

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jiřina Humpolíková

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ 6-THIOGUANINU NA  
BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ  
ELEKTRODĚ

Electrochemical Determination of 6-Thioguanine on Boron  
Doped Diamond Film Electrode

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu GA ČR P206/12/G151 a výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2013.

Dovoluji si tímto poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za odborné vedení, Mgr. Haně Dejmkové za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytovala pomoc při práci, a dále také všem členům katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

## Obsah

1	ÚVOD .....	9
1.1	Cíl práce .....	9
1.2	6-Thioguanin .....	9
1.2.1	Užití.....	10
1.2.2	Fyzikální vlastnosti, příprava .....	11
1.2.3	Metody stanovení.....	11
1.3	Borem dopovaná diamantová filmová elektroda.....	14
1.4	Extrakce tuhou fází .....	16
1.5	Průtoková injekční analýza .....	16
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
2.1	Reagencie .....	18
2.2	Aparatura.....	19
2.3	Pracovní postupy .....	20
2.3.1	Voltametrická měření.....	20
2.3.2	Extrakce tuhou fází .....	22
2.3.3	Další postupy .....	23
2.4	Stálost zásobních roztoků.....	23
3	VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 6-THIOGUANINU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ .....	25
3.1	DC Voltametrie.....	25
3.2	Diferenční pulzní voltametrie.....	32
3.3	Stanovení 6-Thioguaninu v pitné a říční vodě pomocí DC voltametrie .....	38
3.4	Stanovení 6-Thioguaninu v moči a extrakce tuhou fází.....	41
4	PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA .....	44
4.1	Optimalizace.....	44
4.2	Kalibrační závislosti.....	49
5	STANOVENÍ 6-THIOGUANINU V TABLETĚ LANVIS .....	53
5.1	DC voltametrie .....	53
5.2	Průtoková injekční analýza .....	54
5.3	UV spektrometrie.....	54
5.4	Porovnání metod stanovení .....	56
6	ZÁVĚR.....	58
7	LITERATURA .....	61

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením 6-Thioguaninu (6-T) metodami DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE). Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 6-T a za těchto podmínek proměřeny kalibrační závislosti a vypočteny meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé metody.

Jako optimální prostředí pro DCV a DPV stanovení 6-T na BDDFE bylo zvoleno prostředí 60% methanolu a fosfátového pufru (PB) o pH 2,0. Pro obě voltametrické metody byly získány lineární koncentrační závislosti proudu v rozmezí 2  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  až 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  s LOQ 0,9  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  pro DCV a 1,5  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  pro DPV. Nižší LOQ bylo dosaženo pouze v prostředí PB o pH 2, kde byla LOQ 0,6  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  pro DCV i DPV, problémem byla ale nižší opakovatelnost měření.

V prostředí PB o pH 2 metodou DCV byl 6-T stanoven v pitné a říční vodě s dosaženými LOQ 1,3  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  jak v pitné tak i v říční vodě. Pro stanovení 6-T v moči byla zkoumána možnost extrakce na tuhé fázi jako předstupně pro metodu DCV.

Metodou FIA byly, při optimálních podmínkách (polarizační potenciál 1300 mV, průtoková rychlost 5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a objem vzorku 50  $\mu\text{l}$ ), získané lineární koncentrační závislosti proudu v rozmezí 2,0  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  až 10,0  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  a 0,2  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  až 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  s LOQ 0,05  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Optimální podmínky FIA byly použity pro stanovení 6-T v léčivu Lanvis. Pro porovnání výsledků byl během měření FIA předsazen UV detektor, kde byl získán LOQ 0,06  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ .

6-T byl stanoven v léčivu Lanvis metodami DCV na BDDFE za stanovených podmínek, UV-VIS spektrometrie v prostředí methanolu, podle amerického lékopisu v prostředí hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové také metodou UV-VIS spektrometrie a metodou FIA s elektrochemickou a UV detekcí.

Byla sledována stabilita zásobního roztoku 6-T v methanolu pomocí UV-VIS spektrometrie. Roztok 6-T byl stabilní po dobu osmi dnů.

## Abstract

This master's thesis is focused on the determination of 6-thioguanine (6-T) by DC voltammetry (DCV), differential pulse voltammetry (DPV) and flow injection analysis with electrochemical detection (FIA-ED) on a boron doped diamond electrode (BDDFE). The optimum conditions for determination of 6-T were found and under these conditions, concentration dependences were measured and the limits of quantification (LOQ) were calculated for each method.

Medium of 60% methanol and phosphate buffer (PB) pH 2,0 was chosen as optimum for DCV and DPV determination of 6-T at BDDFE. For both DCV and DPV, the linear concentration dependences were obtained in concentration ranges of 6-T from  $2 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  to  $10 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  with LOQ  $0,9 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  for DCV and  $1,5 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  for DPV. Lower LOQ was achieved in PB pH 2,0, where LOQ was  $0,6 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  for both DCV and DPV, but the problem was lower repeatability.

In PB pH 2 6-T was determined by DCV in drinking and river water with LOQ  $1,3 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  in both drinking and river water. The possibility of solid phase extraction was investigated as a method for preliminary separation of 6-T from urine.

For FIA under optimized conditions (polarization potential 1300 mV, flow rate  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and sample volume  $50 \mu\text{l}$ ) the linear concentrations dependences were obtained in concentration ranges of 6-T from  $2,0 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  to  $10,0 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  and from  $0,2 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  to  $1,0 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  with LOQ  $0,05 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . 6-T was determined in drug Lanvis using FIA under optimized conditions. For comparison of FIA-ED 6-T was determined also by FIA using UV detector, where LOQ was  $0,06 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ .

6-T was determined in drug Lanvis by DCV under optimized conditions, by UV spectrometry in methanol and by the UV spectrometry according to U.S. Pharmacopoeia in sodium hydroxide and hydrochloric acid and by FIA with electrochemical and UV detection.

The stability of stock solution of 6-T in methanol was monitored using UV spectrometry. The solution of 6-T was stable for eight days.

**Předmětová hesla:**

Analytická chemie

Elektrochemie

**Klíčová slova:**

Voltametrie

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

6-Thioguanin

Extrakce tuhou fází

Průtoková injekční analýza

**Objective Words:**

Analytical Chemistry

Electrochemistry

**Key Words:**

Voltammetry

DC Voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

Boron doped diamond film electrode

6-Thioguanine

Solid phase extraction

Flow injection analysis

## Seznam použitých zkratek

6-T	– 6-Thioguanin
BDDFE	– borem dopovaná diamantová filmová elektroda
BR pufr	– Brittonův – Robinsonův pufr
CAS. R. N.	– registrační číslo (Chemical abstract service registration number)
CPE	– uhlíková pastová elektroda
DCV	– DC voltametrie
DPV	– diferenční pulzní voltametrie
FIA	– průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
$E_{1/2}$ , $E_p$	– půlvlnový potenciál, potenciál píku (v horním indexu je uváděno číslo vlny/píku)
ED detektor	– elektrochemický detektor
$E_{pol}$	– polarizační potenciál
$I_v$ , $I_p$	– proud vlny, píku (v horním indexu je uváděno číslo vlny/píku)
HDME	– visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	– kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie
LLE	– extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	– mez detekce
LOQ	– mez stanovitelnosti
$M_r$	– relativní molekulová hmotnost
NMR	– nukleární magnetická resonance
PB	– fosfátový pufr
pH	– záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů ( $H_3O^+$ )
$pH^f$	– pH směsi s pufrem a methanolem
Q	– průtoková rychlost nosného roztoku, $ml \cdot min^{-1}$
RSD	– relativní směrodatná odchylka
SPE	– extrakce pevnou fází (solid phase extraction)

# 1 ÚVOD

## 1.1 Cíl práce

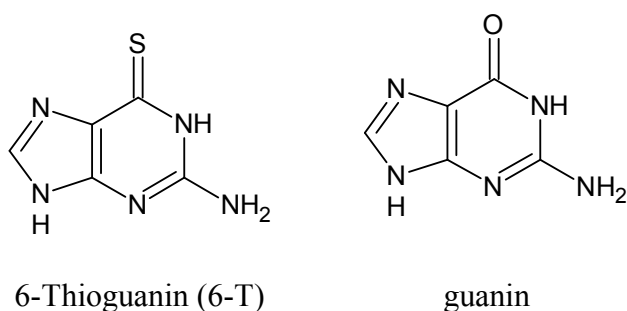
Tato práce se zabývá studiem elektrochemických vlastností 6-Thioguaninu (6-T) pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC („direct current“) voltametrie (DCV). Cílem práce bylo stanovit 6-T na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE), určit vhodné podmínky pro stanovení, dosáhnout nejnižší možné meze stanovitelnosti a stanovit 6-T v reálných vzorcích pomocí DPV nebo DCV a metodou průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED).

