UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

Výzkum a vývoj elektrochemických senzorů ke stanovení biologicky aktivních sloučenin

Bakalářská práce

Autor práce: Iveta Hloušková

Studijní obor: Aplikovaná chemie

Vedoucí práce: Mgr. Daniel Riman

Olomouc 2018

Prohlášení

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, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie Přírodovědecké Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

……..…….

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu Mgr. Danielovi Rimanovi za vedení, odbornou pomoc a věnovaný čas při vypracovávání této bakalářské práce. Děkuji doc. Janu Hrbáčovi PhD. za cenné rady a poskytnutí pomůcek a přístrojů použitých k měření. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Skopalové PhD a doc. RNDr. Petru Bartákovi PhD. za jejich pomoc a praktické rady. Poděkování patří i Mgr. Janu Rozsypalovi za podporu a poskytování dobré nálady.

Bibliografická identifikace

Autor	Iveta Hloušková
Název práce	Výzkum a vývoj elektrochemických senzorů ke stanovení biologicky aktivních sloučenin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Mgr. Daniel Riman
Rok obhajoby	2018
Abstrakt	Práce je zaměřena na vývoj a charakterizaci dvou uhlíkových materiálů pro stanovení kolchicinu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Těmito dvěma uhlíkovými materiály jsou senzor na bázi lisovaného grafitu a mikroelektrody z uhlíkových vláken. Dále je věnována pozornost extrakci kolchicinu z reálného vzorku moči pomocí LLE, je zkoumán vliv extrakčního činidla a pH extrahovaného roztoku.
Klíčová slova	Uhlíkové vlákno, HPLC, elektrochemická detekce, extrakce kapalinou, kolchicin, elektrochemická aktivace
Počet stran	54
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Iveta Hloušková
Title	Research and development of electrochemical sensors for detection of biological active compounds
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Analtical Chemistry
Supervisor	Mgr. Daniel Riman
The year of presentation	2018
Abstract	The thesis is focused on development and characterization of two carbon based materials for determination of colchicine by HPLC-ED (electrochemical detection). These materials are Pressed graphite electrode and carbon fiber microelectrodes. The extraction of colchicine from real sample by LLE is investigated, the influence of extraction agent and pH of extracted solution is examined.
Keywords	Carbon fiber, HPLC, electrochemical detection, liquid extraction, colchicine, electrochemical activation, electrochemical pretreatment
Number of pages	54
Language	Český

Obsah

1 ÚVOD 1
2 TEORETICKÁ ČÁST 2
2.1 Úprava vzorku před analýzou 2
2.1.1 Srážení 2
2.1.2 Filtrace 2
2.1.3 Centrifugace 3
2.1.4 Vysolování 3
2.1.5 Dialýza 3
2.1.6 Chromatografie 4
2.2 Extrakce 5
2.2.1 Extrakce na tuhé fázi 6
2.2.2 Mikroextrakce tuhou fází 7
2.2.3 Extrakce kapalina – kapalina 7
2.2.4 Mikroextrakce kapalnou fází 10
2.3 Stanovení kolchicinu v reálných vzorcích 10
2.3.1 Metody stanovení a detekce 12
2.3.1.1 HPLC s UV detekcí 12
2.3.1.2 HPLC s hmotnostní detekcí 13
2.3.1.3 HPCL s elektrochemickou detekcí 14
2.3.1.4 Elektrochemická detekce 14
2.3.2 Extrakce kolchicinu 15
2.3.2.1 Extrakce pomocí LLE 15
2.3.2.2 Ostatní typy extrakcí 17
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 18
3.1 Pomůcky a přístrojové vybavení 18

3.2 Chemikálie 18
3.3 Příprava vzorků 19
3.4 Výroba mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFMEs) 20
3.5 Modifikace elektrod 21
3.6 Cyklická voltametrie a amperometrie 21
3.7 Měření HPLC-EC 22
3.8 Měření HPLC-UV 22
4 Výsledky a diskuze 23
4.1 Elektrochemická charakterizace PGE 23
4.1.1 Potenciálové okno 23
4.1.2 Průběh oxidace kolchicinu na PGE 23
4.2 Amperometrická stanovení 25
4.2.1 Amperometrické testování analytických vlastností PGE 25
4.2.2 Amperometrické srovnání různých modifikací CFME 27
4.3 HPLC experimenty 30
4.3.1 HPLC měření na PGE 30
4.3.2 HPLC měření na CFME 33
4.4 Výběr extrakčního činidla a pH extrahovaného roztoku 34
5 Závěr 41
6 Seznam zkratek 43
7 Seznam literatury 44

1 ÚVOD

Elektrochemické metody jsou známé jednoduchostí uspořádání, nízkými pořizovacími a provozními náklady, dobrou citlivostí a zároveň selektivitou stanovení. Vedle uvedených výhod lze zmínit také snadnou miniaturizovatelnost elektrochemických detekčních systémů.

Elektrochemickou detekci lze aplikovat pro stanovení řady biologicky aktivních sloučenin, např. antioxidantů, vitamínů, nebo přírodních alkaloidů. Jedním z přírodních alkaloidů je i kolchicin. Kolchicin je získáván z rostlin ocúnu podzimního a využívá se hlavně k léčbě akutních záchvatů bolesti při dně a artritidě. Zároveň je to však také mitotický jed. Běžně jsou zaznamenávány případy předávkování a otravy pacientů, z čehož plyne nutnost vyvinout metodu pro jeho spolehlivé stanovení.

Cílem této práce bylo srovnávání dvou elektrodových materiálů, kdy prvním byl lisovaný grafit (PGE) a druhým mikroelektrody z uhlíkových vláken (CFMEs), u nichž byla testována řada metod aktivace elektrodového povrchu. Srovnání elektrodových materiálů a jejich charakterizace byly provedeny pomocí cyklické voltametrie a amperometrie. Následně byla vyvinuta metod stanovení kolchicinu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí využívající jako elektrodový materiál PGE a druhá využívající CFME. Následně byla vyvinuta metoda extrakce kolchicinu z reálných vzorků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Úprava vzorku před analýzou

Cílem chemické analýzy je získat informace o vlastnostech, resp. složení daného vzorku, k čemuž se využívá celá řada analytických metod. Analytické metody se dělí na chemické a instrumentální. V současnosti ve výzkumu figurují v první řadě metody instrumentální. Chemické metody však stále nalézají uplatnění, často jsou využívány při kontrole přesnosti a preciznosti instrumentální analýzy, tedy jako standardizační metody. Před vlastní analýzou je obvykle vhodné vzorek upravit. Úprava vzorku je soubor operací, jehož cílem je převést analyt do snadno stanovitelné podoby. Podle typu vzorku a zvoleného způsobu detekce pak volíme postup úpravy.

U reálných vzorků je hledaný analyt nutno oddělit od ostatních složek vzorku kvůli možnému rušivému vlivu (tzv. interferenci) složek vzorku (tzv. interferenty). K oddělení analytu jsou využívány separační metody, např. srážení, filtrace, centrifugace, vysolování, dialýza, chromatografie a extrakce.

2.1.1 Srážení

Cílem srážení je získat v roztoku sraženinu, čímž dosáhneme vzniku dvou fází, pevné sraženiny a kapalného rozpouštědla. Sraženina vzniká přidáním vhodného srážecího činidla (např. fosforečnan amonný, aceton, ethanol, ethylenglykol). Směs se pak dá dělit filtrací nebo centrifugací. Pro další práci lze využít: a) sraženinu, kterou lze dále přečistit, žíhat nebo sušit, nebo b) roztok nad sraženinou (supernatant). Srážením lze odstranit např. proteiny z reálných vzorků (krevní sérum, moč).

2.1.2 Filtrace

Principem filtrace je oddělování pevných částic směsi od kapaliny nebo plynu pomocí filtru (papír, membrána, písek). Na filtru se zachytí pevná látka. Podle typu a velikosti oddělovaných částic se volí způsob filtrace a typ filtru.

Mikrofiltrací rozumíme oddělování pevných částic ve velikostním rozmezí 0,01 – 10 μm. Lze ji využít např. k odstranění proteinů z roztoku, tedy jako alternativu ke srážení. Výhodou je, že při mikrofiltraci nedochází k naředění vzorku. Nanofiltrace

pohybující se v rozmezí 1 – 10 nm umožňuje zachycení většiny vícemocných kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}), čehož lze využít k oddělení jednomocných kationtů od vícemocných [1]. Ultrafiltrace dělí směs na základě rozdílných velikostí molekul (rozdílná molární hmotnost) přes polopropustnou membránu. Využívá se k oddělení makromolekulárních látek od solí a rozpouštědla [2].

2.1.3 Centrifugace

Při centrifugaci dochází k oddělení částic od rozpouštědla nebo k oddělení nemísitelných kapalin od sebe navzájem pomocí odstředivé síly. Oddělování částic probíhá, stejně jako u ultrafiltrace, na základě rozdílné velikosti a hmotnosti molekul. Centrifugace je urychlením sedimentace, která probíhá pouze díky působení gravitačního pole.

Ultracentrifugace, tedy centrifugace při vysokých otáčkách, se využívá zejména v biochemii při studiu proteinů. Ve spojení s dalšími metodami je dnes díky ní možné zjistit například čistotu vzorku, určit stechiometrii a konformace makromolekul [3].

2.1.4 Vysolování

Stejně jako ultracentrifugace se i vysolování využívá hlavně v biochemii k separaci a zakoncentrování proteinů. Metoda je založená na koagulaci proteinů v prostředí s vyšší koncentrací soli (např. síranu amonného) z důvodu snížení jejich rozpustnosti ve vodě. Snížení rozpustnosti je způsobeno oslabením vazeb protein-voda a převládnutím interakcí mezi proteiny navzájem.

Schopnost koagulace je pro každý protein jiná. Změnou koncentrace soli je možné proteiny ve směsi postupně navzájem separovat.

2.1.5 Dialýza

Dialýza se využívá hlavně k odstraňování nízkomolekulárních nečistot z roztoku. Nízkomolekulární látky procházejí přes membránu, která je nepropustná pro velké molekuly, např. proteiny. Hybnou silou dialýzy je difúze. Látky přecházejí mezi dvěma roztoky na základě koncentračního gradientu, a to do roztoku o nižší koncentraci.

Dnes se jako membrány pro dialýzu využívají umělé dlouhé trubice s různým průměrem, které se plní roztokem určeným k dialýze a následně se ponořují do nádoby naplněné vodou nebo pufrem [2]. Rychlost dialýzy během procesu klesá díky vyrovnávání

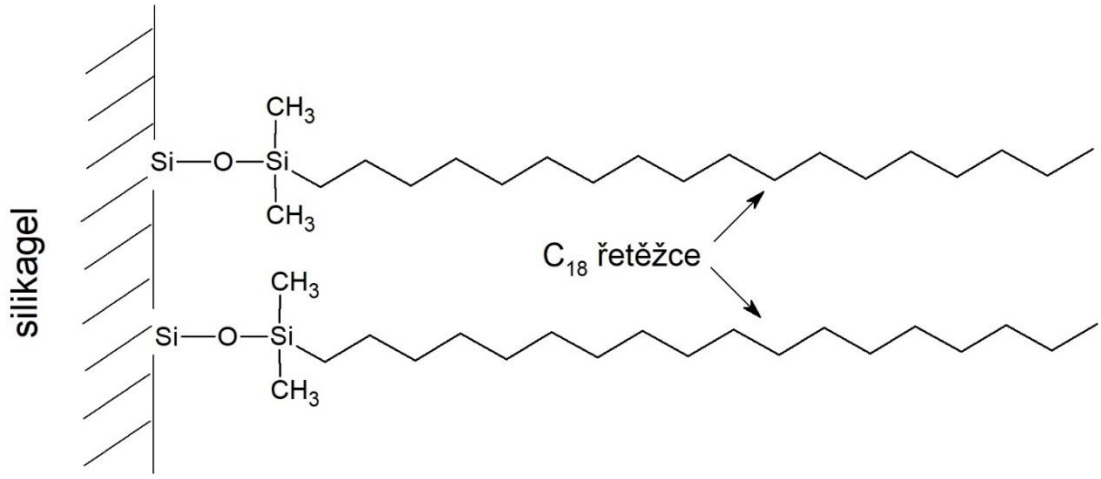
koncentračního rozdílu. Výměnou roztoku, do kterého molekuly difundují, se proces urychluje.

2.1.6 Chromatografie

Chromatografie je založena na rozdílné distribuci složek vzorku mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Mobilní fáze je ve styku se stacionární fází a vyplavuje z ní molekuly zadržovaných látek. Analyty jsou ve stacionární fázi zadržovány podle svého charakteru různou silou a jejich vymývání je postupné, čímž dochází k separaci jednotlivých složek směsi. Oddělené složky směsi pak putují do detektoru. Čas strávený v chromatografickém systému se nazývá retenční (v případě planární chromatografie retenční faktor).

Chromatografické metody se dělí podle skupenství mobilní fáze na plynovou, kapalinovou a superkritickou fluidní chromatografii. Podle druhu stacionární fáze lze pak chromatografii dělit na kolonovou a plošnou (planární). Při plošné chromatografii se jako stacionární fáze využívá papír (papírová chromatografie), nebo folie pokrytá tenkou vrstvou sorbentu, např. silikagelu a oxidu hlinitého (tenkovrstvá chromatografie). Při kolonové chromatografii je stacionární fáze zachycena v koloně (kovová trubice s malým vnitřním průměrem) v podobě a) tenkého filmu molekul sorbentu, b) náplně. Dále se chromatografické metody dělí dle povahy děje, kterým se řídí separace. Takto se chromatografické metody dělí na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnné, gelové permeační a afinitní.

V současné době je nejvýznamnější technikou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC). V kapalinové chromatografii obecně má na separaci látek kromě stacionární fáze vliv i mobilní fáze. Separace v HPLC může být prováděna na normálních fázích (NP-LC), nebo na chemicky vázaných fázích. V případně NP-LC je mobilní fáze méně polární než stacionární, stacionární fází může být např. silikagel, nebo oxid hlinitý. Při chromatografii na chemicky vázaných fázích je mobilní fáze polárnější než stacionární. Nejběžnějším typem chromatografie na chemicky vázaných fázích je chromatografie na obrácených fázích (reversed phase liquid chromatography, RP-LC). V tomto případě je stacionární fáze tvořena vrstvou silikagelu, na němž jsou navázány různě dlouhé uhlíkaté řetězce (např. C_8, C_{18} apod.) (Obr. 1). Mobilní fází je vodný roztok s přídavkem vhodného organického rozpouštědla mísitelného s vodou, např. acetonitrilu, methanolu aj.



Obrázek 1: Schéma stacionární fáze v RP-LC: silikagel modifikovaný oktadecylovou fází

.

Retence látek na koloně je při RP-LC závislá na polaritě látek (s polaritou látek retence klesá). Úpravou mobilní fáze lze dosáhnout změny eluční síly, která retenci látek ovlivňuje.

Na záznamu z HPLC analýzy (chromatogramu) sledujeme změny sledované veličiny, např. absorbance, fluorescence, elektrický proud apod. Průchod detekovatelné látky (která např. absorbuje UV záření nebo podléhá elektrodové reakci) detektorem je zaznamenán ve formě píku.

2.2 Extrakce

Extrakce je separační proces, při kterém dochází k distribuci látek mezi dva systémy na základě polarity, dokud není dosaženo rovnováhy. Základní charakteristikou pro extrakci je distribuční konstanta (distribuční koeficient) *K*, jíž hodnotu vyjadřuje rovnice 1:

$$K = \frac{c_2}{c_1}$$

kde c_2 je aktivita analytu v extrakční fázi a c_1 je aktivita analytu ve fázi původní. Distribuční konstanta je měřítkem efektivity extrakce.

Distribuční konstanta závisí na mnoha faktorech, například na teplotě, době, po kterou se ustaluje distribuční rovnováha, na ostatních látkách přítomných v roztoku a pH [4]. Polární látky se zadržují v polárnější fázi, méně polární mají afinitu k nepolární fázi. Volné ionty budou přecházet do vodné fáze, zatímco nenabité částice se budou zadržovat ve fázi organické. Díky úpravě pH je možné přechod částic usnadnit nebo potlačit tak, abychom podpořili disociaci žádanou a zároveň potlačili disociaci nechtěnou. Extrakci lze také ovlivnit přidáním ion-párovacího činidla.

Další faktor ovlivňující účinnost extrakce je množství použitého extrakčního činidla a počet opakování. Pro vyšší výtěžnost extrakce je dobré extrahovat opakovaně s menším objemem rozpouštědla než jednorázově ekvivalentním množstvím [4].

