciál
GIST	gastrointestinální stromální tumor
GS1	zmlžovací plyn
GS2	sušící plyn
HER2	lidský epidermální receptor
IM	imatinib
IS	napětí na vstupní kapiláře
LAP	lapatinib
MRM	multiple reaction monitoring
NIL	nilotinib
PDGF	destičkový růstový faktor
Src	rodina nereceptorových (celulárních) tyrosinkinas podílející se na růstu buňky
TEM	teplota zmlžujícího plynu
TKI	tyrosinkinasové inhibitory

LITERATURA

- Petruželka L., Petruželková L.: *Farmakologie* 5, 483 (2008).
- Petráková K., Demlová R.: *Remedia* 18, 13 (2008).
- Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian H. M.: *Ann. Intern. Med.* 131, 207 (1999).
- Kantarjian H. M., Talpaz M., Giles F., O'Brien S., Cortes J.: *Ann. Intern. Med.* 145, 913 (2006).
- Faber E.: *Farmakoterapie* 3, 233 (2005).
- Kantarjian H. M., Giles F., Gattermann N., Bhalla K., Alimena G., Palandri F., Ossenkoppele G. J., Nicolini F. E., O'Brien S. G., Litzow M., Bhatia R., Cervantes F., Haque A., Shou Y., Resta D. J., Weitzman A., Hochhaus A., le Coutre P.: *Blood* 110, 3540 (2007).
- Quintas-Cardama A., Kantarjian H., Jones D., Nicaise C., O'Brien S., Giles F., Talpaz M., Cortes J.: *Blood* 109, 497 (2007).
- Titier K., Picard S., Ducint D., Teilhet E., Moore N., Berthaud P., Mahon F.X., Molimard M.: *Ther Drug Monit.* 27, 634 (2005).
- Haouala A., Zanolari B., Rochat B., Montemurro M., Zaman K., Duchosal M. A., Ris H. B., Leyvraz S., Widmer N., Decosterd L. A.: *J. Chromatogr., B* 877, 1982 (2009).

K. Mičová^a, D. Friedecký^a, A. Polýnková^a, E. Faber^b, and T. Adam^a (^a *Laboratory for inherited metabolic disorders, University Hospital and Palacky University Olomouc;* ^b *Hemato-oncological clinic, University Hospital, Olomouc*): **Determination of Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma by UHPLC-MS/MS**

The aim of this study was to develop new rapid and sensitive UHPLC method with tandem mass spectrometry detection for determination and quantification of plasma concentration of tyrosine kinase inhibitors nilotinib, lapatinib, imatinib and its main metabolite (CGP74588). Patients' plasma (20 µl) was deproteinated by 180 µl of methanol with addition of internal standard (deuterated imatinib), sample was shaken, centrifugated 5 min at 14 000 RPM and supernatant was analysed. Chromatographic separation of drugs and internal standard was achieved on a reverse phase analytical column Acquity BEH C18 1.7 µm (2,1 × 50 mm; Waters). Mobile phase consisted of acetonitrile (B) and 4mM ammonium formiate; pH 3,2 (A). The total run time of the analysis was 2,2 min at a flow rate 0,5 ml min⁻¹. A triple quadrupole detector (API 4000, Applied Biosystems) with electrospray ionization in positive mode was used for detection. Mass spectrometer was operated in multiple-reaction monitoring (MRM) mode (*m/z* transitions for IM 494→394, CGP 74588 480→394, D8-IM 502→394, NIL 531→290, and for LAP 582→366). We demonstrated the suitability of this assay for TKIs using to quantify their concentrations in plasma of patients with chronic myeloid leukemia on imatinib and nilotinib therapy and for patients with breast cancer on lapatinib therapy.

INDUKCE ZMĚN KONFORMACE POLYPEPTIDŮ: STUDIE METODOU VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

PAVLÍNA NOVOTNÁ^a a MARIE URBANOVÁ^b

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavlina.Novotna@vscht.cz

Úvod

Konformační změny v roztocích polypeptidů představují komplexní problém. Například ve zředěných roztocích lze u mnoha polypeptidů pozorovat změnu z α -helikální konformace na konformaci „random coil“, která je dnes spíše označována jako konformace podobná konformaci polyprolin II (PPII)¹. Změna struktury může být vyvolána změnou složení rozpouštědla nebo teplotními změnami a může být detekována sledováním různých fyzikálních vlastností. V této práci byla zvolena metoda vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), jejíž výhodou je velká citlivost na sekundární strukturu polypeptidů².

Konformace α -helix je jedním z možných strukturálních motivů v molekulách proteinů. Vznik α -helix z méně uspořádaných struktur je často součástí procesu sbalování proteinů. Naopak konformace PPII často vystupuje jako přechodná konformace při procesu opačném, tj. rozbalování proteinů. Tyto vlastnosti proteinů byly v minulosti často modelovány na molekulách synteticky připravovaných polypeptidů. Pro tuto práci byl jako modelový systém zvolen poly- γ -benzyl-L-glutamát (PBLG), neboť se jedná o velmi dobře charakterizovaný systém vykazující konformační variabilitu. Z dřívějších studií^{3,4} vyplývá, že PBLG existuje v konformaci α -helix v několika organických rozpouštědlech, mezi nimi v trichlormethanu (CHCl_3)

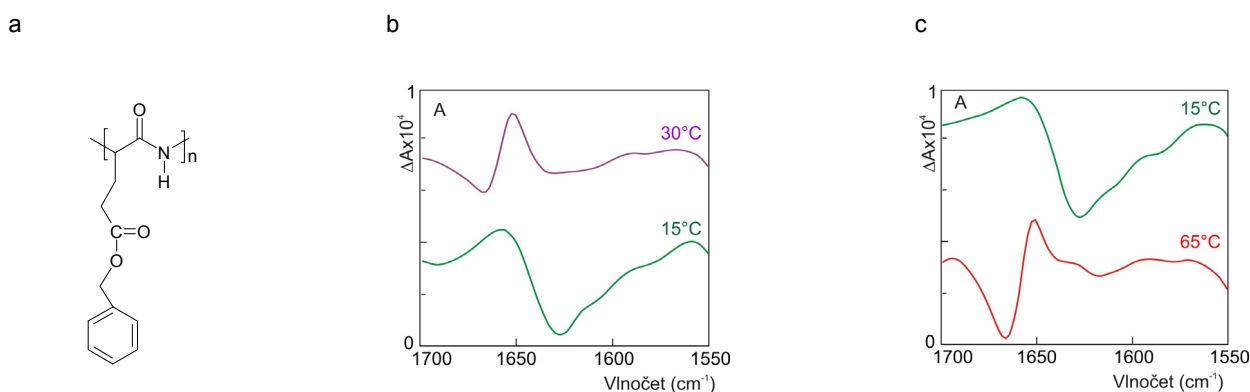
a v benzenu, a v konformaci PPII v trifluoroctové (TFA) a v dichloroctové kyselině.

V předkládané práci byly studovány konformační změny PBLG ve dvou ternárních systémech. V prvním z nich, kterým je v návaznosti na předchozí práci^{5–8} PBLG ve směsném rozpouštědle TFA/ CHCl_3 , byla poprvé studována teplotní závislost VCD spekter pro roztoky s vybraným obsahem TFA s cílem přispět k objasnění vlivu TFA na změnu konformace polypeptidu. Ve druhém studovaném systému, kterým je PBLG ve směsném rozpouštědle benzen- d_6 s TFA, byla poprvé provedena studie závislosti VCD spekter na obsahu TFA v systému a pro vybrané roztoky poté byla studována závislost VCD spekter na teplotě. Výsledky poskytly informace o vlivu sledovaných podmínek na strukturu PBLG.

Experimentální část

V předkládané práci byl použit poly- γ -benzyl-L-glutamát (obr. 1a) s průměrnou molární hmotností $69\,000\text{ g mol}^{-1}$ (Sigma). K přípravě roztoků byla použita rozpouštědla: trichlormethan (Lachner), trifluoroctová kyselina (Penta) a benzen- d_6 (Isosar, 99,5% D).

VCD a absorpční spektra v infračervené (IČ) oblasti $1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ byla naměřena na spektrometru s FT IFS-66/S (Bruker, Německo) s rozlišením 8 cm^{-1} , IČ spektra v oblasti $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ pak na spektrometru s FT Tensor 27 (Bruker, Německo) s rozlišením 2 cm^{-1} . Spektra jsou průměry ze 6 bloků o 3686 scanech. Byly použity skládané kvety typu A145 s okny z CaF_2 a s teflonovou distanční folií o tloušťce $50\text{ }\mu\text{m}$, pro teplotní závislost IČ spekter i s $12\text{ }\mu\text{m}$ folií. Teplotní závislosti byly měřeny v kvetě typu P/N2050 (Specac, UK). Teplota byla nastá-



Obr. 1. Strukturální vzorec PBLG (a), teplotní závislost VCD spekter PBLG v rozpouštědle benzen- d_6 /TFA pro obsah 30 obj.% (b) a 35 obj.% (c) TFA

vována termostatem Heated Jacket Controller 3000 series (Specac, UK).

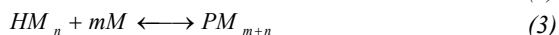
Byly připraveny roztoky PBLG v CHCl_3 a v benzen-d6 a ve směsných rozpouštědlech CHCl_3/TFA a benzen-d6/TFA o hmotnostní koncentraci PBLG $\rho = 30 \text{ g l}^{-1}$ a o objemovém zlomku TFA 0,05; 0,1; 0,15 a 0,20 pro CHCl_3/TFA a 0,05; 0,15; 0,30; 0,35 a 0,40 pro benzen-d6/TFA.

Výsledky a diskuse

PBLG byl studován ve dvou ternárních systémech s TFA a za předpokladu existence pouze monomerní a dimerní formy TFA může být její rovnováha v CHCl_3 resp. v benzen-d6 popsána:



kde M značí monomerní a D značí dimerní formu TFA. Vzhledem k tomu, že v tomto systému je cyklická forma dimeru TFA nejpravděpodobnější⁹, lze předpokládat, že pouze monomerní forma kyseliny interaguje s PBLG a navrhnout následující model interakcí⁹:



kde H značí koncentraci polypeptidu v α -helikální konformaci a P v konformaci PPII. HM_n je koncentrace α -helikálního polypeptidu, na který je vázána TFA, a PM_{m+n} je koncentrace polypeptidu v konformaci PPII, na který je vázána TFA.

V předkládané práci jsme ověřovali tento model jak při studiu závislosti struktury PBLG na složení rozpouštědla benzen-d6/TFA, tak při studiu závislosti struktury PBLG na teplotě v tomto směsném rozpouštědle a ve směsném rozpouštědle CHCl_3/TFA .

Byla studována VCD a IČ absorpční spektra PBLG v benzen-d6 bez TFA a s 5, 15, 30, 35 a 40 obj.% TFA. Ze struktury PBLG (obr. 1a) vyplývají dvě možnosti interakce TFA s C=O skupinami: s C=O skupinami esterů v postranních řetězcích a s C=O skupinami peptidické vazby v hlavním řetězci. První z interakcí nebyla pozorována, neboť pásy pro ni charakteristické leží v oblasti vysoké absorpce TFA⁸. V absorpčních spektrech však byla pozorována interakce TFA s C=O skupinami v hlavním řetězci PBLG.

Pro roztoky o obsahu TFA 0–30 obj.% (obr. 1b) byl ve VCD spektrech v oblasti amidu I pozorován pozitivní couplet typický pro α -helikální konformaci². Pro obsah TFA nad 30 obj.% (obr. 1c) se pozitivní couplet změnil na negativní. To lze vysvětlit změnou konformace PBLG z α -helikální na strukturu PPII, pro niž je daný průběh VCD typický¹.

Pozorované změny ve VCD i v absorpčních spektrech lze aplikovat na model interakce monomerní TFA s PBLG

navržený výše. Rovnováha (2) směrem doprava byla pozorována při nižších přídavicích TFA. Rovnováha (3) směrem doprava byla pozorována mezi obsahy 30 a 35 obj.% TFA v benzen-d6, kdy docházelo ke změně konformace.

Podobná konformační změna v závislosti na obsahu TFA byla námi ve VCD spektrech pozorována již dříve^{5–8} pro systém TFA/ CHCl_3 a ke změně konformace docházelo v rozmezí obsahu TFA 10–15 obj.%. V případě systému TFA/benzen-d6 tedy došlo ke změně při vyšším obsahu TFA. Primární vliv na změny má bezesporu TFA, avšak sekundární vliv má i použité majoritní helikogenní rozpouštědlo, které zjevně ovlivňuje množství TFA nutné pro konformační změnu. Předpokládáme, že CHCl_3 , který je polárnější než benzen-d6, snáze umožňuje změnu konformace. Konformace PPII je totiž mnohem více „otevřená“ než α -helikální a je tedy obklopena více molekulami rozpouštědla, a proto je vzhledem k polárním částem molekul PBLG její realizace výhodnější v polárnějším rozpouštědle.

Byla studována teplotní závislost VCD spekter PBLG v obou ternárních systémech. Pro každý systém byl zvolen roztok, v němž byl PBLG pozorován v α -helikální konformaci, a poté roztok, v němž byl pozorován v konformaci PPII. Pro systém CHCl_3/TFA to byly roztoky o obsahu TFA 10 a 15 obj.%, pro systém benzen-d6/TFA roztoky s 30 (obr. 1b) a 35 obj.% (obr. 1c) TFA. U obou systémů byly pozorovány podobné změny v závislosti na teplotě. Obr. 1b ukazuje, že u roztoků s nižším obsahem TFA (α -helikální konformace) nedocházelo se zvyšováním teploty k žádným změnám, ale při snižování teploty docházelo ke změně na konformaci PPII a to mezi 20–25 °C pro oba systémy. Naopak obr. 1c ukazuje, že u roztoků s výchozí konformací PPII docházelo ke změnám se zvyšující se teplotou, kdy se konformace změnila na α -helikální a to u 40–45 °C pro první systém a u 50–60 °C pro druhý systém. Nejvýznamnějším společným jevem pro pozorované konformační změny tedy je, že struktura PPII považovaná za méně uspořádanou se stabilizuje při nižší teplotě než intramolekulárními vodíkovými můstky stabilizovaná struktura α -helix.

Velmi nízká koncentrace $[\text{H}^+]$ iontů prokázaná konduktometricky⁹ i námi naměřenými IČ spektry dokazuje, že konformace PBLG souvisí s rovnováhou mezi různými asociovanými formami TFA a ne významně s její disociací. V procesech (1), (2) a (3) vystupuje monomerní forma kyseliny a dochází tedy k jejich vzájemnému ovlivnění. Pro posouzení rovnováhy (1) a jejího vlivu na rovnováhy (2) a (3) v závislosti na teplotě byla naměřena teplotní závislost IČ spekter pro rozpouštědlo TFA/ CHCl_3 a pro ternární systém PBLG/TFA/ CHCl_3 . Měření bylo provedeno pro roztoky o obsahu 10 a 15 obj.% TFA v teplotním rozsahu 15–45 °C. Experiment poskytl stejné výsledky pro oba obsahy TFA. Intenzita signálů pro dimerní formu TFA s rostoucí teplotou klesala a naopak intenzita signálů pro monomerní formu TFA rostla. S teplotou je tedy rovnováha (1) posunutá doleva. Z vyhodnocených dat vyplývá, že přítomnost PBLG nemá vliv na změny v rovnováze (1).

Navržený model interakcí TFA s PBLG tedy neaproximuje plně popisovaný systém. Konformační změny PBLG v závislosti na teplotě nejsou způsobeny interakcí TFA s PBLG.

Analyzujeme-li náš systém, je třeba uvažovat různé termodynamické parametry s ním spojené, zejména konformační změnu PBLG spojenou s rozrušením intramolekulárních vodíkových můstků a vazbu TFA na nehelikální úseky PBLG¹⁰. Dle teorie Zimma a Bragga¹¹ lze jako konstantu K označit konstantu charakterizující formaci α -helikální konformace a její hodnota byla stanovena na $2 \cdot 10^{-4}$ pro polypeptidy v nevodných rozpouštědlech¹¹. Zastoupení α -helikální konformace můžeme označit jako h a pro jeho teplotní závislost poté platí¹¹:

$$-\left(\frac{\partial h}{\partial\left(\frac{1}{T}\right)}\right) = \frac{\Delta H}{4 \cdot R \cdot K^{0,5}} \quad (4)$$

kde ΔH je entalpie přechodu PPII \leftrightarrow α -helix, která je zásadní pro vysvětlení problému, neboť její hodnota kladná pro PBLG v systému směsného rozpouštědla složeného z helikogenní složky (CHCl_3 , benzen-d6) a TFA, která naopak α -helix rozrušuje¹⁰. To je důvod pro inverzní přechod, při němž je α -helikální konformace stabilnější za vyšších teplot než PPII.

Závěr

V předkládané práci bylo ukázáno, že konformace PBLG je závislá na obsahu TFA v rozpouštědle i na zvolené teplotě.

Bylo prokázáno, že vliv teploty na strukturu PBLG v roztoku směsného rozpouštědla TFA/ CHCl_3 a TFA/benzen-d6 je významný a že méně uspořádaná konformace PPII je stabilnější za nižších teplot než více uspořádaná α -helix. Pozorované děje nejsou ovlivněny rovnováhou monomerní \leftrightarrow dimerní TFA. Zásadní vliv na překvapivé změny konformace mají termodynamické parametry PBLG v roztocích užitých směsných rozpouštědel.