## 1.2 6-Thioguanin

6-T je analogem guaninu, který je součástí nukleonových kyselin (obr. 1.1). Chemicky se 6-T nazývá 2-amino-1H-purin-6(7H)-thion a patří do rodiny thiopurinových léčiv, jako jsou azathioprin a 6-merkaptopurin, které byly také elektrochemicky stanoveny.<sup>1,2</sup> Elion a Hitchings objevili purinové antimetabolity 6-T a 6-merkaptopurin v roce 1950.<sup>3</sup>

V těle je 6-T metabolizován na kyselinu thiomočovou a to dvěma cestami: Za prvé je 6-T přeměněn enzymem guanin deaminasou na thioxanthin, který je pak metabolizován na thiomočovou kyselinu pomocí xanthin oxidasy. Nebo za druhé je 6-T nejdříve metabolizován aldehyd oxidasou na 8-hydroxy-thioguanin, který je pak konvertován opět xanthin oxidasou na kyselinu thiomočovou.<sup>4</sup>

V tabulce 1.1 jsou uvedeny základní informace 6-T.



Obr. 1.1 *Struktura studované látky 6-T a guaninu, od kterého je odvozen.*

Tab. 1.1 Základní informace

Název	Systematický název	Sumární vzorec	CAS R.N.	M <sub>r</sub>
6-Thioguanin	2-amino-1H-purin-6(7H)-thion	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> S	154-42-7	167,193

### 1.2.1 Užití

6-T se díky svým chemoterapeutickým vlastnostem používá pro léčbu rakoviny a to nejčastěji leukemie. Jeho cytotoxický efekt vychází z reakce s nukleotidy DNA a RNA v buňkách kostní dřeně.<sup>5</sup>

Metabolismus 6-T enzymem hypoxanthin-guanin fosforibosyl transferasou (HGFRT) vede k cytotoxickému efektu 6-T. HGFRT přeměňuje 6-T na 6-thioguanosin 5'-monofosfát, který je dále metabolizován kinasami a reduktasami na deoxy-6-thioguanosin 5' trifosfát (dGF). Inkorporace dGF do DNA způsobuje zpomalení buněčného cyklu a následně apoptózu.<sup>4</sup>

Při rakovině prsu nebo vaječníku, kde mutace příslušných genů způsobuje chybnou homologní rekombinaci, je 6-T schopen selektivně likvidovat poškozené geny v DNA.<sup>6</sup> Dále je 6-T používán k léčbě zánětlivého onemocnění střev a autoimunitní hepatitidy (chronický zánět jater).<sup>7</sup>

Hladina 6-T je nejčastěji sledována v krvi a moči po intravenózním anebo orálním podání. Inkorporace 6-T do DNA při léčbě leukemie závisí na stavu kostní dřeně a dávce. Po jediné dávce 6-T bylo jeho začlenění do DNA velmi malé, ale po pěti denních dávkách byl guanin v DNA z větší části nahrazen 6-T. Po prvních dvou hodinách od podání se 6-T vylučuje nezměněn, později už jen ve formě metabolitů, nejčastěji ve formě kyseliny 6-thiomočové.<sup>8</sup>

Užívání 6-T je zatíženo jeho toxicitou. 6-T může být zodpovědný za snížení tvorby krevních destiček a bílých krvinek v kostní dřeni, což může vést k infekci. Jelikož rozpětí mezi terapeutickou a toxickou dávkou je velmi úzké, je identifikace 6-T v biologických vzorcích důležitá ke kontrole hladiny 6-T v průběhu léčby.<sup>9</sup>

Deriváty 6-T jsou užívány v terapii idiopatických střevních onemocnění. Představují základní léky v terapii kortikodependentní a kortikoresistentní formy idiopatických střevních zánětů a dále u chronicky aktivní Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy.<sup>10</sup>

### 1.2.2 Fyzikální vlastnosti, příprava

Chemicky modifikované báze jako je 6-T jsou studovány pro jejich četné farmakologické, biochemické a biologické funkce.

Molekulární parametry tautomerů 6-T jsou podobné jako u guaninu, což naznačuje nenáročnou výměnu 6-T za guanin a zdůvodňuje biologickou aktivitu 6-T.<sup>11</sup> Rozložení vodíků je stejné, jako u standardních bází, ale atom síry může vyvolat změny ve vlastnostech báze a jejích interakcích. Vodíková vazba u modifikovaných bází je o něco slabší než v případě nemodifikovaných a vazba N–S je delší než vazba N–O. Thioskupina zvyšuje polarizovatelnost a dipólový moment monomerů, a tím zvyšuje disperzní síly a elektrostatické interakce mezi thiobázemi.<sup>12</sup>

6-T je možno připravit zahřátím směsi čistého guaninu a pentasulfidu fosforu s pyridinem. Výtěžek reakce je 93 % čistého 6-T.<sup>13</sup>

6-T je žlutou krystalickou látkou, která má bod tání  $>360^{\circ}\text{C}$ . Hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu 6-T mezi oktanol a vodu ( $\log P_{ow}$ ) byla stanovena na  $-0,07$ . (Cit. <sup>14,15</sup>)

### 1.2.3 Metody stanovení

6-T byl stanoven několika analytickými technikami jako spektrofotometrií, spektrofluorimetrií, NMR spektrometrií, průtokovou injekční analýzou (FIA) a HPLC, která je nejpoužívanější metodou pro stanovení thiolových léčiv. Problémem u technik HPLC a spektrometrie je to, že 6-T postrádá dostatečnou UV absorpci, a proto výběr vhodné mobilní fáze a vhodného reaktantu zvyšuje náklady.<sup>16,17</sup>

Pro stanovení 6-T byla vyvinuta mikročipová elektroforéza s chemiluminiscenční (CL) detekcí, která v porovnání s výše uvedenými analytickými technikami má výhodu v potřebě malého množství vzorku a rychlosti separace.<sup>17</sup>

6-T byl dále stanoven pomocí fosforimetrie za pokojové teploty, kdy má 6-T vysokou fosforescenci. Stanovení 6-T bylo provedeno po jeho adsorpci na pevném substrátu. Výhody fosforescence za pokojové teploty v přítomnosti pevného substrátu jsou jednoduchost, velká selektivita, dobrá citlivost a rychlost. Metoda může analyzovat účinnou látku v tabletách bez interferencí.<sup>18</sup>

LC-MS metoda byla použita pro změření obsahu 6-T v chromozomální DNA bez užití enzymu nebo inkubace.<sup>19</sup>

Koncentrace 6-T v krevní plazmě byla stanovena pomocí fluorimetrie. Léčivo bylo měřeno v oxidované formě (guanin 6-sulfonát) pro získání větší fluorescence.<sup>20</sup>

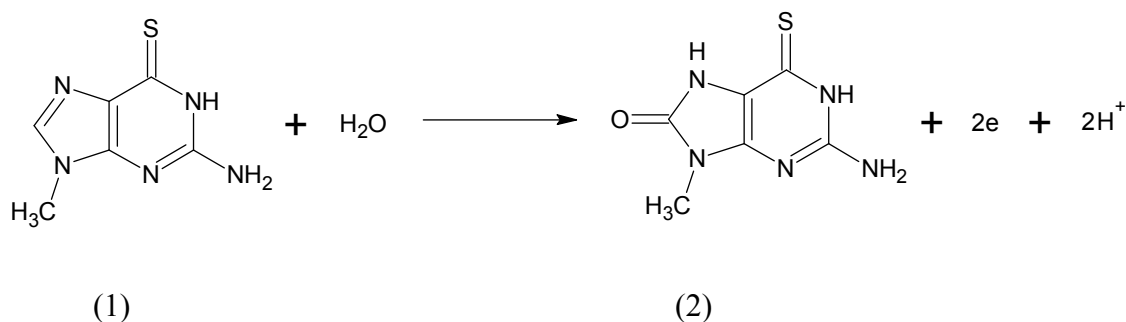
6-T v tabletě byl podle amerického lékopisu stanoven pomocí UV spektrometrie rozdílem absorbancí v prostředí hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové.<sup>21</sup>

Přehled metod stanovení 6-T je uveden v tabulce 1.2.

Tab. 1.2 Přehled metod stanovení 6-T

Metoda	Matrice	Prostředí	LOD mol·l <sup>-1</sup>	LOQ	Cit.
Mikročipová elektroforéza s CL detekcí	Krevní plasma	Borátový pufr	10·10 <sup>-9</sup>	–	17
Fosforimetrie	NaOH, voda	NaOH, Indium sulfát	2,8·10 <sup>-11</sup>	–	18
LC-MS	DNA	Pufr o pH 5 (chloroacetaldehyd ve fosfátu draselném)	2,5·10 <sup>-17</sup> μg <sup>-1</sup> DNA	8,4·10 <sup>-17</sup> μg <sup>-1</sup> DNA	19
Fluorimetrie	Krevní plasma	Voda, fenylrtuť acetát	30·10 <sup>-9</sup>	–	20
UV spektrometrie	Tableta	NaOH, HCl	–	–	21
HPLC	Červené krvinky	HCl, dithiothreitol	–	0,3·10 <sup>-6</sup>	22

Elektrochemicky byl 6-T stanoven pomocí voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) modifikované ferrocenedikarboxylovou kyselinou. 6-T (1) na obr. 1.2 byl na CPE elektrochemicky oxidován na 8-oxo-thioguanin (2). Optimální pH roztoku pro stanovení 6-T bylo pH 9. Oxidační potenciál 6-T klesal s rostoucím pH BR pufru.<sup>23</sup>



Obr. 1.2 *Elektrochemická oxidace 6-T na CPE modifikované ferrocenedikarboxilovou kyselinou*

CPE modifikovaná p-aminofenolem byla použita ke stanovení 6-T v tabletě a ve vzorku moči. Výhodou metody byla nízká interference, vysoká reprodukovatelnost a použití v reálných vzorcích.<sup>24</sup>

CPE modifikovaná 2,7-bis(ferrocenyl-ethyl)fluoren-9-onem byla použita pro zjištění elektrochemického chování 6-T v prostředí fosfátového pufru o pH 7 a pro stanovení 6-T v moči.<sup>25</sup>

Pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (HDME) byly určeny optimální podmínky pro 6-T a následně bylo popsáno jeho stanovení v reálných vzorcích (léčivo a krevní sérum) a ve směsi s kaptoprilem.<sup>26</sup>

Square-wave voltametrie na HMDE byla použita pro stanovení 6-T na základě interakce s DNA v tabletách a v modelovém krevním vzorku s přidaným 6-T.<sup>27</sup>

Adsorpční chování 6-T bylo studováno na HDME cyklickou voltametrií. Byly studovány fáze chemicky a fyzikálně adsorbované.<sup>28</sup>

Přehled elektrochemických stanovení 6-T je uveden v tabulce 1.3.

