

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2013

Bc. Gabriela Komárková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Voltametrické studium a stanovení dopaminu a 3-methoxytyraminu jako potenciálních indikátorů posmrtného intervalu

Autor:	Bc. Gabriela Komárková
Studijní program:	B1407/ Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci, dne.....

.....

Gabriela Komárková

Na prvním místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborné vedení a podnětné připomínky.

A dále rodičům za podporu ve studiu.

Shrnutí

Tato diplomová práce se zabývá studiem voltametrického chování a stanovením dopaminu a 3-methoxytyraminu jako potenciálních indikátorů posmrtného intervalu. Obě látky spolu s jejich metabolity (3,4-dihydroxyfenylactová a homovanilová kyselina) byly studovány metodami cyklické (CV) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV) s elektrodou ze skelného uhlíku. Byla vypracována DPV metoda pro stanovení dopaminu a 3-methoxytyraminu v přítomnosti jejich metabolitů. Pro minimalizaci interferujícího vlivu metabolitů byly testovány různé modifikace povrchu uhlíkové elektrody. Jako nejlepší se jevílo pokrytí nafionem. Metoda byla aplikována na analýzu reálného vzorku mozkové tkáně.

Summary

The aim of my work was to study voltammetric behaviour of dopamine and 3-methoxytyramine as potential indicators of post-mortem interval. Cyclic (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) on glassy carbon electrode were used to study dopamine and 3-methoxytyramine together with their metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid). DPV method was developed for determination of dopamine and 3-methoxytyramine in the presence of their metabolites. Different modification of the electrode surface was tested to eliminate the interfering influence of the metabolites. The best results were obtained with nafion modified electrode. The developed method was applied for determination of dopamine and 3-methoxytyramine in brain tissue.

1 Obsah

Obsah

Shrnutí	1
Summary.....	1
1 Obsah.....	2
2 Úvod	5
3 Cíl práce.....	6
4 Teoretická část.....	7
4.1 Smrt (excitus).....	7
4.2 Příznaky smrti a posmrtné procesy využitelné k určení PMI	7
4.3 Využití metabolismu dopaminu k určení PMI.....	13
4.3.1 Poměr obsahu dopaminu a 3-MT v putamenu	14
4.4 Dopamin, jeho vlastnosti	15
4.4.1 Metabolismus DA	17
4.4.2 Elektrochemické chování katecholaminů a jejich metabolitů.....	19
4.4.3 Elektrochemické chování dopaminu	21
4.4.4 Elektrochemické chování 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny.....	22
4.5 Metody analýzy DA, 3-MT, 3,4-dihydroxyfenyloctové a homovanilové kyseliny	27
5 Experimentální část	33
5.1 Použité přístroje	33
5.2 Chemikálie a roztoky	33
5.3 Pracovní postupy.....	34

5.3.1	Modifikace roztokem SDS	34
5.3.2	Pokryvání elektrody vrstvou nafionu	34
5.4	Voltametrické měření	34
5.4.1	Závislosti na pH	34
5.4.2	Optimalizace parametrů DPV	35
5.4.3	Kalibrační závislosti	35
5.5	Odběr a zpracování mozkové tkáně	36
5.6	SPE extrakce	36
6	Výsledky a diskuse	38
6.1	Voltametrické chování dopaminu a jeho metabolitů	38
6.1.1	3-Methoxytyramin	38
6.1.1	Dopamin	41
6.1.1	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (DOPAC)	45
6.1.2	Homovanilová kyselina (HVA)	49
6.2	Optimalizace parametrů metody DPV	53
6.3	Chování látek ve směsi	56
6.3.1	Čistá elektroda ze skelného uhlíku	56
6.3.2	Elektroda modifikovaná SDS	58
6.3.3	Elektroda modifikovaná nafionem	59
6.4	Kalibrační závislosti	61
6.5	Aplikace	65
7	Závěr	67
8	Seznam literatury	69

2 Úvod

Stanovení doby smrti patří v soudním lékařství k základním otázkám oboru. Kromě důkazní hodnoty v řízení trestním má často velký význam v oblasti občanskoprávní (např. při sporech o dědictví), ale i medicínskoprávní (transplantační problematika)^{1, 2}.

Pokud z hlediska medicínskoprávního není přesně definován okamžik smrti, např. průkazem smrti mozku, vychází soudní lékař při určení doby smrti obvykle z poznatků, které zjistí na zemřelém, a popřípadě je doplní laboratorním vyšetřením a porovná je i s dalšími zjištěnými okolnostmi¹.

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat voltametricou metodu pro stanovení sloučenin dopaminu a 3-methoxytyraminu jako potenciálních indikátorů posmrtného intervalu vedle jejich interferentů 3,4-dihydroxyfenyloctové a homovanilové kyseliny a následně metodu aplikovat na reálný vzorek mozkové tkáně.

4 Teoretická část

4.1 Smrt (excitus)

Definice smrti byla Šiklem formulována jako nezvratná zástava celovztažného uspořádání organismu. Smrt člověka je totožná s nezvratnou zástavou dýchání a krevního oběhu, což je záhy následováno zástavou činnosti centrálního nervového systému (CNS)³. Jednotlivé tkáně a orgány postupně odumírají od těch nejcitlivějších na kyslík (mozek, mícha) po ty nejméně citlivé (vazivo, kůže)⁴.

4.2 Příznaky smrti a posmrtné procesy využitelné k určení PMI

Známky smrti dělíme na nejisté, kam patří různá stádia klinické smrti, jako zástava srdeční činnosti, dýchání, vyhasnutí zornicových a rohovkových reflexů. Jisté známky smrti dělíme na fyzikální a chemické^{4,5}.

Pro potvrzení, zda je osoba mrtvá, se provádí tzv. Balthazarova zkouška, kdy vstříkneme 1 ml éteru (obarveného eosinem) pod kůži. Pokud je osoba živá, ether se vstřebá, pokud je člověk mrtev, po vytažení jehly vytryskne éter zpět⁶.

Tonelliho příznak je pozitivní již po několika minutách po smrti, proto se také využívá k její diagnóze. Vyskytuje se, pokud při stisku dvěma prsty je zornice oválná a při stisku třemi prsty trojhranná⁶.

U mužů může někdy k určení doby smrti přispět délka vousů, které rostou přibližně rychlostí 0,021 mm/hod (cit. ¹)

Východiskem pro stanovení doby smrti nejčastěji bývají: supravitální reakce, posmrtné a hnilobné změny, pitevní a laboratorní nález, eventuálně další poznatky z místa nálezu zemřelé osoby¹. V krátké době po smrti, kdy již není zachována činnost základních životních systémů, mohou ještě po určitou dobu přetrvávat některé funkce orgánů a tkání, které biologicky odumírají postupně¹. K nejčastěji uváděným supravitálními reakcím patří mechanická dráždivost kosterních svalů (po úderu do svalu je pozorován určitý reflex; do 8 hodin po smrti), elektrická dráždivost (vychází z dráždění svalů elektrickým proudem

s použitím jehlových elektrod; pozitivní reakcí je stah svalu, nebo jeho fibrilární záškuby; do 5 hodin po smrti), pupilární reakce (využívá reakci zornic na farmakologický podnět při podání miotika nebo mydriatika, tedy látek vyvolávajících zúžení nebo rozšíření zornic; aplikace se provádí vkápnutím do spojivkového vaku; do 4 hodin po smrti), transpirace potu (subkutánní injekční podání hydrochloridu acetylcholinu vede k transpiraci potu do 8 hodin po smrti), test vitality spermatozoí a leukocytů (buňky při postupném odumírání po smrti přijímají barvivo; odběr se provádí z nadvarlete a krve ze srdce; čím delší dobu po smrti, tím více buněk je obarveno)¹.

V žaludku lze mnohdy identifikovat potravu požitou před smrtí. Protože se po smrti trávení zastavuje, dovoluje množství a druh potravy v žaludku či střevě odhadovat i dobu posledního jídla. Tento postup však může být zkreslen dalšími okolnostmi (psychické vjemy, úrazové změny či poškození mozku)¹.

S vyhasnutím metabolické činnosti dochází k posmrtnému chladnutí těla (*algor mortis*). Tělo se ochlazuje na okolní teplotu^{4,5}. V poslední době se poměrně úspěšně využívá k určení smrti rektální měření teploty. Následně zaznamenaná data jsou následně použita pro výpočet dle matematických rovnic, či k odečtení doby úmrtí z Henssgeho grafického nomogramu⁷. Lékař potom s ohledem na teplotu okolí a další informace vyhodnotí dobu smrti s přesností ± 1 hodiny. Tato metoda je natolik spolehlivá, že je uznána jako kriminalistická metoda při určování PMI (posmrtného intervalu)^{4,5}. Teplota těla se nejčastěji měří na místě činu, ještě před převozem do márnice a druhé měření by mělo probíhat asi o hodinu později od prvního měření.

Hrubý výpočet stanovení doby úmrtí⁷:

Normální tělesná teplota – naměřená teplota těla / 1,5 = počet hodin od smrti

Samotný vztah mezi časem a rychlostí chladnutí těla je relativně objasněn, vyskytují se ale praktické problémy. Lidské tělo při pokojové teplotě chladne během prvních 6 hodin o 1,5 °C za hodinu, poté se rychlost chladnutí těla zpomaluje^{1,7}. Po uplynutí 24 hodin od úmrtí se teplota těla srovná s okolní teplotou vzduchu.

Jiný průběh nastává, pokud zesnulý zemřel např. na nedostatek kyslíku, nebo došlo k výronu krve do mozku, pak počáteční tělesná teplota může být dokonce vyšší, než je běžné. Tělo ponořené ve vodě chladne rychleji než tělo na souši a tělo oblečené chladne pomaleji než tělo nahé⁷.

Při ohledání mrtvého těla se sleduje také posmrtná bledost, kdy v těle již není krev popoháněna srdcem, kapiláry se stáhnou a krev stéká do míst nejnižše položených, kde následně vznikají posmrtné skvrny (*livor mortis*). Posmrtné skvrny nazývané též hypostáze, mají červenofialové až modré zbarvení. Po dvou až třech hodinách po smrti se spojují do větších ploch. Tento jev nazýváme lividitou⁷. Obdobný jev nastává i na vnitřních orgánech. V některých případech, např. při otravě CO, je kůže celého těla zbarvena červeně a mrtvolné skvrny nejsou vytvořeny^{4,5}. Z posmrtných skvrn není možné určit přesnou dobu smrti. Pouze v raném stádiu (1-6 hod. od smrti), kdy ještě kůže se skvrnou pod tlakem zbělá, lze podle nich přibližně odhadnout orientační čas smrti při nalezení mrtvého těla. Posmrtné skvrny jsou důležité z kriminalistického hlediska především k posouzení, zda bylo s tělem po smrti manipulováno⁷.

Rigor mortis neboli posmrtné tuhnutí těla (svalová ztuhlost) nastává asi za 2 hodiny po smrti. Tuhnutí svalů postupuje od hlavy směrem k dolním končetinám^{4,5}. Je způsobeno nahromaděním solí ve svalových vláknech⁷. Posmrtná ztuhlost odeznívá po 3-4 dnech ve stejném pořadí jako nastala. Z tohoto důvodu není tento způsob příliš spolehlivý ke stanovení doby smrti^{1,4,5}. Přesto se *rigor mortis* využívá k přibližnému zjištění doby úmrtí. Používá se k tomu přístroj nazývaný myotonometr, pro kriminalistické účely forenzní myotonometr. Tento měřicí přístroj dokáže změřit ztuhlost svalů, svalový tonus apod. Princip myotonometru je založen na použití sondy (myoton) k záznamu reakce periferního kosterního svalstva na mechanické poškození. Vyhodnocení získaných signálů je prováděno za pomoci počítače. Sonda působí na biologickou tkáň krátkým impulzem, který způsobí následně rychlé uvolnění svalů. Síla impulsu musí být zvolena tak, aby nezpůsobila v biologické tkáni změny. Mechanické oscilace, které jsou způsobeny impulzem, jsou zřetelně viditelné⁷.

V krvi přítomné látky podléhají též změnám, např. hladina kyseliny mléčné 50 až 75krát narostla oproti hladině před smrtí v rozmezí 12 až 24 h; množství kreatinu, dusíku v různých formách (neproteinový, dusík obsažený v aminokyselinách, amoniak), močové kyseliny, bilirubinu, některých hormonů (kortizol), solí (sodík) a většiny enzymů se po smrti měnilo pouze nepatrně. Jediné enzymy, které by bylo možné využít ke stanovení PMI, jsou laktátdehydrogenáza a glutamin transamináza, protože jejich nárůst byl s časem (prvních 60 h) lineární⁸. Komponenta (protein) C3 se skládá z dvou polypeptidových řetězců (alfa a beta řetězce) spojených disulfidickou vazbou. Komponenta C3 se po smrti štěpí a právě

podle procentuálního zastoupení fragmentů je možné určit PMI ± 8 h (pravděpodobnost 95 %) podle rovnice PMI (hodiny) = $1,64 + 1,56 \times s$ s korelačním koeficientem $r = 0,832$ (cit. ⁹).

I podle změny koncentrace draslíku ve sklivci poznáme dobu smrti. Sítnice po smrti praská a z jejích vlásečnic se draslík uvolňuje do sklivce. Dále nastává zakalení zraku kvůli vysychání a krystalizaci struktury rohovky⁶. Metoda založená na koncentraci draslíku je nejspolehlivější biochemický ukazatel před hnilobou¹⁰. Jeho spolehlivost je však pouze krátkodobá (několik hodin po úmrtí)¹¹. Stanovením doby smrti z koncentrace draslíku ve sklivci se zabývali v práci¹², kde bylo zkoumáno 201 vzorků, které byly odebrány sklerální punkcí v blízkosti vnějšího koutku injekční stříkačkou, v rozpětí PMI 1 až 40,45 h. Za použití lineární regrese byly získány rovnice $[K^+] = 5,35 + 0,22 \text{ PMI}$, což odpovídá $\text{PMI} = 2,58[K^+] - 9,30$. U případů násilné, či traumatické smrti bylo $[K^+] = 5,60 + 0,17 \text{ PMI}$ a tudíž $\text{PMI} = 3,92[K^+] - 19,04$. Pomocí těchto vztahů se značně zlepšily výsledky posuzování mimonemocničních úmrtí¹².

Je zřejmé, že existuje významný vliv teploty na hladinu draslíku ve sklivci v době smrti. U uhořelých osob byla hladina vyšší, než u osob zemřelých jinak. Při odběru sklivce z obou očí ve stejnou dobu a zpracování oddělenou analýzou, byly hladiny draslíku v obou očích srovnatelné. Byl pozorován nárůst hladiny draslíku až do 104 hodin. Bylo také zjištěno, že další parametry jako je věk, pohlaví, teplota a vlhkost nemají na hladinu draslíku vliv. Draslík byl stanovován metodou plamenové fotometrie^{13,14} nebo kapilární zónovou elektroforézou¹³.

Ve sklivci je možné kromě draslíku stanovit i hypoxantin (Hx) a volné aminokyseliny, které jsou též použitelné pro stanovení PMI. Hx byl analyzován metodou HPLC s UV detekcí (limit detekce v řádu $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s lineárním korelačním koeficientem $r^2 = 0,757$). Metodou sekvenční injekční analýzy bylo možné ve sklivci stanovit jak Hx, tak K^+ vedle sebe. Limity detekce byly $1,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro Hx a $5 \cdot 10^{-5} \text{ mmol L}^{-1}$ pro draselné ionty. Hx měl ale lepší korelační koeficient ($r^2=0,998$) než draslík. Kombinace výsledků těchto dvou stanovení vede k přesnějšimu určení PMI než u samostatných látek. Jediný problém je, že vyvinutá metodika je vhodná vždy pouze pro určitou matici, tzn., že se stejná metoda nedá použít pro různé matrice jako fluidum, sérum či moč. Z forenzního pohledu při každém stanovení PMI je nutné vzít v úvahu několik faktorů souvisejících s příčinou smrti: podmínky životního prostředí, teplota těla, věk zesnulého, chronická onemocnění a konzumace alkoholu. Kombinace všech těchto faktorů poskytuje doplňující informace k přesnému určení PMI. Analýza aminokyselin

obsažených jak ve sklivci i v mozkomíšním moku byla provedena iontovou kapalinovou chromatografií. Bylo nalezeno 27 aminokyselin, které vykazují lineární závislost s PMI, i když s rozdílnými rychlostmi. Před analýzou bylo zapotřebí aminokyseliny derivatizovat ophthalaldehydem. Vztah mezi koncentracemi vybraných aminokyselin ve sklivci a PMI byl charakterizován korelačními koeficienty ($0,3191 \leq r \leq 0,4508$) (cit. ¹⁵).

Posmrtný rozklad je dalším stádiem, kdy dochází k autolýze a hnilobě. U autolýzy dochází k samonatravení vlastními enzymy, zvláště tam, kde jsou ve velké koncentraci proteolytické enzymy, např. natrávení a změknutí tkání žaludku působením žaludeční šťávy. Hniloba je rozklad bílkovin způsobený hnilobnými mikroby, které pronikají střevní stěnou do okolí. V této fázi nejlépe určíme, kdy smrt nastala^{4,5}. Vnitřní orgány se většinou rozkládají v určitém pořadí, což může sloužit jako ukazatel doby úmrtí^{1,7}.

Společně s rozkladem těla dochází i k posmrtné difúzi tekutin a plynů. Difúzi tekutin doprovází prosáknutí tkání, které se mohou rozvolnit, tento stav nazýváme macerací. U posmrtné difúze plynů dochází k uvolnění sirovodíku, který reaguje s hemoglobinem za vzniku verdohemoglobinu. Ten způsobuje zelenošedé zbarvení na orgánech dutiny břišní a břišní stěny^{1,4,5}.

Na rozdíl od enzymů (jako jsou kyselá fosfatáza, alkalická fosfatáza, amylasa, transamináza, laktátdehydrogenáza, apod.), celková krevní cholinesterasa zůstává stabilní po delší dobu po smrti. To má velký význam pro soudní patologii, která může prokázat přítomnost organických fosforových jedů (např. organofosforečných insekticidů) poklesem hodnot cholinesterázy⁸.

Produkce malých organických molekul, jako jsou těkavé mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C₂-C₅) může být využita ke stanovení PMI v pozdějších stádiích rozkladu⁹. Bylo prokázáno, že těkavé mastné kyseliny (kyselina propionová, máselná, valerová, iso-butyrová a iso-valerová) produkované mikrobiálním rozkladem, jsou dlouhodobě stabilní v půdních roztocích. Byl vyvinut dostatečně citlivý a reprodukovatelný postup pro analýzu směsi termicky stabilních těkavých mastných kyselin metodou plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí. Vass identifikoval a kvantifikoval těkavé mastné kyseliny z lidských ostatků. S využitím specifického poměru v koncentracích kyseliny propionové, máselné a valerové během rozkladu byly určovány PMI s přesností ± 2 dny. Další studie rozkladných tekutin z prasečích ostatků bez přítomnosti půdní matrice využívaly metody

kapilární plynovou chromatografií s detekcí hmotnostní spektrometrií. Byly identifikovány hlavně kyseliny s dlouhými řetězci, např. fenylactová kyselina, fenylpropionová kyselina, 2-piperidon a iso-kapronová kyselina, které měly potenciální forenzní význam¹⁵. GC/MS byla použita také k analýze aminokyselin, neurotransmiterů a rozkladných produktů (kadaverin a putrescin) jako další metoda k určení PMI po třetím týdnu od smrti. Příprava vzorku vyžaduje dva separační derivatizační postupy (jeden pro aminokyseliny a druhý pro kadaverin a putrescin, stejně tak dva teplotní programy). Kadaverin ani putrescin není možné použít k určení PMI, ale vztah mezi šřavelovou kyselinou, gama amino máselonou kyselinou, prolinem a methioninem, fenylalaninem, tyrosinem, izoleucinem, histidinem a PMI byl lineární¹⁵.

S postupem času a s pokročilejším rozkladem přitahuje tělo různé druhy hmyzu. Hmyz se může různě střídat a na základě toho, který hmyz je na mrtvole, je možné určit dobu úmrtí. Jako první jsou u těla mouchy různých druhů např. moucha bzučivka (druh *Calliphora vicina*)^{1,7} či masařka (druh *Cynomia cadaverina*)¹⁶, a podle stádia jejich larev jsme schopni zodpovědět na otázku, kdy smrt nastala, již po první hodině smrti. K tomuto však potřebujeme zkušeného entomologa s praxí^{1,7}. V případě celkové skeletizace nebo působení jiných faktorů na rozklad těla (jako pohřbení, nízká teplota, zabránění přístupu hmyzu k tělu a přítomnost drog), už ale není určení touto metodou možné¹⁵.

Plísně se povětšinou objevují po 2 měsících po smrti. Nejdříve se plíseň objeví na nepokrytých částech těla, později pak pod oděvem. V průběhu prvního roku se nejčastěji vyskytuje *Aspergillus glaucus* nebo *Penicillium digitatum*. Ve druhém až desátém roce se nachází na zbývajících měkkých tkáních *Aspergillus candidus*, *Oospora sulphurea*, *Ctenomyces serratus*. Ještě po 10 letech je možné na kostech i ve zbytcích bronchů nalézt plíseň *Trichoderma lignorum*¹.

Skeletalizace je proces přeměny těla na kostru. Ve středním podnebném pásmu trvá 2 roky, v tropech k ní dojde za 3 týdny⁶. Přesnost metody stanovení PMI pomocí mastných kyselin v době, kdy tělo ještě nebylo skeletalizováno, byla ± 2 dny. Jakmile bylo tělo skeletalizováno, koncentrace anorganických iontů (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} apod.), které migrují do půdy z buněčné složky nebo kosterního materiálu, byla použita pro stanovení PMI. Přesnost této metody stanovení PMI je ± 2 týdny (cit.¹⁰).

Dalšími procesy, ke kterým může dojít, je mumifikace, při níž je tělo konzervováno vysušením v teplých podmínkách, a která znemožňuje provést pitvu, nebo adiporcire (zmýdelnění). Našedlá vosková struktura je způsobena hydrolyzou tuků. Adiporcire postupuje z povrchu těla do hloubky. Zmýdelněné obrysy těla zůstanou zachovány po léta⁶.

4.3 Využití metabolismu dopaminu k určení PMI

Chemická metoda pro stanovení PMI využívá předvídatelného hromadění nebo vymizení dopaminergního metabolitu 3-methoxytyraminu. Jeho hladina byla porovnáována s hladinou koncentrace K^+ ze sklivce. Při důkladném porovnání bylo zjištěno, že metoda stanovení pomocí 3-MT je stejně přesná, ne-li přesnější, než v případě draslíku, ačkoliv hladina 3-MT může být ovlivněna příčinou smrti nebo přítomností drog a různých léčiv v těle v době smrti¹¹.

Tato metoda je založena na posmrtné kumulaci 3-MT v putamenu. Obsah 3-MT v putamenu, převážně jako posmrtný metabolit dopaminu, klesá s rostoucím PMI v případě, kde příčinou smrti bylo organické onemocnění srdce (organic heart disease – OHD), ve všech ostatních případech byla akumulace 3-MT přímo úměrná PMI¹¹.

Vzorek putamenu přibližně 20 mg byl sonifikován v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselině chloristé, centrifugován po dobu 10 min (51 000 g) a supernatant byl nastříknut do kapalinového chromatografu. PMI byl stanoven jako doba od úmrtí po okamžik smíchání vzorku s kyselinou chloristou. Výsledky byly vyhodnoceny statisticky pomocí regresní analýzy. Závislost PMI a 3-MT obsaženého v dorzálním putamenu byla ovlivněna přítomností drog či jiných látek s farmakologickým účinkem. V případě úmrtí na organické onemocnění srdce, bez dalšího vlivu látek působící na organismus, byla korelace negativní, $\text{PMI} = 62,7 - 18,4 c(3\text{-MT})$, korelační koeficient $r = -0,83$ pro 95% pravděpodobnost, přesnost byla $\pm 18,2$ h. Pro případy úmrtí z jiného důvodu než na organické onemocnění srdce byla lineární korelace pozitivní, $\text{PMI} = 2,22 + 7,66 c(3\text{-MT})$, $r = 0,83$ pro 95% pravděpodobnost, přesnost byla $\pm 7,5$ h (cit. ¹¹).

Abnormálně vysoké hladiny 3-MT byly zjištěny v případech úmrtí při detegování amfetaminu, kokainu, kofeinu nebo jiných opiátů v krvi nebo v moči. Na druhou stranu v případě přítomnosti barbiturátů v krvi, nebo v případě úmrtí otravou oxidem uhelnatým, byly stanoveny abnormálně nízké hladiny 3-MT (cit. ¹¹).

