UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

MOŽNOSTI VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH DETEKČNÍCH SYSTÉMŮ V SEPARAČNÍCH TECHNIKÁCH

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: Zdenka Bartošová
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2015

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne ....

....

Mgr. Zdenka Bartošová

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph. D. za odborné vedení a doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph. D. za cenné konzultace a spolupráci při publikování výsledků, které vedly k vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu, a také všem ostatním, kteří jakýmkoli způsobem přispěli k dokončení této práce.

Abstract

The analytical usability and applicability of various electrochemical detection (ECD) systems combined with high-performance liquid chromatography (HPLC) is discussed in the present doctoral thesis.

The investigation of specific electrochemical characteristic (broad potential window, inertness) of *boron doped diamond* (BDD) and its analytical utilization, as a non-traditional electrode material in HPLC, is covered in the first section of the thesis. A HPLC-ECD method for the determination of PDE5 inhibitors (Viagra™, Levitra™) and their main N-dealkylated metabolites, based on BDD as a working electrode, is described. A working potential of +1520 mV (*vs.* Pd/H_2) was used for a sensitive one-run detection of the baseline separated drugs including internal standard in the human plasma. The method developed is fast (12 minutes), isocratic, highly sensitive (LODs in the ng ml^{-1} range), and only minute plasma volume (150 μl) is required. The used thin-layer BDD electrode proved to be of great significance for sensitive amperometric detection of not easily oxidizable analytes, such as the aforementioned piperazine derivatives.

Carbon fiber microelectrodes (CFME) exhibit some unique analytical properties, compared to their conventional sized counterparts. The excellent sensing characteristics of cylindrical microelectrodes and resolving power of HPLC are the key features for the promising HPLC-ECD hyphenation, as demonstrated by four different application examples in the second section.

A model mixture of common phenolic acids (gallic, protocatechuic, gentisic, 4-hydroxybenzoic and caffeic acid) was separated to test the sensing capabilities of the CFME as an amperometric detector in HPLC. Even for trace concentrations of phenolic acids, excellent signal stability and signal-to-noise ratio was observed.

Brominated phenols (BP), extensively used as flame retardants - e.g. 3,3′,5,5′-tetrabromo-bisphenol A (TBBA) - are considered to be neurotoxic, persistent and bioaccumulative. Amperometric CFME-based detector in a liquid-chromatographic arrangement was used for the determination of 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol and TBBA. For the simultaneous detection of BP, working potential of +1450 mV (*vs.* Ag/AgCl) was chosen. The calculated limits of detection (LOD) for the studied analytes were within the range of 1,8–56,6 ng ml^{-1}. The method was applied to determination of BP in spiked water, and of TBBA in a CRT monitor plastic casing.

The presence of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in blood plasma is considered an important marker of oxidative stress and DNA damage. Elevated levels of 8-oxodGuo were found

in the urine and lung tissues of smokers as well as in body fluids and DNA of patients with serious disorders. Unfortunately, plasma concentrations of 8-oxodG cannot often be reliably distinguished as they lie below quantification limits of many analytical methods. ECD belongs to the most sensitive assays of 8-oxodG currently available. The electrochemical detector based on CFME was successfully tested on the standard solution of 8-oxodG at physiological concentration as well as on a plasma sample of a cancer patient. The achieved results indicate that the technique is capable of routine monitoring of 8-oxodG in blood plasma.

Surface CFME modifications (resulting in altered analytical selectivity) represent certainly a very promising research area. Some analytical aspects regarding copper-coated CFME (Cu-CFME) are briefly discussed. Cu-CFME, prepared and processed adequately, was successfully applied to direct-current amperometric determination of selected disaccharides, prior their liquid-chromatographic separation.

1 **ÚVOD** 1

2 **CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE** 2

3 **TEORETICKÁ ČÁST** 3

3.1 ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE V SEPARAČNÍCH TECHNIKÁCH – VYBRANÉ KAPITOLY 3

3.1.1 Základní principy. Elektrochemická aktivita látek 3

3.1.2 Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii (HPLC-ECD) 5

3.2 UHLÍKOVÉ MIKROELEKTRODY 8

3.2.1 Vlastnosti mikroelektrod 8

3.2.2 Uhlíkové cylindrické mikroelektrody v kapalinové chromatografii 9

3.3 DIAMANTOVÉ ELEKTRODY 12

3.3.1 Základní charakteristika BDD 12

3.3.2 Využití BDD elektrod v separačních technikách 15

3.3.3 Diamantové mikroelektrody. BDD elektrody v kapilární elektroforéze a mikrokolonových technikách 17

4 **ANALÝZA INHIBITORŮ PDE5 A JEJICH METABOLITŮ [8]** 20

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 20

4.1.1 Chemikálie a přístrojové vybavení 20

4.1.1.1 Chemikálie 20

4.1.1.2 Přístroje a software 20

4.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky 21

4.1.2.1 Roztoky standardů 21

4.1.2.2 Mobilní fáze 21

4.1.2.3 Úprava vzorku 21

4.1.2.4 Chromatografické podmínky 22

4.1.2.5 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody 22

4.2 VÝSLEDKY A DISKUZE 23

5 **MIKROELEKTRODY Z UHLÍKOVÉHO VLÁKNA V HPLC** 32

5.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 32

5.1.1 Chemikálie a přístrojové vybavení 32

5.1.1.1 Chemikálie 32

5.1.1.2 Přístrojové vybavení 33

5.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky 33

5.1.2.1 Úprava uhlíkových mikroelektrod 33
5.1.2.2 Roztoky standardů 34
5.1.2.3 Mobilní fáze 34
5.1.2.4 Chromatografické podmínky 35
5.1.2.5 Úprava vzorků 36
5.1.2.6 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody 37
5.2 VÝSLEDKY A DISKUZE 38
5.2.1 Analýza fenolických kyselin [9] 39
5.2.2 Analýza bromovaných fenolů [36] 42
5.2.3 Aplikace CFME při HPLC analýze markeru oxidativního poškození DNA 48
5.2.4 Využití CFME modifikovaných vrstvou mědi pro amperometrickou detekci sacharidů [37] 52
6 ZÁVĚR 56
7 SEZNAM ZKRATEK 58
8 LITERATURA 59

1 ÚVOD

Je známo, že elektrochemická aktivita látek v řadě případů souvisí s biologickou aktivitou, což je dáno přítomností určitých funkčních skupin v jejich struktuře, a také mechanismem přenosu elektrického náboje v živých organismech. Je logické, že elektrochemie při vývoji analytických metod nebo při studiu těchto látek zastává důležitou úlohu.

Od svých počátků v sedmdesátých letech dvacátého století se kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) postupně vyvinula ve spolehlivou a všestrannou techniku, která díky své vysoké citlivosti a selektivitě nalezla uplatnění v celé řadě oblastí, ať už při analýze potravin, nebo při kontrole kvality životního prostředí či ve farmakologické nebo klinické analýze.

Předložená disertační práce je zaměřena na dvě specializované oblasti amperometrické detekce v HPLC. První část se zabývá využitím borem dopované diamantové elektrody a jejími výhodami při analýze obtížně oxidovatelných látek - inhibitorů fosfodiesterázy 5 včetně jejich aktivních metabolitů v krevní plasmě.

Druhá část práce se zaměřuje na mikroelektrody z uhlíkových vláken (CFME) a jejich uplatnění v průtokové separační analýze. Mikroelektrody se vyznačují vysokou citlivostí v důsledku účinnějšího převodu hmoty k povrchu elektrody a mimo to jsou výborně kompatibilní s mikrokolonovými technikami. Přesto je jejich využití v praxi zatím ojedinělé, což je pravděpodobně způsobeno především jejich komerční nedostupností. Výsledky prezentované v této práci demonstrují výhody detekčního systému na bázi CFME na příkladech analýzy modelové směsi fenolických kyselin, dále při analýze environmentálních polutantů (bromovaných fenolů) a při citlivé detekci markeru oxidativního poškození DNA v krevní plasmě. Závěr práce pak dokumentuje možnost cílené změny selektivity mikroelektrody modifikací jejího povrchu na příkladu CFME pokryté nanostrukturovanou vrstvou mědi, vhodné pro přímou elektrochemickou detekci sacharidů.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce se zaměřuje na dvě hlavní témata z oblasti elektrochemické detekce v kapalinové chromatografii:

1) *Využití borem dopované diamantové elektrody v HPLC*
   - vývoj metody vhodné k analýze elektroaktivních ihnibitorů fosfodiesterázy 5 v krevní plasmě
2) *Možnosti využití uhlíkových cylindrických mikroelektrod jako vysoce citlivých detekčních sensorů v HPLC*
   - testování základních analytických parametrů amperometrického detektoru na bázi CFME při analýze fenolických kyselin
   - vývoj metody vhodné pro stanovení nízkých koncentrací environmentálních polutantů ze skupiny bromovaných fenolů
   - uplatnění CFME v klinické praxi – HPLC-ECD analýza markeru oxidativního poškození DNA v krevní plasmě
   - přímá amperometrická detekce sacharidů: aplikace uhlíkových cylindrických mikroelektrod modifikovaných nanostrukturovanou vrstvou mědi

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Elektrochemická detekce v separačních technikách – vybrané kapitoly

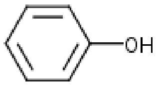
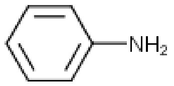
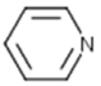
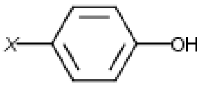
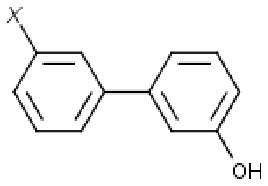
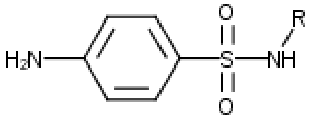
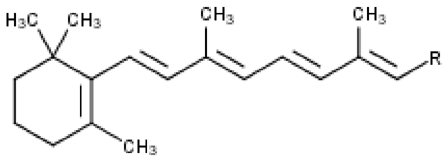
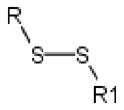
3.1.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY. ELEKTROCHEMICKÁ AKTIVITA LÁTEK

Elektrochemická detekce látek je založena na měření proudu vyvolaného průchodem elektroaktivní látky celou s elektrodami, na něž je vloženo pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce. Jedná se o velmi citlivou detekční techniku vhodnou ke sledování elektroaktivních analytů a uplatňuje se v mnoha oblastech analytické chemie a biochemie. V separačních metodách se elektrochemická detekce využívá k měření odezvy analytů v průtoku po předchozí separaci metodou HPLC nebo CE (kapilární elektroforézou). Z obecného pohledu odezva elektrochemického detektoru nezávisí na elučních podmínkách (v případě amperometrické detekce závisí odezva na rychlosti průtoku), citlivost a selektivitu určuje potenciál, který je vložen mezi pracovní a referentní elektrodu [1].

Odezvu v elektrochemickém detektoru poskytují pouze látky, které při kontaktu s povrchem pracovní elektrody podléhají elektrochemické konverzi – oxidaci nebo redukci [2]. Elektrony vyměněné při elektrochemické reakci jsou detekovány jako proud v daném čase [3]. Elektrochemická aktivita látek je determinována jejich chemickou strukturou, resp. přítomností elektroaktivních funkčních skupin (viz Tab. 1) [3, 4]. Při elektrochemické analýze v průtokových systémech se využívá především oxidační mód, metody založené na redukci jsou obecně méně citlivé a nenašly širšího uplatnění.

Mezi snadno oxidovatelné látky patří ty, které v molekule obsahují hydroxylovou nebo primární aminoskupinu vázanou na aromatické jádro [3, 4], thiolovou skupinu, a také heterocyklický dusík nebo síru [5]. Alifatické sloučeniny s hydroxylovou skupinou, aminoskupinou nebo thiolovou skupinou vyžadují k elektrochemické konverzi již větší energii, pro jejich detekci je tedy nutné aplikovat na pracovní elektrodu vyšší potenciál [4].

Tab. 1: Přehled vybraných oxidovatelných funkčních skupin [1, 5, 6]

Skupina látek	Struktura
Fenoly	
Aromatické aminy	
Heterocykly	
Halogenované fenoly	
Halogenované hydroxybifenyly	
Sulfonamidy	
Karoteny	
Thioly	R—SH
Disulfidy	

Jistě stojí za povšimnutí, že elektroaktivita látek v řadě případů souvisí i s biologickou aktivitou, což je dáno přítomností určitých funkčních skupin v jejich struktuře, a také mechanismem přenosu elektrického náboje v živých organismech. Vzhledem k faktu, že se řada výzkumných týmů zaměřuje na vývoj látek, jež pozitivním způsobem ovlivňují zdraví

člověka, elektrochemická detekce je při vývoji analytických metod nebo při studiu těchto látek často využívanou technikou.

3.1.2 Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii (HPLC-ECD)

Od svých počátků v sedmdesátých letech dvacátého století se HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) postupně vyvinula ve spolehlivou a všestrannou techniku, která díky své vysoké citlivosti a selektivitě nalezla uplatnění v celé řadě oblastí, ať už při analýze potravin a potravinových doplňků, nebo při kontrole kvality životního prostředí a analýze polutantů či ve farmakologické nebo dokonce klinické analýze. Při spojení elektrochemické detekce s HPLC se pro přesnost a rychlost odezvy rutinně využívají elektrolytické metody při nenulovém celkovém proudu.

Amperometrické detektory měří proud při konstantním elektrodovém potenciálu jako funkci celkové koncentrace analytu. Potenciál deponovaný na pracovní elektrodu se obvykle volí v oblasti limitního proudu, kde odezva závisí na koncentraci analytu [5]. U amperometrického detektoru proudí eluát z kolony kolem pracovní elektrody. S jejím povrchem reaguje jen malý podíl elektroaktivního analytu - obvykle 5 – 15 % [3]. V případě mikroelektrodových systémů je v důsledku efektivnější difúze podíl přeměněné látky mnohem vyšší a za určitých podmínek může docházet ke konverzi až se 100% (coulometrickou) účinností [7].

Coulometrické detektory jsou založeny na kvantitativní přeměně elektroaktivní látky na pracovní elektrodě, tedy na předpokladu, že analyzovaná látka zreaguje na pracovní elektrodě se 100%ní proudovou účinností. Coulometrické účinnosti konverze se dosahuje použitím průtočných (flow-through) elektrod, které jsou dnes výlučně na bázi porézního grafitického uhlíku. Pokud je splněna výše uvedená podmínka, metoda se stává absolutní (hmotnostní detektor) a množství látky je pak úměrné pouze prošlému elektrickému náboji dle Faradayova zákona. Coulometrické detektory vykazují zpravidla lepší limity detekce,

nicméně i v tomto směru vývoj pokročil a v současné době lze amperometricky detekovat nanomolární množství analytů i ve složitých matricích [8, 9].

Komerčně dostupné elektrochemické detektory využívají tzv. *tříelektrodového zapojení*, součástí detekční cely je kromě pracovní a srovnávací elektrody také elektroda pomocná.

Na geometrii a celkové vnitřní uspořádání průtokových elektrochemických cel používaných v kapalinové a mikrokolonové chromatografii jsou kladeny obecně vysoké nároky z hlediska hydrodynamických charakteristik, neboť musí být zcela minimalizován jejich příspěvek k dodatečné disperzi či deformaci separovaných zón. Tab. 2 schematicky znázorňuje základní konstrukční typy elektrochemických detekčních cel pro HPLC.

Při využití elektrochemické detekce v kapalinové chromatografii platí jistá praktická omezení. Jednou z podmínek, které musí mobilní fáze pro elektrochemickou detekci splňovat je vodivost, proto je nutná přítomnost elektrolytů – např. fosfátových, citrátových či acetátových solí [1, 4]. Také pH mobilní fáze hraje důležitou roli, vedle retence látek může ovlivnit také elektrochemickou aktivitu, např. sacharidy lze oxidovat jen v silně alkalických roztocích [10].

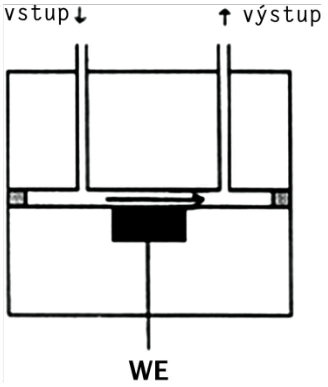
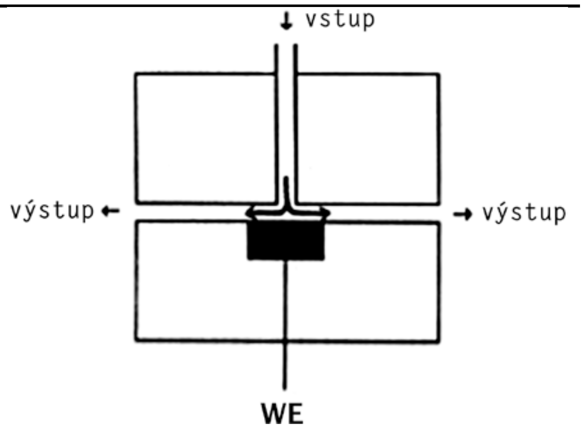
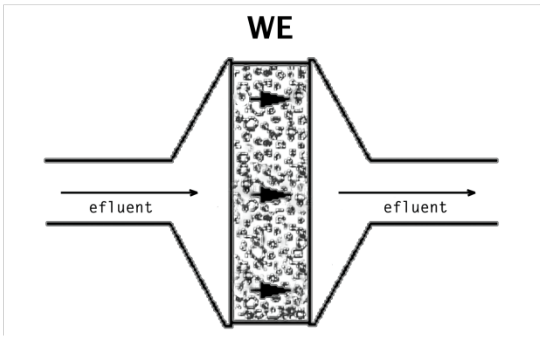
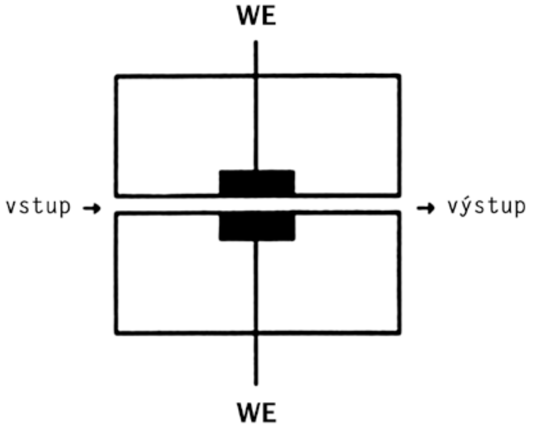
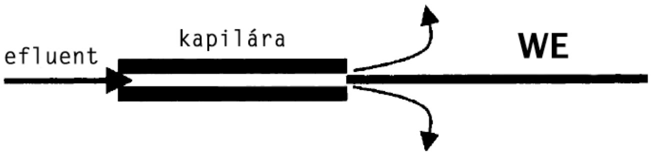
Nezbytností jsou komponenty mobilní fáze o vysoké chemické čistotě, protože nečistoty v elektrolytu i rozpouštědlech mohou samy přispívat ke zvyšování šumu [1, 4]. Totéž platí i pro mechanické nečistoty, které je nutné z mobilní fáze i analyzovaných vzorků odstranit filtrací. Doporučuje se používat filtry o porozitě alespoň 0,2 μm, tedy méně, než je běžné v konvenční HPLC.

Preferuje se izokratická eluce kvůli nestabilitě signálu elektrochemického detektoru při změně iontové síly eluentu, ke které dochází během gradientové eluce. Použití gradientu není nicméně zcela vyloučeno, pokud drift základní linie výrazně nekomplikuje interpretaci chromatografického záznamu [1].

Určité nároky jsou kladeny i na použitou instrumentaci. Z HPLC systému by měly být vyloučeny součásti a spojovací materiál z nerezové oceli (z důvodu možné kontaminace ionty dvojmocných kovů) a čerpadlo by mělo pracovat v bezpulzním režimu a

s reprodukovatelnou rychlostí průtoku. Je rovněž výhodné napájení detektoru ze zcela samostatného záložního síťového zdroje, tzv. „true online“[4].

Tab. 2: Základní konstrukční typy elektrochemických detekčních cel pro HPLC

<table>
<tr><th colspan="2">Konstrukční řešení detekčních cel pro průtoková měření</th></tr>
<tr><td>
tenkovrstvá cela</td><td>
cela typu „wall-jet“</td></tr>
<tr><td>
coulometrická „flow-through“ cela</td><td>
tubulární cela</td></tr>
<tr><td colspan="2">
cela s cylindrickou mikroelektrodou</td></tr>
</table>

Závěrem je však vhodné zmínit, že vzhledem k všeobecnému uplatnění a širokému aplikačnímu rozsahu obrácených fází (RP-LC), i jejich kompatibilitě v analýze hydrofilních matric a vzorků biologické povahy, je přídavek pufrů do mobilní fáze dnes už téměř pravidlem. Stejně tak i vysoká čistota používaných chemikálií je nejen ve stopové analýze

standardním požadavkem. Výše uvedená doporučení tedy nepředstavují zásadní problém při aplikaci spojení HPLC-ECD v rutinní praxi.

Další kapitoly se zevrubněji zaměřují na dvě poměrně specializované oblasti amperometrické detekce, které byly využity v rámci experimentální práce, na borem dopované diamantové elektrody a cylindrické uhlíkové mikroelektrody a jejich aplikace v separačních technikách. Zájemce o další informace, které se týkají spojení elektrochemické detekce se separačními technikami a které nejsou diskutovány v rámci této práce, lze odkázat na následující přehledové články a monografie [1, 4, 5, 11-13].

3.2 Uhlíkové mikroelektrody

3.2.1 Vlastnosti mikroelektrod

Označení „mikroelektroda" se konvenčně užívá pro elektrodu s rozměry v desítkách mikrometrů nebo méně [14].

Mikroelektrody nabízí následující praktické výhody [14, 15]:

- vyšší proudová odezva v důsledku radiální difúze (u vláknových elektrod), která zajišťuje rychlejší a efektivnější převod hmoty k povrchu elektrody
- snížený ohmický pokles napětí v roztoku, což umožňuje měření v prostředí o nízké elektrické vodivosti
- krátká doba potřebná k ustálení základního signálu v důsledku nízkých nabíjecích proudů

Výše zmíněné vlastnosti mikroelektrod i jejich příčina byly známy a podrobně popsány již dříve, nicméně extenzivnějšímu využití bránily praktické aspekty – potřebná

mikroelektronika byla teprve ve vývoji a neexistovaly ani postupy, které by umožnily přípravu mikroelektrod s dostatečnou reprodukovatelností. Tyto problémy se postupně vyřešily počátkem 80. let minulého století, kdy již bylo možné spolehlivě měřit velmi nízké proudy. [14]

Ke konstrukci mikroelektrod se nejčastěji využívá platina, zlato nebo uhlíková vlákna. Princip přípravy uhlíkových vláken spočívá v pyrolýze vhodných polymerů (např. polyakrylonitril). Uhlíková vlákna se mj. vyznačují velmi dobrou pevností, která předčí i ocel [16], což zajišťuje jistý komfort při manipulaci a následné adjustaci vlákna v detekční cele. Naopak kovová vlákna o průměru jednotek mikrometrů jsou velmi křehká a práce s nimi je velmi obtížná a často odradí řadu potenciálních uživatelů, přestože katalytické účinky některých kovů by v elektroanalytických aplikacích jistě našly své uplatnění.
Využití uhlíkových vláken je výhodné nejen z hlediska jejich nízké ceny, ale také dostupnosti. Uhlíková vlákna se vyrábí ve velkém množství pro různé průmyslové účely, nicméně samotná příprava elektrody pro analytická měření vyžaduje jisté zkušenosti a dovednosti. Obvykle je nutné umístit a ukotvit uhlíkové vlákno do ústí tenké skleněné kapiláry, nejčastěji se k tomuto účelu využívají epoxidové pryskyřice s určitým podílem složky, která zajišťuje vodivost a následnou konektivitu. K získání výhodných analytických vlastností je často nutné povrch elektrody elektrochemicky upravit [9, 17].

3.2.2 Uhlíkové cylindrické mikroelektrody v kapalinové chromatografii

V posledních letech je ve vývoji HPLC instrumentace jedním z nejvíce patrných trendů miniaturizace, která vede nejen ke snížení spotřeby rozpouštědel, a tedy ekonomických nákladů i enviromentální zatěže, ale také k nižší spotřebě vzorku [18, 19]. Rostoucí nároky analytické chemie a biochemie akcelerovaly vývoj miniaturizovaných detekčních systémů.
Kromě obecných výhod mikroelektrod, uvedených v kapitole 3.2.1, je jejich další velkou předností také výborná kompatibilita s mikrokolonovými technikami, neboť

elektrochemickou detekční celu lze snadno miniaturizovat, aniž by byla negativně ovlivněna citlivost. Tím se elektrochemická detekce výrazně odlišuje od ostatních detekčních technik, např. optických.

Základní uspořádání detekční cely s cylindrickou mikroelektrodou je znázorněno na schématu (Tab. 2). Referentní a pomocná elektroda se umísťuje obvykle do těsné blízkosti pracovní elektrody, nicméně experimentálně se osvědčila i jiná řešení [20].

Z hlediska analytické chemie lze za atraktivní důsledek používání miniaturizovaných systémů považovat fakt, že výrazně klesají nejen hmotnostní [21, 22], ale často též koncentrační detekční limity [21]. Udává se, že přechodem z klasických HPLC kolon (4.6 mm I.D.) na kolony o průměrech 2.1 mm nebo 1 mm se může teoreticky zvýšit citlivost detekce až 21krát [1]. V praxi je situace poněkud pesimističtější, nicméně stále jde o významné zvýšení poměru signál/šum [22].

Přestože se mikroelektrody na bázi uhlíkového vlákna v klasické elektrochemii již osvědčily, např. pro *in vivo* monitoring neurotransmiterů [23], či ultrastopovou analýzu organických i anorganických elektroaktivních látek (oxid dusnatý [24], léčiva [25]), jejich použití v kombinaci s HPLC je doposud značně omezeno a rovněž literárních zdrojů na toto téma není mnoho. Poprvé byl detekční systém na bázi jednoho uhlíkového vlákna ve spojení s HPLC aplikován při analýze askorbové kyseliny, katecholu a 4-methylkatecholu. V této práci je také experimentálně dokázána coulometrická účinnost tohoto detektoru [7]. V roce 1988 použili Hu a Kuwana CFME pro detekci rozseparovaných dansylovaných aminokyselin [26], v roce 1992 Sagar a kol. ke stanovení salbutamolu v lidské plasmě [27], publikována je i kombinace rychleskenující mikrovoltametrie s využitím CFME za HPLC kolonou [28]. Baur a kolektiv použili uhlíkové vlákno při detekci pikomolárních množství katecholaminů (noradrenalin, adrenalin a 3,4-dihydroxylbenzylamin) po předchozí HPLC separaci na 4 cm dlouhé koloně [29]. V letech 1994 až 2009 bylo publikováno jen několik dalších článků z této oblasti [30-34].

Jak již bylo uvedeno, hlavní výhodou mikroelektrod této konstrukce je skutečnost, že v sobě kombinují vlastnosti mikroelektrody (vysoký příspěvek radiální difúze převodu hmoty k faradaickému proudu) s relativně vysokými proudy (vzhledem k jejich malé ploše). Když k uvedeným výhodám přičteme nižší citlivost CFME vůči změnám míchání (při klasickém elektrochemickém experimentu), resp. změnám v rychlostech proudící kapaliny (v průtokové analýze) [35], je evidentní, že CFME disponují zcela unikátními vlastnostmi, využitelnými zejména při spojení s kapalinovou chromatografií.

V kombinaci s narrow-bore a microbore HPLC kolonami lze u vhodných analytů dosáhnout detekce až attomolárních množství on-column [9]. CFME poskytují analyticky využitelný signál i u látek, které se jinak jeví jako elektrochemicky téměř inaktivní. Bromovaný retardant hoření a enviromentální polutant, tetrabromobisfenol-A, je možno s využitím CFME po předchozí separaci stanovit i na poměrně nízkých koncentračních hladinách [36].

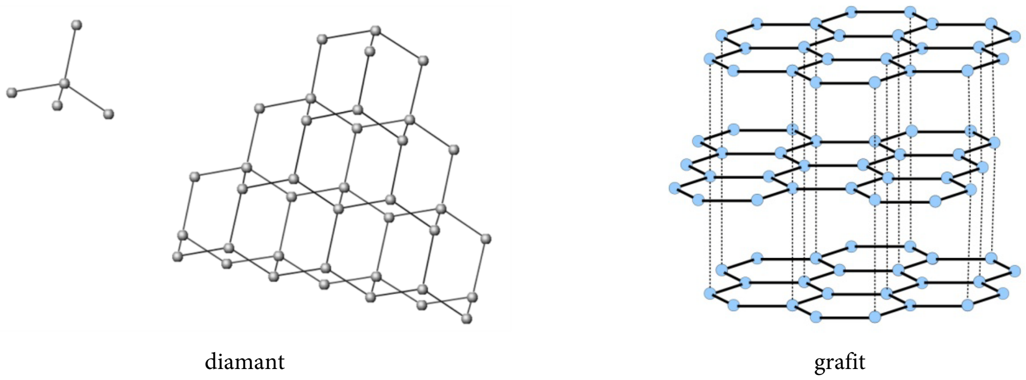
Selektivita senzorů na bázi CFME může být dále modifikována cílenými změnami na jejich povrchu, zejména elektrochemicky (depozice kovových vrstev) nebo chemicky (pokrytí polárních skupin), a tím přizpůsobena konkrétní skupině analytů. Velmi nadějně se jeví modifikace CFME nanostrukturovanými kovovými vrstvami, například mědi, s následným využitím pro detekci sacharidů [37].

Sporadické využití CFME v HPLC-ECD technice pravděpodobně je, vedle jejich faktické komerční nedostupnosti [1], způsobeno nutností citlivě zesilovat extrémně malé proudy, tedy disponovat vysoce kvalitním potenciostatem, a v neposlední řadě k němu také zřejmě přispívá podstatně komplikovanější manipulace a adjustace senzorů v miniaturizovaných systémech.

3.3 Diamantové elektrody

3.3.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BDD

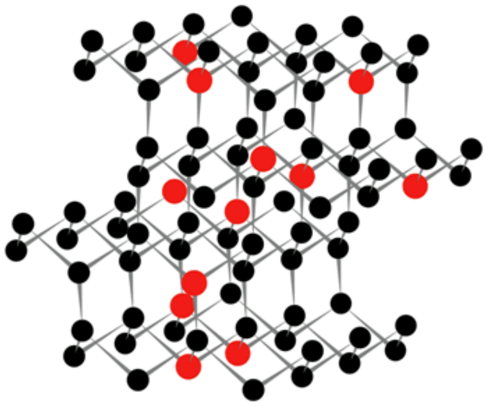
Pracovní elektrody na bázi uhlíku (skelný uhlík, grafit, uhlíková vlákna) se neodmyslitelně pojí s celým spektrem elektrochemických technologií včetně elektroanalytické chemie. Tyto materiály spojuje podobná mikrostruktura, tvořená vzájemně vázanými sp^2 hybridizovanými uhlíkovými atomy. Elektrochemické vlastnosti těchto materiálů byly důkladně studovány několik předchozích desetiletí, zatímco zmínky o elektroanalytickém využití diamantu byly publikovány relativně nedávno. Ve světě elektrochemie a analytické chemie se první zmínky o borem dopované diamantové (BDD) elektrodě poprvé objevily v roce 1992 [38]. První přehledové články, které se zabývají studiem vlastností BDD elektrod a jejich předpokladů pro elektroanalytická měření byly publikovány o deset let později [39, 40].



Obr. 1: Struktura diamantu a grafitu

Čistý diamant je díky své struktuře (sp^3 hybridizaci, viz Obr. 1) jeden z nejlepších přírodních izolantů a pro konstrukci elektrod tedy zcela nevhodný. Avšak je-li nadopován vhodným prvkem (nejčastěji borem), stává se v důsledku poruch v krystalové mřížce (Obr. 2) elektricky vodivým [41]. Přesné souvislosti mezi fyzikální strukturou elektrod na bázi diamantu a jejich elektrochemickými vlastnostmi nejsou zcela objasněny, nicméně z dosud

publikovaných dat je zřejmé, že elektrochemická odezva takových materiálů silně závisí na obsahu dopantu - při nízkých hladinách boru se chová jako vnější polovodič typu „p“, při vyšších dopingových hladinách se chová jako polokov a takto upravený diamant je vhodný k výrobě pracovních elektrod [42].



Obr. 2: Struktura borem dopovaného diamantu. Atomy boru (znázorněny červenou barvou) zaujímají v krystalové mřížce zcela náhodná místa. Obrázek převzat z cit. [43]

Samotný diamant je velmi pozoruhodným materiálem a neméně zajímavý je také způsob výroby či přípravy diamantu pro technologické využití. V zemském plášti je ke vzniku diamantu zapotřebí vysokých teplot a tlaků, výrobní postupy jsou založeny na obdobných principech s tím rozdílem, že jako materiál vhodný ke konstrukci elektrod zcela dostačuje tenký diamantový film.