Tab. 1.3 Přehled elektrochemických stanovení 6-T

Metoda	Elektroda	Prostředí	Potenciál detekce, mV	LOD <sub>3</sub> , $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Cit.
CV	CPE modifikované ferrocenedikarboxylovou kyselinou	BR pufr	250	0,0085	23
CV, Square wave voltametrie	CPE modifikovaná p-aminofenolem	BR pufr	840	0,08	24
DPV	CPE modifikovaná 2,7-bis(ferrocenyl ethyl)fluoren-9-onem	Fosfátový pufr (pH 7)	260	0,022	25
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie	HDME	BR pufr (pH 3.5) s $\text{Cu}^{2+}$	-320	$0,08\cdot 10^{-3}$	26
Square wave voltametrie	HDME	Octanový pufr (pH 4,8), DNA	-1390	0,0021	27
AC voltametrie, CV	HDME	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ , acetát sodný (pH 4,3)	-200	-	28

### 1.3 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

Pro studium chování 6-T byla v této práci jako pracovní elektroda použita borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDFE) s mikrokrystalickým diamantem (obr. 1.4), protože se svými vlastnostmi jevila jako vhodná pro přímé elektroanalytické stanovení této látky.

Diamant je vhodný materiál pro tvorbu elektrod, jelikož je biologicky kompatibilní a je nejtvrdějším materiálem přírody. Je odolný proti opotřebení, chemické korozi a je skvělým tepelným vodičem. Diamant lze snadno dopovat a tím z něj vytvořit polovodič se širokým potenciálovým oknem.

Jedna z možností, jak vyrobit diamant, je technika za vysokého tlaku a teploty. Je to metoda, která simuluje podmínky, za jakých diamant vzniká v přírodě v podzemí. Diamant připravený touto technikou je monokrystalický.

Další metoda pro výrobu diamantu je chemická depozice par za nižší teploty a tlaku. Výhodou metody je ekonomičnost a vznik diamantu ve formě velmi tenké vrstvy.<sup>29, 30</sup>

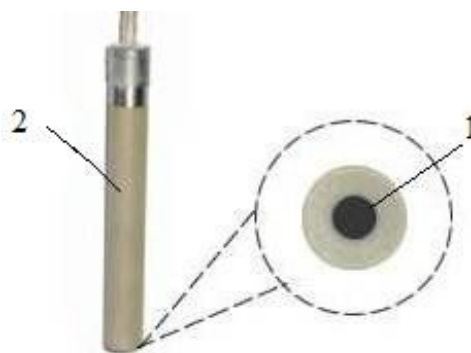
Borem dopované diamantové filmy se obvykle připravují metodou chemické depozice par. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu a vodíku, dopování borem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi těchto plynů.

Pro použití BDDFE v elektrochemii organických látek existují dva hlavní směry: elektrochemická oxidace organických látek obsažených v odpadních vodách na borem dopované diamantové anodě založená na jejich úplné konverzi nebo destrukci a užití BDDFE jako elektrochemických senzorů ve voltametrické nebo při ampérometrické detekci v průtokových metodách (HPLC, průtoková injekční analýza, kapilární elektroforéza).<sup>31</sup>

Oproti klasickým uhlíkovým elektrodám má BDDFE výhodu v lineárním dynamickém rozsahu, limitu detekce, přesnosti a stabilitě.<sup>32</sup>

Existují čtyři typy diamantových elektrod: elektroda s dopovaným diamantovým filmem, bez vrstvy nebo s vrstvou (často karbidu kovu) umístěnou mezi podkladem a filmem, elektroda dopovaná diamantovými částicemi, kde částice jsou na vodivém pasivovaném povrchu nebo jsou částice imobilizovány na izolačním filmu.

Podklad může být buď monokrystalický, polykrystalický křemík nebo z kovů, jako je titan, tantal, wolfram, molybden a niob nebo na bázi uhlíkových materiálů jako grafit, skelný uhlík anebo uhlíkové vlákno.<sup>33</sup>



Obr. 1.4 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda. Křemíková destička s mikrokrystalickým diamantovým povrchem (1), průměr pracovní části elektrody 3 mm, plocha pracovní části elektrody 7,1 mm<sup>2</sup>, tělo elektrody je vyrobeno z polyetheretherketonu. (2)

## 1.4 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je v současné době díky ekonomické dostupnosti, šetrnosti k životnímu prostředí, rychlosti, jednoduchosti, možnosti odběrů vzorků v terénu a bezpečnosti populární technikou pro zakoncentrování a separaci v mnoha různých oblastech analytické chemie, zejména životního prostředí a farmaceutické analýzy.

Nejdůležitějším faktorem při výběru SPE je volba stacionární fáze (sorbentu). Tímto výběrem lze totiž kontrolovat analytické parametry, jako jsou selektivita, afinita a kapacita.

Důležitý trend v SPE je vývoj kolonek s takovým sorbentem, který bude co nejuniverzálnější, levný a s dobře definovanými vlastnostmi.<sup>34</sup>

Extrakce tuhou fází (SPE) je široce užívána pro izolaci vybraných analytů nejčastěji z kapalných vzorků. Analyt je převeden na pevnou fázi, kde je ukotven po dobu vzorkovacího procesu. Elucí je analyt vymyt z pevné fáze za užití jiné kapaliny nebo je uvolněn metodou termální desorpce a tím je převeden do plynné fáze.

Hlavní cíle SPE jsou obohacení vzorku, zjednodušení matrice (přečištění vzorku) a převod vzorku z jedné kapaliny do jiné nebo do plynné fáze.

SPE může sloužit jako doplněk nebo náhrada za extrakci kapalina–kapalina.<sup>35</sup>

## 1.5 Průtoková injekční analýza

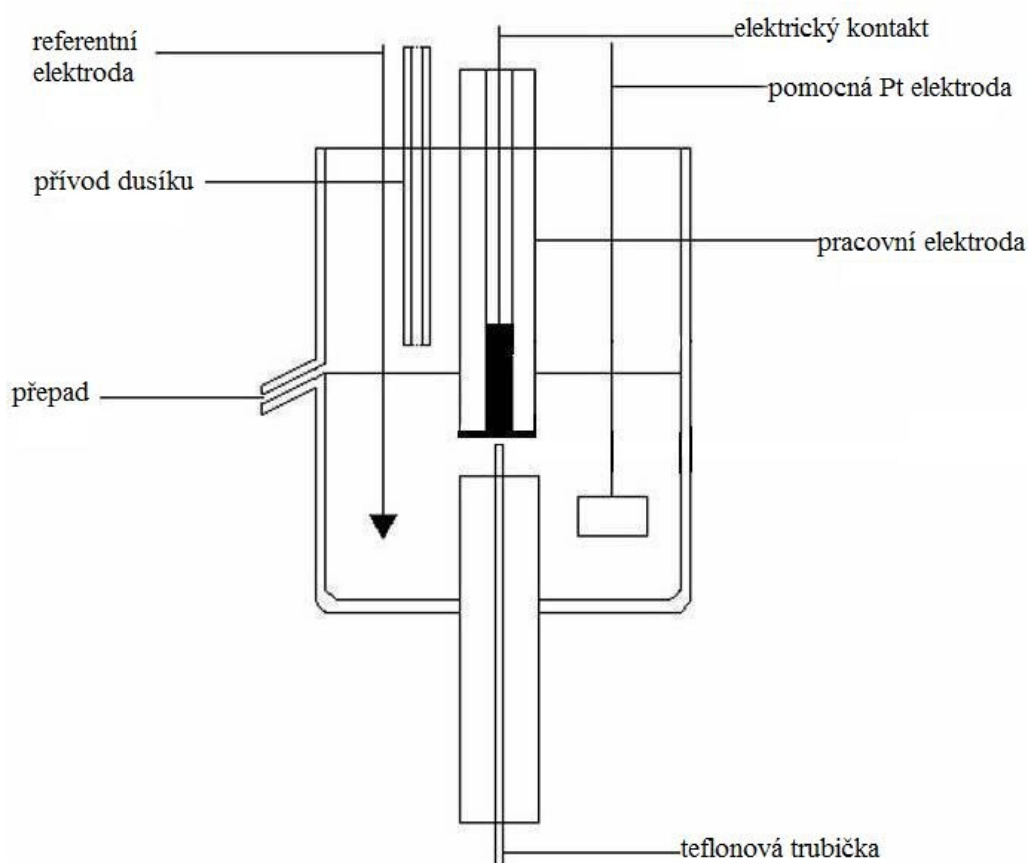
Průtoková injekční analýza (FIA) byla poprvé popsána v roce 1975. (Cit. <sup>36</sup>) Jde o analytickou metodu, kde se uplatňuje plynulý tok všech roztoků, do něž jsou vstříkem dávkovány velmi malé objemy vzorků pomocí dávkovacího ventilu. V proudu může být vzorek fyzikálně a chemicky přeměněn a způsobit tak odezvu na příslušném detektoru. Je to jednoduchá a praktická technika, která umožňuje vysokou frekvenci vzorkování.<sup>37, 38</sup> Další výhody FIA jsou jednoduchá konfigurace, vysoká propustnost vzorků a zvýšená selektivita na základě kinetické povahy procesu měření.<sup>39</sup>