Párová analýza obsahu 3-MT a K^+ v určitém PMI vedla ke konstrukci nomogramů pro základní skupiny subjektů (OHD a non-OHD). Odhadované hodnoty produkované těmito nomogramy jsou pro 95% pravděpodobnost, přesnost byla $\pm 11,3$ h v případě OHD skupiny a $\pm 8,0$ h v případě non-OHD skupiny. Tyto údaje jsou vztaženy k průměrným hodnotám 3-MT a K^+ . Z těchto údajů je zřejmé, s výjimkou určitých případů toxikologicky pozitivních pro specifické třídy léků, že 3-MT i K^+ mohou predikovat PMI a ze stanovení obou parametrů je možné dospět k slušnému odhadu doby nedosvědčené smrti¹¹.

Mozkomíšni mok obsahuje glukózu a kyselinu mléčnou (ani jedna nemůže být použita k určení PMI), dusíkaté sloučeniny (močovina, neproteinový dusík, kreatin, aminokyseliny, amoniak, kyselina močová, xantin), ostatní organické sloučeniny (bilirubin, urobilinogen) aj. U všech těchto látek byla v minulosti snaha dokázat závislost s PMI, ale žádná z nich nebyla spolehlivým ukazatelem. Lze z nich ale stanovit stupeň onemocnění před smrtí, nebo samotnou příčinu smrti (např. z posmrtné močoviny a kreatinu stupeň onemocnění ledvin, nebo urémie jako příčina smrti, snížené hodnoty sodíku a chloridů byly prokázány u některých kojenců, kteří zemřeli na syndrom náhlého úmrtí novorozenců)⁸.

4.3.1 Poměr obsahu dopaminu a 3-MT v putamenu

V lidském putamenu byl analyzován dopamin a jeho metabolit 3-methoxytyramin. Většina množství 3-MT byla vytvořena po smrti. Bylo zjištěno, že hladina DA a suma (DA + 3-MT), ale ne 3-MT, poklesly v intervalu mezi smrtí a pitvou, stejně tak s věkem. Množství dopaminu v mozku po smrti klesá - probíhá oxidativní deaminace monoaminoxidasou a methylace katechol-O-methyltransferasou. Závislost sumy DA + 3-MT na věku a intervalu mezi úmrtím a pitvou byla vypočítána vícenásobnou regresí, $z = 1,92573 - 0,004664 x - 0,003205 y$, kde x odpovídá věku v letech, y odpovídá intervalu mezi smrtí a pitvou v hodinách a $z = \log(\text{DA} + 3\text{-MT})$ v putamenu [mol/g tkáně]. Koeficient vícenásobné korelace byl $r = -0,7177$ (cit. ¹⁷).

Ve všech zkoumaných kočičích sítnicích byl přítomen DA v koncentraci $3,00 \pm 0,54$ ng/mg proteinu. Ve většině případů byly přítomny i metabolity DOPAC a 3-MT, u poloviny případů byla přítomna HVA. Tyto metabolity ale ani v jednom případě nebyly přítomny v obou sítnicích od jedné kočky. DOPAC se však vyskytoval v mnohem menší koncentraci ($1,07 \pm 0,21$ ng/mg proteinu), než zbylé dva metabolity (3-MT $3,44 \pm 0,97$ ng/mg

proteinu, HVA $4,54 \pm 1,05$ ng/mg proteinu). Je také možné, že metabolity 3-MT a DOPAC mohou být transportovány ze sítnice do krve ještě před metabolismem na HVA, to by mohl být důvod, proč se HVA vyskytuje méně často než zbylé dva metabolity¹⁸.

V lidských sítnicích byl obsah látek následující: DA rozmezí 0,30 do 4,85 ng/mg proteinu, DOPAC 0,18 do 7,48 ng/mg proteinu a HVA 0,75 do 6,08 ng/mg proteinu¹⁸.

4.4 Dopamin, jeho vlastnosti

Dopamin (DA) je chemická látka, která přirozeně vzniká v mozku. Je to nejdůležitější katecholamin, který je zapojený do neurotransmise v rámci centrálního a periferního nervového systému a aktivuje dopaminové receptory. Funguje také jako neurohormon a jako takový je vytvářen v hypotalamu²¹. Jeho vylučování je ovládáno acetylcholinem²². Hraje důležitou roli ve funkci lidského metabolismu, kardiovaskulárního, ledvinového a hormonálního systému a také motorických funkcích mozku. U zdravého člověka bylo v mozku nalezeno přibližně $50 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ a v extracelulární tekutině $0,01\text{-}1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dopaminu²¹. U živého zvířete byla hladina mezi 50 až $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bez jakékoliv stimulace²³. Abnormální hladina DA je spojována s Parkinsonovou^{21,24,25}, Alzheimerovou a Huntingtonovou nemocí^{21,26}, hyperkinetickou poruchou (dříve označováno jako lehká mozková dysfunkce) a schizofrenií²¹. Další onemocnění spojená s dysfunkcí dopaminergního systému jsou epilepsie^{27,28}, HIV infekce, onemocnění sítnice²⁷ a Tourettův syndrom²⁹. Také se podílí na regulaci nálady, učení, spánku, pozornosti či odměny³⁰. Je možné, že DA s dalšími neurotransmitery se mohou podílet na epileptické aktivitě³¹.

Garris a Wightman zjistili, že v oblasti bazolaterálního amygdalového jádra se dopamin tvoří 10krát méně než v oblasti kaudálního putamenu³².

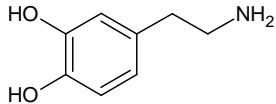
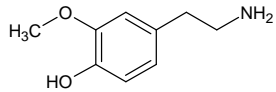
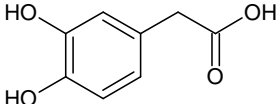
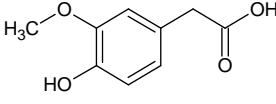
3-methoxytyramin je přítomný v synaptické štěrbině ve velmi nízké koncentraci. Studie³³ ukázala, že se 3-MT chová jako antagonist noradrenalinového systému, hraje také důležitou fyziologickou roli jako inhibitor regulující katecholaminergní činnost ve striatu potkana při nadměrné stimulaci psychostimulanty³⁴.

Dopamin a jeho metabolity jsou při laboratorních podmínkách nestabilní. Degradaci vzorku způsobuje rozpuštěný kyslík, denní světlo a teplota. Rychle oxidují zejména v silně alkalickém prostředí. Mohou být velmi pomalu oxidovány i v neutrálním prostředí. Testy

stability byly prováděny ve vodném prostředí a v roztoku methanolu při 25 °C. Za standardních laboratorních podmínek byly stabilní dva dny. Pro dlouhodobější uchování bylo zapotřebí vzorky zamrazit na -80 °C a zamezit přístupu světla³⁵. Po přidavku kyseliny chlorovodíkové bylo dosaženo lepší stability v podobě jejich hydrochloridové formy^{30,35,36}.

Další charakteristiky dopaminu a jeho metabolitů jsou uvedeny v tabulce 1.

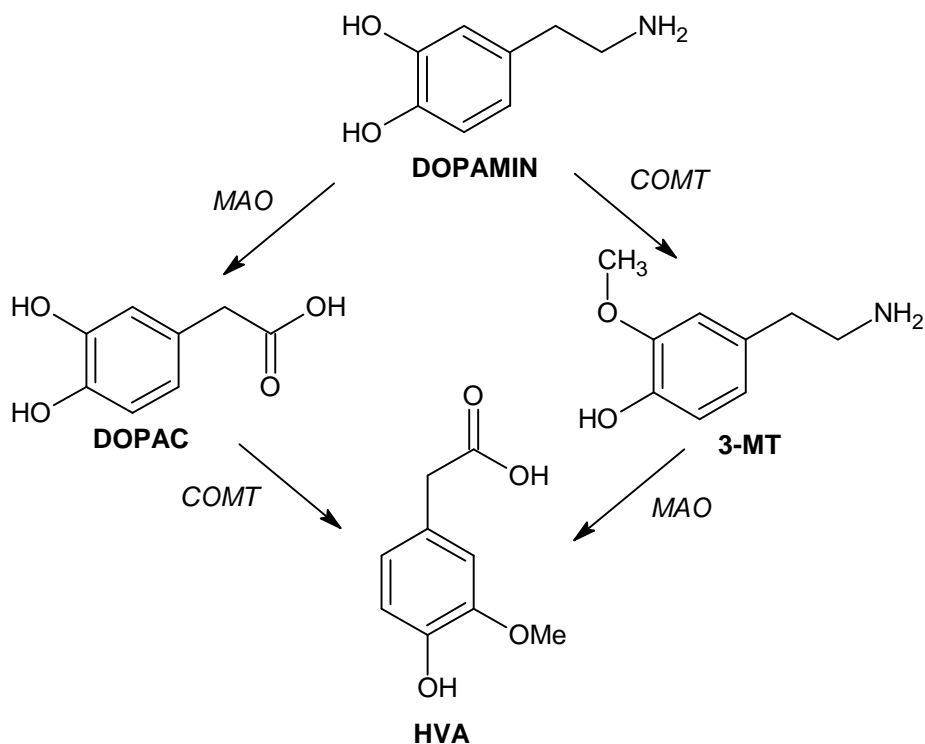
Tab. I Charakteristika zkoumaných látek^{27,37-39}

Systematický název (IUPAC)	Strukturní vzorec	Teplota tání (°C)	Mr	pK	Rozpustnost
Dopamin		128	153,18	pK ₁ = 8,9 pK ₂ = 10,4 pK ₃ = 13,1	v methanolu, 60 g/100 ml vody
3- methoxytyramin		213	167,21	pK ₁ = 9,5 pK ₂ = 10,8	v methanolu, 50 g/ml vody
3,4-hydroxy- fenyloctová kyselina		127	168,15	pK ₁ = 4,2 pK ₂ = 9,8	v methanolu, dobře rozpustná ve vodě
Homovanilová kyselina		142	182,19	pK ₁ = 4,3	v methanolu

4.4.1 Metabolismus DA

Odbourávání dopaminu probíhá nejprve enzymovou methylací hydroxyskupiny v poloze 3 benzenového jádra za vzniku 3-methoxytyraminu. Tato reakce je katalyzovaná enzymem COMT (catechol-O-methyltransferasa)^{19,30,39,41}, který přenáší methylový zbytek z donoru S-adenosylmethioninu⁴². *Antemortem* tato přeměna probíhá spíše okrajově, hlavní přeměnou je deaminace DA monoaminoxidasou (MAO) na DOPAC^{19,41}. Vzniklé aldehydy se pak oxidují až ke konečnému produktu – kyselině homovanilové^{32,39} (schéma 1). Ovšem posmrtně vzniká 3-MT jako hlavní produkt. Posmrtnou akumulaci 3-MT v putamenu

ovlivňují tři faktory: 1. zachování aktivity COMT; 2. dostatečná koncentrace a dostupnost DA; 3. pokles parciálního tlaku kyslíku ve tkáních na nižší hladiny. Tento třetí faktor způsobený selháním kardiorespiračního systému zabraňuje oxidativní deaminaci jak DA, tak i 3-MT monoaminoxidasou, která vyžaduje kyslík (cit.¹⁹).



Schema č. 1 Enzymová katalýza metabolické přeměny dopaminu³².

Posmrtná akumulace 3-MT byla sledována u kryš⁴³. Když byly kryší mozky uloženy *in situ* při 37 °C v různých intervalech po usmrcení, ztráta DA byla větší než nárůst hladiny 3-MT a rozpor byl zvláště výrazný v prvních 10 min. Protože byl podobný rozpor již zaznamenán u zvířat léčených inhibitorem monoaminoxidasou, lze tvrdit, že během počáteční fáze se DA částečně odbourává oxidativní deaminací, částečně O-methylací. Později, když v tkáních poklesne pO₂ prakticky na nulu, druhá reakce převládá. Rychlost akumulace 3-MT neustále klesala během skladování mozků při 37 °C po dobu 2 h. Bylo tedy zjištěno, že ztráty DA v kryším striatu pokračovaly, když byly uloženy *in situ* při + 4 °C po 48 h od setnutí. Hladina homovanilové kyseliny byla během této doby přibližně konstantní⁴³.

U zvířat se zvýšenými hladinami DA, které byly způsobeny léčbou inhibitorem monoaminoxidasy, byla počáteční rychlost posmrtné akumulace 3-MT vyšší než u neléčených zvířat, což naznačuje, že substrát, který je k dispozici, je limitovaný rychlostním faktorem (rate-limiting factor). Tento rozdíl však také může vzniknout ztrátou 3-MT oxidativní deaminací, ke které může docházet pouze u neléčených zvířat⁴³.

V lidských bazálních gangliích byl 3-MT detegován ve vyšších koncentracích než u zvířat⁴³.

Po injekci s pargylinem hladina 3-MT stoupla ve všech studovaných částech krysího mozku (*frontální kortex, cerebellum, hippocampus a striatum*). 3-MT se začal kumulovat ve *frontálním kortexu* třikrát rychleji, než v *cerebellum* a *hippocampu*. Frakční rychlostní konstanta pro 3-MT ve *frontálním kortexu* byla asi dvakrát vyšší než v jiných oblastech mozku⁴⁴.

4.4.2 Elektrochemické chování katecholaminů a jejich metabolitů

V práci⁴⁵ bylo studováno elektrochemické chování různých katecholaminů metodou cyklické voltmetrie v závislosti na pH. Adrenalin v prostředí 1M H₂SO₄ vykazoval pík (1) v prvním anodickém skenu při potenciálu +0,7 V vs. SCE, který odpovídal oxidaci adrenalinu na *o*-chinon. Při zpětném skenu v katodické oblasti byl pozorován také jeden pík (2), který odpovídal zpětné redukci *o*-chinonu na adrenalin. Tento systém se choval kvazireverzibilně.

Při pH 3,0 byl cyklický voltamogram adrenalinu značně odlišný od cyklického voltamogramu v prostředí 1M H₂SO₄. V prvním anodickém skenu byl pík (1) odpovídající oxidaci adrenalinu na *o*-chinon posunut k potenciálu +0,6 V. Ve zpětném skenu byla také pozorována zpětná redukce chinonu, ale pík (2) byl téměř o polovinu menší a byl následován dalším katodickým píkem (3). V bezprostředně následujícím anodickém skenu se objevily dva nové anodické píky (4, 5). Cyklický voltamogram byl interpretován podle mechanismu Harley-Masona (schéma 2).

Při nižších pH je produkt oxidace adrenalinu, adrenalinchinon, protonizován ($pK_a = 8,88$), což zabraňuje cyklizaci jeho postranního řetězce. Při pH 3 je již přítomno dostatečné množství deprotonovaného chinonu, který může cyklizovat. Pík 3 odpovídal redukci cyklického produktu adrenochromu na leukoadrenochrom a pík 4 zpětné oxidaci leukoadrenochromu na adrenochrom. Adrenochrom/leukoadrenochromový redoxní pár byl

prokázán porovnáním s cyklickým voltamogramem autentického vzorku adrenochromu. Rovněž červené zbarvení povrchu elektrody při oxidaci adrenalinu svědčilo o přítomnosti vznikajícího adrenochromu. Ostatní meziprodukty byly identifikovány elektronovou paramagnetickou resonancí. Pík 5 byl přisouzen oxidaci 5,6-dihydroxy-N-metylundolu, který vznikl dehydratací leukoadrenochromu. Protože leukoadrenochrom je snadněji oxidovatelný než sám adrenalin, je oxidován adrenalinchinonem (schéma 2).

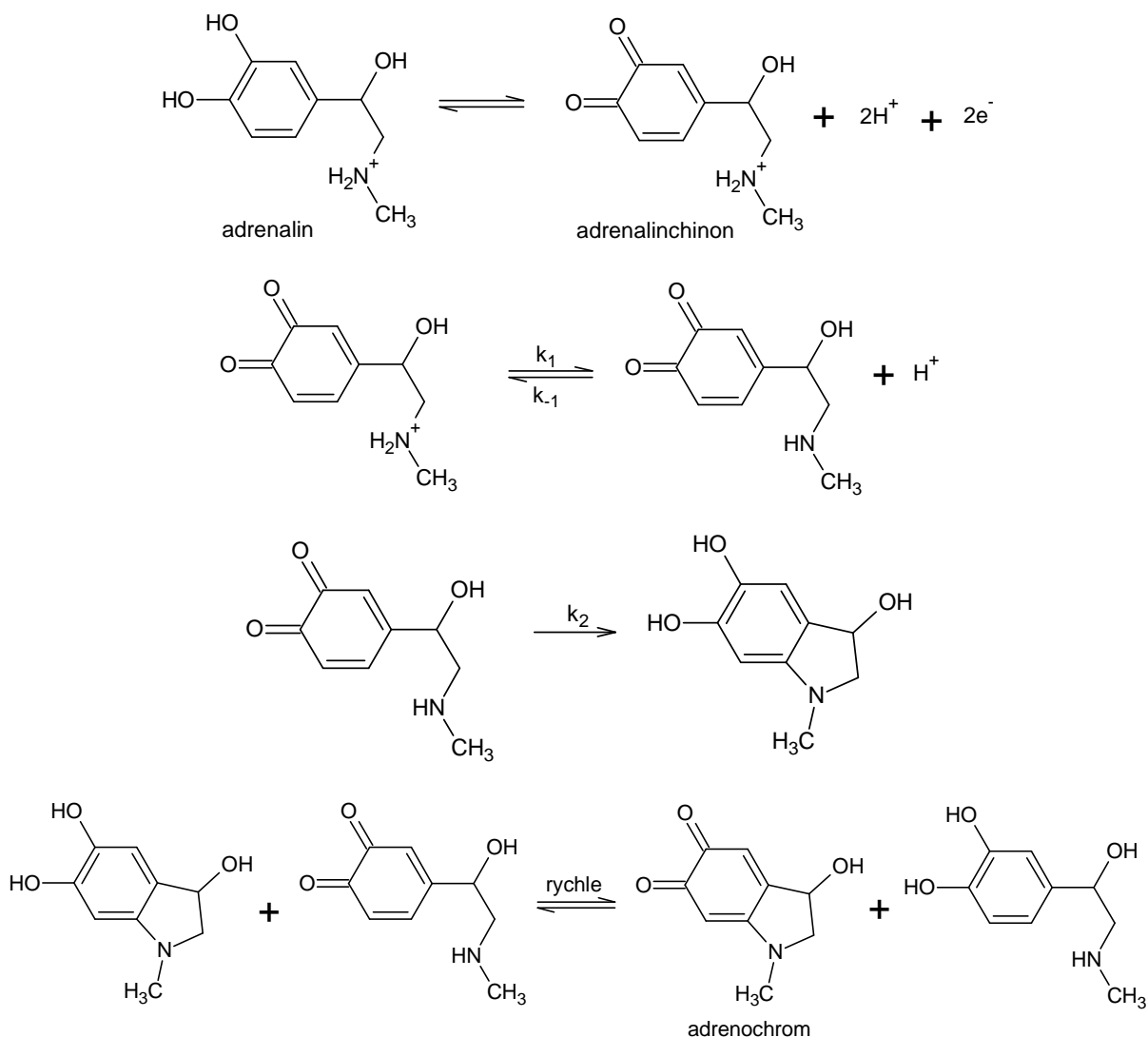


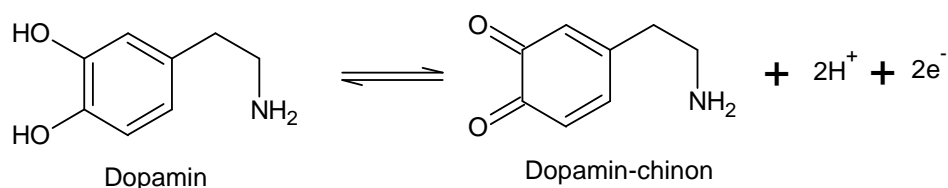
Schéma č. 2 Mechanismus Harley-Masonovy reakce⁴⁵.

Mechanismus oxidace katecholů závisí na stavu elektrodového povrchu. Je známo, že se katecholy adsorbují na povrch uhlíkových i kovových elektrod⁴⁶. V případě čisté platinové elektrody dochází k ireverzibilní adsorpci katecholů na jejím povrchu. Tato chemisorbovaná vrstva nepodléhá reverzibilnímu 2e^- přenosu na odpovídající chinon. Avšak na ireverzibilně

adsorbované organické vrstvě byl pozorován chemicky reverzibilní elektronový přenos⁴⁶. Na iridiovém povrchu vrstva oxidů inhibovala hydrochinon/chinonový elektronový přenos, ale inhibice byla odstraněna malým množstvím chemisorbovaného jodidu nebo síry⁴⁶.

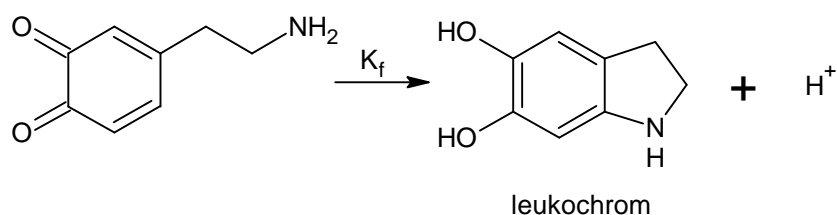
4.4.3 Elektrochemické chování dopaminu

Mechanismus elektrochemické oxidace DA je podobný jako u adrenalinu. Dopamin se nejprve oxiduje na příslušný chinon (schéma 3).



Schema č. 3 Mechanismus reverzibilní elektrochemické oxidace dopaminu⁴⁷.

Po počáteční oxidaci, která je závislá na pH, může probíhat 1,4-adice, která vede k cyklizaci na produkt zvaný leukochrom. V nízkých hodnotách pH je *o*-chinon v protonizované formě, která zabraňuje jeho cyklizaci. Při vyšších hodnotách pH, kdy je přítomno dostatečné množství neprotonovaného chinonu, dochází k jeho cyklizaci na leukochrom. Vznik leukochromu v blízkosti elektrodového povrchu je možné sledovat jako redukční vlnu při potenciálech negativnějších než je vlna redukce necyklického chinonu (schéma 4, cit.⁴⁸).



Schema č. 4 Mechanismus cyklizace dopamin-chinonu na leukochrom⁴⁸.

Mechanismus a kinetika elektrochemické oxidace DA a dalších katecholů ve vodných roztocích s neutrálním pH byla studována v práci⁵². Bylo zjištěno, že při pH 7 probíhá jednoelektronová oxidace aniontu DA následovaná oxidací radikálaniontu. Rychlosti jednoelektronových procesů jsou pomalejší na uhlíkových elektrodách neaktivovaných než aktivovaných (tepelně nebo elektrochemicky⁴⁷) a na elektrodách kovových^{51,52}. Zrychlení

elektrodové reakce a tedy i zvýšení proudové odezvy DA lze dosáhnout také modifikací uhlíkové elektrody např. uhlíkovými nanotrubičkami⁴⁹ či nanovlákný Sr₂V₂O₇ (cit.⁵⁰).

4.4.4 Elektrochemické chování 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny

Elektrochemická oxidace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny zahrnuje přenos dvou elektronů a dvou protonů v roztoku o pH < 8 (rovnice 1) a v roztocích o pH > 8 přenos dvou elektronů a jednoho protonu (rovnice 2).



Formální redoxní potenciály, $E^{0'}$ obou reakcí byly spočítány podle následující rovnice (3),

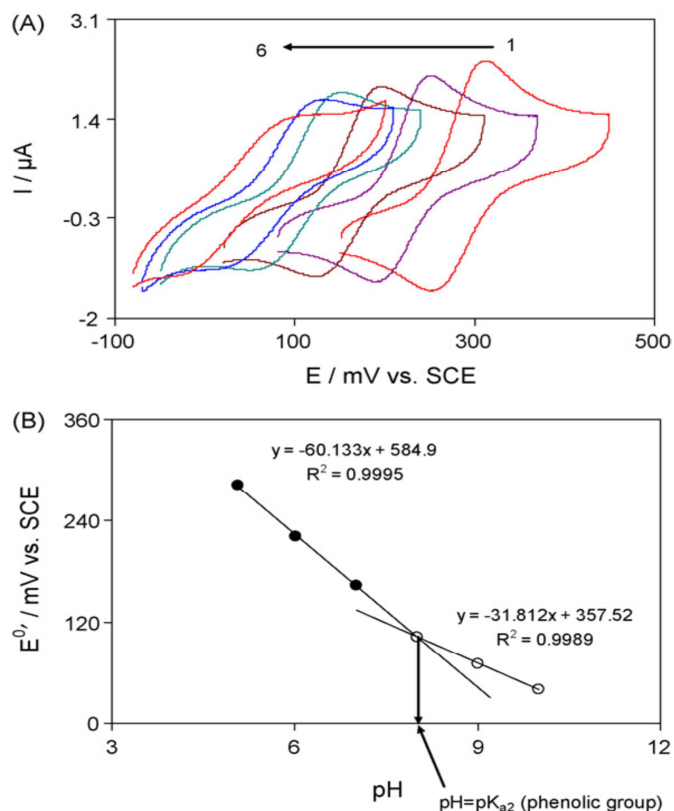
$$E^{0'} = E_{\text{pH}0}^0 - \frac{2,3mRT}{2F} \text{pH} \quad (3)$$

kde $E^{0'}$ je standardní redoxní potenciál; R , T a F jsou molární plynová konstanta, teplota a Faradayova konstanta. Získané hodnoty $E^{0'}$ měřené na pracovní zlaté elektrodě jsou 0,585 a 0,357 V proti nasycené kalomelové elektrodě⁵⁴.