Nejčastěji využívanou technikou přípravy diamantového filmu je metoda založená na principu chemické depozice par (CVD) ze směsi plynných uhlovodíků (např. methan) a vodíku. Energeticky je tento proces podporován buď pomocí žhavené katody, nebo mikrovlnného záření. Během následné reakce je plyn obsahující uhlík energeticky aktivován za vzniku alkylových radikálů a atomárního vodíku. Za teplot od 800-2100°C (podle typu CVD metody) a zvýšeného tlaku dochází k růstu diamantové vrstvy rychlostí 0,1-1 μm/h, přičemž ke konstrukci elektrody je zapotřebí filmu o síle minimálně 1 μm. Dopování borem je realizováno buď přímo v plynné fázi přídavkem plynu obsahujícího bor, jako např. B_2H_6, do reakční směsi, nebo z pevné fáze zplyněním malého množství nitridu boru. Výslednou vrstvu BDD je možné charakterizovat pomocí metod skenovací

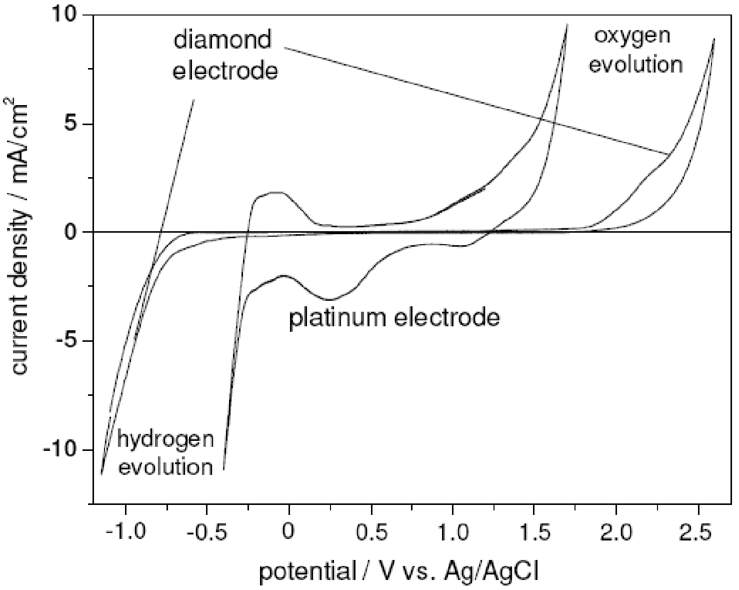
elektronové mikroskopie (SEM), Ramanovy spektrometrie nebo rastrovací tunelové mikroskopie. [40, 42]

Elektrody z BDD nabízí několik zcela unikátních vlastností, které je značně odlišují od elektrod z konvenčních materiálů. Jednou z nich je vysoké přepětí vodíku a kyslíku, díky kterému disponují BDD elektrody širokým potenciálovým oknem (Obr. 3). Příčina tohoto jevu není dosud zcela objasněna, nicméně na základě publikovaných dat lze usuzovat, že toto chování souvisí s inertností a homogenitou diamantového filmu, přepětí vodíku i kyslíku se snižuje úměrně s rostoucím podílem uhlíku v jiné formě než diamantové (tedy s hybridizací sp^3) [44-46]. V oblasti vysokých kladných potenciálů může rovněž docházet k elektrogeneraci silných oxidantů jako jsou hydroxylové radikály [47]. BDD elektrody umožňují detekci obtížně oxidovatelných látek, které podléhají elektrochemické konverzi až při vysokých potenciálech.

Dále se diamantové elektrody vyznačují nízkým proudovým pozadím. Tato vlastnost je přičítána zejména relativní absenci elektroaktivních funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu diamantu a skutečnosti, že se BDD v podstatě chová jako soubor mikroelektrod navzájem oddělených elektricky nevodivým prostředím. [45, 46]

V neposlední řadě je povrch BDD chemicky inertní a vyznačuje se minimálním sklonem k adsorpčním jevům a následné pasivaci elektrody, což přispívá ke stabilitě signálu a dobré opakovatelnosti měření. [41, 45, 46]

Výše uvedené vlastnosti mají zásadní význam pro analytické využití BDD elektrod. Zásluhou svých unikátních vlastností BDD elektroda významně rozšiřuje aplikační rádius elektrochemické detekce – zejména o látky, které vyžadují k elektrochemické konverzi značně vysoké potenciály, např. disulfidy [41] nebo purinové a pyrimidinové báze [48]. Borem dopovaný diamant je cennou alternativou k tradičním uhlíkovým elektrodám.

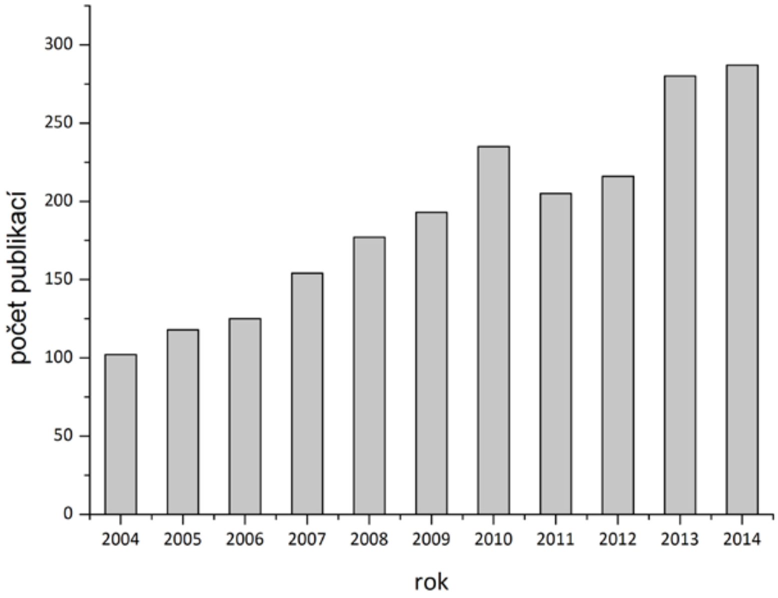


Obr. 3: Cyklický voltamogram platiny a diamantové elektrody (Diachem®, Condias)

Obrázek srovnává rozsah potenciálového okna pro diamantovou a platinovou elektrodu. Z naměřeného voltamogramu je patrné, že se na povrchu diamantové elektrody netvoří povrchové oxidy ani neprobíhají žádné vedlejší reakce. Experimentální podmínky: elektrolyt 0,2 M H_2SO_4, rychlost scanu: 100 mV/sec. Obrázek byl převzat z cit. [42].

3.3.2 Využití BDD elektrod v separačních technikách

Borem dopovaná elektroda se při voltametrických měřeních osvědčila, dalším logickým krokem bylo tedy její zařazení do průtokových měření coby citlivého amperometrického senzoru. Již v roce 1995 byla publikována práce využívající spojení průtokové injekční analýzy (FIA) s elektrochemickým detektorem s pracovní BDD elektrodou [49]. Čtyři roky poté následovalo spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) [44, 50] a o další čtyři roky později byla technologie miniaturizace již natolik pokročilá, že umožnila spojení také s kapilární elektroforézou (CE) na čipech [51-54]. Obr. 4 naznačuje, že zájem vědecké obce o borem dopované diamantové elektrody má stále rostoucí trend.



Obr. 4: Počet publikovaných prací, jež se zabývají vlastnostmi a použitím BDD elektrody.
Obrázek mapuje období posledních 10 let. Web of Science^{TM}, klíčová slova: „boron doped diamond electrode“, kategorie: téma.

Jednou z prvních a nejčastěji využívaných aplikací BDD elektrody ve spojení se separačními technikami byla zejména detekce obtížně oxidovatelných sirných sloučenin a léčiv [50], např. aminothiolů [6, 55], disulfidů a thioetherů [6]. Tento vývoj je logický, pokud si uvědomíme, že řada biologicky aktivních látek patří do skupiny thiolů a disulfidů: glutathion, který se účastní redoxního metabolismu léčiv, je důležitým biochemickým markerem. Jiným příkladem je homocystein, aminokyselina vznikající metabolizací methioninu, odbourávaná dále na cystein za katalýzy vitaminů skupiny B. Přestože elektrochemická detekce sirných sloučenin konvečním způsobem je možná, v principu je výrazně limitována vlastnostmi klasických uhlíkových elektrodových materiálů: zatímco reaktivní thioly se silně adsorbují na povrch elektrod, elektrochemická detekce disulfidů vyžaduje pro dobrý poměr signál/šum použití značně vysokých pracovních potenciálů. BDD elektrody účinně eliminují výše uvedené nevýhody a byly s úspěchem využity pro citlivou detekci glutathionu [56-59], homocysteinu [60], glutathion disulfidu a cysteinylglycinu [57].

Sulfonamidy jsou látky široce používané po několik dekád pro své baktericidní účinky jak v humánní, tak i veterinární medicíně. Vzhledem k tomu, že rezistence bakteriálních

kmenů vůči antibiotikům v důsledku jejich nadužívání je v současnosti závažným celosvětovým problémem, monitoring antibiotik v potravinách hraje stále významnější roli. Metoda pro stanovení stop sulfomethoxazolu a trimethoprimu v kravském mléce využívající spojení amperometrické detekce na BDD elektrodě s multidimenzionální HPLC umožňuje rychlé a citlivé monitorování těchto látek i v takto komplikované matrici [61]. BDD elektrodu lze však ve spojení s FIA či HPLC mimo metod stanovení sulfonamidů [62] výhodně použít pro stanovení také dalších antibiotik, např. tetracyklinů [63, 64].

Využití BDD elektrod v průtokové analýze různých environmentálních polutantů, zejména karcinogenních aminobifenylů, se věnuje skupina Barka [65-67]. Stejný tým publikoval nedávno i práci zaměřenou na stanovení metabolického markeru 1-hydroxypyrenu v lidské moči po předchozí extrakci tuhou fází [68].

Tricyklická antidepresiva je možné citlivě detekovat v oxidačním módu za použití BDD elektrody v kombinaci s FIA nebo HPLC [69]. Duální detekce pěti antivirotik pomocí fluorescenční a elektrochemické detekce s BDD pracovní elektrodou poskytla řádové snížení limitů detekce ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí [70].

Díky širokému potenciálovému rozsahu v anodické i katodické oblasti je možné pracovat s BDD elektrodou také v redukčním módu. Limity detekce u těchto metod však většinou nedosahují parametrů srovnatelných s metodami založenými na oxidaci.

Byla publikována HPLC-ED metoda pro stanovení základních benzodiazepinů na principu jejich elektrochemické redukce [71]. Použitá thin-layer pracovní BDD elektroda pracovala v pulzním režimu.

3.3.3 Diamantové mikroelektrody. BDD elektrody v kapilární elektroforéze a mikrokolonových technikách

Kapilární elektroforéza představuje efektivní analytickou techniku ať už ve své klasické, tak i v mikročipové podobě. Typickým rysem této techniky je vysoká účinnost separace při velmi malé spotřebě vzorku. V kombinaci s CE se již osvědčila celá řada detekčních technik

(spektrofotometrická, fluorescenční, vodivostní, hmotnostně spektrometrická). Zásadním limitujícím faktorem klasických optických detekčních systémů pro jejich širší uplatnění v miniaturizovaných systémech je omezená dráha paprsku v detekční cele. Pro CE na čipech tak byla pro analýzy se subnanomolárními limity detekce dosud využita pouze technika laserem indukované fluorescence (LIF) [72]. Ostatní detekční techniky, včetně hmotnostní spektrometrie (MS), nejsou pro CE v čipovém formátu vhodné z důvodu nutné objemné a náročné instrumentace.

Mezi unikátní vlastnosti elektrochemické detekce patří její vysoká citlivost, která není nijak zhoršována postupnou miniaturizací [22], a dále její mimořádná instrumentální a ekonomická nenáročnost. Spojení CE s elektrochemickou detekcí přináší však kromě výše uvedené výhody také několik problematických skutečností: kromě přesné adjustace pracovní elektrody na konci kapiláry a následného oddělení separačního napětí od napětí v detekční cele, tzv. „decoupling“, je rovněž obtížné zajistit pravidelnou regeneraci amperometrického senzoru v případech, kdy dochází k jeho pasivaci [73]. K těmto jevům má sklon většina běžně používaných tuhých elektrod a pro udržení konstantní aktivity jejich povrchu je nutné aplikovat některý z osvědčených regeneračních postupů.

Diamantové elektrody nabízí, ve srovnání s klasickými materiály, řadu zásadních analytických vlastností: široký dynamický rozsah, nízké limity detekce, reprodukovatelnou odezvu a především velmi malou tendenci k pasivaci povrchu, a to v katodické i anodické oblasti.

Pro účely techniky CE se však nehodí nejčastěji používaná planární BDD ve formě tenkého diamantového filmu na křemíkovém čipu. Vhodným základem pro přípravu BDD mikroelektrod připravených depozicí polykrystalických diamantových filmů jsou například platinové či wolframové drátky o průměru v řádu desítek mikrometrů, upravené do špičky [74]. Elektrochemické vlastnosti takových elektrod jsou do značné míry determinovány obsahem boru (elektrický odpor) a tvarem elektrody. Spektrum látek, které byly tímto způsobem detekovány po předchozí CE separaci, není však dosud příliš široké a zahrnuje

především látky jako dopamin, katechol, kyselina askorbová [74, 75], puriny[54], nitroaromáty [52], aromatické aminy [53] či chlorované fenoly [76].

4 Analýza inhibitorů PDE5 a jejich metabolitů [8]

4.1 Experimentální část

4.1.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1.1 Chemikálie

Sildenafil citrát byl získán od společnosti Pfizer, vardenafil hydrochlorid od firmy Bayer. Metabolity N-desmethylsildenafil a N-desethylvardenafil byly pořízeny od společnosti Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Floretin byl zakoupen u firmy Fluka (Fluka AG, Buchs, Švýcarsko). K přípravě pufrů pro mobilní fáze se používal hydrogenfosforečnan sodný a/nebo dihydrogenfosforečnan sodný, kyselina fosforečná (všechny chemikálie v čistotě TraceSelect) a/nebo chloristan sodný (HPLC grade) – všechny uvedené chemikálie byly zakoupeny u firmy Fluka (Fluka AG, Buchs, Švýcarsko). Z organických rozpouštědel se využíval acetonitril, methanol, methyl-*terc*-butylether a ethylacetát, všechna rozpouštědla (v čistotě gradient grade) byla pořízena u Labscan (Dublin, Irsko). Voda byla získaná reverzní osmózou systémem Millipore Smart Direct Q-3 UV (Merci, Brno, Česká republika). Plazma pro analýzy byla získána od zdravého dobrovolníka.

4.1.1.2 Přístroje a software

Chromatografický systém pro HPLC sestával z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582), guard cely (model 5020) a coulometrického detektoru Coulochem III, vybaveného standardní analytickou celou (model 5010A) a amperometrickou celou (model 5040) s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (BDD), (vše ESA Inc., MA Chelmsford, USA).

Vzorky byly nastřikovány do systému skleněnou mikrostříkačkou (Hamilton, Reno, USA) o objemu 25 nebo 10 μl prostřednictvím manuálního dávkovacího ventilu (Rheodyne, Cotati, USA) s 2,5 μl smyčkou. Veškerá těsnění, spojky, ferulky a kapiláry byly z polymerního materiálu PEEK®. Byly testovány následující kolony - Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 mm × 150 mm (5 μm), Phenomenex Gemini C18 3,0 x 150 mm (5 μm), Polaris C18-A 3,2 mm × 150 mm (3 μm) a Ascentis C18 3 μm, 100 mm × 2,1 mm I. D. Poslední uvedená byla následně používána pro analýzy.
Záznam měření z detektoru a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno prostřednictvím softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány s využitím softwaru OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

4.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky

4.1.2.1 Roztoky standardů

Metanolické zásobní roztoky o koncentraci 1 mg . ml^{-1} byly uchovávány při teplotě -20°C. Pracovní roztoky standardů se připravovaly ředěním zásobních roztoků mobilní fází.

4.1.2.2 Mobilní fáze

Pufr pro mobilní fázi (MF) sestával z 20 mM dihydrogenfosforečnanu sodného s přídavkem chloristanu sodného o výsledné koncentraci 40 mmol l^{-1}. Pufr se smíchal s acetonitrilem v poměru 70/30 (v_{aq}/v_{org}) a pH výsledné mobilní fáze se upravilo pomocí kyseliny fosforečné na hodnotu 3,5. Před použitím se mobilní fáze přefiltrovala přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odplynila pomocí helia.

4.1.2.3 Úprava vzorku

K extrakci analytů z plasmy se využívala jednoduchá *l-l* extrakce: k 150 μl lidské plasmy se přidalo 450 μl methyl-*terc*-butyletheru, směs se důkladně promíchala na třepačce a na

krátkou dobu (cca 2 min) umístila do ultrazvukové lázně. K důkladnému oddělení obou fází se využívala centrifuga (7200 × g, 3 min), 400 μl horní organické vrstvy se převedlo do čisté vialky a pomocí dusíku odpařilo do sucha. Následně se vzorek rekonstituoval 50 μl mobilní fáze, které obsahovaly vnitřní standard floretin (150 ng ml^{-1}). Pokud se výsledný roztok zakalil, opět se umístil na krátkou dobu do centrifugy, čirý supernatant již byl připraven k dávkování do HPLC systému.

4.1.2.4 Chromatografické podmínky

Pokud není uvedeno jinak, základní podmínky chromatografické analýzy a elektrochemické detekce byly následující:

HPLC kolona Ascentis® C18 3 μm, 100 mm × 2,1 mm I.D.; mobilní fáze 20 mM fosforečnan sodný + 40 mM chloristan sodný/acetonitril 70/30 (v_{aq}/v_{org}), pH 3,5, (připravená a upravená tak, jak je popsáno v kapitole 4.1.2.2); průtoková rychlost 0,2 ml min^{-1}.

Potenciál analytické cely s BDD elektrodou byl +1520 mV (*vs.* Pd/H_2), rozsah citlivostí potenciostatu 0,1-5 μA . V^{-1}. Potenciál guard cely byl pro všechna měření +1000 mV (*vs.* Pd/H_2).

4.1.2.5 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody

Pro zjištění kvantitativních parametrů vyvinuté metody byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard (IS) byl zvolen floretin. Kalibrační křivky získané analýzou látek v matrici (lidská plasma) byly sestrojeny jako poměry ploch píků odpovídajícího kalibrantu/IS proti poměru koncentrací kalibrantu/IS. Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly zjištěny s použitím rovnic LOD = $3.3\sigma/b$ a LOQ = $10\sigma/b$, kde σ představuje standardní směrodatnou odchylku signálu základní linie ze 6 signálů při analýze slepého vzorku a b je směrnice odpovídající křivky.

4.2 Výsledky a diskuze

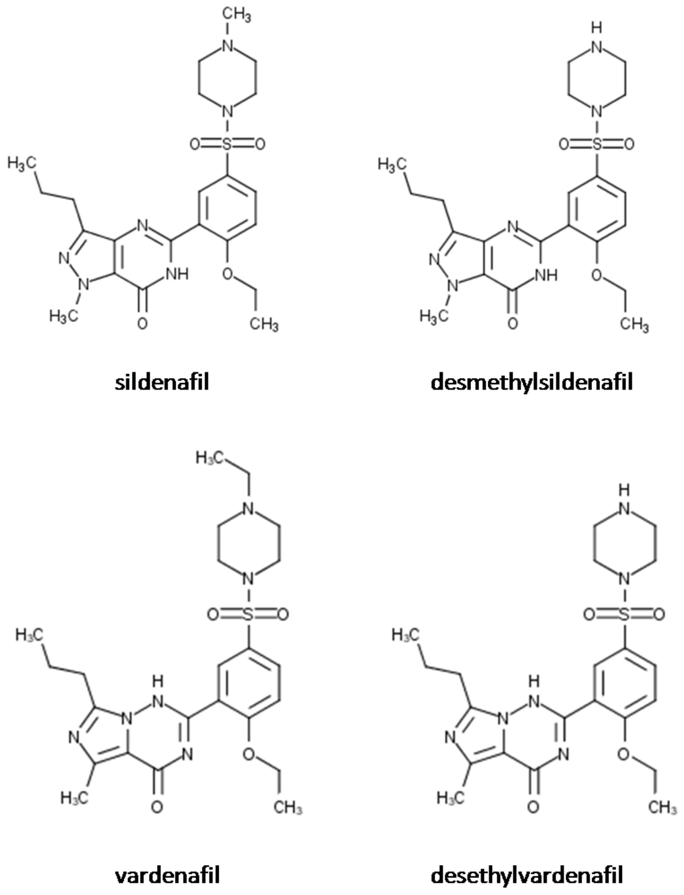
Léčiva odbornou veřejností označována jako sildenafil a vardenafil (známá pod obchodními názvy Viagra™ a Levitra™) se již několik let úspěšně užívají k léčbě erektilní dysfunkce. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici isoenzymu fosfodiesterázy 5 (PDE5), který je zodpovědný za odbourávání cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) v tkáních hladkého svalstva. cGMP mimo regulace průchodnosti iontových kanálů, glykogenolýzy a buněčné apoptózy uvolňuje vlákna hladkého svalstva, což vede k rozšíření cév a zvýšenému průtoku krve [77]. Zvýšené hladiny cGMP podporují vznik a udržení erekce [78]. Mimoto se na základě výše popsaného mechanismu účinku inhibitory PDE5 uplatňují také při terapii plicní hypertenze (PAH) [79, 80].

Mezi hlavní metabolické dráhy patří dealkylace piperazinového kruhu, za kterou jsou zodpovědné enzymy z rodiny cytochromu P450 [78, 81, 82]. Struktura sildenafilu (SL), vardenafilu (VR) a jejich hlavních metabolitů, N-desmethylsildenfilu (DSL) a N-desethylvardenafilu (DVR), je znázorněna na Obr. 5. Plazmatická koncentrace dosáhne vrcholu přibližně 1 hodinu po orálním podání těchto léčiv na lačno, přičemž hodnoty c_{max} se při léčebných dávkách 25–100 mg SL pohybují v rozsahu 127-560 ng ml^{-1} [83]. Po orálním podání terapeutické dávky VR (20 mg) byla zaznamenána maximální plazmatická koncentrace 44 ng ml^{-1} [84].

Vzhledem ke komerčnímu úspěchu jsou tyto látky často předmětem zneužití a v obchodní síti jsou k dostání jak padělky, tak přírodní preparáty a doplňky, které obsahují nepovolená množství inhibitorů PDE5. Tyto praktiky představují závažné zdravotní riziko zejména pro pacienty s poruchami kardiovaskulárního systému a krevního tlaku. Z uvedeného je zřejmé, že vhodné analytické nástroje jsou nezbytné ať už při léčbě pacientů trpících PAH, nebo ke sledování těchto látek na trhu, příp. ve forenzní analýze.

Při analýze PDE5 inhibitorů včetně SL a VR ať už ve vzorcích klinického charakteru nebo v bylinných preparátech se nejvíce uplatňuje HPLC v kombinaci s MS detektorem. K elektrochemickému stanovení SL a VR je možné využít jak oxidace [85, 86], tak i

redukce [87, 88]. Průtoková měření založená na redukcích komplikují interference rozpuštěného kyslíku a zpravidla dosahují nižší citlivosti než metody založené na oxidacích. Oxidace piperazinového kruhu je ireverzibilní a vyžaduje vysokých potenciálů. Při elektrochemické konverzi dochází k pasivaci elektrodového povrchu. Tento efekt lze potlačit např. použitím pulzního módu [89], který však přináší řadu dalších praktických nevýhod (nižší citlivost, náročnější instrumentace). Elegantním řešením je zvolit takový elektrodový materiál, který není náchylný k adsorpci produktů elektrodové reakce a současně umožňuje citlivou detekci v širokém rozsahu potenciálů. Elektrody z BDD výše uvedené požadavky beze zbytku splňují.

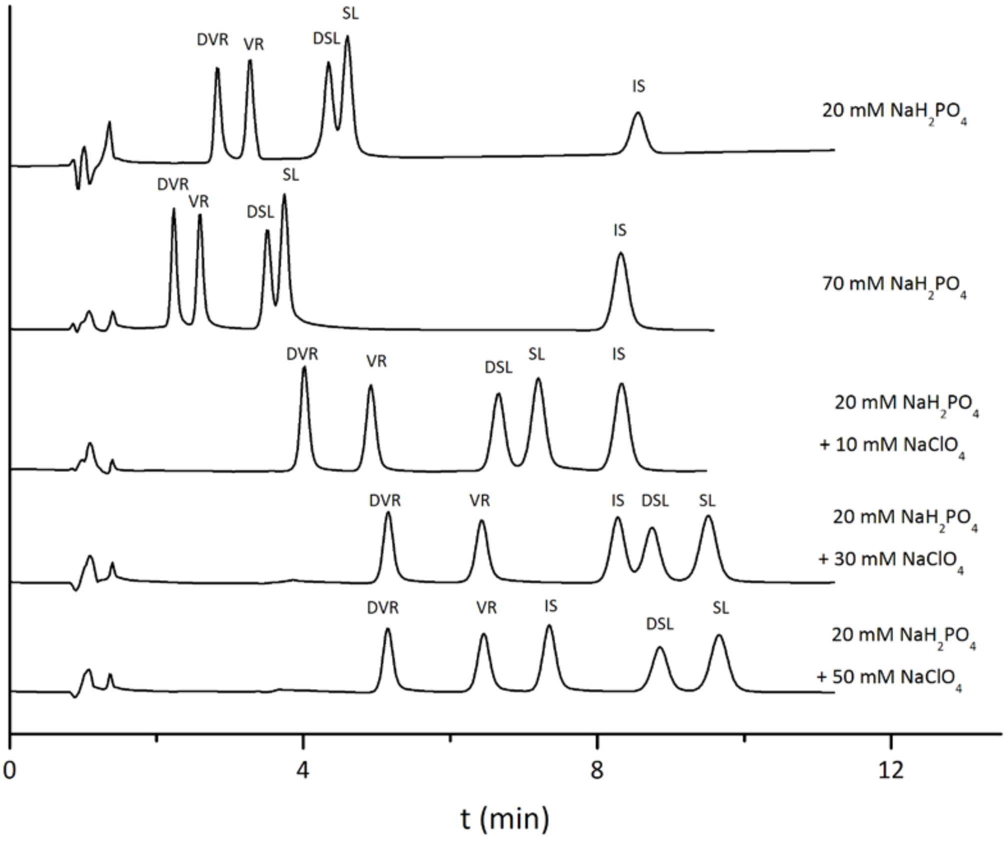


Obr. 5: Chemická struktura studovaných látek

Z několika testovaných kolon různých parametrů (délka, vnitřní průměr, velikost částic), ale podobným chemismem (RP-C18, RP-C8), poskytovala kolona Ascentis 3μm,

100 × 2,1mm I.D. nejlepší účinnost separace a symetrii píků. Využití krátké kolony s menším vnitřním průměrem snižuje spotřebu chemikálií i vzorku a díky menší velikosti částic sorbentu nedochází ke zhoršení účinnosti separace. Nicméně je třeba mít na paměti, že kolony s částicemi menšími než 5 µm kladou vyšší nároky na obsah mechanických nečistot v mobilní fázi.

Z hlediska chromatografie bylo nutné optimalizovat zejména složení pufru, jeho koncentraci a pH. Základní složkou pufru je fosforečnan sodný, jeho úkolem je zajistit dostatečnou pufrační kapacitu, avšak nebylo možné nalézt takový poměr organického modifikátoru a fosforečnanového pufru, aby došlo k rozdělení kritického páru N-desmethylsildenafil (DSL) a sildenafil.

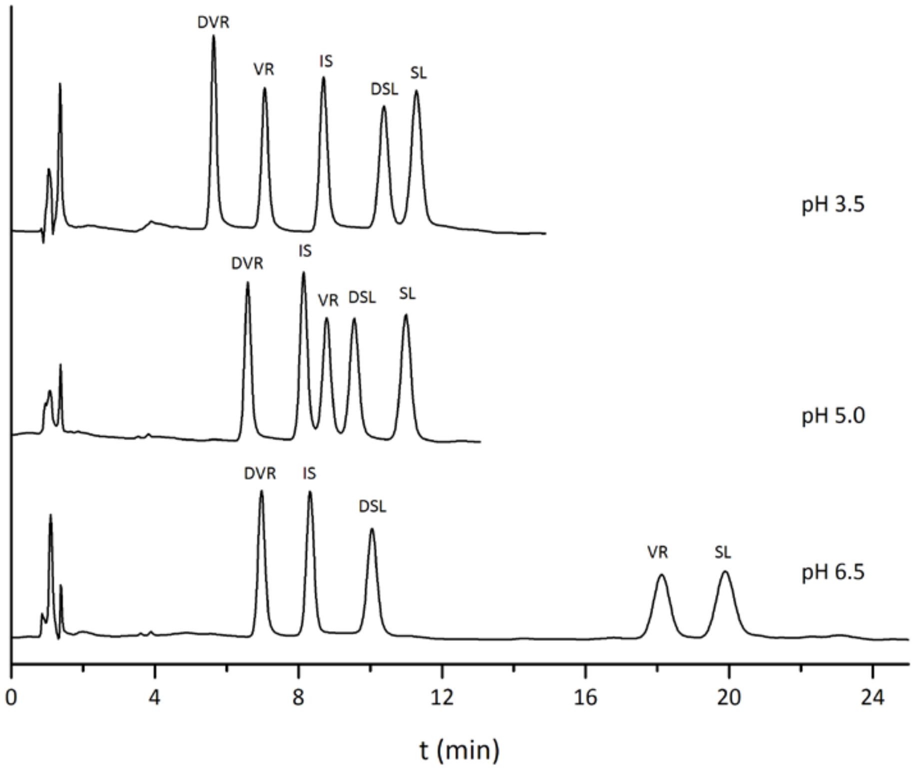


Obr. 6: Efekt složení pufru MF na retenci studovaných PDE5 inhibitorů. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.4. Legenda: SL-sildenafil, DSL-desmethylsildenafil, VR-vardenafil, DVR-desethylvardenafil.

Přídavek chloristanu sodného tento problém vyřešil, současně se zlepšila symetrie píků a zvýšila retence látek, což je žádoucí vzhledem k zamýšlenému využití metody. V rámci optimalizace tohoto parametru byl testován efekt přídavku chloristanu o různé koncentraci

na chromatografické chování látek, nejzajímavější výsledky jsou znázorněny na Obr. 6. Mimo příznivého působení na rozlišení kritického páru se s rostoucí koncentrací chloristanu v MF snižovala retence vnitřního standardu (floretinu).

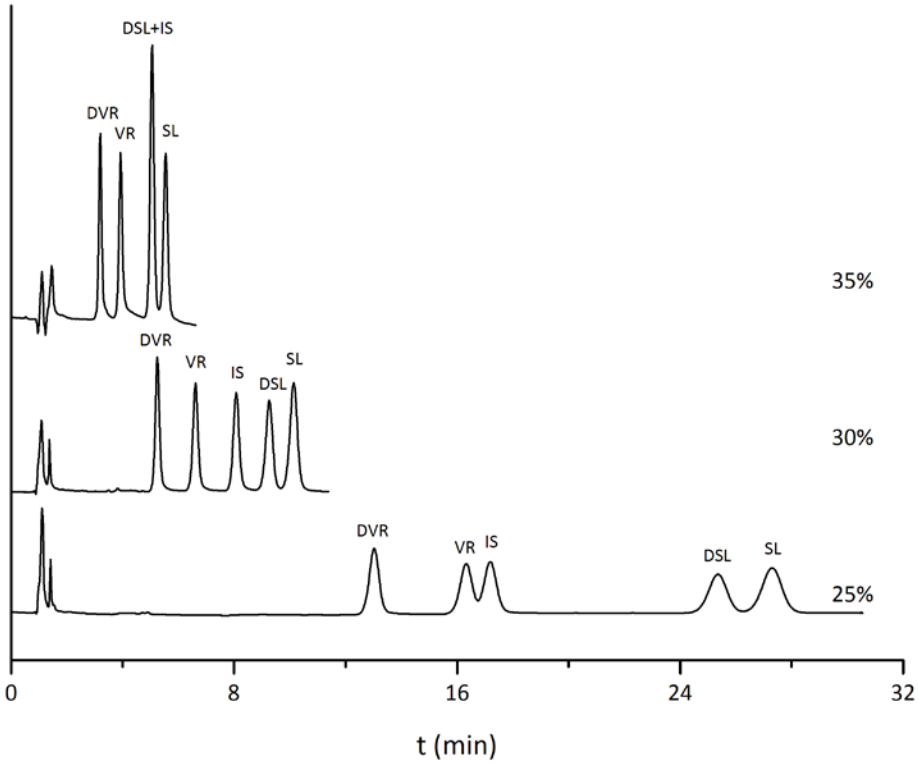
Studované látky pravděpodobně tvoří s chloristanem iontové asociáty, následkem toho je snížena solvatace molekul rozpouštědlem resp. mobilní fází. Tento efekt patrně podporuje také tvorba kvazi-stacionární fáze, jež vykazuje hydrofilnější charakter než původní stacionární fáze. V důsledku uvedených příspěvků dochází ke zlepšení tvaru píků a zvýšení retence látek.