Zásadní vliv na účinnost extrakce má extrakční činidlo, jehož volba se řídí vlastnostmi analytu, povahou vzorku a účelem extrakce. Aby mohla extrakce proběhnout, musí být extrakční činidlo v prvé řadě snadno oddělitelné od vzorku, dále musí rozpouštět či vázat analyt, a to s dostatečnou selektivitou. Na druhou stranu je potřeba, aby spolu s požadovaným analytem/analyty nepřecházely do extraktu balastní látky, které by mohly znemožňovat vlastní stanovení nebo by mohly vést ke znečištění analyzátoru (interferenty, proteiny apod). Musí být chemicky inertní vůči ostatním látkám přítomným ve vzorku i vůči analytu, aby nedošlo k nežádoucím chemickým změnám a musí analytu umožnit snadný prostup, aby došlo k ustálení rovnováhy v rozumném čase [4].

Extrakční techniky není snadné systematizovat. Velmi časté a dobře představitelné je rozdělení podle fází, mezi kterými se ustaluje rovnováha. Další část práce se zabývá dvěma nejčastějšími typy extrakce, které lze využít ve spojení s HPLC: a) extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction, SPE) a b) extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE).

2.2.1 Extrakce na tuhé fázi

SPE je založená na adsorpci analytu z plynné nebo kapalné fáze na tuhou fázi. Zpětně se pak analyt získává promytím této fáze malým množstvím čistého rozpouštědla, nebo za zvýšené teploty desorpcí do plynu.

Výhodou SPE je celková spotřeba menšího množství chemikálií než v případě extrakce kapalinou (LLE), Nízká spotřeba organických rozpouštědel je v souladu s ekologickými a ekonomickými požadavky na vývoj moderních analytických postupů [5]. SPE nabízí širokou škálu sorbentů, které jsou schopné zachycovat i polární analyty. Výběr sorbentu je při využití SPE zásadní, stejně jako je tomu při výběru rozpouštědla u LLE. Výhodou univerzálních sorbentů je jejich schopnost extrahovat širokou škálu analytů. Na druhou stranu s nimi není možné dosáhnout takové selektivity, jako u specializovaných sorbentů, což vede k vyextrahování většího počtu látek z matrice, které ruší analýzu [6]. Běžnými polárními sorbenty jsou např. silikagel, křemičitan hořečnatý, nebo oxid hlinitý. Sorbenty pro nepolární látky jsou např. aktivní uhlí, nebo silikagel modifikovaný oktadecylovou fází (podobně jako u RP-LC, viz Obr. 1).

Nevýhodou SPE je jednodušší kontaminace tuhé fáze oproti kapalné, například při výrobě nebo balení materiálu. Kvůli heterogenitě povrchu tuhé fáze SPE není dosaženo tak vysoké reprodukovatelnosti jako u LLE [4].

SPE je možné provádět i v miniaturizované formě, mluvíme pak o mikroextrakci tuhou fází (solid-phase microextraction, SPME). Mikroextrakční techniky lze lépe automatizovat, proces extrakce je rychlejší a ekonomicky výhodnější. Mnohem nižší spotřeba vzorku může být výhodou (zvláště v případě, když je k dispozici velmi malé množství vzorku).

2.2.2 Mikroextrakce tuhou fází

SPME umožňuje provádět izolaci analytu přímo v terénu již při odběru vzorku. Je možné ji využít pro pevné, kapalné i plynné matrice. Z těchto důvodů nalézá uplatnění při sledování polutantů v životním prostředí, v potravinářství, toxikologii a dalších oborech. Často je využívána v lékařství, kde ji lze využít přímo ve zkoumaném vzorku (*in vivo*) [4, 7].

Základním prvkem u zařízení pro tento typ extrakce je vlákno pokryté polymerem, které je ukryté v kovové jehle. Jehla plní ochrannou funkci vlákna, na které se adsorbuje extrahovaná látka. Druhým možným uspořádáním je pokrytí vnitřního povrchu jehly sorpční vrstvou. V obou uspořádáních slouží jehla k propichování septa vialky se vzorkem a k přímému dávkování extraktu do nástřikového prostoru chromatografu. Není tedy nutný žádný postup k převedení vzorku do chromatografického systému, což je jednou z hlavních výhod [8]. Adsorpční vrstva nesmí analyt vázat příliš silně, aby mohlo docházet ke snadné desorpci do mobilní fáze [8]. V případě GC dochází k desorpci působením vyšší teploty, u HPLC je desorpce způsobená vymytím analytu z povrchu sorbentu protékající mobilní fází. Nevýhodou SPME je cena vláken a jejich omezená životnost [9].

2.2.3 Extrakce kapalina – kapalina

Extrakce analytu z jedné kapaliny do jiné je založená na rozdílné rozpustnosti látky ve dvou nemísitelných kapalinách. Obvykle je LLE prováděna mezi vodnou a organickou fází. V průběhu extrakce dochází k distribuci látek (v závislosti na polaritě) mezi tyto dvě fáze přes fázové rozhraní až do ustavení rovnováhy. Přestup hmoty lze usnadnit protřepáváním nebo mícháním systému. Extrakční vrstvy se od sebe samy oddělují na základě rozdílné hustoty. Zlepšit rozdělení fází lze zvýšením hustoty jedné z fází (např. přídavkem soli), nebo přidáním jiného rozpouštědla (např. ethanol). Lepšího rozdělení lze dosáhnout také

změnou teploty (nelze aplikovat při extrakci analytů citlivých na teplotní změny), centrifugací nebo filtrací [4].

Extrakční proces zcela zásadně ovlivňují vlastnosti použitého rozpouštědla. První podmínkou, která musí být splněna, aby mohla extrakce proběhnout, je nemísitelnost extrakčního činidla se vzorkem. Pokud tato podmínka splněna není, rozpouští se analyt částečně v obou fázích a nelze dosáhnout čistého rozdělení [10]. Za druhé by činidlo mělo mít vlastnosti podobné vlastnostem analytu (zvláště polaritu). Vzorek je nejčastěji ve formě vodného roztoku, jako druhou fázi pak volíme méně polární rozpouštědlo. Veličiny popisující polaritu rozpouštědel jsou relativní permitivita ε a normovaná hodnota polarity E_T^N (Tab. 1). E_T^N vyjadřuje polaritu rozpouštědla v porovnání s TMS jakožto nejméně polárním a s vodou jako nejpolárnějším rozpouštědlem. Matematickým vyjádřením E_T^N je rovnice 2:

$$E_T^N = \frac{E_T(rozpouštědlo) - E_T(TMS)}{E_T(voda) - E_T(TMS)}$$

E_T^N je bezrozměrná veličina, po vynásobení 100 vyjadřuje procenta polarity podle zvolených standardů (tzn. TMS má polaritu 0 %, dichlormethan 31 %, voda 100 % atp.) [11].

Další vlastností rozpouštědla by měla být nízká teplota varu, aby se po odebrání dalo snadno odpařit, a tak umožnilo prekoncentraci, aniž by došlo k tepelnému rozkladu analytu.

Výhodou LLE je nízká náročnost na instrumentaci a snadné provedení. Je také dobře reprodukovatelná. Nevýhodou LLE je používání relativně velkého množství organických rozpouštědel. Úpravou postupu lze dosáhnout snížení objemu organického rozpouštědla na minimum, čímž se zároveň zkrátí doba nutná k odpaření rozpouštědla. Pokud se extrakce provede v atmosféře bez kyslíku a při nízké teplotě, snižuje se pravděpodobnost tepelné degradace a nežádoucích chemických reakcí mezi sloučeninami, ke kterým může docházet při klasické LLE [12].

Další nevýhodou LLE je, že mnoho polárních rozpouštědel je částečně mísitelných s vodou, což zhoršuje průběh a výsledek extrakce [10]. Klasická LLE je také relativně časově náročná a není snadné ji automatizovat. Přes tyto nevýhody je stále lépe reprodukovatelnou technikou než extrakce na tuhé fázi, která ji často nahrazuje [4].

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti vybraných organických rozpouštědel [11, 13, 14]

rozpouštědlo	**teplota varu [°C]**	**ε**	$\mathbf{E_T^N}$	**rozpustnost ve vodě [g·l^{-1}]**
tetramethylsilan	26,50	–	0,000	0,02
pentan	36,05	1,84	0,009	0,04
hexan	68,75	1,88	0,009	0,14
cyklohexan	80,75	2,00	0,006	0,10
heptan	98,45	1,92	0,012	0,05
tetrachlormethan	75,65	2,23	0,052	0,80
toluen	110,65	2,38	0,099	0,47
benzen	80,05	2,27	0,111	1,80
diethylether	35,45	4,34	0,117	74,20
diethylamin	55,45	3,58	0,145	mísitelný
dioxan	105,45	2,21	0,164	mísitelný
octan ethylnatý	77,05	6,02	0,228	86,00
ethylenglykol	197,35	37,70	0,253	mísitelný
chloroform	61,15	4,80	0,259	10,00
pyridin	115,25	12,90	0,302	mísitelný
dichlormethan	39,80	8,93	0,309	16,70
aceton	25,26	20,60	0,355	mísitelný
acetonitril	81,65	35,90	0,460	mísitelný
propan-2-ol	82,25	19,90	0,546	mísitelný
pentan-1-ol	137,75	13,90	0,558	21,90
butan-1-ol	117,65	17,90	0,586	79,00
tetrahydrofuran	64,85	7,58	0,605	mísitelný
kyselina octová	117,95	6,19	0,648	mísitelný
ethanol	78,37	24,60	0,654	mísitelný
methanol	64,65	32,70	0,762	mísitelný
voda	100,00	81,00	1,000	-

2.2.4 Mikroextrakce kapalnou fází

V posledních letech je pozornost věnována miniaturizaci procesu LLE, tzv. mikroextrakci kapalnou fází (liquid-phase microextraction, LPME). LPME umožňuje extrakci a zakoncentrování analytu v jednom kroku, čímž lze zkrátit dobu přípravy vzorku. LPMS si zachovává výhody klasické LLE (dobrá reprodukovatelnost, jednoduchost a široký rozsah aplikací), k extrakci je však potřeba mnohem nižší množství vzorku i extrakčního činidla. Existuje několik provedení LPME, které se liší typem extrakčního média.

Extrakce na jedné kapce (single-drop microextraction, SDME) je založena na extrakci analytu do kapky rozpouštědla nemísitelného s vodou. Kapka extrakčního činidla je suspendována v malém množství vzorku (obvykle několik kapek) [9, 15, 16]. Dalším provedením je mikroextrakce dutým vláknem (hollow fiber-protected LPME, HF/LPME.) Extrakční činidlo (rozpouštědlo) je zachyceno na membráně dutého vlákna. Po ustálení rovnováhy lze vlákno s extrakčním činidlem převést přímo do chromatografického systému bez další úpravy (podobně jako u SPME, viz kapitola 2.2.2 [15, 17].

Kromě těchto dvou základních provedení existuje:

a) mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina (LLLME), neboli třífázová mikroextrakce. K extrakci analytu dochází z tzv. donorové fáze (vzorek) přes tenkou vrstvu druhé kapalné fáze do fáze akceptorové pomocí dutého vlákna [18],

b) disperzivní LPME, při které je do vodného vzorku nastřikována směs extrakčního a disperzního rozpouštědla, čímž vzniká disperze nad roztokem [19],

c) headspace extrakce jednou kapkou z plynné fáze nad hladinou vzorku [20],

d) průtoková injekční extrakce (FIE), která se od ostatních provedení zásadně liší zaváděním vodného vzorku do proudu nosné kapaliny (vodná fáze), která se pak mísí s proudem extrakčního činidla [21].

2.3 Stanovení kolchicinu v reálných vzorcích

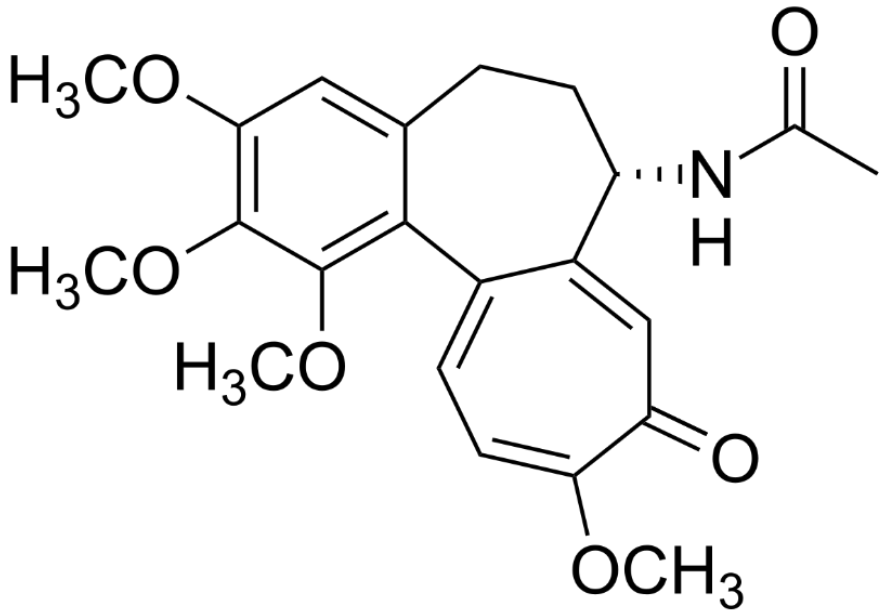
Kolchicin N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7- l] acetamid (Obr. 2) je rostlinný alkaloid obsažený v ocúnu jesenním (*Colchicum atumnale*). Je to prudce jedovatý mitotický jed zabraňující dělení buněk. Kolchicin se s vysokou afinitou váže na tubulin, ze kterého jsou složeny mikrotubuly podílející se na procesu dělení buněk (správně rozdělení chromozomů mateřské buňky do dceřiných). Vazba kolchicinu

s tubulinem stericky zabraňuje vytvoření přímé struktury mikrotubulů a inhibuje tak jejich činnost [22].

Ve veterinárním lékařství se kolchicin využívá k léčbě bradavic a papilom (nezhoubné nádory na sliznicích) [23]. V běžném lékařství se využívá k léčbě familiární středomořské horečky, k potlačení akutních záchvatů bolesti při dně a artritidě a ke zmírňování otoků, které tyto nemoci způsobují. Jakožto mitotický jed působí hlavně na rychle se množící buňky, proto se v posledních letech také testuje jako alternativa k léčbě rakoviny [24]. Ze stejného důvodu pacienti léčení kolchicinem často trpí vypadáváním vlasů [25], nebo aplazií kostní dřeně [26].

Není znám přesný mechanismus toho, jakým způsobem kolchicin potlačuje bolest. Někteří autoři uvádí, že kolchicin zabraňuje migraci leukocytů do zánětlivých oblastí, čímž eliminuje reakci v podobě zánětu a bolesti [27, 28]. V jiných pracích nalezneme teorii, že kolchicin u leukocytů snižuje produkci kyseliny mléčné, čímž se snižuje depozice jejích krystalů v problematických místech, které zapříčiňují záchvaty bolesti, zarudnutí a otoky kloubů [29].

Používání kolchicinu ve větším měřítku však brání jeho toxicita. U pacientů léčených kolchicinem se častěji objevuje hepatotoxicita a selhání ledvin. Za tyto problémy jsou odpovědné metabolity kolchicinu. Kolchicin se v těle metabolizuje demethylací probíhající na pozicích 1-, 2-, 3- a 10- [30].



Obrázek 2: Struktura kolchicinu

Pacienti si kolchicin často ordinují sami bez porady s lékařem. Správnou léčebnou dávku kolchicinu pro konkrétní organismus však není snadné stanovit, proto může dojít k otravám. V literatuře je zaznamenáno také několik případů sebevražd. Letální dávka kolchicinu se pohybuje kolem 0,5 - 0,8 $mg \cdot kg^{-1}$ [26, 31, 32]. Mezi příznaky otravy kolchicinem patří nevolnost, trávicí problémy, průjmy a zvracení [33]. Pokud není poskytnuta lékařská pomoc, začnou selhávat orgány, dochází ke krvácení, poškození svalů, dýchacím potížím a poškození myokardu. Samotná smrt může být způsobena udušením nebo kardiovaskulárním kolapsem [31]. První pomocí při otravě kolchicinem je vypumpování žaludku a podání aktivního uhlí. Přímé antidotum není známo.

2.3.1 Metody stanovení a detekce

Kolchicin se jako léčivá látka využívá již několik desetiletí. Jeho užívání je v řadě zemí legislativně omezeno kvůli toxicitě. I přes toxicitu kolchicinu se jedná o látku relativně snadno dostupnou ve formě tablet (Colchicum-Disper. Pharmaselect) nebo rostlinných extraktů. Relativně nízká toxická dávka a přecitlivělost některých pacientů mohou vést k otravám během léčebné aplikace kolchicinu. Vedle náhodných otrav se lze setkat také se zneužitím kolchicinu při sebevraždách. Z těchto důvodů je potřeba zajistit spolehlivé a rychlé stanovení kolchicinu v reálných vzorcích.