Při pozorování vlivu obsahu TFA na strukturu PBLG v roztoku směsného rozpouštědla TFA/benzen-d6 se prokázalo, že TFA interaguje s PBLG a že tato interakce má vliv na změnu sekundární konformace, která zde probíhá z více uspořádané na méně uspořádanou s rostoucím množstvím kyseliny. Tato konformační změna se tedy svou podstatou významně liší od té probíhající v závislosti na teplotě. Ukázalo se také, že použité helikogenní rozpouštědlo má významný vliv. V méně polárním systému s benzenem-d6 docházelo ke konformační změně PBLG při vyšším obsahu TFA než v systému s polárnějším CHCl_3 .

Poprvé bylo využito podrobných strukturálních informací získaných z VCD ke kompletní analýze konformačních změn v systémech PBLG/TFA/ CHCl_3 a PBLG/TFA/benzen-d6 v závislosti na teplotě a v případě druhého systému i v závislosti na obsahu TFA.

LITERATURA

1. Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
2. Berova N., Nakanishi K., Woody R. W.: *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley-VCH, New York 2000.
3. Bradbury E. M., Carpenter. B. G., Crane-Robinson C.: *Macromolecules* 4, 557 (1971).
4. Pivcova H., Doskocilova D., Bradbury E. M.: *Polymer* 20, 139 (1979).
5. Novotná P., Urbanová M.: *CD and ISBC conf. 2009, Brescia, 130 (30.8. - 4.9.2009)*.
6. Novotná P., Urbanová M.: *61. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, (7-11.9.2009)*. *ChemZi* 5/1, 58 (2009).
7. Novotná P., Urbanová M.: *Proc. 5th Int. Stud. Conf. „Modern Analytical Chemistry“, Charles University, Praha 2009 (21-22.9. 2009)*.
8. Novotná P.: *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2009.
9. Brosio E., Delfini M., Depaolis A., Paci M., Conti F.: *Biopolymers* 13, 745 (1974).
10. Puett D., Ciferri A.: *Biopolymers* 10, 547 (1971).
11. Zimm B. H., Bragg J. K.: *J. Chem. Phys.* 31, 526 (1959).

VÝVOJ METODY PRO *IN VIVO* MONITOROVÁNÍ NEUROCHEMICKÝCH ZMĚN V MOZKU POTKANŮ

LUCIE PACOSOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ
a PETR KAČER

Ústav organické technologie, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

lucie.pacosova@vscht.cz

Úvod

Studiu procesů odehrávajících se v mozku byla v poslední době věnována značná pozornost, nicméně neznalost podstaty řady biochemických dějů celé studium značně komplikuje. Sledování koncentrace neurotransmiterů a jejich metabolitů by mohlo přispět k objasnění celé řady biochemických dějů. Nejdůležitější tzv. modulační katecholamin – dopamin (DA) – se podílí na regulaci nálad, učení, spánku, pozornosti, odměny, vzniku deprese, Parkinsonovy choroby a schizofrenie. Dopamin je považován za hlavní neuropřenašeč při vzniku adikce, která se projevuje zvýšením koncentrační hladiny dopaminu a jeho metabolitů v mozkovém centru *Nucleus Accumbens* (NA). DA je metabolizován enzymem catechol-*O*-methyltransferasou (COMT) anebo enzymem monoaminoxidasou (MAO) na kyselinu homovanilovou (HVA), 3-methoxytyramin (3-MT) a 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu (DOPAC). Koncentrační hladiny DA a jeho metabolitů přesně vystihují chování dopaminergního systému a poskytlují tak informace o enzymatické aktivitě v mozku.

Vzorky mikro dialyzátu, jejichž složení koresponduje se složením extracelulárního prostředí konkrétního mozkového centra, umožňují monitorování koncentračních profilů látek *in vivo* v průběhu různých biochemických dějů. Pro stanovení DA a jeho metabolitů v mikro dialyzátech se používá řada analytických technik^{1–7}, např. spojení chromatografie s fluorescenční (FL), chemiluminescenční (CL), ultrafialovou (UV) a elektrochemickou (EC) detekcí. Kapalinová chromatografie spojená s elektrochemickým detektorem se v oblasti neurověd stala velice populární. Ačkoliv tato technika byla úspěšně aplikována v řadě prací, vyznačuje se několika nedostatky, a to zejména dlouhým časem analýz a identifikací sledovaných látek jen na základě porovnání retenčních časů se standardy. Jednou z možností jak zvýšit selektivitu a senzitivitu analýzy, je použití kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS).

V současné době se na ilegálním trhu s drogami vyskytuje mnoho nových syntetických látek, jejichž mechanismus účinku na dopaminergní systém nebyl zcela objasněn. Znalost mechanismu působení drog je velice důležitý

pro charakterizaci jejich toxicity a adiktivity, ale i pro výběr vhodného antidota při intoxikaci organismu. Velice populární drogou se stala látka označovaná jako 2C-B (= 4-bromo-2,5-dimethoxyfenylethylamin), která se prodává jako náhražka extáze (3,4-methylendioxyamfetamin, MDMA), ovšem má zcela odlišné vlastnosti, které však ještě nebyly důsledně prozkoumány. Jiným příkladem je metamfetamin (MA), který můžeme zařadit mezi „stálice“ na trhu s drogami, a jehož ovlivnění dopaminergního systému bylo prokázáno. Otázkou u MA a dalších návykových látek však zůstává ovlivnění dopaminergní neurotransmise při prenatální expozici.

Předkládaná práce se zabývá vývojem nové, vysoce účinné a selektivní metody pro *in vivo* monitorování DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) ve vzorcích mikro dialyzátů odebraných z mozkového centra *Nucleus Accumbens* (NA) potkanů po aplikaci MA a 2C-B. Vyvinutá metoda se skládá ze separační části (lyofilizace), která je určena k zakoncentrování DA a jeho metabolitů, a samotné HPLC-MS analýzy.

Experimentální část

Odběr mikro dialyzátu

Odběr mikro dialyzátu byl prováděn pomocí implantované kanyly MAB 4.15 IC [Agn Tho's AB, Švédsko] 2 mm nad NA. Do kanyly byla zavedena mikro dialyzační sonda MAB 4.15.2.Cu [Agn Tho's AB, Švédsko], která byla promývána umělé cirkulující tekutinou – ACSF (147 mM NaCl, 1,3 mM CaCl₂, 0,9 mM MgCl₂ a 4,0 mM KCl ve vodě (pH 6,5–7,0)) o průtoku 2 μl min⁻¹. Vzorek byl vždy odebrán po dobu 20 min do připravených plastových mikro zkumavek obsahujících 15 μl 0,1 M HCl a 10 pg vnitřního standardu (deuterovaný standard – DA.HCl-*d*₄). Před aplikací drogy byly vždy nejprve odebrány 3 vzorky (pro stanovení základní hladiny DA a jeho metabolitů). Po aplikaci drogy byly změny hladin analytů monitorovány po dobu 180 min.

Zakoncentrování vzorku

Zakoncentrování vzorku probíhalo s využitím mrazového sušení (lyofilizace) na přístroji Labconco Free Zone po dobu 12 h. Kondenzační spirála lyofilizátoru byla chlazená na teplotu –47 °C a tlak se v zařízení po hodině ustálil na 9 kPa. Vzorek během lyofilizace byl udržován při absenci světla. Vzorek po lyofilizaci byl rozpuštěn v 10 μl methanolu a analyzován metodou LC-ESI-MS/MS.

Tabulka I
Monitorovací reakce analytů a kolizní energie

Analyt	CID kolize		Kolizní energie [eV]
	[m/z → m/z]		
DA.HCl	137 → 91		-17,5
DA.HCl-d4	141 → 123		-17,5
HVA	181 → 122		17,0
3-MT.HCl	168 → 151		-11,5
DOPAC	167 → 122		8,5

LC/MS analýza

Pro vlastní analýzu bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Varian 1200 L, USA). Chromatografické dělení látek bylo realizováno na koloně Gemini (C18, 110 Å, 5 µm, 15 × 2 mm) s předkolonkou Gemini (Phenomenex, USA) a s mobilní fází o složení methanol (A) a vodný roztok kyseliny octové (pH 2) (B) při gradientovém uspořádání (0:00–4:59 min 95% B; 5:00–14:59 70% B; 15:00–15:59 70% B; 16:00–19:59 95% B; od 20:00 95% B) o průtoku 150 µl min⁻¹. Nastříkovaný objem vzorku na kolonu byl 5 µl.

Tabulka II

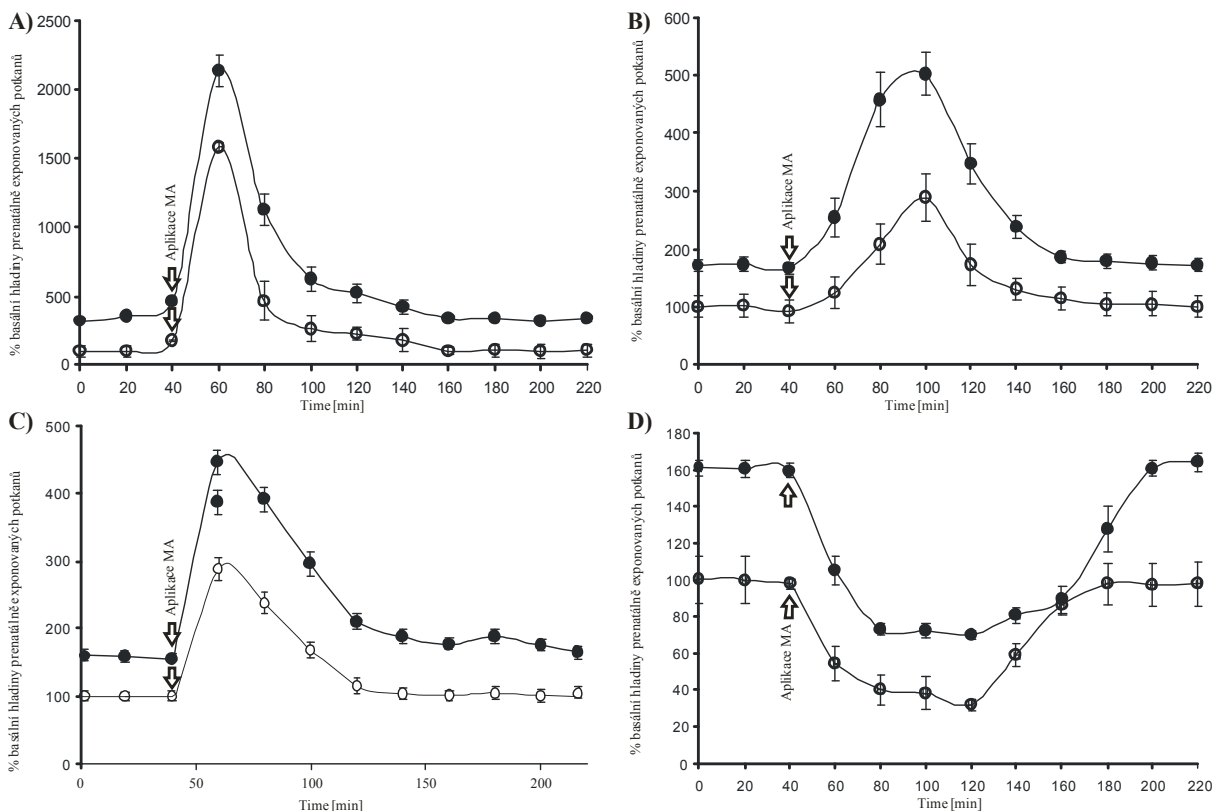
Validační parametry pro DA.HCl a jeho metabolity – HVA, 3-MT.HCl a DOPAC

Substance	Přesnost RSD [%]	Správnost RE [%]	Výtěžnost [%]	LOD [pg/40 µl]	LOQ [pg/40 µl]
<i>Lyofilizace - LC-ESI-MS/MS</i>					
DA.HCl	11,4	-11,8	88,2	0,07	0,08
HVA	10,1	-11,7	88,5	0,08	0,09
3-MT.HCl	13,9	-14,1	86,1	0,09	0,11
DOPAC	11,9	-11,4	88,6	0,08	0,09
<i>SPE - LC-ESI-MS/MS</i>					
DA.HCl	13,6	-18,3	80,6	0,10	0,12
HVA	13,5	-20,6	79,2	0,16	0,17
3-MT.HCl	15,3	-16,8	82,5	0,11	0,13
DOPAC	14,6	-21,3	77,7	0,18	0,19
<i>Stripování dusíkem - LC-ESI-MS/MS</i>					
DA.HCl	17,6	-13,4	85,3	0,08	0,09
HVA	15,5	-13,0	87,8	0,09	0,10
3-MT.HCl	18,3	-16,9	83,7	0,11	0,13
DOPAC	19,4	-12,4	88,0	0,09	0,10
<i>LC-ECD</i>					
DA.HCl	10,2	-7,3	94,7	8,9	10,4
HVA	12,6	-6,2	95,8	13,9	18,2
3-MT.HCl	9,3	-5,5	96,0	12,8	16,3
DOPAC	9,9	-6,6	95,1	13,2	17,7

Trojité kvadrupól, kterým byl vybaven hmotnostní spektrometr, umožnil použití vysoce citlivého a selektivního „Selective Reaction Monitoring“ modu (SRM). Jeho principem je izolace specifického iontu analytu na prvním kvadrupólu, který je následně podroben kolizně-indukované disociaci (CID) na druhém kvadrupólu a charakteristický produktový ion je pak detegován na kvadrupólu třetím. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly optimalizovány z hlediska dosažení maximální citlivosti stanovení na následující hodnoty: napětí na kapiláře 65 V (ESI⁺) a -70 V (ESI⁻), tlak kolizního plynu (argon) využívaného pro kolizně-indukovanou disociaci (CID) 0,2 Pa. Kolizní energie jako výsledek série optimalizačních experimentů jsou uvedeny v následující tabulce I pro každý jednotlivý analyt.

Výsledky a diskuse

Dopamin a jeho metabolity jsou známy jako málo stabilní látky⁴, proto bylo nezbytné zjistit jejich chování při laboratorní teplotě (25 °C) v matrici ACSF a v použité mobilní fází, tj. za podmínek jejich zpracování. Stabilita látek byla stanovena NMR analýzou, která byla realizována na přístroji Bruker AVANCE III 600 MHz (600,23 MHz for ¹H, Bruker). V průběhu stabilitní studie (doba jednoho experimentu 2 dny) nebyla pozorována



Obr. 1. Koncentrační závislost DA (A), HVA (B), 3-MT (C) a DOPAC (D) před a po aplikaci MA; ● MA prenatálně exponovaná skupina, ○ kontrolní skupina

degradace HVA a DOPAC. Pro DA a 3-MT byla stanovena rychlost poklesu koncentrace 0,10–0,15 % za hodinu. DA a 3-MT lze stabilizovat jejich převedením na příslušné hydrochloridy, které se po přidání kyseliny chlorovodíkové tvoří okamžitě. Z tohoto důvodu byl roztok ACSF s analyty v průběhu experimentální studie jímán do mikrozkuhavky obsahující 15 μl 0,1% kyseliny chlorovodíkové.

Analýza mikrodialyzátu klade značné nároky na použité analytické metody hned z několika důvodů: 1) velice nízká koncentrace (femto- či pikogramy na mililitr) analytů v ACSF roztoku; 2) malý objem analyzovaných vzorků (40 μl) a 3) přítomnost velkého množství solí v ACSF. Z těchto důvodů byly před samotnou HPLC/MS analýzou sledované látky separovány a zakonzentrovány. Jako koncentrační metody byly testovány lyofilizace, SPE (extrakce na pevné fázi) s využitím SPE PerfectPure C18 tip (Eppendorf, Německo) a stripování dusíkem. Vyvinuté metody skládající se z koncentračního kroku a následné HPLC/MS analýzy byly porovnány s kapalinovou chromatografií spojenou s elektrochemickým detektorem (HPLC ESA 582 pump a ESA CoulArray 5600A multi-electrode array detector se čtyřmi pracovními elektrodami). Získaná validační data všech analytických metod byla statisticky vyhodnocena a jsou uvedena v tab. II.

Vyvinutá analytická metoda skládající se z koncentrační metody – lyofilizace a HPLC-MS/MS analýzy byla použita pro experimentální studii při sledování změn koncentrací DA, HVA, 3-MT a DOPAC v mozku ve vzorcích mikrodialyzátu po akutní aplikaci MA a 2C-B. Vzorky byly získávány z *Nucleus Accumbens* u prenatálně exponovaných potkanů danou návykovou látkou (5 mg kg^{-1} , *s.c.*). Vzorky byly sbírány 180 min po akutním podání MA, nebo 2C-B (1 mg kg^{-1} , *s.c.*). Typický průběh závislosti koncentrace DA a jeho metabolitů na čase po podání MA je znázorněn na obr. 1. Vyšší bazální koncentrace DA, HVA, 3-MT a DOPAC byly nalezeny jak pro MA, tak i pro 2C-B u prenatálně exponované skupiny potkanů. Hladiny DA, HVA, 3-MT a DOPAC se měnily ve stejném časovém okamžiku v souladu s mechanismem účinků daných návykových látek.