Obr. 7: Vliv pH mobilní fáze na retenci studovaných látek. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.4.

Vzhledem k povaze látek a přítomnosti ionizovatelných skupin v jejich struktuře lze usuzovat na závislost jejich chromatografického chování na pH mobilní fáze. Vliv pH na separaci jsem studovala při hodnotách 3,5; 5,0 a 6,5. Jak je patrné z Obr. 7, s rostoucí hodnotou pH rostl významně kapacitní faktor pro sildenafil a vardenafil. Při pH 6,5 bylo dosaženo nejvyšších hodnot rozlišení pro všechny analyty, nicméně z ekonomického ani analytického hlediska není žádoucí prodlužovat dobu separace. Při pH 3,5 bylo rozlišení i retence všech látek dostatečné a pro další práci byla zvolena tato hodnota.

V rámci optimalizace chromatografických podmínek byl testován také obsah organického modifikátoru v mobilní fázi. Acetonitril má v porovnání s methanolem, jakožto nejběžnějším organickým modifikátorem používaným na obrácených fázích, menší viskozitu, snižuje tedy zpětný tlak kolony, a poskytuje užší píky. Obsah acetonitrilu v MF a jeho vliv na rozlišení látek byl testován v úzkém rozsahu 25 – 35 % (v/v). Nejvýhodněji se z hlediska sledovaných parametrů jevilo použití mobilní fáze s 30% obsahem acetonitrilu – rozlišení všech píků v chromatogramu bylo dostatečné a celková doba separace byla také uspokojivá (Obr. 8). Při 35% obsahu acetonitrilu v MF koeluují píky sildenafilu a vnitřního standardu, naopak při nižším obsahu acetonitrilu – 25 % dochází k podstatnému prodloužení doby separace a významnému zhoršení rozlišení mezi VR a SL (Obr. 8).

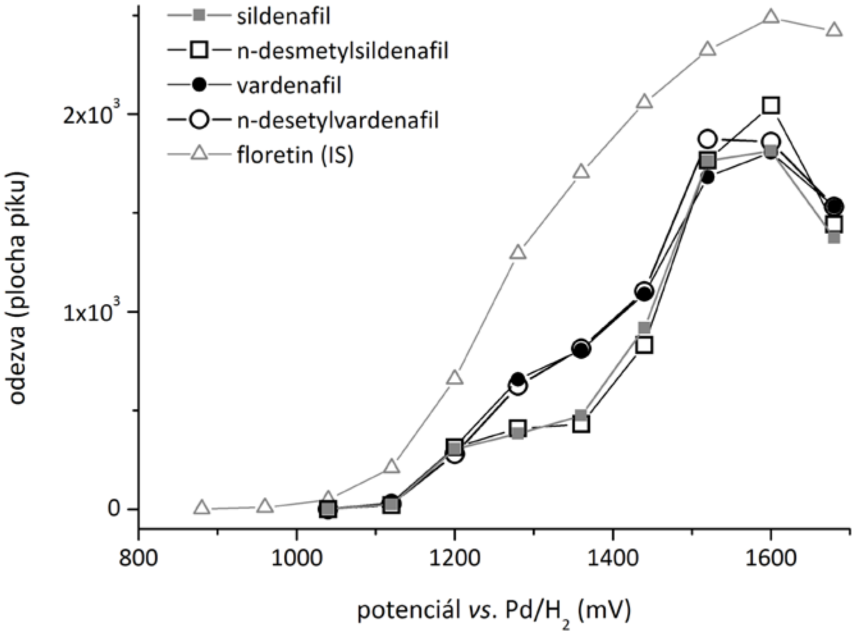


Obr. 8: Množství organické složky MF a jeho vliv na separaci studovaných PDE5 inhibitorů.
Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.4.

Na základě výsledků výše popsaných experimentů byly stanoveny konečné chromatografické podmínky separace. Mobilní fáze obsahovala 30 % organické složky a 70 % vodné složky, přičemž organická složka byla tvořena acetonitrilem a vodná složka sestávala z pufru tvořeného 20 mM dihydrogenfosforečnanem sodným a 40 mM

chloristanem sodným. pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 3,5. Odezva amperometrických detektorů závisí nepřímo úměrně na rychlosti průtoku mobilní fáze, s ohledem na tento fakt a na základě hodnot zpětného tlaku kolony a subjektivního posouzení tvaru píků byla zvolena rychlost průtoku mobilní fáze 0,2 ml min^{-1}. Za těchto podmínek proběhla celá separace během 12 minut, přičemž začátek chromatogramu nabízí dostatečně velké separační okno pro eluci eventuálních nečistot z matrice vzorku.

Mimo optimalizace chromatografické separace je nutné zvolit vhodné podmínky detekce, resp. detekční potenciál. K tomuto účelu obvykle slouží hydrodynamický voltamogram, který sleduje závislost odezvy látek na potenciálu vloženém na pracovní elektrodě. Hydrodynamické voltamogramy jednotlivých analytů včetně IS jsou uvedeny na Obr. 9. Z obrázku je patrné, že elektrochemické chování původních drog a jejich příslušných metabolitů se dle očekávání neliší. Mimoto je evidentní, že k elektrochemické konverzi všech studovaných látek dochází při vysokých pozitivních potenciálech s maximem, které odpovídá přibližně hodnotě +1600 mV (*vs.* Pd/H_2). Nicméně vysoký potenciál deponovaný na elektrodu se začal projevovat negativně na chromatografickém záznamu, neboť významně narostl nízkofrekvenční šum a navíc se výrazně prodloužila doba nutná ke kompenzaci nabíjecího proudu, z těchto důvodů byl pro detekci zvolen potenciál +1520 mV (*vs.* Pd/H_2), při němž se zmíněné efekty uplatňovaly v omezené míře nebo vůbec. Signál BDD elektrody v DC módu byl stabilní a reprodukovatelný i při opakovaných nástřicích vzorku. Al-Ghazawi a jeho kolegové publikovali pro stanovení sildenafilu a jeho hlavního metabolitu metodu HPLC-ED, která využívala anodické oxidace na elektrodě ze skelného uhlíku při poteniálu +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl) v pulzním režimu [89]. Pulzní režim se využívá v případech, kdy dochází k pasivaci elektrodového povrchu a postupné ztráty signálu, nicméně jeho nevýhodou je snížení citlivosti detekce. Povrch BDD elektrody je vůči pasivaci odolnější a použití pulzního módu nebylo nutné.



Obr. 9: HDV studovaných PDE5 inhibitorů a použitého vnitřního standardu.
Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.4.

K extrakci a prekoncentraci analytů z krevní plasmy byla zvolena jednoduchá *l-l* extrakce vhodným rozpouštědlem. Při volbě extrakční podmínek byl kladen důraz na nízkou spotřebu vzorku, aby se metoda mohla uplatnit i v případech, kdy je dostupné množství vzorku omezené, tedy např. u neonatálních pacientů nebo ve forenzní analýze. Na dvou koncentračních hladinách studovaných látek jsem testovala výtěžnost extrakce pro dvě organická rozpouštědla – ethylacetát a methyl-*terc*-butylether. Z tohoto hlediska se lépe osvědčil methyl-*terc*-butylether – získaná data jsou shrnuta v Tab. 3. Extrakce ethylacetátem poskytovala nižší výtěžky zejména pro nižší koncentraci, která odpovídá očekávaným fyziologickým hladinám.

Tab. 3: Výtěžnost extrakce methyl-*terc*-butyletherem (MTBE) a ethylacetátem (EtAc) v procentech

	SL	DSL	VR	DVR
c_{MTBE} = 400 ng ml^{-1}	96±5	117±1	108±6	115±2
c_{MTBE} = 50 ng ml^{-1}	43±1	38±12	64±9	61±7
c_{EtAc} = 400 ng ml^{-1}	94±2	95±1	86±1	89±2
c_{EtAc} = 50 ng ml^{-1}	32±16	32±13	34±15	34±7

SL – sildenafil, DSL – desmethylsildenafil, VR – vardenafil, DVR – desethylvardenafil

Vzhledem k povaze vzorku je bezesporu výhodnější využít pro kalibraci metodu vnitřního standardu. Pro všechny studované látky je kalibrace z matrice (lidská krevní plasma) lineární v rozsahu 10 – 400 ng ml^{-1} (viz Tab. 4). Po požití 50 mg tablety sildenafilu dosahuje jeho max. plazmatická koncentrace hodnoty přibližně 200 ng ml^{-1} a pro jeho hlavní metabolit DSL 80 ng ml^{-1}, po 15 hodinách od požití uvedené dávky se koncentrace obou látek pohybuje přibližně na úrovni 10 ng ml^{-1}. [89] Dosažené limity kvantifikace i rozsah kalibrace jsou tedy pro analýzu reálných vzorků dostatečné. Obr. 10 znázorňuje separaci PDE5 inhibitorů na fyziologických hladinách ve vzorku krevní plasmy, který byl upraven dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2.3.

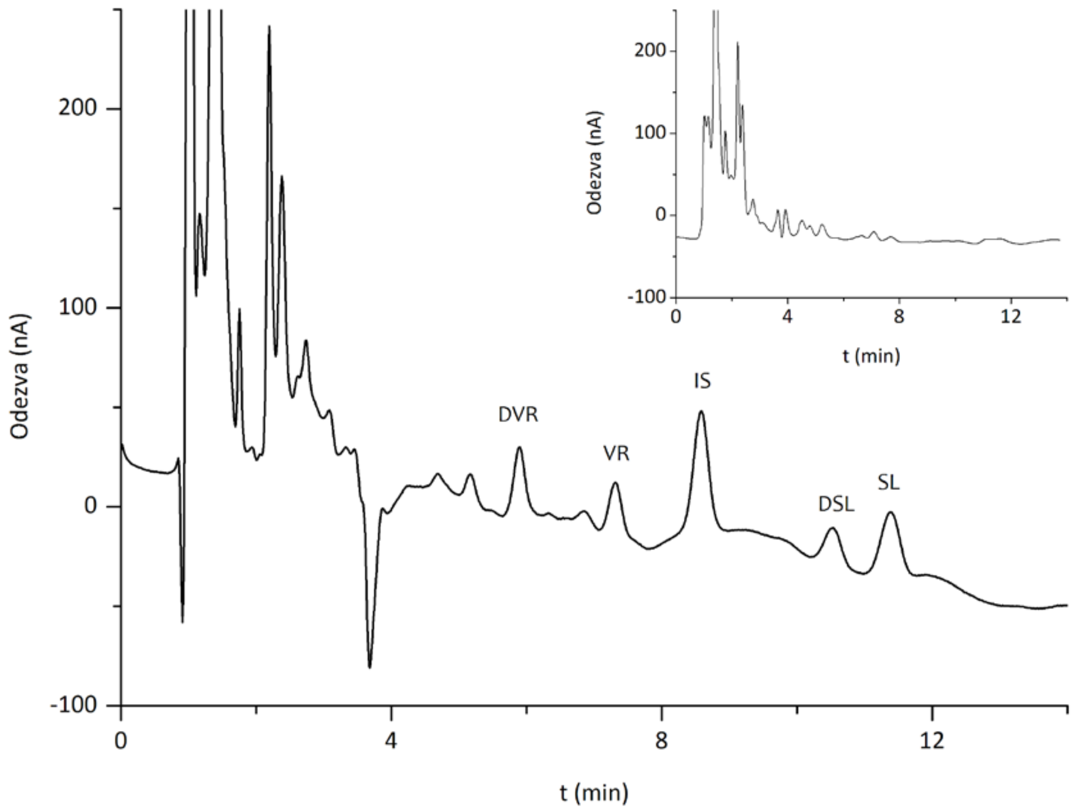
Tab. 4: Základní validační a kalibrační charakteristiky metody

	Opakovatelnost[a] Plocha RSD (%)	Opakovatelnost[b] Plocha RSD (%)	LOQ (ng ml^{-1})	směrnice (*a*)	úsek (*b*)	r^2
SL	4,3	5,3	7,7	3,0500	−0,3275	0,9958
DSL	3,3	6,3	13,4	1,9318	−0,3107	0,9918
VR	3,9	6,4	9,3	1,7927	−0,1937	0,9979
DVR	4,9	7,9	7,0	1,5593	−0,1612	0,9991

[a] (n=6, c=200 ng ml^{-1}), v rámci jednoho dne

[b] (n=5, c=200 ng ml^{-1}), mezi jednotlivými dny

Dosažené výsledky potvrzují výhodné elektroanalytické vlastnosti BDD elektrod zmíněné již v teoretické části práce (kapitola 3.3.1). Během měření elektroda nevykazovala známky pasivace povrchu a nevyžadovala elektrochemické čištění, vyznačovala se rychlým poklesem nabíjecího proudu a nízkým proudovým pozadím i šumem. Tenkovrstevná BDD elektroda se osvědčila při detekci obtížně oxidovatelných látek a vyvinutá HPLC metoda je dostatečně citlivá i pro klinické aplikace.



Obr. 10: Chromatrogram reálného vzorku - extrakt krevní plasmy s přídavkem studovaných analytů
Koncentrace PDE5 inhibitorů je 50 ng ml^{-1} (vnitřního standardu 150 ng ml^{-1}); vložený chromatogram: záznam blanku krevní plasmy. Legenda: SL-sildenafil, DSL-desmethylsildenafil, VR-vardenafil, DVR-desethylvardenafil. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.4.

5 MIKROELEKTRODY Z UHLÍKOVÉHO VLÁKNA V HPLC

5.1 Experimentální část

5.1.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

5.1.1.1 Chemikálie

Standardy fenolických kyselin (gallová, gentisová, 4-hydroxybenzoová, kávová a protokatechová) byly pořízeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standardy bromovaných fenolů (4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol, 2,4,6-tribromofenol, 3,3´,5,5´-tetrabromobisfenol A) byly zakoupeny u firmy Fluka (Fluka AG, Buchs, Švýcarsko). Standard 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxodGuo) byl pořízen u firmy Sigma-Aldrich s.r.o (St. Louis, MO, USA).

Standardy sacharidů (dextran, galaktóza, glukóza, fruktóza, laktóza, maltóza, rafinóza, sacharóza, xylóza) byly zakoupeny u firmy Riedel-deHaën (Seelze, Německo) nebo Supelco (Bellefonte, PA, USA).

K přípravě pufrů pro mobilní fáze se používal hydrogenfosforečnan sodný a/nebo dihydrogenfosforečnan sodný, kyselina fosforečná a hydroxid sodný (všechny chemikálie v čistotě TraceSelect), chloristan sodný (HPLC grade) – všechny uvedené chemikálie byly zakoupeny u firmy Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Z organických rozpouštědel se využíval acetonitril, methanol a methyl-*terc*-butylether, všechna rozpouštědla (v čistotě gradient grade) byla pořízena u firmy Labscan (Dublin, Irsko) nebo Merck (Darmstadt, Německo). Voda byla získaná reverzní osmózou systémem Millipore Smart Direct Q-3 UV (Merci, Brno, Česká republika).

Plazma pro analýzy byla získána od zdravého dobrovolníka.

5.1.1.2 *Přístrojové vybavení*

Chromatografický systém pro HPLC sestával z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582), guard cely (model 5020) a coulometrického detektoru Coulochem III, vybaveného standardní analytickou celou (model 5010A), vše ESA Inc. (MA Chelmsford, USA) nebo amperometrickou celou vytvořenou dle schématu na Obr. 11 osazenou mikroelektrodou z uhlíkového vlákna a Ag/AgCl srovnávací mikroelektrodou L-Chem (Olomouc, Česká republika) nebo Innovative Instruments, Inc. (Tampa, FL, USA).

Vzorky byly nastřikovány do systému skleněnou mikrostříkačkou (Hamilton, Reno, USA) o objemu 25 nebo 10 µl prostřednictvím manuálního dávkovacího ventilu (Rheodyne, Cotati, USA) s 2,5 µl nebo 10 µl smyčkou. Veškerá těsnění, spojky, ferulky a kapiláry byly z polymerního materiálu PEEK®.

V rámci prováděných experimentů byly použity následující HPLC kolony: Ascentis C18-A 100 mm × 2,1 mm I.D., 3 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Supelco C18 250 mm × 2,1 mm I.D., 3 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Nucleodur Gravity C8 250 mm × 2,1 mm I.D., 5 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo), Hypercarb™ 100 mm × 2,1 mm I.D., 5 µm (Thermo Scientific);

Záznam měření z detektoru a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno prostřednictvím softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány s využitím softwaru OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

5.1.2 PRACOVNÍ POSTUPY A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY

5.1.2.1 *Úprava uhlíkových mikroelektrod*

Povrch uhlíkových mikroelektrod se před instalací do detektoru aktivoval pomocí elektrochemické úpravy. Mikroelektroda se umístila do elektrochemické cely, která obsahovala 1 % roztok NaCl (w/w) a argentochloridovou srovnávací elektrodu. Po dobu 20 s se na CFME vkládaly opakované napěťové pulsy 0 a +2,9 V sinusoidálního charakteru

s frekvencí 50 Hz, po té následoval 5 s dlouhý puls při potenciálu -0,8 V a 5 s dlouhý puls při +1,5 V.

5.1.2.2 *Roztoky standardů*

Z přesných navážek pevných standardů se připravily metanolické nebo vodné zásobní roztoky o koncentraci 1 mg ml^{-1} nebo 2 mg ml^{-1}. Zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -20°C. Pracovní roztoky standardů se připravovaly ředěním zásobních roztoků vodou nebo mobilní fází.

5.1.2.3 *Mobilní fáze*

Analýza fenolických kyselin

Není-li uvedeno jinak, pufr pro mobilní fázi sestával z 50 mM dihydrogenfosforečnanu sodného s přídavkem chloristanu sodného o výsledné koncentraci 20 mmol l^{-1}. Pufr se smíchal s acetonitrilem v poměru 85/15 (v_{aq}/v_{org}) a pH výsledné mobilní fáze se upravilo pomocí kyseliny fosforečné na hodnotu 3,0. Před použitím se mobilní fáze přefiltrovala přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odplynila pomocí helia.

Analýza bromovaných fenolů

Není-li uvedeno jinak, mobilní fáze sestávala z 50 mM dihydrogenfosforečnanu sodného, methanolu a acetonitrilu v poměru 35/15/50 (v/v/v), pH výsledné mobilní fáze se upravilo pomocí kyseliny fosforečné na hodnotu 3,5. Před použitím se mobilní fáze přefiltrovala přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odplynila pomocí helia.

Analýza markeru oxidativního poškození DNA (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin)

Není-li uvedeno jinak, mobilní fáze sestávala z methanolu a 25 mM hydrogenfosforečnanu sodného v poměru 10/90 (v/v), pH pufru bylo upraveno pomocí kyseliny fosforečné na

hodnotu 6,2. Před použitím se mobilní fáze přefiltrovala přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odplynila pomocí helia.

Analýza sacharidů

Mobilní fáze sestávala z acetonitrilu a 0,025 M hydroxidu sodného v poměru 3/97 (v/v). Před použitím se mobilní fáze přefiltrovala přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odplynila pomocí helia.

5.1.2.4 Chromatografické podmínky

Pokud není uvedeno jinak, základní podmínky chromatografické analýzy a elektrochemické detekce byly následující:

Analýza fenolických kyselin

HPLC kolona: Ascentis C18-A 3 μm, 100 mm × 2,1 mm I.D.

Pracovní elektroda: CFME.

Mobilní fáze: 0,05 M NaH_2PO_4 + 0,02 M $NaClO_4$/ACN (85/15, v/v), pH = 3,0, příprava viz kapitola 5.1.2.3.

Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.

Potenciál analytické cely s CFME: +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl).

Rozsah citlivostí potenciostatu: 0,5 – 20 nA . V^{-1}.

Analýza bromovaných fenolů

HPLC kolona: Supelco C18 3 μm, 250 mm × 2,1 mm I.D.

Pracovní elektroda: CFME.

Mobilní fáze: 0,05 M NaH_2PO_4/MeOH/ACN (35/15/50, v/v/v), pH = 3,5, příprava viz kapitola 5.1.2.3.

Průtoková rychlost: 0,3 ml min^{-1}.

Potenciál analytické cely s CFME: +1450 mV (*vs.* Ag/AgCl).

Rozsah citlivostí potenciostatu: 1 – 10 nA . V^{-1}.

Analýza markeru oxidativního poškození DNA (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin)

HPLC kolona: Nucleodur Gravity C8 5 µm, 250 mm × 2,1 mm I.D.

Pracovní elektroda: CFME.

Mobilní fáze: 0,025 M Na2HPO4 (pH = 6,2)/MeOH (90/10, v/v), příprava viz kapitola 5.1.2.3.

Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.

Potenciál analytické cely s CFME: +800 mV (*vs.* Ag/AgCl).

Rozsah citlivostí potenciostatu: 1 – 10 nA . V^{-1}.

Analýza sacharidů

HPLC kolona: Hypercarb™ 5 µm, 100 mm × 2,1 mm I.D.

Pracovní elektroda: Cu-CFME (uhlíkové vlákno pokryté nanostrukturovanou vrstvou mědi).

Mobilní fáze: 0,025 M NaOH/ACN (97/3, v/v), příprava viz kapitola 5.1.2.3.

Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.

Potenciál analytické cely s Cu-CFME: +500 mV (*vs.* Ag/AgCl).

Citlivost potenciostatu: 10 nA . V^{-1}.

5.1.2.5 Úprava vzorků

Vzorek plastu k analýze bromovaných fenolů

Vnější plastový kryt CRT monitoru z roku 1995 byl narušen elektrickým brusným nástrojem (Dremel), 100 mg jemného prášku se suspendovalo ve 2 ml methyl-*terc*-butyletheru. Alikvotní podíl (1 ml) byl odpařen a vysušen pod proudem N_2 do sucha. Odparek byl rekonstituován 0,2 ml MF a analyzován.

Slepý vzorek (blank) představovaly 2 ml methyl-*terc*-butyletheru odpařeného do sucha proudem N_2, odparek byl opět rekonstituován 0,2 ml MF a analyzován.

Pro kvantitativní stanovení TBBA ve vzorku byla použita metoda standardního přídavku.

Vzorek vody k analýze bromovaných fenolů

Vzorek vody byl odebrán z veřejné vodovodní sítě. Před samotným odběrem se voda nechala 10 minut volně odtékat. Vzorek vody se přefiltroval přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm, takto upravená voda se použila jednak jako slepý vzorek a jednak jako rozpouštědlo pro přídavek standardů 4-bromofenolu, 2,4-dibromofenolu, 2,6-dibromofenolu a 2,4,6-tribromofenolu. Vzorek vody s přídavkem všech uvedených analytů o výsledné koncentraci 25 ng ml^{-1} byl připraven k analýze.

Aplikace CFME při analýze 8-oxodGuo

Vzorky krevní plasmy pacientů s rakovinou prostaty poskytla FN v Olomouci. Vzorky plasmy byly zpracovány ultrafiltrací přes membránový filtr Microcon YM 10 (cut-off 10 kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Německo) za použití centrifugy (7200 × g, 30 min), tak došlo k oddělení vysokomolekulárních látek. Filtrát byl připraven přímo k nástřiku do HPLC systému.

Vzorek zdravého dobrovolníka byl zpracován stejným způsobem.

5.1.2.6 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody

Pro zjištění kalibračních parametrů vyvinutých metod byla použita metoda vnějšího standardu.

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly zjištěny s použitím rovnic LOD = $3.3\sigma/b$ a LOQ = $10\sigma/b$, kde σ představuje standardní směrodatnou odchylku signálu základní linie ze 6 signálů při analýze slepého vzorku a b je směrnice odpovídající křivky.

5.2 Výsledky a diskuze

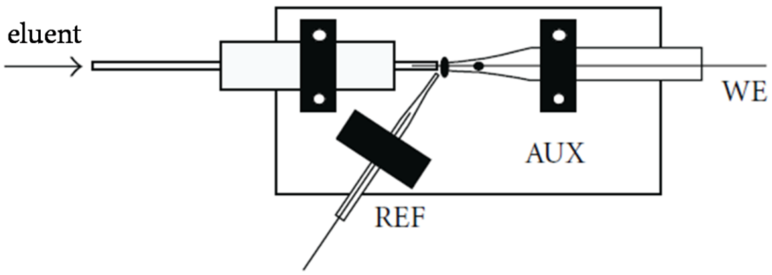
Klíčové vlastnosti elektrod jsou dány nejen použitým materiálem, ale také tvarem a velikostí, jak je evidentní u systémů na bázi mikroelektrod.

Uhlíková vlákna se vyrábí pyrolýzou vhodných prekurzorů – např. polyakrylonitril nebo smola (dehet). V závislosti na použité vstupní surovině a výrobním postupu se liší i mikrotextura vzniklých vláken, nejčastěji v příčném řezu převládá radiální, cibulovité nebo snopkovité („PAN-AM“) uspořádání grafitických vrstev [16], mimoto se rozlišuje ještě několik dalších typů uspořádání - radiální zvlněné, nahodilé či smíšené. Hrany a poruchy grafitické vrstvy (mřížky) jsou reaktivnější než bazální vrstvy a obsahují také významná množství kyslíkatých funkčních skupin [16]. Je zřejmé, že i elektrochemická aktivita vlákna je dána jeho mikrostrukturou.

Kromě výborných mechanických a elektrických vlastností nabízí CF možnost zvýšit citlivost a/nebo selektivitu vhodnou úpravou jejich povrchu, což je z pohledu analytické chemie výhodná vlastnost. Elektrochemická úprava (elektrooxidace nebo elektroredukce) povrchu CF je elegantní a rozšířená metoda, protože je efektivní, dobře reprodukovatelná a rychlá. Tímto způsobem lze např. zvýšit podíl povrchových funkčních skupin obsahujících kyslík (např. karbonyl-, karboxyl-, chinon, ether, ester a hydroxyl), označovaných také jako grafitické oxidy. Dle publikovaných dat se na reaktivní místa na uhlíku vážou převážně karbonylové a hydroxylové skupiny. Tyto skupiny regulují rychlost elektronového přenosu pro mnoho electroaktivních látek. Tento efekt lze potlačit specifickým pokrytím těchto skupin derivatizací (k pokrytí hydroxylových skupin lze použít Lucasovo činidlo, v případě karbonylových skupin pak dinitrofenylhydrazin). V rámci elektrochemické úpravy povrchu dochází také k postupnému narušování kompaktních povrchových vrstev vlákna. Následkem toho se odhalí neuspořádaná vnitřní struktura vlákna, která disponuje větším počtem aktivních míst resp. elektrochemicky aktivním povrchem.

Z hlediska selektivity je výhodné modifikovat povrch CFME vrstvami kovů a využívat jejich katalytických účinků – příklad analytického využití CFME pokrytých nanostrukturovanou vrstvou mědi je diskutován v kapitole 5.2.4.

Elektrochemicky upravené CFME se osvědčily např. při analýze NO, dopaminu či askorbové kyseliny za voltametrických (statických) podmínek [17], současně autoři této publikace také prokázali, že elektrochemicky upravené CFME poskytují pro uvedené analyty vyšší proudové odezvy než neupravené. Dalším logickým krokem bylo zařazení těchto elektrod do průtokových měření. Pro spojení se separačními metodami, jako je HPLC nebo CE, je v současnosti hlavním limitujícím faktorem nedostupnost komerčního detekčního systému na bázi mikroelektrod.
V rámci své disertační práce jsem studovala využití mikroelektrodového detekčního systému na bázi jednoho uhlíkového vlákna ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Princip uspořádání použité detekční cely je schematicky znázorněn na Obr. 11.

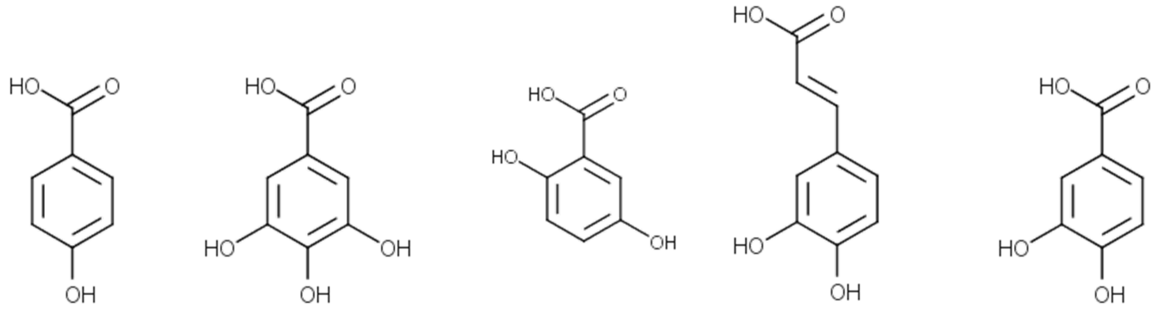


Obr. 11: Uspořádání detekční cely pro HPLC

5.2.1 Analýza fenolických kyselin [9]

Základní analytické charakteristiky výše uvedeného uspořádání byly testovány na analýze modelové směsi vybraných fenolických kyselin (gallová, protokatechová, gentisová, 4-hydroxybenzoová a kávová). Fenolické kyseliny jsou známé pro své antioxidační účinky a

přirozeně se vyskytují v různých částech rostlin, včetně plodů a také produktech z nich (potravinářských i kosmetických). Fenolické látky lze poměrně snadno oxidovat a této vlastnosti se také využívá při jejich analýze [90, 91].

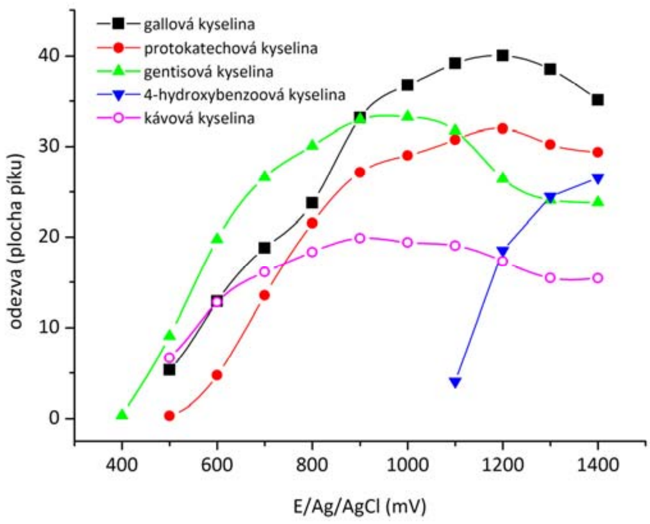


1 2 3 4 5

Obr. 12: Chemická struktura studovaných fenolických kyselin
1) 4-hydroxybenzoová kyselina, 2) gallová kyselina, 3) gentisová kyselina, 4) kávová kyselina, 5) protokatechová kyselina.

Mikroelektrodové systémy jsou kompatibilní s mikrokolonovými technikami, k separaci modelového setu fenolických kyselin byla použita 2,1 × 100 mm narrow-bore kolona. Závislost odezvy jednotlivých fenolických látek na vloženém potenciálu graficky znázorňuje HDV na Obr. 13. Z HDV je patrné, že se elektrochemická aktivita studovaných látek liší – zejména v závislosti na počtu hydroxylových skupin vázaných na benzenovém jádře, mimo to se uplatňují i sterické efekty a vlastní mechanismus oxidace [92].

Pro další experimenty byl zvolen potenciál +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl). Pro klasické uhlíkové elektrody není používání tak vysokých potenciálů obvyklé, protože může docházet k jejich degradaci. Nicméně na CFME nebyly pozorovány žádné významné změny ani při opakovaných měřeních, mimoto se základní proudový signál vyznačoval nízkým šumem vysokofrekvenčního charakteru. Ve shodě s teorií [14, 15] CFME vyžadovala ke kompenzaci nabíjecích proudů velmi krátkou dobu – kratší než je tomu u velkoplošných elektrod.



Obr. 13: HDV studovaných fenolických kyselin
Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

Závislost odezvy na koncentraci měla lineární charakter v rozsahu 5–100 ng ml^{-1} pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 0,5-100 ng ml^{-1} pro ostatní fenolické kyseliny, dosažené korelační koeficienty příslušných kalibračních závislostí měly hodnotu vyšší než 0,999 (viz Tab. 5). Odhad LOD pro všechny studované látky v modelové směsi s výjimkou 4-hydroxybenzoové kyseliny se pohyboval v řádu stovek pmol l^{-1}.