FIA se dále využívá ke kvantifikaci sloučenin, které jsou ve vzorcích s rozmanitým složením. Použití FIA systému pro přepravu vzorků do detektoru elektroanalytických metod snižuje dobu kontaktu mezi vzorkem a elektrodou, čímž se minimalizuje nebezpečí pasivace pracovní elektrody.<sup>40</sup>

Vývoj průtokových analýz je součástí trvalého zlepšování celé analytické instrumentace a závisí také na zájmu o používání těchto metod v různých oblastech praktické aplikace. V počátcích byly aplikace průtokových analýz používány především v klinických metodách. Později se ale začaly široce využívat i v environmentální analýze a analýze potravin.

V posledních letech je vývoj této techniky zaměřen na přeměnu průtoku do mikrofluidního formátu, což může otevřít nové pole praktického využití průtokových analýz.<sup>41</sup>

Pro využití elektrochemické detekce je často zařazen "wall-jet" detektor. Používá se nejen u FIA, ale také běžně v kapalinové chromatografii a kontinuální průtokové analýze. Při tomto uspořádání je nosný roztok se vzorkem přiveden k detektoru, kde tryská na pracovní elektrodu. Výhodou wall-jet uspořádání je snadná údržba a jednoduchý design, viz obr. 1.5. (Cit<sup>42-44</sup>)



Obr 1.5 Elektrochemické uspořádání "wall-jet".<sup>43</sup>

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztok 6-T (Sigma Aldrich,  $\geq 98\%$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro měření kalibračních křivek a závislosti na pH roztoku byl připraven rozpuštěním vypočteného množství látky ve 100 ml methanolu (Merck, Německo) za pomoci ultrazvukové lázně. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku sledované látky methanolem anebo pufrům.

Pro stanovení 6-T v pitné vodě (odebrána 10. 12. 2012 v budově chemických kateder na PŘF UK, Hlavova 8, Praha 2) a v říční vodě (odebrána 12. 12. 2012 z Vltavy, v oblasti Výtoně, Praha 2) byl zásobní roztok připraven rozpuštěním vypočteného množství látky v 250 ml pitné nebo říční vody na výslednou koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH (Lachema Ner., ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (Lachema, Brno, ČR), fosforečnou (Lachema, Brno, ČR) a octovou (Lachema Ner., ČR), každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Všechny chemikálie použité pro přípravu BR pufru byly čistoty p.a.

Fosfátový pufr (PB) o příslušném pH byl připraven smísením  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH (Lachema Ner., ČR) a  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny fosforečné (Lachema, Brno, ČR), obě o čistotě p.a.

Léčivo Lanvis (šarže 904202, Heumann PCS GmbH, Feucht, Německo, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A., Poznaň, Polsko) s deklarovaným obsahem 6-T 40 mg v jedné tabletě.

Další použité chemikálie: ferrokyanid draselný (Lachema, N.P., Brno, p.a.), chlorid draselný (Lachner Neratovice, ČR, p.a.), kyselina dusičná (čistota p.a., Penta), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, p.a.) a acetonitril (Merck, Praha, chromatografická čistota).

## 2.2 Aparatura

Při voltametrických technikách, DC voltametii a diferenční pulzní voltametii, byla použita sestava Mini – and Microelectrode System UM $\mu$ E (ETP-21-10) se softwarem PolarPro verze 5.1, (Polaro-Sensors, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP.

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní použita elektroda argentochloridová ( $3 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1} \text{ KCl}$ , EcoTrend Plus, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda ETP-CZ-PO1006 (EcoTrend Plus, ČR). Pracovní elektrodou byla borem dopovaná diamantová filmová elektroda (Windsor Scientific, D-257-SA, o průměru 3 mm).

Při DPV byly na elektrody vkládány pulzy o šířce 100 ms a modulační amplitudě 50 mV. Při technice DCV i DPV byla použita rychlost nárůstu potenciálu  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 8453 UV-Visible Spectrophotometer v křemenných kyvetách měrné tloušťky 10 mm.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005, Jenway LTD, Essex, Velká Británie), který byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Pro předběžnou separaci a prekoncentraci studované látky byly použity kolonky Lichrolut EN (Merk, Darmstadt, Německo) vhodné pro separaci slabě polárních látek z vodného prostředí. Tyto kolonky jsou naplněny 200 mg sorbentu na bázi kopolymeru ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu.

Při měření technikou průtokové injekční analýzy (FIA) s dávkovacím ventilem (Sample injektor D, Ecom, ČR) byl použit elektrochemický detektor v uspořádání wall-jet tvořený přepadovou nádobkou s nosným roztokem, v níž byla fixována měrná elektroda přímo proti ústí teflonové trubičky, kterou byl přiváděn vzorek s nosným roztokem (obr. 1.5). Měrnou elektrodou zde byla BDDFE. Zapojení a použití elektrod bylo obdobné jako při voltametrických měřeních. K elektrochemické detekci byl použit Amperometric Detector ADLC 1 (Laboratorní přístroje, Praha).

Spektrofotometrická detekce při FIA byla zajišťována UV detektorem LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Praha). Signál byl měřen při vlnové délce  $\lambda = 344 \text{ nm}$ , výstupní napětí odpovídalo 1V na 1 A.U. Bylo použito vysokotlaké lineární čerpadlo HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha). Dále byl použit program Clarity Lite (DataApex, Praha), který pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corp.).

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Voltametrická měření

BDDFE se nejdříve aktivovala cyklickou voltametrií v kyselině dusičné o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od  $-2500$  do  $+2500 \text{ mV}$  a rychlosti nárůstu potenciálu  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . (Cit. <sup>45</sup>) Pro urychlení měření byla zvýšena rychlost aktivace na  $400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a pro dostatečnou aktivaci po zrychlení, přidána navíc aktivace v  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl.

Každý nový den měření, nebo když byla elektroda dlouho v klidu, byla elektroda aktivována v kyselině dusičné a KCl o koncentracích  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od  $-2500$  do  $+2500 \text{ mV}$  a rychlosti nárůstu potenciálu  $400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . V průběhu dne byla po změně prostředí elektroda aktivována pouze v  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od  $-2500$  do  $+2500 \text{ mV}$  a rychlosti nárůstu potenciálu  $400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Po každé aktivaci byla elektroda kontrolována cyklickou voltametrií, kdy byla sledována reverzibilita redoxního systému ferrokyanid/ferrikyanid. Cyklické voltamogramy byly měřeny v roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl v potenciálovém rozsahu od  $-200$  do  $1000 \text{ mV}$ . Tímto procesem se kontrolovalo, jestli není elektroda zpasivována. V případě, že se na cyklických voltamogramech objevily píky, mezi jejichž maximy byl rozdíl větší než  $150 \text{ mV}$ , byla elektroda zpasivována a musela být podrobena další aktivaci v kyselině dusičné a KCl. Na obr. 2.1 jsou znázorněny křivky ukazující, kdy je a kdy není potřeba elektrodu aktivovat.

Při voltametrických měřeních bylo do 10 ml odměrné baňky odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku studované látky v methanolu, či ve vodě, byl přidán

methanol k získání jeho požadovaného obsahu (nejčastěji 60 % (v/v)) a roztok byl doplněn PB nebo BR pufrům o příslušném pH na celkový objem 10 ml.

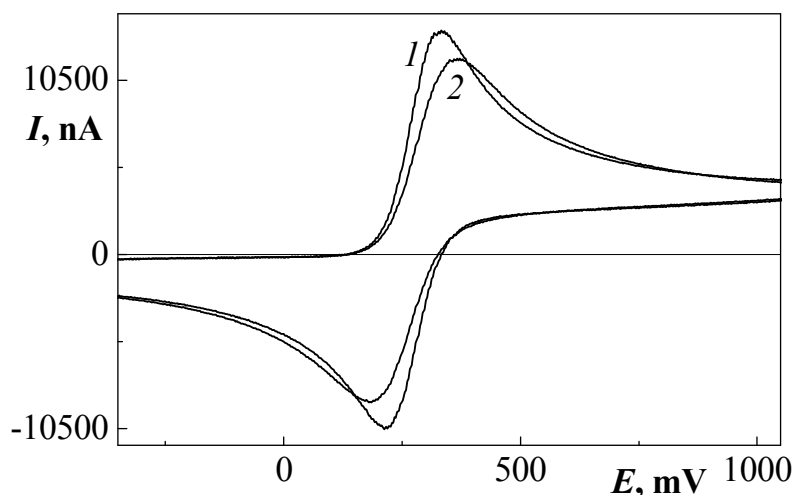
Pro stanovení 6-T v pitné a říční vodě byl modelový vzorek 6-T připraven rozpuštěním 6-T přímo ve vzorku pitné či říční vody na výslednou koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Při voltametrických měřeních bylo do 10 ml odměrné baňky odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku studované látky ve vodě, roztok byl doplněn pitnou nebo říční vodou na celkový objem 10 ml a k takto řaděným roztokům byl ve voltametrické nádobě přidán 1 ml PB o pH 2.