Závěr

Předkládaná práce se zabývá vývojem analytické metody pro *in vivo* stanovení koncentrace DA a jeho metabolitů v mozku. Navržená metoda se skládá z mikrodialyzačního odběru vzorku z *Nucleus Accumbens*

a analytické metody, která kombinuje lyofilizační zakoncentrování vzorku s hmotnostně spektrometrickým stanovením neurotransmiterů po akutním podání návykové látky (metamfetaminu a 2C-B). Navržená metoda byla optimalizována ve snaze postihnout co největší množství parametrů jak na straně odběru vzorku a zacházení s ním, tak na straně jeho zpracování a následného analytického stanovení. Vyvinutá metoda byla následně testována na animální studii, jejímž úkolem bylo objasnit mechanismus účinku a adikce látky 2C-B a MA při prenatální expozici jedinců po akutní aplikaci drogy. Realizovaná studie umožnila vyslovit domněnku, že aplikace drog ze skupiny budivých aminů v průběhu prenatálního vývoje vede k ovlivnění dopaminergního systému v mozku potomků a to jak vyššími bazálními koncentracemi dopaminu, tak jeho vyššími fyziologickými koncentracemi v *Nucleus Accumbens*, což by mohlo být interpretováno jako vyšší predispozice k vytváření adikce na návykové látky uvedeného typu.

Autoři by chtěli poděkovat Grantové agentuře České republiky (GA ČR P303/10/0580) a Ministerstvu Školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT 223 100001) za finanční podporu.

LITERATURA

1. Baranyi M., Milusheva El., Vizi E. S., Sperlágh B.: *J. Chrom., A* 13, 1120 (2006).
2. Chang L., Alicata D., Ernst T., Volkow N.: *Addiction* 16, 102 (2007).
3. Westerink B. H. C.: *J. Chrom., B* 21, 747 (2000).
4. Braenden J. U., Stendal T. L., Fagernaes C. B.: *J. Clin. Pharm. Therap.* 28, 471 (2003).
5. Kuczenski R., Segal D. S.: *J. Pharm. Exper. Ther.* 262, 1085 (1992).
6. Ying Shen, Ming Y.Y. E.: *J. Liquid Chrom.* 17, 1557 (1994).
7. Syslová K., Rambousek L., Pacosová L., Kuzma M., Bubeníková-Valešová V., Šlamberová R., Najmanová V., Kačer P.: *J. Chrom., B*, zasláno k otištění.

IN-SITU NMR STUDIE MECHANISMU ASYMETRICKÉ HYDROGENACE SUBSTITUOVANÝCH DIHYDROISOCHINOLINŮ NA Ru-KATALYZÁTORECH NOYORIHO TYPU

JAN PŘECH^a, MAREK KUZMA^b
a PETR KAČER^a

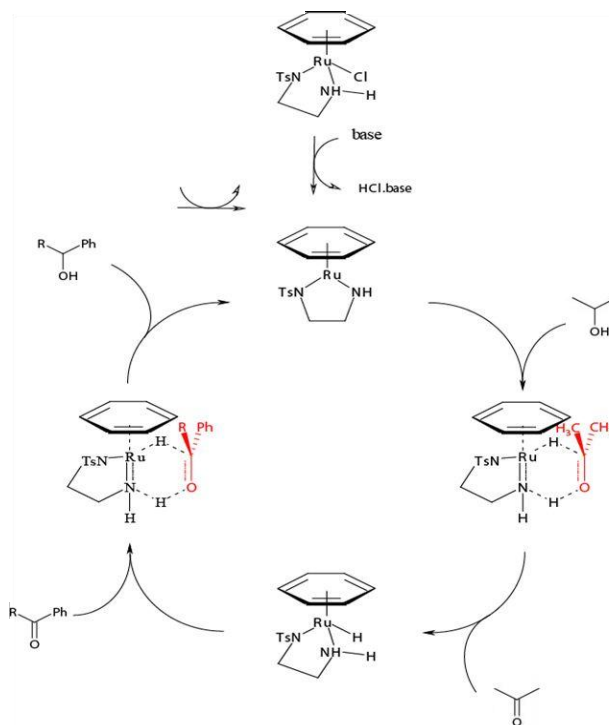
^a Ústav organické technologie VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^b Laboratoř charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
jan.prech@vscht.cz

Úvod

Rozdílný účinek optických antipodů na biologický systém je důvodem zájmu o asymetrické syntézy v posledních desetiletích v mnoha odvětvích, zvláště pak v oblasti léčiv, vonných látek a dalších biologicky aktivních látek. Od této doby se enantioselektivní katalýza prudce rozvíjí a stává se v dnešní době široce používanou a poměrně snadnou cestou přípravy opticky aktivních látek z achirálních prekurzorů a to jak v laboratorním, tak v průmyslovém měřítku¹⁻⁶. Primárně byla pozornost soustředěna především na asymetrickou hydrogenaci C=C dvojných vazby, v poslední době se však do popředí zájmu

stále více dostává i asymetrická hydrogenace C=N a C=O dvojných vazby. Pro asymetrickou hydrogenaci C=N a C=O dvojných vazby na opticky aktivních katalytických systémech jsou používány dva základní postupy: hydrogenace plynným vodíkem a transfer hydrogenace. Pro asymetrickou hydrogenaci plynným vodíkem jsou užívány jako katalyzátory především organometalické komplexy rhodia a ruthenia s difosfinovými ligandy⁷⁻¹³. Metoda transfer hydrogenace využívá jako zdroj vodíku jednoduché organické sloučeniny (např. propan-2-ol, kyselina mravenčí) a reakce je katalyzována komplexy ruthenia, rhodia nebo iridia s β-diaminovými nebo β-aminoalkoholovými chirálními ligandy¹⁴⁻¹⁸. Do této skupiny spadá i katalyzátor Noyoriho typu¹⁹, za jehož objev byla udělena Nobelova cena a který je předmětem studia předkládané práce.

Asymetrická transfer hydrogenace C=N dvojných vazby v dihydroisochinolinovém substrátu na katalytickém komplexu Ru (II) Cl [(1*S*,2*S*)-*N*-*p*-toluensulfonyl-1,2-difenylethyldiamin (η⁶-*p*-cymen)] (Noyoriho katalyzátor) za použití donoru vodíku, kyselina mravenčí : triethylamin je předmětem předkládané práce. Na obr. 1 je zachycen Noyorim navržený mechanismus, kde triethylamin obsažený v reakční směsi plní pouze funkci akceptoru chlorovodíku při aktivaci katalyzátoru do formy hydridu katalytic-



Obr. 1. Původně navržený mechanismus funkce Noyoriho katalyzátoru¹⁹

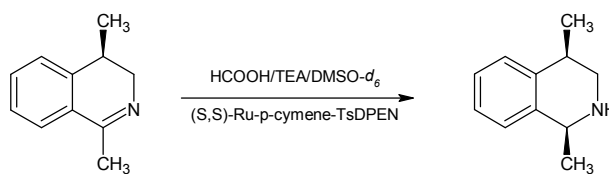
kého komplexu, který je následně zodpovědný za přenos vodíku na substrát. V předkládané práci realizované experimenty s různými bázemi lišícími se svou bazicitou však vedly k nalezení korelačních vztahů mezi strukturálními vlastnostmi použité báze na straně jedné a reakční rychlostí, ale i enantioselektivitou na straně druhé. Tato skutečnost iniciovala náš zájem o další studium mechanismu asymetrické hydrogenace na Noyoriho katalyzátoru.

Experimentální část

Použité chemikálie: Noyoriho katalyzátor, kyselina mravenčí, triethylamin (TEA), diisopropylethylamin (DIPEA), 1,4-diazabicyclo[2,2,2]oktan (DABCO), pyridin, pyrrol, imidazol, morfolin, piperidin, DMSO- d_6 , CD_3CN a $CDCl_3$ (Sigma-Aldrich, USA). Modelový substrát (4*R*)-1,4-dimethyl-3,4-dihydroisochinolin [1] a ^{15}N -piperidin byly synteticky připraveny a byla stanovena jejich čistota (GC/MS, 99,0 %).

In-situ kinetické experimenty byly měřeny na NMR systému Varian ^{15}N UNITY Inova-400 MHz v rozpouštědlech CD_3CN , DMSO- d_6 a $CDCl_3$ při teplotě 303 K. Zbytkový signál rozpouštědla byl použit jako vnitřní standard (CD_3CN : δ_H 1,931 ppm, δ_C 1,265 ppm, DMSO- d_6 : δ_H 2,500 ppm, δ_C 39,60 ppm, $CDCl_3$: δ_H 7,265 ppm, δ_C 77,00 ppm). 1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena standardním softwarem (Varian Inc., U.S.A.). Experimenty se značeným ^{15}N -piperidinem byly měřeny na NMR systému Bruker AVANCE III 600 MHz (600,23 MHz pro 1H -NMR, 150,93 MHz pro ^{13}C -NMR, 60,82 MHz pro ^{15}N -NMR, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo). Pro měření koordinace báze byl použit heteronukleární korelační experiment 1H - ^{15}N HMBC.

Hmotnostně spektrometrické experimenty byly provedeny na přístroji APEX-Ultra FTMS vybaveném 9,4 T supravodivým magnetem, s využitím elektrosprejové (ESI) pozitivní ionizace s průtokem nástřiku 1 ml min $^{-1}$ a teplotou sušícího plynu (dusík) 200 °C.



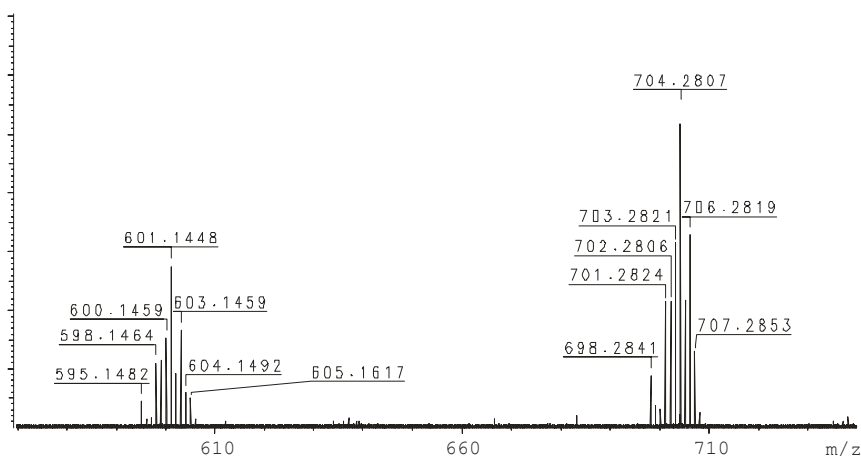
Obr. 2. Modelová reakce pro studium mechanismu Noyoriho katalyzátoru

Výsledky a diskuse

Asymetrická transfer hydrogenace na Noyoriho katalyzátoru probíhá se směsí kyselina mravenčí – báze jakožto donorem vodíku. Přítomnost organické báze (TEA, DIPEA, DABCO, piperidin) je pro průběh reakce nezbytná. Předpokládá se, že báze hraje roli akceptoru HCl při aktivaci katalyzátoru¹⁹ a o jejím vlivu na rychlost a selektivitu reakce nebyly dosud publikovány žádné informace. Naše pozornost byla zaměřena na studium vlivu použité báze na průběh hydrogenační reakce. Na modelové reakci (obr. 2) jsme testovali hydrogenaci v přítomnosti řady různých bází (uvedeny v tab. I), které byly voleny s ohledem na různou sterickou náročnost a bazicitu. Kinetické experimenty byly prováděny v NMR kyvetě.

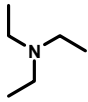
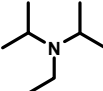







Výsledky kinetických experimentů jsou shrnuty v tab. I. Použití různých bází vedlo ke značným změnám v reakčních rychlostech, ale i hodnotách enantioselektivity vyjádřených parametrem *de* (diastereomerní přebytek). V případě terciárních alifatických aminů můžeme pozorovat korelaci mezi bazicitou aminu a selektivitou reakce. Selektivita reakce je také pravděpodobně ovlivněna sterickou náročností použité báze, což je dobře vidět na řadě DIPEA – TEA – DABCO. Nižší sterická náročnost báze vede k vyšší selektivitě.

Tyto výsledky jasně dokazují, že báze v mechanismu asymetrické transfer hydrogenace hraje podstatně důležitější roli, než jen roli akceptoru HCl, protože použitá báze neovlivňuje jen reakční rychlost, ale také enantioselektivitu.



Obr. 3. FT-MS spektrum Noyoriho katalyzátoru za podmínek hydrogenace se směsí HCOOH/TEA

Tabulka I
Výsledky kinetických experimentů s různými bázemi

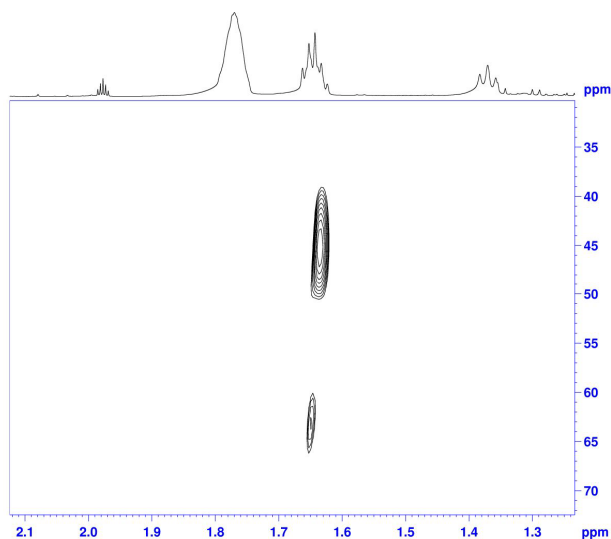
Druh báze	Báze	pK_{a1}	$k_{rel.}$ vzhledem k TEA	de [%]	
Acyklické	Triethylamin		11,0	1,0000	55,5
	Diisopropylethylamin		11,4	0,2442	46,1
Cyklické	Morpholin		8,3	0,2144	65,6
	Piperidin		11,0	0,2059	65,1
	Pyrrolidin		11,3	0,0594	71,5
	DABCO		8,7	0,2335	63,8
Heteroaromatické	Pyrrrol		0,4	0,1423	65,5
	Imidazol		7,0	0,0042	0
	Pyridin		5,2	0,0064	69,3

tu. To by mohlo být vysvětleno jako důsledek koordinace báze na strukturu Ru hydridu, který je aktivní částicí při hydrogenaci.

K důkazu této domněnky jsme se rozhodli prokázat vznik rutheniového katalytického komplexu s koordinovanou bází. Byla použita ESI⁺-FT-MS měření s cílem získat bližší informaci o katalytických strukturách vznikajících za podmínek transfer hydrogenace. Získaná ESI⁺-MS spektra reakční bez substrátu (HCOOH:TEA 5:2 (10 μ l) a Noyoriho katalyzátor (5,1 mg) v acetonitrilu (550 μ l) s přidávkem vody (40 μ l)) prokázala přítomnost pouze 2 iontových klastrů (obr. 3). Intenzivnější klaster obsahuje monoizotopický ion s m/z 698,2841. Analýza toho klastru poskytla sumární vzorec C₃₇H₅₂N₃O₂RuS.

Teoretický monoizotopický ion této struktury m/z 698,2851 velmi dobře odpovídá naměřeným m/z (chyba: 1,4 ppm). Sumární vzorec Ru hydridu je C₃₁H₃₆N₂O₂RuS. Rozdíl sumárních vzorců (molárních hmotností) odpovídá částici C₆H₁₆N. Reakční směs obsahovala jako bázi TEA (C₆H₁₅N), iontový klaster tedy může být interpretován jako Ru hydrid s koordinovaným TEA. Druhý, méně intenzivní klaster obsahuje monoizotopickou hmotu m/z 595,1482, což odpovídá sumárnímu vzorci C₃₁H₃₅N₂O₂RuS (teoreticky m/z 595,1490; chyba: 1,3 ppm). To může být vysvětleno eliminací TEA.

Popsané měření s TEA bylo zopakováno i s dalšími bázemi – DIPEA a DABCO, abychom potvrdili koordinaci báze s Ru hydridem za podmínek transfer hydrogenace.



Obr. 4. ^1H - ^{15}N HMBC spektrum reakční směsi s ^{15}N -piperidinem

MS spektra těchto směsí opět obsahovala dvojici klastrů. První z nich byl ve všech případech shodný s monoizotopickou hmotou o hodnotě $m/z = 595,14$, nicméně hodnota m/z druhého klastru se měnila vždy v závislosti na molární hmotnosti použité báze. Lze tedy očekávat, že tyto iontové klastry představují komplexy Ru hydridu s použitou bází. Tato očekávání jsou podpořena vynikající shodou mezi očekávanými a naměřenými hmotami monoizotopických iontů komplexů Ru hydridu s různými bázemi. Tím bylo dále potvrzeno, že i další báze jsou schopny koordinace k Ru za podmínek transfer hydrogenace.

Za stejných podmínek jako FT-MS měření byl proveden i ^1H - ^{15}N HMBC experiment s ^{15}N -značeným piperidinem. Molární poměr báze : katalyzátor byl zvolen 10:1. Byla pozorována dvojice signálů ^{15}N (obr. 4) odpovídající korelaci N–H v poloze C4. Majoritní signál odpovídal volnému piperidinu ($\delta = 45,2$) a minoritní ($\delta = 63,0$) korespondoval piperidinu koordinovanému na Ru.