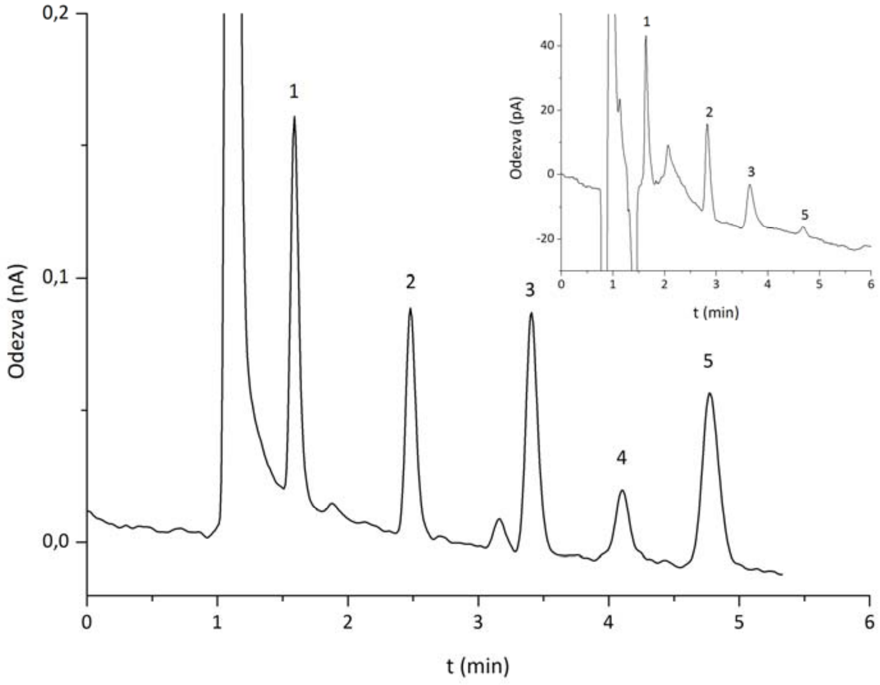
Tab. 5: Kalibrační parametry a limity detekce

	směrnice (*a*) *y = ax + b*	úsek (*b*)	r^2	LOD (pg ml^{-1})	LOD (nmol l^{-1})	Opakovatelnost[a] Plocha RSD %
gallová kyselina	0,36435	0,50998	0,99913	45,3	0,27	2,4
protokachová kyselina	0,41324	0,95112	0,99912	39,9	0,26	2,3
gentisová kyselina	0,35023	0,28650	0,99995	47,1	0,31	2,1
4-hydroxybenzoová kyselina	0,02738	-0,00785	0,99946	1205,2	8,7	2,7
kávová kyselina	0,34307	0,22750	0,99998	57,7	0,32	2,0

[a] v rámci jednoho dne, (n=5, c = 10 ng ml^{-1})

Využití kolon s vnitřním průměrem menším než 2.1 mm by mohlo dále přispět ke zvýšení citlivosti [22]. Chromatogram na Obr. 14 znázorňuje separaci vybraných fenolických kyselin na úrovni desítek a stovek femtomolů (vyjádřeno jako absolutní množství na koloně). Nízký objem detekční cely snižuje efekt rozmytí separovaných zón, v důsledku toho nedochází k významným ztrátám rozlišení, píky jsou vyšší a užší (např. pro kapiláru o

průměru 50 μm a délku inkorporované CFME 2 mm činí mrtvý objem cely 16 nl, deklarovaný vnitřní objem komerční coulometrické cely Thermo Scientific je 7,1 μl [93]).



Obr. 14: Ukázka separace modelové směsi fenolických kyselin o koncentraci 10 ng ml^{-1}
Vložený chromatogram – analýza fenolických kyselin o koncentraci 1 ng ml^{-1} (2,5 pg „on-column“). Legenda: 1) gallová kyselina, 2) protokatechová kyselina, 3) gentisová kyselina, 4) 4-hydroxybenzoová kyselina, 5) kávová kyselina. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

5.2.2 ANALÝZA BROMOVANÝCH FENOLŮ [36]

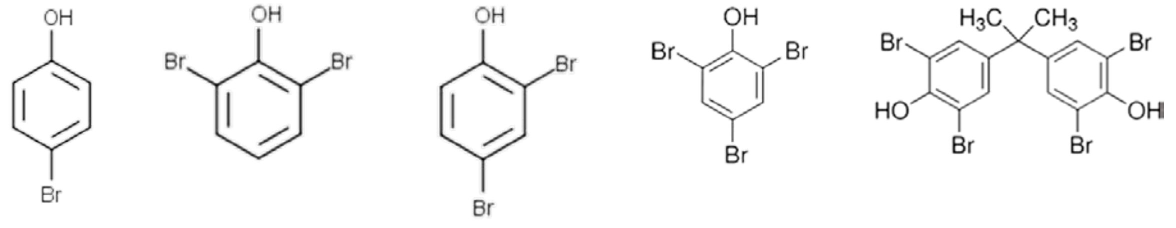
Detekční systém na bázi CFME se ve spojení s HPLC experimentálně osvědčil a splnil veškerá očekávání dle teoretických předpokladů. Pro další experimenty byla zvolena skupina fenolických látek environmentálního významu – bromované fenoly (BF).

Do skupiny bromovaných fenolů se řadí látky jak přírodního, tak antropogenního charakteru. Komerčně se tyto látky využívají pro své fungicidní účinky [94] a také se přidávají do plastů, kde působí jako retardanty procesu hoření [95]. V předchozích desetiletích dramaticky vzrostla produkce syntetických polymerů a společně s tím i

bromovaných retardantů hoření. V důsledku toho vzrostl také výskyt těchto látek v životním prostředí (ŽP) [95, 96]. Stejně jako jiné halogenové organické látky i bromované retardanty hoření jsou jen omezeně biologicky odbouratelné, patří tedy mezi perzistentní látky se schopností bioakumulace [96]. Jejich residua byla nalezena ve vejcích a tkáních rybožravých ptáků [97-99] a savců, např. polárních medvědů [100].

Monobromované a dibromované fenoly si přirozeně vytváří některé mořské organismy (např. řasy *Sargassum siliquastrum, Padina arborescens* nebo *Lobophora variegata*), jejich role není dosud zcela objasněna, ale předpokládá se, že plní protektivní funkci, protože na ostatní organismy působí toxicky [101, 102].

Kromě akutních toxických účinků BF na vodní organismy jsou v literatuře popsány nefrotoxické [101], imunotoxické a neurotoxické účinky [103], navíc některé z nich (např. 2,4–dibromofenol, 2,4,6–tribromofenol nebo tetrabromobisfenol A) působí jako endokrinní disruptory [101, 103] (tj. narušují fyziologické funkce endogenních hormonů zvířat i člověka; zasahují do syntézy, sekrece, transportu, vazby, působení i vylučování přirozených, organismu vlastních hormonů, v důsledku toho mohou poškozovat vývoj, neurologické, rozmnožovací a imunitní funkce organismu).



1 2 3 4 5

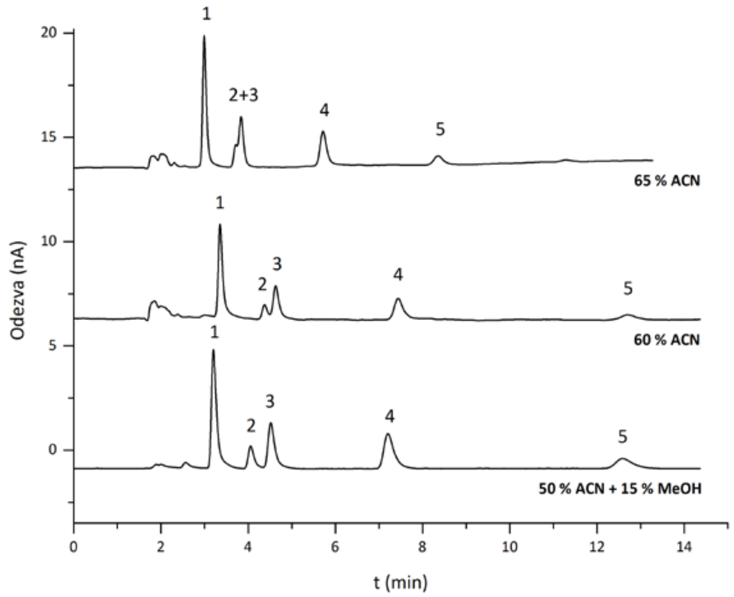
Obr. 15: Chemická struktura studovaných bromovaných fenolů

1) 4-bromofenol, 2) 2,6-dibromofenol, 3) 2,4-dobromofenol, 4) 2,4,6-tribromofenol, 5) 3,3´,5,5´-tetrabromobisfenol A

Vedle 4-bromofenolu (4-BP), 2,4-dibromofenolu (2,4-DBP), 2,6-dibromofenolu (2,6-DBP a 2,4,6-trobromofenolu (2,4,6-TBP) byl do studie zařazen průmyslově nejčastěji využívaný BF 3,3´,5,5´-tetrabromobisfenol A (TBBA), který se přidává především do akrylonitril-butadienstyrenu (ABS), fenolových a epoxidových pryskyřic, které jsou součástí plošných spojů. Stopy TBBA byly nalezeny v kancelářském a domácím prachu [104, 105] a také

v krevním séru pracovníků s IT technikou [106]. Struktura TBBA se podobá hormonu thyroxinu, z tohoto důvodu také TBBA kompetuje s thyroxinem o vazbu na transportní protein transthyretin, tím narušuje funkci důležitého hormonu štítné žlázy. TBBA přispívá také ke zvyšování koncentrace 2,4,6-TBP v ŽP, protože je jedním z produktů fotodegradace TBBA [96, 101].

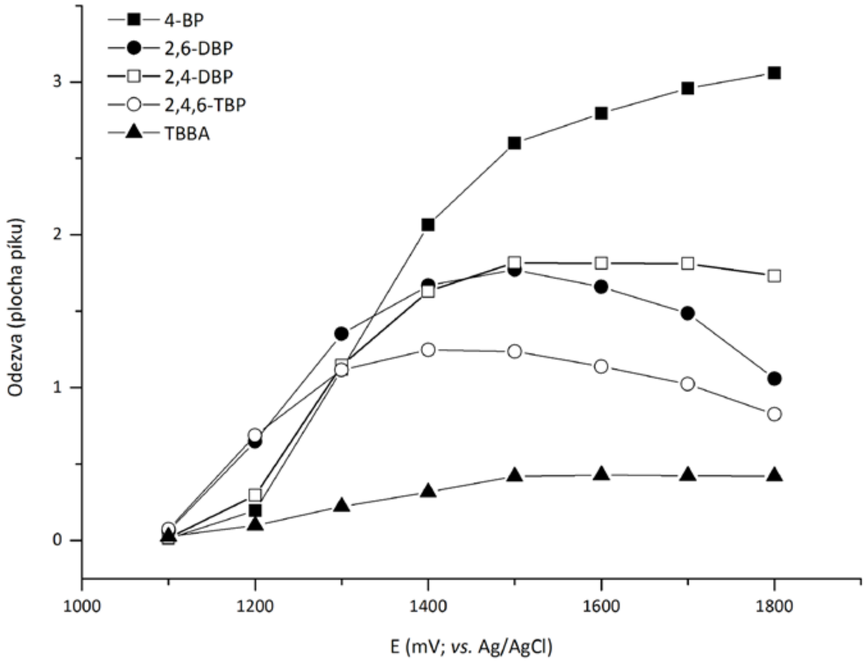
Pro separaci studovaných látek byla zvolena narrow-bore kolona s oktadecylovou vázanou fází. Z hlediska separačních podmínek se pro skupinu studovaných látek osvědčilo ternární složení mobilní fáze, které ovlivnilo selektivitu systému ve smyslu lepšího rozlišení kritického páru 2,4-DBP, 2,6-DBP (Obr. 16).



Obr. 16: Obsah organické složky v MF a její vliv na sepraraci BF
Legenda: 1) 4-BF, 2) 2,6-DBP, 3) 2,4-DBP, 4) 2,4,6-TBP, 5) TBBA. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

Mobilní fáze se z větší části (65 %) skládala z organického modifikátoru – acetonitrilu – avšak při postupném snižování podílu acetonitrilu v MF docházelo k prodlužování doby separace, přičemž efekt na rozlišení zmíněného kritického páru nebyl dostatečný. Na základě těchto výsledků bylo zřejmé, že je nutné ovlivnit separační mechanismus. Tuto úlohu splnila třetí složka MF – methanol, který nahradil část stávajícího organického modifikátoru. Ve výsledku byla MF tvořena 50 % acetonitrilu, 15 % methanolu a 35 % 50 mM H_2NaPO_4, pH 3,5.

Z HDV (Obr. 17) je patrné, že s rostoucím počtem atomů bromu na fenolovém skeletu klesá elektrochemická odezva, přičemž pro TBBA je odezva nejnižší a křivka má plochý tvar téměř přes celý měřený potenciálový rozsah. Nízká elektroaktivita TBBA je pravděpodobně zapříčiněna sterickým blokováním hydroxylových skupin objemnými atomu bromu. V této práci byla poprvé experimentálně prokázána elektroaktivita TBBA a přestože je odezva nízká, poskytuje na CFME dostatečný analyticky využitelný signál.



Obr. 17: HDV studovaných bromovaných fenolů
Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

Na základě HDV byl pro simultánní detekci studovaných BF zvolen potenciál +1450 mV *vs*. Ag/AgCl.

Linearita kalibračních křivek sestavených z ploch píků se pro 4-BP, 2,4-DBP, 2,6-DBP a 2,4,6-TBP testovala v koncentračním rozsahu 25 – 500 ng ml^{-1} a korelační koeficient byl ve všech případech vyšší než 0,99. Vzhledem k nižší odezvě TBBA byla kalibrace provedena v rozsahu 0,2 – 1,0 mg ml^{-1} a zjištěný korelační koeficient také potvrdil linearitu. Dosažené limity detekce a kvantifikace jsou dostatečné pro stanovení BF v plastech nebo jiných reálných vzorcích.

Testované validační parametry včetně opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsou shrnuty v Tab. 6.

Metoda byla ověřena na vzorku plastické hmoty získané z vnějšího krytu CRT monitoru (viz Obr. 18). Vzhledem k povaze vzorku byla pro kvantifikaci použita metoda standardního přídavku, která je schopna eliminovat matricové efekty. Metoda standardního přídavku je časově náročnější než metoda vnějšího standardu, protože je nutné vytvořit kalibraci pro každý vzorek zvlášť, což může být nevýhodné pro větší série vzorků. Avšak v případě, že není dostupný vhodný blank, poskytuje tato metoda správnější výsledky.

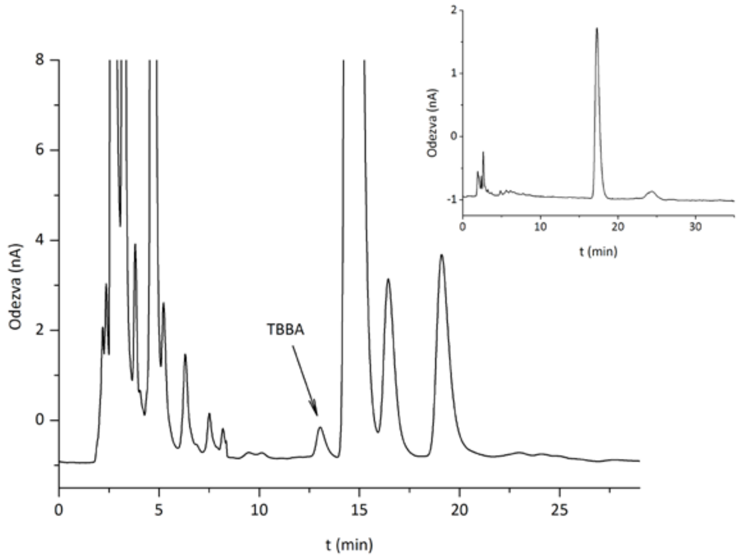
Tab. 6: Testované validační charakteristiky a kalibrační parametry

Analyt	Opakovatelnost[a] Plocha RSD (%)	Opakovatelnost[b] Plocha RSD (%)	LOD (ng ml^{-1})	LOQ (ng ml^{-1})	směrnice (*a*)	úsek (*b*)	R^2
4-BP	2,0	5,9	1,8	5,4	31,627	355,3	0,9992
2,4-DBP	1,9	6,1	4,3	13,2	18,004	74,4	0,9993
2,6-DBP	1,6	6,0	5,8	17,6	12,054	-18,1	0,9986
2,4,6-TBP	2,0	6,2	7,7	23,4	10,066	-126,2	0,9943
TBBA	2,5	6,3	56,6	171,4	4,197	21,4	0,9982

[a] v rámci jednoho dne, (n=6, c = 1 μg ml^{-1}, pro 2,4,6 TBP and TBBA c = 2 μg ml^{-1})

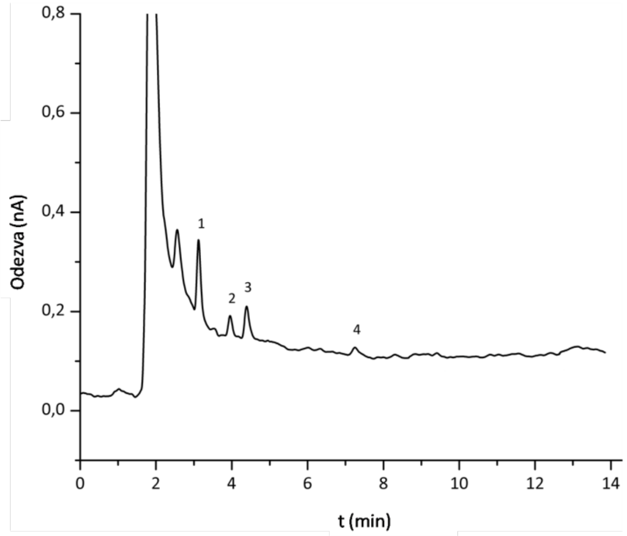
[b] mezi jednotlivými dny, (n=5, c = 1 μg ml^{-1}, pro 2,4,6 TBP and TBBA c = 2 μg ml^{-1})

Vzorek plastu byl zpracován jednoduchou extrakcí kapalinou dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2.5. Identita píku byla ověřena metodou standardního přídavku a také porovnáním elektrochemické odezvy analytu se standardem. V testovaném vzorku bylo nalezeno 10,22 mg kg^{-1} tetrabromobisfenolu A.



Obr. 18: Ukázka separace vzorku plastu odebraného z PC monitoru
Ve vzorku byl identifikován a metodou standardního přídavku kvantifikován TBBA. Vložený obrázek: chromatogram blanku. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

Jak už je zmíněno výše, BF se řadí mezi polutanty ŽP a působí škodlivě zejména na vodní organismy, z tohoto důvodu je publikována celá řada prací, která se zabývá jejich analýzou ve vodách. Mořská voda není v ČR dostupná, proto byl zvolen jednoduchý model a studované látky se přidaly do kohoutkové vody v koncentraci 25 ppb (tj. 76 – 144 nmol l^{-1}).



Obr. 19: Analýza vody s přídavkem studovaných BF na koncentrační úrovni 25 ng ml^{-1}.
Legenda: 1) 4-BF, 2) 2,6-DBP, 3) 2,4-DBP, 4) 2,4,6-TBP. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4.

Před vlastní analýzou byl vzorek vody upraven dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2.5. Pro jednotlivé BF bylo dosaženo následujících hodnot výtěžnosti: 97,1 % pro 4-BP, 107,3 %

pro 2,4 – DBP, 111,7 % pro 2,6-DBP a 113,5 % pro 2,4,6-TBP. Z těchto výsledků a z chromatogramu na Obr. 19 je zřejmé, že metoda je vhodná ke stanovení těchto BF ve vodách na úrovni desítek ppb.

5.2.3 Aplikace CFME při HPLC analýze markeru oxidativního poškození DNA

Nositelka genetické informace, deoxyribonukleová kyselina (DNA), je tvořena dvěma komplementárními páry bází: adenin-thymin a guanin-cytosin. Reaktivní volné kyslíkové radikály (např. superoxid $O_2^{\bullet-}$, hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$) způsobují oxidativní poškození DNA, v důsledku toho dochází k četným mutacím molekuly DNA a následné replikaci chyb, které mohou být příčinou rozvoje závažných chorob. Kromě exogenních zdrojů (ionizující záření, UV záření, průmyslové znečištění, kouření, některá léčiva) vznikají volné radikály přirozeně např. při buněčném dýchání nebo při reakcích katalyzovaných enzymy CYP450 [107], proto se vyvinul antioxidační obranný systém, který reguluje hladinu volných radikálů v organismu. Je-li rovnováha posunuta v neprospěch antioxidačního obranného systému, nastává oxidativní stres.

Nejsnáze oxidovatelnou bází DNA je guanin, hlavním produktem oxidativního poškození DNA je tedy 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), resp. jeho nukleosid 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosin (8-oxodGuo). Oxidovaná báze je velmi mutagenní, protože ztrácí párovou specificitu a místo cytosinu se páruje s purinovou bází adeninem. Při reparaci poškozené DNA buď specifické glykosylázy vyštěpí oxidované báze, nebo nespecifické enzymy vyštěpí fragment poškozeného vlákna a nukleotidázy následně uvolní odpovídající nukleosidy. Takto dochází ke zvyšování koncentrace 8-oxoGua a 8-oxodGuo v buňkách, krevním séru a moči [108]. V minulých letech byly obě tyto látky podrobeny rozsáhlému studiu a všeobecně jsou považovány za markery oxidativního poškození DNA a buněčného oxidativního stresu. [107, 109]

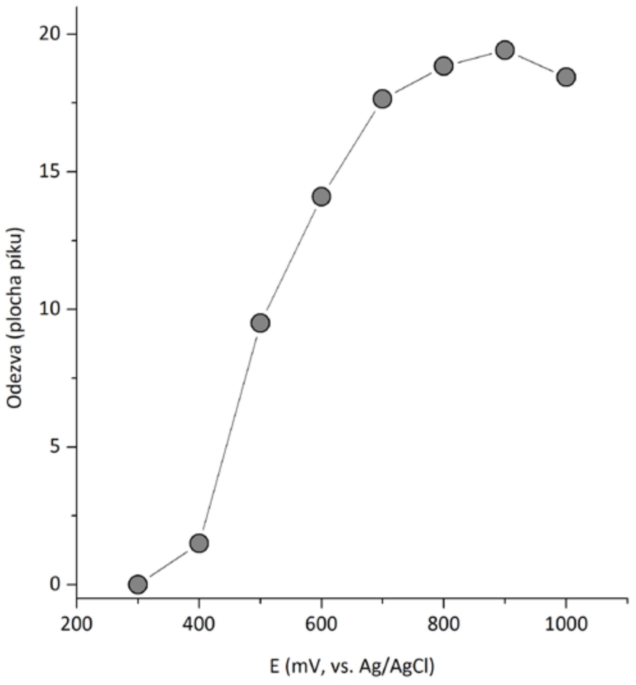
Interpretace naměřených výsledků v klinických vzorcích je poměrně složitá záležitost, nicméně zvýšené hladiny 8-oxodGuo jsou spojeny s rozvojem závažných onemocnění jako

je rakovina, diabetes, arterioskleróza, neurodegenerativní poruchy a choroby spojené se stárnutím [107-110].

Z hlediska analýzy těchto markerů se nejčastěji uplatňuje kapalinová chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí [109, 111, 112] nebo hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem [113, 114].

Oba zmíněné markery jsou elektroaktivní, ale vzhledem k tomu, že 8-oxoGua na klasických reverzních fázích vykazuje nízkou retenci, pozornost se zaměřila na 8-oxodGuo.

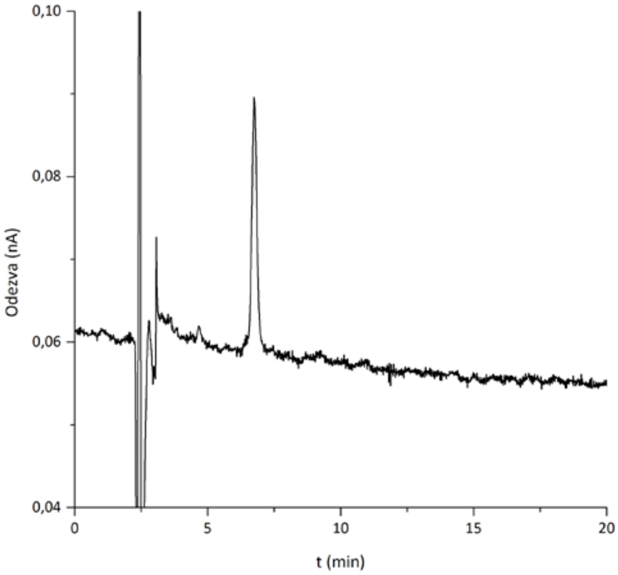
Z hydrodynamického voltamogramu na Obr. 20 je zřejmé, že 8-oxodGuo podléhá oxidaci již za nízkých potenciálů, což může být výhodné v případě, že jsou ve vzorku současně přítomny elektrochemicky aktivní nečistoty. Jejich interference lze pak omezit či vyloučit pouhým snížením pracovního potenciálu při zachování signálu analytu. V reálných vzorcích se nejlépe osvědčil potenciál +800 mV, při vyšších hodnotách pracovního potenciálu bylo měření již komplikováno interferencemi matrice a vyšším šumem.



Obr. 20: Hydrodynamický voltamogram 8-oxodGuo
Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4. [115]

Pro srovnání citlivosti různých elektrod vůči studovanému analytu byly pro modelové roztoky 8-oxodGuo proměřeny v koncentračním rozmezí 5 – 80 nmol l^{-1} (korespondujícím s obvyklými fyziologickými hladinami) kalibrační závislosti na třech CFME, připravených v různém časovém období, a porovnány směrnice získaných kalibračních křivek. Hodnoty RSD směrnic jednotlivých CFME se nelišily o více než 6 %, což lze považovat za velmi dobrý výsledek, uvážíme-li náročnost procesu přípravy uhlíkového vlákna i kompletace detekční CFME cely před jejím vřazením do HPLC systému. Parametry kalibrační křivky pro elektrodu, která byla poté použita pro analýzu reálných vzorků, byly následující: y=8,4176x - 5,9192 a R^2=0,9987.

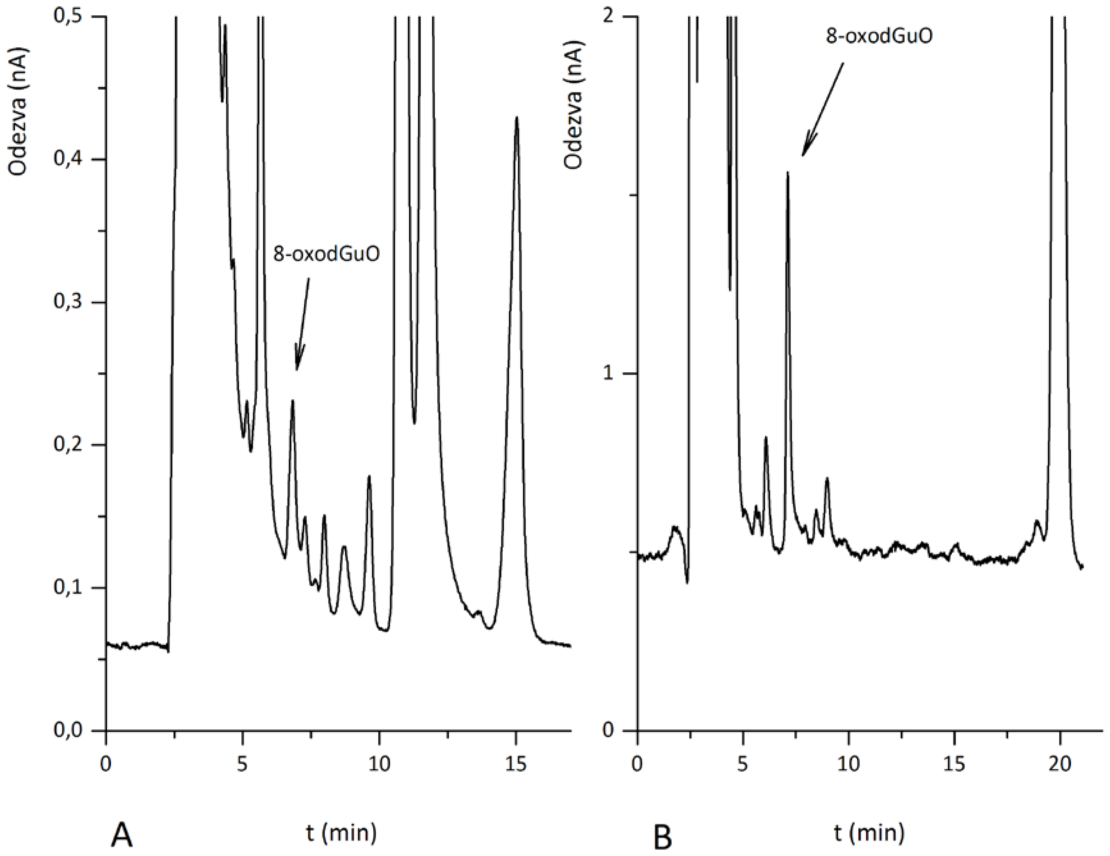
Chromatogram na Obr. 21 názorně dokumentuje značný analytický potenciál senzorů na bázi CFME. Představuje analýzu standardu 8-oxodGuo na úrovni desítek fmol (vyjádřeno jako absolutní množství analytu na koloně). Velmi malý objem detekční cely s CFME má za následek minimální rozmytí píku a přispívá tím ke zlepšení poměru signál/šum.



Obr. 21: Odezva CFME pro standard 8-oxodGuo o koncentraci 5 nmol l^{-1} (50 fmol „on column“).
Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4. [115]

Odezva byla dostatečně citlivá také pro analýzu reálných vzorků krevní plasmy - Obr. 22 porovnává hladinu studovaného markeru u zdravého jedince a pacienta trpícího rakovinou prostaty. Na první pohled je zřejmé, že koncentrace 8-oxodGuo je u nemocného přibližně o jeden řád vyšší. Identita píku byla v obou případech potvrzena metodou standardního

přídavku. Vzorky krevní plasmy byly před analýzou upraveny jednoduchou ultrafiltrací přes membránový filtr (cut-off 10 kDa), filtrát bylo možné přímo nastřikovat do HPLC systému. Je to elegantní metoda úpravy vzorku vhodná pro analyty, které se nevážou na proteiny a nevyžaduje velké množství vzorku, nevýhodou je finanční náročnost.



Obr. 22: Analýza 8-oxodGuo v reálných vzorcích krevní plasmy

A – Analýza krevní plasmy zdravého dobrovolníka, B – analýza krevní plasmy pacienta trpícího rakovinou prostaty. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.4. [115]

5.2.4 Využití CFME modifikovaných vrstvou mědi pro amperometrickou detekci sacharidů [37]

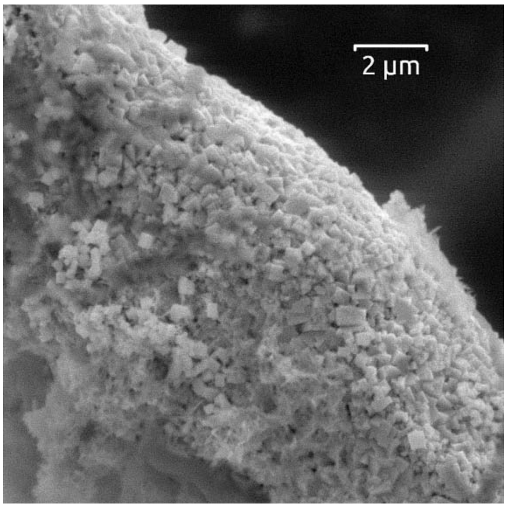
Citlivá analýza sacharidů má klíčový význam pro celou řadu oblastí, sacharidy představují však z analytického hlediska velmi problematickou skupinu látek. Jejich molekuly neobsahují chromofor, fluorofor či jinou funkční skupinu, která by usnadňovala detekci tradičními instrumentálními technikami. Klasicky se pro detekci sacharidů po předchozí HPLC separaci využívá refraktometrické detekce, která je však vzhledem ke své nízké citlivosti zcela nevhodná pro stopové analýzy.

Pro analýzy nízkých koncentrací sacharidů v rozmanitých matricích nalezla široké uplatnění amperometrická detekce s pracovními elektrodami z ušlechtilých kovů, především platiny a zlata [116-118]. Při pulsně-amperometrické detekci (PAD) se využívá skutečnosti, že sacharidy je možné na těchto kovech elektrochemicky oxidovat v silně alkalickém prostředí již za nízkých kladných potenciálů. Protože produkty takové elektrodové reakce silně kontaminují povrch elektrody a výrazně tím snižují či znemožňují její další odezvu, je nutné pracovat v pulsním režimu. Na elektrodu jsou během jednoho pracovního cyklu aplikovány v rychlém sledu potenciály různé velikosti, kdy mimo vlastní konverze analytu dochází současně také k elektrochemickému čištění elektrody a její kondicionaci. Tato technika vyžaduje složitější a dražší instrumentaci (pulsní potenciostat), přičemž limity detekce dosahované PAD bývají často horší než u technik s konstantním potenciálem [119].