Kolchicin lze stanovit elektrochemicky [34], kolorimetricky [35], fluorimetricky [36], spektrofotometricky [37], nebo pomocí radioimunoanalýzy [38]. Vzhledem ke složitosti reálných vzorků (moč, krevní plasma, krev aj.) je nezbytná separace kolchicinu od ostatních složek matrice. Při toxikologickém stanovení kolchicinu nalézá uplatnění v první řadě kapalinová chromatografie ve spojení s různými typy detekcí.

2.3.1.1 HPLC s UV detekcí

UV/VIS detektor je založený na měření absorbance kapaliny, která detektorem prochází, v UV (resp. VIS) oblasti vlnových délek. Velikost odezvy na chromatogramu je dána Lambert-Beerovým zákonem. Při volbě vhodné vlnové délky pro detekci je nutné uvažovat spektrofotometrické vlastnosti analytu i mobilní fáze. UV detekce je výhodná svou spolehlivostí a také dostupností v běžných laboratořích.

E. Bodoki a kol. [27] stanovovali kolchicin z rostlinného materiálu pomocí TLC na silikagelu s denzitometrickou detekcí při 254 a 365 nm. Bylo dosaženo limitu detekce

(LOD) 2,1 ng·ml^{-1}, limit kvantifikace (LOQ) 27,0 ng·ml^{-1}. Výsledky TLC byly porovnány se stanovením pomocí HPLC-UV při 243 a 350 nm. V práci je také publikována degradace kolchicinu na světle, která je demonstrována rozdílnými absorpčními spektry před a po dvoudenní světelné expozici.

F. Alali a kol. [39] provedli stanovení kolchicinu v rostlinném materiálu pomocí HPLC s UV detekcí. LOD byl stanoven na 50 ng·ml^{-1}, detekované koncentrace se od skutečných lišily v rozmezí 2 %. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 1–250 ppm. Toto stanovení bylo porovnáno se stanovením pomocí techniky TLC-UV. Ukázalo se, že jednoduchá metoda TLC-UV poskytla velmi podobné výsledky jako HPLC-UV, a proto ji autoři deklarovali jako vhodnou náhradu v případě, že HPLC není k dispozici.

V. F. Samanidou a kol. [29] stanovili kolchicin pomocí HPLC s UV detekcí při 245 nm v krevním séru a v moči metodou vnitřního standardu (IS, kodein). IS byl přidáván v koncentraci 10 ng·µl^{-1}. Bylo dosaženo LOD 0,4 ng·µl^{-1} a LOQ 1 ng· µl^{-1} při lineárním rozsahu (LDR) 0,05–2,5 ng·µl^{-1}.

J. Pietsch a kol. [40] provedli simultánní detekci třinácti rostlinných alkaloidů v různých tělních tekutinách. Detekci prováděli pomocí HPLC s PDA detektorem v rozsahu vlnových délek 190–400 nm. Stanovení provedli metodou vnitřního standardu s koncentrací kodeinu 100 ng·µl^{-1}. Ve vzorku krevního séra bylo pro kolchicin dosaženo LOQ 2,2 ng·µl^{-1} a lineárního rozsahu 2–200 ng·µl^{-1}. Ve vzorku moči byl LOQ stanoven na 0,98 ng·µl^{-1}, odezva byla lineární v rozsahu 2–200 ng·µl^{-1}.

S. Bahrani a kol. [41] provedli stanovení kolchicinu v plasmě také pomocí HPLC s UV detekcí při 245 nm. Lineární rozsah metody byl 0,5–1700 ng·µl^{-1}, LOD byl stanoven na 0,13 ng·µl^{-1} a LOQ na 0,43 ng·µl^{-1}. Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídavku.

2.3.1.2 HPLC s hmotnostní detekcí

Hmotnostní detekce určuje identitu molekul nebo iontů na základě rozdílného poměru hmotnosti a náboje a podává informace o struktuře jednotlivých složek vzorku. MS detektor je v současné době využívaný hlavně z důvodu vysoké citlivosti.

M. Chèze a kol. [33] stanovili kolchicin ve vzorcích tkání zemřelých pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS). Dosáhli LDR 0,5 - 50 ng·µl^{-1}. LOD byl 0,1 ng·µl^{-1} (50x S/N), LOQ 0,5 ng·µl^{-1}.

P. Qiu a kol. [42] provedli stanovení 5 toxických alkaloidů, včetně kolchicinu, v moči a krevním séru pomocí HPLC-MS. U kolchicinu dosáhli LDR v rozmezí koncentrací 0,01– 10,0 ng·µl^{-1}. LOQ byl určen na 0,01 ng·µl^{-1}.

A. Tracqui a kol. [31] detekovali kolchicin pomocí HPLC s MS detekcí v krevním séru a plazmě. LDR koncentrací byl v rozmezí 5–20 ng·ml^{-1}. LOD byl 0,6 ng·ml^{-1}.

2.3.1.3 HPCL s elektrochemickou detekcí

Spojení HPLC-UV resp. HPCL-MS je spolehlivá metoda stanovení. Pořizovací cena MS přístroje, stejně jako jeho provoz, je však značně nákladná. Problémem UV detekce je zase nízká selektivita v reálných vzorcích, protože při běžně používaných vlnových délkách absorbuje velké množství látek (absorpce látek obsahujících nenasycené vazby, aromatických uhlovodíků). Na záznamu se tak objevuje množství látek, které zhoršují vyhodnocení, z čehož vyplývá nutnost věnovat větší pozornost separaci vzorku. Naproti tomu elektrochemická detekce vykazuje vyšší selektivitu (pouze u elektroaktivních látek). Kolchicin lze oxidovat na uhlíku okolo 1000 mV. Spojení HPLC s elektrochemickou detekcí v případě kolchicinu nebylo doposud v odborné literatuře publikováno. Elektrochemické stanovení bylo prováděno pouze bez separace běžnými elektrochemickými metodami.

2.3.1.4 Elektrochemická detekce

H. Zhang [43] provedl stanovení kolchicinu pomocí diferenčně pulzní voltametrie ve vodném roztoku na kompozitním filmem modifikované uhlíkové pastové elektrodě (CPE) vs. SCE (kalomelová elektroda). Základním elektrolytem byla 0,1M $HClO_4$. Byl proměřen rozsah potenciálů od 0,8 po 1,2 V. Pík kolchicinu se objevil při 1,08 V. Lineární rozsah metody byl 1·10-7–4·10^{-5} mol·l^{-1}. LOD byl stanoven jako 4·10^{-8} mol·l^{-1}. Metoda byla aplikována na vzorek moči s přídavkem standardu kolchicinu na finální koncentrace v rozmezí 5·10^{-7}–1·10^{-5} mol·l^{-1}. Výtěžnost stanovení se pohybovala mezi 97–104 %.

K. Zhang a kol. [44] stanovili kolchicin pomocí cyklické voltametrie (CV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a chronocoulometrie. Jako pracovní elektroda byla použita CPE dopovaná uhlíkovými nanotrubičkami, referentní elektrodou byla Ag/AgCl. Oxidační pík byl pozorován při potenciálu 0,897 V, redukční pík při potenciálu 0,828 V v H_2SO_4 o koncentraci 0,15 mol·l^{-1} jako základním elektrolytu. Elektroda vykazovala lineární rozsah 1·10^{-8}–2,5·10^{-5} mol·l^{-1}. LOD byl stanoven na 8·10^{-9} mol·l^{-1}.

E. Bodoki a kol. [28] studovali chování kolchicinu na uhlíkových sítotiskem připravených elektrodách (SPE) cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií v základním elektrolytu $H_3PO_4/HClO_4$ 0,01 $mol \cdot l^{-1}$ vs. stříbrná pseudoferentní elektroda. Na voltamogramech byly patrné dva oxidační píky kolchicinu – první při 1,06 V a druhý při 1,22 V.

D. M. Stanković a kol. [25] stanovovali kolchicin v krevním séru elektrochemicky pomocí cyklické a diferenčně pulzní voltametrie na borem dopované diamantové elektrodě (BDDE) vs. Ag/AgCl v 0,04 $mol \cdot l^{-1}$ Britton-Robinsonově pufru jako základním elektrolytu. Na voltamogramech byly zaznamenány dva oxidační píky, první při 1,19 V a druhý při 1,37 V. Pracovní rozsah byl rozdělen na dva lineární segmenty, 1–10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a 10–100 $\mu mol \cdot l^{-1}$. LOD byl určen na 0,26 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

Klasická elektrochemická stanovení však neřeší problém separace matrice. Z tohoto důvodu jsem věnovala pozornost vývoji elektrochemické detekce kolchicinu po HPLC separaci pomocí a) mikroelektrod z uhlíkových vláken b) elektrochemického senzoru na bázi lisovaného grafitu, které se dají propojit s HPLC.

2.3.2 Extrakce kolchicinu

Hladina kolchicinu se obvykle stanovuje v krevním séru, moči, popřípadě posmrtně v některých vnitřních orgánech, např. játrech. Problémy způsobené složitostí těchto reálných vzorků a vysoký obsah látek rušících stanovení lze řešit extrakcí, čímž dojde ke značnému zjednodušení analýzy. Vedle snížení (nebo odstranění) rušivého vlivu interferentů lze provést i prekoncentraci analytu, čímž lze snížit limity detekce a kvantifikace použitých metod.

2.3.2.1 Extrakce pomocí LLE

V literatuře je kolchicin nejčastěji extrahován pomocí klasické LLE. Tato metoda je volena pro jednoduchost provedení a dobrou reprodukovatelnost. Díky velké škále organických rozpouštědel je také možné vybrat nejvhodnější extrakční činidlo, aniž by došlo k významnému zvýšení nákladů. Jako extrakční činidlo se využívá např. chloroform [45], pethrolether [39] a nejvíce pak dichlormethan nebo směs dichlormethanu s jiným organickým rozpouštědlem.

F. Alali a kol. [39] extrahovali kolchicin z ocúnu. Rostlinný materiál převedli na prášek a extrahovali dvakrát 25 ml petroletheru po dobu 2 hod. Residuum po extrakci bylo vysušeno a znovu extrahováno 10 ml dichlormethanu po 30 min. Poté bylo přidáno 0,5 ml 10% roztoku amoniaku. Směs byla 10 min protřepávána a po 30 min stání zfiltrována. Materiál zachycený na filtru byl promyt 2x5 ml dichlormethanu. Organická fáze (proplach filtru + filtrát) byla odpařena do sucha a analyt byl rekonstituován v 1 ml 70% ethanolu. Dále byly pro stanovení obsahu kolchicinu srovnány dvě metody: HPLC-UV a TLC-UV.

G. Hamscher a kol. [23] stanovovali kolchicin v mléce a krevním séru u ovcí. Po homogenizaci vzorků a přídavku fosfátového pufru byl kolchicin extrahován 10 ml dichlormethanu, poté byla směs 5 min míchána. Po 10 min centrifugaci byla oddělena organická fáze, která byla odpařena do sucha. Odparek byl následně reextrahován dalšími 10 ml dichlormethanu. Odparek po druhé extrakci byl rekonstituován v 0,5 ml methanolu (krevní sérum), resp. 1 ml methanolu (mléko). Kolchicin byl stanoven pomocí HPLC-MS.

M. Chèze a kol. [33] stanovovali kolchicin vždy v 1 ml tělních tekutin (krevní sérum, moč, žluč, žaludeční šťávy). Po úpravě pH na 9,6 pomocí amoniaku byla provedena extrakce směsí 5 ml dichlormethanu s 5% 2-propanolem. Po 10 min míchání a 5 min centrifugace byla organická fáze odebrána a vysušena. Odparek byl rekonstituován v 75 µl methanolu a koncentrace kolchicinu stanovena pomocí HPLC-MS.

P. Fernandez a kol. [46] extrahovali kolchicin z krevní plasmy. pH vzorku bylo upraveno na hodnotu 8, ke kterému bylo přidáno 3 ml dichlormethanu. Směs byla míchána 15 min a po 5 min centrifugaci byla organická fáze oddělena a promyta 0,5 ml fosfátového pufru (pH 7,6). 2 ml organické fáze byly odpařeny do sucha a odparek byl rekonstituován ve 100 µl mobilní fáze (methanol/acetonitril/fosfátový pufr; 205:75:220; v:v:v) obsahující 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$ chinidinu. Stanovení kolchicinu bylo provedeno pomocí HPCL-UV.

N. Fabresse a kol. [47] stanovovali kolchicin v lidské plazmě a moči. Ke 200 µl plasmy nebo moči bylo přidáno 100 µl fosfátového pufru o pH 8,4. Vzorek byl extrahován 10 min 3 ml směsi n-hexan/dichlormethan/isopropanol (300:150:15; v:v:v). Po 10 min centrifugace a odpaření do sucha byl odparek rekonstituován ve 100 µl mobilní fáze (2 $mmol \cdot l^{-1}$ mravenčan amonný obsahující směs 0,1% kyseliny mravenčí/acetonitril, 40:60, v:v). Tako připravený vzorek byl analyzován pomocí HPLC-MS.

2.3.2.2 Ostatní typy extrakcí

S. Bahrani a kol. [41] provedli SPME kolchicinu ze vzorku plasmy a z rostlinného materiálu na nanokompozitním magnetickém sorbentu na bázi oxidu zinku a železa. Nejvhodnější pH roztoku, ze kterého prováděli extrakci bylo experimentálně stanoveno na 6. Vyextrahovaný kolchicin vyeluovali pomocí methanolu, a poté jeho koncentraci stanovili pomocí HPLC- UV.

J. Pietsch a kol. [40] extrahovali kolchicin spolu s jinými alkaloidy z tělních tekutin pomocí klasické SPE. Alkaloidy byly ze sorbentu eluovány nejprve dichlormethanem a poté směsí dichlomethan/iso-propanol/amoniak. Po spojení extraktů a vysušení dusíkem byl odparek rekonstituován v acetonitrilu a koncentrace kolchicinu stanovena pomocí HPLC-UV.

P. Qiu a kol. [42] provedli stanovení 5 toxických alkaloidů v moči a krevním séru. Krevní sérum bylo smícháno s 300 µl roztoku trifluoroctové kyseliny a acetonitrilu. Směs byla míchána po dobu 2 min, poté následovala 10 min sonifikace a 10 min centrifugace. Vzorek moči byl upraven přídavkem 500 µl 0,05 $mol \cdot l^{-1}$ HCl. Oba vzorky pak byly přečištěny pomocí SPE, jako elační činidlo byl použit vodný roztok amoniak/methanol (20:80, v:v). Eluát z SPE kolonek byl odpařen do sucha a rekonstituován v 1 ml methanolu. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí HPLC-MS.

Ve své práci jsem k extrakci kolchicinu zvolila LLE kvůli jednoduchosti a reprodukovatelnosti provedení. Postup extrakce byl vyvíjen pro stanovení pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí (ED). Spojení separace vzorku pomocí HPLC a detekce pomocí elektrochemických senzorů nebylo dosud publikováno, nabízí však alternativu ke klasickým metodám HPLC-MS a HPLC-UV.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

K úpravě pH vzorků byl použit pH metr ISFET pH Meter MiniLab (IQ Scientific, USA). Extrahované roztoky byly protřepávány na automatickém Vortexu TSS 2 (Yellow line, Belgie). Odpařování organických rozpouštědel za zvýšené teploty a pod proudem dusíku probíhalo pomocí přístroje Sample Concentrator Visible (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., PRC).

K modifikaci elektrod jiskrovým výbojem byl využit nekomerční stejnosměrný zdroj vysokého napětí (200–2000 V) sestávající se z 10 kHz oscilátoru, transformátoru a pětistupňového Cockroft-Waltonova generátoru.

Amperometrcká a voltametrická měření byla prováděna pomocí Nanoampere electrochemical Workstation (L-Chem, Česká republika) s elektromagnetickou míchačkou (MIX 1 eco, 2 mag, Německo).

HPLC měření s elektrochemickou detekcí bylo prováděno pomocí systému, který se skládal z pumpy (Shimadzu LC-10AD), nástřikového ventilu se smyčkou 2 µl (Rheodyne, Cotati, USA), kolony EC 250/2 NUCLEODUR C8 Gravity 5 µm, 250x2,1 mm I. D. (Machrery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo), termostatu CTO-10AC (Schimadzu, ČR), potenciostatu Coulochem III (ESA Inc, MA Chelmsford, USA) a nekomerční elektrochemické cely. Při HPLC měření s UV detekcí byl využit UV-VIS detektor SPD-10A (Schimadzu, ČR). Vzorky byly nastřikovány mikrostříkačkou Hamilton, 50 µl.