Závěr

Byla studována asymetrická transfer hydrogenační reakce na Noyoriho katalyzátoru a to z hlediska vlivu struktury použité báze ve směsi s kyselinou mravenčí jako zdrojem vodíku na selektivitu a rychlost reakce. Bylo zjištěno, že struktura použité báze má zásadní vliv nejen na rychlost reakce, ale především na její selektivitu, což ukazuje, že mechanismus reakce je odlišný od původního navrženého prof. Noyorim¹⁹. FT-MS měření a experimenty s ^{15}N značeným piperidinem prokázaly, že dochází v průběhu reakce ke koordinaci katalytické báze na aktivní částici Ru hydrid. Tato částice hraje roli nejen vodíkového

donoru při hydrogenaci, ale svou strukturou determinuje i koordinaci hydrogenované látky, což se projeví zcela zásadně parametrem enantioselektivity. Tento závěr představuje zcela zásadní změnu v obecně přijímaném mechanismu asymetrické transfer hydrogenace na rutheniových katalyzátorech Noyoriho typu.

Autoři by chtěli poděkovat Grantové agentuře České republiky (GA ČR 104-09-1497) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT 223 100001) za finanční podporu.

LITERATURA

- Rathelot P.; et al.: *Eur. J. Med. Chem.* **30**, 503 (1995).
- Ohkuma T., Noyori R., v knize: *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; (Jacobsen E. N., Pfaltz A., Yamamoto H., ed.), Vol. 1, str. 199-246. Springer, Berlin 1999.
- Blaser H.-U., Springer F., v knize: *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; (Jacobsen E. N., Pfaltz A., Yamamoto H., ed.), Vol. 1, str. 247-265. Springer, Berlin 1999.
- Noyori R.: *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*; str. 16-94. Wiley, New York 1994.
- Noyori R., Ohkuma T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 40 (2001).
- Blaser H.-U., Malan C., Pugin B., Spindler F., Steiner H., Studer M.: *Adv. Synth. Catal.* **345**, 103 (2003).
- Noyori R., Kitamura M., Ohkuma T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 5356 (2004).
- Zassinovich G., Mestroni G., Gladioli S.: *Chem. Rev.* **92**, 1051 (1992).
- Hashiguchi S., Fujii A., Noyori R.: *J. Synth. Org. Chem. (Jpn)* **54**, 818 (1996).
- Noyori R., Hashiguchi S.: *Acc. Chem. Res.* **30**, 97 (1997).
- Everaere K., Mortreux A.: Carpentier J.-F.: *Adv. Synth. Catal.* **345**, 67 (2003).
- Palmer M. J., Wills M.: *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 2045 (1999).
- Nordin S. F. M., Roth P., Tarnai T., Alonso D. A., Brandt P., Andersson P. G.: *Chem. Eur. J.* **7**, 1431 (2001).
- Ohkuma T., Ooka H., Hashiguchi S., Ikariya T., Noyori R.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2675 (1995).
- Ohkuma T., Ooka H., Ikariya T., Noyori R.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10417 (1995).
- Doucet H., Ohkuma T., Murata K., Yokozawa T., Kozawa M., Katayama E., England A. F., Ikariya T., Noyori R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **37**, 1703 (1998).
- Ohkuma T., Ishii D., Takeno H., Noyori R.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6510 (2000).
- Ohkuma T., Koizumo M., Muniz K., Hilt G., Kabuto C., Noyori R.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6508 (2002).
- Yamakawa M., Ito H., Noyori R.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1466 (2000).

VYUŽITÍ THIOLOVOU VRSTVOU MODIFIKOVANÉ VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODY VE VOLTAMETRICKÉ ANALÝZE GENOTOXICKÝCH ENVIROMENTÁLNÍCH POLUTANTŮ

VÍT PRCHAL, 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
prchal@natur.cuni.cz

Úvod

Nitroderiváty polycyklických uhlovlků (NPAH) patří k intenzivně sledovaným polutantům životního prostředí, neboť bylo prokázáno, že expozice těmto látkám zvyšuje riziko výskytu nádorových onemocnění¹. Velmi snadná redukovatelnost nitroskupiny vázané na aromatickém jádře umožňuje jednoduché stanovení NPAH elektrochemickými metodami^{2–4}. Cílem této práce bylo voltametrické stanovení vybraných NPAH a nitrofenolů na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a studium zlepšení jejich detekce pomocí chemické modifikace povrchu této elektrody. Zkoumané látky byly: 1-nitrobenzen (1-NB), 1-nitronaftalen (1-NN), 2-nitrofluoren (2-NF), 9-nitroanthracen (9-NA), 2-nitrofenol (2-NFe) a 4-nitrofenol (4-NFe); jako modelový zástupce nitroderivátů alifatických uhlovlků byl pro srovnání zvolen nitromethan. Při použití diferenční pulsní voltametrie (DPV) na HMDE je analytická odezva výše uvedených látek velice podobná (dochází k překryvu píků), tudíž tyto látky nelze spolehlivě stanovit vedle sebe. Chemickou modifikací povrchu HMDE 1-oktanthiolem⁵ lze dosáhnout změny analytické odezvy (potlačení/posun píku) aromatických aminů na zlaté elektrodě. Cílem této práce proto bylo ověřit možnost analogické chemické modifikace HMDE pomocí samoskladné vrstvy 1-oktanthiolu a její případný vliv na polohu a výšku píku výše uvedených zkoumaných látek a případné využití tohoto vlivu k elektrochemické detekci těchto látek ve směsi.

Experimentální část

Byly použity následující chemikálie: 1-nitrobenzen (99,5%), 1-nitronaftalen (99%), 2-nitrofluoren (98%), 9-nitroanthracen (99,9%), 4-nitrofenol (99,5%) (všechny Sigma-Aldrich, Praha, ČR), 2-nitrofenol (99%; Riedel-de-Haën, Seelze, SRN) a nitromethan (99%; P. P. H. Polskie odczynniki chemiczne, Gliwice, Polsko). Z těchto látek byly připraveny zásobní roztoky v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} . Zásobní roztoky 1-oktanthiolu (98,5%; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ($1 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1} , $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} a $1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}) v tetrahydrofuranu (98%; Sigma-Aldrich,

Praha, ČR) byly připraveny rozpuštěním přesně odměřeného objemu tohoto modifikátoru.

Pro DPV byl použit elektrodový stojan s pracovní víceúčelovou rtuťovou elektrodou Metrohm 633 VA Stand (Metrohm, Zofingen, Švýcarsko). Pracovní elektroda (HMDE) byla vždy zapojena v klasickém tříelektrodovém zapojení s argentchloridovou elektrodou s nasyceným roztokem KCl jako referentní elektrodou a plíškovou platínovou pomocnou elektrodou. Elektrodový stojan byl řízen digitálním potenciostatem AUTOLAB PGSTAT 10 a ovládaný pomocí software GPES (General Purpose Electrochemical Software) verze 4.9 (vše EcoChemie, Utrecht, Nizozemí). Povrch rtuťové kapky HMDE byl $0,52 \text{ mm}^2$. Byl používán následující potenciálový program pro DPV: výška pulsu -25 mV , šířka pulsu 50 ms , rychlost nárůstu potenciálu 10 mV s^{-1} .

Při DPV na HMDE bylo postupováno následovně: do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství roztoku dané látky v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 5 ml a roztok byl doplněn po značku Brittonovým-Robinsonovým (BR) pufrům o příslušném pH. Obsah baňky byl důkladně promíchán protřepáním a poté kvantitativně převeden do voltametrické nádoby a probublán dusíkem 5 min, jednalo-li se o první měření, každé další probublání stejného vzorku bylo zkráceno na 30 s. Po probublání byla automaticky vytvořena nová rtuťová kapka a zaznamenán DP voltamogram. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

Při modifikaci HMDE uspořádanou vrstvou 1-oktanthiolu bylo postupováno způsobem, jakým bylo postupováno v případě modifikace zlaté elektrody⁵: mikronádobka upnutá v modifikačním stojanu byla doplněna po okraj roztokem modifikačního činidla, do té byl ponořen konec kapiláry rtuťové elektrody. V roztoku 1-oktanthiolu byla vytvořena nová rtuťová kapka a modifikátor byl aplikován po dobu přesně 5 min v nemíchaném roztoku. Konec kapiláry byl opatrně vyjmut z roztoku (aby nedošlo k porušení či odtržení kapky), elektroda byla opláchnuta ponořením do deionizované vody a ponořena do analyzovaného roztoku.

Výsledky a diskuse

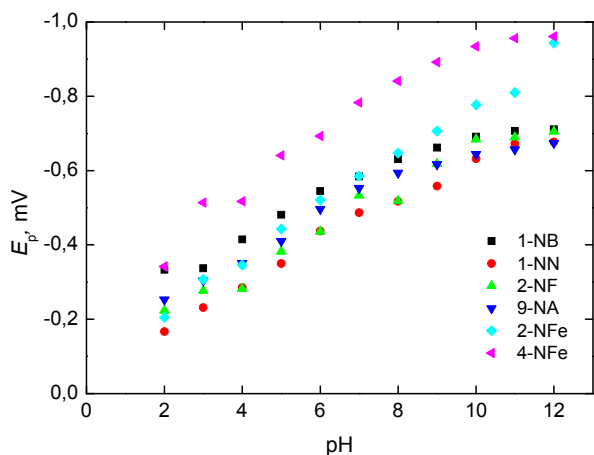
Studování voltametrického chování probíhalo nejdříve na nemoifikované HMDE, a to u všech studovaných látek v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 12,0. Na obr. 1 je zobrazena závislost potenciálu píků sledovaných látek na pH, na obr. 2 jsou pak zobrazeny voltamogramy všech látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} v prostředí BR pufr pH 2,0 – methanol (1:1). Z obou obrázků je patrné, že stanovení studovaných látek vedle sebe pomocí DPV na HMDE není

až na výjimky možné a spolehlivé.

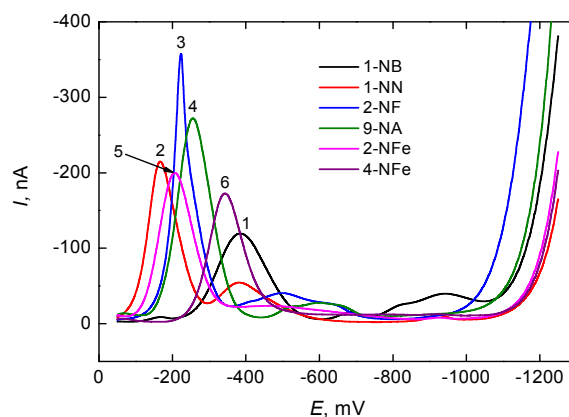
Při modifikaci HMDE 1-oktanthiolem o nejvyšší koncentraci ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) se předpokládalo, že přístup analytu k povrchu elektrody bude při vysoké koncentraci modifikátoru (c_{mod}) nejvíce ztížen. Elektrochemická odezva přítomných látek byla v prvním skenu však zcela potlačena. Při potenciálu -550 mV docházelo, vzhledem k velmi vysokému stupni modifikace, k desorpci navázaného 1-oktanthiolu projevující se rapidním nárůstem proudu procházejícím roztokem⁶ (v druhém bezprostředním skenu jsou pak již pozorovatelné odezvy látek). Pravděpodobně však nedojde k úplnému rozpadnutí povrchově aktivní vrstvy, ta je pouze narušena.

Při střední koncentraci modifikátoru ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) lze na DP voltamogramech (viz obr. 3) zkoumaných látek měřených na modifikované HMDE pozorovat posun potenciálu píku některých zkoumaných látek k negativnějším potenciálům. Ke snížení proudu píku (I_p) také nedošlo v míře využitelné pro praktické stanovení látek vedle sebe (relativně velký pokles proudu píku lze pozorovat u 2-NF a 9-NA). Při této koncentraci modifikátoru byl pro srovnání také použit nitromethan. U nitromethanu při této koncentraci modifikátoru opět nedošlo k výrazné změně proudu píku, ale došlo k posunu potenciálu (E_p) píku o 150 mV směrem k pozitivnějším potenciálům. V tab. I je uvedeno srovnání hodnot E_p a I_p na nemodifikované a modifikované HMDE.

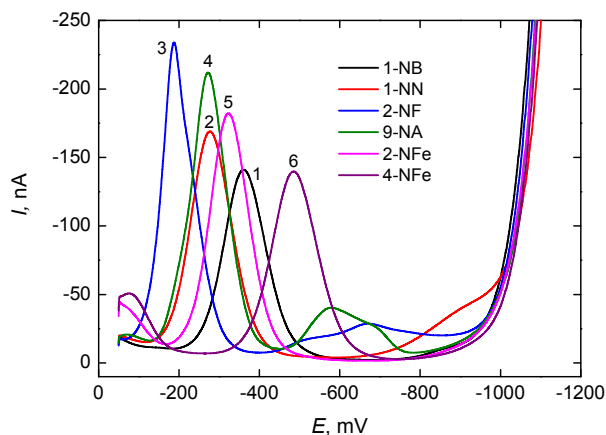
Při modifikaci 1-oktanthiolem o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ nebylo očekávaným projevem modifikace pouze snížení výšky píku či posun potenciálu píku, ale také možnost zvýšení proudu píku způsobená akumulací analytu ve vzniklé samoskladné vrstvě 1-oktanthiolu. Voltametrická odezva studovaných látek je však při použití modifikované HMDE nižší než na nemodifikované HMDE a k akumulaci tudíž nedochází; akumulace se nepotvrdila ani pro nitromethan. V tab. II je opět uvedeno srovnání



Obr. 1. Závislost potenciálu píku (E_p) všech zkoumaných látek ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na hodnotě pH použitého BR pufru; měřeno metodou DPV na nemodifikované HMDE ($S = 0,52 \text{ mm}^2$) v prostředí BR pufr – methanol (1:1)



Obr. 2. DP voltamogramy zkoumaných látek ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na nemodifikované HMDE ($S = 0,52 \text{ mm}^2$) v prostředí BR pufr pH 2,0 – methanol (1:1). Studované látky: 1-NB (1), 1-NN (2), 2-NF (3), 9-NA (4), 2-NFe (5) a 4-NFe (6)



Obr. 3. DP voltamogramy zkoumaných látek ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na modifikované HMDE ($S = 0,52 \text{ mm}^2$; $c_{\text{mod}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí BR pufr pH 2,0 – methanol (1:1). Studované látky: 1-NB (1), 1-NN (2), 2-NF (3), 9-NA (4), 2-NFe (5) a 4-NFe (6)

hodnot E_p a I_p studovaných látek pro nemodifikovanou a modifikovanou HMDE.

Závěr

Bylo prostudováno elektrochemické chování 1-nitrobenzenu, 1-nitronaftalenu, 2-nitrofluorenu, 9-nitroanthracenu, 2-nitrofenolu a 4-nitrofenolu pomocí diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě. Bylo zjištěno, že všech pět studovaných látek nelze ve směsi stanovit vedle sebe z důvodu překryvu piků. Případ-

Tabulka I

Potenciály píku (E_p) a proudy píku (I_p) stanovených látek ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při DPV na nemodifikované a modifikované ($c_{\text{mod}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) HMDE

Analyt	Nemodifikovaná HMDE		Modifikovaná HMDE		Posun ($X - X_{\text{mod}}$)	
	E_p [mV]	I_p [nA]	E_p [mV]	I_p [nA]	ΔE_p [mV]	ΔI_p [nA]
1-NB	-387	-120	-362	-141	-25	+21
1-NN	-165	-213	-276	-169	+111	-44
2-NF	-222	-354	-187	-233	-35	-121
9-NA	-254	-272	-273	-210	+19	-62
2-NFe	-206	-199	-323	-182	+117	-17
4-NFe	-344	-173	-484	-140	+140	-33

Tabulka II

Potenciály píku (E_p) a proudy píku (I_p) stanovených látek ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při DPV na nemodifikované a modifikované ($c_{\text{mod}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) HMDE

Analyt	Nemodifikovaná HMDE		Modifikovaná HMDE		Posun ($X - X_{\text{mod}}$)	
	E_p [mV]	I_p [nA]	E_p [mV]	I_p [nA]	ΔE_p [mV]	ΔI_p [nA]
1-NB	-387	-120	-468	-111	+81	-9
1-NN	-165	-213	-254	-197	+89	-16
2-NF	-222	-354	-237	-284	+15	-70
9-NA	-254	-272	-267	-255	+13	-17
2-NFe	-206	-199	-402	-134	+196	-65
4-NFe	-344	-173	-592	-96	+248	-77

né stanovení by bylo možné pouze v případě 4-nitrofenolu, který má pík v negativnějších potenciálech než zbylé sloučeniny, a jedné ze zbylých látek.

Byla vyzkoušena modifikace HMDE 1-oktanthiolem a její vliv na elektrochemickou odezvu studovaných látek. Předpoklad, že se odezva některých látek potlačí či se potenciál píku posune, aby bylo možno stanovit zkoumané látky vedle sebe, nebyl zcela splněn. Alifatický nitromethan se ve srovnání s aromatickými nitroderiváty choval podobně.

V rámci dalšího výzkumu bude zkoumáno, jak pomocí modifikace povrchu elektrody dosáhnout rozdělení elektrochemických odezev studovaných látek, a tedy i vypracování elektrochemické metody jejich stanovení ve směsi. Nabízí se více možností, od použití tuhé elektrody (např. zlaté či bismutové – tuhé elektrody jsou z hlediska manipulace jednodušší na modifikování jejich povrchu a lze na nich při modifikaci dosáhnout velmi dobré opakovatelnosti) po použití jiných modifikátorů (jiná délka uhlovodíkového řetězce thiolu či složitější thiol, např. benzenthiool či naftalenthiool).