6-T byl stanoven v tabletě léčiva Lanvis, která má deklarovaný obsah 6-T 40 mg v každé tabletě. Rozdrcená tableta byla rozpuštěna v methanolu za pomoci ultrazvukové lázně tak, aby zásobní roztok měl koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  6-T.

V případě metody standardního přídavku bylo do čtyř 10 ml odměrných baněk pipetováno 400  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku vzorku tablety. Do zbylých tří byl postupně přidán zásobní roztok standardu 6-T o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v methanolu a to tak, že do druhé byl přidán objem 200  $\mu\text{l}$ , do třetí 400  $\mu\text{l}$  a čtvrté 600  $\mu\text{l}$ . Do všech čtyř baněk byl přidán methanol pro získání obsahu 60% methanolu a baňky byly doplněny po rysku PB o pH 2. Očekávaná koncentrace vzorku tablety v roztoku byla  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Takto připravené roztoky byly převedeny do voltametrické nádoby. Před měřením roztoků se studovanou látkou byl vždy zaznamenán signál základního elektrolytu. Křivky základního roztoku byly změřeny třikrát a křivky se studovanou látkou pětkrát. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

Postup při vyhodnocování křivek se lišil podle použitých voltametrických technik. Vyhodnocení DCV vlny bylo prováděno prodloužením lineární části záznamu před nástupem a po nástupu vlny a byl změřen potenciál v polovině výšky vlny. Výška DPV píku byla vyhodnocována od spojnice minim po jeho stranách, změřením velikosti proudu mezi touto spojnicí a maximem píku.



Obr 2.1 *Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  v  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{KCl}$  bez (1) a s potřebou aktivace (2). Měřeno na BDDFE.*

### 2.3.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází byla prováděna následujícím postupem, kolonka byla napojena na speciální vakuovou nádobu, která byla spojena s vývěvou. Podtlak byl kontrolován manometrem a byl nastaven tak, aby byla udržována konstantní rychlost průtoku cca  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , hodnota podtlaku byla 78 kPa. Před vlastní extrakcí byla kolonka aktivována promytím 3 ml methanolu, který byl následně vymyt 3 ml deionizované vody. Poté byl na kolonku nanesen modelový vzorek 10 ml 6-T v destilované vodě o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo 10 ml modelového vzorku 6-T v moči. Zachycený 6-T byl eluován 6 ml methanolu do odměrné baňky a doplněn PB o pH 2 do 10 ml. Následně byl roztok převeden do polarografické nádoby a byly zaznamenány voltamogramy metodou DCV na BDDFE.

Shodným postupem byl připraven slepý pokus s použitím destilované vody neobsahující 6-T. K němu bylo po zaznamenání voltamogramu přidáno příslušné množství 6-T, které odpovídalo koncentraci v měřeném roztoku po SPE a znovu byl zaznamenán voltamogram.

Procentový výtěžek extrakce byl určen z poměru  $I_p/I_p^0$ , kde  $I_p$  značí výšku píku po provedené extrakci 6-T z vodného roztoku a  $I_p^0$  je výška píku 6-T v roztoku připraveném přidávkem potřebného objemu standardního roztoku 6-T k roztoku po extrakci slepého vzorku.

### 2.3.3 Další postupy

Pro spektrometrické stanovení byl zásobní roztok tablety 6-T připraven stejně, jako v případě voltametrie (viz kap. 2.3.1) a byl navíc zcentrifugován. Stanovení 6-T v tabletě léčiva spektrometricky pomocí kalibrační křivky bylo provedeno odpipetováním příslušného množství zásobního roztoku 6-T a vzorku tablety do 10 ml odměrných baněk a doplněním po rysku methanolem. Po změření vzorku tablety o očekávané koncentraci  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  6-T byl výsledek dosazen do rovnice regrese kalibrační křivky. Příprava pro metodu standardního přidávku bylo podobná jako u voltametrie, ale baňky byly doplněny po rysku methanolem.

Při FIA bylo dávkování vzorků do systému prováděno s použitím injekční stříkačky přes dávkovací ventil. U měření 6-T v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2 byly vzorky připravovány obdobně jako při voltametrických měřeních.

Mez stanovitelnosti (LOQ) byla určena jako koncentrace odpovídající signálu vypočtenému z desetinásobku směrodatné odchylky proudu dvaceti opakovaných měření sledované látky o koncentraci v nejnižším bodě příslušné kalibrační přímky.<sup>46</sup>

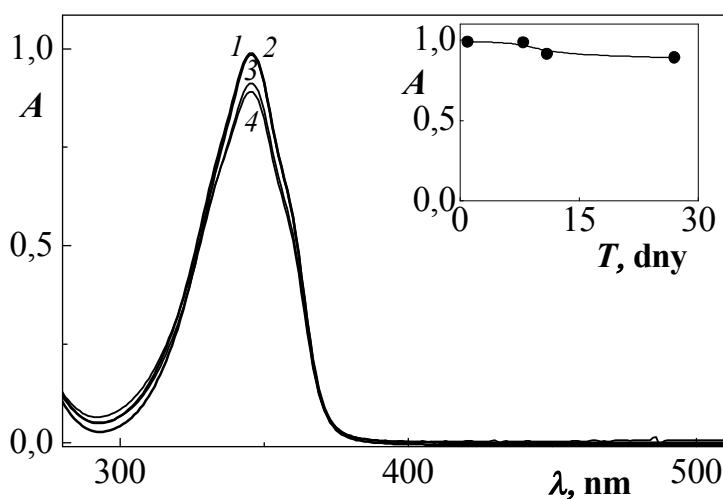
## 2.4 Stálost zásobních roztoků

Stálost zásobního roztoku studované látky v methanolu o koncentraci  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 10 mm. Jelikož hodnota absorbance zásobního roztoku byla vyšší než 1,5, byla stálost zásobního roztoku 6-T sledována po zředění. K tomuto účelu byl každý den měření stálosti zásobní roztok naředěný methanolem 2 krát na výslednou koncentraci  $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Referentní kyveta byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce, kde měla studovaná látka absorpční maximum ( $\lambda = 346 \text{ nm}$ ). Výsledky sledování stálosti zásobních roztoků jsou uvedeny v tabulce 2.1.

Absorbance 6-T byla po 11 dnech o něco nižší než absorbance čerstvého roztoku a v průběhu dní mírně klesla. Z výsledků vyplývá, že zásobní roztok 6-T v methanolu byl při uchování ve tmě a za laboratorních podmínek stálý po dobu nejméně 8 dní. Absorpční spektrum 6-T je na obrázku 2.2.

Tab. 2.1 *Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku 6-T ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v methanolu. Hodnoty relativní změny absorbance jsou vztaženy k nultému dni, kdy byl zásobní roztok připraven.*

DNY	0	8	11	27
A (346 nm)	0,9882	0,9853	0,9117	0,8910
SIGNÁL (%)	100,0	99,7	92,3	90,2



Obr. 2.2 *Absorpční spektrum roztoku 6-T ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 10 mm. Křivky – 1 čerstvý roztok, 2 – roztok po 8 dnech 3 – roztok po 11 dnech, 4 – roztok po 27 dnech. Vložená závislost absorbance při vlnové délce 346 nm na čase.*

### 3 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 6-THIOGIUANINU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

#### 3.1 DC Voltametrie

Vzhledem k tomu, že 6-T byl rozpuštěn v methanolu, byl sledován vliv obsahu methanolu na výšku signálu a na opakovatelnost měření v prostředí BR pufru o pH 7. Z obrázku 3.1 je zřejmé, že optimální bylo prostředí 60% methanolu, protože zde byl získán nejvyšší signál a nejužší interval spolehlivosti.

Vliv pH na chování 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) při DCV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufr-methanol (4:6). BR pufr byl připraven o příslušném pH v rozmezí 2,0 – 12,0, v tabulce 3.1 jsou uvedeny hodnoty pH směsného vodně-methanolickeho roztoku ( $\text{pH}^f$ ) po přidání methanolu k pufru o příslušném pH. Látka poskytuje v oblasti  $\text{pH}^f$  3,0 – 11,9 jednu vlnu, při  $\text{pH}^f$  4,2 a 5,0 se objevují vlny dvě. Vlny mohou odpovídat oxidaci 6-T na 8-oxo-thioguanin, nebo oxidaci 6-T v místech thiacetamidu a kruhu purinu.<sup>23, 47</sup>. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obr. 3.2. Potenciál všech vln s rostoucím pH klesá.

Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvolného potenciálu  $E_{1/2}$  na  $\text{pH}^f$  v roztoku v rozmezí  $\text{pH}^f$  3,0 – 11,9 vypočten vztah:

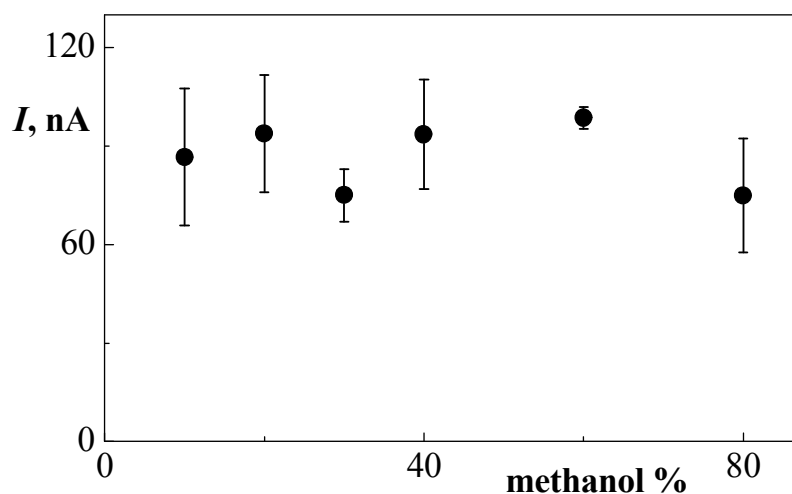
$$E_{1/2} \text{ (mV)} = -58,7 \text{ pH}^f + 1214,0 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9829).$$

Zjištěné hodnoty půlvolného potenciálu  $E_{1/2}$  a proudu vlny  $I_v$  v závislosti na  $\text{pH}^f$  roztoku jsou uvedeny v tab. 3.1. Graficky je závislost  $E_{1/2}$  a  $I_v$  na  $\text{pH}^f$  znázorněn na obr. 3.3. Ze závislosti  $I_v$  na  $\text{pH}^f$  je vidět, že závislost proudu vlny klesá s rostoucím  $\text{pH}^f$  a nejvyšší signál je v oblasti  $\text{pH}^f$  3,0. Proto vedle BR pufru byl testován PB a roztoky běžných kyselin s cílem nalézt optimální prostředí pro stanovení.

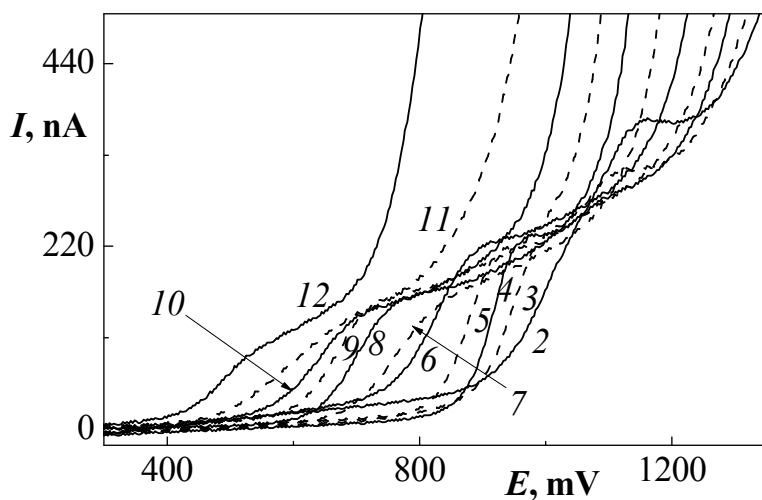
Vliv různých základních elektrolytů v prostředí 60% methanolu na voltametrické chování 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) při DCV na BDDFE je shrnut v tabulce 3.2 s hodnotami půlvolného potenciálu  $E_{1/2}$  a proudu vlny  $I_v$ . Příslušné voltamogramy 6-T pro jednotlivá kyselá prostředí jsou znázorněny na obrázku 3.4.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí 60% methanolu a PB o pH 2. V tomto prostředí látka poskytovala nejlépe vyhodnotitelnou vlnu a signál byl v tomto prostředí stálejší než v prostředí v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ , kde byl naměřen vyšší signál.

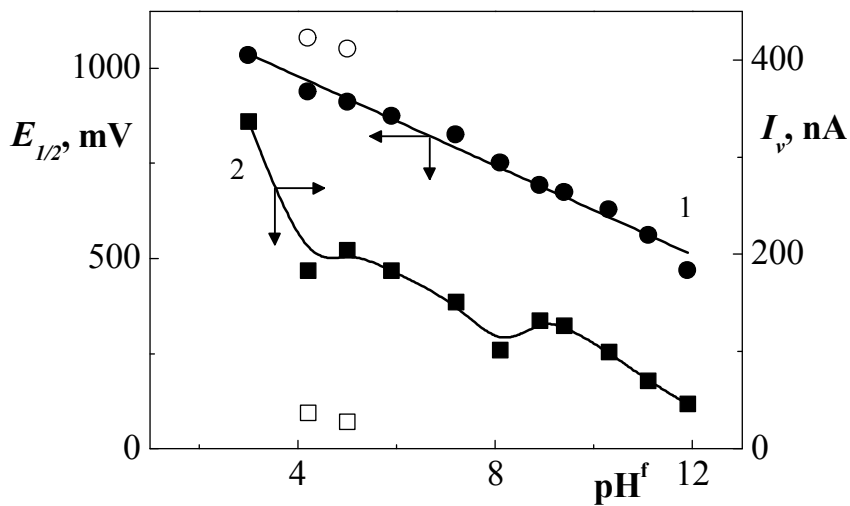
Opakovaným měřením roztoku 6-T ( $c = 1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ve zvoleném prostředí 60% methanolu a PB o pH 2 byla zjištěna stabilita signálu elektrody s  $\text{RSD} = 4,2 \%$ .



Obr. 3.1 Závislost proudu 6-T ( $c = 1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na obsahu methanolu v prostředí BR-pufri o pH 7, měřeno technikou DCV na BDDFE.



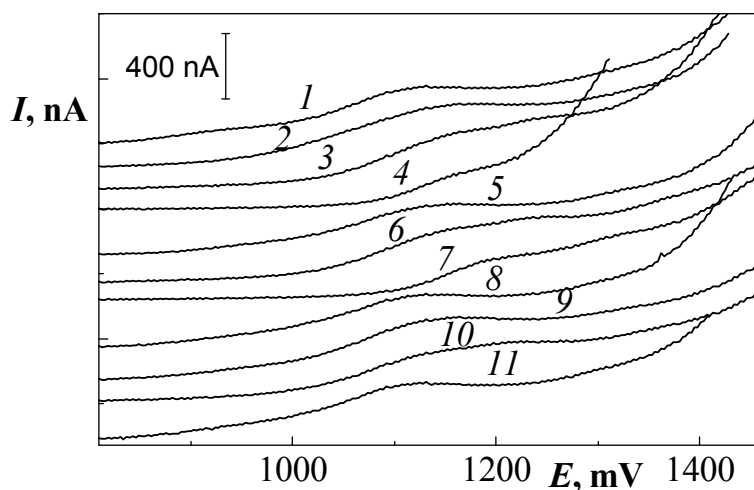
Obr. 3.2 Voltamogramy 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a BR pufru o pH 2 – 12 (hodnoty pH BR pufru odpovídají číslům křivek v grafu).



Obr. 3.3 Závislost půlvolného potenciálu (1 – ●, ○) a proudu vlny (2 – ■, □) 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na  $\text{pH}^f$  roztoku, měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru a 60% methanolu. ●, ■ – první vlna, ○, □ – druhá vlna.

Tab. 3.1 Hodnoty  $E_{1/2}$  a  $I_v$  při pH (2 – 12) a  $pH^f$ , 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru a 60% methanolu.

pH	$pH^f$	$E_{1/2}^1$ mV	$I_v^1$ nA	$E_{1/2}^2$ mV	$I_v^2$ nA
2,0	3,0	1034	336,7	–	–
3,0	4,2	938	183,2	1080	37,19
4,0	5,0	911	204,7	1051	27,53
5,0	5,9	875	183,2	–	–
6,0	7,2	826	151,1	–	–
7,0	8,1	752	101,9	–	–
8,0	8,9	693	132,0	–	–
9,0	9,4	675	126,9	–	–
10,0	10,3	629	99,64	–	–
11,0	11,1	562	69,79	–	–
12,0	11,9	469	46,16	–	–



Obr. 3.4 Voltamogramy 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu: a BR pufru o pH 2 (1),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (2),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (3),  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (4),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (5),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (6),  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (7),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (8),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (9),  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (10) a PB o pH 2 (11).