S rostoucím pH se současně zvětšuje potenciálový rozdíl mezi anodickým a katodickým píkem DOPAC (tab. 2). Ve slabě alkalickém prostředí bylo pozorováno kvazireverzibilní chování a v alkalickém (pH > 10) bylo chování ireverzibilní (obr. 1). Z toho bylo usouzeno, že po oxidaci DOPAC následuje ireverzibilní chemická reakce, zejména v alkalickém prostředí⁵⁴.

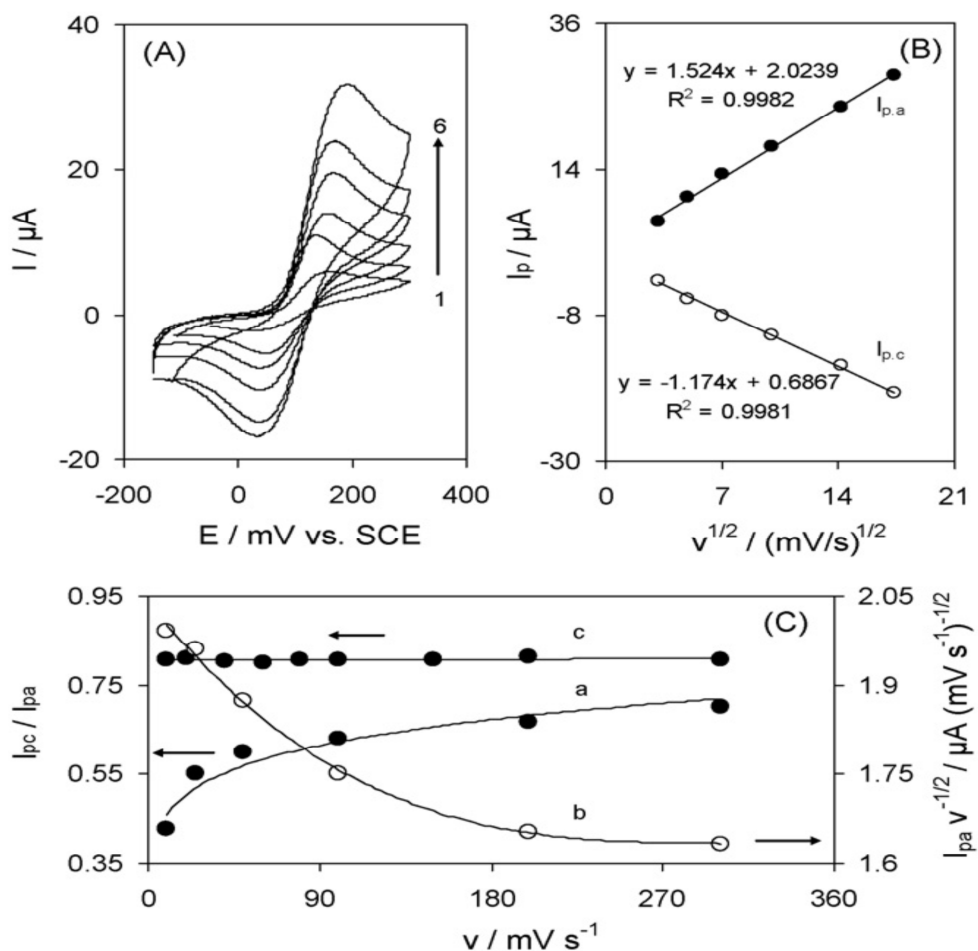
Tab. II Anodické a katodické potenciály píků (E_{pa} a E_{pc}) DOPAC v různých hodnotách pH základního elektrolytu⁵⁴.

	pH					
	5,1	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
E_{pa}/V	0,314	0,255	0,200	0,149	0,126	0,098
E_{pc}/V	0,249	0,187	0,128	0,057	0,014	-0,018



Obr. č. 1 (A) Cyklické voltamogramy měřené Au elektrodou v $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru o různých hodnotách pH s přidavkem $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DOPAC. Skeny 1-6 odpovídají pH 5,1; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 a 10,0. Rychlost skenu 100 mVs^{-1} . (B) Závislost formálního redoxního potenciálu $E^{0'}$ DOPAC na pH (cit. ⁵⁴).

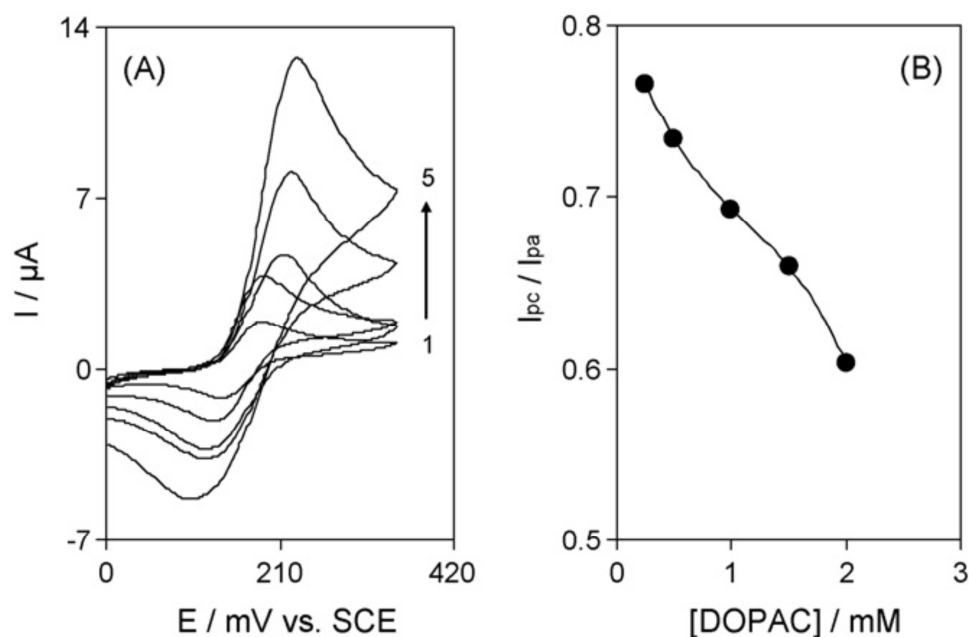
Obrázek (2) ukazuje cyklické voltamogramy DOPAC na zlaté elektrodě při různých rychlostech skenu v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru (pH 7) s obsahem $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DOPAC. Na obr. 2B jsou zobrazeny proudy anodických a katodických píků proti odmocnině z rychlosti skenu. Proud anodického a katodického píku roste lineárně, což ukazuje na děj řízený difúzí.



Obr. č. 2 (A) Cyklické voltamogramy měřené Au elektrodou $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru (pH 7,0) s přidavkem $1,8 \text{ mM}$ DOPAC při různých rychlostech skenu. Křivky 1–6 odpovídají rychlostem $10, 25, 50, 100, 200$ a $300 \text{ m}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Závislost proudu píku na odmocnině z rychlosti skenu. (C) Závislost poměru katodického a anodického píku (I_{pc}/I_{pa}) na rychlosti skenu zaznamenaných v $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DOPAC (křivka a) a $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DOPAC (křivka c). Křivka b ukazuje závislost normalizovaného proudu píku ($I_p/v_{1/2}$) na rychlosti skenu získanou z křivky a (cit. ⁵⁴).

Dále byla studována závislost proudu píku DOPAC na koncentraci. Obr. 3A ukazuje cyklické voltamogramy v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru s různými koncentracemi DOPAC. Poměr proudů katodického a anodického píku (obr. 3B) s rostoucí koncentrací DOPAC klesá⁵⁴.

Přenos elektronu mezi redoxním centrem molekuly DOPAC a povrchem elektrody může sloužit jako modelový systém k pochopení mechanismu přenosu elektronu v biologickém systému⁵⁴.



Obr. č. 3 (A) Cyklické voltamogramy měřené Au elektrodou v prostředí 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0) obsahujícího různé koncentrace DOPAC při rychlosti skenu 50mV/s. Křivky 1–5 odpovídají koncentraci DOPAC (0,25; 0,50; 1,00; 1,50 a 2,00 mmol·l⁻¹). (B) Závislost poměru katodického a anodického proudu píků na koncentraci DOPAC (cit. ⁵⁴).

Elektrochemická oxidace DOPAC byla prováděna na mikroelektrodách z uhlíkových vláken a ze skelného uhlíku v roztoku ledové kyseliny octové za použití voltametrických technik. Voltamogramy ukázaly jeden velmi dobře definovaný pík. Navržený mechanismus anodické oxidace DOPAC (schéma 5) se skládal ze dvou postupných jedno-elektronových a jedno-protonových kroků. Ztráta prvního elektronu probíhá ireverzibilně a určuje celkovou rychlost elektrodového procesu. Tento krok je doprovázen generováním nestabilního fenoxylradikálu v pozici 4 na aromatickém kruhu. Ve druhém kroku elektrodové reakce vzniká substituovaný *o*-chinon jako finální produkt²⁷, poté může dojít k jeho dimeraci. Rychlost dimerizační reakce byla spočítána na $2,10 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (cit.⁵⁵).

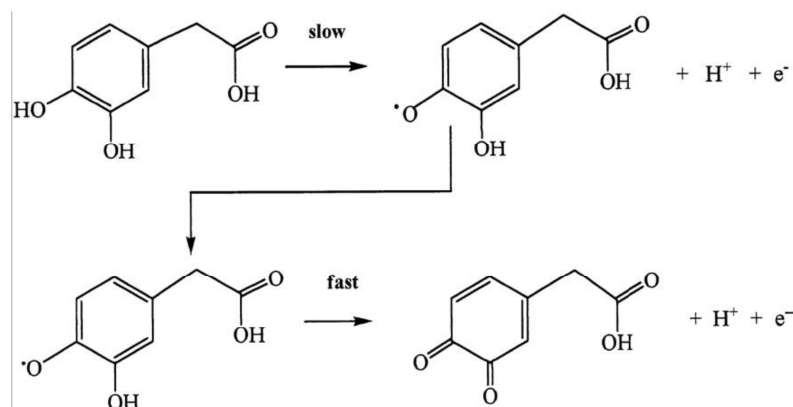
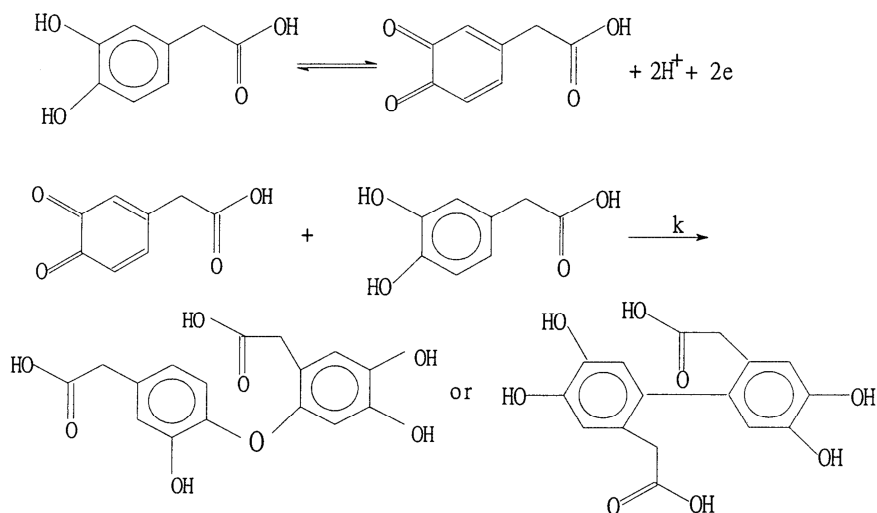


Schéma č. 5 Navržený mechanismus oxidace DOPAC (cit. ²⁷).

Na holé GC elektrodě vykazuje DOPAC ireverzibilní chování, rozdíl mezi potenciálem v anodické oblasti (E_{pa}) a katodické oblasti (E_{pc}) byl 259 mV při rychlosti skenu $0,1 \text{ Vs}^{-1}$. Na SWNT modifikované elektrodě byl získán $\Delta E_p = 49 \text{ mV}$, tudíž se reverzibilita zlepšila. To vede k závěru, že SWNTs mohou být použity jako promotory ke zvýšení rychlosti elektrodové reakce a snížení přepětí DOPAC na SWNT modifikované elektrodě⁵⁵.

Oxidativní proces DOPAC (schéma 6) by mohl probíhat následovně:



Schema č. 6 Mechanismus oxidačního procesu DOPAC (cit. ⁵⁵).

V prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HAC-NaAc pufru (pH 4,4) ukazovala elektroda SWNT vyšší elektrokatalytickou aktivitu vedoucí k oxidaci DOPAC. Byl získán dobře definovaný redoxní pár. Proud píku rostl lineárně s koncentrací DOPAC v rozmezí $1,0 \cdot 10^{-6} - 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Detekční limit byl $4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na SWNT- modifikované elektrodě byla měřena

i kyselina homovanilová (HVA), u které byly také zaznamenány lepší výsledky než na samotné elektrodě ze skelného uhlíku⁵⁵.

V neutrálních hodnotách pH byl u katecholů pozorován elektrochemicky kvazireverzibilní proces. DOPAC je více ireverzibilní než 3,4-dihydroxybenzylamin na neaktivované elektrodě ze skelného uhlíku⁵².

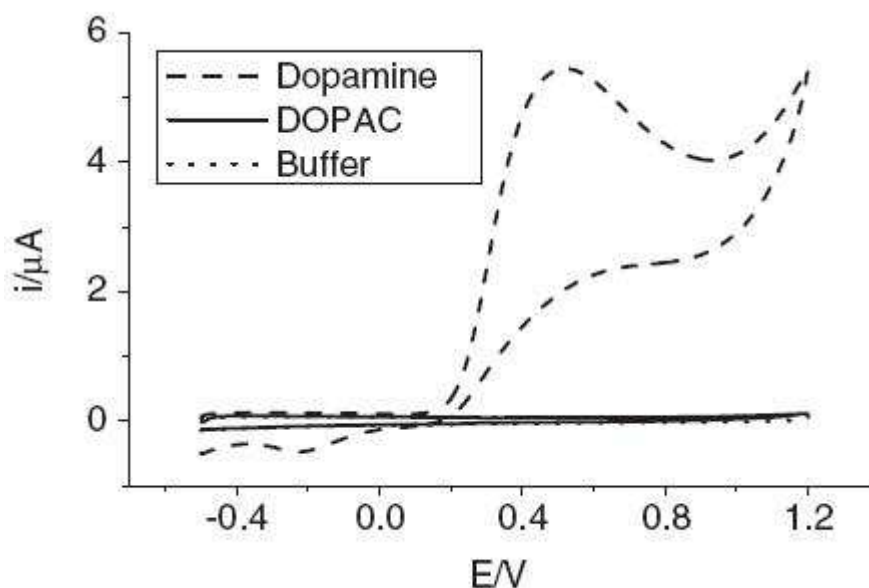
4.5 Metody analýzy DA, 3-MT, 3,4-dihydroxyfenyloctové a homovanilové kyseliny

Při stanovení dopaminu mohou interferovat močová a askorbová kyselina, které mají podobný oxidační potenciál. Askorbová kyselina je v biologických tekutinách v nadbytku oproti DA (cit. ⁴⁹). Pokud je proud píku ovlivněn z ± 5 %, je to považováno za interferenci. Při stanovení $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu, močová kyselina neruší v případě dvojnásobného nadbytku a askorbová kyselina v případě desetinásobného nadbytku⁴⁷.

Dopamin byl stanoven jak na čisté elektrodě ze skelného uhlíku, tak na elektrodách z pyrolytických vláken, které byly elektrochemicky upravené^{47,59}. Byly testovány také různé modifikované elektrody, např. zlatá elektroda modifikovaná směsí oxidu india a cínu⁵⁶, elektroda ze skelného uhlíku pokrytá vrstvou nafionu⁵⁷, elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami²¹.

Dalším vhodným modifikátorem skelného uhlíku jsou nanovlákná $\text{Sr}_2\text{V}_2\text{O}_7$, která zlepšila přenos elektronu mezi DA a elektrodou a umožnila selektivně detegovat DA v přítomnosti kyseliny askorbové. Detekční limit DA byl stanoven na $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ⁵⁰).

Na elektrodě modifikované filmem indium-cín oxidu (ITO) srovnávali selektivní oxidaci dopaminu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny. Redoxní proces DA byl méně reverzibilní, než na kovových elektrodách a elektrodách ze skelného uhlíku, což znamená, že redukce chinonu na katechol byla částečně potlačena na ITO elektrodě. Ze studie⁵³ vyplývá, že adsorpce fosfátu podporuje adsorpci DA (pK_b 8,87) a inhibuje adsorpci záporně nabitého DOPAC (obr. 4).



Obr. č. 4 Cyklický voltamogram $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DA a $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DOPAC ve $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7,4 na ITO-elektrodě. Rychlost skenu $0,1 \text{ V/s}$ (cit. ⁵³).

Elektrochemická studie⁴⁷ stanovovala DA elektrodou ze skelného uhlíku, jejíž povrch byl před měřením elektrochemicky aktivován oxidací při $1,75 \text{ V}$ po dobu 300 s , a poté redukcí při $-1,75 \text{ V}$ po 300 s v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7 metodou cyklické voltametrie. Takto aktivovaná elektroda dávala 100krát větší proud odpovídající DA oproti neupravené elektrodě ze skelného uhlíku. V prostředí fosfátového pufru pH=7 byl zaznamenán největší proud píku. Kalibrační závislosti byly lineární v oblasti $1 \cdot 10^{-7}$ až $9,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,2 \cdot 10^{-5}$ až $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s korelačními koeficienty $0,9973$ a $0,9980$, mez detekce byla stanoven na $3,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Elektroda z pyrolytických uhlíkových vláken (tloušťka $8 \text{ }\mu\text{m}$ a délka $0,5 \text{ mm}$), která byla elektrochemicky (za určitých podmínek⁵⁹) upravena, zlepšila výsledky měření *in vivo* metabolismu dopaminu v mozkové tkáni. Tato upravená elektroda v kombinaci s diferenčně pulzní voltametří byla schopná separovat kyselinu askorbovou od katecholů a některé katecholy byla schopná rozeznat s vysokou citlivostí. Citlivost měření elektrodou s uhlíkovými vlákny byla 10krát vyšší pro DOPAC než pro kyselinu askorbovou a 100krát vyšší pro DA než pro DOPAC. Neupravené elektrody z uhlíkových vláken dávaly špatně definované píky při $+550 \text{ mV}$ pro DOPAC a $+600 \text{ mV}$ pro AA. Citlivost těchto elektrod byla téměř stejná pro AA a DOPAC. Směsné roztoky AA a DOPAC dávaly pouze jeden pík.

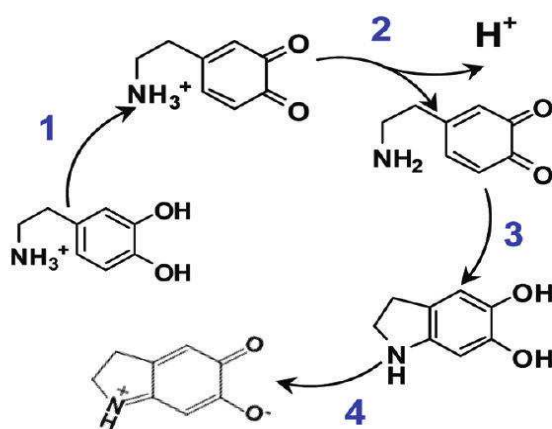
S použitím upravené elektrody byly viditelné dva dobře oddělené píky (AA při -80 mV a DOPAC při +70 mV). Lineární rozsah elektrody z pyrolytických vláken pro DA byl $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $0.5 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ⁵⁹).

Mez detekce speciálně upravené mikroelektrody z uhlíkových vláken (flame etching enhance) byl pro DA $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ²³) a pro elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami (CNTP) $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ²¹).

Metodou cyklické voltametrie s použitím mikroelektrody z uhlíkových vláken lze stanovit DA ve směsi s askorbátem i v případě, že askorbát je 200krát v nadbytku proti DA. Ve směsi DA s DOPAC lze DA stanovit v 20násobném nadbytku DOPAC (cit. ⁶⁸).

Elektrochemické zařízení na bázi papíru modifikovaného SDS položeného na uhlíkovou tištěnou elektrodu bylo vyvinuto pro stanovení DA v krevní plazmě. Metodou square-wave voltametrie umožňovalo měřit v lineárním rozsahu $1 - 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DA s mezí detekce $0,37 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mezí stanovitelnosti $1,22 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ²¹).

Dopamin byl selektivně detegován také redukční cestou po enzymatické oxidaci laccasou. Mechanismus byl založen na chemické reakci částic DA zahrnující oxidaci (1), deprotonaci (2), intermolekulární cyklizaci (3) a disproportionační reakce (4). Finální produkt oxidace byl 5,6-dihydroxyindolin-chinon (obr. 5A). Jeho detekce byla založena na dvou elektronové a dvouprotonové redukci při potenciálu -0,3 V na elektrodě ze skelného uhlíku. Systém byl stabilní, reprodukovatelný a bez interferencí DOPAC, močové a askorbové kyseliny. Tento způsob by tedy mohl sloužit k průběžnému zaznamenávání DA v CNS (obr. 5B)⁶⁰.



Obr. č. 5 Mechanismus enzymové oxidace DA na 5,6-dihydroxyindolinchinon⁶⁰.

Cyklické voltamogramy s rychlým nárůstem potenciálu (FSCV) byly měřeny mikroelektrodou z uhlíkových vláken (délka 50 až 100 μm) implantovanou do mozkové tkáně. Rychlost skenu byla $400 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, klidový potenciál $-0,4 \text{ V}$ proti Ag/AgCl, anodický limit $1,3 \text{ V}$ a sken byl opakován každých 100 ms. Limit detekce dopaminu byl $8 \pm 3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. FSCV s uvedenou mikroelektrodou umožňuje měření extracelulárních hladiny dopaminu v mozku s vynikajícím prostorovým rozlišením. Tato technika byla dříve použita pro sledování extracelulárního DA v putamenu, *nucleus accumbens* a mediální prefrontální mozkové kůře. Detegované množství DA měřené *in vivo* bylo $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit. ³²).

3-MT byl měřen i *in vivo* v souvislosti s užíváním drog působící na katecholový nebo 5-hydroxyindolový metabolismus. V práci⁶¹ použili elektrodu s uhlíkovými vlákny ve spojení s diferenčně pulzní voltametří pro sledování metabolitů aminů ve specifické oblasti krysího mozku. S tímto biosenzorem bylo možné monitorovat současně oxidaci extracelulární kyseliny askorbové ($E_p = -50 \text{ mV}$), 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny ($E_p = +100 \text{ mV}$) a směsi 70% 5-hydroxyindolactové kyseliny/30% močové kyseliny v krysím striatu ($E_p = +300 \text{ mV}$), vzniklý čtvrtý pík při $E_p = +400 \text{ mV}$ proti referenční elektrodě Ag/AgCl odpovídal oxidaci HVA a 3-MT. Biosenzor byl také schopný detegovat HVA ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 3-MT ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) rozpuštěný v PBS. Obě látky se oxidovaly při $+400 \text{ mV}$, ale pro 3-MT byl senzor 3krát citlivější (i v přítomnosti AA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, DOPAC $70 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ než k HVA. Přídavek pargylinu zabraňuje deaminaci DA a má za následek zánik extracelulárního DOPAC. Za těchto podmínek pík odpovídající oxidačnímu potenciálu $+100 \text{ mV}$ odpovídá oxidaci DA.

Vliv na hladiny DA i 3-MT měla lokální infúze KCl ($2 \mu\text{l}$, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Měřením *in vivo* vzrostly oba píky odpovídající DA a 3-MT. Po aplikaci infúze bylo možné detegovat DA v případech, kdy signál DA detegovatelný nebyl⁶¹.

DOPAC byl stanovován na zlaté elektrodě modifikované vrstvou 1,6-hexandithiolu (cit. ⁶²), biosenzorem založeným na konjugaci chitosanu s tyrosinem^{63,64} nebo na elektrodě ze skelného uhlíku modifikovaného jednostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (SWNTs)⁵⁵.

DA a jeho metabolity byly stanoveny HPLC s elektrochemickým detektorem^{18,20,28,65,66} s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (operační potenciál 800 mV proti referenční elektrodě Ag⁺/AgCl). Byla použita kolona se sorbentem C18. Mobilní fáze se skládala ze $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloroctové kyseliny o pH 3, $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ethylendinitro-tetraocové kyseliny,

520 mg·l⁻¹ octylsulfonátu sodného a 7% acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min při tlaku 1000 psi. Za těchto podmínek byly retenční časy: DOPAC 8,7 min, DA 17,0 min, HVA 19,6 min a 3-MT 40,8 min (cit. ¹⁸).