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

LITERATURA

- Perrini G., Tomasello M., Librando V., Minniti Z.: *Ann. Chim.* 95, 567 (2005).
- Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
- Vyskočil V., Barek J., Jiránek I., Zima J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M. M., eds.), kap. 5. str. 171. Nova Science Publishers, New York 2008.
- Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).
- Carrillo I., Quintana M. C., Esteva A. M., Hernandez L., Hernandez P.: *Electroanalysis* 20, 2614 (2008).
- Brucknerlea C., Kimmel R. J., Janata J., Conroy J. F. T., Caldwell K.: *Electrochim. Acta* 40, 2897 (1995).

KOMPARACE 2D ELEKTROFORETICKÝCH PŘÍSTUPŮ PRO SLEDOVÁNÍ PROTEOMICKÉHO PROFILOVÁNÍ ROSTLIN

JAN SKALÁK, MARTIN ČERNÝ, IVA MITOŠINKOVÁ a BŘETISLAV BRZOBOHATÝ

Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
skalakjan7@gmail.com

Úvod

Zatímco v minulosti se v molekulární biologii živých organismů přikládá nejvyšší význam genomickým studiím a analýzám profilování mRNA pomocí DNA čipů, dnes získává na stále větším významu analýza proteomu. Proteomická analýza je schopna reflektovat změny v okamžité odpovědi organismu na stimulus, které nemusí být vůbec závislé na regulaci genové exprese. Příkladem mohou být post-translační regulace enzymů, které hrají klíčovou roli v mnoha aktivačních drahách buňky, ale i celých organismů. Velkou nevýhodou ale zůstává omezené množství proteinů, které jsme schopni sledovat. Například u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, jejíž genom obsahuje přibližně 26 000 genů, bylo doposud v proteomických pracích nalezeno a identifikováno pouze kolem 5000 proteinů, což je méně jak 10 % předpokládaných možných proteinů v tomto organismu¹. Pomocí běžné proteomické analýzy není však dosažení ani tohoto čísla příliš reálné. Běžná dvojrozměrná gelová elektroforéza (2D GE) je schopná sledovat přibližně 1200 proteinů, které je možné identifikovat hmotnostní spektrometrií. Proto je velmi důležité při plánování 2D GE experimentů zvolit takové podmínky, které poskytnou co nejlepší rozdělení proteinů, ale nebudou na úkor jejich detekovatelnosti. Jednou možností je prepuprifikace či obohacování vzorku. To však nebývá bezztrátové a v mnoha případech může časová náročnost vést i k ztrátě méně stabilních post-translačních modifikací, či rozpadu některých proteinů. Druhá cesta je modifikace parametrů samotné 2D GE. Volba rozsahu pI a hustota gelu v druhém rozměru dramaticky ovlivní kvalitu výsledného 2D GE obrazu proteomu².

Kvalitu získaného 2D GE rozdělení je možné posuzovat subjektivně, ale pro objektivní porovnání je třeba nalézt vhodné parametry, které je možné statisticky sledovat. Cílem naší práce bylo nalezení těchto parametrů a zhodnocení nejvhodnějších podmínek pro 2D GE analýzu celkového proteomu tabáku.

Experimentální část

Izolace proteinu

Celkový protein byl izolován klasickou extrakcí pomocí acetonu a kyseliny trichloroctové. 400 mg listů tabá-

ku poskytlo zhruba 1800 µg solubilního proteinu. Koncentrace proteinu byla ověřena měřením absorbance při 205 a 280 nm a stanovením proteinu metodou M. Bradfordové³ (Sigma).

2D gelová elektroforéza

Proteiny byly separovány na základě postupu popsaného Lochmanovou a spol.⁴ (2008). Krátce popsany postup: Vzorky byly nanášeny na strip v množství 500 µg (18 cm strip), nebo 150 µg (7 cm strip) a podrobeny isoelektrické fokusaci na IPG stripech s lineárním pH gradientem (4–7), či nelineárním pH gradientem (3–10) na PROTEAN IEF Cell unit (Bio-Rad). Proteiny na stripech byly redukovány DTT, alkylovány jodacetamidem (Sigma) a separovány pomocí SDS-PAGE na PROTEAN Plus Dodeca Cell a Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell (Bio-Rad). Použité gely byly o koncentraci akrylamidu 11 %, či s lineárním gradientem koncentrace 4–20 %. Proteinové spoty byly obarveny koloidní Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad). Obarvené gely byly skenovány na Bio-Rad GS-800 Calibrated Densitometer (120–42 µm) a Li-Cor Odyssey (169–84 µm).

Vyhodnocení

Vyhodnocení 2D mapy bylo provedeno softwarem Decodon Delta 2D (<http://www.decodon.com>), střední šedá hodnota byla spočítána pomocí PhotoImpact X3 (<http://www.corel.com>) metodou dle L. Millera⁵.

Výsledky a diskuse

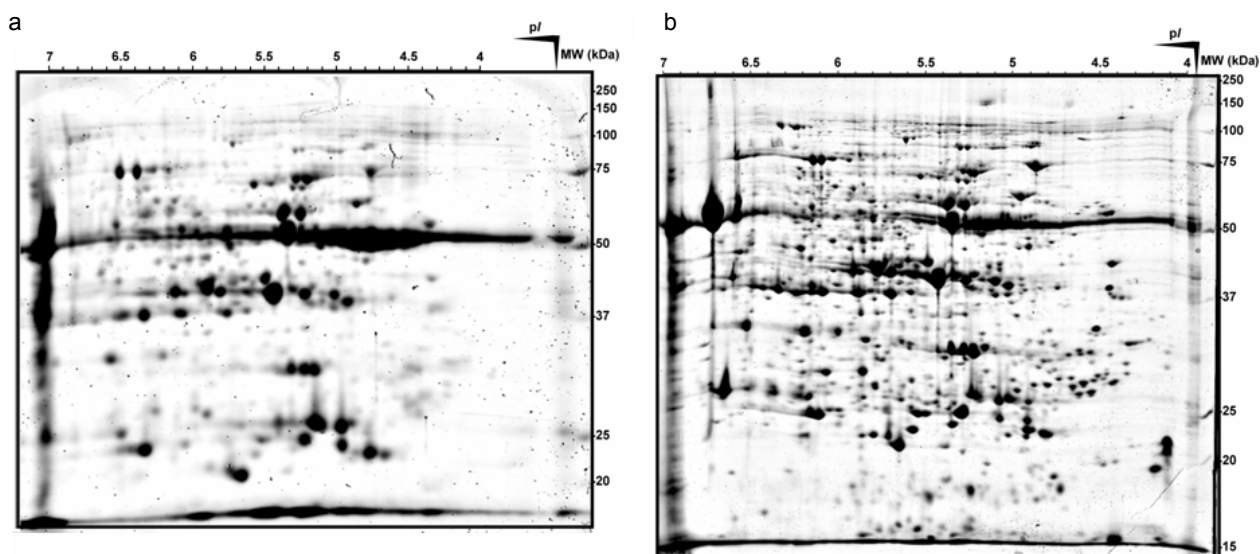
Na základě dat z 6 velkých proteomických analýz jsme vybrali skupinu parametrů, které je možné získat běžně dostupným softwarem pro analýzu 2D gelů a z programů pro práci s grafikou (tabulka I).

a) Kvantitativní hodnocení

- počet detekovaných spotů – rozdělovací vlastnosti získané mapy proteomu,
- celkový objem všech detekovaných spotů – hodnotí množství rozděleného proteinu,
- hraniční relativní objem rozděleného spotu – hranice relativního objemu, za kterou se již mohou vyskytovat smíšené spoty.

b) Kvalitativní hodnocení

- počet spotů s relativním objemem menším než 0,05 % – hodnotí kvalitu získané mapy proteomu – hodnota byla stanovena porovnáním 6 nezávislých experimen-



Obr. 1. Ukázka rozdělení proteomu tabáku; a) rozdělení v pI 4–7 (7 cm, ~150 µg proteinu): N 500 spotů; V 3500; $V_{\%min}$ 204; $V_{\%mix}$ 1,0; $V_{\%max}$ 22; \bar{A} 237; Δ 0,9. b) rozdělení v pI 4–7 (18 cm, ~500 µg proteinu): N 1146 spotů; V 12200; $V_{\%min}$ 700; $V_{\%mix}$ 0,4; $V_{\%max}$ 43; \bar{A} 200; Δ 0,5

Tabulka I

Parametry vhodné pro porovnávání 2D map proteomu

Parametr	Název
N	Počet detekovaných spotů
V	Celkový objem všech detekovaných spotů
$V_{\%min}$	Počet spotů s relativním objemem menším než 0,05%
$V_{\%mix}$	Hraniční relativní objem rozděleného spotu
$V_{\%max}$	Počet spotů s relativním objemem větším než $V_{\%mix}$
\bar{A}	Střední šedá hodnota
Δ	Podíl střední šedé hodnoty a počtu kvalitních spotů

tů a odpovídá hranici pro jasně definovaný spot o objemu 0,05 % z celkového objemu všech detekovaných spotů. Takovýto spot lze ještě s vysokou pravděpodobností identifikovat hmotnostní spektrometrií. Čím je počet spotů s relativním objemem < 0,05 % vyšší, tím je celková kvalita spotů nižší,

- počet spotů s relativním objemem větším než $V_{\%mix}$ – hodnotí kvalitu získané mapy proteomu – příliš velké spoty mohou být smíšené a velký počet takovýchto spotů tedy indikuje ztrátu rozlišení proteomické mapy,
- střední šedá hodnota – porovnání kvality obrazu nezatížené chybou zpracováním pomocí programu na 2D analýzu,

- podíl střední šedé hodnoty a počtu kvalitních spotů s relativním objemem mezi $V_{\%min}$ a $V_{\%mix}$ – ukazatel kvality rozdělení gelu v prvním rozměru elektroforézy pro stejná množství proteinu. Čím je toto číslo menší, tím je rozdělení lepší.

Provedli jsme rozdělení proteomu tabáku různými způsoby (obr. 1) a pomocí vybraných parametrů porovnali podmínky pro separaci. Z našeho zpracování vyplývá, že při sledování proteomu tabáku je vhodnější použít velké gely, což je očekávatelný výsledek, jelikož tyto gely rozdělují 3× více proteinu (obr. 1). Gely o rozhraní pI 3–10 pokrývají větší množství proteinu tabáku než pI 4–7, ale ukázalo se, že ztráta rozlišení v kyselé oblasti je vyšší, než získané rozlišení v zásadité oblasti.

Závěr

Zpracovali jsme množství dat z analýzy obrazu 2D gelů a vybrali parametry, které lze použít při hledání nevhodnějších podmínek pro dělení proteomu. Pomocí těchto kritérií jsme poté porovnali 4 různé rozdělení proteomu tabáku a pro další molekulárně-biologické experimenty vybrali rozdělení pI 4–7 na 18 cm stripech.

Tento výzkum byl finančně podporován granty LC06034 a IM06030 (MŠMT ČR), IAA600040701 (GA AV ČR) a 206/09/2062 (GA ČR).

LITERATURA

1. Boschetti E., Bindschedler L., Tang C., Fasoli E., Righetti P.: *J. Chromatogr., A* 1216, 1215 (2009).
2. Hafiz A.: *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*. CRC Press LLC, New York 2005.
3. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
4. Lochmanová G., Zdrahal Z., Konecna H., Koukalova S., Malbeck J., Soucek P., Valkova M., Kiran N. S., Brzobohaty B.: *J. Exp. Bot.* 59, 3705 (2008).
5. Miller L.: Quantifying western blots without expensive commercial quantification software. <http://www.lukemiller.org/journal/2007/08/quantifying-western-blots-without.html>. Staženo 15.1.2007.

IDENTIFIKACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V KREVNI STOPĚ NA PEVNÉM POVRCHU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

MARTIN ŠVIDRNOCH^a, LUCIE HARTMANOVÁ^a,
VÁCLAV RANČ^a, VLADIMÍR HAVLÍČEK^{a,b}
a KAREL LEMR^{a,b}

^a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
martin.svidrnoch@volny.cz

Úvod

Výzkum v oblasti chemických věd a forenzního zkoumání je velmi rozsáhlý, neustále jsou vyvíjeny nové a efektivnější postupy s využitím moderních instrumentálních metod jak identifikovat a stanovovat jednotlivé analyty v rozmanitém spektru vzorků a matic.

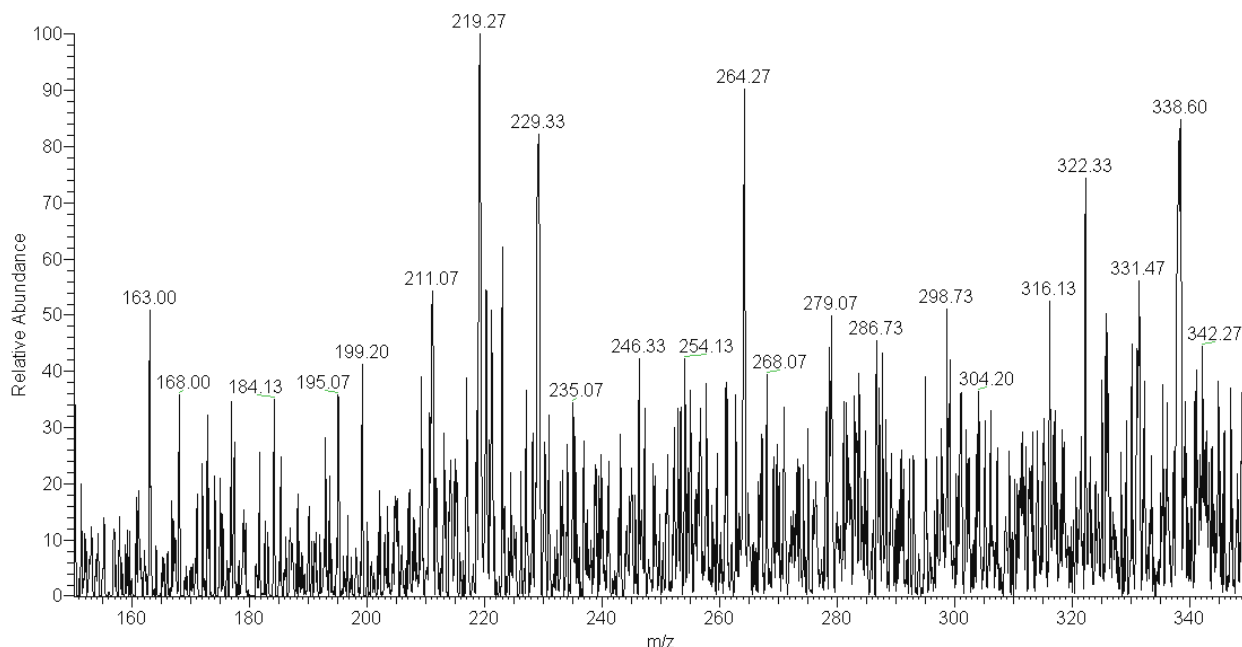
Jednou ze základních metod ve forenzní analýze je i hmotnostní spektrometrie (MS)¹. Pro uvedené účely je zapotřebí použít takovou metodu, která poskytne rychlé a ekonomicky dostupné analýzy s co nejnižšími detekčními limity. Chceme-li provádět rychlou analýzu *in situ*, lze s výhodou použít některou z desorpčních ionizačních technik. Ionizace desorcí elektrosprejem (DESI) eliminuje

úpravu vzorku a zjednodušuje samotnou analýzu.

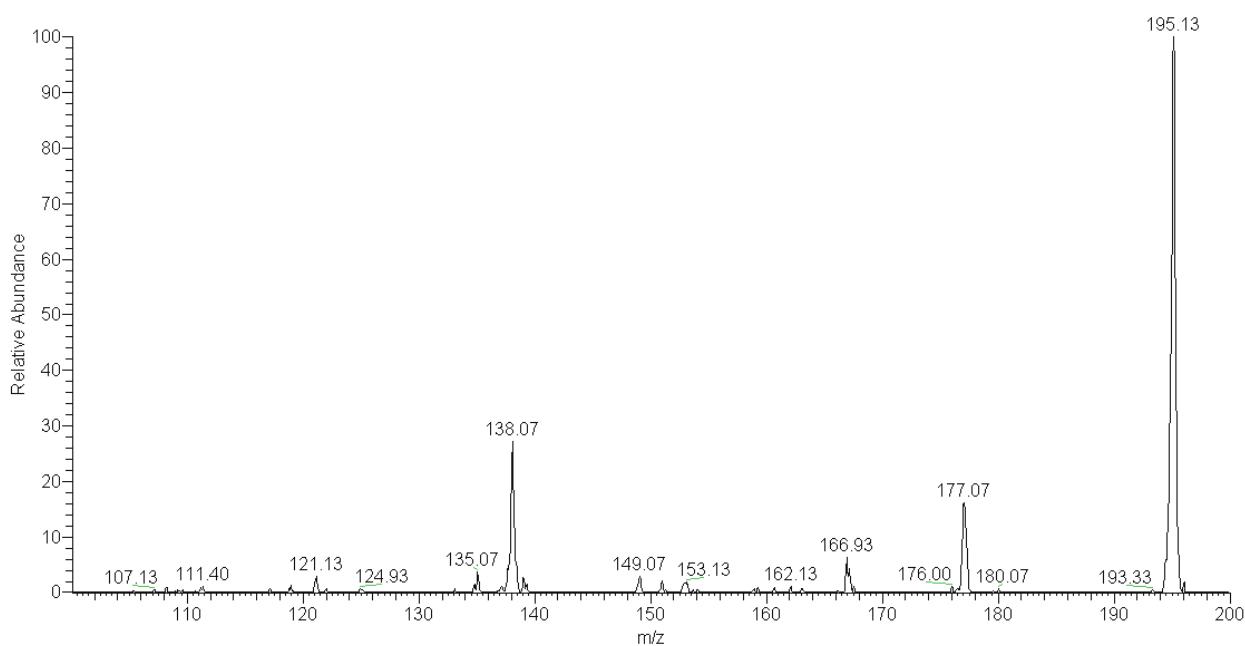
Účelem této práce je poskytnout metodu rychlého screeningu pro průkaz intoxikace biologicky aktivní látkou v krevní stopě s využitím DESI/MS.