Uhlíková vlákna Pro Systems pro výrobu elektrod byla obdržena z firmy Havel Composites (Přáslavice, ČR), senzor na bázi lisovaného grafitu byl vyvinut a zapůjčen doc. RNDr. Hrbáčem PhD.

3.2 Chemikálie

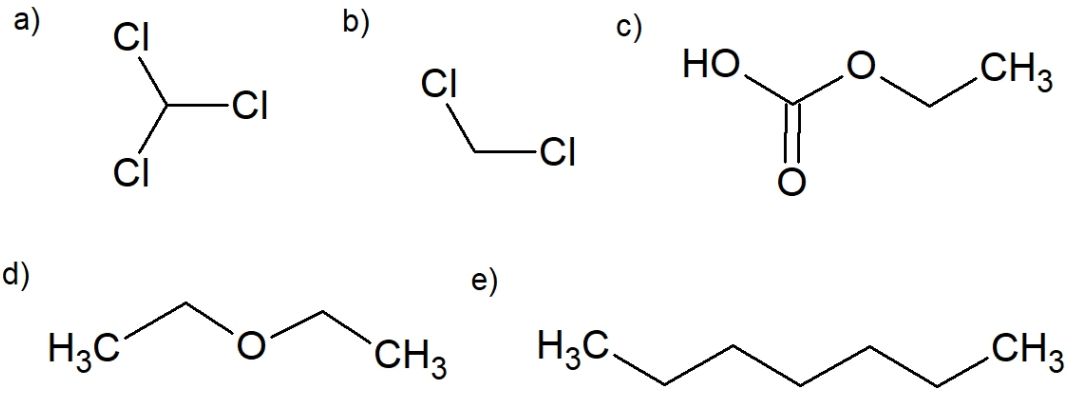
- ultračistá voda (Milipore Smart Direct Q 3 UV)
- stříbrná dvousložková epoxidová pryskyřice Polytec EC 101 (Epotek H_2OE, Epoxy Technology, Inc., USA)
- dvousložková epoxidová pryskyřice (Havel Composites, ČR)
- kolchicin (Sigma-Aldrich, Německo) M = 399,44 $g \cdot mol^{-1}$
- chlorid sodný p.a. (Sigma-Aldrich, Německo) M = 54,44 $g \cdot mol^{-1}$

- kyselina chloristá, 75 % (Lachema a. s., ČR) M = 100,46 g·mol^{-1}
- chloristan sodný p. a. (Sigma-Aldrich, Německo) M = 140, 46 g·mol^{-1}
- dichlormethan p.a. (Sigma-Aldrich, Německo) M = 84,93 g·mol^{-1}
- chloroform p. a. (Lachner s. r. o., ČR) M = 119,38 g·mol^{-1}
- octan ethylnatý p. a. (Lachema a.s., ČR) M = 88,105 g·mol^{-1}
- diethylether p. a. (Lachema, a. s., ČR) M = 74,12 g·mol^{-1}
- heptan p. a. (VWR International s. r. o., Francie) M = 100,21 g·mol^{-1}
- acetonitril p. a. (VWR International s. r. o., Francie) M = 41,05 g·mol^{-1}
- uhličitan lithný p. a. (Sigma-Aldrich, Německo) M = 73,89 g·mol^{-1}
- močová kyselina p. a. (Sigma-Aldrich, Německo) M = 168,11 g·mol^{-1}
- wolfram (Plansee, 99,999%) M = 183,84 g/mol
- zirkon (Alfa Aesar, 99,999%) M = 91,224 g/mol

3.3 Příprava vzorků

Pro základní testy elektrod byl vytvořen jako standard vodný roztok kolchicinu o koncentraci 500 µmol·l^{-1}, který byl dle potřeby ředěn na žádané koncentrace roztokem 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$.

Při extrakcích bylo použito pět běžně dostupných organických rozpouštědel, chloroform, dichlormethan, octan ethylnatý, diethylether a heptan (Obr. 3, Tab. 2). Vlastní extrakce byla prováděna ze vzorků moči, které obsahovaly standard kolchicinu o koncentraci 1·10^{-8} mol·l^{-1}. pH roztoků bylo upraveno na hodnoty 4, 7 a 9 pomocí roztoku uhličitanu lithného, popř. zředěné kyseliny chloristé.



Obrázek 3: Strukturní vzorce organických sloučenin použitých jako extrakční činidlo: a) chloroform, b) dichlormethan, c) octan ethylnatý, d) diethyleter, e) heptan.

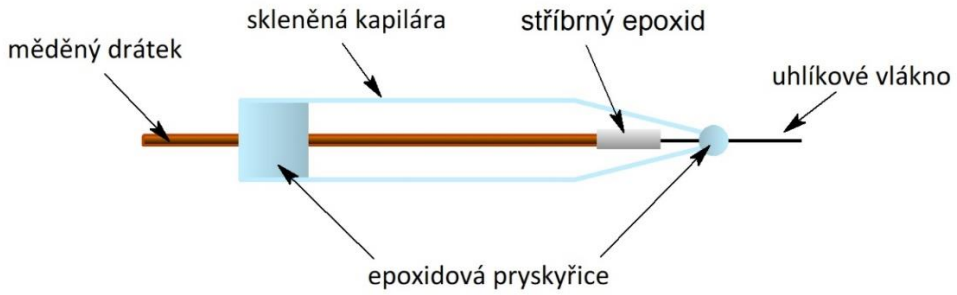
Tabulka 2: Fyzikální vlastnosti organických rozpouštědel využitých jako extrakční činidla pro extrakci kolchicinu z modelových roztoků [11, 13, 14],

Činidlo	**Bod varu [°C]**	**Hustota při 25 °C [g·cm^{-3}]**	**ε**	**E_T^N**	**Rozpustnost ve vodě [g·l^{-1}]**
choroform	61,15	1,49	4,80	0,259	10,00
dichlormethan	39,80	1,32	8,93	0,309	16,70
octan ethylnatý	77,05	0,89	6,02	0,228	86,00
diethylether	35,45	0,71	4,34	0,117	74,20
heptan	98,45	0,68	1,92	0,012	0,05

Po přídavku 1 ml extrakčního činidla k 1 ml modelového vzorku byla směs 2 min protřepávána na automatické třepačce, poté byla odebrána organická fáze a postup extrakce opakován, celkem 5x. Dílčí extrakty byly spojeny do jednoho výsledného extraktu, vysušeny za zvýšené teploty proudem dusíku a poté rekonstituovány v 0,5 ml roztoku 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$. Takto připravené vzorky byly nastřikovány do chromatografu. Extrakty byly připravovány vždy v den měření.

3.4 Výroba mikroelektrod z uhlíkového vlákna (CFMEs)

Jedním z materiálů pro výrobu mikroelektrod jsou uhlíková vlákna. Tato vlákna mohou být vyrobena z umělého hedvábí, polyakrylonitrilu, popř. ligninu. Uhlíková vlákna mají obvykle šířku 5–10 μm. Při výrobě mikroelektrod bylo jedno polyakrylonitrilové (PAN) vlákno nalepeno na měděný drátek pomocí vodivého stříbrného epoxidu (Polytec EC 101). Stříbrný epoxid byl vytvrzen v peci při 170 °C po dobu 10 min. Drátek s nalepeným vláknem byl poté vsunut do kapiláry tak, aby vlákno trčelo ze zúženého konce kapiláry asi 5 mm. Oba konce kapiláry byly zalepeny epoxidovou pryskyřicí, která se nechala volně zatuhnout (Obr. 4). Před modifikací elektrody bylo vlákno zkráceno asi na 2 mm.



Obrázek 4: Schéma CFME

3.5 Modifikace elektrod

Před samotným měřením bylo vlákno modifikováno. Porovnávány byly modifikace pomocí jiskrového výboje a elektrochemická aktivace vlákna v roztoku NaCl (tzv. pretreatment).

Jiskrový výboj je proces modifikace povrchu pracovní elektrody pomocí depozice nanočástic kovu jiné kovové elektrody. Při jiskrovém výboji dochází k vytvoření vodivého kanálu mezi elektrodami a vzniku plazmatu, které dosahuje teplot až 20 000 K [48]. Zahříváním a dopadem nabitých částic dochází k erozi materiálu elektrod do plazmatu. V případě katody je množství materiálu uvolněného do plazmatu relativně malé, protože během výboje dochází k nárazu elektronů s malou hmotností. Naproti tomu eroze materiálu anody je větší, protože je bombardována podstatně hmotnějšími ionty plynů. Po ukončení výboje dochází k chládnutí uvolněného materiálu a jeho kondenzací se tvoří nanočástice, které se pak usazují na povrch katody. Jako anoda byl zapojen kovový plíšek (wolfram, resp. zirkon) a jako anoda CFME. Obě elektrody byly k sobě přibližovány, dokud nedošlo k výboji a tím k pokrytí povrchu elektrody nanočásticemi daného kovu [49].

Pro elektrochemickou aktivací vlákna byla mikroelektroda umístěna do elektrochemické cely obsahující 1% (w:w) NaCl a cyklováním potenciálu mezi 0 až 2 V se sinusoidní frekvencí 50 Hz došlo k aktivaci vlákna. Senzor PGE byl používán bez jakýchkoli úprav.

3.6 Cyklická voltametrie a amperometrie

Cyklická voltametrie probíhala v tříelektrodovém zapojení, kde pracovní elektrodou byla CFME, resp. PGE, referentní elektrodou byla Ag/AgCl (CHI-111, CH Instruments, USA) a jako pomocná elektroda byl použit platinový drátek. Před vlastním měřením byly roztoky probublány dusíkem. Jako základní elektrolyt při CV kolchicinu bylo použito 30 ml roztoku 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, celková koncentrace kolchicinu v cele byla 0,5 mmol·ml^{-1}.

Při zjišťování rozsahu potenciálového okna byl základním elektrolytem Britton-Robinsonův pufr s pH upraveným na hodnoty 2, 4, 7, 9 a 11. Rozsah testovaných potenciálů byl od - 1000 do 1800 mV při skenovací rychlosti 50 $mV \cdot s^{-1}$.

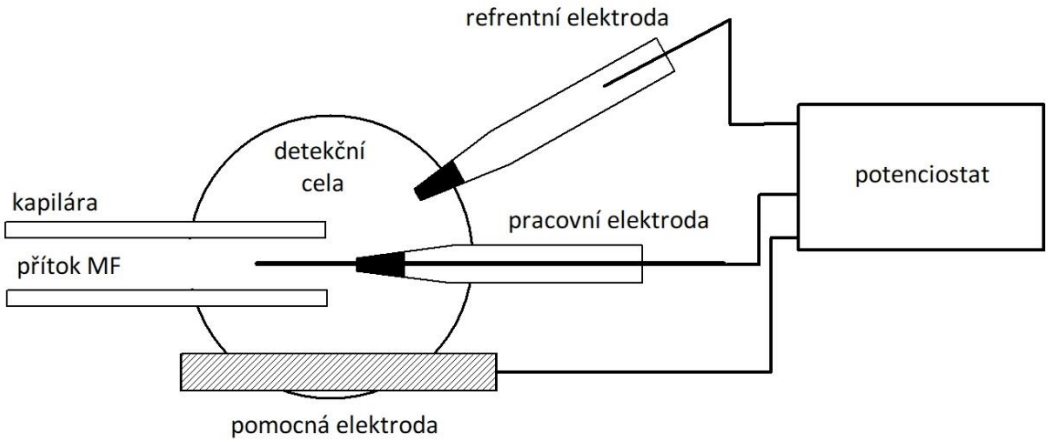
Při amperometrickém měření bylo elektrodové uspořádání shodné s cyklickou voltametrií. Měření probíhalo za stálého míchání (cca 400 $ot.min^{-1}$) v cele obsahující 30 ml roztoku 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$. Kolchicin byl nastřikován automatickou pipetou přímo do míchaného elektrolytu.

3.7 Měření HPLC-EC

HPLC měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla elektrochemicky aktivovaná CFME, resp. PGE, jako referentní elektroda byla použita miniaturní Ag/AgCl a jako pomocná elektroda sloužil šroub z nerezavějící oceli. Detekční cela byla vyrobena z teflonu. CFME byla v cele umístěna tak, aby byly 2 mm vlákna vsunuty do protilehlé kapiláry přivádějící mobilní fázi. PGE byl do cely zaveden tak, aby co nejdelší část byla zasunuta v protilehlé kapiláře přivádějící mobilní fázi (Obr. 5). Mobilní fází byla v obou případech směs ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$ v poměru 25:75 (v:v).

3.8 Měření HPLC-UV

Stanovení koncentrace kolchicinu v připravených extraktech bylo provedeno pomocí HPLC s UV detekcí. Toto stanovení probíhalo při teplotě 45 °C a při průtokové rychlosti 250 $\mu l \cdot min^{-1}$. Kolchicin byl detekován při vlnové délce 254 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$ v poměru 33:67, resp. 22:78 (v:v).



Obrázek 5: Schéma uspořádání elektrod v detekční cele

4 Výsledky a diskuze

Cílem práce bylo srovnání dvou uhlíkových materiálů jako elektrochemických senzorů v průtokovém systému pro stanovení kolchicinu. Prvním elektrodovým materiálem byl senzor na bázi lisovaného grafitu (Pressed Graphite Electrode, PGE), druhým mikroelektrody z uhlíkového vlákna (CFMEs). CFMEs byly testovány nemodifikované, modifikované jiskrovým výbojem (protielektrodou byl wolfram nebo zirkon) a elektrochemicky aktivované.