Kromě kapalinové chromatografie byly k detekci DA použity další instrumentální techniky, např. kapilární elektroforéza, spektrofluorometrie, elektroforéza na mikročipech, povrchová plasmonová resonance, chemiluminiscence či hmotnostní spektrometrie²¹.

Kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí byla použita ke studiu metabolismu DA v krysím ledvinovém mikrodialyzátu. DA a jeho metabolity bylo možné stanovit i v moči krys. Z dialyzátu bylo možné detegovat DOPAC v koncentraci 150 fmol a HVA na 300 fmol (cit. ⁶⁷).

Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (LC-ESI-MS/MS) pro stanovení DA, 3-MT, DOPAC a HVA potenciálně rozšiřuje diagnostické/léčebné možnosti, pokud se jedná o neuropsychiatrické a neurologické poruchy, kde jsou koncentrace hladiny DA a jeho metabolitů změněné ve srovnání s normální fyziologickou úrovní. Metoda může přispět k lepšímu pochopení patofyziologie a patogeneze řady neuropsychiatrických poruch a farmaceutického výzkumu nových léků k léčbě neurologických onemocnění³⁶.

3-MT byl stanovován metodou GC/MS. Před analýzou bylo zapotřebí látku derivatizovat. V jednom případě byla látka acetylována⁶⁹, v jiném případě byl 3-MT deuterovaný⁴⁴.

Dopamin, katechol a kyselina askorbová byly analyzovány metodou CE s elektrochemickou detekcí ve tříelektrodovém zapojení (pracovní borem-dopovaná diamantová elektroda, referentní Ag/AgCl elektroda). Měření bylo prováděno v 10 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru pH 6 v 30 cm dlouhé křemenné kalipáře (průměr 75 μm) o separačním napětí 8 kV. Roztok byl nastříknut na kolonu elektrokineticky (3 s, 8 kV). Pracovní potenciál byl v rozmezí -0,6 až +1,4 V vs. Ag/AgCl. Mez detekce byla vypočítána na 1,7 fmol pro DA a 2,6 fmol pro katechol⁷⁰.

Kyselina homovanilová je jedním z biochemických markerů, které jsou měřeny v moči různými metodami (TLC, HPLC, GC/MS, ELISA) k vyšetření možné diagnózy neuroblastomu a jiných pevných tumorů. Stanovení HVA hraje též roli při biochemické

diagnóze vrozených vad metabolismu serotoninu a katecholaminu. V práci⁷¹ byla snaha vyvinout metodu LC-MS/MS, která by nahradila stávající HPLC při vyšetření HVA v moči.

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje

Polarograf ECO-TRIBO (Polaro-Sensors, Praha) v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE MF-2012, Bioanalytical Systems, USA), referentní nasycenou kalomelovou elektrodou (Monokrystaly, Turnov) a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou (MW-4130, Bioanalytical Systems, USA) byl použit pro měření cyklickou (CV) a diferenční pulzní voltametrií (DPV). Měření a vyhodnocování voltamogramů bylo prováděno v programu Polar Pro, verze 4.

Hodnoty pH byly měřeny na pH-metru Inolab WTW (Weilheim, Německo) s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21. Přístroj byl kalibrován na vodné standardní pufrы WTW pH = 4,01; 7,00 a 10,01 při 25 °C.

5.2 Chemikálie a roztoky

Standardy 3-methoxytyraminu (3-MT), dopaminu (DA), 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (DOPAC) a homovanilová kyselina (HVA) byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich. Byly skladovány v temnu při 4 °C, 3-MT a HVA v atmosféře dusíku.

Nastavení pH měřených vzorků bylo realizováno Britton-Robinsonovými pufrы s iontovou silou korigovanou pomocí NaClO₄ (p.a., Fluka). Dále byl použit fosfátový pufr o pH 2; 6,5; 7 a 7,4 připravený z 0,1M H₃PO₄ a 0,2M NaOH. Pro přípravu všech vodných roztoků bylo použito ultračistá voda (0,055 μS cm⁻¹) získané ze soustavy ELGA. K modifikaci uhlíkové elektrody byl použit 5% roztok Nafionu (Sigma Aldrich) ve směsi alifatických alkoholů a vody (alkoholy: 2-propanol obsah 25-50 %, n-propanol 25-50 %). Dále byly použity: methanol (p.a., Penta), Chelaton III (p.a., Lachema, Praha), pyrosiřičitan sodný (p.a., Lachema, Brno), uhličitán draselný bezvodý (p.a., Lachema, Brno), dodecylsulfát sodný (SDS, p.a., Sigma-Aldrich).

5.3 Pracovní postupy

Zásobní roztoky DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA koncentrace $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny navážením potřebného množství pevné látky a jeho rozpuštěním v methanolu nebo v destilované vodě. Roztoky byly krátkodobě skladovány (nejdéle týden) v temnu při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.3.1 Modifikace roztokem SDS

Zásobní roztok SDS byl připraven v koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v destilované vodě. Metodou DPV s GC elektrodou byly proměřeny všechny látky v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS pufru v pH 2 a 7. Základní elektrolyt se skládal z 5 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS o příslušném pH, 3 ml vody a 1 ml 10 mM SDS v destilované vodě. K tomuto roztoku se přidával 1 ml $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zásobního roztoku analytu.

5.3.2 Pokrývání elektrody vrstvou nafionu

Roztok nafionu (2.5% w/v) byl připraven ředěním 5% w/v Nafionu 1:1 s methanolem. Na elektrodu byly nanášeny 3 μl ředěného nafionu pomocí mikropipety. Při pokrývání bylo s elektrodou otáčeno (cca 60 otáček/min) a současně na její povrch foukán teplý vzduch po dobu jedné minuty (cit. ⁵⁷). Vliv rotace elektrody při pokrývání měl zásadní vliv na kvalitu měřené proudové odezvy.

5.4 Voltametrické měření

5.4.1 Závislosti na pH

Voltamogramy všech studovaných látek v Britton-Robinsonových pufrech v rozsahu pH 2 – 12 jsem měřila metodami DPV a CV. K měření jsem použila jako pracovní čistou elektrodu ze skelného uhlíku, referentní nasycenou kalomelovou elektrodu a jako pomocnou platinový drátek. Použila jsem nádobku pro měření v malých objemech 0,2 – 2 ml (MF-1084 a MF-2031, Bioanalytical Systems, USA). Základní elektrolyt byl složen ze 100 μl Britton-Robinsonova pufru o různém pH a 80 μl destilované vody. K němu bylo přidáno 20 μl látky (DA, 3-MT, DOPAC, HVA) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledná koncentrace analytu v nádobce byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V případě měření CV byly použity parametry: rozsah potenciálů -400 až 1300 mV , rychlost polarizace elektrody 100 mV/s . Při měření DPV byly

parametry: rozsah potenciálů -400 až 1200 mV, rychlost polarizace elektrody 20 mV/s, modulační amplituda 50 mV a šířka pulzu 100 ms s měřením proudu v posledních 20 ms. V alkalických prostředích bylo nutné snižovat konečný potenciál.

5.4.2 Optimalizace parametrů DPV

Při optimalizaci metody DPV bylo měření prováděno v PBS pufru pH 7. Elektrolyt byl složen z 5 ml 0,1 mol·l⁻¹ PBS pufru, 4 ml destilované vody a do něj jsem dávkovala 1 ml zásobního roztoku analytu o koncentraci 1·10⁻³ mol·l⁻¹. Parametry měření: rozsah potenciálů -400 až 1200 mV, rychlost polarizace jsem měnila v rozmezí 5, 10 a 20 mV/s a modulační amplitudu v rozsahu 10, 25 a 50 mV. Šířka pulzu byla vždy 100 ms, proud byl měřen v posledních 20 ms.

5.4.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační roztoky pro DPV měření byly připravovány z 5 ml fosfátového pufru o pH 6,5 a 5 ml destilované vody. Do roztoku základního elektrolytu jsem dávkovala přídavky zásobních vodných roztoků jednotlivých látek (DA, 3-MT, DOPAC a HVA). Roztok byl vždy před měřením 5 min probublán dusíkem. Rozsah koncentrací kalibračních roztoků jednotlivých analytů byl 1·10⁻⁶ mol·l⁻¹ až 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ při měření na čisté uhlíkové elektrodě a 1·10⁻⁷ mol·l⁻¹ až 1·10⁻⁵ mol·l⁻¹ při měření na uhlíkové elektrodě pokryté nafionem.

Kalibrační roztoky směsi DA a 3-MT obsahovaly konstantní koncentraci DA a 3-MT byl přidáván postupně. Pro měření na čisté elektrodě roztok obsahoval 5 ml PBS pH = 6,5; 4 ml destilované vody a 1 ml 1·10⁻³ mol·l⁻¹ (výsledná koncentrace DA byla 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹). Pro měření s elektrodou modifikovanou nafionem obsahoval roztok 5 ml PBS pH = 6,5; 4 ml destilované vody a 1 ml 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ (výsledná koncentrace DA byla 1·10⁻⁵ mol·l⁻¹). K těmto roztokům jsem přidávala 3-MT tak, aby jeho koncentrace v celkovém objemu byla od 1·10⁻⁶ do 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ (čistá elektroda) a 1·10⁻⁷ mol·l⁻¹ až 1·10⁻⁵ mol·l⁻¹ (modifikovaná elektroda). Diferenční pulzní voltamogramy byly zaznamenány v rozmezí potenciálů 0 až -1200 mV s polarizační rychlostí 20 mV/s, šířkou pulzu 100 ms a modulační amplitudou 50 mV.

5.5 Odběr a zpracování mozkové tkáně

Reálné vzorky byly odebrány z mozku prasete domácího. Mozek byl zakoupen v řeznictví Josef Filák (Olomouc-Hodolany). Každý jeden vzorek byl naškrabán, navážen po 2 až 3 g do polyethylenových uzavíratelných sáčků, některé vzorky byly obohaceny injektováním $164 \mu\text{l } 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DA a $150 \mu\text{l } 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-MT. Všechny vzorky tkáně byly pak zamrazeny na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ na 12 hodin (cit. ¹⁰).

Další postup úpravy a zpracování vzorku byl převzat z literatury⁴¹. Zmražený vzorek tkáně (2 až 3 g) byl homogenizován 10 min v třecí misce předem zchlazené na teplotu $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ s přidavkem 10 ml extrakčního roztoku ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina chloristá s 0,2 % EDTA a 0,05 % disířičitanu sodného), zcentrifugován (4400 rpm; 10 min), zfiltrován přes filtrační papír (červená páska) a před přečištěním na kolonce bylo pH upraveno na hodnotu 2 pomocí $2,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3$.

5.6 SPE extrakce

Extrakční postup byl nejprve testován s modelovým vzorkem, který obsahoval $260 \mu\text{l } 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DA, $240 \mu\text{l } 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-MT v 10 ml extrakčního roztoku ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$ s 0,2 % EDTA a 0,05 % disířičitanu sodného). Před nanesením na kolonku bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 2 pomocí 2,5M K_2CO_3 . Postup byl převzat z literatury⁴¹.

Byly testovány dva typy separačních kolonek:

1. AG[®] 50W-X8.Resin, 100 – 200 mesh, H⁺-cyklus, 0,8 x 4 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA);
2. AccuBOND SPE kolonka, 500 mg SCX s objemem 3 ml (J&W Scientific, Folsom, USA).

S oběma typy jsem pracovala stejně. Nejprve jsem kolonky promyla 5 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pufru o pH 6,5 s 0,1% EDTA, poté 5 ml destilované vody. Tímto byly kolonky připraveny k použití.

Na kolonky jsem nanesla 10 ml modelového vzorku analytů v extrakčním roztoku nebo 10 ml extraktu z vepřového mozku (jejich pH bylo upraveno na 2,5M K_2CO_3), a nechala protéct kolonkami. Na promytí kolonek jsem použila: 10 ml H_2O , 10 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pH 6,5 s 0,1 % EDTA, dalších 10 ml H_2O . Následovala eluce roztokem 1M HCl s EtOH (50%).

Modelový vzorek standardů DA a 3-MT byl eluován 7krát po 3,5 ml. Extrakt z mozku byl eluován 10 ml elučního roztoku a následně byl obsah EtOH ve směsi odfoukán dusíkem pro zakoncentrování eluátu. Všechny frakce jsem jímala do vialek, aciditu upravila přibližně na pH 2 pomocí 2,5M K₂CO₃, smíchala s PBS pH 7,4 (1:1) do definovaného objemu a dala zamrazit na -20 °C. Frakce byly rozmrazeny těsně před analýzou⁴¹. Jako slepý pokus byl měřen roztok složený z 5 ml extrakčního roztoku (0,4 HClO₄ s 2% obsahem EDTA a 0,05% Na₂S₂O₅), jehož acidita byla upravena na pH 4 pomocí 2,5M K₂CO₃ a 5 ml mol·l⁻¹ PBS (pH = 7,4).

Analýza byla provedena metodou DPV (rozmezí potenciálů -300 až 900 mV, rychlost skenu 20 mV/s, doba akumulace 0 s, modulační amplituda 50 mV a šířka pulzu 100 ms) s GC elektrodou modifikovanou nafionem.

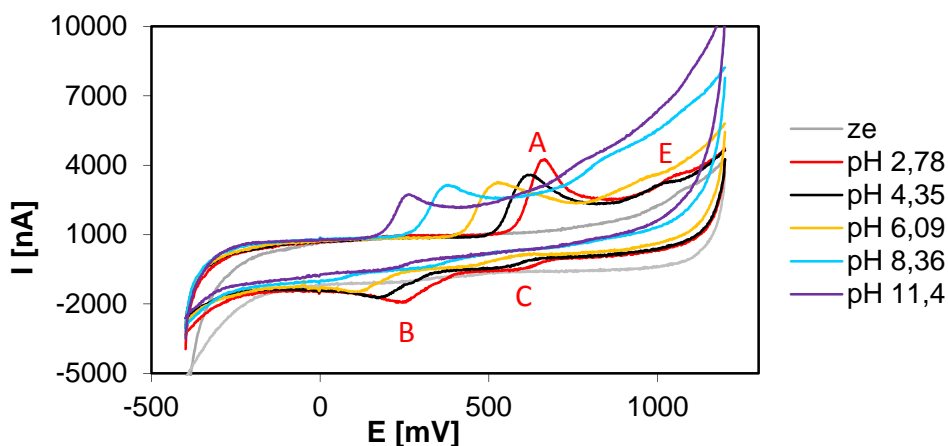
6 Výsledky a diskuse

6.1 Voltametrické chování dopaminu a jeho metabolitů

Cílem práce bylo studovat hlavně voltametrické chování 3-methoxytyraminu (3-MT), který vzniká jako hlavní metabolit dopaminu (DA) v mozku po smrti, kdy je zachována funkce katechol-O-methyltransferázy. Současně s DA a 3-MT bylo sledováno také voltametrické chování 3,4-dihydroxyfenylacetové kyseliny (DOPAC) a homovanilové kyseliny (HVA), které jako další metabolity DA a 3-MT bývají také přítomny v mozkové tkáni. Vzhledem k podobné struktuře všech čtyř látek je třeba uvažovat možnost interference DOPAC a HVA při voltametrickém stanovení DA a 3-MT. Proto bylo studováno také voltametrické chování u těchto dvou potenciálních interferentů.

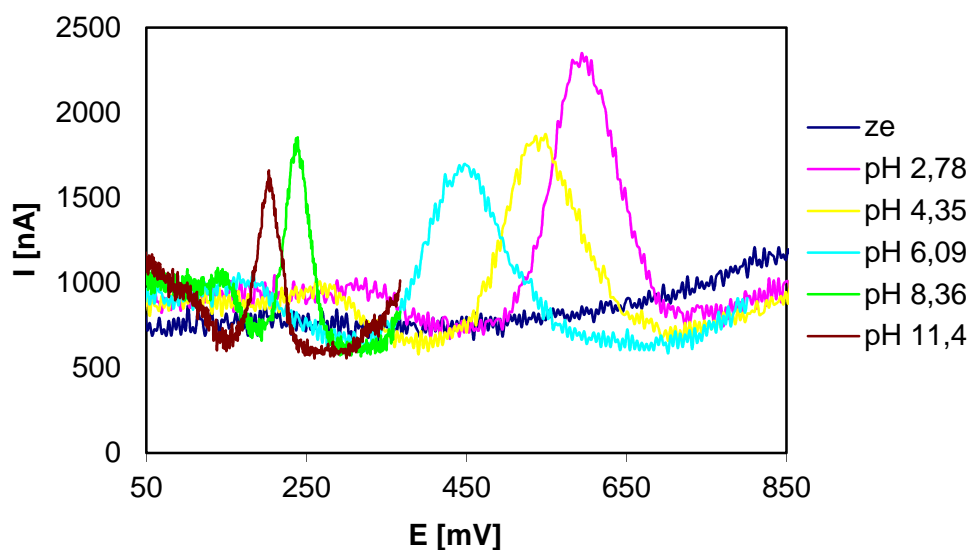
6.1.1 3-Methoxytyramin

Na cyklických voltamogramech 3-MT (obr. 6) v závislosti na pH B-R pufru je vidět v anodickém směru polarizace jeden dobře vyvinutý pík (A) a při vyšším potenciálu špatně vyvinutý pík (E). V katodickém směru jsou zřetelné dva píky (B a C). Z počtu proudových píků lze usoudit, že elektrooxidace 3-MT probíhá ve dvou postupných krocích a vznikají při ní dva elektroaktivní produkty. S rostoucím pH se potenciály píků v anodické i katodické oblasti posouvaly k nižším hodnotám a proudy klesaly. V alkalickém pH byly katodické píky téměř nezřetelné v důsledku rostoucí ireverzibility elektrodových dějů.



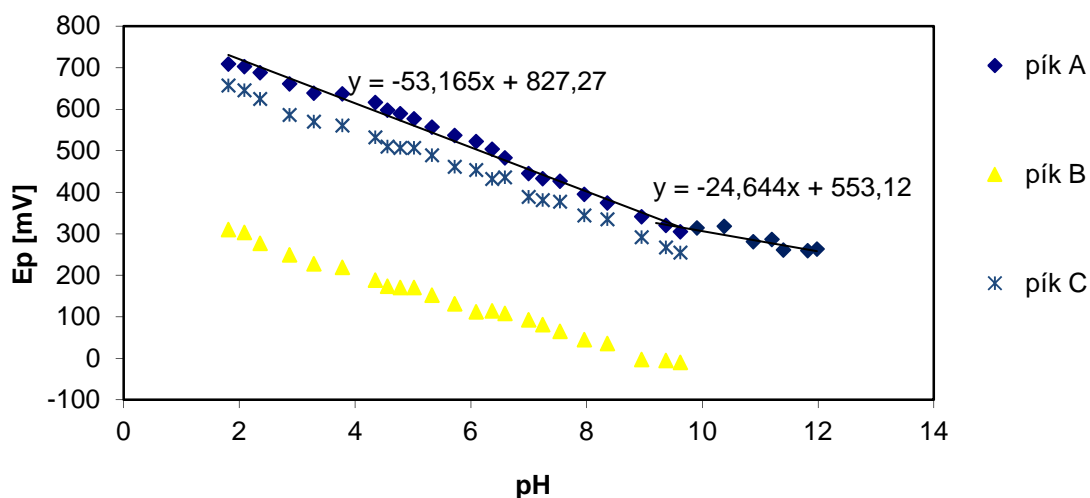
Obr. č. 6 Cyklické voltamogramy 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrch. Rychlost skenu 100 mV/s.

Podobně jako u cyklických voltamogramů 3-MT je pozorován i na diferenčně pulzních voltamogramech (obr. 7) posun potenciálů píků směrem k nižším hodnotám s rostoucím pH.

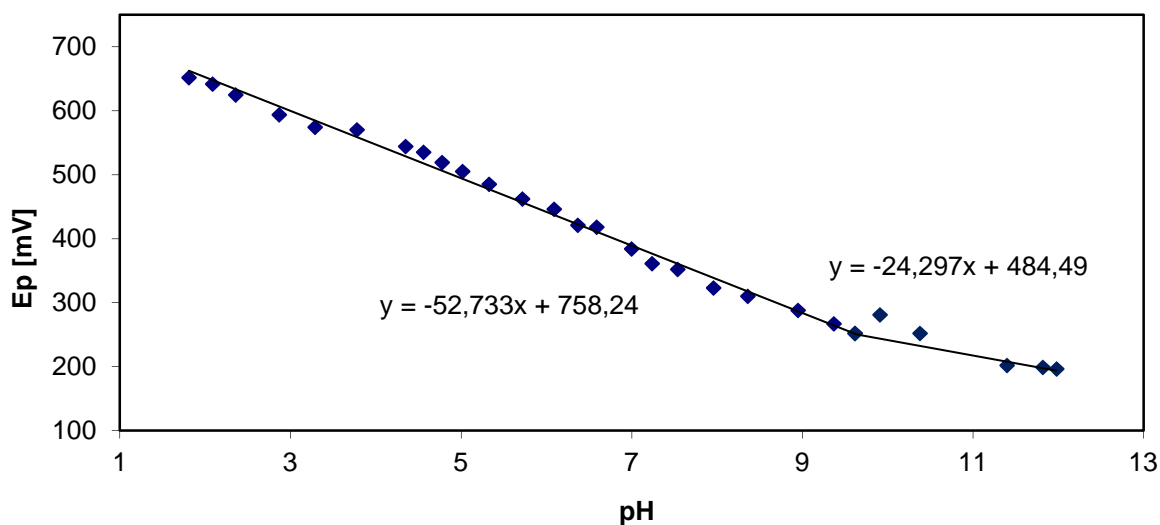


Obr. č. 7 Diferenčně pulzní voltamogramy 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrech. Rychlost skenu 20 mV/s.

Grafické znázornění závislosti potenciálů CV-píků 3-MT (obr. 8) na rostoucí hodnotě pH Britton-Robinsonového pufru má klesající tendenci v anodickém i katodickém směru polarizace. Proložení závislostí dvěma regresními přímkami se směrnici -53 mV/pH a -24 mV/pH byl získán průsečík přímek odpovídající pH 9,6. Podobně jako u CV-píku i v případě DPV-píků byla závislost E_p na pH proložena dvěma lineárními úseky se směrnici -52 a -24 mV/pH s průsečíkem při pH 9,6 (obr. 9). Oba nalezené průsečíky odpovídají hodnotě $pK_{a1} = 9,5$ publikované v literatuře³⁹**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

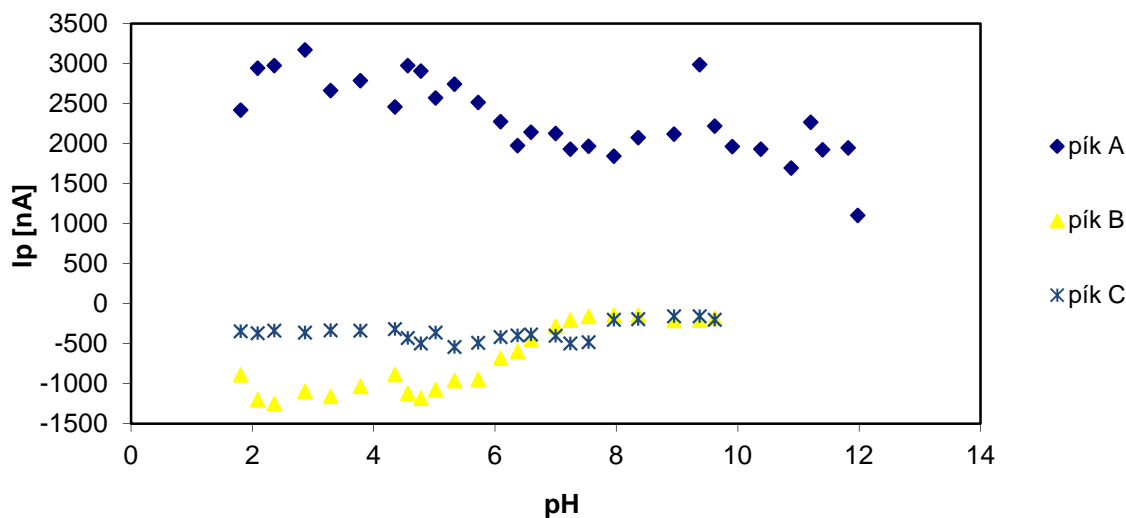


Obr. č. 8 Závislost potenciálů píků 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost scanu 100 mV/s.