Experimentální část

Veškerá měření byla provedena na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (LCQ, Thermo Finnigan, San Jose, USA), kde jako iontový zdroj sloužila modifikovaná sprejovací část desorpčního nano-elektrospreje s kovem pokrytou sprejovací kapilárou (PicoTip emitter GlassTip, ID = 2 ± 1 μm; New Objectiv, Woburn, USA)². Kapilára byla předem naplněna sprejovací kapalinou sestávající ze směsi acetonitrilu a vody v poměru 9:1 (v/v), modifikované kyselinou mravenčí (30 μl/2 ml směsi) a následně na ni bylo vloženo sprejovací napětí v rozsahu +1,5 až +3,5 kV. Jako modelové látky byly použity kofein, efedrin (Sigma Aldrich, Praha) a nikotin (Merck, Praha). Uvedené modelové látky byly předem změřeny bez přítomnosti matrice a byla získána hmotnostní (MS) a fragmentační (MS/MS) spektra, která sloužila k identifikaci zkoumaných látek v krevní matrici. Poté byly postupně nanášeny na vzorkovací povrch samotná krevní matrice a krev obsahující známou koncentraci uvedených látek.



Obr. 1. Hmotnostní spektrum plné krve s obsahem kofeinu 10 mg l⁻¹ (M_r 195), nanášené na filtr ze skelných mikrovláken



Obr. 2. **Fragmentační MS/MS spektrum plné krve s obsahem kofeinu 10 mg l⁻¹ (M_r 195).** Spektrum se shoduje s MS/MS spektry získanými měřením čistých standardů

Jako desorpčního povrchu bylo využito filtrů ze skelných mikrovláken (typ Z7, střední velikost pórů 2,5 μm, Merck, Praha), které vykazují lepší ionizační efekt ve srovnání se standardně používanými zdrsňnými skly³. Sprejovací médium je rozprašováno elektrosprejem na zkoumaný povrch, kde dochází k ionizaci a desorpci iontů analytu vlivem interakcí s ionty vzniklými v elektrospreji.

Výsledky a diskuse

Z naměřených dat je patrné, že ionizace a desorpce závisí jak na struktuře samotného analytu, tak rovněž na složení sprejovací kapaliny. I když se detekční limity pro jednotlivé látky lišily (desorpce probíhala nejlépe v případě kofeinu a nikotinu), v analyzovaných vzorcích krve byly detegovatelné všechny uvedené látky na koncentrační hladině odpovídající 10 mg l⁻¹ plné krve. Přítomnost všech zkoumaných látek byla potvrzena fragmentačními spektry a jejich srovnáním s předem naměřenými MS/MS spektry čistých standardů.

Závěr

Použitá metoda je i přes své relativně vysoké detekční limity (např. oproti LC/MS a GC/MS) vhodná pro rychlý screening akutní i letální intoxikace vybranými látkami. Další postupy vedoucí ke snížení detekčních limitů budou předmětem dalšího studia.

Autoři práce děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM6198959216).

LITERATURA

1. Ranc V., Hlavlíček V., Bednar P., Lemr K.: Chem. Listy 101, 524 (2007).
2. Ranc V., Hlavlíček V., Bednář P., Lemr K.: Eur. J. Mass Spectrom. 14, 411 (2008).
3. Švidrnoch M., Ranc V., Hartmanová L., M, Maier V., Hlavlíček V., Lemr K.: AUPO Chemica 47, 149 (2010).

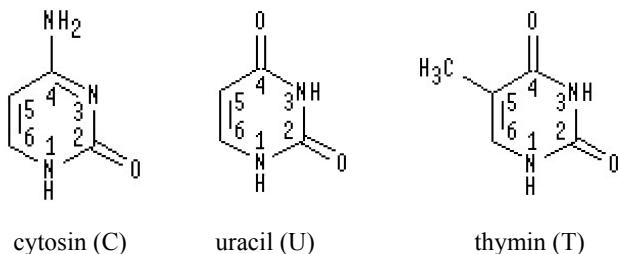
STUDIUM ACIDBAZICKÝCH A KOMPLEXOTVORNÝCH ROVNOVÁH PYRIMIDINOVÝCH BÁZÍ

OLGA TRÍSKOVÁ, PŘEMYSL LUBAL
a LIBUŠE TRNKOVÁ

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
175607@mail.muni.cz

Úvod

Acidobazické a komplexotvorné rovnováhy složek nukleových kyselin jsou studovány pro pochopení procesů v živých organismech, které probíhají ve vodném prostředí a velmi často i na nabitém fázovém rozhraní. Protonizace/deprotonizace (změna pH) a tvorba komplexů nukleových kyselin s ionty kovů má význam jednak pro odhalení samotného procesu komplexace iontů kovů s bázemi nukleových kyselin a tím i ovlivnění změny při přenosu energie, náboje a funkčních skupin, tak pro výzkum tautomerizace těchto bází v přítomnosti iontů kovů, které v jeho důsledku mohou vést k chybnému párování v genetickém kódu¹. Cílem předkládaného příspěvku bylo studium výše jmenovaných rovnováh, stanovení protonizačních konstant pyrimidinových bází (cytosin, uracil, thymin) a konstant stability jejich komplexů s ionty Cu(II), Zn(II), Cd(II) pomocí acidobazických potenciometrických titrací.



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných ligandů

Experimentální část

Chemikálie

Cytosin (p.a.) a thymin (p.a.) byly získány od firmy Lachema (Brno, ČR), kdežto uracil (> 98%) byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, SRN).

Aparatura

Potenciometrické titrace byly prováděny na titrátoru Titrand 835 (Metrohm, Švýcarsko) s vestavěnou 10ml byretou a připojenou kombinovanou skleněnou elektrodou

LL Electrode plus. Elektroda byla kalibrována v koncentračním režimu titrací 0,02M roztoku HCl ($I = 0,1M$ NaCl) 0,1M odměrným roztokem NaOH. Titrace byly prováděny v atmosféře inertního plynu (Ar pro odstranění CO₂) při teplotě $25,0 \pm 0,1$ °C.

Potenciometrická titrace

Pro stanovení protonizačních konstant byly roztoky bází po okyselení přidavkem ekvivalentního množství odměrného roztoku HCl titrovány odměrným roztokem 0,1M NaOH z kyselé oblasti do alkalické ($3,0 < \text{pH} < 5,4$ pro C, $2,6 < \text{pH} < 11,5$ pro T a U). Stanovení konstant stability bází s příslušnými ionty kovů (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) bylo prováděno za analogických podmínek. V případě C byly titrace prováděny jak v přebytku iontu kovu, tak v přebytku ligandu (až do 10násobku). Pro zjištění možnosti tvorby polynukleárních komplexů v případě U a T byly titrace prováděny jak při různých poměrech ligand:M (II) (5:1, 7:1, 10:1), tak při různých koncentracích ligandu a kovu ($c_L = 2, 1$ a 0,5mM). Iontová síla všech roztoků byla upravena přidavkem chloridu sodného na hodnotu $I = 0,1M$.

Výpočty

Experimentální data byla předběžně zpracována MS Excel a stanovení rovnovážných konstant pak vyhodnoceno programem OPIUM² ze všech spojených experimentálních dat.

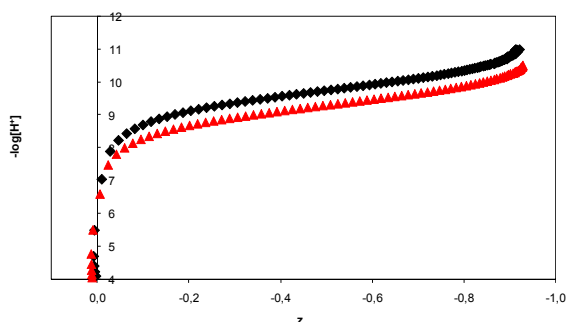
Výsledky a diskuse

Stanovení hodnoty pK_a

Titrační křivky pro jednotlivé báze byly normalizovány (viz obr. 2) a z nich pak vypočteny hodnoty disociačních konstant pro H₂L⁺ (C), resp. HL (T, U) species (viz obr. 1 a tab. I). Protonizace pro C a deprotonizace pro T a U probíhá na dusíkovém atomu N3.

Stanovení konstant stability β

Studium interakcí iontů kovů s pyrimidinovými bázemi se provádí analogickým způsobem jako v předchozím případě. Tvorbou komplexů dochází ke zvýšení síly příslušných konjugovaných kyselin. Je to patrné z normalizovaných titračních křivek (viz obr. 3), ze kterých lze vypočítat konstanty stability (viz tab. II). Předběžná analýza titračních křivek (viz obr. 3) ukazuje na možnost tvorby polynukleárních komplexů. Pro výpočet bylo testováno několik chemických modelů obsahující chemické



Obr. 2. Normalizované z-pH titrační křivky studovaných bází; $c_L = 1 \text{ mM}$, \bar{z} jako stupeň ztitrování je definován

$$\bar{z} = \frac{c_{H^+} - [H^+] + [OH^-]}{c_L}$$

Tabulka I

Stanovené hodnoty disociačních konstant ($t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,1 \text{ M}$)

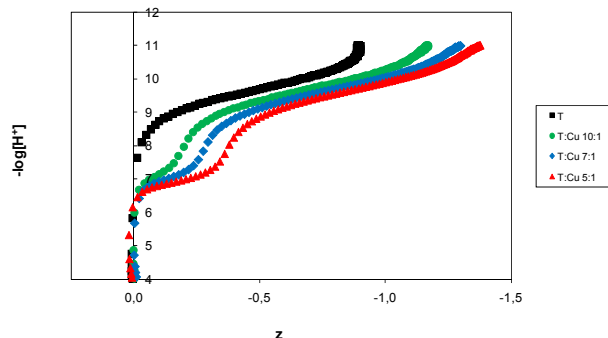
Ligand	pK_a^a	Lit.
C	4,606 (6)	tato práce
	4,57 (7)	3
T	9,773 (4)	tato práce
	9,71 (5)	3
U	9,265 (2)	tato práce
	9,28 (2)	3

^a Čísla v závorkách odpovídají směrodatné odchylce u posledního desetinného místa příslušné hodnoty, např. 4,606 (6) ... $4,606 \pm 0,006$

species $H_pM_qL_r$ o různých stechiometrických poměrech ($p:q:r$) a jako nejlepší model byl vybrán ten, který poskytoval nejlepší proložení experimentálních dat (např. podle nejmenší hodnoty směrodatné odchylky).

Závěr

V práci byly studovány protonizace bází pyrimidino-ového typu (C, T, U) a tvorba jejich komplexů s ionty Cu(II), Zn(II) a Cd(II). Na základě stability komplexů klesající v řadě Cu(II) > Zn(II) > Cd(II), která je ve shodě s Irwing-Williamsovou řadou, bylo zjištěno, že platí závislost $\log \beta = f(pK_a)$, tzn. stabilnější komplexy se tvoří s ligandy o vyšší bazicitě. Pro komplexy U a T byla zjištěna možnost tvorby polynukleárních komplexů, jejichž koncentrace nemusí být zanedbatelná za experimentálních podmínek *in vivo* a může tak ovlivňovat přenos genetické informace. Dosažených výsledků lze využít pro možné analytické stanovení bází ve směsi pomocí separačních



Obr. 3. Ukázka normalizovaných titračních křivek pro různé koncentrační poměry T:Cu(II); $c_L = 1 \text{ mM}$, $c_{M, 10:1} = 0,1 \text{ mM}$, $c_{M, 7:1} = 0,14 \text{ mM}$, $c_{M, 5:1} = 0,2 \text{ mM}$

Tabulka II

Přehled konstant stability vypočtených programem OPI-UM pro studované systémy

Ligand	Ion kovu	Species $H_pM_qL_r$	$\log \beta^a$
C	Cu(II)	0:1:1	1,78 (6)
	Zn(II)	0:1:1	1,0 (4)
	Cd(II)	0:1:1	0,73 (7)
T	Cu(II)	0:1:1	5,43 (9)
		-1:1:1	-3,44 (6)
		0:2:2	15,0 (2)
	Zn(II)	0:1:1	3,4 (2)
		-1:1:1	-4,91 (4)
		Cd(II)	1:1:1
U	Cu(II)	-2:1:1	-8,0 (5)
		0:1:1	5,23 (5)
		-1:1:1	-2,53 (3)
	Zn(II)	-1:2:2	6,6 (1)
		-1:1:1	5,15 (3)
		1:1:1	12,5 (1)
Cd(II)	-1:1:1	-7,0 (1)	
	-1:2:2	20,5 (2)	

^a Čísla v závorkách odpovídají směrodatné odchylce u posledního desetinného místa příslušné hodnoty, např. 4,606 (6) ... $4,606 \pm 0,006$

(např. HPLC) nebo elektroanalytických voltmetrických metod.

Tento výzkum byl finančně podporován projekty MŠMT ČR (ME09065, LC06035) a INCHEMBIOL – MSM0021622412).

LITERATURA

1. Lippert B., Gupta D.: *Dalton Trans.* 2009, 4619.
2. Kývala, M., Lubal P., Lukeš I.: <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html> (staženo 5.10.2008).
3. Martell A. E., Smith R. M., Motekaitis R. J.: *Database 46: NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*, Version 7, NIST 2003.

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ DINITRONAFTALENŮ NA STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGAMOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

JANA TVRDÍKOVÁ, ALEŠ DAŇHEL
a JIŘÍ BAREK

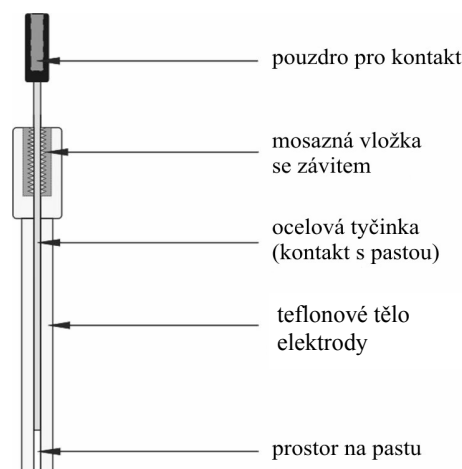
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
tvrdikova22@seznam.cz

Úvod

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH) jsou významnou skupinou genotoxických polutantů. Vznikají zejména při spalovacích procesech ve stacionárních zdrojích, dieslových a benzinových motorech nebo fotochemickou reakcí PAH s oxidy dusíku (NO_x)¹. Do této skupiny patří také stanovené látky 1,3-dinitronaftalen (1,3-DNN), 1,5-dinitronaftalen (1,5-DNN) a 1,8-dinitronaftalen (1,8-DNN)². Vzájemná poloha nitroskupin ovlivňuje nejenom jejich fyzikální vlastnosti (např. rozpustnost, teplotu tání), ale také jejich genotoxicitu a elektrochemické chování. Schopnost odčerpávat elektrony z konjugovaného systému zvyšuje elektronovou hustotu na těchto skupinách (tzv. záporný mezomerní efekt), a jsou tak snadno elektrochemicky redukovatelné. Vyšší elektronová hustota na nitroskupině má mimo jiné, ve srovnání s nepolárním naftalénem, za následek vyšší polaritu 1,8-DNN a 1,3-DNN. Nejméně polární je díky symetrické poloze nitroskupin 1,5-DNN, což způsobuje jeho nižší rozpustnost v polárních rozpouštědlech a s tím související omezení při jeho stanovení. Pozice nitroskupin DNN má také vliv na jejich mutagenitu a organovou specificitu, což dokazuje vyšší mutagenní aktivita 1,5-izomeru v porovnání s méně aktivním 1,8-izomerem^{3,4}. Studované DNN lze stanovit metodami spektrometrickými, separačními či elektrochemickými, viz např.^{5,6}.

Rtuť je zřejmě doposud nejvýhodnější elektrodový materiál pro voltametrické a polarografické stanovení založené na katodické redukci⁷. Práce s rtuťí je však s ohledem na její toxicitu omezena legislativou Evropské unie⁸, a proto je rtuť nahrazována jinými netoxickými materiály.