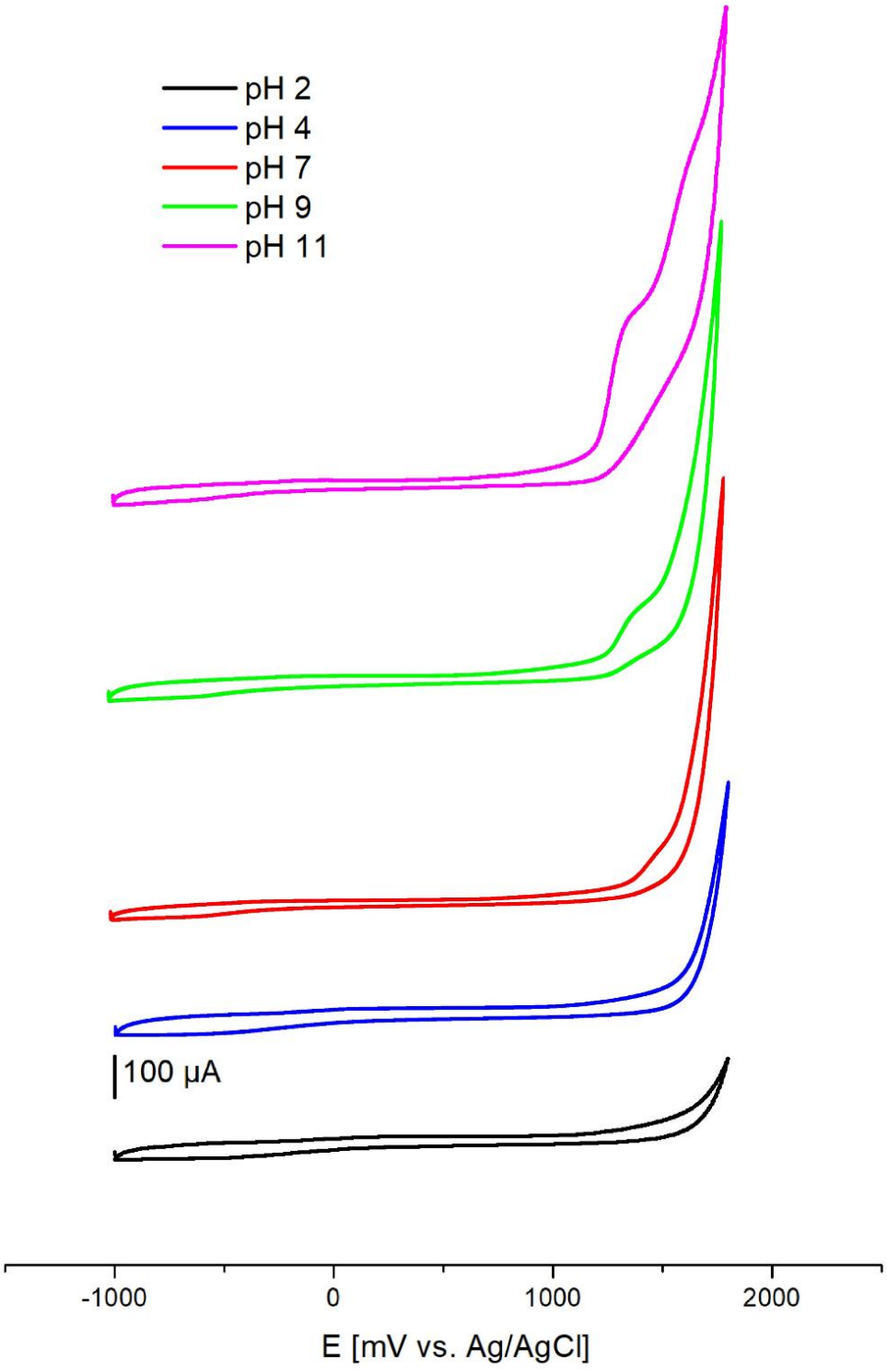
4.1 Elektrochemická charakterizace PGE

4.1.1 Potenciálové okno

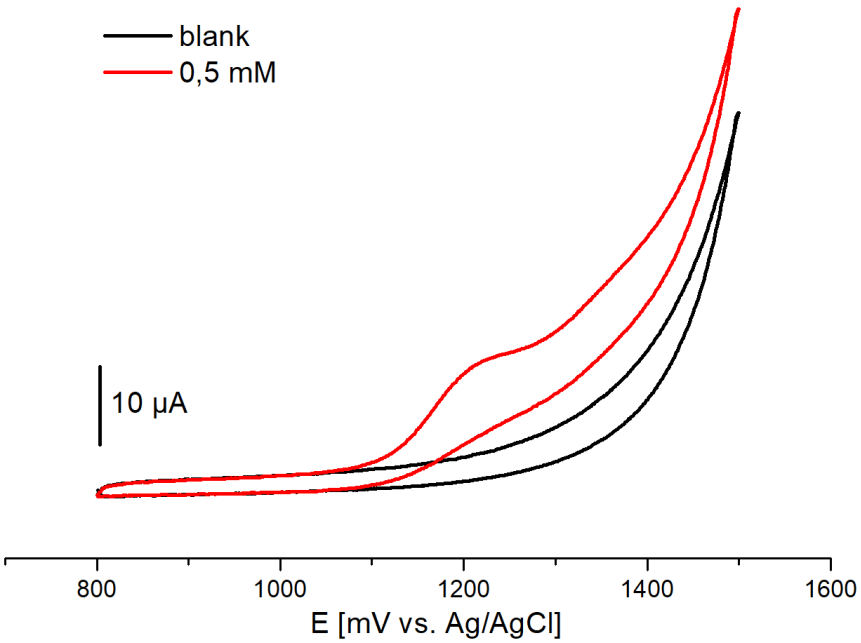
Prvním provedeným testem bylo zjištění rozsahu aplikovatelných potenciálů na PGE při různých hodnotách pH (2, 4, 7, 9 a 11). Rozsah testovaných potenciálů byl od - 1000 do 1800 mV (vs. Ag/AgCl). Z Obr. 6 je vidět, že senzor se chová lineárně v rozmezí od - 300 mV do 700 mV při pH 7. Při nižších potenciálech dochází v roztoku k vývoji vodíku. Se zvyšujícím se pH se množství vyvíjeného vodíku snižuje z důvodu přítomnosti menšího množství H_3O^+. Při vyšších potenciálech dochází ke změnám na povrchu elektrody (oxidace), se zvyšujícím se pH je tato oxidace rozsáhlejší. Narušení povrchu elektrody se v chromatografickém systému projevuje mnohonásobně vyšším proudem pozadí. Za těchto podmínek není možné provádět spolehlivé stanovení, navíc hrozí nevratné poškození elektrody.

4.1.2 Průběh oxidace kolchicinu na PGE

Další série experimentů byla věnována studiu elektrochemické oxidace kolchicinu na PGE. Z CV (Obr. 7) je zřejmé, že kolchicin se na PGE začíná oxidovat okolo 1100 mV (vs. Ag/AgCl). Vrchol oxidačního píku je dosažen při 1200 mV. Je patrné, že kolchicin je látka, která vyžaduje relativně vysoké potenciály pro elektrochemickou přeměnu. Tato hodnota byla následně využita jako výchozí pro amperometrická měření.



Obrázek 6: Srovnání cyklických voltamogramů měřených na PGE v Britton-Robinsonově pufru při pH 2 (černá), 4 (modrá), 7 (červená), 9 (zelená) a 11 (růžovofialová). Rozsah potenciálů - 1000 – 1800 mV vs. Ag/AgCl.



Obrázek 7: Srovnání cyklických voltamogramů PGE v roztoku 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$: bez přídavku kolchicinu (černá), s přídavkem kolchicinu o koncentraci 0,5 mmol·l^{-1}.

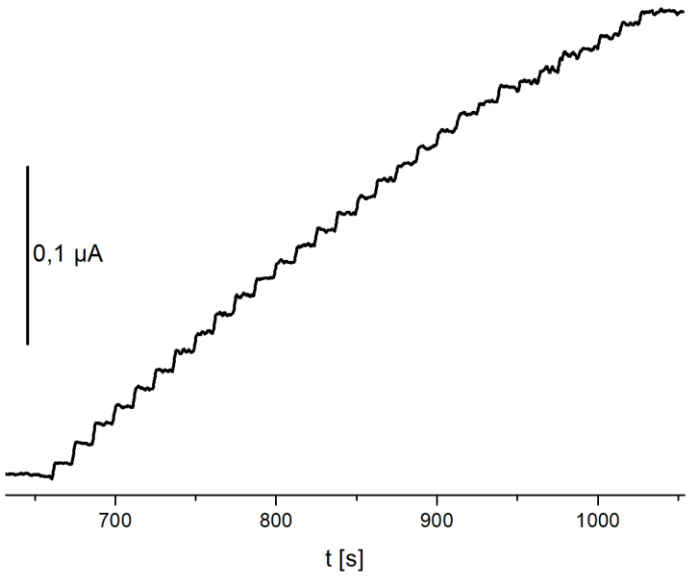
4.2 Amperometrická stanovení

Na obou senzorech (CFME, PGE) byla provedena amperometrická měření v neprůtočném systému pro další předběžné testování (LOD, LOQ, LDR, stabilita, vhodný způsob modifikace). Důvodem byla rychlost a jednoduchost uspořádání ve srovnání s amperometrickou prútokovou analýzou (FIA) nebo HPLC.

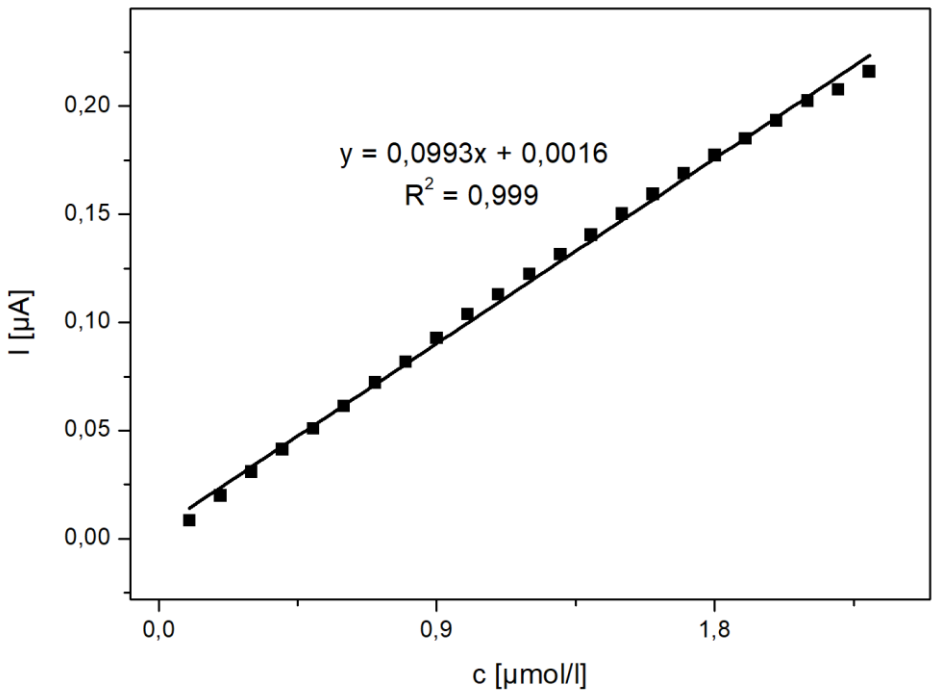
4.2.1 Amperometrické testování analytických vlastností PGE

Amperometrické testování PGE bylo provedeno sérií přídavků standardu kolchicinu, která způsobila změnu koncentrace analytu v cele o 0,1 µmol·l^{1} (Obr. 8). Srovnávány byly různé potenciály, které byly voleny podle výsledků CV. Jako optimální se ukázala aplikace 1200 mV (vs. Ag/AgCl) Amperometricky bylo dosaženo LOD 49 nmol·l^{-1}, LOQ 166,38 nmol·l^{-1}. LDR elektrody je v rozmezí 0,1 - 1,8 µmol·l^{-1} (Obr. 9).

Odezva senzoru byla reprodukovatelná po 18 nástřiků kolchicinu, poté docházelo k zeslabení signálu a ke zvyšování šumu. Důvodem těchto jevů je pravděpodobně nasycení povrchu elektrody molekulami analytu.



Obrázek 8: Amperometrický záznam měření kolchicinu na PGE. Podmínky měření: elektrolyt 0,01M-HClO4 v 0,1M-NaClO4, potenciál 1200 mV (vs. Ag/AgCl), nástřik kolchicinu 30x0,1 µmol·l^{-1}.

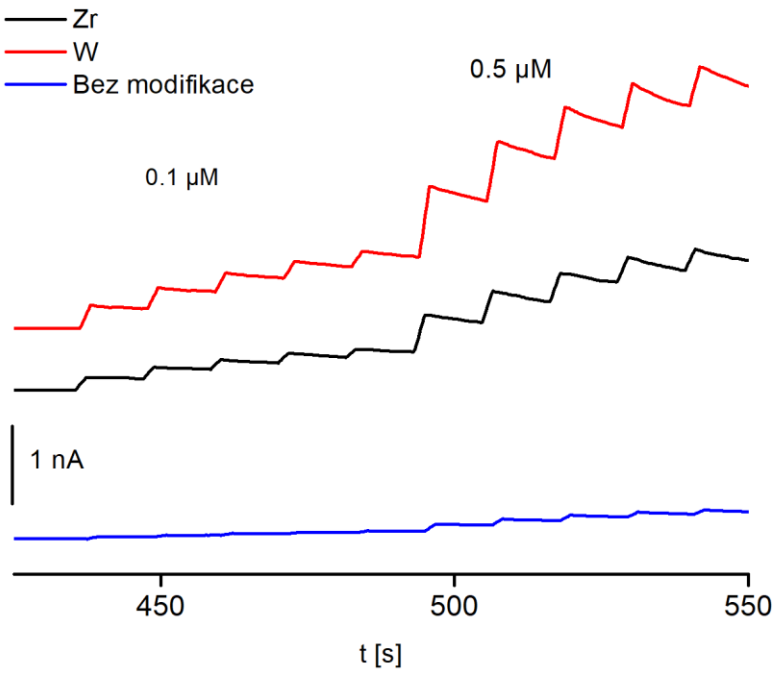


Obrázek 9: Kalibrační závislost měření kolchicnu na PGE.

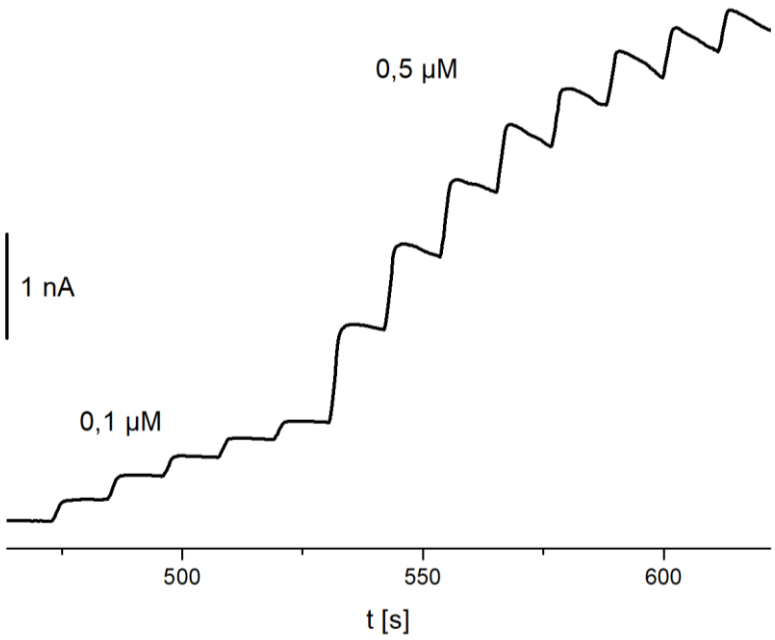
4.2.2 Amperometrické srovnání různých modifikací CFME

Pomocí amperometrických experimentů byl testován vliv způsobu modifikace CFME na velikost odezvy oxidace kolchicinu. Byla srovnávána proudová odezva: a) nemodifikovaných elektrod, b) elektrod modifikovaných pomocí jiskrového výboje (wolfram, resp. zirkon), d) elektrochemicky aktivovaných vláken. Z Obr. 10, je patrné, že modifikace elektrody způsobuje značné zvýšení odezvy na kolchicin (více než 5x větší odezvy po aktivaci, přesný poměr závisí na typu aktivace). Elektroda modifikovaná wolframem poskytovala na kolchicin vyšší odezvu než CFME modifikovaná zirkonem, současně však měla i vyšší šum. Ze srovnání poměru signál/šum u obou modifikací vyplynulo, že pro stanovení kolchicinu je vhodnější CFME modifikovaná zirkonem. Nejlepší poměr signál/šum ze všech testovaných metod úpravy však poskytovala elektrochemicky aktivovaná elektroda, která zároveň vykazovala i nejširší lineární rozsah odezvy k opakovaným přídavkům kolchicinu (Obr. 11, Tab. 3). Lineární rozsah kovy modifikovaných CFMEs klesal již po několika prvních nástřicích (Obr. 12). Povrch CFMEs modifikovaných kovy se pravděpodobně nasytí analytem rychleji než povrch elektrochemicky aktivované CFME. Důvodem tohoto rozdílu je pravděpodobně fakt, že při modifikaci jiskrovým výbojem je zasažena především špička vlákna, zatímco při elektrochemické aktivaci dochází k aktivaci po celém povrchu vlákna, tedy pro oxidaci kolchicinu je dostupná větší aktivní plocha. Pro měření v HPLC-ED byly tedy použity elektrochemicky aktivované CFMEs.

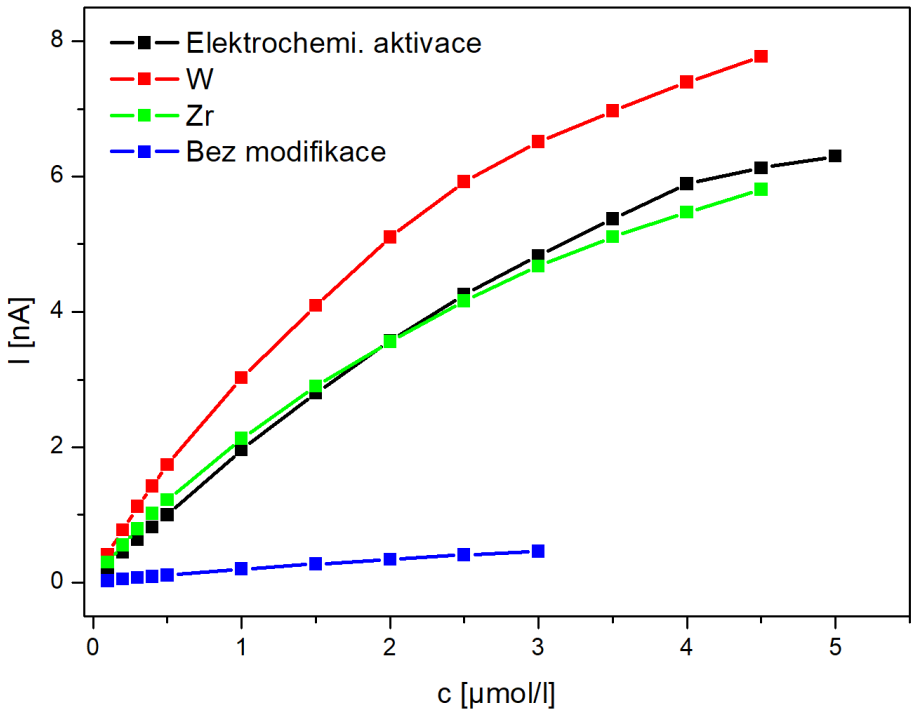
Z amperometrických měření vyplývá, že elektrochemicky modifikované CFMEs poskytují na kolchicin výrazně větší odezvy a vykazují výrazně vyšší poměr signál/šum než PGE. Důvodem vyšší citlivosti CFMEs je pravděpodobně lepší transport analytu k elektrodovému povrchu díky radiální difuzí probíhající u mikroelektrod. U PGE, který je oproti CFMEs velkoplošným senzorem, probíhá transport analytu lineární difuzí, čímž je oxidace na povrchu senzoru umožněna menšímu množství analytu než u CFMEs. Z hlediska reprodukovatelnosti odezvy vůči opakovaným nástřikům kolchicinu se však prokázal jako lepší senzor PGE.