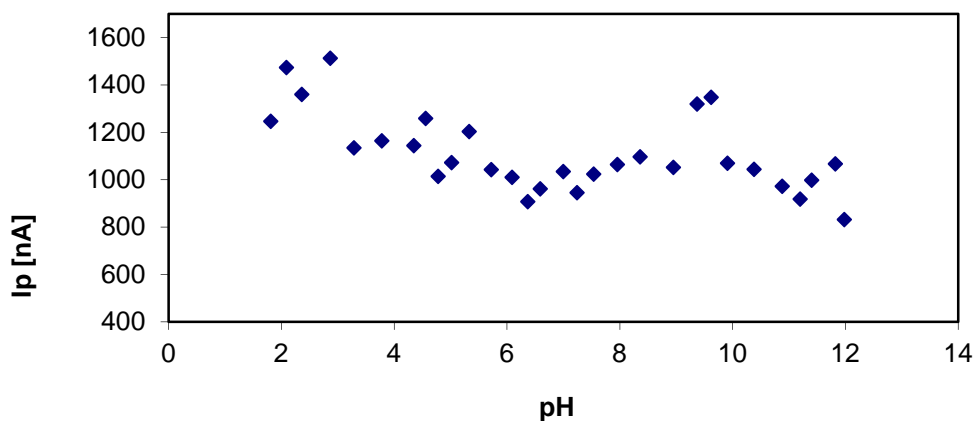


Obr. č. 9 Závislost potenciálů píků 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní potenciál 0 mV až 1000 mV; rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Intenzita proudu všech CV-píků 3-MT byla větší v kyselé oblasti pH (obr. 10). Od pH 6 výše proudy klesaly a v alkalickém prostředí byl proud katodických píků B a C jen obtížně vyhodnotitelný. Proud anodického DPV-píku se měnil s rostoucím pH podobně jako proud CV-píku A (obr. 11).



Obr. č. 10 Závislost proudu píků 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost skenu 100 mV/s.

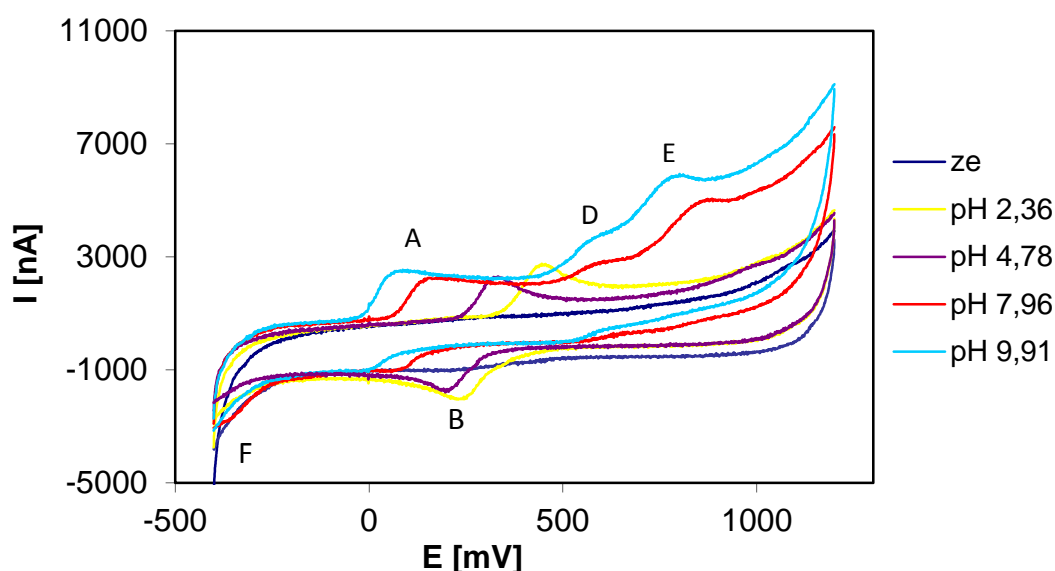


Obr. č. 11 Závislost proudů píků 3-MT ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní potenciál 0 mV až 1000 mV; rychlost scanu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

6.1.1 Dopamin

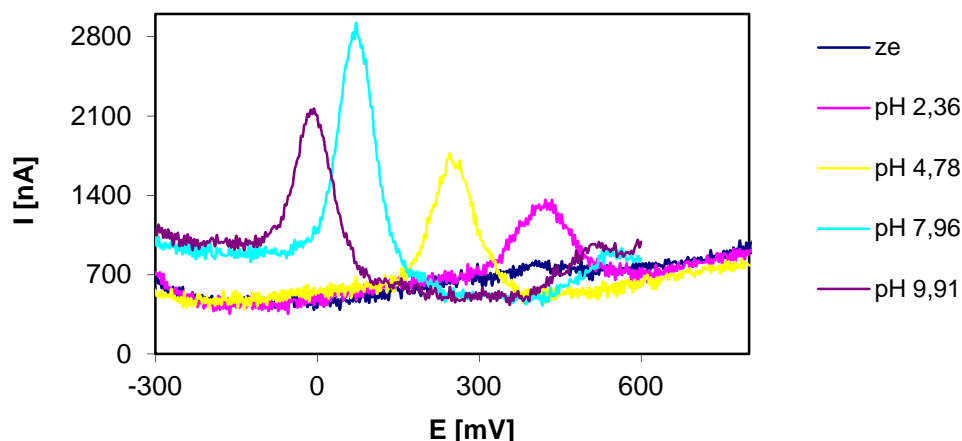
Na cyklických voltamogramech DA v závislosti na pH B-R pufru (obr. 12) je vidět v anodickém směru polarizace v kyselém prostředí jeden pík (A), který pravděpodobně odpovídá dvouelektronové oxidaci DA na příslušný *o*-chinon. S rostoucím pH se posouvá

potenciál píku A k nižším hodnotám. Při vyšších potenciálech se objevoval na voltamogramech anodický proudový pík (E), málo zřetelný v kyselém prostředí, ale dobře vyvinutý v neutrálním a alkalickém prostředí. V neutrálním a alkalickém prostředí byl na voltamogramech zřetelný další anodický pík (D) s potenciálem mezi píky A a E. Proudové odezvy D a E mohou náležet oxidaci produktu, který vzniká z chinonu následnou chemickou reakcí⁴⁷. V katodickém směru polarizace se v kyselém prostředí objevoval jeden dobře vyvinutý pík (B), jehož potenciál se s rostoucím pH posouval k nižším hodnotám. V neutrálním a alkalickém prostředí byl pík B málo zřetelný. Zato ale se v rozmezí pH 5,7 až 8 objevil nový katodický pík (F) v oblasti negativních potenciálů.



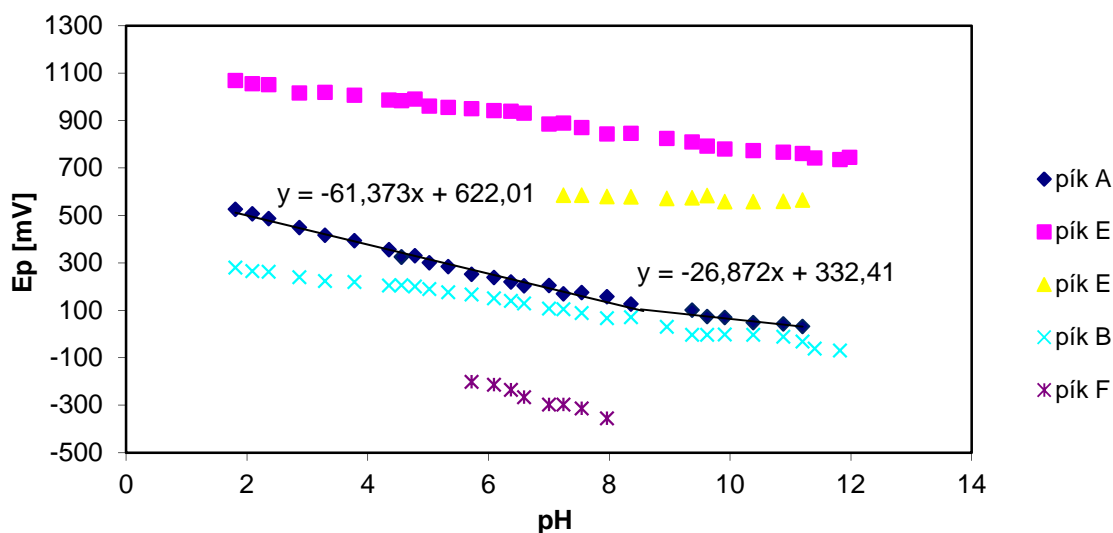
Obr. č. 12 Cyklické voltamogramy DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrch. Rychlost skenu 100 mV/s.

Chování DA v závislosti na pH bylo sledováno také metodou DPV v anodickém směru polarizace. Na voltamogramech (obr. 13) byl pozorován jeden dobře vyvinutý pík, který odpovídal píku A na cyklických voltamogramech. V neutrálním a alkalickém prostředí bylo možné sledovat další pík při vyšším potenciálu kolem 580 mV, odpovídající píku D na cyklických voltamogramech ve stejném prostředí.

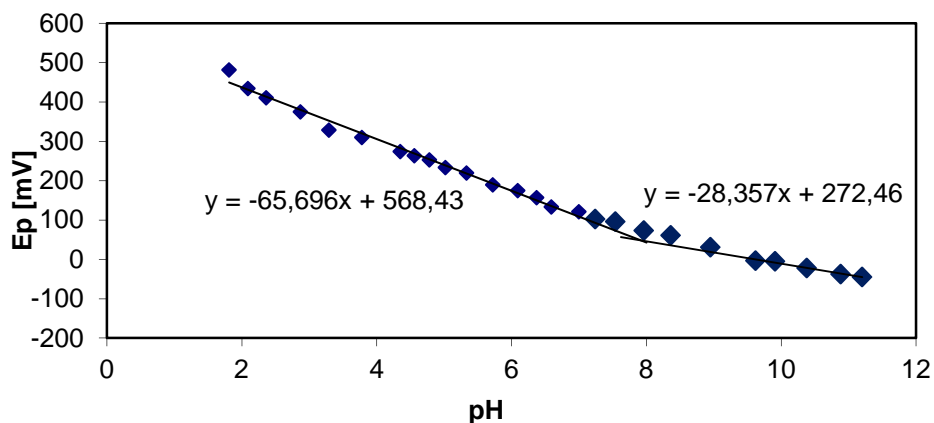


Obr. č. 13 Diferenčně pulzní voltamogramy DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrách. Rychlost skenu 20 mV/s, modulační amplituda 50 mV.

Na obr. 14 a 15 jsou grafické závislosti potenciálů CV- a DPV-píků DA na pH v celém studovaném aciditním rozsahu. Potenciály všech píků v katodické i anodické oblasti se s rostoucím pH pufru posouvaly k nižším hodnotám. Potenciál píku A se měnil lineárně se směrnici -61 mV na jednotku pH (pro CV) a -66 mV/pH (pro DPV) až do alkalických hodnot kolem pH 8. V slině alkalických roztocích byly směrnice -27 mV/pH (CV) a -28 mV/pH (DPV). Hodnoty směrníc blízké teoretické hodnotě 59 mV/pH ukazují, že v kyselé a neutrální oblasti pH se oxidace DA účastní stejný počet protonů a elektronů. Poloviční hodnoty směrníc zjištěné pro alkalickou oblast naznačují účast polovičního počtu protonů proti elektronům. Průsečíky obou lineárních úseků při pH 8,4 pro CV resp. 7,9 pro DPV korespondují s hodnotou první disociační konstanty DA $pK_{a1} = 8,9$ publikovanou v literatuře^{37,38,39}.

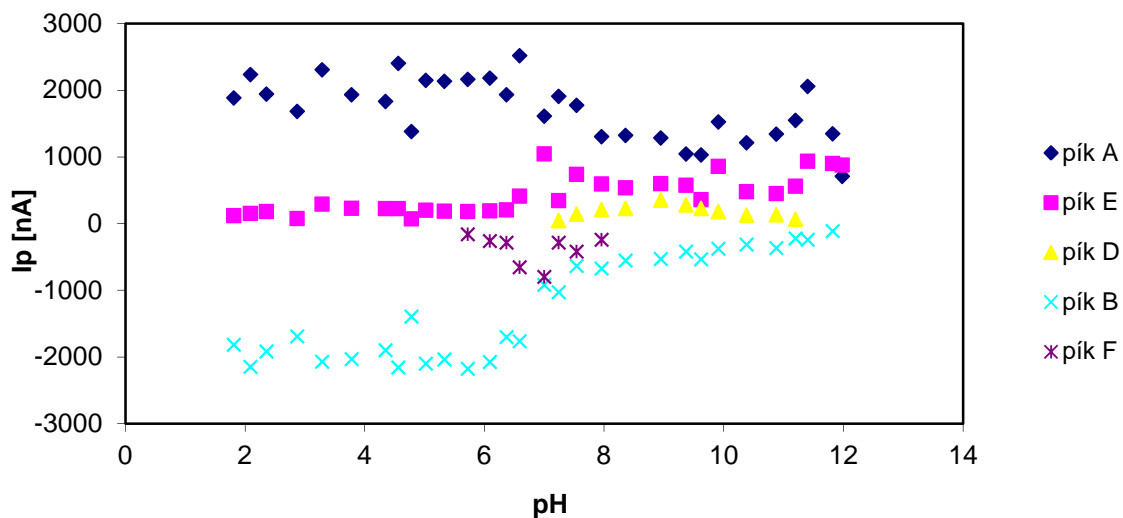


Obr. č.14 Závislost potenciálů píků DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost skenu 100 mV/s.

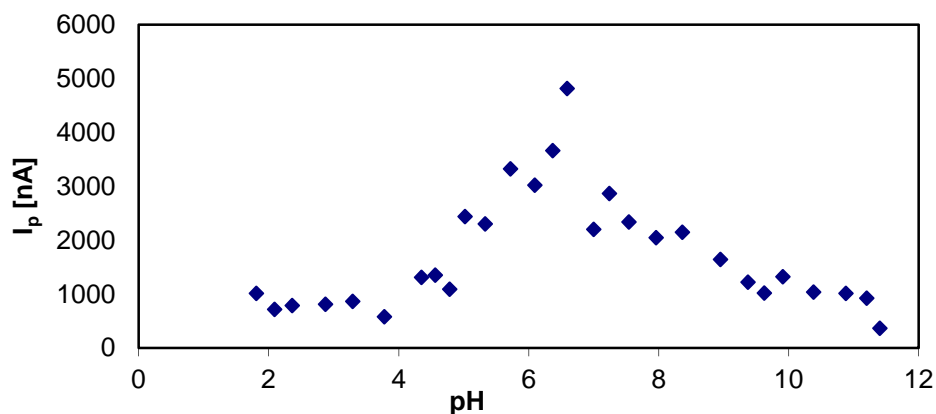


Obr. č. 15 Závislost potenciálů píků DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní potenciál -300 mV až 800 mV; rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Závislost proudů CV-píků na hodnotě pH (obr. 16) ukazuje, že píky A a B mají vyšší intenzitu v kyselém prostředí než v alkalickém. Metodou DPV byla zaznamenána nejvyšší intenzita píku A v slabě kyselém a neutrální oblasti pH (obr. 17).



Obr. č. 16 Závislost proudů píků DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost skenu 100 mV/s.

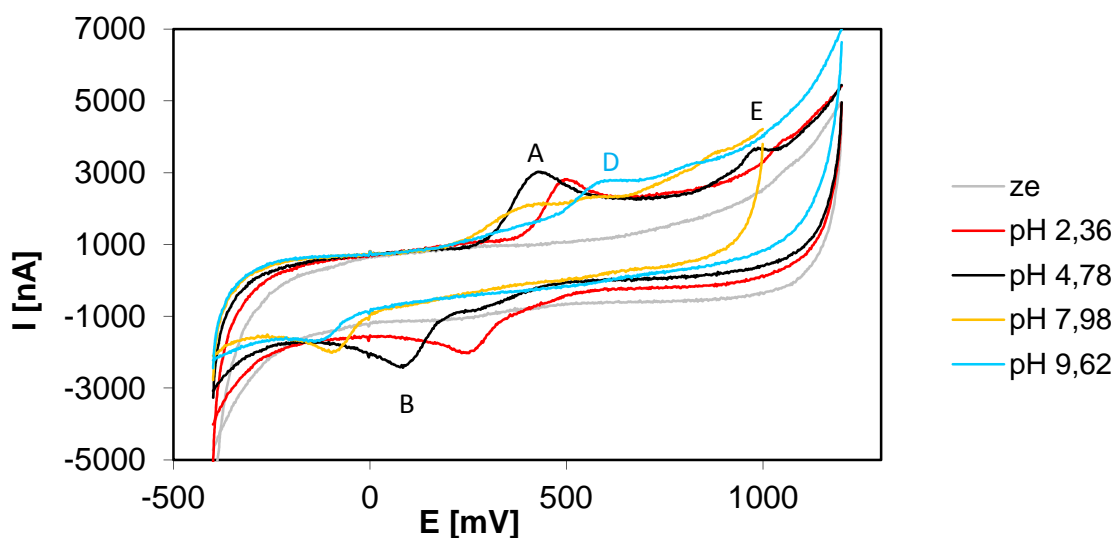


Obr. č. 17 Závislost proudů píků DA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní potenciál -300 mV až 800 mV; 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

6.1.1 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (DOPAC)

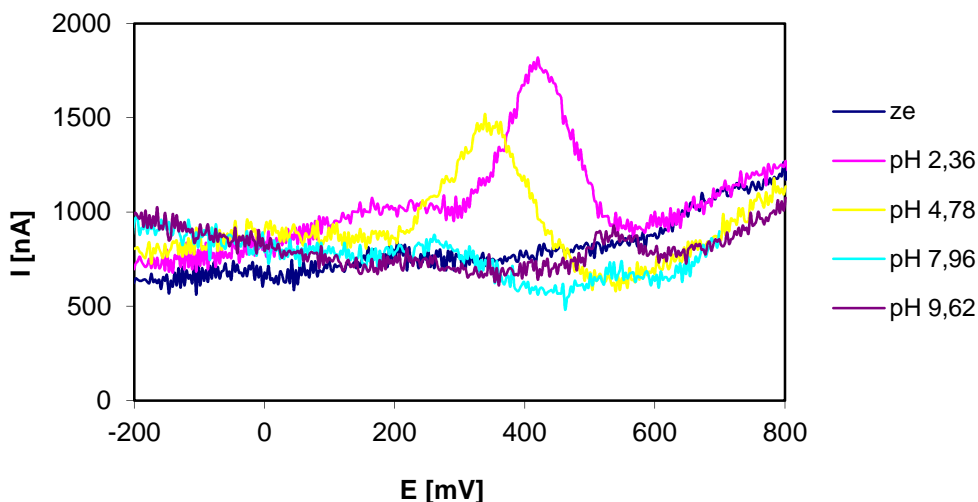
Na cyklickém voltamogramu DOPAC (obr. 18) byl v anodickém směru polarizace pozorován v kyselém a neutrálním prostředí pouze jeden pík (A), který se s rostoucím pH v rozmezí 2 – 7 posouval k nižším hodnotám potenciálů. V zásaditém prostředí se objevil

nový anodický pík (D) při vyšším potenciálu. V oblasti okolo 1000 mV byl na voltamogramech pozorován málo intenzivní pík (E) v celém studovaném rozsahu pH. Tento pík rostl se zvyšujícím se pH a jeho potenciál se posouval k nižším hodnotám. V katodické oblasti byl registrován jediný dobře definovaný pík (B), doprovázený proudovou předvlnou s vyšším potenciálem. S rostoucím pH se potenciál píku B posouval k nižším hodnotám. U vyšších pH se rozdíl potenciálů píků A a B zvětšoval v důsledku rostoucí ireverzibility elektrodového děje.



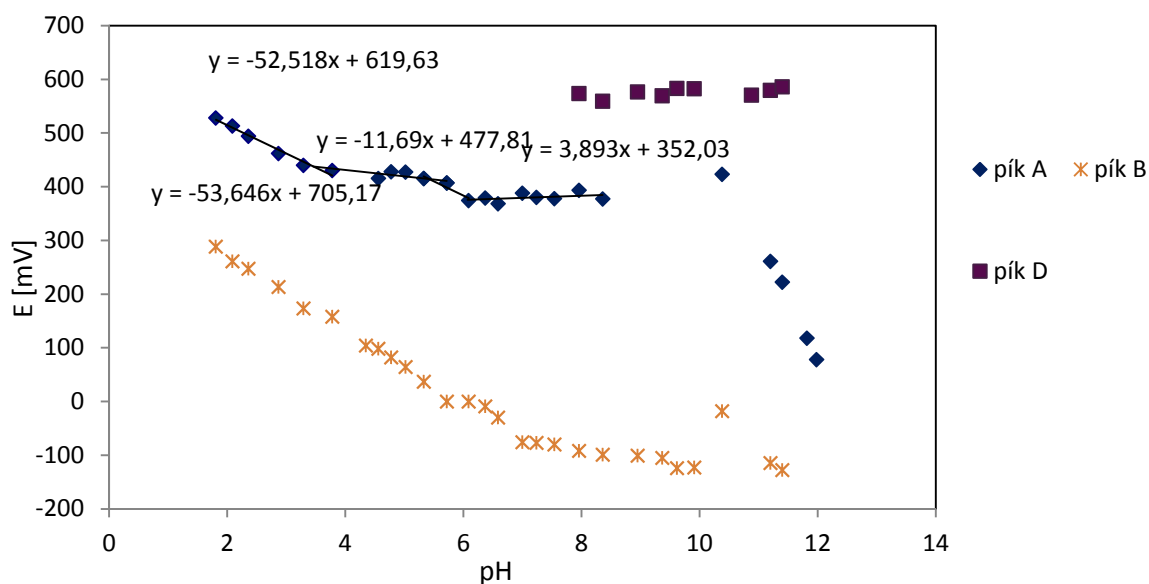
Obr. č. 18 Cyklické voltamogramy DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrách. Rychlost skenu 100 mV/s.

Z diferenčně pulzního votamogramu DOPAC (obr. 19) je patrné, že s rosoucím pH se anodický pík posouval směrem k nižším hodnotám potenciálu a současně klesal. V roztocích o $\text{pH} \geq 8$ byl již velmi málo zřetelný.

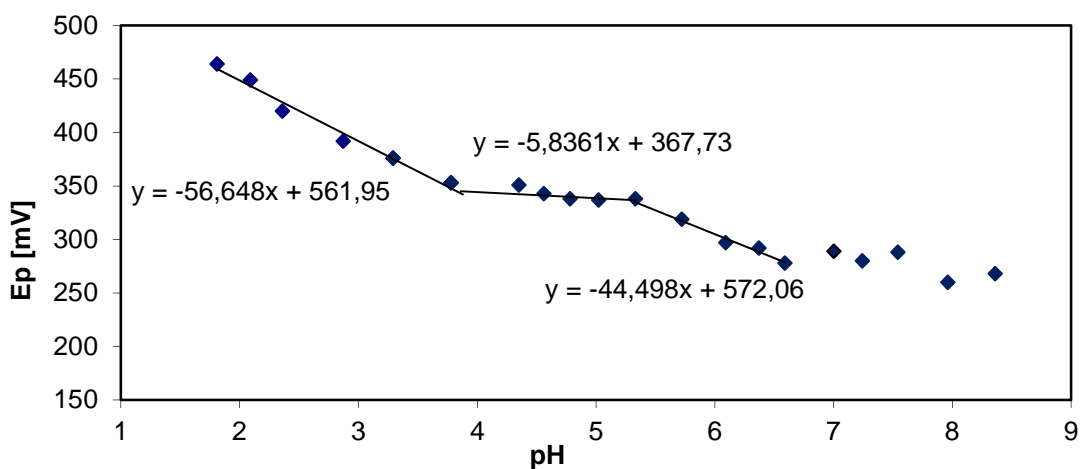


Obr. č. 19 Diferenčně pulzní voltamogramy DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrů. Rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Obr. 20 ukazuje grafickou závislost potenciálů CV-píků DOPAC na pH Britton-Robinsonových pufrů. Potenciál píku A s rostoucím pH lineárně klesal o -53 mV/pH až do pH kolem 3,5, kde byla pozorována změna trendu. V oblasti pH 3,5 – 5,5 klesal potenciál píku pouze nepatrně o -12 mV/pH a v oblasti pH 5,5 – 6,1 klesal opět strměji o -54 mV/pH. Při vyšších pH pufru byl již potenciál píku prakticky konstantní (380 mV). Z popsané závislosti lze usoudit, že v kyselých roztocích do pH 3,5 se DOPAC oxiduje za účasti stejného počtu elektronů a protonů. Změna v trendu zřejmě souvisí s deprotonací DOPAC ($pK_a = 4,2$; cit. ²⁷). Pro anodický DPV pík je průběh závislosti E_p na pH podobný (obr. 21).