Stříbrný amalgam je vhodným netoxickým elektrodovým materiálem pro konstrukci nových typů elektrod a představuje možnou náhradu toxické rtuťi. Pevné amalgamové elektrody mají dobrou mechanickou stabilitu, jednoduchou manipulovatelnost a také potenciálové okno srovnatelné s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE)⁹. Hlavní nevýhodou stříbrných pevných amalgamových elektrod (AgSAE) je především jejich častá pasivace způsobená znečištěním elektrodového povrchu složkami analyzovaného roztoku či produkty elektrodové reakce. Tento problém je řešen pravidelným mechanickým



Obr. 1. Schéma stříbrné tuhé amalgamové pastové elektrody (AgSA-PE)

a elektrochemickým čištěním elektrodového povrchu¹⁰.

Nově vyvinutá stříbrná tuhá amalgamová pastová elektroda (AgSA-PE, viz obr. 1) poskytuje novou možnost stanovení elektrochemicky redukovatelných sloučenin moderními voltametrickými metodami. Hlavní výhodou je snadné obnovení jejího elektrodového povrchu (otřením amalgamové pasty), jako je tomu v případě uhlíkových pastových elektrod, a předpokládá se možnost modifikace amalgamové pasty příměsími (např. cyklodextriny). Potenciálové okno AgSA-PE je sice užší než potenciálové okno AgSAE či HMDE, je však stále dostatečně široké pro katodickou redukci mnoha elektroaktivních látek. AgSA-PE dále poskytuje dobrou reprodukovatelnost signálu a limity detekce srovnatelné s jinými pevnými elektrodami. Již dříve bylo nalezeno optimální složení připravených past ze stříbrného pevného amalgamového prášku ($\text{Hg}/\text{Ag} = 50:50; 60:40; 70:30$ (w/w)) a použitých pastovacích kapalin (parafinový, minerální, silikonový olej a trikresylfosfát)¹¹, ze kterých právě stříbrný amalgam $\text{Hg}/\text{Ag} = 60:40$ (w/w) smísen s parafinovým olejem (20:1 (w/w)) vykazoval optimální vlastnosti.

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztoky studovaných DNN o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním 0,02183 g studovaného DNN (Sigma-Aldrich) ve 100 ml methanolu. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přes-

ným ředěním zásobního roztoku uvedeným rozpouštědlem. Všechny roztoky byly uchovány ve skleněných nádobách. UV/VIS spektrofotometrií bylo zjištěno, že tyto zásobní roztoky jsou stále po dobu 4 měsíců (1,3-DNN), 6 měsíců (1,5-DNN) a 8 měsíců (1,8-DNN).

Další použité chemikálie: kyselina boritá, octová kyselina (99,8%), kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný a methanol (MeOH, 99,8%) – byly čistoty p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR).

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol l⁻¹ NaOH s roztokem obsahující směs kyseliny borité, fosforečné a octové, každé o koncentraci 0,04 mol l⁻¹. Pro přípravu BR pufru byla používána deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Na přípravu amalgamových past byl použit amalgamový prášek připravený smísením kovové rtuti (99,999%, Polarografie, Praha) a práškového stříbra (2–3,5 μm; ≥ 99,9%; Sigma-Aldrich) v poměru 60:40 (w/w) v zubařském amalgamatoru (Dentomat compact, Degussa, Brazílie) a rozetřený v achátové misce na jemý prášek. Ten byl pak smísen s parafinovým olejem (*Paraffinum liquidum*, ČSL) v poměru 20:1 (w/w).

Kyslík byl z roztoku odstraněn probubláním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha).

Aparatura

Byla použita aparatura Eco-Tribo Polarograph se softwarem PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha) v tříelektrodovém zapojení s referenční argentchloridovou elektrodou (3M KCl, Ag | AgCl). Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (obě Monokrystaly, Turnov). Stříbrná tuhá amalgamová pastová elektroda (AgSA-PE) s pastou obsahující stříbrný amalgamový prášek a parafinový olej byla použita jako pracovní elektroda (vnitřní průměr 1,70 mm). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Přesné hodnoty pH tlumivých roztoků byly měřeny digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou. pH-metr byl kalibrován standardními vodními pufrů za laboratorní teploty. Takto změřené formální hodnoty pH ve smíšeném prostředí vodný roztok základního elektrolytu-methanol (1:1) jsou dále označovány pH^f.

Pracovní postupy

Při voltametrických měřeních bylo do 10 ml odměrných baněk odměřeno potřebné množství zásobního roztoku DNN, přidán MeOH do celkového objemu 5 ml a doplněno BR pufrům po rysku. Analyzovaný roztok byl zbaven kyslíku probubláním dusíkem, který byl před vstupem do polarografické nádoby veden promývačkou plynů obsahující směs MeOH-voda o stejném poměru jako analyzovaný roztok (t.j. 1:1). Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Při DPV byla použita rychlost polarizace 20 mV s⁻¹, výška pulsu –50 mV a šířka pulsu 100 ms.

Výšky píků 1,3-DNN a 1,5-DNN byly vyhodnocovány od spojnice minim před prvním a za druhým pikem. Výška píků 1,8-DNN byla stanovena od nalezené spojnice minim před a za měřeným pikem.

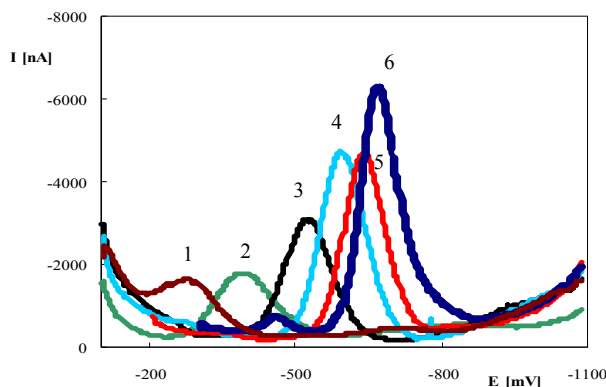
Mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočítána podle IUPAC pomocí vztahu $LOQ = 10\sigma/a$, kde σ je směrodatná odchylka jedenácti po sobě jdoucích měření při koncentraci 2 μmol l⁻¹, a a je směrnice kalibrační závislosti v rozmezí 2–10 μmol l⁻¹.

Výsledky a diskuse

Vliv pH na DPV studovaných látek na AgSA-PE

Nejprve byl proměřen vliv pH na DP voltamogramy studovaných látek na AgSA-PE (pro ilustraci viz obr. 2). Bylo zjištěno, že 1,3-DNN poskytuje v celé oblasti pH dva píky, kde první pik odpovídá čtyřelektronové redukci jedné nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu a druhý pik odpovídá analogické redukci druhé nitroskupiny. Se zvyšujícím se pH nedochází k výraznému posunu potenciálového okna k negativnějším potenciálům, ale pouze k posunu signálu 1,3-DNN k negativnějším potenciálům. V případě 1,5-DNN je situace analogická na rozdíl od 1,8-DNN, který poskytuje v celé oblasti pH pouze jeden pik, protože dochází pravděpodobně k redukci obou nitroskupin na hydroxylaminoskupiny současně.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufr : MeOH (1:1) o pH pufru 6,0 (pH^f 6,9) pro 1,3-DNN, pH pufru 12,0 (pH^f 12,3) pro 1,5-DNN a pH pufru 8,0 (pH^f 8,7) pro 1,8-DNN. Volba byla provedena z hlediska výšky a snadné vyhodnotitelnosti píků a jejich konstantnosti při opakovaných měřeních.

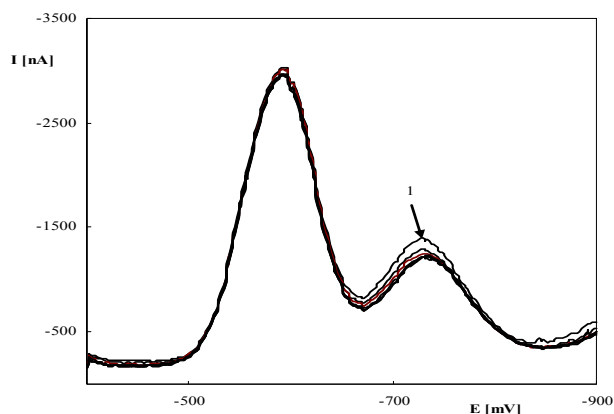


Obr. 2. DP voltamogramy 1,8-DNN ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) na AgSA-PE v prostředí BR pufr-MeOH (1:1) o pH^f: (1) 2,7; (2) 4,6; (3) 6,9; (4) 8,7; (5) 10,5; (6) 12,3

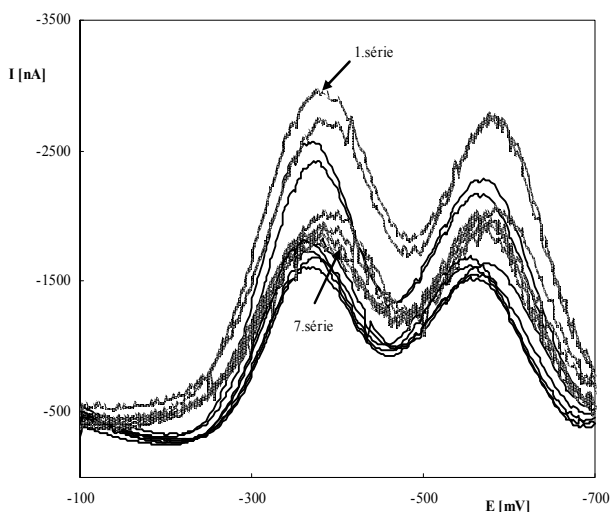
Stabilita signálu

Byla změřena série osmnácti následných měření studovaných DNN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) ve výše uvedeném optimálním prostředí na AgSA-PE bez její elektrochemické regenerace (ta – na rozdíl od m-AgSAE či p-AgSAE – nemá vliv na stabilitu signálu) a bez otírání amalgamové pasty (pro ilustraci viz obr. 3).

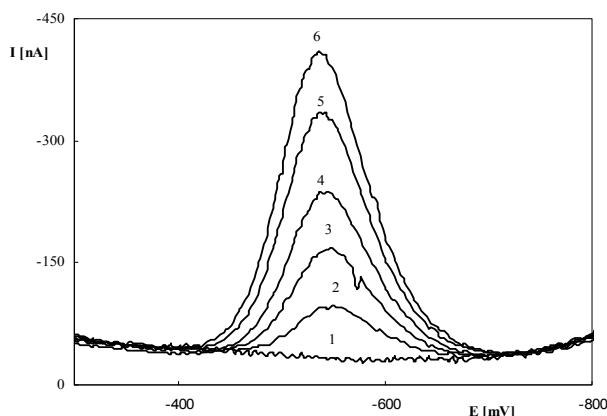
V případě osmnácti následných měření bez otírání amalgamové pasty byla u všech látek a všech pozorovaných píků prokázána stabilita signálu s RSD do 5 %. Při otírání amalgamové pasty mezi sériemi pěti následných měření (viz obr. 4) je stabilita signálu obou píků s RSD



Obr. 3. DP voltamogramy pro osmnáct následných měření 1,5-DNN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na AgSA-PE ve směsi MeOH-BR pufr o pH 12,0 (1:1); znázorněna je každá třetí křivka



Obr. 4. DP voltamogramy sedmi serií při otírání amalgamové pasty po pěti následných měřeních 1,3-DNN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na AgSA-PE ve směsi MeOH-BR pufr o pH 6,0 (1:1); znázorněna je vždy první (tečkovaná čára) a poslední (plná čára) křivka dané série



Obr. 5. DP voltamogramy 1,8-DNN na AgSA-PE v prostředí MeOH-BR pufr o pH 8,0 (1:1); $c(1,8\text{-DNN}) [\mu\text{mol l}^{-1}]$: (1) 0 (základní elektrolyt); (2) 2; (3) 4; (4) 6; (5) 8; (6) 10

v rozmezí 20–30 %. K většímu rozdílu hodnot mezi jednotlivými sériemi měření při otírání pasty dochází v důsledku odlišné distribuce elektroaktivních částic na nově získaném povrchu elektrodového materiálu (pasty). Tento jev je zřejmě způsoben malou jednotností velikosti částic amalgamového prášku. Na řešení problému nejednotnosti velikosti částic se stále pracuje. Měření je tedy lepší provádět na jednom povrchu elektrody a nedoporučuje se zahrnovat první měření na novém povrchu pasty, které většinou bývá odlehle.

Kalibrační závislosti

V prostředí MeOH-BR pufr o zvoleném optimálním pH (1:1) byly naměřeny DP voltamogramy bez otírání amalgamové pasty v závislosti na koncentraci studovaných látek (pro ilustraci viz obr. 5). Parametry kalibračních přímků jsou shrnuty v tab. I.

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63).

LITERATURA

1. Barek J., Bencko V., Cvačka J., Mejstřík V., Slámová A., Švagrová I., Zima J.: Chem.Listy 91, 871 (1997).
2. Daňhel A., Pecková K., Čížek K., Barek J., Zima J., Yosypchuk B., Navrátil T.: Chem.Listy 101, 144 (2007).
3. Lewis R. J. Sr.: *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 11. vydání, str.1483. John Wiley & Sons, New York 2004. Online verze přístupná na: http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1332&VerticalID=0, staženo 21.11.2009.

Tabulka I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení studovaných DNN pomocí DPV na AgSA-PE v prostředí BR pufr-MeOH (1:1)

Látka (pH pufru)	Pík	Koncentrace [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Směrnice [nA L μmol^{-1}]	Úsek [nA]	R ²	LOQ [$\mu\text{mol l}^{-1}$]
1,3-DNN (pH pufru 6,0)	1	20–100	–45,1	–188	0,9856	–
	2	20–100	–35,0	138	0,9956	–
	1	2–10	–38,5	41,7	0,9865	1
	2	2–10	–15,4	23,6	0,9941	3
1,5-DNN (pH pufru 12,0)	1	20–80	–70,7	400	0,9812	–
	2	20–100	–14,2	–37,1	0,9962	–
	1	2–10	–51,0	–54,6	0,9753	2
1,8-DNN (pH pufru 8,0)	2	2–10	–16,5	–26,8	0,9872	2
	1 ^a	20–100	–27,2	–248	0,9869	–
	1 ^a	2–10	–38,5	25,8	0,9977	1

^a Látka poskytuje pouze jeden pík

- Gangolli S.: *Dictionary of Substances and Their Effects*, 3. elektronické vydání, Royal Society of Chemistry, London 2005. Online verze přístupná na: http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=527&VerticalID=0, staženo 21.11.2009.
- Shanmugam K., Barek J., Zima.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 49, 765 (2004).
- Shanmugam K., Barek J., Zima.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 2021 (2004).
- Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
- URL: http://www.europarl.eu.int/meetdocs/2004_2009/documents/pr/585/585664/585664cs.pdf, staženo 22.10.2009.
- Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
- Barek J., Fisher J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B.: *Sensors* 6, 445 (2006).
- Daňhel A., Yosypchuk B., Vyskočil V., Barek J.: *6th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Foz do Iguaçu, Brazil, 16 – 19 March 2008*, Book of Abstracts, str. 131.

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE KARCINOGENNÍCH DERIVÁTŮ PYRENU A JEJICH METABOLITŮ

OKSANA YOSYPCHUK a JIŘÍ BAREK

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

Úvod

Přímým důsledkem současného bouřlivého rozvoje automobilismu je nárůst zdravotních rizik spojených s expozicí naší populace škodlivým látkám obsaženým v automobilových emisích. Významnou roli v tomto směru hrají polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH)¹ patřící k rozšířeným chemickým karcinogenům². Proto je velice důležité tyto látky v životním a pracovním prostředí vhodnými postupy monitorovat. PAH a NPAH mohou do těla vstupovat po přímém kontaktu s kůží či zažívacím traktem. Proto je důležitý výběr vhodných zástupců těchto polutantů, případně jejich metabolitů, jako vhodných biomarkerů pro sledování expozice těmto nebezpečným látkám. Jeden z nejpoužívanějších markerů expozice PAH je 1-hydroxypyren (1-HP). Poprvé byl identifikován v moči prasete v roce 1983 jako hlavní produkt metabolismu pyrenu³. Pro sledování expozice NPAH se jako biomarkery uplatňují 1-nitropyren a jeho metabolit 1-aminopyren (1-AP).

Vzhledem k tomu, že výše uvedené látky obsahují snadno oxidovatelné hydroxy- a aminoskupiny na aromatickém jádře, nabízí se pro jejich mimořádně citlivé a selektivní stanovení v tělních tekutinách vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Tato technika je levnější nežli metody využívající hmotnostně-spektrometrické detekce a zároveň dostatečně citlivá, takže by mohla být obecně použitelná k monitorování expozice PAH a NPAH.

Velmi důležitou roli v elektrochemické detekci hraje výběr pracovní elektrody. Pro daný projekt byla zvolena borem dopovaná diamantová filmová elektroda. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou, nízkým šumem a odolností vůči pasivaci, což umožňuje využití těchto elektrod v průtokových systémech⁴.

Cílem této práce je na základě studia elektrochemického chování 1-HP a 1-AP nalézt optimální podmínky pro jejich stanovení diferenční pulsní voltametrií ve vodně-methanolickém prostředí na borem dopované diamantové filmové elektrodě a rovněž jejich stanovení v moči metodou HPLC-ED po předběžné separaci a prekoncentraci pomocí extrakce na tuhou fázi.