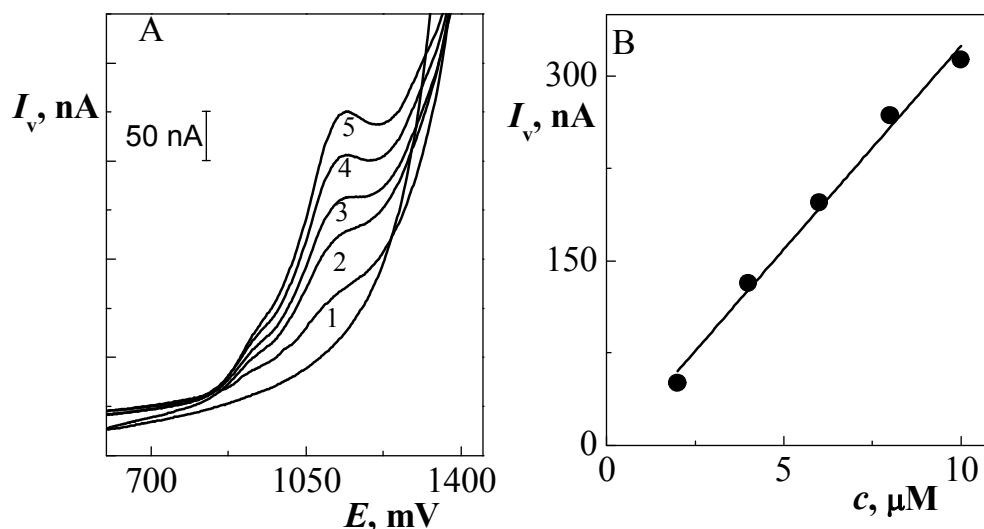
Tab. 3.2 Hodnoty  $E_{1/2}$  a  $I_v$  6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), měřeno DCV v prostředí 60% methanolu a dané kyseliny či pufru.

Kyselina / pufr	$E_{1/2}$ , mV	$I_v$ , nA
BR pufr, pH 2	1027	360,2
0,01 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1056	355,1
0,1 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1097	313,2
1 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1097	81,6
0,01 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1051	316,0
0,1 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1100	354,9
1 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1124	135,6
0,01 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1021	337,3
0,1 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1057	380,7
1 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1090	321,0
PB, pH 2	1027	363,7

Kalibrační závislost pro 6-T byla proměřena metodou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2 a methanolu (4:6) v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Změřené voltamogramy jsou znázorněny na obr. 3.5 (A).

Graf závislosti výšky vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  je na obr. 3.5 (B). Závislost výšky vln na koncentraci je lineární v celém měřeném rozsahu 2 – 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.3.

Kontrola opakovatelnosti výšky vln při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla 0,9  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (RSD = 4,5 %).



Obr. 3.5 Voltamogramy 6-T měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (A) a příslušná závislost proudu vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B).

Tab. 3.3 Parametry kalibrační závislosti 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
2 – 10	-6,01	33,1	0,9917	0,9

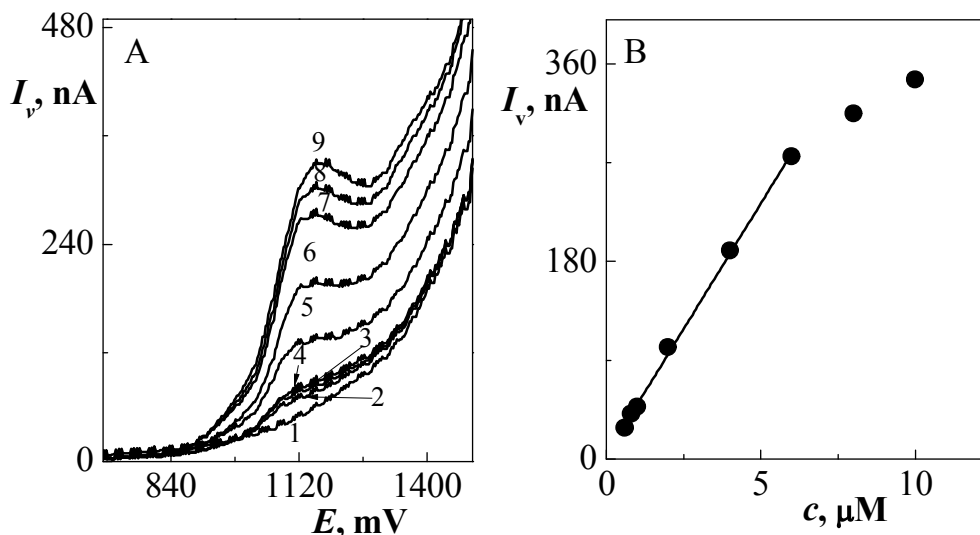
Pro dosažení nižší meze stanovitelnosti byla změřena kalibrační závislost také v prostředí bez methanolu.

Kalibrační závislost 6-T byla proměřena metodou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2,0 v koncentračním rozmezí 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Závislosti proudu vlny na koncentraci jsou znázorněny společně s příslušnými křivkami na obr. 3.6.

Závislost výšky vln na koncentraci je lineární v rozmezí 0,6 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 3.4.

Kontrola opakovatelnosti výšky vln při použití režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla 0,6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (RSD = 9,2 %).

Bylo dosaženo pouze nevýrazného snížení meze stanovitelnosti, což mohlo být způsobeno právě nepřítomností methanolu, který snižoval výšku signálu látky. Odchyłka od lineární kalibrační závislosti při koncentraci nad  $6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zřejmě souvisí s omezenou rozpustností analytu v nepřítomnosti methanolu.



Obr. 3.6 Voltamogramy 6-T měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 0,6 (2), 0,8 (3), 1,0 (4), 2,0 (5), 4,0 (6), 6,0 (7), 8,0 (8) a 10 (9)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (A) a závislost proudu vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v rozmezí 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B).

Tab. 3.4 Parametry kalibrační závislosti 6-T v rozmezí 0,6 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
0,6 – 6	4,02	45,8	0,9987	0,6

### 3.2 Diferenční pulzní voltametrie

Pro DPV bylo zvoleno stejně jako při DCV prostředí 60% methanolu. Vliv pH na chování 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) při DPV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufru a methanolu (4:6) o  $\text{pH}^f$  směsi 3,0 až 12,0. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obr. 3.7. Látka poskytuje v oblastech  $\text{pH}^f$  3,0 – 12,0 jeden pík a při  $\text{pH}^f$  4,2 a 5,1 se objevují píky dva, což může odpovídat oxidaci 6-T na látky stejné jako v případě DCV (viz kapitola 3.1). Potenciál a signál píků, které se objevují v celé škále  $\text{pH}^f$ , s rostoucím  $\text{pH}^f$  klesá, viz obr. 3.8.

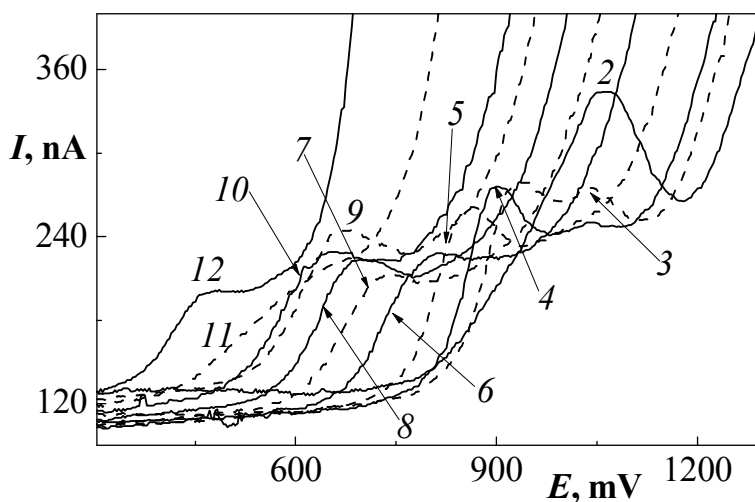
Metodou lineární regrese byl vypočten vztah pro závislost potenciálu píku  $E_p$  na  $\text{pH}^f$  roztoku v rozmezí  $\text{pH}^f$  3,0 – 12,0 pro potenciál prvního píku  $E_p$ :

$$E_p \text{ (mV)} = -57,8 \text{ pH}^f + 1197,4 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9814).$$

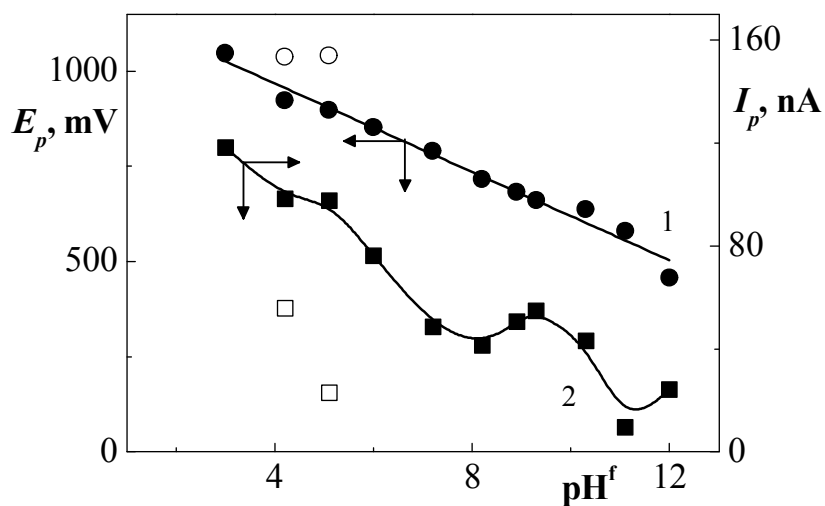
Zjištěné hodnoty potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$  na  $\text{pH}^f$  roztoku jsou uvedeny v tab. 3.5. Graficky je závislost  $E_p$  a  $I_p$  na  $\text{pH}^f$  znázorněna na obrázku 3.8. Ze závislosti  $I_p$  na  $\text{pH}^f$  vyplývá, že výška píku s  $\text{pH}^f$  postupně klesá. Nejvyššího signálu bylo dosaženo při  $\text{pH}^f$  3,0. Proto vedle BR pufru byl testován PB a roztoky běžných kyselin s cílem nalézt optimální prostředí pro stanovení.