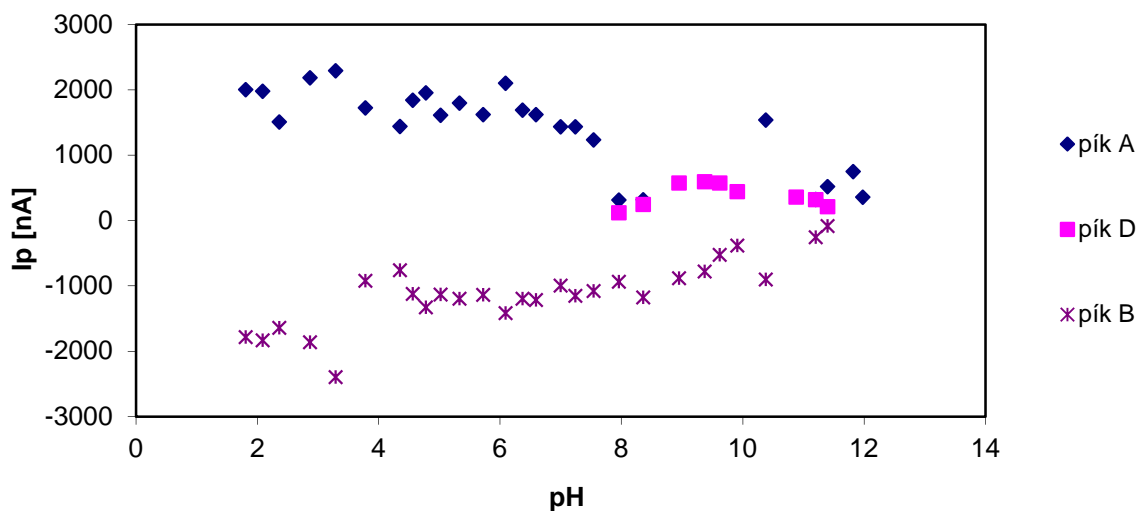


Obr. č. 20 Závislost potenciálů píků DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonově pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost skenu 100 mV/s.

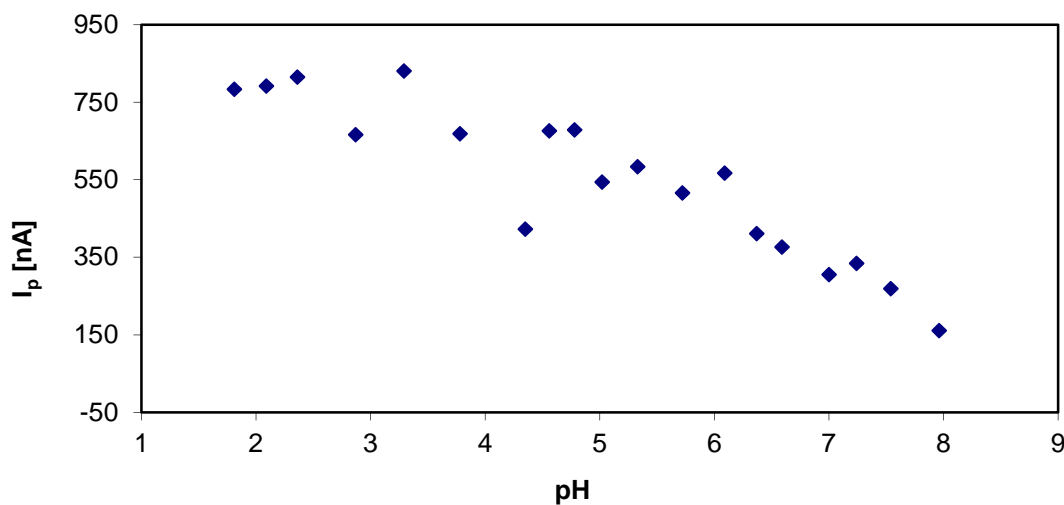


Obr. č. 21 Závislost potenciálů píků DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonově pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní potenciál -200 mV až 800 mV; rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Intenzita proudů CV-píků (A a B) DOPAC s rostoucí hodnotou pH Britton-Robinsonova pufru v anodickém směru polarizace klesá (obr. 22). Intenzita anodického píku D, který se objevuje při $\text{pH} \geq 8$, je nízká a nemění se příliš s hodnotou pH. Klesající trend výšky anodického píky byl zaznamenán také metodou DPV (obr. 23).



Obr. č. 22 Závislost proudů píků DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou CV. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV ; rychlost skenu 100 mV/s .

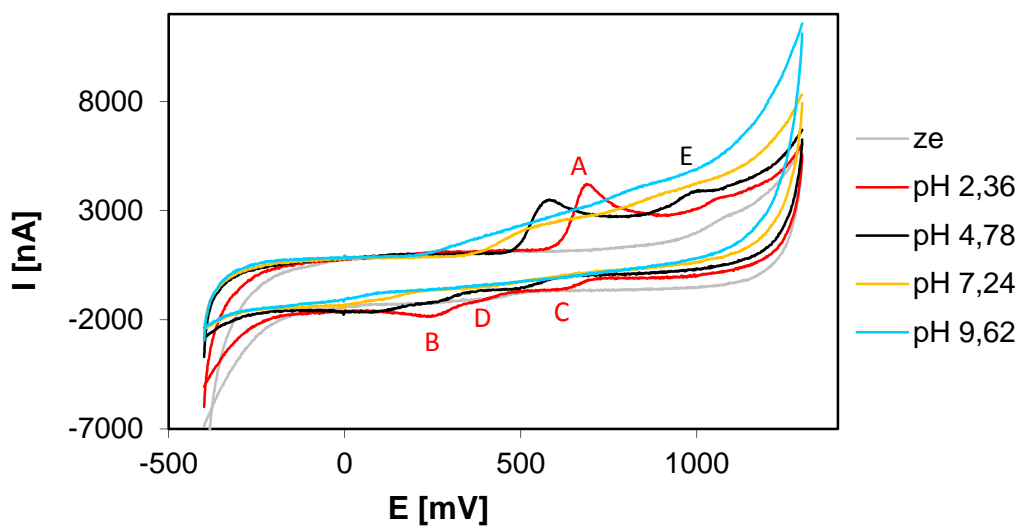


Obr. č. 23 Závislost proudu anodického DPV-píku DOPAC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH měřené metodou DPV. Pracovní rozsah potenciálů -200 mV až 800 mV ; rychlost skenu 20 mV/s ; modulační amplituda 50 mV .

6.1.2 Homovanilová kyselina (HVA)

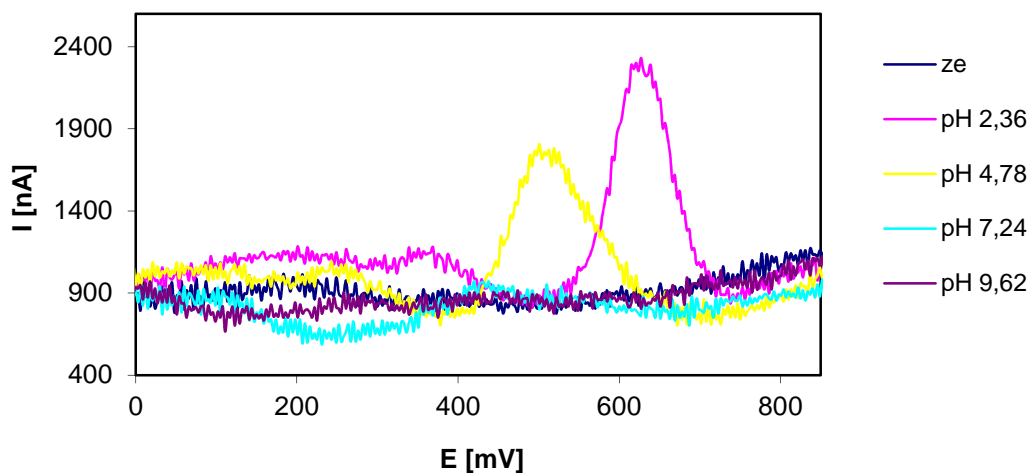
Cyklické voltamogramy HVA jsou velmi podobné voltamogramům 3-MT. V anodickém směru polarizace byly pozorovány dva píky, dobře definovaný pík (A) s nižším

potenciálem a málo intenzivní pík (E) při vyšším potenciálu kolem 1 V (obr. 24). S rostoucím pH se potenciály obou anodických píků posouvaly směrem k nižším hodnotám. V případě píku A se proud s rostoucím pH snižoval až do úplného vymizení v alkalických roztocích. Pík E byl nejvyšší v mírně kyselém pH. V katodickém směru polarizace byly pozorovány dva píky (B a C), přičemž pík B předchází hůře definovaná proudová vlna (D). Potenciály i proudy všech katodických píků s rostoucím pH klesaly.



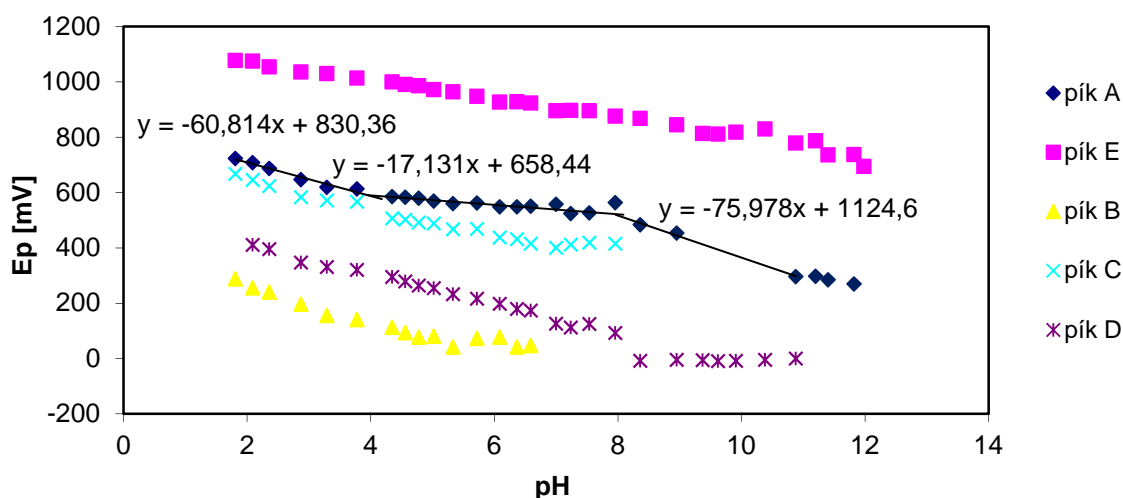
Obr. č. 24 Cyklické voltamogramy HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrch. Rychlost skenu 100 mV/s.

Diferenčně pulzní voltamogramy HVA (obr. 25) zaznamenané v kyselých roztocích ukazují dobře vyvinutý anodický pík doprovázený málo intenzivním píkem při nižším potenciálu. S rostoucím pH proud pozitivnějšího anodického píku klesal, až zmizel úplně.

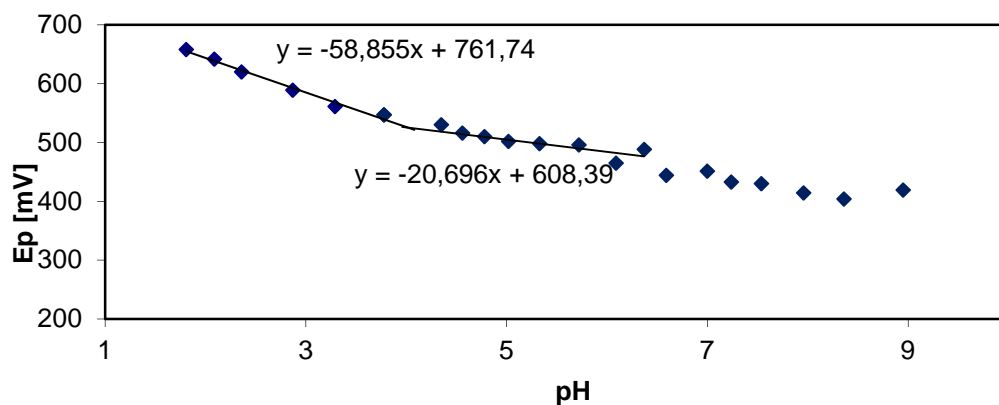


Obr. č. 25 Diferenčně pulzní voltamogramy HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v závislosti na pH v Britton-Robinsonových pufrch. Rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Závislost potenciálů CV-píků HVA (obr. 26) na rostoucí hodnotě pH Britton-Robinsonova pufru má pro všechny píky v anodickém i katodickém směru polarizace klesající charakter. Potenciál píku A klesal o -61 mV/pH v oblasti pH < 4. V tomto prostředí tedy HVA při elektrodové reakci odevzdává stejný počet elektronů jako protonů. Při vyšších hodnotách pH byl pokles potenciálu píku A méně strmý, tedy při oxidaci počet elektronů převyšoval počet protonů. Stejný trend včetně hodnot směrnice ukazuje i závislost potenciálu hlavního anodického DPV-píku na pH (obr. 27). Průsečíky lineárních úseků při pH 3,9 (CV) resp. pH 4,0 (DPV) odpovídají hodnotě $pK_a = 4,3$ uváděné v literatuře³⁸.

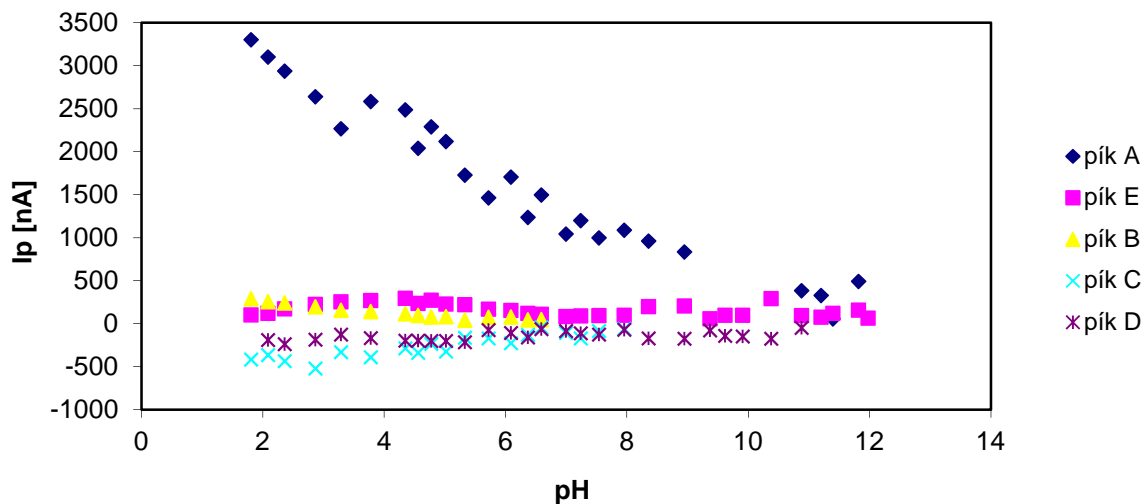


Obr. č. 26 Závislost potenciálů CV-píků HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV; rychlost skenu 100 mV/s.

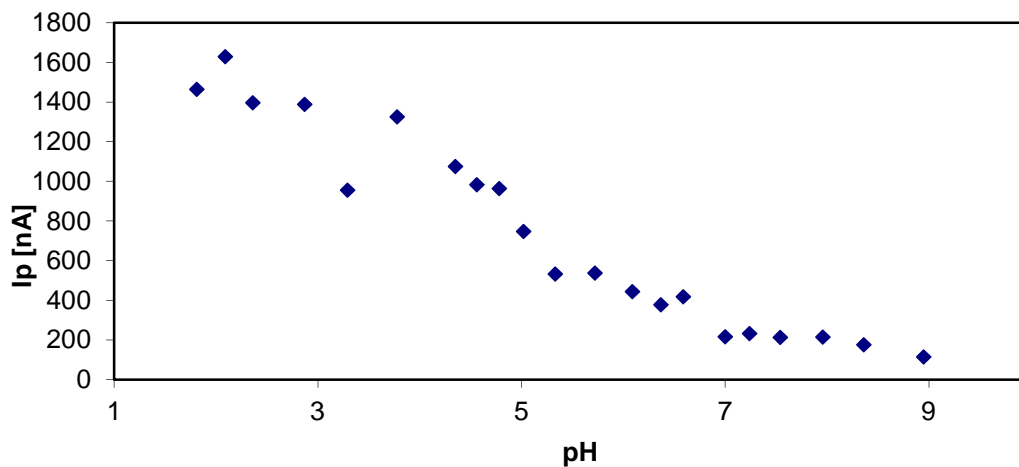


Obr. č. 27 Závislost potenciálu DPV-píku HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH. Pracovní rozsah potenciálů 0 mV až 1000 mV; rychlost skenu 20 mV/s; modulační amplituda 50 mV.

Z grafických závislostí proudů píků na pH naměřených metodami CV (obr. 28) a DPV (obr. 29) je patrné, že největší intenzitu má pík A v kyselém prostředí a s rostoucím pH proud průběžně klesá. Proudů ostatních CV-píků jsou velmi malé a téměř konstantní v celé sledované oblasti pH, proto z hlediska analytického využití nemají zásadní význam.



Obr. č. 28 Závislost proudů CV-píků HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV ; rychlost skenu 100 mV/s .



Obr. č. 29 Závislost proudu DPV-píku HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v Britton-Robinsonovém pufru o různých hodnotách pH. Pracovní potenciál 0 mV až 1000 mV ; rychlost polarizace 20 mV/s ; modulační amplituda 50 mV .

6.2 Optimalizace parametrů metody DPV

Z výsledků studia voltametrického chování 3-MT, DA, DOPAC a HVA v prostředích o různém pH lze usoudit, že pro stanovení 3-MT v přítomnosti dalších tří strukturně

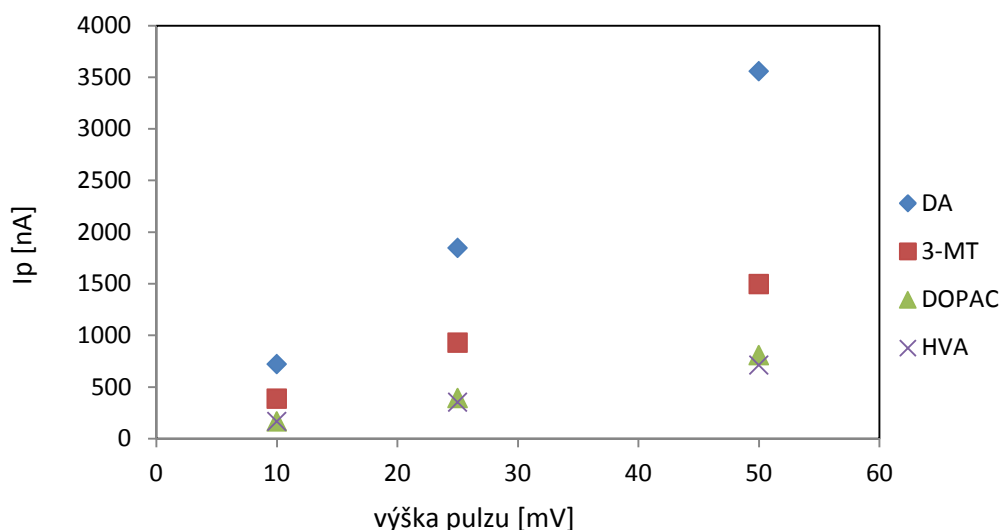
podobných sloučenin bude mít největší význam jejich anodický proudový pík označený jako pík A. Tento pík je nejvíce intenzivní na DP-voltamogramech. Protože DPV je obecně citlivější metoda než CV, byla DPV zvolena jako metoda pro stanovení studovaných látek. V této kapitole jsou popsány výsledky hledání nejvhodnějších parametrů metody DPV. Byla zkoumána závislost potenciálů, proudů a pološířek píků na modulační amplitudě a rychlosti polarizace.

S rostoucí rychlostí polarizace roste i proud píků (při zrychlení z 5 na 20 mV/s nárůst asi o 37 %) pro většinu studovaných látek vyjma DA, jehož proud mírně klesl (při zrychlení z 5 na 20 mV/s pokles o 6 %). Zásadnější vliv na zvýšení proudu píků měla rostoucí modulační amplituda. Zvýšením amplitudy z 10 mV na 50 mV vzrostl proud asi o 400 % pro DA, 300 % pro 3-MT a 340 % pro DOPAC a HVA .

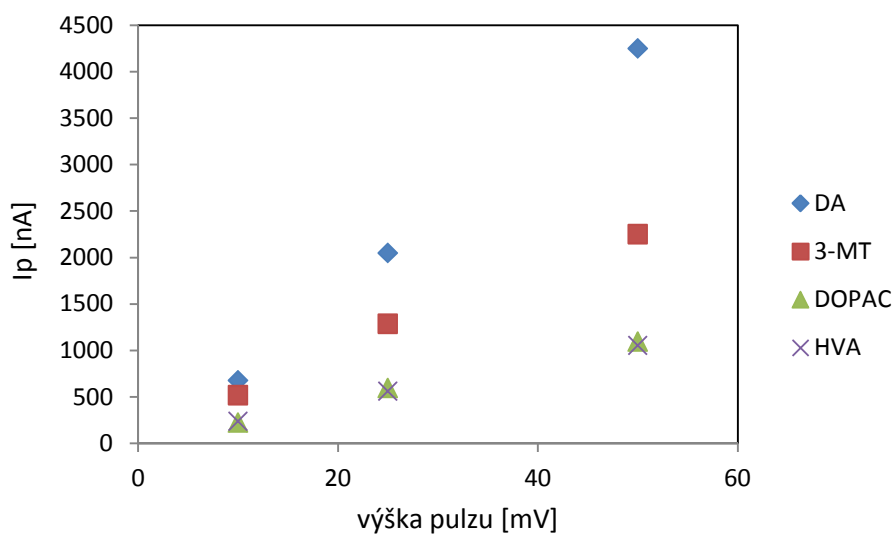
Rychlost polarizace měla pouze nepatrný vliv na změnu potenciálu píků u všech studovaných látek. Největší posun byl zaznamenán u DOPAC (asi o 40 mV do pozitivnějších potenciálů). Změna modulační amplitudy z 10 mV na 50 mV způsobila posun potenciálů píků k nižším hodnotám (pro 3-MT a DA zhruba o 20 mV, pro DOPAC a HVA asi o 10 mV).

Vliv rychlosti polarizace i modulační amplitudy na pološířku píků byl nevyznamný. S rostoucí rychlostí polarizace se pološířkou píků zmenšovala. Při rychlosti 20 mV/s byly tedy získány nejužší píky. S rostoucí modulační amplitudou pološířka píků zůstávala téměř konstantní u všech látek s výjimkou HVA, kde pološířka píků rostla.

Rychlost skenu měla zásadní vliv na proud píků u všech studovaných látek (obr. 30). Pro DA a 3-MT byl nárůst proudu výraznější než pro zbylé dvě látky. Rostoucí modulační amplituda tento vliv ještě podpořila (obr. 31).



Obr. č. 30 Závislost proudu DPV-píků látek DA, 3-MT, DOPAC a HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7 na modulační amplitudě. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV ; rychlost skenu 5 mV/s .



Obr. č. 31 Závislost proudů DPV-píků látek DA, 3-MT, DOPAC a HVA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7 na modulační amplitudě. Pracovní potenciál -400 mV až 1200 mV ; rychlost skenu 20 mV/s .

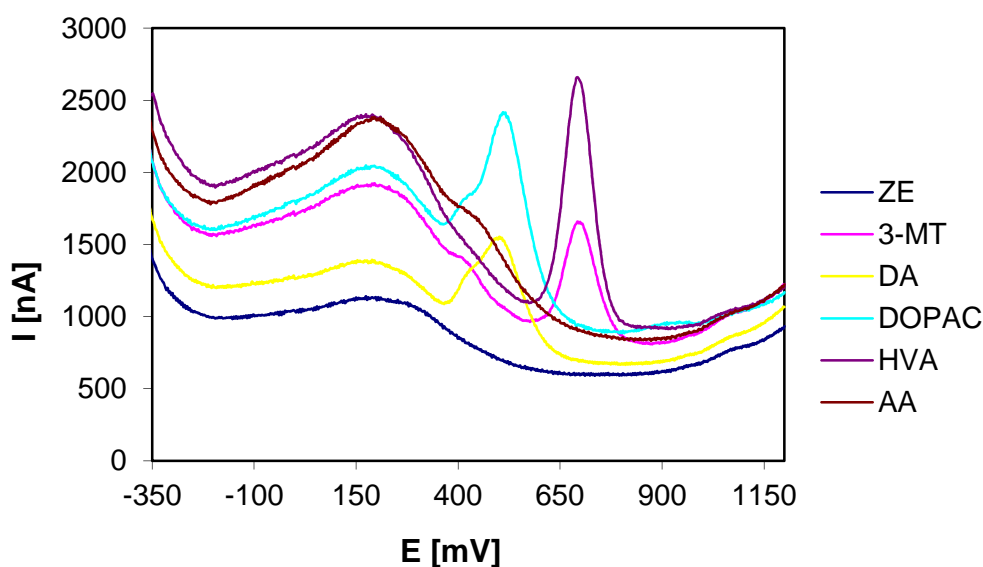
Při porovnání naměřených závislostí byly vybrány jako nejlepší podmínky rychlost 20 mV/s a modulační amplituda 50 mV , protože za těchto podmínek byly zaznamenány nejvyšší proudy píků aniž by se příliš zvětšila pološířka píků.

6.3 Chování látek ve směsi

Další experimenty byly prováděny s cílem najít takové podmínky DPV analýzy, při kterých by bylo možné stanovit selektivně 3-MT a DA v přítomnosti DOPAC, HVA a askorbové kyseliny jako interferentů. Je známo, že askorbová kyselina (AA) se vyskytuje v mozkové tkáni ve vysokých koncentracích a může být významným interferentem při stanovení 3-MT a DA v této matrici.