Experimentální část

Studované látky

Zásobní roztok 1-HP (čistota p. a., 98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) byl připraven rozpuštěním 0,02183 g 1-HP v methanolu (čistota p. a., 99,8%, Penta, ČR) za pomoci ultrazvuku a doplněním na celkový objem 100 ml. Zásobní roztok 1-AP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) byl připraven rozpuštěním 0,02171 g 1-AP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků. Všechny roztoky studovaných látek byly skladovány ve skleněných nádobách ve tmě za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie

Kyselina boritá (čistota p. a., Lachema, Brno), kyselina orthofosforečná (čistota p. a., 85%, Lach-Ner, ČR), octová kyselina (čistota p. a., 99,8%, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný (čistota p. a., Lach-Ner, ČR), deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Britton-Robinsonův pufr (dále BR pufr) o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselé složky (obsahující kyselinu boritou, octovou kyselinu a kyselinu fosforečnou o koncentraci 0,04 mol dm⁻³) a složky zásadité obsahující 0,20 mol dm⁻³ NaOH. Fosforečnanový pufr o pH 3–5 byl připraven smísením kyseliny fosforečné o koncentraci 0,05 mol dm⁻³ s vypočteným množstvím hydroxidu sodného o koncentraci 1,0 mol dm⁻³.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí počítačového Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) v programu PolarPro verze 5. Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení. Referentní elektroda: argentschloridová (3 mol dm⁻³ KCl, Monokrystaly, Turnov, ČR), pomocná elektroda: platinový plíšek (Monokrystaly, Turnov, ČR) a pracovní elektroda: borem dopovaná diamantová filmová elektroda (Windsor Scientific Ltd, Velká Británie, průměr aktivní části 3 mm). Pro měření pH sloužil digitální pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Dále byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf s elektrochemickou detekcí v uspořádání: gradientová pumpa L-2130 (Merck), dávkovač Front-Loading Sample Injector Model 7725(i) 20 µl (Rheodyne), kolona Lichro-CART 125-4 100 RP-18, Cat. 50825, 5 µm, 119×4 mm (Merck), Amperometric Detector LC-4C (BAS), předko-

lonka LiChroCARTR PAH 4-4 (Merck). Byl používán tříelektrodový systém (viz výše) v tzv. „wall-jet“ uspořádání. Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona byla termostátována na 40 °C. Používané mobilní fáze byly odvzdušňovány ultrazvukem PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner (Powersonic) po dobu 10 min. Extrakce na tuhé fázi se prováděla na kolonce LiChrolut® RP-18 (Merck).

Pracovní postupy

Při diferenční pulsní voltametrii (DPV) byly použity následující parametry: polarizační rychlost 20 mV s⁻¹, pulsy o šířce 80 ms, modulační amplituda +50 mV. Pro eliminaci problémů s pasivací byl oxidační scan prováděn v případě 1-AP od +230 do +680 mV a od +150 do +500 mV v případě 1-HP. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávána v deionizované vodě.

Při záznamu DP voltamogramů bylo postupováno následovně: do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno dané množství roztoku 1-HP nebo 1-AP v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 7 ml a roztok byl doplněn po značku BR pufrům o daném pH. Vzdušný kyslík byl z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výška pík obou sledovaných látek při DPV byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem.

Mez detekce (LOD) byla počítána podle směrnice IUPAC pomocí trojnásobku směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti a mez stanovitelnosti (LOQ) pomocí desetinásobku této směrodatné odchylky. Při stanovení 1-AP a 1-HP metodou HPLC-ED byla LOD (resp. LOQ) určována jako koncentrace látky, která poskytuje pík třikrát (resp. desetkrát) vyšší než je absolutní hodnota šumu.

Extrakce 1-AP a 1-HP z moči

K 10 ml moči neexponovaného pracovníka bylo přidáno vypočtené množství 1-AP nebo 1-HP v methanolu. K takto připravenému modelovému vzorku moči bylo přidáno 10,0 ml fosforečnanového pufru o pH 5 a vzniklý roztok byl prolit SPE kolonkou, která byla předem aktivována promytím 5 ml MeOH a 10 ml deionizované vody. Kolonka byla následně promyta 10 ml vody a zachycené látky byly vymyty 10 ml MeOH. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku, odparek rozpuštěn v 1,0 ml MeOH a zanalyzován pomocí HPLC-ED. Porovnáním výšek píků daných látek o $c = 4 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ v methanolu s jejich odezvami po předběžné prekoncentraci ze vzorku moči obsahujícím $4 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ 1-AP nebo 1-HP bylo zjištěno, že výtěžnost použité extrakce je 87 % pro 1-HP a 75 % pro 1-AP.

Výsledky a diskuse

Stanovení 1-HP a 1-AP ve vodně-methanolickém prostředí diferenční pulsní voltametrií

Nejdříve byl sledován vliv pH na chování 1-AP a 1-HP v prostředí methanol – BR pufr o pH 2 až 12 (7:3) metodou diferenční pulsní voltametrie. Za optimální bylo pro 1-AP zvoleno prostředí methanol – BR pufr o pH 3,0 (výsledné pH vodně-methanolického roztoku 4,5) a o pH 5,0 pro 1-HP (výsledné pH vodně-methanolického roztoku 6,3), kde byly získány nejvyšší a nejsnáze vyhodnotitelné píky.

U obou látek docházelo k pasivaci elektrody po druhém oxidačním kroku, kterému odpovídá druhý pík. Pro odstranění pasivace byl scan prováděn v případě 1-AP pouze v rozmezí od +230 do +680 mV a v případě 1-HP od +150 do +500 mV. Při dodržení těchto potenciálových rozmezí se pasivace elektrody podstatně snížila, obzvláště u 1-AP, kdy se při potenciálu vyšším než +680 mV tvořil polymerní produkt tvořící elektrochemicky neodstranitelný povlak na elektrodě.

Koncentrační závislost 1-AP a 1-HP byla proměřena ve výše uvedeném prostředí v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Parametry kalibračních přímků jsou uvedeny v tabulce I. Vybrané DP voltamogramy 1-AP jsou pro ilustraci uvedeny na obr. 1a. Vzhledem k blízkým hodnotám potenciálů píků nelze provést stanovení těchto látek vedle sebe.

Stanovení 1-HP a 1-AP ve vodně-methanolickém prostředí pomocí HPLC-ED

Při hledání optimálních podmínek pro stanovení 1-AP a 1-HP metodou HPLC-ED se zkoumaly následující parametry: vliv složení mobilní fáze na eluční časy a výšku píků látek, potenciál oxidace obou látek a nevhodnější průtoková rychlost mobilní fáze.

Během optimalizace složení mobilní fáze byl smíchán odpovídající objem methanolu (60–85 %) s vodným roztokem 0,05M fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 3,0 až 5,0. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze se složením MeOH:0,05M fosforečnanový pufr o pH 5,0 (80:20) pro obě látky, při které hodnoty elučních časů byly do 4 minut.

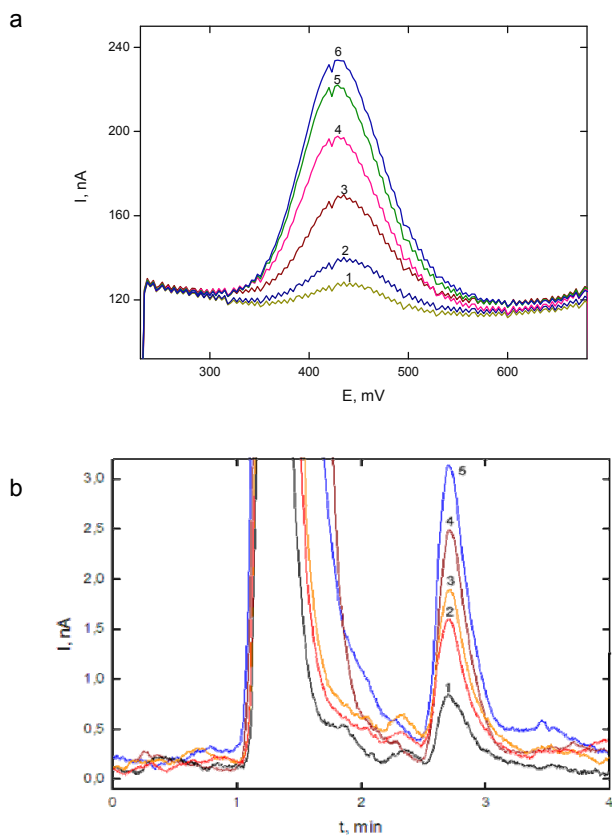
Nejvhodnější potenciál oxidace při různých hodnotách průtokové rychlosti (proměřeno v rozmezí 0,6 až 1,4 ml min⁻¹) mobilní fáze 1-AP a 1-HP byl odečten z příslušných hydrodynamických voltamogramů. Potenciál elektrody byl postupně zvyšován od +400 do +1200 mV. Při nižším potenciálu obě látky už neposkytovaly žádnou odezvu a při hodnotě vyšší než +1200 mV základní linie byla velmi nestabilní. Potenciál detekční elektrody, při kterém obě látky poskytují nejlepší odezvu, byl +1000 mV při průtokové rychlosti 1,0 ml min⁻¹ pro 1-AP a 0,8 ml min⁻¹ pro 1-HP. Při těchto podmínkách byla proměřena koncentrační závislost 1-AP a 1-HP v methanolu (viz tab. I).

Tabulka I

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolicém prostředí pomocí DPV a HPLC-ED na BDDE

Látka	c [mol dm ⁻³]	Směrnice [nA mol ⁻¹ dm ³]	R	LOD [mol dm ⁻³]	LOQ [mol dm ⁻³]
<i>DPV^a</i>					
1-AP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,18 \cdot 10^7$	0,9969	$6 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$
1-HP	$2 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6}$	$1,38 \cdot 10^7$	0,9934	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$
<i>HPLC-ED^b</i>					
1-AP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$5,42 \cdot 10^6$	0,9990	$5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$
1-HP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$2,09 \cdot 10^6$	0,9992	$9 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-7}$

^a Potenciál píku při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ +443 mV (1-AP) a +310 mV (1-HP), podmínky a prostředí viz text; ^b retenční čas 2,76 min (1-AP) a 3,93 (1-HP), mobilní fáze a potenciál pracovní elektrody viz text



Obr. 1. (a) Voltamogramy 1-AP. Koncentrace v měřeném roztoku $1 \cdot 10^{-6}$ (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) mol dm⁻³. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0. (b) Chromatogramy 1-AP v moči. Koncentrace v moči $2 \cdot 10^{-8}$ (1), $4 \cdot 10^{-8}$ (2), $6 \cdot 10^{-8}$ (3), $8 \cdot 10^{-8}$ (4) a $1 \cdot 10^{-7}$ (5) mol dm⁻³. Píky neodpovídají MF: MeOH:0,05M fosforečnanový pufr pH 5,0 (80:20), E = 1000 mV, průtoková rychlost 1 ml min⁻¹. Měřeno metodou HPLC-ED na BDDE

Při porovnání stanovení 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolicém prostředí metodou DPV a HPLC-ED výsledky ukazují, že citlivější metodou je DPV, ale HPLC-ED je pochopitelně selektivnější. Souvisí to pravděpodobně s tím, že při měření v průtokovém systému jsou menší problémy s pasivací vzhledem k odplavování produktů elektrodové reakce od povrchu elektrody. Meze stanovitelnosti jsou téměř totožné.

Stanovení 1-HP a 1-AP v moči pomocí HPLC-ED

Na základě zjištěných optimálních parametrů pro stanovení obou látek v methanolu byla proměřena koncentrační závislost pro 1-AP a pro 1-HP v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ v modelovém vzorku moči po předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí na tuhé fázi. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedené v tab. II, vybrané chromatogramy na obr. 1b.

Závěr

Na základě provedeného výzkumu elektrochemického chování 1-AP a 1-HP na borem dopované diamantové filmové elektrodě metodami DPV a HPLC-ED byly nalezeny optimální podmínky pro jejich stanovení ve vodně-methanolicém prostředí a v moči. Závěrem lze konstatovat, že v případě monitorování profesionální expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům by citlivost elektrochemického detektoru měla být zcela postačující pro provedení přesné a rychlé analýzy.

Tabulka II

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 1-AP a 1-HP v moči po extrakci na tuhé fázi. Měřeno metodou HPLC-ED

Látka	Retenční čas [min]	c [mol dm ⁻³]	Směrnice [nA mol ⁻¹ dm ³]	R	LOD [mol dm ⁻³]	LOQ [mol dm ⁻³]
1-AP	2,70	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$	$3,35 \cdot 10^7$	0,9996	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$
1-HP	3,95	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,92 \cdot 10^7$	0,9996	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63).

LITERATURA

1. Barek J., Bencko V., Cvačka J., Šuta M.: Chem. Listy 92, 794 (1998).
2. Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: Chem. Listy 90, 805 (1996).
3. Keimig S. D., Kirby K. W., Morgan D. P., Keiser J. E., Hubert T. D.: Xenobiotica 13, 415 (1983).
4. Pecková K., Musilová J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39,148 (2009).

OBSAH PŘÍSPĚVKŮ

<i>Anna Barešová, David Friedecký, Tomáš Adam</i>	Analýza nukleotidů v krevních skvrnách	s3
<i>Vendula Burdová, Vlastimil Vyskočil, Jiří Barek</i>	Polarografické a voltametrické stanovení genotoxického 4-nitroindanu na rtuťové kapající a stříbrné pevné amalgamové elektrodě	s6
<i>Kateřina Diáková, Jan Šíma, Carlos A. Arias, Hans Brix</i>	Analytická chemie v hodnocení alternativních systémů pro čištění odpadních vod	s10
<i>Štěpán Eichler, Oto Mestek</i>	Speciační analýza selenu v moči spojením HPLC a ICP/MS	s13
<i>Kateřina Ježková, Petra Pavlíková, Petr Dobiáš, Martin Adam, Karel Ventura</i>	Analýza kyseliny l-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS	s17
<i>Antonín Kaňa, Oto Mestek</i>	Stanovení fosforu metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	s20
<i>Alan Liška, Jiří Ludvík</i>	Analýza aromatických nitroslooučenin aneb není nitro jako nitro	s23
<i>Kateřina Marcaníková, Blanka Beňová</i>	Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek	s27
<i>Kateřina Mičová, David Friedecký, Adriana Polýnková, Edgar Faber, Tomáš Adam</i>	Stanovení hladiny tyrosinkinasových inhibitorů metodou UHPLC-MS/MS	s31
<i>Pavína Novotná, Marie Urbanová</i>	Indukce změn konformace polypeptidů: studie metodou vibračního cirkulárního dichroismu	s35
<i>Lucie Pacosová, Kamila Syslová, Petr Kačer</i>	Vývoj metody pro <i>in vivo</i> monitorování neurochemických změn v mozku potkanů	s38
<i>Jan Přeč, Marek Kuzma, Petr Kačer</i>	<i>In-situ</i> NMR studie mechanismu asymetrické hydrogenace substituovaných dihydroisochinolinů na Ru-katalyzátorech noyoriho typu	s42
<i>Vít Prchal, Vlastimil Vyskočil, Jiří Barek</i>	Využití thiolovou vrstvou modifikované visící rtuťové kapkové elektrody ve voltametrické analýze genotoxických environmentálních polutantů	s46
<i>Jan Skalák, Martin Černý, Iva Mitošinková, Břetislav Brzobohatý</i>	Komparace 2D elektroforetických přístupů pro sledování proteomického profilování rostlin	s49
<i>Martin Švidrnoch, Lucie Hartmanová, Václav Ranc, Vladimír Havlíček, Karel Lemr</i>	Identifikace biologicky aktivních látek v krevní stopě na pevném povrchu hmotnostní spektrometrií	s52
<i>Olga Třísková, Přemysl Lubal, Libuše Trnková</i>	Studium acidobazických a komplexotvorných rovnováh pyrimidinových bází	s54
<i>Jana Tvrdíková, Aleš Daňhel, Jiří Barek</i>	Voltametrické stanovení dinitronaftalenů na stříbrné tuhé amalgamové pastové elektrodě	s57
<i>Oksana Yosypchuk, Jiří Barek</i>	Elektrochemická detekce karcinogenních derivátů pyrenu a jejich metabolitů	s61

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Adam Martin s17
Adam Tomáš s3, s31
Arias Carlos A. s10

Barek Jiří s6, s46, s57, s61
Barešová Anna s3
Beňová Blanka s27
Brix Hans s10
Brzobohatý Břetislav s49
Burdová Vendula s6

Černý Martin s49

Daňhel Aleš s57
Diáková Kateřina s10
Dobiáš Petr s17

Eichler Štěpán s13

Faber Edgar s31
Friedecký David s3, s31

Hartmanová Lucie s52
Havlíček Vladimír s52

Ježková Kateřina s17

Kačer Petr s38, s42
Kaňa Antonín s20
Kuzma Marek s42

Lemr Karel s52
Liška Alan s23

Lubal Přemysl s54
Ludvík Jiří s23

Marcaníková Kateřina s27
Mestek Oto s13, s20
Mičová Kateřina s31
Mitošinková Iva s49

Novotná Pavlína s35

Pacosová Lucie s38
Pavlíková Petra s17
Polýnková Adriana s31
Prchal Vít s46
Přech Jan s42

Ranc Václav s52

Skalák Jan s49
Syslová Kamila s38

Šíma Jan s10
Švidrnoch Martin s52

Trnková Libuše s54
Třísková Olga s54
Tvrdíková Jana s57

Urbanová Marie s35

Ventura Karel s17
Vyskočil Vlastimil s46, s6

Yosypchuk Oksana s61