Obrázek 10: Srovnání amperometrických měření kolchicinu na CFMEs modifikovaných kovovými částicemi wolframu (červená), zirkonu (černá) generovaných pomocí jiskrového výboje a nemodifikované CFME (modrá). Podmínky měření: elektrolyt 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, potenciál 1300 mV (vs. Ag/AgCl), nástřik kolchicinu 5x0,1 µmol·l^{-1}, 5x0,5 µmol·l^{-1}.



Obrázek 11: Amperometrické měření kolchicinu na elektrochemicky aktivované CFME. Podmínky měření: elektrolyt 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, potenciál 1300 mV (vs. Ag/AgCl), nástřik kolchicinu 5x0,1 µmol·l^{-1}, 5x0,5 µmol·l^{-1}.



Obrázek 12: Závislost proudové odezvy CFMEs na koncentraci kolchicinu: nemodifikovaných (modrá), modifikovaných pomocí jiskrového výboje zirkonem (zelená), wolframem (červená) a elektrochemicky aktivovaných (černá).

Tabulka 3: Poměr signál/šum u různě modifikovaných elektrod

Elektroda	**modifikace**	**signál**	**šum**	**S/N**
PGE	-	$1{,}12 \cdot 10^{-8}$	$1{,}93 \cdot 10^{-9}$	5,78
CFME	-	$1{,}54 \cdot 10^{-11}$	$3{,}87 \cdot 10^{-12}$	4,00
	ojiskření W	$1{,}17 \cdot 10^{-10}$	$7{,}74 \cdot 10^{-12}$	15,12
	ojiskření Zr	$1{,}67 \cdot 10^{-10}$	$5{,}80 \cdot 10^{-12}$	28,56
	elchem. aktivace	$2{,}01 \cdot 10^{-10}$	$3{,}87 \cdot 10^{-12}$	51,99

4.3 HPLC experimenty

4.3.1 HPLC měření na PGE

Volba pracovního potenciálu

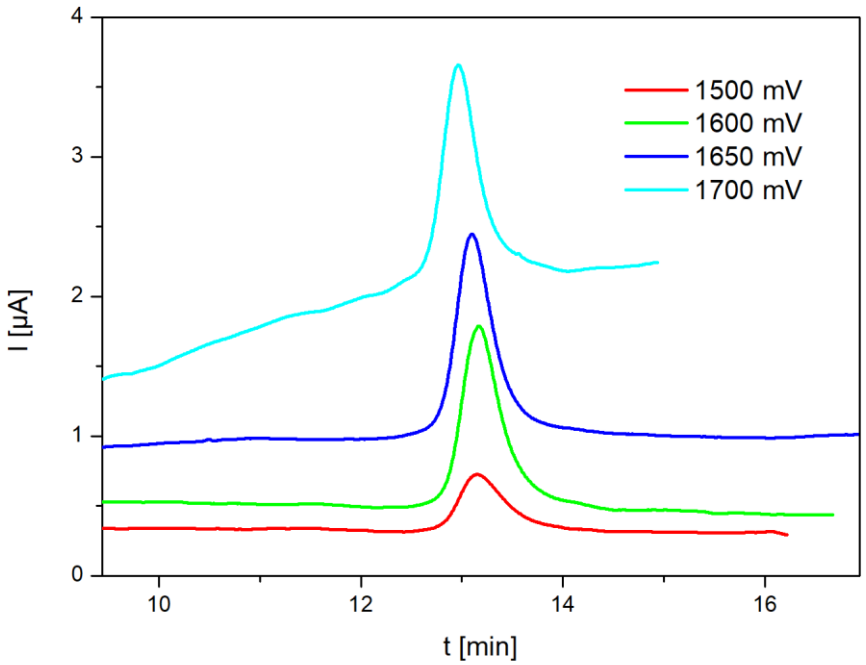
Jedním z hlavních parametrů ovlivňujících výsledek měření je pracovní potenciál aplikovaný na elektrodu. Při HPLC měřeních na PGE byly testovány potenciály od 1200 mV do 1700 mV (vs. Ag/AgCl). Srovnání bylo provedeno pomocí opakovaných nástřiků kolchicinu o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Z cyklických voltamogramů PGE je patrné, že k oxidaci kolchicinu dochází při 1200 mV (vs. Ag/AgCl). Tato hodnota byla zvolena jako výchozí potenciál pro konstrukci hydrodynamických voltamogramů. Při aplikaci PGE do průtokového sytému se však při tomto potenciálu žádný signál neobjevoval. Postupně tedy byl potenciál zvyšován po 100 mV na 1500 mV, kdy začala být patrná proudová odezva oxidace kolchicinu (50 $\mu mol \cdot l^{-1}$). Následně byl potenciál navyšován po 50 mV až na 1700 mV. Z Obr. 13 a 14 je patrné, že nejvyšší odezvu dosahovaly PGE při potenciálu 1700 mVl). Nevýhodou však byl drift základní linie a strmý nárůst velikosti šumu způsobený degradací (oxidace) povrchu senzoru. Nejlepší poměr signál/šum elektroda poskytovala při potenciálu 1650 mV. Tato hodnota potenciálu byla používána při dalších experimentech.

Stabilita senzoru PGE

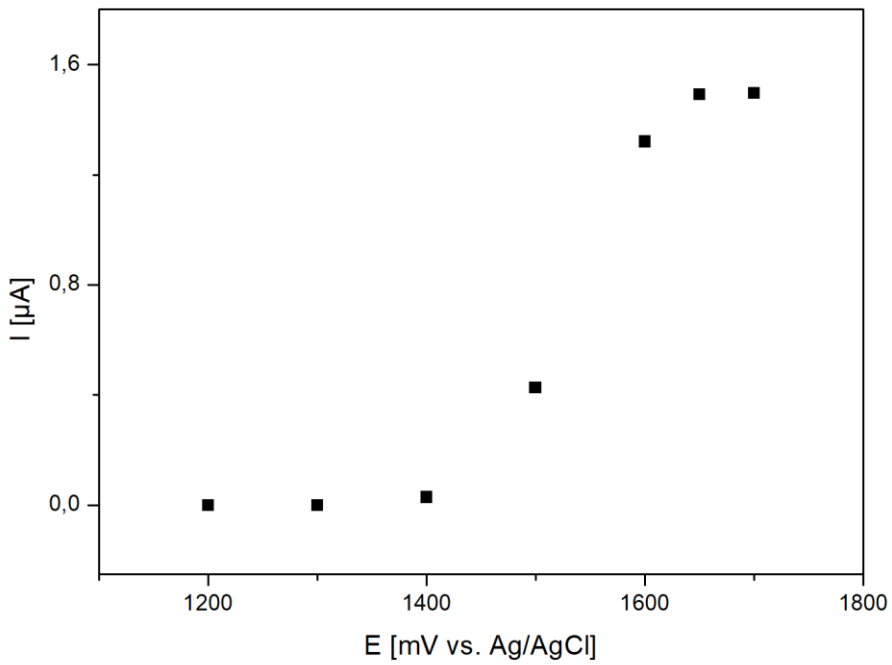
V dalších experimentech byla testována stabilita senzoru v průběhu jednoho dne a během několika následujících dní opakovaným nástřikem kolchicinu o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. V průběhu 6 hodin prvního dne byla odezva na kolchicin stabilní, její průměrná velikost byla 0,62 ± 0,03 nA. V průběhu dalších dní se odezva snížila o 15–30 %.

Kalibrační řada kolchicinu na PGE

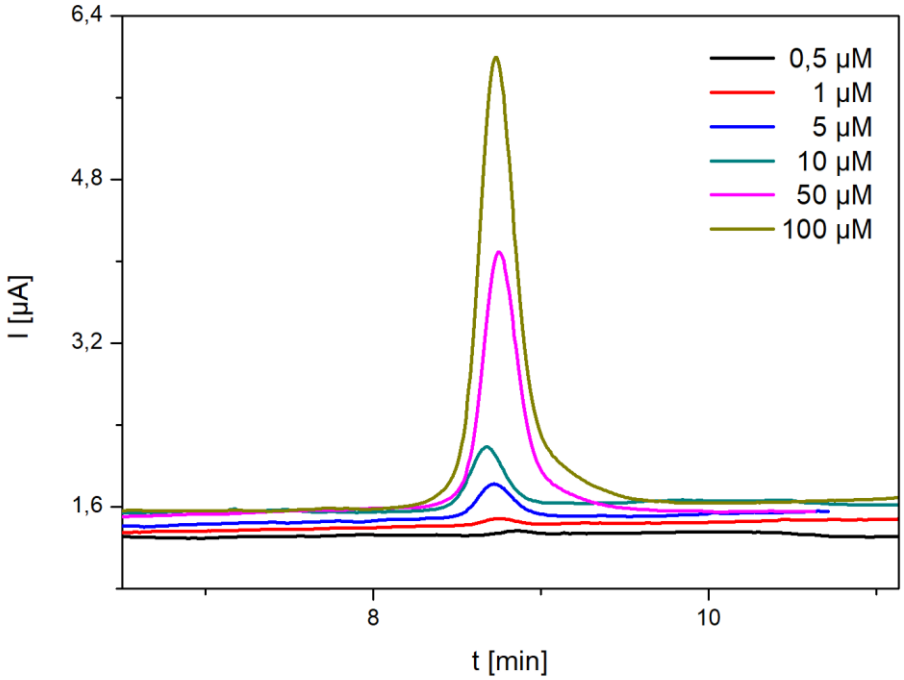
Lineární odezva senzoru na zvyšující se koncentrace zkoumané látky je jedním ze zásadních požadavků na senzory. Z vyhodnocení závislosti odezvy na koncentraci a z regresní rovnice přímky lze po analýze neznámého vzorku vypočítat koncentrace analytu. V případě PGE byla nejnižší detekovaná koncentrace 0,5 $\mu mol \cdot l^{-1}$, lineární rozsah odezvy byl při koncentracích v rozmezí 0,5–100 $\mu mol \cdot l^{-1}$. LOD byl 0,32 $\mu mol \cdot l^{-1}$, LOQ byl 1,05 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (Obr. 15, 16).



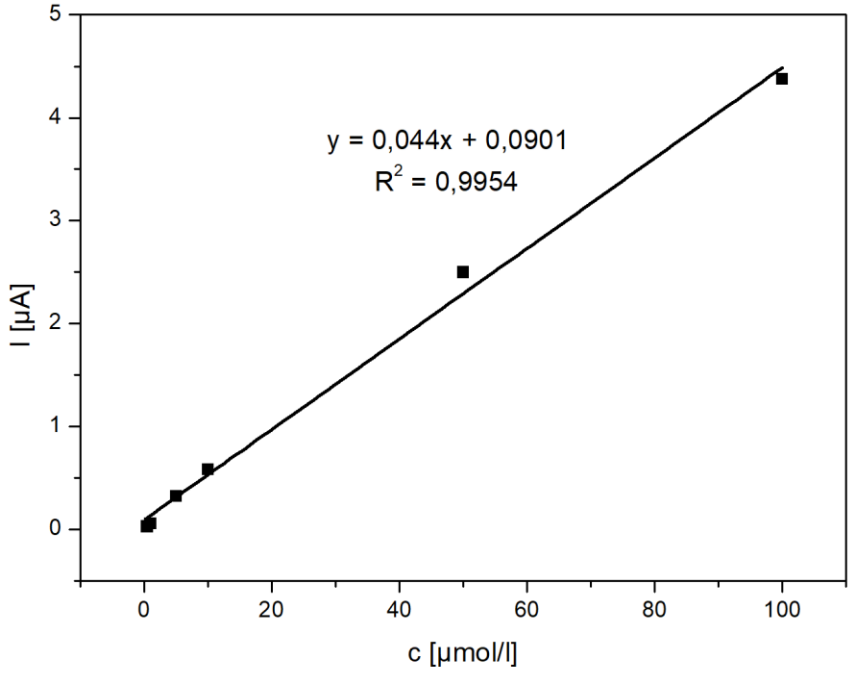
Obrázek 13: Srovnání chromatogramů měřených na PGE při testování vhodného pracovního potenciálu: 1500 mV (červená), 1600 mV (zelená), 1650 mV (modrá), 1700 mV (modrozelená). Podmínky měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$ v poměru 25:75 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl kolchicinu o koncentraci 50 µmol·ml^{-1}.



Obrázek 14: Hydrodynamický voltamogram kolchicinu na PGE na 50 µmol·ml^{-1}.



Obrázek 15: Srovnání chromatogramů z měření kalibrační řady kolchicinu na PGE v rozsahu koncentrací 0,1–100 µmol·l^{-1}. Podmínky měření: nástřik 20 µl, mobilní fáze ACN:roztok 0,01M- $HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$ v poměru 25:75 (v:v), potenciál 1650 mV (vs. Ag/AgCl), průtoková rychlost 0,3 ml·min^{-1}, teplota 45 °C.



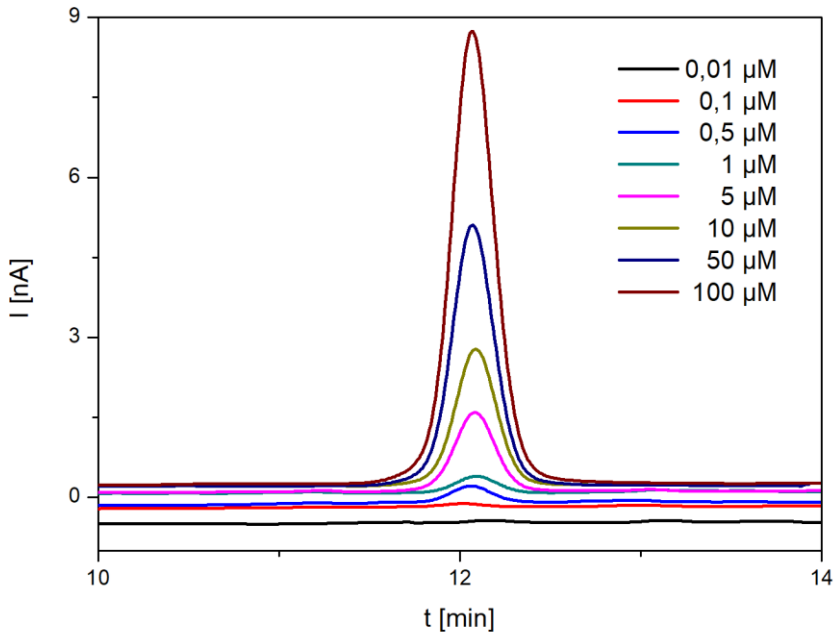
Obrázek 16: Kalibrační přímka závislosti proudu na koncentraci kolchicinu na PGE v rozsahu koncentrací 0,1–100 µmol·l^{-1}.

4.3.2 HPLC měření na CFME

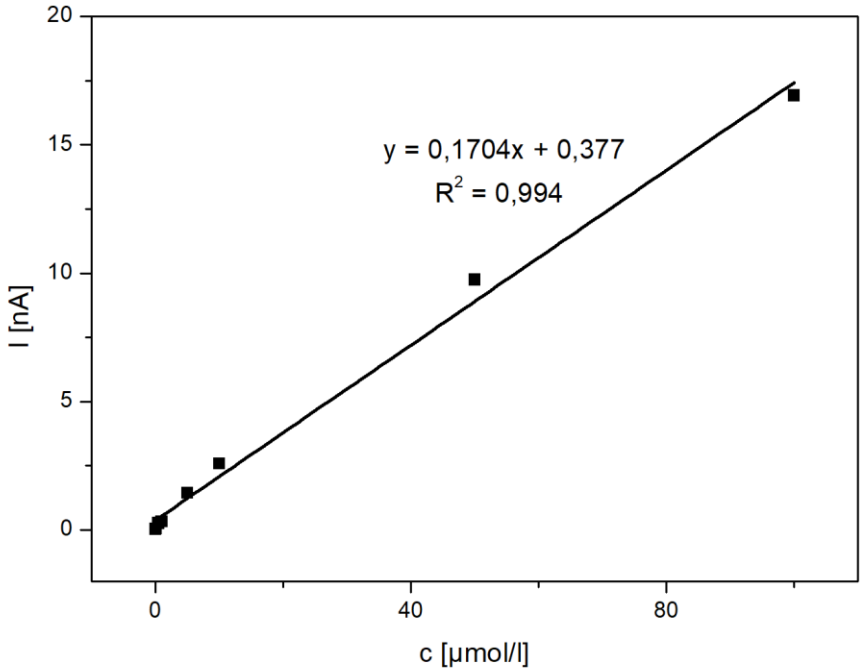
Kalibrační řada kolchicinu na CFME

Proudové odezvy CFME byly testovány v rozsahu koncentrací 0,01–100 µmol·l^{-1}. Odezva CFME byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární. LOD byl 7,6 nmol·l^{-1}, LOQ byl 25,5 nmol·l^{-1} (Obr. 17, 18).