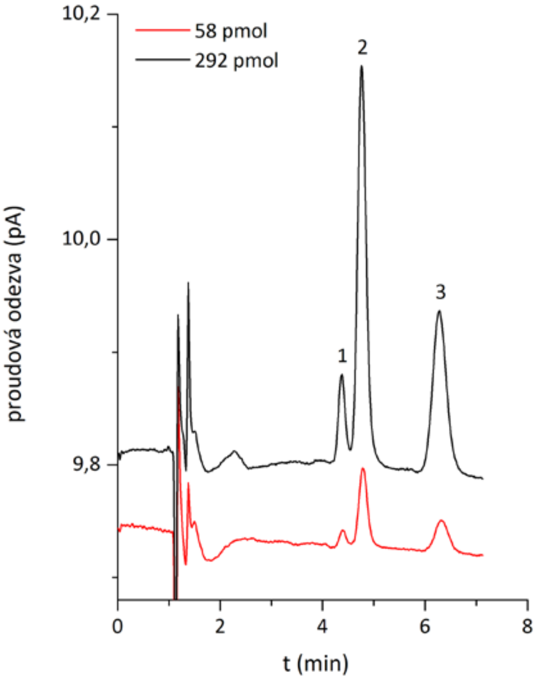
Z výše uvedených důvodů se jako atraktivní alternativa k PAD jeví přímá amperometrická detekce za konstantního potenciálu při použití pracovních elektrod na bázi mědi [10]. Při oxidaci sacharidů se předpokládá specifická katalytická spoluúčast oxidů Cu^{II}/Cu^{III} vznikajících na povrchu elektrody [120]. Přestože přesný mechanismus elektrodové reakce není dosud zcela objasněn, uvedený jev je znám už relativně dlouho. I když se v poslední době objevily práce, nově využívající elektrody modifikované nanostrukturovanými vrstvami mědi [121], (jež se vyznačují proti klasickým Cu-elektrodám některými

výhodnými vlastnosti, zejména větším elektroaktivním povrchem - tedy vyšší odezvou), širší využití takových materiálů jako senzorů pro spojení HPLC-ECD je dosud značně omezeno [122-126]. Pro oblast cylindrických mikroelektrod je pravděpodobně limitujícím faktorem také skutečnost, že mikroelektrody na principu drátků z čistého kovu jsou pro manipulace v systému HPLC-ECD příliš křehké [16].

Jak již bylo uvedeno 3.2, mikroelektrody z uhlíkových vláken (CFME) disponují celou řadou unikátních vlastností, které jsou výborně využitelné zejména při spojení s mikrokolonovou kapalinovou chromatografií a pro stopovou detekci různorodých analytů. Protože se podařilo uspokojivě zvládnout techniku elektrolytického pokovení [127], vhodnou rovněž pro modifikaci uhlíkových vláken, a s jejím využitím následně připravit CFME modifikované tenkými povrchovými vrstvami různých kovů [128], dalším logickým krokem bylo otestovat využitelnost CFME pokrytých nanostrukturovanou mědí (Cu-CFME) jako senzorů pro detekci sacharidů v systému HPLC. Jelikož analytické vlastnosti měděných elektrod pro detekci sacharidů jsou silně závislé od katalytického působení oxidů mědi na elektrodovém povrchu, byla publikována řada postupů anodické pre-oxidace elektrod, vedoucí k jejich tvorbě. Pro aktivaci povrchu připravených Cu-CFME se nicméně osvědčil jednoduchý a časově nenáročný postup, sestávající z pětiminutové elektrochemické anodizace elektrody při +700 mV (*vs.* Ag/AgCl) v roztoku 0,01M-NaOH. U takto ošetřených Cu-CFME byla pozorována změna morfologie povrchu za tvorby kubických krystalů oxidů mědi o rozměrech 50-400 nm (viz snímek ze SEM na Obr. 23).



Obr. 23: Snímek Cu-CFME po 5 min anodizace v 0,01-M NaOH při +700 mV (*vs.* Ag/AgCl), převzato z cit. [37].



Obr. 24: HPLC chromatogram vybraných sacharidů. 1-sacharóza, 2-laktóza, 3-maltóza (c_1 = 20 mg l^{-1}, c_2 = 4 mg l^{-1}). Podmínky viz kap. 5.1.2.4.

Při charakterizaci analytických vlastností Cu-CFME (upravených výše uvedeným způsobem) bylo na modelových roztocích glukózy zjištěno, že optimální odezva se nachází v potenciálovém okně mezi +500 až +700 mV (*vs.* Ag/AgCl). V režimu FIA (bez zařazené chromatografické kolony) byl detekční systém s Cu-CFME pracovní elektrodou otestován na standardech 9 sacharidů (xylóza, fruktóza, galaktóza, glukóza, sacharóza, maltóza, laktóza, rafinóza, dextran), přičemž zjištěné limity detekce se pohybovaly v rozmezí 3,5.10^{-7} až 2,9.10^{-6} mol l^{-1}. Test stability odezvy elektrody byl proveden opakovanými nástřiky laktózy po 0; 0,5; 1; 2; 3; 12; 13; 14 hod.; RSD zjištěná mezi jednotlivými nástřiky se pohybovala v rozmezí 1,6-7,2 % a zjištěná opakovatelnost odezvy mezi elektrodami byla 20 %, což lze, vzhledem k individuálním odchylkám mezi jednotlivými vlákny a dále nemožností přesně kontrolovat aktivní délku vlákna uvnitř HPLC kapiláry při osazování detekční cely, považovat za uspokojivý výsledek.

Na Obr. 24 je ukázka HPLC analýzy třech vybraných disacharidů na dvou koncentračních hladinách (vyjádřených jako absolutní množství na koloně) s pracovní elektrodou

Cu-CFME při +500 mV (*vs.* Ag/AgCl). Pro separaci byla použita HPLC kolona na bázi uhlíku, která umožňuje, na rozdíl od konvenčních kolon se silikagelem, práci v oblastech s vysokým pH bez omezení spojených s rizikem degradace stacionární fáze.

Je zřejmé, že Cu-CFME, připravené a aktivované popsaným postupem, představují účinný neenzymatický senzor pro detekci nízkých koncentrací sacharidů, zejména pak v průtokových systémech, tedy např. po jejich předchozí separaci mikrokolonovou HPLC. K tomuto využití je předurčuje zejména jejich stabilní, rychlá a citlivá odezva a v neposlední řadě miniaturní rozměry. Lze očekávat, že CFME na tomto principu by se mohly dobře uplatnit také při analýze dalších obtížně detekovatelných analytů, což zůstává předmětem dalšího výzkumu.

6 ZÁVĚR

V rámci předkládané disertační práce jsem se zaměřila na dvě oblasti amperometrické detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), a to na využití borem dopované diamantové elektrody (BDD) a mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFME). Jak BDD tak CFME se vyznačují pozoruhodnými vlastnostmi, které tyto elektrody značně odlišují od ostatních elektrodových materiálů a konstrukcí.

Výhod spojení BDD s HPLC bylo využito při vývoji citlivé metodiky vhodné ke stanovení léčiv erektilní dysfunkce a pulmonární hypertenze, sildenafilu (Viagra™) a vardenafilu (Levitra™), včetně jejich hlavních aktivních metabolitů N-desmethylsildenafilu a N-desethylvardenafilu v krevní plasmě. Z hlediska chromatografie bylo optimalizováno zejména složení pufru, jeho koncentrace a pH. Výsledkem byla dokonalá a rychlá separace (12 minut) všech analytů na krátké narrow-bore koloně s vázanou C18 fází bez nutnosti použití gradientové eluce. Detekce analytů je založena na jejich oxidaci na BDD elektrodě při potenciálu +1520 mV (*vs.* Pd/H_2). Odezva byla dobře reprodukovatelná a lineární v rozsahu koncentrací 10 – 400 ng ml^{-1} a LOQ pro jednotlivé analyty se pohybuje na úrovni 10 ng ml^{-1}. Metoda vyžaduje pouze malé množství vzorku (150 µl krevní plasmy), což může být přínosné v případě omezeného množství biologického materiálu. Metodika byla ověřena při analýze krevní plasmy s přídavkem zmíněných analytů na terapeutických koncentračních hladinách.

Vyvinutá metoda může najít uplatnění při terapeutickém monitoringu nebo ve forenzní analýze, a při vhodné úpravě vzorku také při kontrole kvality léčiv nelicencovaných distributorů.

Klíčové vlastnosti elektrod jsou dány nejen použitým materiálem, ale také tvarem a velikostí, jak je evidentní u systémů na bázi mikroelektrod. Druhá část této disertační práce

je zaměřena na využití mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFME) jako citlivých senzorů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Základní analytické charakteristiky detekčního systému na bázi CFME byly testovány na analýze modelové směsi vybraných fenolických kyselin (gallová, protokatechová, gentisová, 4-hydroxybenzoová a kávová), a rovněž při vývoji HPLC metody stanovení vybraných bromovaných fenolů (4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol, 2,4,6-tribromofenol a 3,3',5,5'-tetrabromobisfenol A).

Elektrochemický CFME detektor byl dále úspěšně otestován při analýze významného markeru oxidativního poškození DNA, 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosinu (8-oxodGuo). Citlivost a selektivita metody byla ověřena na reálných vzorcích krevní plasmy pacientů s karcinomem prostaty. Dosažené výsledky ukazují, že analytické vlastnosti CFME senzorů v tomto uspořádání mohou být dobře využitelné pro rutinní sledování hladin 8-oxodG v tělních tekutinách.

Jako značně perspektivní se jeví možnost změny selektivity CFME díky modifikaci jejich povrchu, například nanostrukturovanými vrstvami kovů. Příkladem analytické aplikace, využívající CFME modifikovanou elektrolyticky deponovanou vrstvou mědi (Cu-CFME), je stanovení vybraných sacharidů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí za konstantního potenciálu. 58 pmol laktózy, sacharózy a maltózy („on-column“) bylo detekováno na Cu-CFME při +500 mV (*vs.* Ag/AgCl) po jejich předchozí HPLC separaci v silně alkalickém prostředí. Zajímavé analytické možnosti do budoucnosti nabízí modifikace CFME také dalšími kovy.

Výše uvedené příklady dokumentují mimořádné analytické vlastnosti studovaných amperometrických detekčních systémů v kombinaci s HPLC. BDD elektrody se uplatní zejména při analýze obtížně oxidovatelných látek nebo v případech, kdy může docházet k pasivaci elektrodového povrchu. Hlavní předností CFME kromě mimořádné citlivosti je možnost modifikace povrchu mikroelektrod za účelem změny selektivity či jejich implementace do kapilárních a mikrofluidických systémů, což současně představuje perspektivní oblasti budoucího vývoje.

7 Seznam zkratek

4-BP	4 - bromofenol
2,4-DBP	2,4 - dibromofenol
2,6-DBP	2,6 – dibromofenol
2,4,6-TBP	2,4,6 – tribromofenol
BDD	borem dopovaný diamant
BF	bromované fenoly
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CE	kapilární elektroforéza
CF	uhlíková vlákna
CFME	mikroelektroda z uhlíkového vlákna (carbon fiber microelectrode)
c_{max}	maximální koncentrace
Cu-CFME	mikroelektroda z uhlíkového vlákna pokrytá nanostrukturovanou vrstvou mědi
CVD	chemická depozice par
CYP450	skupina enzymů z rodiny cytochromu P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSL	desmethylsildenafil
DVR	desethylvardenafil
ECD	elektrochemická detekce
EtAc	ethylacetát
FIA	průtoková injekční analýza
GMP	guanosinmonofosfát
HDV	hydrodynamický voltamogram
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ECD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
PDE5	fosfodiesteráza 5
I.D.	vnitřní průměr
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MtBE	methyl-*terc*-butylether
8-oxoGua	8-oxo-7,8-dihydroguanin
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosin
PAD	pulsní amperometrická detekce
PAH	pulmonární hypertenze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLD	sildenafil
TBBA	tetrabromobisfenol A
VR	vardenafil
ŽP	životní prostředí

8 LITERATURA

[1] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, Electrochemical Detection in HPLC, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.

[2] R.P.W. Scott, Chromatographic Detectors: Design, Function, and Operation, Marcel Dekker Inc., New York, 1996.

[3] C. Santos-Buelga, G. Williamson, Methods in Polyphenols Analysis, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 2003.

[4] I.N. Acworth, M. Naoi, H. Parvez, S. Parvez, Progress in HPLC-HPCE, VS Press, Utrecht, 1997.

[5] K. Štulík, V. Pacáková, Elektroanalytická měření v proudících kapalinách, 1. vydání ed., SNTL, Praha, 1989.

[6] B. Bailey, J. Waraska, I. Acworth, Methods Mol Biol 594 (2010) 327-339.

[7] L.A. Knecht, E.J. Guthrie, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 56 (1984) 479-482.

[8] Z. Bartosova, D. Jirovsky, A. Horna, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7996-8001.

[9] Z. Bartosova, D. Riman, P. Jakubec, V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, Scientific World Journal Art.No.: 295802 (2012).

[10] N. Torto, Bioelectrochemistry 76 (2009) 195-200.

[11] A.T. Woolley, K.Q. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, Anal. Chem. 70 (1998) 684-688.

[12] R.A. Wallingford, A.G. Ewing, Anal. Chem. 59 (1987) 1762-1766.

[13] J. Dobes, O. Zitka, J. Sochor, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Beklova, J. Kynicky, J. Hubalek, B. Klejdus, R. Kizek, V. Adam, International Journal of Electrochemical Science 8 (2013) 4520-4542.

[14] K. Stulik, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, Pure and Applied Chemistry 72 (2000) 1483-1492.

[15] K. Toth, K. Stulik, W. Kutner, Z. Feher, E. Lindner, Pure and Applied Chemistry 76 (2004) 1119-1138.

[16] M.I. Montenegro, M.A. Queirós, J.L. Daschbach, Microelectrodes: Theory and Applications, Springer Netherlands, Dordrecht, 1991.

[17] V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, D. Riman, P. Jakubec, Z. Bartosova, V. Masek, P. Mojzes, J. Vacek, Curr. Anal. Chem. 9 (2013) 305-311.

[18] M. Szumski, B. Buszewski, Critical Reviews in Analytical Chemistry 32 (2002) 1-46.

[19] D.Y. Tao, L.H. Zhang, Y.C. Shan, Z. Liang, Y.K. Zhang, Anal Bioanal Chem 399 (2011) 229-241.

[20] K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G.M. Swain, J. Zima, J. Barek, Chem. Listy 100 (2006) 124-132.

[21] M.G. Donker, N.J. Reinhoud, C.F.M. van Valkenburg, Attomole detection limits in micro HPLC-ECD, Univ College Dublin, Belfield Dublin, 2001.

[22] F.C. Cheng, J.S. Kuo, Journal of Chromatography B-Biomedical Applications 665 (1995) 1-13.

[23] M.L. Huffman, B.J. Venton, Analyst 134 (2009) 18-24.

[24] T. Malinski, Z. Taha, Nature 358 (1992) 676-678.

[25] A. Guzman, L. Agui, M. Pedrero, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, Talanta 56 (2002) 577-584.

[26] I.F. Hu, T. Kuwana, Abstr Pap Am Chem S 196 (1988) 184-ANYL.

[27] K.A. Sagar, C. Hua, M.T. Kelly, M.R. Smyth, Electroanalysis 4 (1992) 481-486.

[28] J.G. White, A.L. Soli, J.W. Jorgenson, J Liq Chromatogr 16 (1993) 1489-1496.

[29] J.E. Baur, R.M. Wightman, Journal of Chromatography 482 (1989) 65-73.
[30] C. Hua, H.K. Lee, A.K. Hsieh, Electroanalysis 6 (1994) 1147-1149.
[31] M. Marazuela, L. Agui, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, Electroanalysis 11 (1999) 1333-1339.
[32] K.A. Sagar, M.R. Smyth, J Pharmaceut Biomed 22 (2000) 613-624.
[33] J. Barek, A. Teraso, V. Mejstrik, J.C. Moreira, J. Zima, Chem Anal-Warsaw 48 (2003) 483-493.
[34] P. Agrafiotou, S. Sotiropoulos, A. Pappa-Louisi, J. Sep. Sci. 32 (2009) 949-954.
[35] J. Buffle, M.L. Tercier-Waeber, Trac-Trends in Analytical Chemistry 24 (2005) 172-191.
[36] Z. Bartosova, D. Jirovsky, D. Riman, V. Halouzka, M. Svidrnoch, J. Hrbac, Talanta 122 (2014) 115-121.
[37] D. Riman, Z. Bartosova, V. Halouzka, J. Vacek, D. Jirovsky, J. Hrbac, RSC Advances 5 (2015) 31245-31249.
[38] K. Patel, K. Hashimoto, A. Fujishima, Denki Kagaku 60 (1992) 659-659.
[39] G. Pastor-Moreno, D.J. Riley, Electrochim Acta 47 (2002) 2589-2595.
[40] Y.V. Pleskov, Russian Journal of Electrochemistry 38 (2002) 1275-1291.
[41] J. Waraska, M. Acworth, American Laboratory 39 (2007) 38-+.
[42] A. Kraft, International Journal of Electrochemical Science 2 (2007) 355-385.
[43] in, http://www.esrf.eu/news/spotlight/spotlight77, staženo 15.4.2015.
[44] M.C. Granger, J.S. Xu, J.W. Strojek, G.M. Swain, Anal. Chim. Acta 397 (1999) 145-161.
[45] J.S. Xu, M.C. Granger, Q.Y. Chen, J.W. Strojek, T.E. Lister, G.M. Swain, Anal. Chem. 69 (1997) A591-A597.
[46] A. Fujishima, Diamond Electrochemistry, Tokyo: BKC, Amsterdam: Elsevier, 2005.
[47] M. Plante, B. Bailey, I. Acworth, Lc Gc North America (2010) 36-36.
[48] T.A. Ivandini, K. Honda, T.N. Rao, A. Fujishima, Y. Einaga, Talanta 71 (2007) 648-655.
[49] H. Awada, J.W. Strojek, G.M. Swain, Journal of the Electrochemical Society 142 (1995) L42-L45.
[50] T.N. Rao, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, Journal of Electroanalytical Chemistry 491 (2000) 175-181.
[51] D.C. Shin, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, Anal. Chem. 75 (2003) 530-534.
[52] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, A. Fujishima, D.A. Tryk, D. Shin, Anal. Chem. 75 (2003) 935-939.
[53] D.C. Shin, D.A. Tryk, A. Fujishima, A. Muck, G. Chen, J. Wang, Electrophoresis 25 (2004) 3017-3023.
[54] J. Wang, G. Chen, A. Muck, D.C. Shin, A. Fujishima, J Chromatogr A 1022 (2004) 207-212.
[55] N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, Talanta 58 (2002) 1213-1219.
[56] C. Terashima, T.N. Rao, B.V. Sarada, A. Fujishima, Chem Lett 32 (2003) 136-137.
[57] I.N. Acworth, J. Waraska, B. Bailey, Free Radical Biology and Medicine 43 (2007) S180-S181.
[58] H.J. Park, K. Courtemanche, R.S. Bruno, Faseb J 23 (2009).
[59] H.J. Park, E. Mah, R.S. Bruno, Anal. Biochem. 407 (2010) 151-159.
[60] O. Chailapakul, W. Siangproh, B.V. Sarada, C. Terashima, T.N. Rao, D.A. Tryk, A. Fujishima, Analyst 127 (2002) 1164-1168.
[61] L.S. Andrade, M.C. de Moraes, R.C. Rocha, O. Fatibello, Q.B. Cass, Anal. Chim. Acta 654 (2009) 127-132.
[62] A. Preechaworapun, S. Chuanuwatanakul, Y. Einaga, K. Grudpan, S. Motomizu, O. Chailapakul, Talanta 68 (2006) 1726-1731.

[63] S. Treetepvijit, A. Preechaworapun, N. Praphairaksit, U. Chuanuwatanakul, Y. Einaga, O. Chailapakul, Talanta 68 (2006) 1329-1335.
[64] N. Wangfuengkanagul, W. Siangproh, O. Chailapakul, Talanta 64 (2004) 1183-1188.
[65] L. Maixnerova, K. Peckova, J. Barek, H. Klimova, Chem. Listy 104 (2010) 191-196.
[66] K. Peckova, K. Jandova, L. Maixnerova, G.M. Swain, J. Barek, Electroanalysis 21 (2009) 316-324.
[67] L. Maixnerova, J. Barek, K. Peckova, Electroanalysis 24 (2012) 649-658.
[68] O. Yosypchuk, J. Barek, V. Vyskocil, Anal Bioanal Chem 404 (2012) 693-699.
[69] T.A. Ivandini, B.V. Sarada, C. Terashima, T.N. Rao, D.A. Tryk, H. Ishiguro, Y. Kubota, A. Fujishima, Journal of Electroanalytical Chemistry 521 (2002) 117-126.
[70] K. Suzuki, M. Katayama, K. Takamatsu, S. Kaneko, K. Miyaji, H. Ishikawa, Y. Matsuda, J Chromatogr A 1216 (2009) 3117-3121.
[71] I. Martins, L.D. Canaes, K.M. Doretto, S. Rath, Electroanalysis 22 (2010) 455-462.
[72] K. Uchiyama, H. Nakajima, T. Hobo, Anal Bioanal Chem 379 (2004) 375-382.
[73] N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martin, S.M. Lunte, Electrophoresis 22 (2001) 2526-2536.
[74] J. Cvacka, V. Quaiserova, J. Park, Y. Show, A. Muck, Jr., G.M. Swain, Anal Chem 75 (2003) 2678-2687.
[75] A. Suzuki, T.A. Ivandini, K. Yoshimi, A. Fujishima, G. Oyama, T. Nakazato, N. Hattori, S. Kitazawa, Y. Einaga, Anal Chem 79 (2007) 8608-8615.
[76] G.W. Muna, V. Quaiserova-Mocko, G.M. Swain, Anal Chem 77 (2005) 6542-6548.
[77] S.H. Francis, J.L. Busch, J.D. Corbin, Pharmacological Reviews 62 (2010) 525-563.
[78] M. Gupta, A. Kovar, B. Meibohm, Journal of Clinical Pharmacology 45 (2005) 987-1003.
[79] D. Montani, M.C. Chaumais, L. Savale, D. Natali, L.C. Price, X. Jais, M. Humbert, G. Simonneau, O. Sitbon, Advances in Therapy 26 (2009) 813-825.
[80] T. Reffelmann, R.A. Kloner, Current Pharmaceutical Design 12 (2006) 3485-3494.
[81] D.J.R. Gary J. Muirhead, Donald K. Walker, Philip Wastall, Br J Clin Pharmacol 53 (2002).
[82] D.K. Walker, M.J. Ackland, G.C. James, G.J. Muirhead, D.J. Rance, P. Wastall, P.A. Wright, Xenobiotica 29 (1999) 297-310.
[83] R.C. Rosen, J.B. Kostis, Am. J. Cardiol. 92 (2003) 9M-18M.
[84] H.Y. Ku, J.H. Shon, K.H. Liu, J.G. Shin, S.K. Bae, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877 (2009) 95-100.
[85] B. Uslu, B. Dogan, S.A. Ozkan, H.Y. Aboul-Enein, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 127-134.
[86] S.A. Ozkan, B. Uslu, P. Zuman, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 227-233.
[87] J. Rodriguez, J.J. Berzas, G. Castaneda, N. Rodriguez, Talanta 62 (2004) 427-432.
[88] K. Tyszczuk, M. Korolczuk, Bioelectrochemistry 78 (2010) 113-117.
[89] M. Al-Ghazawi, M. Tutunji, S. AbuRuz, J Pharmaceut Biomed 43 (2007) 613-618.
[90] R.J. Robbins, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (2003) 2866-2887.
[91] S.M. Henning, P.W. Wang, N. Abgaryan, R. Vicinanza, D.M. de Oliveira, Y.J. Zhang, R.P. Lee, C.L. Carpenter, W.J. Aronson, D. Heber, Molecular Nutrition & Food Research 57 (2013) 483-492.
[92] A. Simic, D. Manojlovic, D. Segan, M. Todorovic, Molecules 12 (2007) 2327-2340.
[93] Thermo Scientific, Dionex 6011RS ultra Analytical Cell, produktový specifikační list.
[94] M. Nichkova, M. Germani, M.P. Marco, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 29-34.
[95] L.S. Birnbaum, D.F. Staskal, Environmental Health Perspectives 112 (2004) 9-17.
[96] O. Segev, A. Kushmaro, A. Brenner, International Journal of Environmental Research and Public Health 6 (2009) 478-491.

[97] C.J. Henny, J.L. Kaiser, R.A. Grove, B.L. Johnson, R.J. Letcher, Ecotoxicology 18 (2009) 802-813.
[98] M. Venier, M. Wierda, W.W. Bowerman, R.A. Hites, Chemosphere 80 (2010) 1234-1240.
[99] U. Nordlof, B. Helander, A. Bignert, L. Asplund, Sci Total Environ 409 (2010) 238-246.
[100] M.A. McKinney, R.J. Letcher, J. Aars, E.W. Born, M. Branigan, R. Dietz, T.J. Evans, G.W. Gabrielsen, E. Peacock, C. Sonne, Environ Int 37 (2011) 365-374.
[101] T. Hassenklover, S. Predehl, J. Pilli, J. Ledwolorz, M. Assmann, U. Bickmeyer, Aquatic Toxicology 76 (2006) 37-45.
[102] G.J. Gribble, Environmental Science and Pollution Research 7 (2000) 37-49.
[103] A. Covaci, S. Voorspoels, M.A.E. Abdallah, T. Geens, S. Harrad, R.J. Law, J Chromatogr A 1216 (2009) 346-363.
[104] C. Yu, B. Hu, J Chromatogr A 1160 (2007) 71-80.
[105] H. Fromme, B. Hilger, E. Kopp, M. Miserok, W. Volkel, Environ Int 64 (2014) 61-68.
[106] K. Jakobsson, K. Thuresson, L. Rylander, A. Sjodin, L. Hagmar, A. Bergman, Chemosphere 46 (2002) 709-716.
[107] H.E. Poulsen, L.L. Nadal, K. Broedbaek, P.E. Nielsen, A. Weimann, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1840 (2014) 801-808.
[108] B.N. Ames, Free Radical Research 7 (1989) 121-128.
[109] I.A. Rebelo, J.A.P. Piedade, A.M. Oliveira-Brett, Talanta 63 (2004) 323-331.
[110] A. Valavanidis, T. Vlachogianni, C. Fiotakis, Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews 27 (2009) 120-139.
[111] H.J. Helbock, K.B. Beckman, M.K. Shigenaga, P.B. Walter, A.A. Woodall, H.C. Yeo, B.N. Ames, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (1998) 288-293.
[112] D. Germadnik, A. Pilger, H.W. Rudiger, Journal of Chromatography B 689 (1997) 399-403.
[113] T. Henriksen, P.R. Hillestrom, H.E. Poulsen, A. Weimann, Free Radical Biology and Medicine 47 (2009) 629-635.
[114] H. Moriwaki, Anal Sci 16 (2000) 105-106.
[115] Z. Bartošová, nepublikovaná data.
[116] T.R.I. Cataldi, C. Campa, G.E. De Benedetto, Fresenius J. Anal. Chem. 368 (2000) 739-758.
[117] Y.C. Lee, J Chromatogr A 720 (1996) 137-149.
[118] C. Corradini, Annali Di Chimica 84 (1994) 385-396.
[119] R.P. Baldwin, Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, in: Z. El Rassi (Ed.) Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 947-959.
[120] J.M. Marioli, T. Kuwana, Electrochim Acta 37 (1992) 1187-1197.
[121] S.N.A.M. Yazid, I.M. Isa, S. Abu Bakar, N. Hashim, S. Ab Ghani, Anal Lett 47 (2014) 1821-1834.
[122] K. Kano, K. Takagi, K. Inoue, T. Ikeda, T. Ueda, J Chromatogr A 721 (1996) 53-57.
[123] S.V. Prabhu, R.P. Baldwin, Anal. Chem. 61 (1989) 852-856.
[124] L. Nagy, G. Nagy, P. Hajos, Sensors and Actuators B-Chemical 76 (2001) 494-499.
[125] P.F. Luo, S.V. Prabhu, R.P. Baldwin, Anal. Chem. 62 (1990) 752-755.
[126] S.A. Wring, A. Terry, R. Causon, W.N. Jenner, J Pharmaceut Biomed 16 (1998) 1213-1224.
[127] V. Halouzka, P. Jakubec, L. Kvitek, V. Likodimos, A.G. Kontos, K. Papadopoulos, P. Falaras, J. Hrbac, Journal of the Electrochemical Society 160 (2013) B54-B59.
[128] J. Hrbáč, V. Halouzka, R. Večerková, Z. Bartošová, D. Riman, nepublikovaná data.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

MOŽNOSTI VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH DETEKČNÍCH SYSTÉMŮ V SEPARAČNÍCH TECHNIKÁCH

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:	Zdenka Bartošová
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí disertační práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2015

Abstract

The analytical usability and applicability of various electrochemical detection (ECD) systems combined with high-performance liquid chromatography (HPLC) is discussed in the present doctoral thesis.

The investigation of specific electrochemical characteristic (broad potential window, inertness) of *boron doped diamond* (BDD) and its analytical utilization, as a non-traditional electrode material in HPLC, is covered in the first section of the thesis. A HPLC-ECD method for the determination of PDE5 inhibitors (Viagra™, Levitra™) and their main N-dealkylated metabolites, based on BDD as a working electrode, is described. A working potential of +1520 mV (*vs.* Pd/H_2) was used for a sensitive one-run detection of the baseline separated drugs including internal standard in the human plasma. The method developed is fast (12 minutes), isocratic, highly sensitive (LODs in the ng ml^{-1} range), and only minute plasma volume (150 μl) is required. The used thin-layer BDD electrode proved to be of great significance for sensitive amperometric detection of not easily oxidizable analytes, such as the aforementioned piperazine derivatives.

Carbon fiber microelectrodes (CFME) exhibit some unique analytical properties, compared to their conventional sized counterparts. The excellent sensing characteristics of cylindrical microelectrodes and resolving power of HPLC are the key features for the promising HPLC-ECD hyphenation, as demonstrated by four different application examples in the second section.

A model mixture of common phenolic acids (gallic, protocatechuic, gentisic, 4-hydroxybenzoic and caffeic acid) was separated to test the sensing capabilities of the CFME as an amperometric detector in HPLC. Even for trace concentrations of phenolic acids, excellent signal stability and signal-to-noise ratio was observed.

Brominated phenols (BP), extensively used as flame retardants - e.g. 3,3′,5,5′-tetrabromo-bisphenol A (TBBA) - are considered to be neurotoxic, persistent and bioaccumulative. Amperometric CFME-based detector in a liquid-chromatographic arrangement was used for the determination of 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol and TBBA. For the simultaneous detection of BP, working potential of +1450 mV (*vs.* Ag/AgCl) was chosen. The calculated limits of detection (LOD) for the studied analytes were within the range of 1,8–56,6 ng ml^{-1}. The method was applied to determination of BP in spiked water, and of TBBA in a CRT monitor plastic casing.

The presence of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in blood plasma is considered an important marker of oxidative stress and DNA damage. Elevated levels of 8-oxodGuo were

found in the urine and lung tissues of smokers as well as in body fluids and DNA of patients with serious disorders. Unfortunately, plasma concentrations of 8-oxodG cannot often be reliably distinguished as they lie below quantification limits of many analytical methods. ECD belongs to the most sensitive assays of 8-oxodG currently available. The electrochemical detector based on CFME was successfully tested on the standard solution of 8-oxodG at physiological concentration as well as on a plasma sample of a cancer patient. The achieved results indicate that the technique is capable of routine monitoring of 8-oxodG in blood plasma.

Surface CFME modifications (resulting in altered analytical selectivity) represent certainly a very promising research area. Some analytical aspects regarding copper-coated CFME (Cu-CFME) are briefly discussed. Cu-CFME, prepared and processed adequately, was successfully applied to direct-current amperometric determination of selected disaccharides, prior their liquid-chromatographic separation.

OBSAH

1 ÚVOD **1**
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE **2**
3 TEORETICKÁ ČÁST **3**
3.1 Uhlíkové mikroelektrody 3
3.2 Diamantové elektrody 4
3.2.1 Základní charakteristika BDD *4*
4 ANALÝZA INHIBITORŮ PDE5 A JEJICH METABOLITŮ [22] **5**
4.1 Experimentální část 5
4.1.1 Instrumentace *5*
4.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky *5*
4.1.2.1 Úprava vzorku 5
4.1.2.2 Chromatografické podmínky 6
4.1.2.3 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody 6
4.2 Výsledky a diskuze 6
5 APLIKACE MIKROELEKTROD Z UHLÍKOVÉHO VLÁKNA V HPLC **12**
5.1 Experimentální část 12
5.1.1 Chemikálie a přístrojové vybavení *12*
5.1.1.1 Přístrojové vybavení 12
5.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky *13*
5.1.2.1 Úprava uhlíkových mikroelektrod 13
5.1.2.2 Chromatografické podmínky 13
5.1.2.3 Úprava vzorků 14
5.1.2.4 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody 14
5.2 Výsledky a diskuze 15
5.2.1 Analýza fenolických kyselin [8] *16*
5.2.2 Analýza bromovaných fenolů [35] *18*
5.2.3 Aplikace CFME při HPLC analýze markeru oxidativního poškození DNA *22*
5.2.4 Využití CFME modifikovaných vrstvou mědi pro amperometrickou detekci sacharidů [54] 24
6 ZÁVĚR **27**
7 LITERATURA **29**

1 ÚVOD

Je známo, že elektrochemická aktivita látek v řadě případů souvisí s biologickou aktivitou, což je dáno přítomností určitých funkčních skupin v jejich struktuře, a také mechanismem přenosu elektrického náboje v živých organismech. Je logické, že elektrochemie při vývoji analytických metod nebo při studiu těchto látek zastává důležitou úlohu.