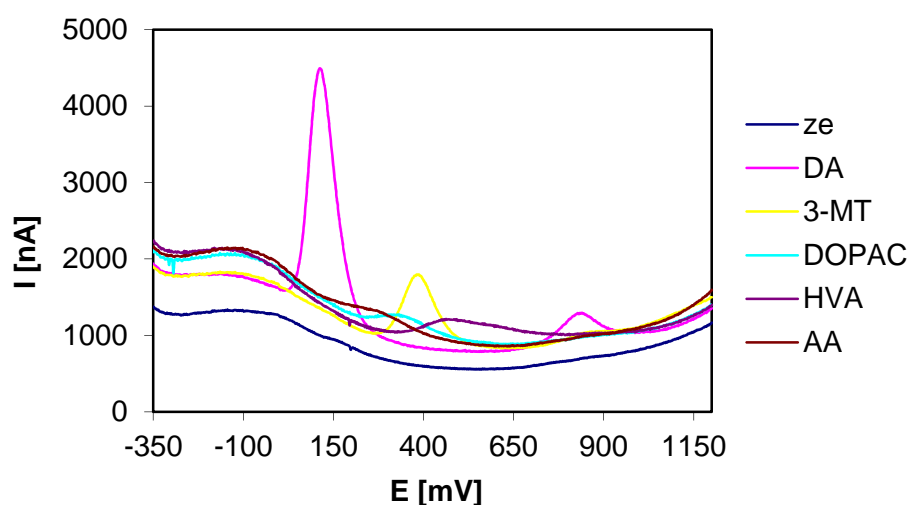
6.3.1 Čistá elektroda ze skelného uhlíku

Nejprve byly porovnávány DP-voltamogramy jednotlivých látek ve stejné koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě ze skelného uhlíku, a to ve fosfátových pufrch (PBS) o pH 2 a pH 7. Jak je vidět na obr. 32, v kyselém roztoku o pH 2 poskytují DA a POPAC píky při stejném potenciálu 500 mV, přičemž pík DOPAC je o více než třetinu vyšší než pík DA. Podobně potenciály píků 3-MT a HVA jsou stejné (680 mV) a výška píku HVA je dvojnásobná proti výšce 3-MT. Askorbová kyselina se projevila málo intenzivním píkem při 430 mV, který je velmi blízko potenciálu píků DA a DOPAC. Z porovnání signálů všech pěti látek vyplývá, že kyselé prostředí o pH 2 není vhodné pro selektivní analýzu DA a 3-MT v přítomnosti DOPAC, HVA a AA.



Obr. č. 32 Diferenčně pulzní voltamogramy DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS pH 2 za použití čisté GC elektrody; rychlost skenu 20 mV/s ; modulační amplituda 50 mV .

V prostředí PBS pH 7 (obr. 33) se signály jednotlivých látek překrývaly méně. Hodnoty proudů píků odpovídajících látkám DA a 3-MT byly vyšší v porovnání s prostředím o pH 2. Pík DA byl větší oproti píkům ostatních látek a jeho potenciál byl posunut do potenciálu okolo 105 mV. Na křivce DA byl pozorován další pík okolo 810 mV. Pík odpovídající 3-MT byl sice větší oproti píkům DOPAC a HVA ve stejné koncentraci, ale jeho potenciál $E_p = 366$ mV nebyl dostatečně vzdálen od potenciálu píku DOPAC (312 mV) a HVA (450 mV), aby došlo k rozlišení píků těchto tří látek v jejich směsi. Navíc by mohla v tomto prostředí interferovat i AA s potenciálem píku 260 mV.

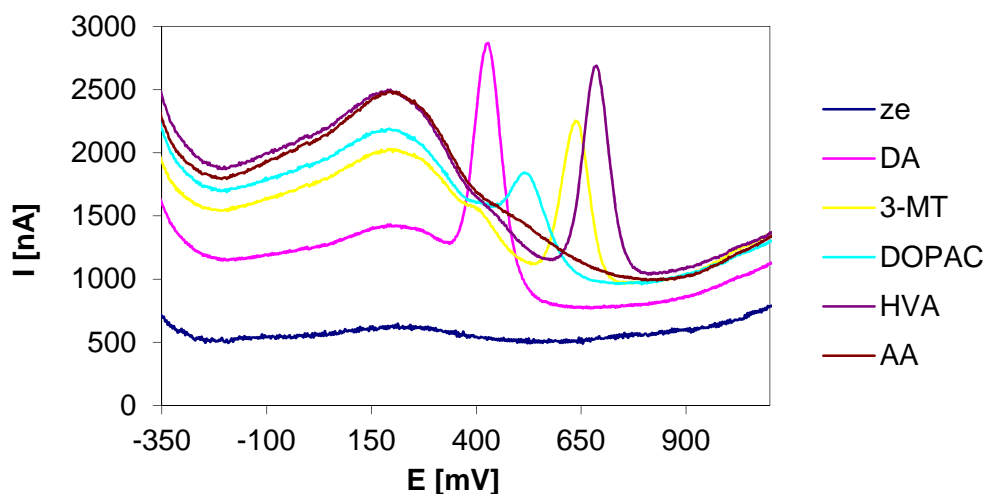


Obr. č. 33 Diferenčně pulzní voltamogramy DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS pH 7 za použití čisté GC elektrody; 20 mV/s .

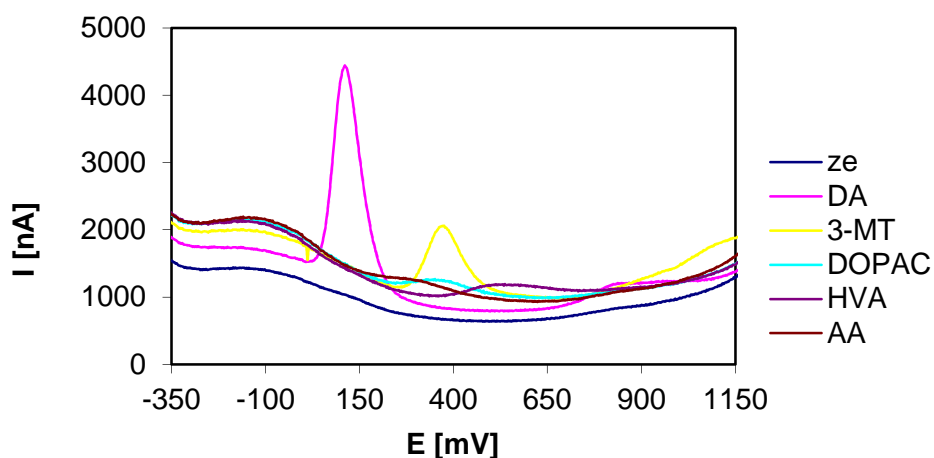
Při měření DPV jsem též zkoušela vliv akumulace DA a 3-MT v koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě ze skelného uhlíku. Porovnávala jsem DP-voltamogramy DA bez a s akumulací 10, 20 až 80 s při 0 mV s následnou polarizací elektrody v rozsahu 0 až 700 mV a podobně i voltamogramy 3-MT bez a s akumulací 10, 20 až 80 s při 200 mV a následnou polarizací od 200 do 800 mV. Ani u jedné z obou látek nebyl pozorován nárůst proudu píku po akumulaci, ačkoliv v literatuře⁵³ je popisována adsorpce katecholaminů na elektrodovém povrchu. Zkoušela jsem také vliv akumulace na proudový signál oxidačních produktů DA a 3-MT, kdy jsem porovnávala voltamogramy bez a s akumulací 90 s při 700 mV (DA) a 800 mV (3-MT) s následnou polarizací k 0 V. Ani v tomto případě nevedla akumulace ke zvýšení proudových odezev příslušných oxidačních produktů.

6.3.2 Elektroda modifikovaná SDS

Pro zvýšení selektivity jsem zkoušela do roztoku studovaných látek přidat dodecylsulfát sodný (SDS) v koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, tedy nižší než je kritická micelární koncentrace SDS ($cmc = 0,0082 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$, cit.²¹). Podobně jako v předchozích experimentech s čistou elektrodou jsem zaznamenala voltamogramy DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA v roztocích PBS o pH 2 a pH 7. Jak ukazuje obr. 34, v přítomnosti SDS v kyselém pufru se proudy píků DA a 3-MT zvýšily a píky interferentů snížily. Potenciály píků DA a 3-MT se posunuly o 53 mV k nižším hodnotám, zatímco potenciály píků DOPAC, HVA a AA zůstaly beze změny. Při pH 7 (obr. 35) byly voltamogramy pořízené v roztocích s SDS velmi podobné voltamogramům roztoků bez surfaktantu na čisté elektrodě (obr. 33), avšak je patrný nárůst intenzity píku 3-MT proti píkům DOPAC, HVA a AA. Z uvedeného pozorování vyplývá, že SDS zesiluje proudovou odezvu katecholaminů patrně v důsledku elektrostatických interakcí mezi záporným nábojem surfaktantu a kladně nabitou aminoskupinou DA a 3-MT. Avšak při delším měření s elektrodou ze skelného uhlíku v prostředí SDS se objevil problém s rostoucím širokým kapacitním proudovým maximem při 170 mV, které značně ztěžovalo hodnocení voltamogramů. Toto proudové maximum způsobila zřejmě adsorpce SDS na hrany disku uhlíkové elektrody, která ji takto trvale modifikovala. Při čištění bylo nutné elektrodu brousit jemným brusným papírem a pak teprve suspenzí aluminu. Přesto se nepodařilo obnovit původní kvalitu povrchu a zbytkový proud elektrody byly trvale vyšší. Navíc SDS kontaminoval stěny nádoby i všech dalších elektrod v článku a bylo nutné vše pracně a zdlouhavě čistit.



Obr. č. 34 Diferenčně pulzní voltamogramy DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS pH 2 v přítomnosti SDS ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); rychlost skenu 20 mV/s ; modulační amplituda 50 mV .



Obr. č. 35 Diferenčně pulzní voltamogramy DA, 3-MT, DOPAC, HVA a AA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS pH 7 v přítomnosti SDS ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); rychlost skenu 20 mV/s ; modulační amplituda 50 mV .

6.3.3 Elektroda modifikovaná nafionem

V dalším pokusu zvýšit selektivitu stanovení 3-MT a DA vedle DOPAC a HVA jsem modifikovala elektrodu ze skelného uhlíku nafionem. Nafion je sulfonovaný polymer na bázi

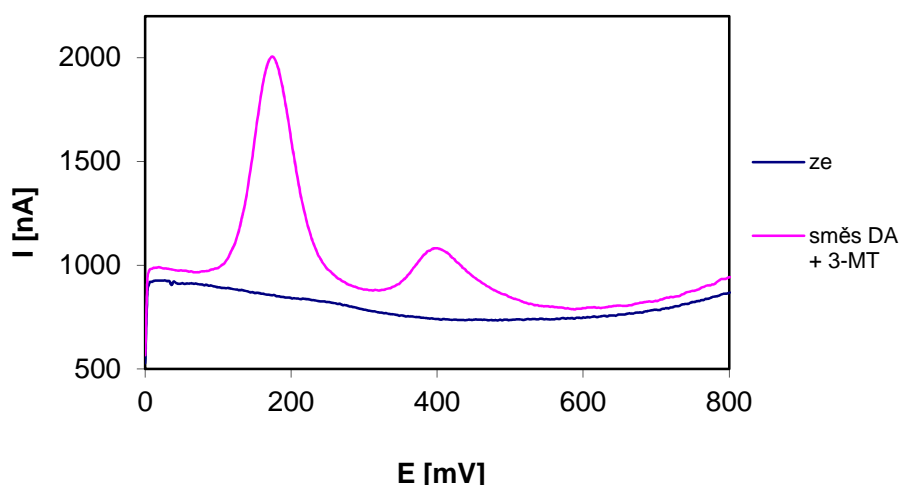
tetrafluoroethylenu s inkorporovanými tetrafluorvinyletherovými skupinami, který má vlastnosti iontoměniče. Má schopnost akumulovat kationty jako je DA (cit. ⁷²) Tato modifikace se ukázala jako nejvhodnější, neboť měla srovnatelný vliv na rozlišení a zesílení proudových píků 3-MT a DA jako přítomnost SDS v roztoku, ale nezpůsobovala problémy s kontaminací elektrochemického článku. Navíc vrstva nafionu se velmi snadno obnovovala a nezpůsobila trvalé poškození elektrody jako SDS.

V tabulce III jsou pro porovnání uvedeny hodnoty potenciálů píků a proudů píků jednotlivých látek o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v roztoku PBS o pH 6,6 a pH 7,4 na čisté a nafionem modifikované elektrodě. Je z nich patrné, že odezva DA a 3-MT je několikanásobně vyšší na nafionové elektrodě než na čisté. Posun potenciálu píků 3-MT o 50 mV k nižším hodnotám na modifikované elektrodě znamená, že pík 3-MT je dostatečně vzdálen od píku HVA (zejména při pH 7,4), která tak nebude při stanovení 3-MT interferovat. Ačkoliv se potenciál 3-MT na modifikované elektrodě přiblížil potenciálu píku DOPAC, proud píku DOPAC odpovídá pouze 6 % proudu píku 3-MT při stejné koncentraci, takže DOPAC nemusí při stanovení 3-MT významně interferovat.

Tab. III Srovnání jednotlivých látek ($c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve fosfátovém pufru o pH 6,5 a 7,4 na čisté a nafionem modifikované elektrodě ze skelného uhlíku.

látka	typ elektrody	pH=6,5		pH=7,4	
		E_p [mV]	I_p [nA]	E_p [mV]	I_p [nA]
DA	s nafionem	174	593	118	459
	čistá	191	160	122	313
3-MT	s nafionem	392	210	344	199
	čistá	343	99	405	102
DOPAC	s nafionem	348	13	326	11
	čistá	356	11	321	11
HVA	s nafionem	462	74	427	39
	čistá	456	79	430	44

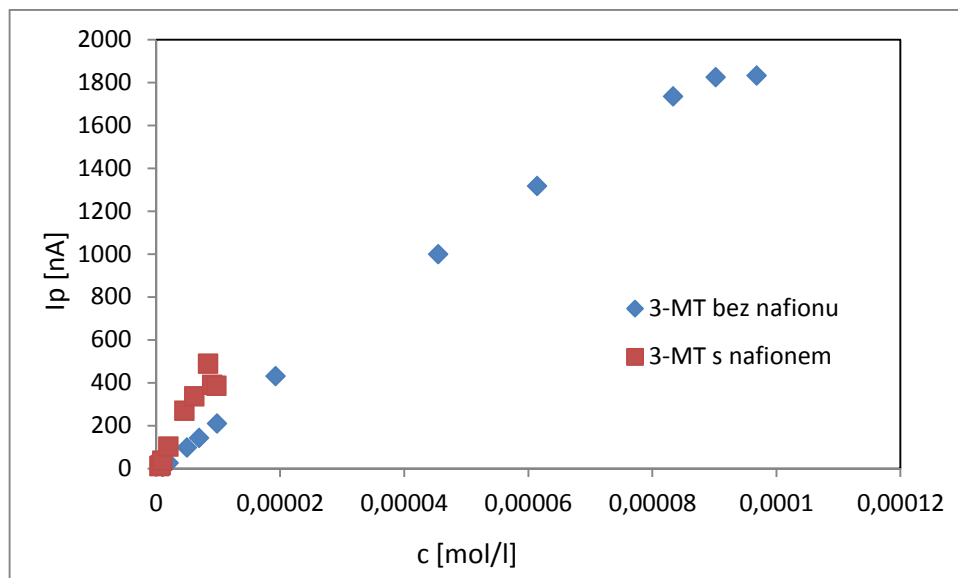
Opakovatelnost měření s nafionem modifikovanou elektrodou byla o něco horší než s čistou elektrodou, avšak relativní směrodatná odchylka proudu píku při osmi opakovaných měřeních téhož roztoku 3-MT o koncentracích $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nepřesáhla 10 %. Pro ilustraci je na obr. 36 ukázán DP-voltamogram 3-MT v dvojnásobném nadbytku DA.



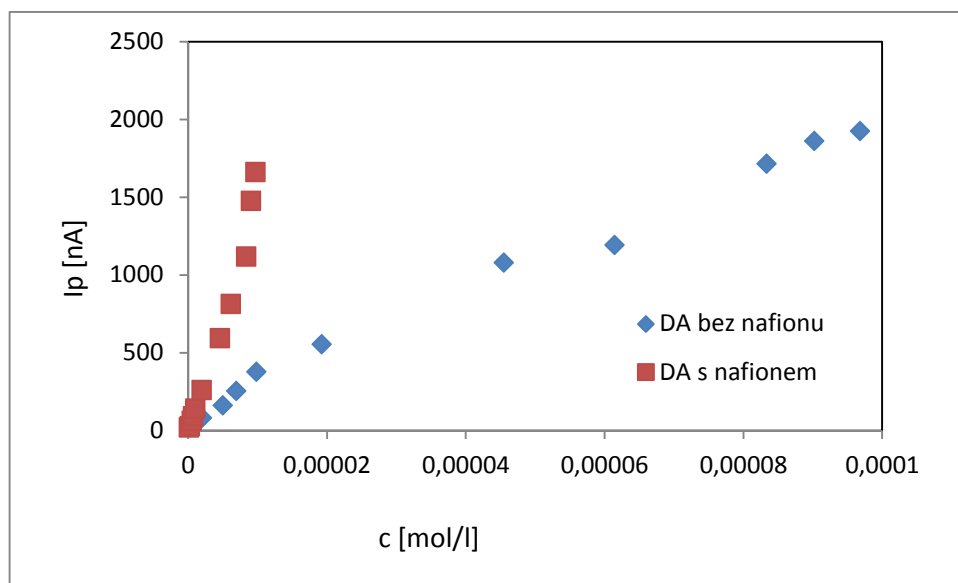
Obr. č. 36 DP-voltamogram směsi DA ($c = 9,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 3-MT ($c = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na nařionem modifikované elektrodě v prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Rychlost skenu 20 mV/s, modulační amplituda 50 mV.

6.4 Kalibrační závislosti

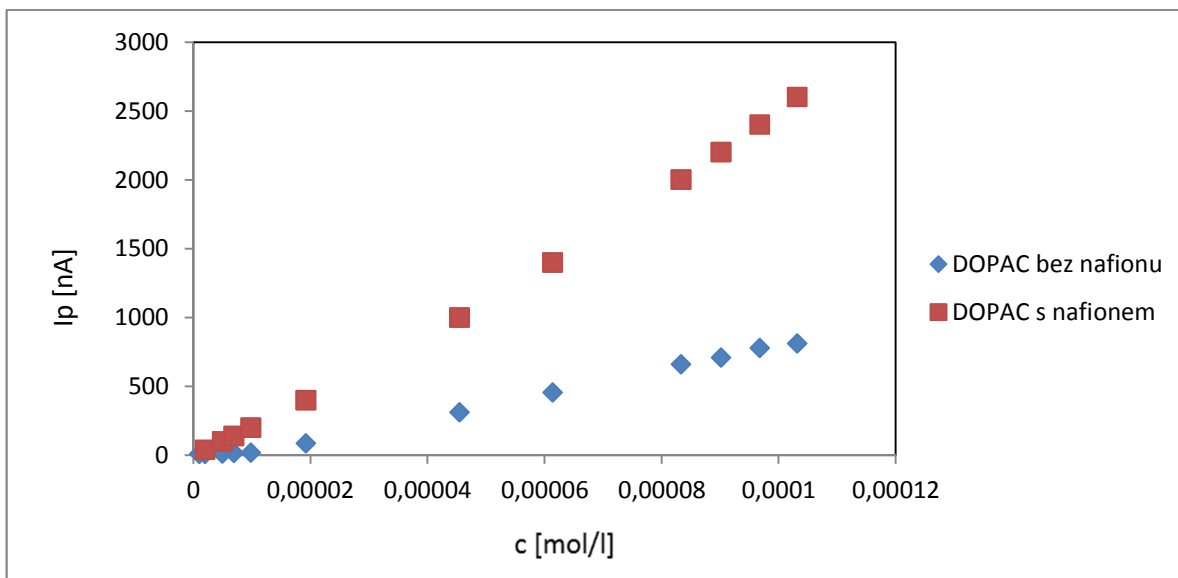
Pro všechny studované látky byly metodou DPV naměřeny kalibrační závislosti v prostředí PBS o pH 6,5 jak na čisté, tak na nařionem modifikované uhlíkové elektrodě. Kalibrační závislosti 3-MT byla lineární v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě a $5 \cdot 10^{-7}$ až $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na modifikované (obr. 37), pro DA $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě a $1 \cdot 10^{-7}$ až $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na modifikované (obr. 38), pro DOPAC $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě a $2 \cdot 10^{-6}$ až $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na modifikované (obr. 39) a pro HVA $2 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na čisté elektrodě a $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na modifikované (obr. 40). Užší lineární rozsah kalibrace u 3-MT a DA s nařionem modifikovanou elektrodou je způsoben adsorpcí aminů na povrchu elektrody, která se projevila zahnutím kalibračních křivek při vyšších koncentracích. Mnohem větší strmost kalibračních přímk 3-MT a DA na modifikované elektrodě v porovnání s nemoifikovanou odráží větší citlivost modifikované elektrody. U HVA byla směrnice kalibrační přímky prakticky stejná na obou elektrodách a u DOPAC byl nárůst směrnice méně výrazný než u DA.



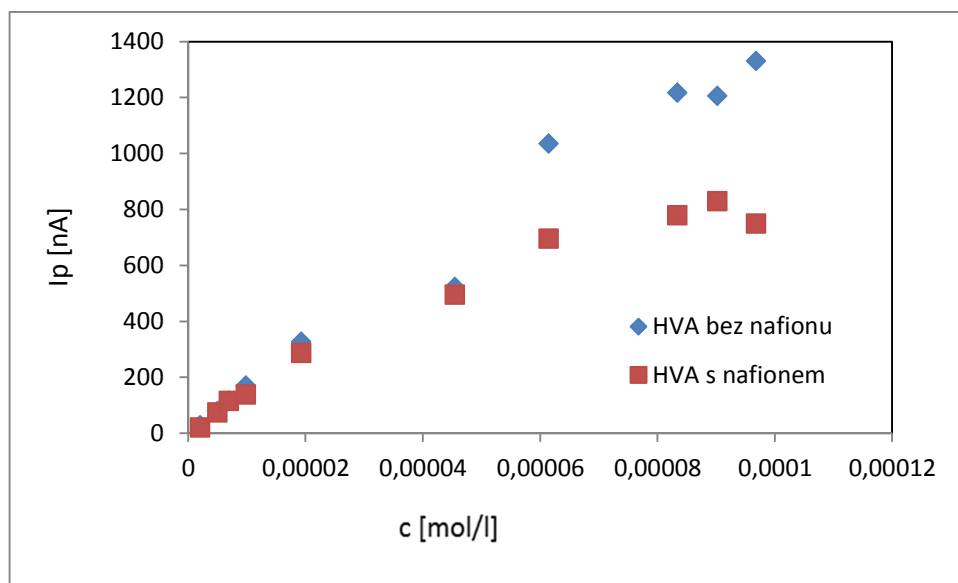
Obr. č. 37 Kalibrační závislost 3-MT na čisté a nafionem modifikované elektrodě měřené v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pH 6,5; metodou DPV.



Obr. č. 38 Kalibrační závislost DA na čisté a nafionem modifikované elektrodě měřené v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pH 6,5; metodou DPV.



Obr. č. 39 Kalibrační závislost DOPAC na čisté a nafionem modifikované elektrodě měřené v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pH 6,5; metodou DPV.



Obr. č. 40 kalibrační závislost HVA na čisté a nafionem modifikované elektrodě měřené v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBS pH 6,5; metodou DPV.

Parametry kalibračních regresních přímek, meze detekce a meze stanovitelnosti vypočítané v programu QC-Expert metodou přímé metody signálu, IUPAC jsou uvedeny v tabulce V. Směrnice kalibračních přímek u nafionem modifikované elektrody byly vyšší u DA a 3-MT a naopak nižší u DOPAC a HVA v porovnání s čistou elektrodou. Z toho

vyplývá, že modifikovaná elektroda je citlivější na katecholaminy a naopak má menší citlivost na potenciální interferenty. Tato vlastnost nafionem modifikované elektrody se odráží i v hodnotách mezí detekce a stanovitelnosti, které jsou nižší u DA a 3-MT a naopak vyšší u DOPAC a HVA v porovnání s nemoifikovanou elektrodou.

Vzhledem k zamýšlenému využití DPV metody pro stanovení 3-MT a DA v mozkové tkáni byly také sledovány kalibrační závislosti 3-MT v přítomnosti nadbytku DA, neboť v reálných vzorcích lze očekávat nadbytek DA, který je prekurzorem 3-MT. Z výsledků uvedených v tabulce IV je vidět, že 3-MT je detegovatelný a může být stanoven ještě v přítomnosti stonásobného nadbytku DA.