Ze srovnání výsledků měření pomocí HPLC-ED se ukázalo, že elektrochemicky modifikovaná CFME dosahuje více než 40x nižších limitů detekce a kvantifikace než PGE. Také má širší lineární rozsah, ačkoliv PGE má vyšší koeficient spolehlivosti. Ke stanovení kolchicinu na CFME je třeba nižších potenciálů, což ovlivňuje velikost šumu a degradaci elektrodového povrchu během opakovaných analýz. Z hlediska analýzy reálných vzorků je potřeba uvažovat koncentraci kolchicinu. V případě, že jsou koncentrace velmi nízké, tak je CFME zcela jednoznačně vhodnější volba díky svým nižším LOD a LOQ. V případě vyšších koncentrací se ukázalo výhodnější použít PGE z důvodu jednodušší přípravy a obsluhy během práce.



Obrázek 17: Srovnání chromatogramů z měření kalibrační řady kolchicinu na elektrochemicky aktivované CFME v rozsahu koncentrací 0,01–100 µmol·l^{-1}. Podmínky měření: nástřik 20 µl, mobilní fáze ACN:roztok 0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$ v poměru 25:75 (v:v), potenciál 1500 mV (vs. Ag/AgCl), průtoková rychlost 0,2 ml·min^{-1}, teplota 45 °C.



Obrázek 18: Kalibrační přímka závislosti proudu na koncentraci kolchicinu na elektrochemicky modifikované CFME v rozsahu koncentrací 0,1–100 µmol·l^{-1}.

4.4 Výběr extrakčního činidla a pH extrahovaného roztoku

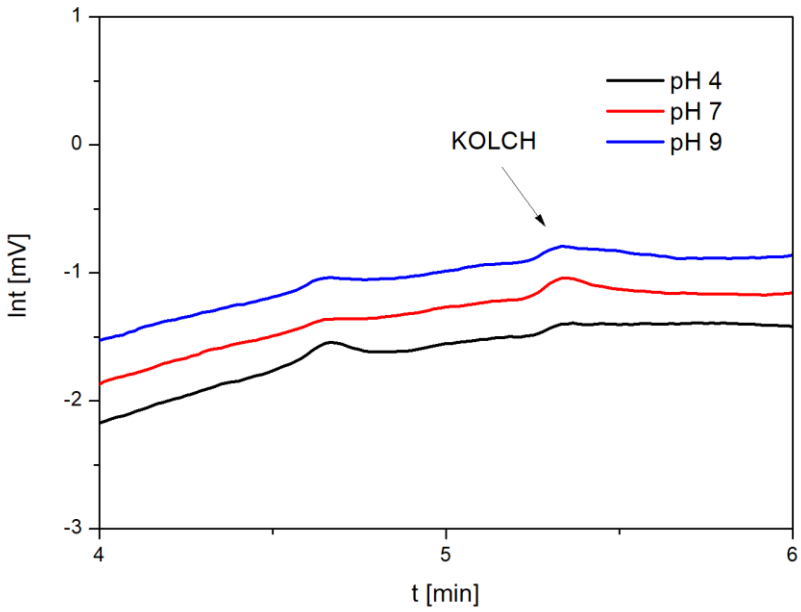
Důležitým krokem při analýze reálných vzorků je extrakce analytu pomocí vhodného organického činidla. Jeho výběr je často kritickým bodem analýzy a jeho volba ovlivňuje jednak množství analytu v extraktu a jednak obsah rušivých látek. Vedle extrahovadla hraje roli i pH prostředí, které může výrazně ovlivnit ionizaci vzorku a tím i jeho distribuci mezi fázi vodnou (moč, krev) a organickou (extrahovadlo). Vliv extrakčního činidla a pH při extrakci byl testován pomocí HPLC s UV detekcí (jednoduchost uspořádání, dobrá reprodukovatelnost).

Účinnost extrahovadel byla posuzována dle výtěžnosti metody. Extrakce byla prováděna na vzorku moči, do kterého byl přidán standardní roztok kolchicinu (viz. kapitola 3.3). Heptan, který má nejnižší polaritu z vybraných rozpouštědel, extrahoval kolchicin ve velmi malém množství (Obr. 19). Octan ethylnatý ze vzorku vyextrahoval vedle kolchicinu celou řadu dalších látek, které záznam rušily a nedovolovaly jasně určit pík kolchicinu (Obr. 20). Z těchto důvodů budou dále brány v úvahu pouze výsledky z extrakcí polárnějšími rozpouštědly diethyletherem, dichlormethanem a chloroformem. Koncentrace

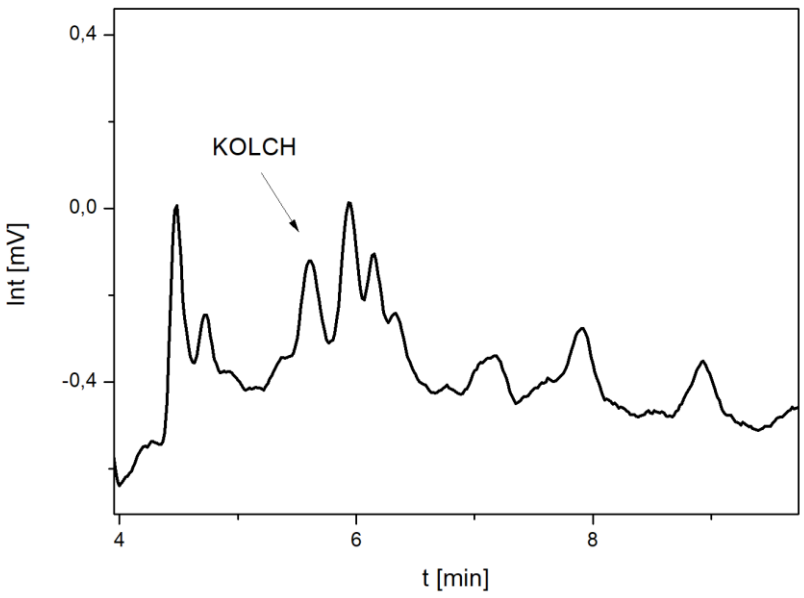
kolchicinu v extraktech těchto rozpouštědel vykazovaly relativně srovnatelné odezvy (mimo dichlormethanu při pH 7) (Obr. 21–24). Nejvyšší odezvu poskytl vzorek extrahovaný chloroformem (Tab. 3).

Dále bylo testováno nejvhodnější pH extrahovaného roztoku. Kolchicin je díky dusíkovému atomu v molekule mírně zásadité povahy, takže nejvyšší výtěžnost byla předpokládána při extrakci ze zásaditého roztoku. Stanovení ale ukázalo, že největší výtěžnost vykazovaly extrakty z roztoku o pH 7 (Tab. 4). Důvodem může být fakt, že kolchicin se v roztoku nachází v elektroneutrální formě, tedy ve své nejméně polární formě, a tak nejsnáze přechází do nepolárního organického rozpouštědla při neutrálním pH. Zároveň při tomto pH (v případě extrakce diethyletherem) docházelo k extrakci dalších látek, které se neextrahovaly z kyselého ani zásaditého pH, což zhoršovalo záznam z HPLC. Druhou nejvyšší výtěžnost vykazovaly extrakty provedené z roztoků o pH 9, zde se ukázal platný předpoklad z chemické struktury kolchicinu. Při stanovení výtěžnosti extraktu extrahovaného dichlormethanem se v této tendenci objevila výrazná diskrepance, při pH 7 byla výtěžnost extrakce velice malá, nejvyšší výtěžnost se ukázala při pH 9.

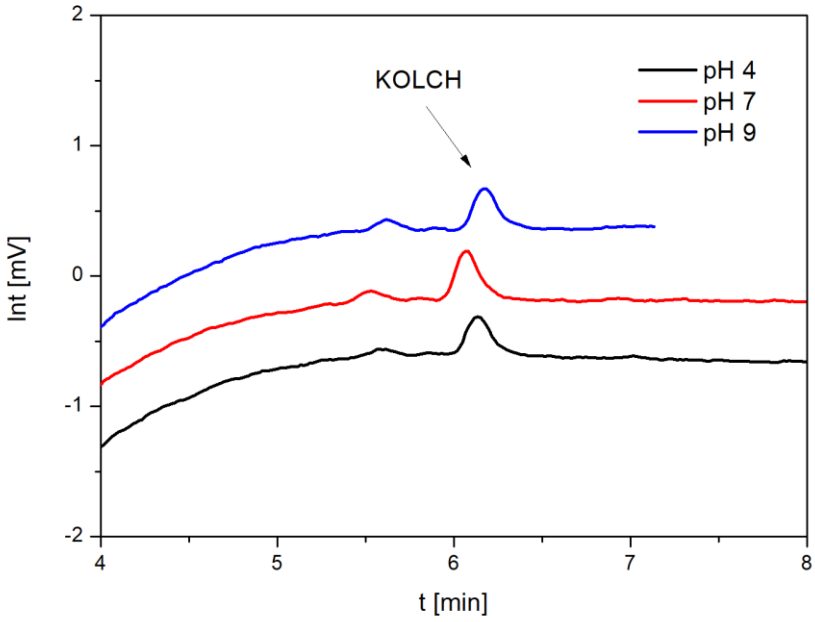
Extrakty byly vždy připravovány čerstvé, při pokusu o konzervaci zamražením docházelo ke změně velikosti odezvy kolchicinu a současně se na záznamu objevovaly další píky s podobným retenčním časem. Tyto rušivé vlivy na záznamu mohly být způsobeny degradací kolchicinu. V literatuře lze nalézt zmínky o nestálosti kolchicinu na světle. Další píky objevující se na záznamu a zároveň nenáležící kolchicinu patří ostatním látkám přítomným ve vzorku.



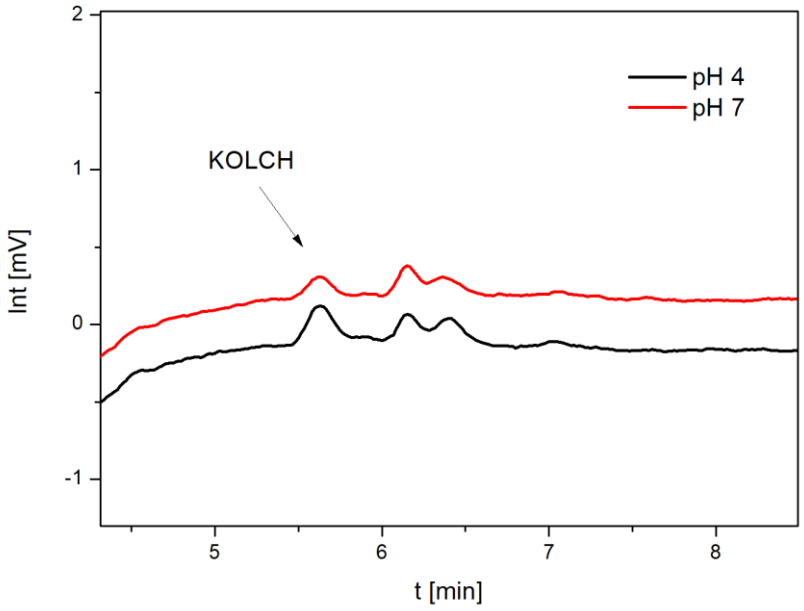
Obrázek 19: HPLC-UV chromatogram kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí heptanu, pH extrahovaného vzorku upraveno na 4 (černá), 7 (červená) a 9 (modrá). Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 30:70 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.



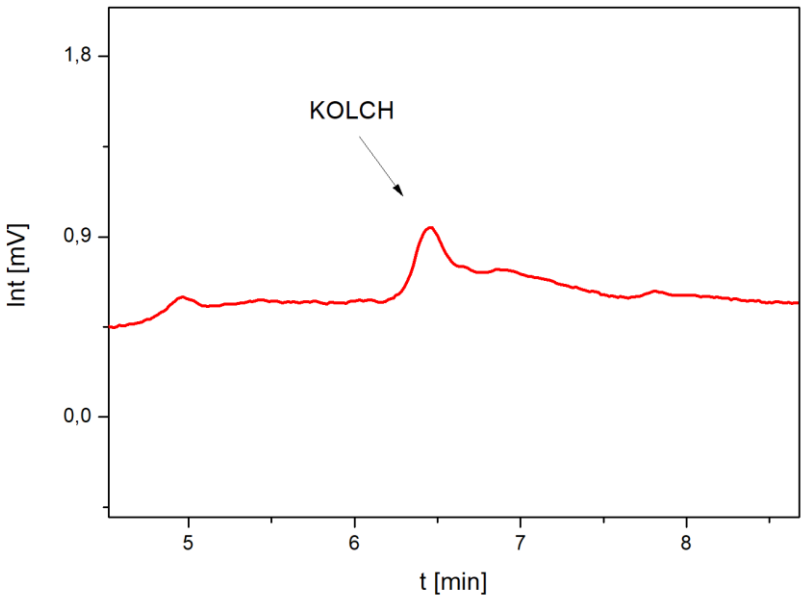
Obrázek 20: HPLC-UV chromatogram kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí octanu ethylnatého, pH extrahovaného vzorku upraveno na 7. Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 30:70 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.



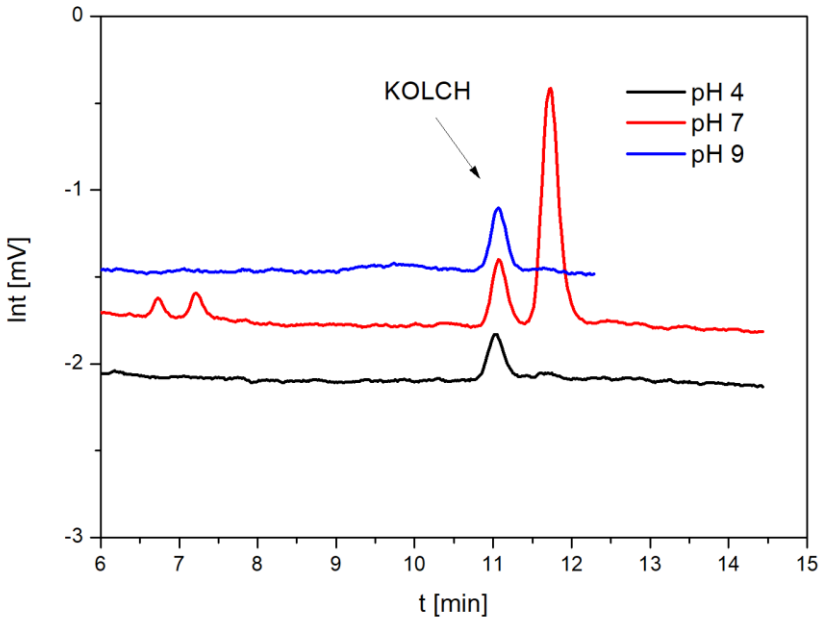
Obrázek 21: Srovnání HPLC-UV chromatogramů kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí chloroformu, pH extrahovaného roztoku upraveno na 4 (černá), 7 (červená) a 9 (modrá). Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 30:70 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.



Obrázek 22: Srovnání HPLC-UV chromatogramů kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí dichlormethanu, pH extrahovaného roztoku upraveno na 4 (černá) a 7 (červená). Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 30:70 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.