Od svých počátků v sedmdesátých letech dvacátého století se kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) postupně vyvinula ve spolehlivou a všestrannou techniku, která díky své vysoké citlivosti a selektivitě nalezla uplatnění v celé řadě oblastí, ať už při analýze potravin, nebo při kontrole kvality životního prostředí či ve farmakologické nebo klinické analýze.

Předložená disertační práce je zaměřena na dvě specializované oblasti amperometrické detekce v HPLC. První část se zabývá využitím borem dopované diamantové elektrody a jejími výhodami při analýze obtížně oxidovatelných látek - inhibitorů fosfodiesterázy 5 včetně jejich aktivních metabolitů v krevní plasmě.

Druhá část práce se zaměřuje na mikroelektrody z uhlíkových vláken (CFME) a jejich uplatnění v průtokové separační analýze. Mikroelektrody se vyznačují vysokou citlivostí v důsledku účinnějšího převodu hmoty k povrchu elektrody a mimo to jsou výborně kompatibilní s mikrokolonovými technikami. Přesto je jejich využití v praxi zatím ojedinělé, což je pravděpodobně způsobeno především jejich komerční nedostupností. Výsledky prezentované v této práci demonstrují výhody detekčního systému na bázi CFME na příkladech analýzy modelové směsi fenolických kyselin, dále při analýze environmentálních polutantů (bromovaných fenolů) a při citlivé detekci markeru oxidativního poškození DNA v krevní plasmě. Závěr práce pak dokumentuje možnost cílené změny selektivity mikroelektrody modifikací jejího povrchu na příkladu CFME pokryté nanostrukturovanou vrstvou mědi, vhodné pro přímou elektrochemickou detekci sacharidů.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce se zaměřuje na dvě hlavní témata z oblasti elektrochemické detekce v kapalinové chromatografii:

1) *Využití borem dopované diamantové elektrody v HPLC*
    - vývoj metody vhodné k analýze elektroaktivních ihnibitorů fosfodiesterázy 5 v krevní plasmě
2) *Možnosti využití uhlíkových cylindrických mikroelektrod jako vysoce citlivých detekčních sensorů v HPLC*
    - testování základních analytických parametrů amperometrického detektoru na bázi CFME při analýze fenolických kyselin
    - vývoj metody vhodné pro stanovení nízkých koncentrací environmentálních polutantů ze skupiny bromovaných fenolů
    - uplatnění CFME v klinické praxi – HPLC-ECD analýza markeru oxidativního poškození DNA v krevní plasmě
    - přímá amperometrická detekce sacharidů: aplikace uhlíkových cylindrických mikroelektrod modifikovaných nanostrukturovanou vrstvou mědi

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Uhlíkové mikroelektrody

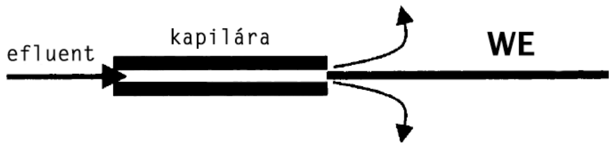
Označení „mikroelektroda“ se konvenčně užívá pro elektrodu s rozměry v desítkách mikrometrů nebo méně [1].

Mikroelektrody nabízí proti klasickým velkoplošným elektrodám následující praktické výhody [1, 2]:

- vyšší proudová odezva v důsledku radiální difúze (u vláknových elektrod), která zajišťuje rychlejší a efektivnější převod hmoty k povrchu elektrody
- snížený ohmický pokles napětí v roztoku, což umožňuje měření v prostředí o nízké elektrické vodivosti
- krátká doba potřebná k ustálení základního signálu v důsledku nízkých nabíjecích proudů
- výborná kompatibilita s mikrokolonovými technikami

Když k uvedeným výhodám přičteme nižší citlivost CFME vůči změnám míchání (při klasickém elektrochemickém experimentu), resp. změnám v rychlostech proudící kapaliny (v průtokové analýze) [3], je evidentní, že CFME disponují zcela unikátními vlastnostmi, využitelnými zejména při spojení s kapalinovou chromatografií.

Z hlediska analytické chemie lze za atraktivní důsledek používání miniaturizovaných systémů považovat fakt, že výrazně klesají nejen hmotnostní [4, 5], ale často též koncentrační detekční limity [4]. Udává se, že přechodem z klasických HPLC kolon (4.6 mm I.D.) na kolony o průměrech 2.1 mm nebo 1 mm se může teoreticky zvýšit citlivost detekce až 21krát [6]. V praxi je situace poněkud pesimističtější, nicméně stále jde o významné zvýšení poměru signál/šum [5].



Obr. 1: Princip konstrukce detekční cely s cylindrickou mikroelektrodou

Ke konstrukci mikroelektrod se nejčastěji využívá platina, zlato nebo uhlíková vlákna. Uhlíková vlákna se mj. vyznačují velmi dobrou pevností, která předčí i ocel [7]. Naopak kovová vlákna o průměru jednotek mikrometrů jsou velmi křehká a práce s nimi je náročná [7]. K získání výhodných analytických vlastností je často nutné povrch elektrody

elektrochemicky upravit [8, 9]. Základní uspořádání detekční cely s cylindrickou mikroelektrodou je znázorněno na Obr. 1.

Selektivita senzorů na bázi CFME může být dále modifikována cílenými změnami na jejich povrchu, zejména elektrochemicky (depozice kovových vrstev) nebo chemicky (pokrytí polárních skupin), a tím přizpůsobena konkrétní skupině analytů [8, 10].

Sporadické využití CFME v HPLC-ECD technice pravděpodobně je, vedle jejich faktické komerční nedostupnosti [6], způsobeno nutností citlivě zesilovat extrémně malé proudy, tedy disponovat vysoce kvalitním potenciostatem, a v neposlední řadě k němu také zřejmě přispívá podstatně komplikovanější manipulace a adjustace senzorů v miniaturizovaných systémech.

3.2 Diamantové elektrody

3.2.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BDD

První zmínky o využití borem dopované diamantové (BDD) elektrody v elektrochemii se objevily v roce 1992 [11]. První přehledové články, které se zabývají studiem vlastností BDD elektrod a jejich předpokladů pro elektroanalytická měření byly publikovány o deset let později [12, 13].

Čistý diamant je díky své struktuře jeden z nejlepších přírodních izolantů a pro konstrukci elektrod tedy zcela nevhodný. Avšak je-li nadopován vhodným prvkem (nejčastěji borem), stává se v důsledku poruch v krystalové mřížce elektricky vodivým [14].

Elektrody z BDD nabízí několik zcela unikátních vlastností, které je značně odlišují od elektrod z konvenčních materiálů. Jednou z nich je vysoké přepětí vodíku a kyslíku, díky kterému disponují BDD elektrody širokým potenciálovým oknem [15]. Příčina tohoto jevu není dosud zcela objasněna, nicméně na základě publikovaných dat lze usuzovat, že toto chování souvisí s inertností a homogenitou diamantového filmu, přepětí vodíku i kyslíku se snižuje úměrně s rostoucím podílem uhlíku v jiné formě než diamantové (tedy s hybridizací sp^3) [16-18]. V oblasti vysokých kladných potenciálů může rovněž docházet k elektrogeneraci silných oxidantů jako jsou hydroxylové radikály [19]. BDD elektrody umožňují detekci obtížně oxidovatelných látek, které podléhají elektrochemické konverzi až při vysokých potenciálech.

Dále se diamantové elektrody vyznačují nízkým proudovým pozadím. Tato vlastnost je přičítána zejména relativní absenci elektroaktivních funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu diamantu a skutečnosti, že se BDD v podstatě chová jako soubor mikroelektrod navzájem oddělených elektricky nevodivým prostředím. [17, 18]

V neposlední řadě je povrch BDD chemicky inertní a vyznačuje se minimálním sklonem k adsorpčním jevům a následné pasivaci elektrody, což přispívá ke stabilitě signálu a dobré opakovatelnosti měření. [14, 17, 18]
Výše uvedené vlastnosti mají zásadní význam pro analytické využití BDD elektrod. Zásluhou svých unikátních vlastností BDD elektroda významně rozšiřuje aplikační rádius elektrochemické detekce – zejména o látky, které vyžadují k elektrochemické konverzi značně vysoké potenciály, např. disulfidy a thioethery [14, 20] nebo purinové a pyrimidinové báze [21]. Borem dopovaný diamant je cennou alternativou k tradičním uhlíkovým elektrodám.

4 Analýza inhibitorů PDE5 a jejich metabolitů [22]

4.1 Experimentální část

4.1.1 Instrumentace

Chromatografický systém pro HPLC sestával z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582), guard cely (model 5020) a coulometrického detektoru Coulochem III, vybaveného amperometrickou celou (model 5040) s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (BDD), (vše ESA Inc., MA Chelmsford, USA). K separaci byla použita kolona Ascentis C18 3 μm, 100 mm × 2,1 mm I. D. Záznam měření z detektoru a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno prostřednictvím softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány s využitím softwaru OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

4.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky

4.1.2.1 Úprava vzorku

K extrakci analytů z plasmy se využívala jednoduchá *l-l* extrakce: k 150 μl lidské plasmy se přidalo 450 μl methyl-*terc*-butyletheru, směs se důkladně promíchala na třepačce a na krátkou dobu (cca 2 min) umístila do ultrazvukové lázně. K důkladnému oddělení obou fází se využívala centrifuga (7200 × g, 3 min), 400 μl horní organické vrstvy se převedlo do čisté vialky a pomocí dusíku odpařilo do sucha. Následně se vzorek rekonstituoval 50 μl mobilní fáze, které obsahovaly vnitřní standard floretin (150 ng ml^{-1}). Pokud se výsledný roztok zakalil, opět se umístil na krátkou dobu do centrifugy, čirý supernatant již byl připraven k dávkování do HPLC systému.

4.1.2.2 Chromatografické podmínky

HPLC kolona Ascentis® C18 3 µm, 100 mm × 2,1 mm I.D.; mobilní fáze (MF) 20 mM fosforečnan sodný + 40 mM chloristan sodný/acetonitril 70/30 (v_{aq}/v_{org}), pH 3,5; průtoková rychlost 0,2 ml min^{-1}.
Potenciál analytické cely s BDD elektrodou byl +1520 mV (*vs.* Pd/H_2), rozsah citlivostí potenciostatu 0,1-5 µA . V^{-1}. Potenciál guard cely byl pro všechna měření +1000 mV (*vs.* Pd/H_2).

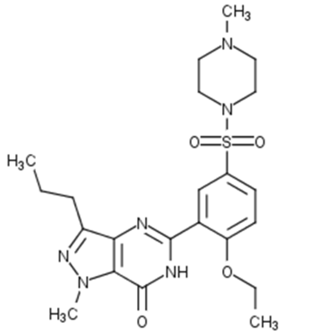
4.1.2.3 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody

Pro zjištění kvantitativních parametrů vyvinuté metody byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard (IS) byl zvolen floretin. Kalibrační křivky získané analýzou látek v matrici (lidská plasma) byly sestrojeny jako poměry ploch píků odpovídajícího kalibrantu/IS proti poměru koncentrací kalibrantu/IS. Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly zjištěny s použitím rovnic LOD = $3.3\sigma/b$ a LOQ = $10\sigma/b$, kde σ představuje standardní směrodatnou odchylku signálu základní linie ze 6 signálů při analýze slepého vzorku a b je směrnice odpovídající křivky.

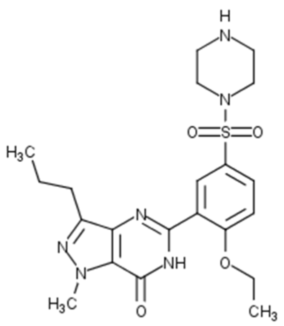
4.2 Výsledky a diskuze

Léčiva odbornou veřejností označována jako sildenafil a vardenafil (známá pod obchodními názvy Viagra™ a Levitra™) se již několik let úspěšně užívají k léčbě erektilní dysfunkce a pulmonární hypertenze (PAH).
Mezi hlavní metabolické dráhy patří dealkylace piperazinového kruhu, za kterou jsou zodpovědné enzymy z rodiny cytochromu P450 [23-25]. Struktura studovaných inhibitorů fosfodiesterázy 5 (PDE5) - sildenafilu (SL), vardenafilu (VR) a jejich hlavních aktivních metabolitů, N-desmethylsildenfilu (DSL) a N-desethylvardenafilu (DVR), je znázorněna na Obr. 2. Plazmatická koncentrace dosáhne vrcholu přibližně 1 hodinu po orálním podání těchto léčiv na lačno.
Vzhledem ke komerčnímu úspěchu jsou tyto látky často předmětem zneužití a v obchodní síti jsou k dostání jak padělky, tak přírodní preparáty a doplňky, které obsahují nepovolená množství inhibitorů PDE5. Tyto praktiky představují závažné zdravotní riziko zejména pro pacienty s poruchami kardiovaskulárního systému a krevního tlaku. Z uvedeného je zřejmé, že vhodné analytické nástroje jsou nezbytné ať už při léčbě pacientů trpících PAH, nebo ke sledování těchto látek na trhu, příp. ve forenzní analýze.

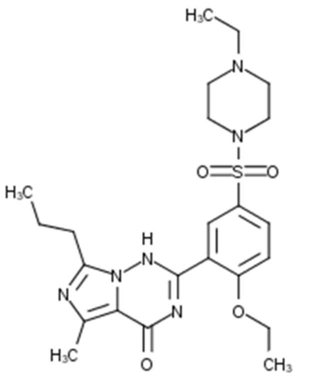
Při analýze PDE5 inhibitorů včetně SL a VR ať už ve vzorcích klinického charakteru nebo v bylinných preparátech se nejvíce uplatňuje HPLC v kombinaci s MS detektorem. K elektrochemickému stanovení SL a VR je možné využít jak oxidace [26, 27], tak i redukce [28, 29]. Průtoková měření založená na redukcích komplikují interferen-ce rozpuštěného kyslíku a zpravidla dosahují nižší citlivosti než metody založené na oxidacích. Oxidace piperazinového kruhu je ireverzibilní a vyžaduje vysokých potenciálů. Při elektrochemické konverzi dochází k pasivaci elektrodového povrchu. Tento efekt lze potlačit např. použitím pulzního módu [30], který však přináší řadu dalších praktických nevýhod (nižší citlivost, náročnější instrumentace). Elegantním řešením je zvolit takový elektrodový materiál, který není náchylný k adsorpci produktů elektrodové reakce a současně umožňuje citlivou detekci v širokém rozsahu potenciálů. Elektrody z BDD výše uvedené požadavky beze zbytku splňují.



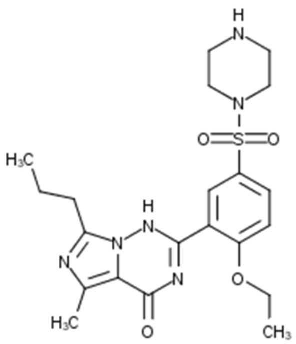
sildenafil



desmethylsildenafil



vardenafil



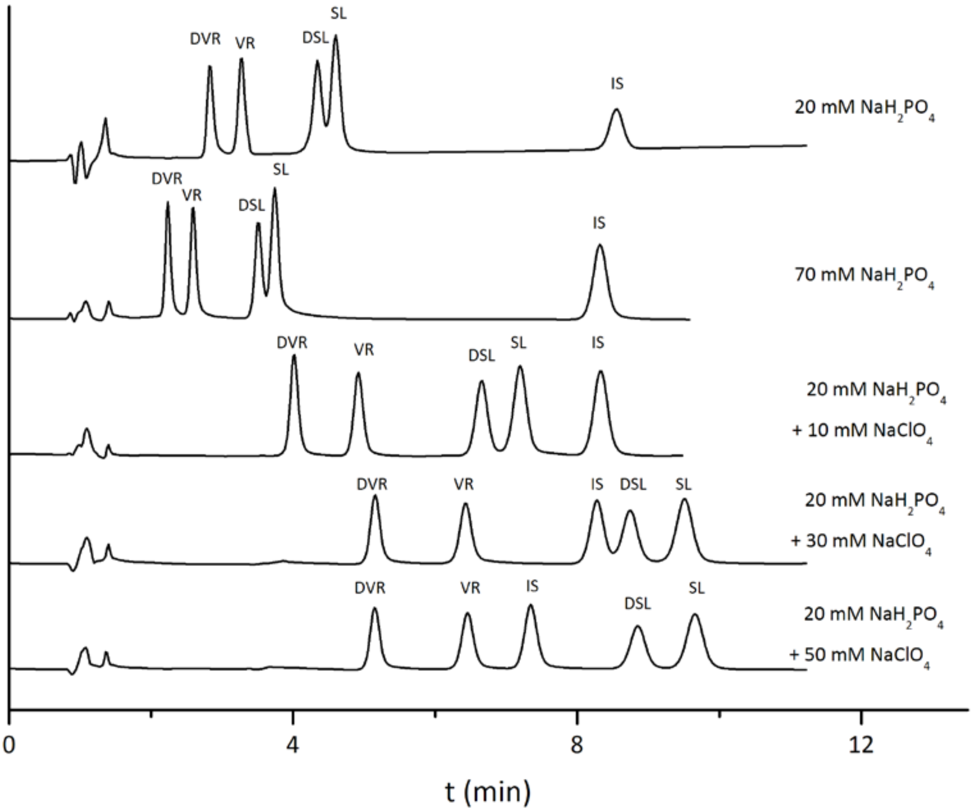
desethylvardenafil

Obr. 2: Chemická struktura studovaných látek

Z několika testovaných kolon různých parametrů (délka, vnitřní průměr, velikost částic), ale podobným chemismem (RP-C18, RP-C8), poskytovala kolona Ascentis 3µm, 100 × 2,1mm I.D. nejlepší účinnost separace a symetrii píků. Využití krátké kolony s menším vnitřním průměrem snižuje spotřebu chemikálií i vzorku a díky menší velikosti částic sorbentu nedochází ke zhoršení účinnosti separace.

Z hlediska chromatografie bylo nutné optimalizovat zejména složení pufru, jeho koncentraci a pH. Základní složkou pufru je fosforečnan sodný, jeho úkolem je zajistit dostatečnou pufrační kapacitu, avšak nebylo možné nalézt takový poměr organického modifikátoru a fosforečnanového pufru, aby došlo k rozdělení kritického páru N-desmethylsildenafil (DSL) a sildenafil.

Přídavek chloristanu sodného tento problém vyřešil, současně se zlepšila symetrie píků a zvýšila retence látek, což je žádoucí vzhledem k zamýšlenému využití metody. V rámci optimalizace tohoto parametru byl testován efekt přídavku chloristanu o různé koncentraci na chromatografické chování látek, nejzajímavější výsledky jsou znázorněny na Obr. 3. Mimo příznivého působení na rozlišení kritického páru se s rostoucí koncentrací chloristanu v MF snižovala retence vnitřního standardu (floretinu).



Obr. 3: Efekt složení pufru MF na retenci studovaných PDE5 inhibitorů. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2. Legenda: SL-sildenafil, DSL-desmethylsildenafil, VR-vardenafil, DVR-desethylvardenafil.

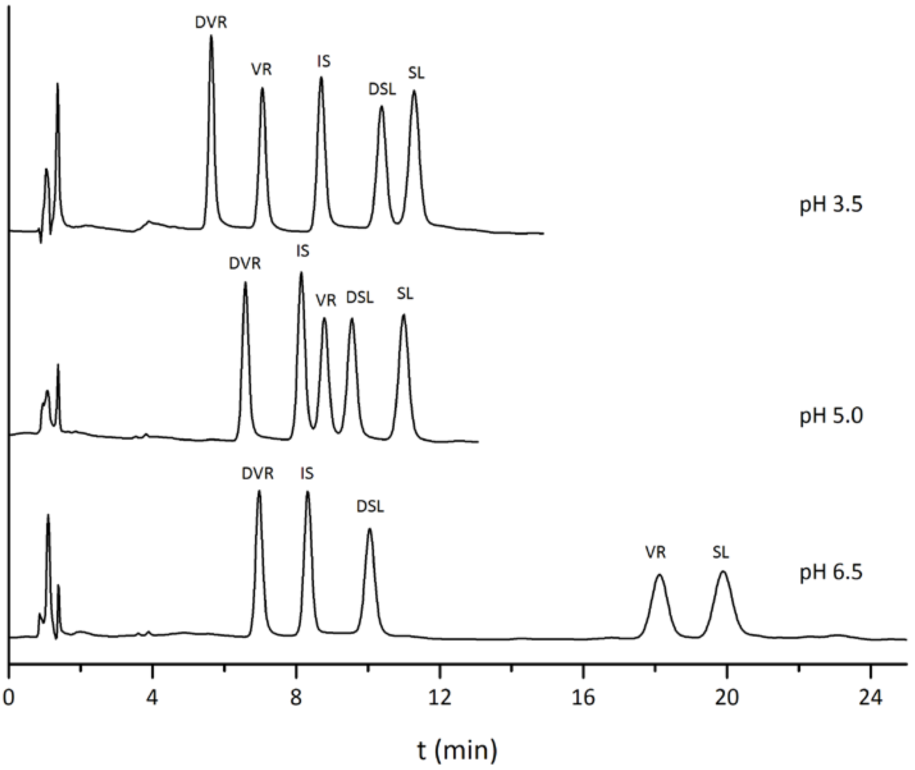
Studované látky pravděpodobně tvoří s chloristanem iontové asociáty, následkem toho je snížena solvatace molekul rozpouštědlem resp. mobilní fází. Tento efekt patrně podporuje také tvorba kvazi-stacionární fáze, jež vykazuje hydrofilnější charakter než původní stacionární fáze. V důsledku uvedených příspěvků dochází ke zlepšení tvaru píků a zvýšení retence látek.

Vzhledem k povaze látek a přítomnosti ionizovatelných skupin v jejich struktuře lze usuzovat na závislost jejich chromatografického chování na pH mobilní fáze. Vliv pH na separaci jsem

studovala při hodnotách 3,5; 5,0 a 6,5. Jak je patrné z Obr. 4, s rostoucí hodnotou pH rostl významně kapacitní faktor pro sildenafil a vardenafil. Při pH 6,5 bylo dosaženo nejvyšších hodnot rozlišení pro všechny analyty, nicméně z ekonomického ani analytického hlediska není žádoucí prodlužovat dobu separace. Při pH 3,5 bylo rozlišení i retence všech látek dostatečné a pro další práci byla zvolena tato hodnota.

Na základě výsledků výše popsaných experimentů byly stanoveny konečné chromatografické podmínky separace (viz kapitola 4.1.2.2). Při průtoku mobilní fáze 0,2 ml min^{-1} proběhla celá separace během 12 minut, přičemž začátek chromatogramu nabízí dostatečně velké separační okno pro eluci eventuálních nečistot z matrice vzorku.

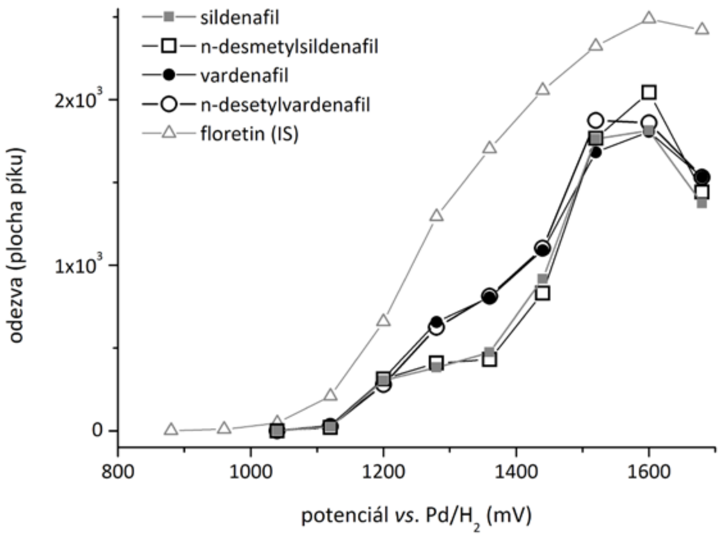
Mimo optimalizace chromatografické separace je nutné zvolit vhodné podmínky detekce, resp. detekční potenciál. K tomuto účelu obvykle slouží hydrodynamický voltamogram, který sleduje závislost odezvy látek na potenciálu vloženém na pracovní elektrodě.



Obr. 4: Vliv pH mobilní fáze na retenci studovaných látek. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.

Hydrodynamické voltamogramy jednotlivých analytů včetně IS jsou uvedeny na Obr. 5. Z obrázku je patrné, že elektrochemické chování původních drog a jejich příslušných metabolitů se dle očekávání neliší. Mimoto je evidentní, že k elektrochemické konverzi všech studovaných látek dochází při vysokých pozitivních potenciálech s maximem, které odpovídá přibližně hodnotě +1600 mV (*vs.* Pd/H_2). Nicméně vysoký potenciál deponovaný na elektrodu se začal projevovat negativně na chromatografickém záznamu, neboť významně narostl nízkofrekvenční šum a navíc se výrazně prodloužila doba nutná ke kompenzaci nabíjecího

proudu, z těchto důvodů byl pro detekci zvolen potenciál +1520 mV (*vs.* Pd/H_2), při němž se zmíněné efekty uplatňovaly v omezené míře nebo vůbec.



Obr. 5: HDV studovaných PDE5 inhibitorů a použitého vnitřního standardu.
Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.

Signál BDD elektrody v DC módu byl stabilní a reprodukovatelný i při opakovaných nástřicích vzorku. Al-Ghazawi a jeho kolegové publikovali pro stanovení sildenafilu a jeho hlavního metabolitu metodu HPLC-ED, která využívala anodické oxidace na elektrodě ze skelného uhlíku při poteniálu +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl) v pulzním režimu [30]. Pulzní režim se využívá v případech, kdy dochází k pasivaci elektrodového povrchu a postupné ztráty signálu, nicméně jeho nevýhodou je snížení citlivosti detekce. Povrch BDD elektrody je vůči pasivaci odolnější a použití pulzního módu nebylo nutné.

K extrakci a prekoncentraci analytů z krevní plasmy byla zvolena jednoduchá *l-l* extrakce vhodným rozpouštědlem. Při volbě extrakční podmínek byl kladen důraz na nízkou spotřebu vzorku, aby se metoda mohla uplatnit i v případech, kdy je dostupné množství vzorku omezené, tedy např. u neonatálních pacientů nebo ve forenzní analýze.

Tab. 1: Výtěžnost extrakce methyl-*terc*-butyletherem (MTBE) a ethylacetátem (EtAc) v procentech

	SL	DSL	VR	DVR
c_{MTBE} = 400 ng ml^{-1}	96±5	117±1	108±6	115±2
c_{MTBE} = 50 ng ml^{-1}	43±1	38±12	64±9	61±7
c_{EtAc} = 400 ng ml^{-1}	94±2	95±1	86±1	89±2
c_{EtAc} = 50 ng ml^{-1}	32±16	32±13	34±15	34±7

Na dvou koncentračních hladinách studovaných látek jsem testovala výtěžnost extrakce pro dvě organická rozpouštědla – ethylacetát a methyl-*terc*-butylether. Z tohoto hlediska se lépe osvědčil methyl-*terc*-butylether – získaná data jsou shrnuta v Tab. 1. Extrakce ethylacetátem

poskytovala nižší výtěžky zejména pro nižší koncentraci, která odpovídá očekávaným fyziologickým hladinám.

Vzhledem k povaze vzorku je bezesporu výhodnější využít pro kalibraci metodu vnitřního standardu. Pro všechny studované látky je kalibrace z matrice (lidská krevní plasma) lineární v rozsahu 10 – 400 ng ml^{-1} (viz Tab. 2). Po požití 50 mg tablety sildenafilu dosahuje jeho max. plazmatická koncentrace hodnoty přibližně 200 ng ml^{-1} a pro jeho hlavní metabolit DSL 80 ng ml^{-1}, po 15 hodinách od požití uvedené dávky se koncentrace obou látek pohybuje přibližně na úrovni 10 ng ml^{-1}. [30] Dosažené limity kvantifikace i rozsah kalibrace jsou tedy pro analýzu reálných vzorků dostatečné. Obr. 6 znázorňuje separaci PDE5 inhibitorů na fyziologických hladinách ve vzorku krevní plasmy, který byl upraven dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2.1.

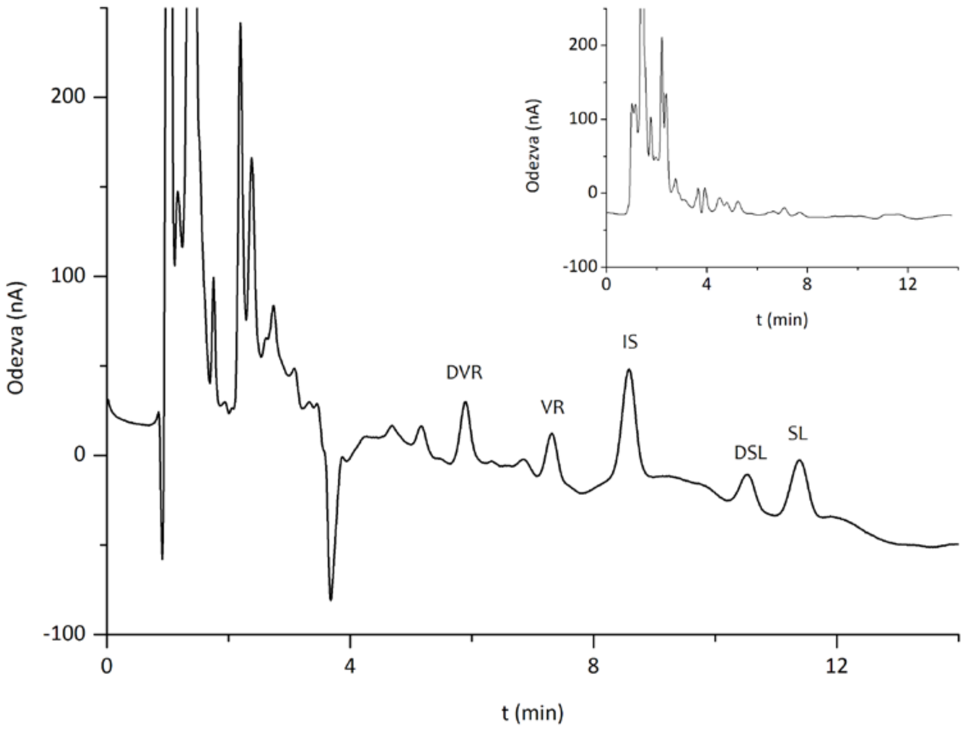
Tab. 2: Základní validační a kalibrační charakteristiky metody

	Opakovatelnost[a] Plocha RSD (%)	Opakovatelnost[b] Plocha RSD (%)	LOQ (ng ml^{-1})	směrnice (*a*)	úsek (*b*)	r^2
SL	4,3	5,3	7,7	3,0500	−0,3275	0,9958
DSL	3,3	6,3	13,4	1,9318	−0,3107	0,9918
VR	3,9	6,4	9,3	1,7927	−0,1937	0,9979
DVR	4,9	7,9	7,0	1,5593	−0,1612	0,9991

[a] (n=6, c=200 ng ml^{-1}), v rámci jednoho dne

[b] (n=5, c=200 ng ml^{-1}), mezi jednotlivými dny

Během měření elektroda nevykazovala známky pasivace povrchu a nevyžadovala elektrochemické čištění, vyznačovala se rychlým poklesem nabíjecího proudu a nízkým proudovým pozadím i šumem. Tenkovrstevná BDD elektroda se osvědčila při detekci obtížně oxidovatelných látek a vyvinutá HPLC metoda je dostatečně citlivá i pro klinické aplikace.



Obr. 6: Chromatrogram reálného vzorku - extrakt krevní plasmy s přídavkem studovaných analytů

Koncentrace PDE5 inhibitorů je 50 ng ml^{-1} (vnitřního standardu 150 ng ml^{-1}); vložený chromatogram: záznam blanku krevní plasmy. Legenda: SL-sildenafil, DSL-desmethylsildenafil, VR-vardenafil, DVR-desethylvardenafil. Experimentální podmínky viz kapitola 4.1.2.

5 Aplikace mikroelektrod z uhlíkového vlákna v HPLC

5.1 Experimentální část

5.1.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

5.1.1.1 Přístrojové vybavení

Chromatografický systém pro HPLC sestával z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582), guard cely (model 5020) a coulometrického detektoru Coulochem III, vybaveného standardní analytickou celou (model 5010A), vše ESA Inc. (MA Chelmsford, USA) nebo amperometrickou celou vytvořenou dle schématu na Obr. 7 osazenou mikroelektrodou z uhlíkového vlákna a Ag/AgCl srovnávací mikroelektrodou L-Chem (Olomouc, Česká republika) nebo Innovative Instruments, Inc. (Tampa, FL, USA).