Tab. IV Srovnání chování látek v PBS pH 6,5 na čisté uhlíkové elektrodě a na uhlíkové elektrodě pokryté nafionem

	Použitá elektroda	Mez detekce [mol·l ⁻¹]	Mez stanovitelnosti [mol·l ⁻¹]	Odhad absolutního členu [nA]	Odhad směrnice [nA·l·mol ⁻¹]	Korelační koeficient
DA	čistá	2,96·10 ⁻⁶	4,32·10 ⁻⁶	51,062	2,4·10 ⁷	0,977
	s nafionem	1,61·10 ⁻⁷	2,38·10 ⁻⁷	4,659	1,3·10 ⁸	0,997
3-MT	čistá	2,81·10 ⁻⁷	4,18·10 ⁻⁷	-18,932	2,3·10 ⁷	0,999
	s nafionem	5,22·10 ⁻⁷	7,61·10 ⁻⁷	-18,931	5,7·10 ⁷	0,978
3-MT s 10 ⁻⁴ M DA	čistá	8,15·10 ⁻⁷	1,22·10 ⁻⁶	-340	2,05·10 ⁷	0,999
	s nafionem	7,35·10 ⁻⁷	1,06·10 ⁻⁶	-15,445	4,5·10 ⁷	0,991
DOPAC	čistá	7,52·10 ⁻⁶	1,1·10 ⁻⁵	-29,915	8,1·10 ⁶	0,990
	s nafionem	1,37·10 ⁻⁵	1,97·10 ⁻⁵	-31,507	6,4·10 ⁶	0,912
HVA	čistá	2,43·10 ⁻⁶	3,6·10 ⁻⁶	-1,402	1,7·10 ⁷	0,997
	s nafionem	2,62·10 ⁻⁶	3,73·10 ⁻⁶	-2,392	1,5·10 ⁷	0,985

6.5 Aplikace

Použití voltametrické metody ke stanovení 3-MT a DA v tak složité matrici, jakou je mozková tkáň, předpokládá použití vhodné separační techniky k odstranění interferujících vysokomolekulárních látek, jako jsou proteiny, z matrice vzorku a ideálně také zakoncentrování analytu. K tomuto účelu byly testovány dva typy SPE kolonek s katexovou stacionární fází: kolonky s iontoměničovou pryskyřicí AG 50W-X8 a kolonky AccuBOND s benzensulfonovou kyselinou vázanou na povrchu částic oxidu křemičitého.

Testování obou typů kolonek bylo provedeno nejprve s vodným roztokem standardů DA ($c = 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 3-MT ($c = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v objemu 10 ml. V tabulce V jsou uvedeny výsledky ze sledování účinnosti obou typů SPE kolonek. Obsah DA a 3-MT byl kontrolován metodou DPV s nafionem modifikovanou elektrodou jednak v roztoku prošlém

kolonkou při nanášení vzorku, dále v roztocích použitých k promytí kolonky před elucí a nakonec v každém podílu eluční směsi (1 M HCl s 50% ethanolu), která se nanášela na kolonku postupně v objemech 3,5 ml. Eluce DA a 3-MT z kolonky AG 50W-X8 proběhla až po promytí 14 ml eluční směsi. Výtěžnost DA byla okolo 52% a 3-MT pouze 8%. Zbytek nanesených látek se pravděpodobně zadržel na kolonce a nebyl eluován. Kolonka Accu BOND byla pro tuto eluci vhodnější. Oba analyty se začaly eluovat už v prvním podílu eluční směsi, tudíž je zřejmé, že se vyeluovaly v maximálním možném množství. Výtěžnost byla též vyšší, pro DA byla 65 % a pro 3-MT 57 %.

Tab. V Srovnání dvou SPE kolonek AG[®] 50W-X8.Resin a AccuBOND po nanesení standardních roztoků.

	Kolonka AG		Kolonka AccuBOND	
	Obsah DA mmol·l ⁻¹	Obsah 3-MT mmol·l ⁻¹	Obsah DA mmol·l ⁻¹	Obsah 3-MT mmol·l ⁻¹
Nanesení vzorku	-	-	-	-
10 ml H ₂ O	-	-	-	-
pufr	-	-	-	-
10 ml H ₂ O	-	-	-	-
3,5 ml HCl	-	-	4,21·10 ⁻⁵	5,08·10 ⁻⁵
3,5 ml HCl	-	-	2,51·10 ⁻⁵	1,52·10 ⁻⁵
3,5 ml HCl	-	-	-	-
3,5 ml HCl	-	-	-	-
3,5 ml HCl	3,9·10 ⁻⁶	-	-	-
3,5 ml HCl	1,77·10 ⁻⁵	9,44·10 ⁻⁶	-	-
3,5 ml HCl	4,72·10 ⁻⁵	-	-	-

Proces přečištění na SPE kolonce AccuBOND byl použit na přečištění reálného vzorku extraktu mozkové tkáně obohaceného o DA a 3-MT. Následně proběhla detekce látek metodou DPV na nafionem modifikované elektrodě. Nebylo dosaženo uspokojujících výsledků přečištění. Výtěžnost DA byla 1 % a 3-MT 38%, kdy toto množství bylo stanoveno v roztoku, který protekl kolonkou při nanášení vzorku, tj. nezadrželo se na kolonce. V eluátech nebyl DA ani 3-MT detegován. Zbývající množství zůstalo pravděpodobně zadrženo na kolonce spolu s molekulami bílkovin a nepodařilo se je vyeluovat.

7 Závěr

Voltametrické chování dopaminu, 3-methoxytyraminu, 3,4-dihydrofenyloctové kyseliny a kyseliny homovanilové bylo studováno metodami cyklické voltametrie (CV) a diferenčně pulsní voltametrie (DPV) s čistou elektrodou ze skelného uhlíku a modifikovanou SDS nebo filmem nafionu.

Cyklické i diferenčně pulsní voltamogramy všech látek zaznamenané na čisté elektrodě ukazovaly výrazný proudový pík v anodickém směru polarizace, který pravděpodobně odpovídá oxidaci substituovaného benzenového jádra na odpovídající chinon. Tento pík byl s výjimkou HVA výrazný v celém sledovaném aciditním rozsahu pH 2 – 12. U kyseliny HVA nebyl tento pík v alkalickém prostředí dobře definovaný. Na cyklických voltamogramech všech studovaných látek bylo možné pozorovat ještě další proudové píky, jeden anodický a dva až tři katodické v závislosti na pH. Ty zřejmě odpovídaly další oxidaci chinonu (anodický pík) a redukci oxidačních produktů vznikajících na elektrodě (katodické píky).

Diferenčně pulsní voltametrií byly sledován anodický pík, jehož potenciál se posouval k nižším hodnotám s rostoucím pH. Potenciál tohoto „hlavního“ píku ležel u DA a DOPAC ve stejné potenciálové oblasti, a také u 3-MT a HVA měl tento pík téměř stejný potenciál. Kvůli zamýšlené aplikaci metody pro stanovení 3-MT a DA v mozkové tkáni byly hledány podmínky, při kterých by bylo možné selektivně stanovit oba katecholaminy v přítomnosti jejich metabolitů (DOPAC a HVA). Proto byly testovány různé způsoby modifikace elektrody.

Přídavek SDS do měřeného roztoku směsi analytů způsobil posun potenciálů 3-MT a DA k nižším hodnotám a nárůst jejich píků, což vedlo k jejich lepšímu rozlišení od píků DOPAC a HVA, jejichž proudy SDS naopak potlačil. Problém použití SDS spočíval v nárůstu širokého píku kapacitního proudu v blízkosti potenciálů píků analytů a v nevrátne adsorpci na povrch elektrody. Podobný efekt na výšky a potenciály píků měla modifikace elektrody vrstvou nafionu, která neměla výše uvedené nevýhody SDS. Proto byla nafionem modifikovaná elektroda použita pro měření kalibračních závislostí a stanovení 3-MT a DA v reálném vzorku.

Vhodným prostředím pro stanovení 3-MT a DA v přítomnosti DOPAC a HVA byly fosfátové pufrы o pH 6,5 až 7,4. Při těchto pH poskytovaly oba aminy intenzivní píky, kdežto

píky interferentů byly nízké. Dále byly také optimalizovány parametry měření metodou DPV: rychlost polarizace a modulační amplituda. Jako nejlepší byly vybrány rychlost 20 mV/s a modulační amplituda 50 mV, protože za těchto podmínek byly zaznamenány nejvyšší proudy píků aniž by se příliš zvětšila pološířka píků.

Za nalezených vhodných podmínek byly změřeny kalibrační závislosti všech čtyř látek s čistou a nafionem modifikovanou elektrodou. Tyto závislosti byly lineární v rozsahu koncentrací pro 3-MT $1 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ na čisté elektrodě a $5 \cdot 10^{-7}$ až $6 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ na modifikované, pro DA $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ na čisté elektrodě a $1 \cdot 10^{-7}$ až $4 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ na modifikované, pro DOPAC $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ na čisté elektrodě a $2 \cdot 10^{-6}$ až $8 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ na modifikované a pro HVA $2 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ na čisté elektrodě a $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ na modifikované, meze detekce a meze stanovitelnosti byly u DA a 3-MT nižší s modifikovanou elektrodou než s čistou. Byla měřena i 3-MT v nadbytku DA.

Vypracovaná DPV metoda byla použita pro stanovení 3-MT a DA v mozkové tkáni prasete domácího. Pro přečištění vzorku byly testovány dva typy separačních iontoměničových kolonek. Účinnost zjištěná pomocí modelové směsi standardů 3-MT a DA byla poměrně nízká (pro DA 65 % a pro 3-MT 57 %). Analýza vzorků mozkové tkáně obohacené o 3-MT a DA nebyla úspěšná. Při přečištění na kolonce část 3-MT nebyla zadržena. A v eluátech nebyl detegován 3-MT ani DA. Je možné, že analyty zůstaly zadrženy na kolonce spolu s bílkovinou složkou. Při případné aplikaci této metody bude nutné optimalizovat způsob izolace analytů z matrice.

8 Seznam literatury

- 1 Vorel F. a kol: Soudní lékařství. Grada Publishing, první vydání, Praha 1999.
- 2 Sparks D. L., Oeltgen P. R., Kryscio R. J., Hunsaker J. C.: Comparison of Chemical Methods of Determining Postmortem Interval. *J. Forensic Sci.* **34**, 197-206 (1989).
- 3 Miřejovský P., Bednář B.: *Obecná patologie*, str. 16 – 17. Karolinum, druhé vydání, Praha 1997.
- 4 Mačák J.: *Obecná patologie*, str.18 – 19. Univerzita Palackého v Olomouci, první vydání, Olomouc 2002.
- 5 Mačák J., Mačáková J.: *Patologie*, str. 47 – 48. Grada Publishing, a.s., první vydání, Praha 2004.
- 6 Drábek, přednáška mrtvola a pitva.
http://www.dnabased.com/Forezní_chemie/extdoc/11_Pitva_znalec.pdf
- 7 Kubíčková Š.: Studie zkoumání procesů Rigor mortis a Algor mortis. Bakalářská práce, Fakulta aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, 2011.
- 8 Coe J. I: Postmortem Chemistry: Practical Considerations and a Review of the Literature. *J. Forensic Sci*, Vol. 19, No. 1, 13 – 32 (1974).
- 9 Kominato Y., Harada S., Yamazaki K., Misawa S.: Estimation of Postmortem Interval Based on the Third Component of Complement (C3) Cleavage. *J. Forensic Sci.* **33**, 404-409 (1988).
- 10 Vass A. A., Barshick S. A., Sega G., Caton J., Skeen J. T., Love J. C., Systelien J. A.: Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **47**, 542-553 (2002).
- 11 Sparks D. L., Oeltgen P. R., Kryscio R. J., Hunsaker J. C: Comparison of chemical methods for determining the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **34**, 197-206 (1989).
- 12 Muñoz J. I., Suárez-Peñaranda J. M., Otero X. L., Rodríguez-Calvo M. S., Costas E., Miguéns X., Concheiro L.: A New Perspective in the Estimation of Postmortem Interval (PMI) Based on Vitreous [K⁺]. *J. Forensic. Sci.* **46(2)**, 209–214 (2001).

- 13 Garg V., Oberoi S. S., Gorea R. K., Kaur K.: Changes in the Levels of Vitreous Potassium with increasing Time since Death. *JIAFM* **20**(4), 136-139 (2004).
- 14 Ahi R. S., Garg V.: Role of Vitreous Potassium Level In Estimating Postmortem Interval And The Factors Affecting It. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **5**, 13-15 (2011).
- 15 Swann L. M., Forbes S. L., Lewis S. W.: Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: A review. *Anal. Chim. Acta* **682**, 9 – 22 (2010).
- 16 PLATT R.: Místo činu, str. 144. Slovart, první vydání, Praha 2005.
- 17 Carlsson A., Winblad B.: Influence of Age and Time Interval between Death and Autopsy on Dopamine and 3-Methoxytyramine Levels in Human Basal Ganglia. *J. Neur. Transm.* **38**, 271-276 (1976).
- 18 Vaughn D. M., Lindley D. M., Cox N. R., Stimpson S. T., Whitmer W. L.: Analyses of cat retina for dopamine, dihydroxyphenylacetic acid, 3-Methoxytyramine and homovanillic acid. *Vet. Res. Commun.* **13**, 173-181 (1989).
- 19 Sparks D. L., Slevin J. T., Hunsaker J. C.: 3-Methoxytyramine in the Putamen as a Gauge of the Postmortem Interval. *J. Forensic Sci.* **31**, 962-971 (1986).
- 20 Cheng F. C., Kuo J. S., Chang W. H., Juang D. J., Shih Y., Lai J. S.: Rapid and reliable high-performance liquid chromatographic method for analysing human plasma serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. *J. Chromatogr.* **617**, 227-232 (1993).
- 21 Rattanart P., Dungchai W., Siangproh W., Chailapakul O.: Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Anal. Chim. Acta* **744**, 1 – 7 (2012).
- 22 Seidl Z., Obenberger J.: *Neurologie pro studium i praxi*. Grada Publishing, první vydání, Praha 2004.
- 23 Strand A. M., Venton B. J.: Flame Etching Enhances the Sensitivity of Carbon-Fiber Microelektrodes. *Anal. Chem.* **80**, 3708-3715 (2008).

- 24 Gołembiowska K., Dziubina A.: Effect of Adenosine A2A Receptor Antagonists and L-DOPA on Hydroxyl Radical, Glutamate and Dopamine in the Striatum of 6-OHDA-Treated Rats. *Neurotox Res* **21**, 222–230 (2012).
- 25 Shachar D. B., Kahana N., Kampel V., Warshawsky A., Youdim M. B. H.: Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology* **46**, 254–263 (2004).
- 26 Cunha L., Oliveira C. R., Diniz M., Amaral R., Conalves A. F., Pio-Abreu J.: Homovanillic acid in Huntington's disease and Sydenham's chorea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **44**, 258-261 (1981).
- 27 Michalkiewicz S., Skorupa A.: Anodic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid on carbon electrodes in acetic acid solutions. *Bioelectrochemistry* **79**, 57–65 (2010).
- 28 Freitas R. M., Oliveira A. A., Vasconcelos S. M. M., Sousa F. C. F., Viana G. S. B., Fonteles M. M. F.: Expression of muscarinic and dopaminergic receptors and monoamine levels frontal cortex of epileptic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **83**, 302–306 (2006).
- 29 Giros B., Caron M. G.: Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 43 – 49 (1993).
- 30 Pacosová L., Syslová K., Kačer P.: Vývoj metody *in vivo* monitorování neurochemických změn v mozku potkanů. *Chem. Listy* **104**, 38-41 (2010).
- 31 Freitas R. M., Vasconcelos S. M. M., Souza F. C. F., Viana G. S. B., Fonteles M. M. F.: Monoamine levels after pilocarpine-induced status epilepticus in hippocampus and frontal cortex of Wistar rats. *Neurosci. Lett.* **370**, 196–200 (2004).
- 32 Garris P. A., Wightman R. M.: In vivo voltammetric measurement of evoked extracellular dopamine in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *J. Physiol.* **478**, 239-249 (1994).
- 33 Antkiewicz-Michaluk L., Ossowska K., Romanska I., Michaluk J., Vetulani J.: 3-Methoxytyramine, an extraneuronal dopamine metabolite plays a physiological role in brain as an inhibitory regulator of catecholaminergic activity. *Eur. J. Pharmacol.* **599**, 32-35 (2008).

- 34 Alachkar A., Brotchie J. M., Jones O. T.: Binding of dopamine and 3-methoxytyramine as L-DOPA metabolites to human α_2 -adrenergic and dopaminergic receptors. *Neuroscience Res.* **67**, 245–249 (2010).
- 35 Najmanová V., Rambousek L., Syslová K., Bubeníková V., Šlamberová R., Valeš K., Kačer P.: LC-ESI-MS-MS Method for Monitoring Dopamine, Serotonine and Their Metabolites in Brain Tissue. *Chromatographia* **73**, 143-S149 (2010).
- 36 Syslová K., Rambousek L., Kuzma M., Najmanová V., Bubeníková-Valešová V., Šlamberová R., Kačer P.: Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3382-3391 (2011).
- 37 Horváth C., Melander W., Molnár I.: Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. *Anal. Chem.* **49**, 142-154 (1977).
- 38 Fernandes S. C., Vieira I. C., Peralta R. A., Neves A.: Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. *Electrochim. Acta* **55**, 7152-7157 (2010).
- 39 Gh A. B.: Thermodynamic studies on complexation of dopamine with gadolinium(III) in water–ethanol systém. *J. Mol. Liq.* **156**, 141–145 (2010).
- 40 Tsunoda M., Aoyama Ch., Nomura H., Toyoda T., Matsuki N., Funatsu T.: Simultaneous determination of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in mouse striatum using mixed-mode reversed-phase and cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 712–715 (2010).
- 41 Kehr W.: A Method for the Isolation and Determination of 3-Methoxytyramine in Brain Tissue. *Nannyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **284**, 149 – 158 (1974).
- 42 Ulrychová M., Vávrová J., Palička V.: Stanovení metanefrinů v plazmě a moči metodou HPLC-ED. *Klin. Biochem. Metab.* **15**, 218-221 (2007).
- 43 Carlsson A., Lindqvist M., Kehr W.: Postmortal Accumulation of 3-Methoxytyramine in Brain. *Nannyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **284**, 365 – 372 (1974).

- 44 Chrapusta S. J., Egan M. F., Masserano J. M., Wyatt R. J.: Dopamine release in the rat cerebellum and hippocampus: a tissue 3-methoxytyramine study. *Brain Res.* **655**, 271-275 (1994).
- 45 Hawley M. D., Tatanawawadi S. V., Piekarski S., Adams R. N.: Electrochemical Studies of the Oxidation Pathways of Catecholamines. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 447–450 (1967).
- 46 DuVall S. H., McCreery R. L.: Control of Catechol and Hydroquinone Electron-Transfer Kinetics on Native and Modified Glassy Carbon Electrodes. *Anal. Chem.* **71**, 4594-4602 (1999).
- 47 Huang D. CH., Chen Ch., Wu Y. M., Zhang H., Sheng L. Q., Xu H. J., Liu Z. D.: The Determination of Dopamine Using Glassy Carbon Electrode Pretreated by a Simple Electrochemical Method. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**, 5510-5520 (2012).
- 48 Kuwana T.: Analytical Electrochemistry: A Laboratory Manual. 4. The Cyclic Voltammetry of Dopamine: an *ec* mechanism. Analytical Sciences Digital Library (ASDL), <http://www.asdlib.org/> (staženo 20. 4. 2013)
- 49 Valentini F., Amine A., Orlanducci S., Terranova M. L., Paleschi G.: Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes. *Anal. Chem.* **75**, 5413-5421 (2003).
- 50 Zhou Q., Shao M., Chen T., Xu H.: Strontium vanadate nanoribbons: Synthesis, characterization and detection of dopamine. *Mater. Res. Bull.* **45**, 1051–1055 (2010).
- 51 Chen T. K., Lau Y. Y., Wong D. K., Ewing A. G.: Pulse Voltammetry in Single Cells Using Platinum Microelectrodes. *Anal. Chem.* **64**, 1264-1268 (1992).
- 52 Deakin M. R., Kovach P. M., Stutts K. J., Wightman R. M.: Heterogeneous Mechanisms of the Oxidation of Catechols and Ascorbic Acid at Carbon Electrodes. *Anal. Chem.* **58**, 1474-1480 (1986).
- 53 Xu G., Iwasaki Y.: Selective Electrochemical Response of Dopamine against 3,4-dihydroxyphenylacetic Acid at Bare Indium-Tin Oxide Electrode. *Chem. Lett.* **34**, 1120-1121 (2005).

- 54 Zare H. R., Namazian M., Coote M. L.: Experimental and theoretical studies of electrochemical characteristics of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). *Electrochim. Acta* **54**, 5353–5357 (2009).
- 55 Wang J., Li M., Shi Z., Li N., Gu Z.: Electrocatalytic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. *Electrochim. Acta* **47**, 651 – 657 (2001).
- 56 Huang R., Guo L.: Lack of nano size effect on electrochemistry of dopamine at a gold nanoparticle modified indium tin oxide electrode. *Sci. China Chem.* **53**, 1778–1783 (2010).
- 57 Ugo P., Moretto L. M., Rudello D., Birriel E., Chevalet J.: Trace Iron Determination by Cyclic and Multiple Square-Wave Voltammetry at Nafion Coated Electrodes. Application to Pore-Water Analysis. *Electroanalysis* **13**, 661-668 (2001).
- 58 Bath B. D., Martin H. B., Wightman R. M., Anderson M. R.: Dopamine Adsorption at Surface Modified Carbon-Fiber Electrodes. *Langmuir* **17**, 7032-7039 (2001).
- 59 Gonon F. G., Fombarlet C. M., Buda M. J., Pujol J. F.: Electrochemical Treatment of Pyrolytic Carbon Fiber Electrodes. *Anal. Chem.* **53**, 1386-1389 (1981).
- 60 Zhang M., Yu P., Mao L.: Rational Design of Surface/Interface Chemistry for Quantitative in Vivo Monitoring of Brain Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **45**, 533–543 (2012).
- 61 Crespi F., Martin K. F., Heal D. J., Marsden C. A., Buckett W. R., Sanghera M. K.: Measurement of 3-methoxytyramine by in vivo voltammetry: evidence for differences in central dopamine function in BULB/c and CBA mice. *Brain Res.* **500**, 241-246 (1989).
- 62 Raj M. A., Revin S. B., John S. A.: Selective determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the presence of ascorbic acid using 4-(dimethylamino)pyridine capped gold nanoparticles immobilized on gold electrode. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **87**, 353–360 (2011).
- 63 Liu A., Honma I., Zhou H.: Amperometric biosensor based on tyrosinase-conjugated polysaccharide hybrid film: Selective determination of nanomolar neurotransmitters

- metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in biological fluid. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 809–816 (2005).
- 64 Liu A., Honma I., Zhou H.: Electrochemical biosensor based on protein–polysaccharide hybrid for selective detection of nanomolar dopamine metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). *Electrochem. Commun.* **7**, 233–236 (2005).
- 65 Yokoo H., Kojima H., Yamada S., Tsutsumi T., Anno N., Anraku S., Nishi S., Inanaga K.: Simultaneous Determination of Dopamine, Serotonin, 3,4-dihydroxyphenylacetic Acid, Homovanillic Acid, 3-methoxytyramine and 5-hydroxyindole-3-Acetic Acid by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Kurume Med. J.* **32**, 75-80 (1985).
- 66 Yeung P. K. F., Buckley S. J., Pedder S. C. J., Dingemans J.: Determination of 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Human Plasma by a Simple and Rapid High-Performance Liquid Chromatography Assay. *J. Pharm. Sci.* **85**, 451-453 (1996).
- 67 Tsunoda M., Mitsuhashi K., Masuda M., Imai K.: Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid using high performance liquid chromatography–fluorescence detection and application to rat kidney microdialysate. *Anal. Biochem.* **307**, 153-158 (2002).
- 68 Heien M. L. A. V., Johnson M. A., Wightman R. M.: Resolving Neurotransmitters Detected by Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Anal. Chem.* **76**, 5697-5704 (2004).
- 69 Wynne P. M., Vine J. H., Amiet R.G.: 3-Methoxytyramine as an indicator of dopaminergic manipulation in the equine athlete. *J. Chrom. B.* **811**, 93-101 (2004).
- 70 Cvačka J., Quaiserová V., Park J., Show Y., Muck A., Swain G. M.: Boron-Doped Diamond Microelectrodes for Use in Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Anal. Chem.* **75**, 2678-2687 (2003).
- 71 Magera M. J., Stoor A. L., Helgeson J. K., Matern D., Rinaldo P.: Determination of homovanillic acid in urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **306**, 35–41 (2001).

- 72 Cserey A., Gratzl M.: Stationary-State Oxidized Platinum Microsensor for Selective and On-Line Monitoring of Nitric Oxide in Biological Preparations. *Anal. Chem.* **73**, 3965-3974 (2001).