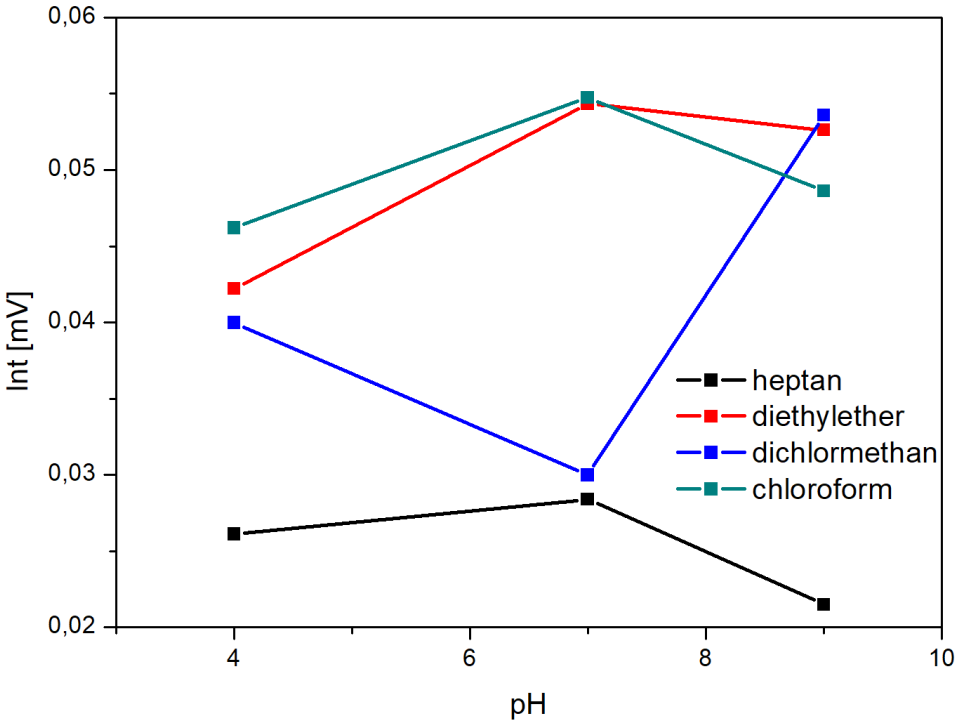
Obrázek 23: HPLC-UV chromatogram kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí dichlormethanu, pH extrahovaného roztoku upraveno na 9. Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 22:78 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.



Obrázek 24: Srovnání HPLC-UV chromatogramů kolchicinu vyextrahovaného ze vzorku moči pomocí diethyletheru, pH extrahovaného roztoku upraveno na 4 (černá), 7 (červená) a 9 (modrá). Podmínky při měření: mobilní fáze ACN:0,01M-$HClO_4$ v 0,1M-$NaClO_4$, 22:78 (v:v), průtoková rychlost 0,25 ml·min^{-1}, teplota 45 °C, nástřik 20 µl, λ_{det} 254 nm.

Tabulka 4: Výtěžky extrakcí jednotlivými rozpouštědly při daném pH

extrakční činidlo	pH	výška píku	výtěžek [µmol/l]	výtěžnost [%]
chloroform	4	0,294	0,0924	184,8
	7	0,382	0,1095	219,0
	9	0,319	0,0973	194,5
dichlormethan	4	0,230	0,0800	160,0
	7	0,127	0,0600	119,9
	9	0,370	0,1072	214,3
diethylether	4	0,253	0,0844	168,9
	7	0,378	0,1087	217,5
	9	0,360	0,1052	210,5



Obrázek 26: Závislost intenzity odezvy kolchicinu na pH roztoku, ze kterého byl extrahován činidly: heptanem (černá), diethyletherem (červená), dichlormethanem (modrá) a chloroformem (zelená).

Z provedených experimentů je zřejmé, že výhodou extrakce kolchicinu je zvýšení jeho koncentrace v analyzovaném vzorku a tedy snížení LOD. Dalšími výhodami jsou jeho přečištění a odstranění většiny interferujících látek. Při analýze extraktu pomocí HPLC-ED získáme nenáročnou a selektivní metodu stanovení. V případě použití PGE je další výhodou vysoká stabilita stanovení, v případě elektrochemicky aktivovaných CFMEs zase vysoká citlivost, což umožňuje stanovení ve vzorcích, kde očekáváme velmi malé koncentrace kolchicinu.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a charakterizovat dva typy uhlíkových materiálů pro stanovení kolchicinu pomocí HPLC-ED. Tyto dva materiály byly charakterizovány pomocí cyklické voltametrie a amperometrie. Také byl zkoumán nejvhodnější způsob jejich modifikace.

Prvním testovaným materiálem byl nový elektrodový materiál na bázi lisovaného grafitu (PGE), jež byl používán bez dalších modifikací. Při HPLC stanovení kolchicinu bylo u PGE dosaženo LOD 0,32 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a LOQ 1,05 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Lineární rozsah senzoru je v rozmezí 0,5–100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ při potenciálu 1650 mV (vs. Ag/AgCl).

Druhým materiálem testovaných senzorů byly mikroelektrody z uhlíkového vlákna (CFMEs). Před aplikací CFMEs do průtokového systému byl pomocí amperometrie testován nejvhodnější způsob jejich modifikace. Byly srovnány modifikace pomocí jiskrového výboje kovy wolframem a zirkonem a elektrochemicky aktivované CFMEs, které se ukázaly jako nejvhodnější díky nejvyššímu poměru signál/šum. Elektrochemicky aktivované CFMEs byly aplikovány do HPLC a byly charakterizovány jejich analytické vlastnosti. Dosažený LOD byl 7,6 $nmol \cdot l^{-1}$, LOQ 25,5 $nmol \cdot l^{-1}$ a LDR 0,01–100 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

Provedené experimenty ukázaly, že elektrochemicky aktivované CFMEs jsou vhodnými senzory pro stanovení kolchicinu díky nízkým LOD, LOQ a širokému lineárnímu rozsahu. Senzor PGE je však výhodnější použít v případě očekávání vyšších koncentrací kolchicinu ve vzorku z důvodu snadnější přípravy a manipulace při měření.

Summary

The aim of this work was development and characterization of two carbon based materials for determination of colchicine by HPLC-ED. These two materials were characterized by cyclic voltametry and amperometry. Also the most appropriate way of modifying was investigated.

The first tested material was Pressed graphite electrode which was used without any modification. LOD was 0,32 $\mu mol \cdot l^{-1}$ and LOQ 1,05 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Linear range of PGE was 0,5– 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ at potential 1650 mV (vs. Ag/AgCl) in HPLC system.

The second material was carbon fiber microelectrodes (CFMEs). The most appropriate way of modification was investigated before their application into the HPLC system. CFMEs modified by spark discharge (counter electrode was tungsten or zircon respectively) and electrochemicaly activated CFMEs were compared. Electrochemically activated CFMEs had the highest signal to noise ration and were aplicated to the HPLC. The analytical properties were characterized, reached LOD was 7,6 $nmol \cdot l^{-1}$, LOQ 25,5 $nmol \cdot l^{-1}$ and LDR 0,01–100 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

The experiments showed that electrochemically activated CFMEs are suitable sensors for determination of colchicine because of low LOD and LOQ and wide linear range. However PGE sensor is better in cases with higher concentrations of colchicine because of easier preparation and manipulation during the measurement.

6 Seznam zkratek

BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
CFME	mikroelektroda z uhlíkového vlákna
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
FIA	průtoková injekční analýza
FIE	průtoková injekční extrakce
HF/LPME	mikroextrakce dutým vláknem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
LDR	lineární rozsah
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LLLMW	mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LPME	mikroextrakce kapalnou fází
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní detekce
NP-LC	kapalinová chromatografie na normálních fázích
PAN	polyakrilonitril
PGE	senzor na bázi lisovaného grafitu
RP-LC	kapalinová chromatografie na obrácených fázích
SCE	kalomelová elektroda
SDME	extrakce na jedné kapce
SPE	extrakce na tuhé fázi
SPE	sítotiskem připravené elektrody
SPME	mikroextrakce na tuhé fázi
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

7 Seznam literatury

[1] P. Hasal, I. Schreiber, D. Šnita, e. al, Chemická inženýrství I., 2. vydání ,*VŠCHT Praha*, (2007).

[2] J. Káš, M. Kodíček, O. Valentová, Laboratorní techniky biochemie 1, 2. vydání, *VŠCHT Praha*, (2006).

[3] O. Vaněk, K. Bezouška, Analytická centrifuga a její využití v biochemické laboratoři, *Chem. Listy* 104 (2010) 1155-1162.

[4] J. Pawliszyn, e. al., Comprehensive Sampling and Sample Preparation - Analytical Techniques for Scientist, *Academic Press*, Volume 2 (2012).

[5] M.C. Hennion, C. Cau-Dit-Coumes, V. Pichon, Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples - Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters, *J Chromatogr A* 823(1-2) (1998) 147-161.

[6] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J Chromatogr A* 856(1-2) (1999) 3-54.

[7] J.V. Wooten, D.L. Ashley, A.M. Calafat, Quantitation of 2-chlorovinylarsonous acid in human urine by automated solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 772(1) (2002) 147-153.

[8] J.V. Hinshaw, Solid-phase microextraction, *GC Connections* 21(11) (2003) 1056-1060.

[9] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in single-drop microextraction, *Trac-Trend Anal Chem* 21(1) (2002) 53-63.

[10] D. Barcelo, M.C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, Volume 19, *Elsevier Science*, (1997).

[11] Ch. Reichardt, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3rd edition, *WILEY-VCH* (2003).

[12] M. Ortega-Heras, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltran, Aroma composition of wine studied by different extraction methods, *Anal Chim Acta* 458(1) (2002) 85-93.

[13] R. Knob, V. Pauk, V. Maier, Vybrané aspekty užití nevodných rozpouštědel v analytické chemii, *Příručka v rámci inovace výuky, FRVŠ G6 2004/2012* (2012).

[14] K. Waisser, M. Pour, Fyzikální metody organické chemie, 1. vydání *Karolinum* (2016).

[15] L. Xu, C. Basheer, H.K. Lee, Chemical reactions in liquid-phase microextraction, *J Chromatogr A* 1216(4) (2009) 701-707.

[16] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal Chem* 68(13) (1996) 2236-2240.

[17] G. Shen, H.K. Lee, Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides, *Anal Chem* 74(3) (2002) 648-654.

[18] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem*. 71 (1999) 2650-2656.

[19] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseinia, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J Chromatogr A* 1116(1-2) (2006) 1-9.

[20] A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, Headspace extraction of alcohols into a single drop, *Analyst* 126(10) (2001) 1674-1677.

[21] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817-1821.

[22] Y. Lu, J.J. Chen, M. Xiao, W. Li, D.D. Miller, An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site, *Pharm Res-Dordr* 29(11) (2012) 2943-2971.

[23] G. Hamscher, B. Priess, H. Nau, E. Panariti, Determination of colchicine residues in sheep serum and milk using high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 77(8) (2005) 2421-2425.

[24] D. Bartusik, B. Tomanek, E. Lattova, H. Perreault, J. Tuszynski, G. Fallone, The efficacy of new colchicine derivatives and viability of the T-Lymphoblastoid cells in three-dimensional culture using F-19 MRI and HPLC-UV ex vivo, *Bioorg Chem* 37(6) (2009) 193-201.

[25] D.M. Stankovic, L. Svorc, J.F.M.L. Mariano, A. Ortner, K. Kalcher, Electrochemical Determination of Natural Drug Colchicine in Pharmaceuticals and Human Serum Sample and its Interaction with DNA, *Electroanal* 29(10) (2017) 2276-2281.

[26] C. Bismuth, M. Gaultier, F. Conso, Marrow Aplasia after Acute Colchicine Poisoning - 20 Cases, *Nouv Presse Med* 6(19) (1977) 1625-1629.

[27] E. Bodoki, R. Oprean, L. Vlase, M. Tamas, R. Sandulescu, Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts, *J Pharmaceut Biomed* 37(5) (2005) 971-977.

[28] E. Bodoki, S. Laschi, I. Palchetti, R. Sandulescu, M. Mascini, Electrochemical behavior of colchicine using graphite-based screen-printed electrodes, *Talanta* 76(2) (2008) 288-294.

[29] V.F. Samanidou, G.A. Sarantis, I.N. Papadoyannis, Development and validation of a rapid HPLC method for the direct determination of colchicine in pharmaceuticals and biological fluids, *J Liq Chromatogr R T* 29(1) (2006) 1-13.

[30] X.C. Guo, D.J. Lin, W. Li, K. Wang, Y. Peng, J. Zheng, Electrophilicities and Protein Covalent Binding of Demethylation Metabolites of Colchicine, *Chem Res Toxicol* 29 (2016) 296−302.

[31] A. Tracqui, P. Kintz, B. Ludes, C. Rouge, H. Douibi, P. Mangin, High-performance liquid chromatography coupled to ion spray mass spectrometry for the determination of colchicine at ppb levels in human biofluids, *J Chromatogr B* 675(2) (1996) 235-242.

[32] Y. Finkelstein, S.E. Aks, J.R. Hutson, D.N. Juurlink, P. Nguyen, G. Dubnov-Raz, U. Pollak, G. Koren, Y. Bentur, Colchicine poisoning: the dark side if an ancient drug, *Clinical Toxicology* 48(5) (2010) 407-414.

[33] M. Cheze, M. Deveaux, G. Pepin, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of colchicine in postmortem body fluids. Case report of two fatalities and review of the literature, *J Anal Toxicol* 30(8) (2006) 593-598.

[34] W. Holak, W.M. Plank, Differential pulse polarographic determination of colchicine, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69(12) (1980) 1439-1440.

[35] E.M. Pearce, The quantitative colorimetric determination of colchicine in aqueous solution, and studies on its application to urine, *J Chromatogr A* 2 (1959) 108-113.

[36] Y.M. Liu, G.Z. Li, Determination of colchicine in tablet by fluorimetry, *Chinese J Anal Chem* 28(3) (2000) 330-332.

[37] D.K. Singh, B. Srivastava, A. Sahu, Spectrophotometric determination of colchicine using iron(III) chloride and 1,10-phenanthroline, *J Indian Chem Soc* 81(2) (2004) 171-173.

[38] C. Boudene, F. Duprey, C. Bohuon, Radioimmunoassay of Colchicine, *Biochem J* 151(2) (1975) 413-415.

[39] F. Alali, K. Tawaha, R.M. Qasaymeh, Determination of colchicine in Colchicum steveni and C-hierosolymitanum (Colchicaceae): Comparison between two analytical methods, *Phytochem Analysis* 15(1) (2004) 27-29.

[40] J. Pietsch, J. Gunther, T. Henle, J. Dressler, Simultaneous determination of thirteen plant alkaloids in a human specimen by SPE and HPLC, *J Sep Sci* 31(13) (2008) 2410-2416.

[41] S. Bahrani, M. Ghaedi, K. Dashtian, A. Ostovan, M.J.K. Mansoorkhani, A. Salehi, MOF-5(Zn)-Fe2O4 nanocomposite based magnetic solid-phase microextraction followed by HPLC-UV for efficient enrichment of colchicine in root of colchicium extracts and plasma samples, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1067 (2017) 45-52.

[42] P.H. Qiu, X.H. Chen, X. Chen, L. Lin, C.C. Ai, Simultaneous determination of five toxic alkaloids in body fluids by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 875(2) (2008) 471-477.

[43] H.J. Zhang, Electrochemistry and voltammetric determination of colchicine using an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite film modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry* 68(2) (2006) 197-201.

[44] K. Zhang, J. Zhou, J. Liu, K.J. Li, Y.F. Li, L.X. Yang, B.X. Ye, Sensitive determination of colchicine at carbon paste electrode doped with multiwall carbon nanotubes, *Anal Methods-Uk* 5(7) (2013) 1830-1836.

[45] M. Fahim, M. Singh, Y.T. Kamal, H.M. Mukhtar, S. Ahmad, A high performance thin layer chromatographic method for the estimation of colchicine in different formulations, *J Pharm Bioallied Sc* 7(4) (2015) 260-263.

[46] P. Fernandez, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, M. Lopezrivadulla, A. Cruz, Determination of Colchicine in Biological-Fluids by Reverse-Phase Hplc - Variation of Colchicine Levels in Rats, *Forensic Sci Int* 59(1) (1993) 15-18.

[47] N. Fabresse, J. Allard, M. Sardaby, A. Thompson, R.E. Clutton, M. Eddleston, J.C. Alvarez, LC MS/MS quantification of free and Fab -bound colchicine in plasma, urine and organs following colchicine administration and colchicine-specific Fab fragments treatment in Gottingen minipigs, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1060 (2017) 400-406.

[48] R. Reinmann, M. Akram, Temporal investigation of a fast spark discharge in chemically inert gases, *J Phys D Appl Phys* 30(7) (1997) 1125-1134.

[49] N.S. Tabrizi, Q. Xu, N.M. van der Pers, U. Lafont, A. Schmidt-Ott, Synthesis of mixed metallic nanoparticles by spark discharge, *J Nanopart Res* 11(5) (2009) 1209-1218.