Záznam měření z detektoru a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno prostřednictvím softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány s využitím softwaru OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

5.1.2 Pracovní postupy a experimentální podmínky

5.1.2.1 Úprava uhlíkových mikroelektrod

Povrch uhlíkových mikroelektrod se před instalací do detektoru aktivoval pomocí elektrochemické úpravy. Mikroelektroda se umístila do elektrochemické cely, která obsahovala 1 % roztok NaCl (w/w) a Ag/AgCl srovnávací elektrodu. Po dobu 20 s se na CFME vkládaly opakované napěťové pulsy 0 a +2,9 V sinusoidálního charakteru s frekvencí 50 Hz, po té následoval 5 s dlouhý puls při potenciálu -0,8 V a 5 s dlouhý puls při +1,5 V.

5.1.2.2 Chromatografické podmínky

Analýza fenolických kyselin
HPLC kolona: Ascentis C18-A 3 μm, 100 mm × 2,1 mm I.D.
Pracovní elektroda: CFME.
Mobilní fáze: 0,05 M NaH_2PO_4 + 0,02 M $NaClO_4$/ACN (85/15, v/v), pH = 3,0.
Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.
Potenciál analytické cely s CFME: +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl).
Rozsah citlivostí potenciostatu: 0,5 – 20 nA . V^{-1}.

Analýza bromovaných fenolů
HPLC kolona: Supelco C18 3 μm, 250 mm × 2,1 mm I.D.
Pracovní elektroda: CFME.
Mobilní fáze: 0,05 M NaH_2PO_4/MeOH/ACN (35/15/50, v/v/v), pH = 3,5.
Průtoková rychlost: 0,3 ml min^{-1}.
Potenciál analytické cely s CFME: +1450 mV (*vs.* Ag/AgCl).
Rozsah citlivostí potenciostatu: 1 – 10 nA . V^{-1}.

Analýza markeru oxidativního poškození DNA (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin)
HPLC kolona: Nucleodur Gravity C8 5 μm, 250 mm × 2,1 mm I.D.
Pracovní elektroda: CFME.
Mobilní fáze: 0,025 M Na2HPO4 (pH = 6,2)/MeOH (90/10, v/v).
Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.
Potenciál analytické cely s CFME: +800 mV (*vs.* Ag/AgCl).
Rozsah citlivostí potenciostatu: 1 – 10 nA . V^{-1}.

Analýza sacharidů
HPLC kolona: Hypercarb™ 5 μm, 100 mm × 2,1 mm I.D.
Pracovní elektroda: Cu-CFME (uhlíkové vlákno pokryté nanostrukturovanou vrstvou mědi).
Mobilní fáze: 0,025 M NaOH/ACN (97/3, v/v).
Průtoková rychlost: 0,2 ml min^{-1}.
Potenciál analytické cely s Cu-CFME: +500 mV (*vs.* Ag/AgCl).
Citlivost potenciostatu: 10 nA . V^{-1}.

5.1.2.3 Úprava vzorků

Vzorek plastu k analýze bromovaných fenolů
Vnější plastový kryt CRT monitoru z roku 1995 byl narušen elektrickým brusným nástrojem (Dremel), 100 mg jemného prášku se suspendovalo ve 2 ml methyl-*terc*-butyletheru. Alikvotní podíl (1 ml) byl odpařen a vysušen pod proudem N_2 do sucha. Odparek byl rekonstituován 0,2 ml MF a analyzován.
Slepý vzorek (blank) představovaly 2 ml methyl-*terc*-butyletheru odpařeného do sucha proudem N_2, odparek byl opět rekonstituován 0,2 ml MF a analyzován.
Pro kvantitativní stanovení TBBA ve vzorku byla použita metoda standardního přídavku.

Vzorek vody k analýze bromovaných fenolů
Vzorek vody byl odebrán z veřejné vodovodní sítě. Před samotným odběrem se voda nechala 10 minut volně odtékat. Vzorek vody se přefiltroval přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm, takto upravená voda se použila jednak jako slepý vzorek a jednak jako rozpouštědlo pro přídavek standardů 4-bromofenolu, 2,4-dibromofenolu, 2,6-dibromofenolu a 2,4,6-tribromofenolu. Vzorek vody s přídavkem všech uvedených analytů o výsledné koncentraci 25 ng ml^{-1} byl připraven k analýze.

Aplikace CFME při analýze 8-oxodGuo
Vzorky krevní plasmy pacientů s rakovinou prostaty poskytla FN v Olomouci. Vzorky plasmy byly zpracovány ultrafiltrací přes membránový filtr Microcon YM 10 (cut-off 10 kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Německo) za použití centrifugy (7200 × g, 30 min), tak došlo k oddělení vysokomolekulárních látek. Filtrát byl připraven přímo k nástřiku do HPLC systému.
Vzorek zdravého dobrovolníka byl zpracován stejným způsobem.

5.1.2.4 Vyhodnocení dat. Kalibrační parametry metody

Pro zjištění kalibračních parametrů vyvinutých metod byla použita metoda vnějšího standardu.

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly zjištěny s použitím rovnic LOD = $3.3\sigma/b$ a LOQ = $10\sigma/b$, kde σ představuje standardní směrodatnou odchylku signálu základní linie ze 6 signálů při analýze slepého vzorku a b je směrnice odpovídající křivky.

5.2 Výsledky a diskuze

Klíčové vlastnosti elektrod jsou dány nejen použitým materiálem, ale také tvarem a velikostí, jak je evidentní u systémů na bázi mikroelektrod.

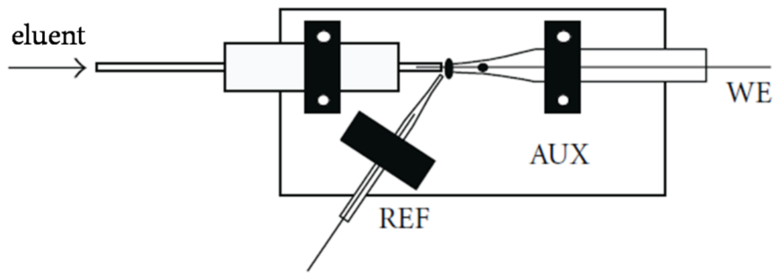
Uhlíková vlákna se vyrábí pyrolýzou vhodných prekurzorů – např. polyakrylonitril nebo smola (dehet). V závislosti na použité vstupní surovině a výrobním postupu se liší i mikrotextura vzniklých vláken, nejčastěji v příčném řezu převládá radiální, cibulovité nebo snopkovité („PAN-AM") uspořádání grafitických vrstev [7], mimoto se rozlišuje ještě několik dalších typů uspořádání - radiální zvlněné, nahodilé či smíšené. Hrany a poruchy grafitické vrstvy (mřížky) jsou reaktivnější než bazální vrstvy a obsahují také významná množství kyslíkatých funkčních skupin [7]. Je zřejmé, že i elektrochemická aktivita vlákna je dána jeho mikrostrukturou.

Kromě výborných mechanických a elektrických vlastností nabízí CF možnost zvýšit citlivost a/nebo selektivitu vhodnou úpravou jejich povrchu, což je z pohledu analytické chemie výhodná vlastnost. Elektrochemická úprava (elektrooxidace nebo elektroredukce) povrchu CF je elegantní a rozšířená metoda, protože je efektivní, dobře reprodukovatelná a rychlá. Tímto způsobem lze např. zvýšit podíl povrchových funkčních skupin obsahujících kyslík (např. karbonyl-, karboxyl-, chinon, ether, ester a hydroxyl), označovaných také jako grafitické oxidy. Dle publikovaných dat se na reaktivní místa na uhlíku vážou převážně karbonylové a hydroxylové skupiny. Tyto skupiny regulují rychlost elektronového přenosu pro mnoho electroaktivních látek. Tento efekt lze potlačit specifickým pokrytím těchto skupin derivatizací (k pokrytí hydroxylových skupin lze použít Lucasovo činidlo, v případě karbonylových skupin pak dinitrofenylhydrazin). V rámci elektrochemické úpravy povrchu dochází také k postupnému narušování kompaktních povrchových vrstev vlákna. Následkem toho se odhalí neuspořádaná vnitřní struktura vlákna, která disponuje větším počtem aktivních míst resp. elektrochemicky aktivním povrchem. [8]

Z hlediska selektivity je výhodné modifikovat povrch CFME vrstvami kovů a využívat jejich katalytických účinků – příklad analytického využití CFME pokrytých nanostrukturovanou vrstvou mědi je diskutován v kapitole 5.2.4.

Pro spojení se separačními metodami, jako je HPLC nebo CE, je v současnosti hlavním limitujícím faktorem nedostupnost komerčního detekčního systému na bázi mikroelektrod.

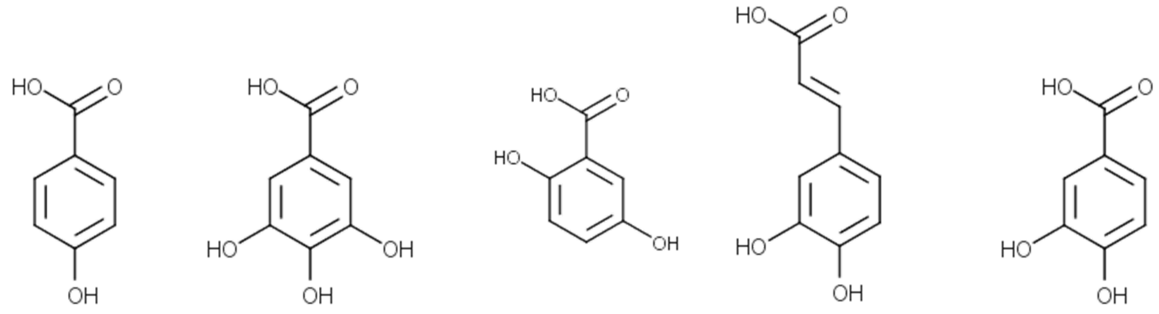
V rámci své disertační práce jsem studovala využití mikroelektrodového detekčního systému na bázi jednoho uhlíkového vlákna ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Princip uspořádání použité detekční cely je schematicky znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7: Uspořádání detekční cely pro HPLC

5.2.1 ANALÝZA FENOLICKÝCH KYSELIN [8]

Základní analytické charakteristiky výše uvedeného uspořádání byly testovány na analýze modelové směsi vybraných fenolických kyselin (gallová, protokatechová, gentisová, 4-hydroxybenzoová a kávová). Fenolické kyseliny jsou známé pro své antioxidační účinky a přirozeně se vyskytují v různých částech rostlin, včetně plodů a také produktech z nich (potravinářských i kosmetických). Fenolické látky lze poměrně snadno oxidovat a této vlastnosti se také využívá při jejich analýze [31, 32].



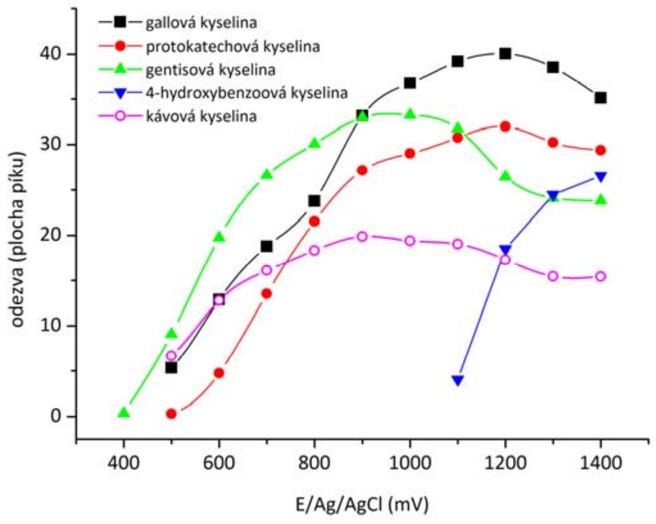
1 2 3 4 5

Obr. 8: Chemická struktura studovaných fenolických kyselin

1) 4-hydroxybenzoová kyselina, 2) gallová kyselina, 3) gentisová kyselina, 4) kávová kyselina, 5) protokatechová kyselina.

Mikroelektrodové systémy jsou kompatibilní s mikrokolonovými technikami, k separaci modelového setu fenolických kyselin byla použita 2,1 × 100 mm narrow-bore kolona. Závislost odezvy jednotlivých fenolických látek na vloženém potenciálu graficky znázorňuje HDV na Obr. 9. Z HDV je patrné, že se elektrochemická aktivita studovaných látek liší –

zejména v závislosti na počtu hydroxylových skupin vázaných na benzenovém jádře, mimo to se uplatňují i sterické efekty a vlastní mechanismus oxidace [33].



Obr. 9: HDV studovaných fenolických kyselin

Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.

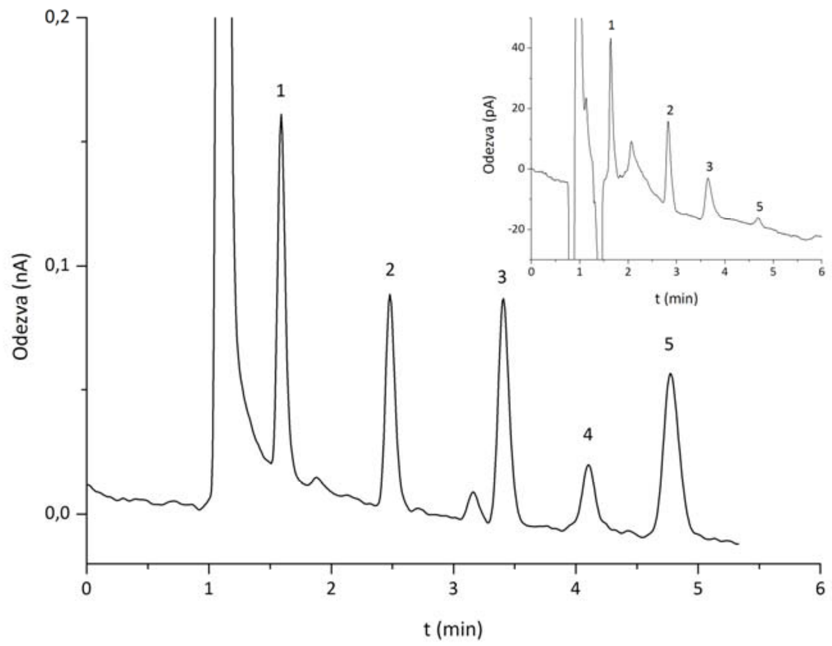
Pro další experimenty byl zvolen potenciál +1200 mV (*vs.* Ag/AgCl). Pro klasické uhlíkové elektrody není používání tak vysokých potenciálů obvyklé, protože může docházet k jejich degradaci. Nicméně na CFME nebyly pozorovány žádné významné změny ani při opakovaných měřeních, mimoto se základní proudový signál vyznačoval nízkým šumem vysokofrekvenčního charakteru. Ve shodě s teorií [1, 2] CFME vyžadovala ke kompenzaci nabíjecích proudů velmi krátkou dobu – kratší než je tomu u velkoplošných elektrod.

Tab. 3: Kalibrační parametry a limity detekce

	směrnice (*a*) *y = ax + b*	úsek (*b*)	r^2	LOD (pg ml^{-1})	LOD (nmol l^{-1})	Opakovatelnost[a] Plocha RSD %
gallová kyselina	0,36435	0,50998	0,99913	45,3	0,27	2,4
protokachová kyselina	0,41324	0,95112	0,99912	39,9	0,26	2,3
gentisová kyselina	0,35023	0,28650	0,99995	47,1	0,31	2,1
4-hydroxybenzoová kyselina	0,02738	-0,00785	0,99946	1205,2	8,7	2,7
kávová kyselina	0,34307	0,22750	0,99998	57,7	0,32	2,0

[a] v rámci jednoho dne, (n=5, c = 10 ng ml^{-1})

Závislost odezvy na koncentraci měla lineární charakter v rozsahu 5–100 ng ml^{-1} pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 0,5-100 ng ml^{-1} pro ostatní fenolické kyseliny, dosažené korelační koeficienty příslušných kalibračních závislostí měly hodnotu vyšší než 0,999 (viz Tab. 3). Odhad LOD pro všechny studované látky v modelové směsi s výjimkou 4-hydroxybenzoové kyseliny se pohyboval v řádu stovek pmol l^{-1}.



Obr. 10: Ukázka separace modelové směsi fenolických kyselin o koncentraci 10 ng ml^{-1}

Vložený chromatogram – analýza fenolických kyselin o koncentraci 1 ng ml^{-1} (2,5 pg „on-column“). Legenda: 1) gallová kyselina, 2) protokatechová kyselina, 3) gentisová kyselina, 4) 4-hydroxybenzoová kyselina, 5) kávová kyselina. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.

Chromatogram na Obr. 10 znázorňuje separaci vybraných fenolických kyselin na úrovni desítek a stovek femtomolů (vyjádřeno jako absolutní množství na koloně). Nízký objem detekční cely snižuje efekt rozmytí separovaných zón, v důsledku toho nedochází k významným ztrátám rozlišení, píky jsou vyšší a užší (např. pro kapiláru o průměru 50 µm a délku inkorporované CFME 2 mm činí mrtvý objem cely 16 nl, deklarovaný vnitřní objem komerční coulometrické cely Thermo Scientific je 7,1 µl [34]).

5.2.2 Analýza bromovaných fenolů [35]

Detekční systém na bázi CFME se ve spojení s HPLC experimentálně osvědčil a splnil veškerá očekávání dle teoretických předpokladů. Pro další experimenty byla zvolena skupina fenolických látek environmentálního významu – bromované fenoly (BF).

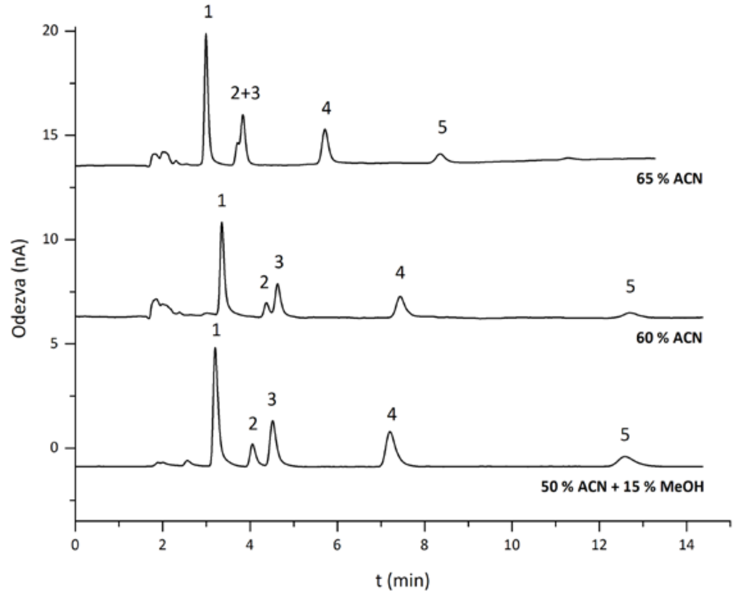
Do skupiny bromovaných fenolů se řadí látky jak přírodního, tak antropogenního charakteru. Komerčně se tyto látky využívají pro své fungicidní účinky [36] a také se přidávají do plastů, kde působí jako retardanty procesu hoření [37]. V předchozích desetiletích dramaticky vzrostla produkce syntetických polymerů a společně s tím i bromovaných retardantů hoření. V důsledku toho vzrostl také výskyt těchto látek v životním prostředí (ŽP) [37, 38]. Stejně jako jiné halogenové organické látky i bromované retardanty hoření jsou jen omezeně biologicky

odbouratelné, patří tedy mezi perzistentní látky se schopností bioakumulace [38]. Jejich residua byla nalezena ve vejcích a tkáních rybožravých ptáků [39-41] a savců, např. polárních medvědů [42].

Monobromované a dibromované fenoly si přirozeně vytváří některé mořské organismy, jejich role není dosud zcela objasněna, ale předpokládá se, že plní protektivní funkci, protože na ostatní organismy působí toxicky [43, 44].

Kromě akutních toxických účinků BF na vodní organismy jsou v literatuře popsány nefrotoxické [43], imunotoxické a neurotoxické účinky [45], navíc některé z nich (např. 2,4–dibromofenol, 2,4,6–tribromofenol nebo tetrabromobisfenol A) působí jako endokrinní disruptory [43, 45] (tj. narušují fyziologické funkce endogenních hormonů zvířat i člověka; zasahují do syntézy, sekrece, transportu, vazby, působení i vylučování přirozených, organismu vlastních hormonů, v důsledku toho mohou poškozovat vývoj, neurologické, rozmnožovací a imunitní funkce organismu).

Vedle 4-bromofenolu (4-BP), 2,4-dibromofenolu (2,4-DBP), 2,6-dibromofenolu (2,6-DBP a 2,4,6-trobromofenolu (2,4,6-TBP) byl do studie zařazen průmyslově nejčastěji využívaný BF 3,3´,5,5´-tetrabromobisfenol A (TBBA), který se přidává především do akrylonitril-butadienstyrenu (ABS), fenolových a epoxidových pryskyřic, které jsou součástí plošných spojů. Stopy TBBA byly nalezeny v kancelářském a domácím prachu [46, 47] a také v krevním séru pracovníků s IT technikou [48]. TBBA přispívá také ke zvyšování koncentrace 2,4,6-TBP v ŽP, protože je jedním z produktů fotodegradace TBBA [38, 43].



Obr. 11: Obsah organické složky v MF a její vliv na sepraraci BF

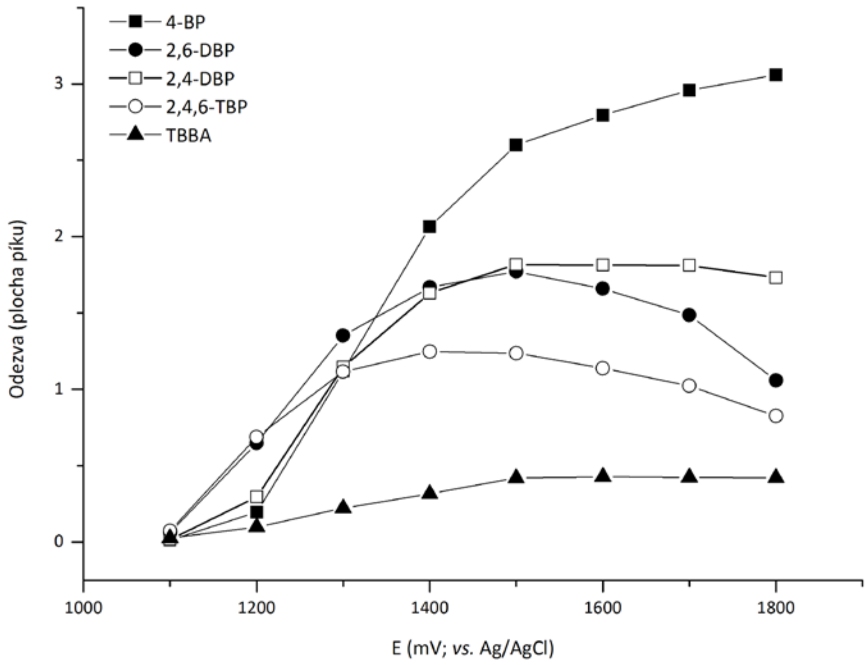
Legenda: 1) 4-BF, 2) 2,6-DBP, 3) 2,4-DBP, 4) 2,4,6-TBP, 5) TBBA. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.

Pro separaci studovaných látek byla zvolena narrow-bore kolona s oktadecylovou vázanou fází. Z hlediska separačních podmínek se pro skupinu studovaných látek osvědčilo ternární

složení mobilní fáze, které ovlivnilo selektivitu systému ve smyslu lepšího rozlišení kritického páru 2,4-DBP, 2,6-DBP (Obr. 11).

Mobilní fáze se z větší části (65 %) skládala z organického modifikátoru – acetonitrilu – avšak při postupném snižování podílu acetonitrilu v MF docházelo k prodlužování doby separace, přičemž efekt na rozlišení zmíněného kritického páru nebyl dostatečný. Na základě těchto výsledků bylo zřejmé, že je nutné ovlivnit separační mechanismus. Tuto úlohu splnila třetí složka MF – methanol, který nahradil část stávajícího organického modifikátoru. Ve výsledku byla MF tvořena 50 % acetonitrilu, 15 % methanolu a 35 % 50 mM H_2NaPO_4, pH 3,5.

Z HDV (Obr. 12) je patrné, že s rostoucím počtem atomů bromu na fenolovém skeletu klesá elektrochemická odezva, přičemž pro TBBA je odezva nejnižší a křivka má plochý tvar téměř přes celý měřený potenciálový rozsah. Na základě HDV byl pro simultánní detekci studovaných BF zvolen potenciál +1450 mV *vs.* Ag/AgCl.



Obr. 12: HDV studovaných bromovaných fenolů

Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.

Linearita kalibračních křivek sestavených z ploch píků se pro 4-BP, 2,4-DBP, 2,6-DBP a 2,4,6-TBP testovala v koncentračním rozsahu 25 – 500 ng ml^{-1} a korelační koeficient byl ve všech případech vyšší než 0,99. Vzhledem k nižší odezvě TBBA byla kalibrace provedena v rozsahu 0,2 – 1,0 mg ml^{-1} a zjištěný korelační koeficient také potvrdil linearitu. Dosažené limity detekce a kvantifikace jsou dostatečné pro stanovení BF v plastech nebo jiných reálných vzorcích. Testované validační parametry včetně opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsou shrnuty v Tab. 4.

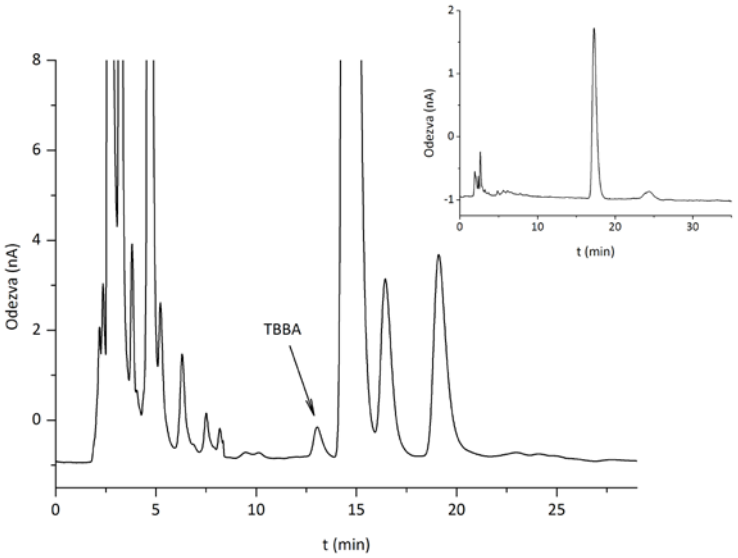
Tab. 4: Testované validační charakteristiky a kalibrační parametry

Analyt	Opakovatelnost[a] Plocha RSD (%)	Opakovatelnost[b] Plocha RSD (%)	LOD (ng ml^{-1})	LOQ (ng ml^{-1})	směrnice (*a*)	úsek (*b*)	R^2
4-BP	2,0	5,9	1,8	5,4	31,627	355,3	0,9992
2,4-DBP	1,9	6,1	4,3	13,2	18,004	74,4	0,9993
2,6-DBP	1,6	6,0	5,8	17,6	12,054	-18,1	0,9986
2,4,6-TBP	2,0	6,2	7,7	23,4	10,066	-126,2	0,9943
TBBA	2,5	6,3	56,6	171,4	4,197	21,4	0,9982

[a] v rámci jednoho dne, (n=6, c = 1 μg ml^{-1}, pro 2,4,6 TBP and TBBA c = 2 μg ml^{-1})

[b] mezi jednotlivými dny, (n=5, c = 1 μg ml^{-1}, pro 2,4,6 TBP and TBBA c = 2 μg ml^{-1})

Metoda byla ověřena na vzorku plastické hmoty získané z vnějšího krytu CRT monitoru (viz Obr. 13). Vzhledem k povaze vzorku byla pro kvantifikaci použita metoda standardního přídavku, která je schopna eliminovat matricové efekty. Metoda standardního přídavku je časově náročnější než metoda vnějšího standardu, protože je nutné vytvořit kalibraci pro každý vzorek zvlášť, což může být nevýhodné pro větší série vzorků. Avšak v případě, že není dostupný vhodný blank, poskytuje tato metoda správnější výsledky.



Obr. 13: Ukázka separace vzorku plastu odebraného z PC monitoru

Ve vzorku byl identifikován a metodou standardního přídavku kvantifikován TBBA. Vložený obrázek: chromatogram blanku. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2.2.

Vzorek plastu byl zpracován jednoduchou extrakcí kapalinou dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2.3. Identita píku byla ověřena metodou standardního přídavku a také porovnáním elektrochemické odezvy analytu se standardem. V testovaném vzorku bylo nalezeno 10,22 mg kg^{-1} tetrabromobisfenolu A.

Jak už je zmíněno výše, BF se řadí mezi polutanty ŽP a působí škodlivě zejména na vodní organismy, z tohoto důvodu je publikována celá řada prací, která se zabývá jejich analýzou ve vodách. Mořská voda není v ČR dostupná, proto byl zvolen jednoduchý model a studované látky se přidaly do kohoutkové vody v koncentraci 25 ppb (tj. 76 – 144 nmol l^{-1}). Před vlastní analýzou byl vzorek vody upraven dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2.3. Pro jednotlivé BF bylo dosaženo následujících hodnot výtěžnosti: 97,1 % pro 4-BP, 107,3 % pro 2,4 – DBP, 111,7 % pro 2,6-DBP a 113,5 % pro 2,4,6-TBP. Z těchto výsledků je zřejmé, že metoda je vhodná ke stanovení těchto BF ve vodách na úrovni desítek ppb.

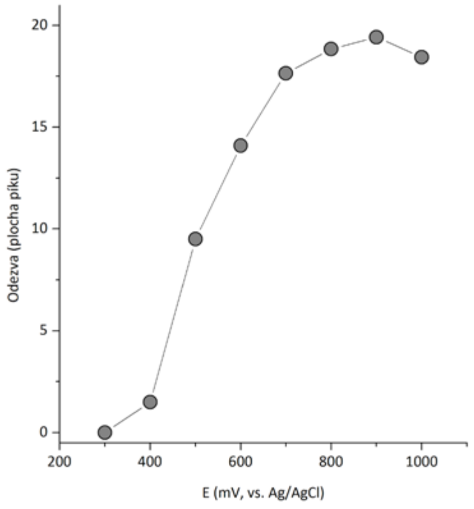
5.2.3 Aplikace CFME při HPLC analýze markeru oxidativního poškození DNA

Nositelka genetické informace, deoxyribonukleová kyselina (DNA), je tvořena dvěma komplementárními páry bází: adenin-thymin a guanin-cytosin. Reaktivní volné kyslíkové radikály (např. superoxid $O_2^{\bullet -}$, hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$) způsobují oxidativní poškození DNA, v důsledku toho dochází k četným mutacím molekuly DNA a následné replikaci chyb, které mohou být příčinou rozvoje závažných chorob. Nejsnáze oxidovatelnou bází DNA je guanin, hlavním produktem oxidativního poškození DNA je tedy 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), resp. jeho nukleosid 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosin (8-oxodGuo). Oxidovaná báze je velmi mutagenní, protože ztrácí párovou specificitu a místo cytosinu se páruje s purinovou bází adeninem. Při reparaci poškozené DNA dochází ke zvyšování koncentrace 8-oxoGua a 8-oxodGuo v buňkách, krevním séru a moči [49]. V minulých letech byly obě tyto látky podrobeny rozsáhlému studiu a všeobecně jsou považovány za markery oxidativního poškození DNA a buněčného oxidativního stresu. [50, 51]

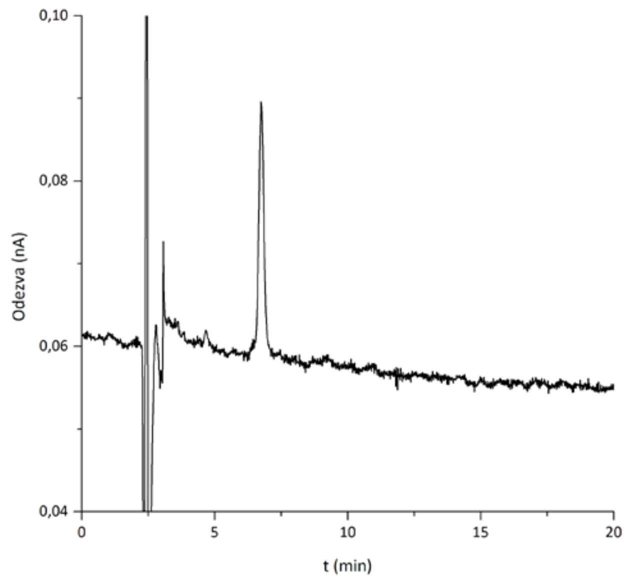
Interpretace naměřených výsledků v klinických vzorcích je poměrně složitá záležitost, nicméně zvýšené hladiny 8-oxodGuo jsou spojeny s rozvojem závažných onemocnění jako je rakovina, diabetes, arterioskleróza, neurodegenerativní poruchy a choroby spojené se stárnutím [49-52].

Oba zmíněné markery jsou elektroaktivní, ale vzhledem k tomu, že 8-oxoGua na klasických reverzních fázích vykazuje nízkou retenci, pozornost se zaměřila na 8-oxodGuo.

Z hydrodynamického voltamogramu na Obr. 14 je zřejmé, že 8-oxodGuo podléhá oxidaci již za nízkých potenciálů, což může být výhodné v případě, že jsou ve vzorku současně přítomny elektrochemicky aktivní nečistoty. Jejich interference lze pak omezit či vyloučit pouhým snížením pracovního potenciálu při zachování signálu analytu. V reálných vzorcích se nejlépe osvědčil potenciál +800 mV (*vs.* Ag/AgCl), při vyšších hodnotách pracovního potenciálu bylo měření již komplikováno interferencemi matrice a vyšším šumem.



Obr. 14: Hydrodynamický voltamogram 8-oxodGuo. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2. [53]

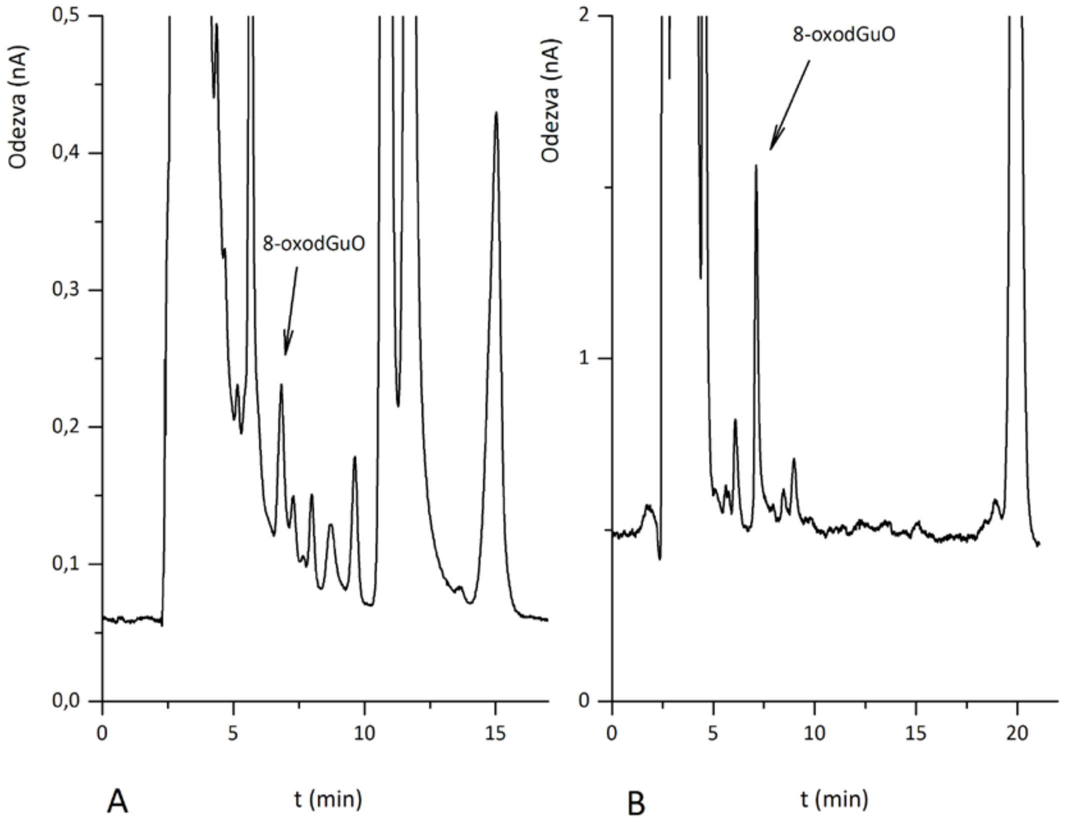


Obr. 15: Odezva CFME pro standard 8-oxodGuo o koncentraci 5 nmol l-1 (50 fmol „on column"). Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2. [53]

Chromatogram na Obr. 15 názorně dokumentuje značný analytický potenciál senzorů na bázi CFME. Představuje analýzu standardu 8-oxodGuo na úrovni desítek fmol (vyjádřeno jako absolutní množství analytu na koloně). Velmi malý objem detekční cely s CFME má za následek minimální rozmytí píku a přispívá tím ke zlepšení poměru signál/šum.

Pro srovnání citlivosti různých elektrod vůči studovanému analytu byly pro modelové roztoky 8-oxodGuo proměřeny v koncentračním rozmezí 5 – 80 nmol l^{-1} (korespondujícím s obvyklými fyziologickými hladinami) kalibrační závislosti na třech CFME a porovnány směrnice získaných kalibračních křivek. Hodnoty RSD směrnic jednotlivých CFME se nelišily o více než 6 %, což lze považovat za velmi dobrý výsledek, uvážíme-li náročnost procesu přípravy uhlíkového vlákna i kompletace detekční CFME cely před jejím vřazením do HPLC systému. Parametry kalibrační křivky pro elektrodu, která byla poté použita pro analýzu reálných vzorků, byly následující: y=8,4176x - 5,9192 a R^2=0,9987.

Odezva detektoru byla dostatečně citlivá také pro analýzu reálných vzorků krevní plasmy - Obr. 16 porovnává hladinu studovaného markeru u zdravého jedince a pacienta trpícího rakovinou prostaty. Na první pohled je zřejmé, že koncentrace 8-oxodGuo je u nemocného přibližně o jeden řád vyšší. Identita píku byla v obou případech potvrzena metodou standardního přídavku. Vzorky krevní plasmy byly před analýzou upraveny jednoduchou ultrafiltrací přes membránový filtr (cut-off 10 kDa), filtrát bylo možné přímo nastřikovat do HPLC systému. Je to elegantní metoda úpravy vzorku vhodná pro analyty, které se nevážou na proteiny a nevyžaduje velké množství vzorku, nevýhodou je finanční náročnost.



Obr. 16: Analýza 8-oxodGuo v reálných vzorcích krevní plasmy

A – Analýza krevní plasmy zdravého dobrovolníka, B – analýza krevní plasmy pacienta trpícího rakovinou prostaty. Experimentální podmínky viz kapitola 5.1.2. [53]

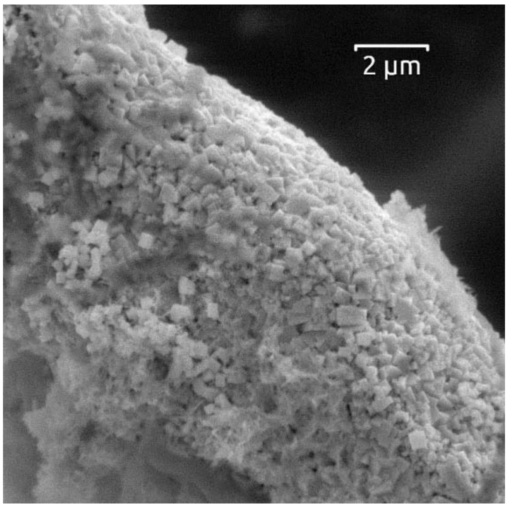
5.2.4 VYUŽITÍ CFME MODIFIKOVANÝCH VRSTVOU MĚDI PRO AMPEROMETRICKOU DETEKCI SACHARIDŮ [54]

Citlivá analýza sacharidů má klíčový význam pro celou řadu oblastí, sacharidy představují však z analytického hlediska velmi problematickou skupinu látek. Jejich molekuly neobsahují chromofor, fluorofor či jinou funkční skupinu, která by usnadňovala detekci tradičními instrumentálními technikami.

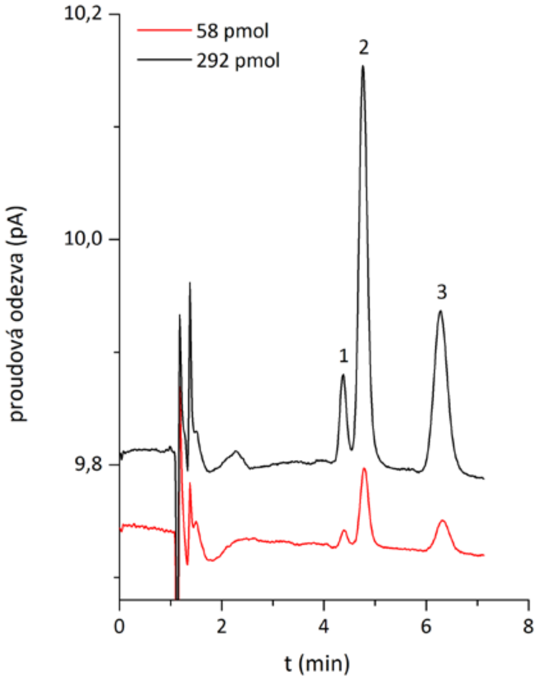
Pro analýzy nízkých koncentrací sacharidů v rozmanitých matricích nalezla široké uplatnění amperometrická detekce s pracovními elektrodami z ušlechtilých kovů, především platiny a zlata [55-57]. Při pulsně-amperometrické detekci (PAD) se využívá skutečnosti, že sacharidy je možné na těchto kovech elektrochemicky oxidovat v silně alkalickém prostředí již za nízkých kladných potenciálů. Protože produkty takové elektrodové reakce silně kontaminují povrch elektrody a výrazně tím snižují či znemožňují její další odezvu, je nutné pracovat v pulsním režimu, avšak limity detekce dosahované PAD bývají často horší než u technik s konstantním potenciálem [58].

Z výše uvedených důvodů se jako atraktivní alternativa k PAD jeví přímá amperometrická detekce za konstantního potenciálu při použití pracovních elektrod na bázi mědi [59]. Při oxidaci sacharidů se předpokládá specifická katalytická spoluúčast oxidů Cu^{II}/Cu^{III} vznikajících na povrchu elektrody [60].

Protože se podařilo uspokojivě zvládnout techniku elektrolytického pokovení [61], vhodnou rovněž pro modifikaci uhlíkových vláken, a s jejím využitím následně připravit CFME modifikované tenkými povrchovými vrstvami různých kovů [62], dalším logickým krokem bylo otestovat využitelnost CFME pokrytých nanostrukturovanou mědí (Cu-CFME) jako senzorů pro detekci sacharidů v systému HPLC. Pro aktivaci povrchu připravených Cu-CFME se osvědčil jednoduchý a časově nenáročný postup, sestávající z pětiminutové elektrochemické anodizace elektrody při +700 mV (*vs.* Ag/AgCl) v roztoku 0,01M-NaOH. U takto ošetřených Cu-CFME byla pozorována změna morfologie povrchu za tvorby kubických krystalů oxidů mědi o rozměrech 50-400 nm (viz snímek ze SEM na Obr. 17).



Obr. 17: Snímek Cu-CFME po 5 min anodizace
v 0,01-M NaOH při +700 mV (*vs.* Ag/AgCl), převzato z cit. [54].



Obr. 18: HPLC chromatogram vybraných sacharidů.
1-sacharóza, 2-laktóza, 3-maltóza (c_1 = 20 mg l^{-1}, c_2 = 4 mg l^{-1}). Podmínky viz kap. 5.1.2.2.

Při charakterizaci analytických vlastností Cu-CFME (upravených výše uvedeným způsobem) bylo na modelových roztocích glukózy zjištěno, že optimální odezva se nachází v potenciálovém okně mezi +500 až +700 mV (*vs.* Ag/AgCl). V režimu FIA (bez zařazené chromatografické kolony) byl detekční systém s Cu-CFME pracovní elektrodou otestován na standardech 9 sacharidů (xylóza, fruktóza, galaktóza, glukóza, sacharóza, maltóza, laktóza,

rafinóza, dextran), přičemž zjištěné limity detekce se pohybovaly v rozmezí $3{,}5.10^{-7}$ až $2{,}9.10^{-6}$ mol l^{-1}. Test stability odezvy elektrody byl proveden opakovanými nástřiky laktózy po 0; 0,5; 1; 2; 3; 12; 13; 14 hod.; RSD zjištěná mezi jednotlivými nástřiky se pohybovala v rozmezí 1,6-7,2 % a zjištěná opakovatelnost odezvy mezi elektrodami byla 20 %, což lze, vzhledem k individuálním odchylkám mezi jednotlivými vlákny a dále nemožností přesně kontrolovat aktivní délku vlákna uvnitř HPLC kapiláry při osazování detekční cely, považovat za uspokojivý výsledek.

Na Obr. 18 je ukázka HPLC analýzy třech vybraných disacharidů na dvou koncentračních hladinách (vyjádřených jako absolutní množství na koloně) s pracovní elektrodou Cu-CFME při +500 mV (*vs.* Ag/AgCl). Pro separaci byla použita HPLC kolona na bázi uhlíku, která umožňuje, na rozdíl od konvenčních kolon se silikagelem, práci v oblastech s vysokým pH bez omezení spojených s rizikem degradace stacionární fáze.

Je zřejmé, že Cu-CFME, připravené a aktivované popsaným postupem, představují účinný neenzymatický senzor pro detekci nízkých koncentrací sacharidů, zejména pak v průtokových systémech, tedy např. po jejich předchozí separaci mikrokolonovou HPLC. K tomuto využití je předurčuje zejména jejich stabilní, rychlá a citlivá odezva a v neposlední řadě miniaturní rozměry. Lze očekávat, že CFME na tomto principu by se mohly dobře uplatnit také při analýze dalších obtížně detekovatelných analytů, což zůstává předmětem dalšího výzkumu.

6 ZÁVĚR

V rámci předkládané disertační práce jsem se zaměřila na dvě oblasti amperometrické detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), a to na využití borem dopované diamantové elektrody (BDD) a mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFME). Jak BDD tak CFME se vyznačují pozoruhodnými vlastnostmi, které tyto elektrody značně odlišují od ostatních elektrodových materiálů a konstrukcí.

Výhod spojení BDD s HPLC bylo využito při vývoji citlivé metodiky vhodné ke stanovení léčiv erektilní dysfunkce a pulmonární hypertenze, sildenafilu (Viagra™) a vardenafilu (Levitra™), včetně jejich hlavních aktivních metabolitů N-desmethylsildenafilu a N-desethylvardenafilu v krevní plasmě. Z hlediska chromatografie bylo optimalizováno zejména složení pufru, jeho koncentrace a pH. Výsledkem byla dokonalá a rychlá separace (12 minut) všech analytů na krátké narrow-bore koloně s vázanou C18 fází bez nutnosti použití gradientové eluce. Detekce analytů je založena na jejich oxidaci na BDD elektrodě při potenciálu +1520 mV (*vs.* Pd/H_2). Odezva byla dobře reprodukovatelná a lineární v rozsahu koncentrací 10 – 400 ng ml^{-1} a LOQ pro jednotlivé analyty se pohybuje na úrovni 10 ng ml^{-1}. Metoda vyžaduje pouze malé množství vzorku (150 µl krevní plasmy), což může být přínosné v případě omezeného množství biologického materiálu. Metodika byla ověřena při analýze krevní plasmy s přídavkem zmíněných analytů na terapeutických koncentračních hladinách. Vyvinutá metoda může najít uplatnění při terapeutickém monitoringu nebo ve forenzní analýze, a při vhodné úpravě vzorku také při kontrole kvality léčiv nelicencovaných distributorů.

Klíčové vlastnosti elektrod jsou dány nejen použitým materiálem, ale také tvarem a velikostí, jak je evidentní u systémů na bázi mikroelektrod. Druhá část této disertační práce je zaměřena na využití mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFME) jako citlivých senzorů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Základní analytické charakteristiky detekčního systému na bázi CFME byly testovány na analýze modelové směsi vybraných fenolických kyselin (gallová, protokatechová, gentisová, 4-hydroxybenzoová a kávová), a rovněž při vývoji HPLC metody stanovení vybraných bromovaných fenolů (4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol, 2,4,6-tribromofenol a 3,3',5,5'-tetrabromobisfenol A).

Elektrochemický CFME detektor byl dále úspěšně otestován při analýze významného markeru oxidativního poškození DNA, 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosinu (8-oxodGuo). Citlivost a selektivita metody byla ověřena na reálných vzorcích krevní plasmy pacientů s karcinomem prostaty. Dosažené výsledky ukazují, že analytické vlastnosti CFME senzorů v tomto

uspořádání mohou být dobře využitelné pro rutinní sledování hladin 8-oxodG v tělních tekutinách.

Jako značně perspektivní se jeví možnost změny selektivity CFME díky modifikaci jejich povrchu, například nanostrukturovanými vrstvami kovů. Příkladem analytické aplikace, využívající CFME modifikovanou elektrolyticky deponovanou vrstvou mědi (Cu-CFME), je stanovení vybraných sacharidů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí za konstantního potenciálu. 58 pmol laktózy, sacharózy a maltózy („on-column") bylo detekováno na Cu-CFME při +500 mV (*vs.* Ag/AgCl) po jejich předchozí HPLC separaci v silně alkalickém prostředí. Zajímavé analytické možnosti do budoucnosti nabízí modifikace CFME také dalšími kovy.

Výše uvedené příklady dokumentují mimořádné analytické vlastnosti studovaných amperometrických detekčních systémů v kombinaci s HPLC. BDD elektrody se uplatní zejména při analýze obtížně oxidovatelných látek nebo v případech, kdy může docházet k pasivaci elektrodového povrchu. Hlavní předností CFME kromě mimořádné citlivosti je možnost modifikace povrchu mikroelektrod za účelem změny selektivity či jejich implementace do kapilárních a mikrofluidických systémů, což současně představuje perspektivní oblasti budoucího vývoje.

7 LITERATURA

[1] K. Stulik, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, Pure and Applied Chemistry 72 (2000) 1483-1492.
[2] K. Toth, K. Stulik, W. Kutner, Z. Feher, E. Lindner, Pure and Applied Chemistry 76 (2004) 1119-1138.
[3] J. Buffle, M.L. Tercier-Waeber, Trac-Trends in Analytical Chemistry 24 (2005) 172-191.
[4] M.G. Donker, N.J. Reinhoud, C.F.M. van Valkenburg, Attomole detection limits in micro HPLC-ECD, Univ College Dublin, Belfield Dublin, 2001.
[5] F.C. Cheng, J.S. Kuo, Journal of Chromatography B-Biomedical Applications 665 (1995) 1-13.
[6] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, Electrochemical Detection in HPLC, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.
[7] M.I. Montenegro, M.A. Queirós, J.L. Daschbach, Microelectrodes: Theory and Applications, Springer Netherlands, Dordrecht, 1991.
[8] Z. Bartosova, D. Riman, P. Jakubec, V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, Scientific World Journal Art.No.: 295802 (2012).
[9] V. Halouzka, J. Hrbac, D. Jirovsky, D. Riman, P. Jakubec, Z. Bartosova, V. Masek, P. Mojzes, J. Vacek, Curr. Anal. Chem. 9 (2013) 305-311.
[10] D. Riman, Z. Bartosova, V. Halouzka, J. Vacek, D. Jirovsky, J. Hrbac, Rsc Advances 5 (2015) 31245-31249.
[11] K. Patel, K. Hashimoto, A. Fujishima, Denki Kagaku 60 (1992) 659-659.
[12] G. Pastor-Moreno, D.J. Riley, Electrochim Acta 47 (2002) 2589-2595.
[13] Y.V. Pleskov, Russian Journal of Electrochemistry 38 (2002) 1275-1291.
[14] J. Waraska, M. Acworth, American Laboratory 39 (2007) 38-+.
[15] A. Kraft, International Journal of Electrochemical Science 2 (2007) 355-385.
[16] M.C. Granger, J.S. Xu, J.W. Strojek, G.M. Swain, Anal. Chim. Acta 397 (1999) 145-161.
[17] J.S. Xu, M.C. Granger, Q.Y. Chen, J.W. Strojek, T.E. Lister, G.M. Swain, Anal. Chem. 69 (1997) A591-A597.
[18] A. Fujishima, Diamond Electrochemistry, Tokyo: BKC, Amsterdam: Elsevier, 2005.
[19] M. Plante, B. Bailey, I. Acworth, Lc Gc North America (2010) 36-36.
[20] B. Bailey, J. Waraska, I. Acworth, Methods Mol Biol 594 (2010) 327-339.
[21] T.A. Ivandini, K. Honda, T.N. Rao, A. Fujishima, Y. Einaga, Talanta 71 (2007) 648-655.
[22] Z. Bartosova, D. Jirovsky, A. Horna, J Chromatogr A 1218 (2011) 7996-8001.
[23] D.J.R. Gary J. Muirhead, Donald K. Walker, Philip Wastall, Br J Clin Pharmacol 53 (2002).
[24] D.K. Walker, M.J. Ackland, G.C. James, G.J. Muirhead, D.J. Rance, P. Wastall, P.A. Wright, Xenobiotica 29 (1999) 297-310.
[25] M. Gupta, A. Kovar, B. Meibohm, Journal of Clinical Pharmacology 45 (2005) 987-1003.
[26] B. Uslu, B. Dogan, S.A. Ozkan, H.Y. Aboul-Enein, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 127-134.
[27] S.A. Ozkan, B. Uslu, P. Zuman, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 227-233.
[28] J. Rodriguez, J.J. Berzas, G. Castaneda, N. Rodriguez, Talanta 62 (2004) 427-432.
[29] K. Tyszczuk, M. Korolczuk, Bioelectrochemistry 78 (2010) 113-117.
[30] M. Al-Ghazawi, M. Tutunji, S. AbuRuz, J Pharmaceut Biomed 43 (2007) 613-618.
[31] R.J. Robbins, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (2003) 2866-2887.
[32] S.M. Henning, P.W. Wang, N. Abgaryan, R. Vicinanza, D.M. de Oliveira, Y.J. Zhang, R.P. Lee, C.L. Carpenter, W.J. Aronson, D. Heber, Molecular Nutrition & Food Research 57 (2013) 483-492.

[33] A. Simic, D. Manojlovic, D. Segan, M. Todorovic, Molecules 12 (2007) 2327-2340.
[34] Thermo Scientific, Dionex 6011RS ultra Analytical Cell, produktový specifikační list.
[35] Z. Bartosova, D. Jirovsky, D. Riman, V. Halouzka, M. Svidrnoch, J. Hrbac, Talanta 122 (2014) 115-121.
[36] M. Nichkova, M. Germani, M.P. Marco, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 29-34.
[37] L.S. Birnbaum, D.F. Staskal, Environmental Health Perspectives 112 (2004) 9-17.
[38] O. Segev, A. Kushmaro, A. Brenner, International Journal of Environmental Research and Public Health 6 (2009) 478-491.
[39] C.J. Henny, J.L. Kaiser, R.A. Grove, B.L. Johnson, R.J. Letcher, Ecotoxicology 18 (2009) 802-813.
[40] M. Venier, M. Wierda, W.W. Bowerman, R.A. Hites, Chemosphere 80 (2010) 1234-1240.
[41] U. Nordlof, B. Helander, A. Bignert, L. Asplund, Sci Total Environ 409 (2010) 238-246.
[42] M.A. McKinney, R.J. Letcher, J. Aars, E.W. Born, M. Branigan, R. Dietz, T.J. Evans, G.W. Gabrielsen, E. Peacock, C. Sonne, Environ Int 37 (2011) 365-374.
[43] T. Hassenklover, S. Predehl, J. Pilli, J. Ledwolorz, M. Assmann, U. Bickmeyer, Aquatic Toxicology 76 (2006) 37-45.
[44] G.J. Gribble, Environmental Science and Pollution Research 7 (2000) 37-49.
[45] A. Covaci, S. Voorspoels, M.A.E. Abdallah, T. Geens, S. Harrad, R.J. Law, J Chromatogr A 1216 (2009) 346-363.
[46] C. Yu, B. Hu, J Chromatogr A 1160 (2007) 71-80.
[47] H. Fromme, B. Hilger, E. Kopp, M. Miserok, W. Volkel, Environ Int 64 (2014) 61-68.
[48] K. Jakobsson, K. Thuresson, L. Rylander, A. Sjodin, L. Hagmar, A. Bergman, Chemosphere 46 (2002) 709-716.
[49] B.N. Ames, Free Radical Research 7 (1989) 121-128.
[50] I.A. Rebelo, J.A.P. Piedade, A.M. Oliveira-Brett, Talanta 63 (2004) 323-331.
[51] H.E. Poulsen, L.L. Nadal, K. Broedbaek, P.E. Nielsen, A. Weimann, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1840 (2014) 801-808.
[52] A. Valavanidis, T. Vlachogianni, C. Fiotakis, Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews 27 (2009) 120-139.
[53] Z. Bartošová, nepublikovaná data.
[54] D. Riman, Z. Bartosova, V. Halouzka, J. Vacek, D. Jirovsky, J. Hrbac, RSC Advances 5 (2015) 31245-31249.
[55] T.R.I. Cataldi, C. Campa, G.E. De Benedetto, Fresenius J. Anal. Chem. 368 (2000) 739-758.
[56] Y.C. Lee, J Chromatogr A 720 (1996) 137-149.
[57] C. Corradini, Annali Di Chimica 84 (1994) 385-396.
[58] R.P. Baldwin, Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, in: Z. El Rassi (Ed.) Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 947-959.
[59] N. Torto, Bioelectrochemistry 76 (2009) 195-200.
[60] J.M. Marioli, T. Kuwana, Electrochim Acta 37 (1992) 1187-1197.
[61] V. Halouzka, P. Jakubec, L. Kvitek, V. Likodimos, A.G. Kontos, K. Papadopoulos, P. Falaras, J. Hrbac, Journal of the Electrochemical Society 160 (2013) B54-B59.
[62] J. Hrbáč, V. Halouzka, R. Večerková, Z. Bartošová, D. Riman, nepublikovaná data.

Curriculum vitae

Titul, jméno a příjmení	Mgr. Zdenka Bartošová
Bydliště	Dolní Lhota 19, 763 23 Dolní Lhota u Luhačovic
E-mail	bartosova.zdenka@gmail.com

Vzdělání

2009 – dosud	postgraduální studium na PřF UP Olomouc, téma disertační práce: *Možnosti využití elektrochemických detekčních systémů v separačních technikách*
2007 – 2009	magisterské studium na PřF UP Olomouc, obor analytická chemie, téma diplomové práce: *Využití elektrochemické detekce při analýze vybraných perorálních antidiabetik metodou HPLC*
2003 – 2007	bakalářské studium na PřF UP Olomouc, obor aplikovaná chemie, téma bakalářské práce: *Analýza flavonoidů s využitím HPLC s coulometrickou detekcí*

Pracovní zkušenosti

1.1.2015 – dosud	výzkumný pracovník, Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci
1.9.2012 – 31.8.2014	asistent manažerů projektu *„Rozvoj vzdělávání a výzkumu v oblasti chemie a medicíny popáleninových stavů“*
1.6.2012 – 31.5.2015	lektor, Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci
1.1.2012 – 31.12.2014	výzkumný pracovník, Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci

Odborné vědecké zaměření

Analytická chemie, separační techniky – spojení kapalinové chromatografie s elektrochemickými detekčními systémy a využití těchto metod při analýze a detekci biologicky aktivních látek.

Odborná praxe a stáže

2015 (3 měsíce)	TEVA Czech Industries, s.r.o., Opava (CZ) – Oddělení kontroly kvality (farmaceutická analýza)
2014 (3 měsíce)	Norwegian University of Science and Technology, Department of Biotechnology, Ass. Prof. Per Bruheim; Trondheim, Norsko
2013 (3 měsíce)	Norwegian University of Science and Technology, Department of Biotechnology, Prof. Per Bruheim; Trondheim, Norsko

Pedagogická činnost

- Cvičení z instrumentálních metod
- Chemický seminář 1, Chemický seminář 2
- Chemie životního prostředí
- oponentura bakalářských (1) a diplomových prací (2)

Projektová činnost

Grantová agentura ČR

- *GA ČR P108/15/05198S* Nanostructured metal layers on conductive and semiconductive substrates as a sensing platform for application in chemical and biomedical analysis, 2015-2017, hl. řešitel J. Hrbáč; člen řešitelského kolektivu.
- *GA ČR P206/12/079* Carbon microfiber electrodes modified by electrochemical surface treatment and nanostructured metal layers as cuttingedge HPLC-EC detectors, 2012-2014, hl. řešitel J. Hrbáč; člen řešitelského kolektivu.

Interní grantová agentura UP, IGA

- *PrF_2013_030* Úprava vzorku při analýze složitých matric; člen řešitelského týmu
- *PrF_2012_020* Selektivita a analýza složitých matric; člen řešitelského týmu
- *PrF_2011_025* Analýza izomerů biologicky aktivních látek; člen řešitelského týmu
- *PrF_2010_028* Analytické vlastnosti vybraných izomerů; člen řešitelského týmu

Operační program vzdělávání pro konkurenceschopnost

- *OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0066* Rozvoj a internacionalizace chemických a biologických studijních programů na UP v Olomouci, *2*012-2015, hl. řešitel Z. Dvořák; člen realizačního týmu.
- *OP VK prioritní osa 2.4 CZ.1.07/2.4.00/31.0006* Rozvoj vzdělávání a výzkumu v oblasti chemie a medicíny popáleninových stavů, 2012-2014, hl. řešitel J. Petr; člen realizačního týmu.

Fond rozvoje vysokých škol

- FRVŠ 2118/2012: Tvorba výukových skript sloužících k inovaci předmětu Cvičení z aplikované analytické chemie; spoluřešitel.

Seznam publikací

Publikace v impaktovaných časopisech

1. Riman D., **Bartosova Z.**, Halouzka V., Vacek J., Jirovsky D., Hrbac J.: Facile preparation of nanostructured copper-coated carbon microelectrodes for amperometric sensing of carbohydrates. *RSC Advances* **5** (2015) 31245.

2. **Bartosova Z.**, Jirovsky D., Riman D., Halouzka V., Svidrnoch M., Hrbac J.: HPLC-ED of low-molecular weight brominated phenols and tetrabromobisphenol A using pretreated carbon fiber microelectrode. *Talanta* **122** (2014) 115.

3. Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D., Riman D., Jakubec P., **Bartosova Z.**, Masek V., Mojzes P., Vacek J.: Electrochemical pretreatment of carbon fiber microelectrodes based on sinusoidal-wave potential cycling and its application to amperometric sensing of bioactive compounds. Curr. Anal. Chem. **9** (2013) 305.

4. **Bartosova Z.**, Riman D., Jakubec P., Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D.: Electrochemically pretreated carbon microfiber electrodes as sensitive HPLC-EC detectors. THESCIENTIFICWORLDJO. (2012) art. no. 295802.
5. **Bartošová Z.**, Jirovský D., Horna A.: High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma. J. Chromatogr. A **1218** (2011) 7996.
6. Jirovsky D., Bednar P., Myjavcova R., **Bartosova Z.**, Skopalova J., Tvrdonova M., Lemr K.: Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by on-line combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass specrometry, Monatsh. Chem. **142** (2011) 1211.
7. Jirovsky D., **Bartosova Z.**, Skopalova J., Maier V.: Electrochemical characterization of repaglinide and its determination in human plasma using liquid chromatography with dual-channel coulometric detection, J. Chromatogr. B **878** (2010) 3242.

Publikace v recenzovaných časopisech

1. Jirovsky D., **Bartosova Z.**, Skopalova J.: Electrochemistry On-line With Mass Spectrometry: Notes On Current State Of The Technique, Acta Univ Palacki Olomouc, Fac Rerum Nat, Chem **47**, (2007) 22.

Prezentace na odborných setkáních *(prezentující autor zvýrazněn)*

1. **Bartošová Z.**, Jirovský D., Riman D., Horna A., and J. Hrbáč: *HPLC as a Tool for Characterization of Antioxidants in Lupin Oil.* 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods. Istanbul (Turkey), October 14-17, 2014.
2. Jirovsky D., **Bartosova Z.**, Hrbac J.: *HPLC of Brominated Phenols Using Amperometric Detection at Carbon Fiber Microelectrode.* 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques, ITP 2013. Tenerife, Canary Islands (Spain), October 6-9, 2013.
3. **Bartosova Z.**, Jirovsky D.: *Utilization of specialty amperometric sensors in HPLC with electrochemical detection: selected applications*, In *Proceedings of the international symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2012.* Chemica 50S. Olomouc. Acta UPOL, 2012, s. 74. ISBN 978-80-244-3115-4.
4. **Bartosova Z.**, Jirovsky D., Horna A.: HPLC with Electrochemical Detection: Selected Pharmacological Applications. In *Scientific program, Book of Abstracts & Exhibition Catalogue of The 14th Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society, Isranalytica 2011*, Tel Aviv, Israel, February 7-8, 2011. Ness-Ziona. Bioforum Applied Knowledge Center, 2011. p. 89.
5. Jirovský D., **Bartošová Z.**, Skopalová J., Maier V.: *Electrochemical Characterization of Repaglinide and its Determination in Human Plasma Using HPLC with Dual-channel coulometric Detection*, Proceedings of the international symposium Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2010, Chemica 47S, Acta UPOL, str. 72 (ISBN: 978-80-244-2470-5).

6. Bartošová Z., Jirovský D., Skopalová J., Maier V.: *Stanovení perorálních antidiabetik pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí*. In Barek J., Navrátil T. (Eds.). *Moderní elektrochemické metody:* sborník přednášek z XXIX. mezinárodní odborné konference, Jetřichovice 25. – 29. května 2009. Ústí nad Labem. BEST Servis, 2009, s. 13. ISBN 978-80-254-3997-5.