Vliv různých základních elektrolytů v prostředí 60% methanolu na 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) při DPV na BDDFE je shrnut v tabulce 3.6 s hodnotami potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$ . Příslušné voltamogramy 6-T pro jednotlivá kyselá prostředí jsou znázorněny na obrázku 3.9.

Opakovaným měřením roztoku 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) ve zvoleném prostředí 60% methanolu a PB o pH 2 byla potvrzena dobrá stabilita signálu elektrody s  $\text{RSD} = 4,8 \%$ .



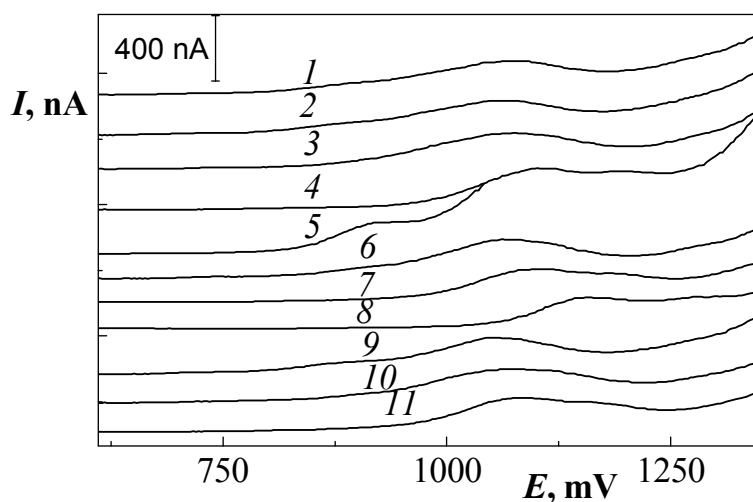
Obr. 3.7 Voltamogramy 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a BR pufru o pH 2 – 12 (hodnoty pH BR pufru odpovídají číslům křivek v grafu).



Obr. 3.8 Závislost potenciálu piku  $E_p$  (1 – ●, ○) a proudu piku  $I_p$  (2 – ■, □) 6-T, ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na  $\text{pH}^f$  roztoku. Měřeno v prostředí methanolu a BR pufru (6:4) metodou DPV na BDDFE. ●, ■ – první pik, ○, □ – druhý pik.

Tab. 3.5 Hodnoty  $E_p$  a  $I_p$  při  $pH$  (2-12) a  $pH^f$ , 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), měřeno DPV v prostředí BR pufru a 60% methanolu.

pH	$pH^f$	$E_p^1$ mV	$I_p^1$ nA	$E_p^2$ mV	$I_p^2$ nA
2,0	3,0	1047	118,3	-	-
3,0	4,2	924	98,4	1038	55,9
4,0	5,1	898	97,7	1041	23,0
5,0	6,0	853	76,3	-	-
6,0	7,2	791	48,5	-	-
7,0	8,2	716	41,4	-	-
8,0	8,9	683	50,5	-	-
9,0	9,3	661	54,8	-	-
10,0	10,3	637	43,1	-	-
11,0	11,1	581	9,5	-	-
12,0	12,0	457	24,2	-	-



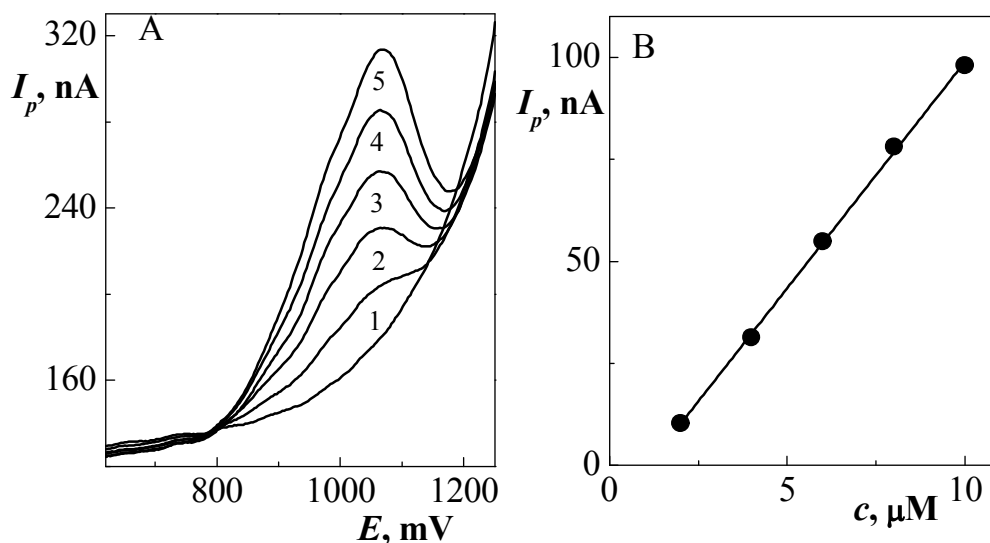
Obr. 3.9 Voltamogramy 6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a: BR pufru o  $pH$  2 (1), fosfátovém pufru o  $pH$  2 (2),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (3),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (4),  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$  (5),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (6),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (7),  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$  (8),  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (9),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (10) a  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$  (11).

Tab. 3.6 Hodnoty  $E_p$  a  $I_p$  6-T ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), měřeno DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a kyseliny či pufru.

Kyselina / pufr	$E_p$ mV	$I_p$ nA
BR pufr, pH 2	1066	100,3
fosfátový pufr, pH 2	1078	126,0
0,01 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1045	102,5
0,1 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1072	123,6
1 mol·l <sup>-1</sup> HCl	1097	121,8
0,01 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1115	47,5
0,1 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1059	142,2
1 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	1089	116,5
0,01 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1150	89,4
0,1 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1048	125,5
1 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1072	121,8

Kalibrační závislost pro 6-T byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2,0 v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Graf závislosti výšky píku  $I_p$  na koncentraci 6-T je na obr. 3.10 společně s příslušnými voltamogramy. Závislost výšky píků na koncentraci byla lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 3.7.

Kontrola stability výšky píků při použitém režimu byla provedena opakovaným měřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla 1,5  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (RSD = 4,8 %).



Obr. 3.10 Voltamogramy 6-T měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (A) a závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B).

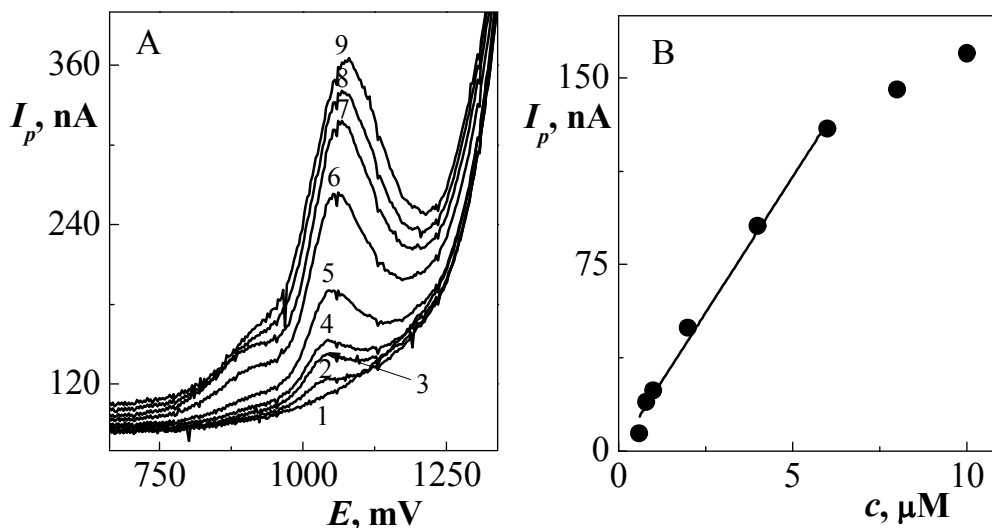
Tab. 3.7 Parametry kalibrační závislosti 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
2 – 10	-12,1	11,1	0,9992	1,5

Pro dosažení nižší meze stanovitelnosti byla kalibrační závislost 6-T změřena v prostředí bez methanolu.

Kalibrační závislost pro 6-T byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí PB o pH 2,0 v koncentračním rozmezí 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf závislosti výšky píku  $I_p$  na koncentraci 6-T je na obr. 3.11 společně s jeho voltamogramy. Závislost výšky píku na koncentraci byla lineární v rozmezí 0,6 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 3.8.

Kontrola opakovatelnosti výšky píku při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla  $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (RSD = 10,5 %). Nevýrazné zvýšení citlivosti i pozorovaná odchylka kalibrační závislosti od přímky při vyšších koncentracích analytu lze vysvětlit stejně jako v případě DCV.



Obr. 3.11 Voltamogramy 6-T měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí PB o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 0,6 (2), 0,8 (3), 1,0 (4), 2,0 (5), 4,0 (6), 6,0 (7), 8,0 (8) a 10,0 (9)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (A) a závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci 6-T v rozmezí 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B).

Tab. 3.8 Parametry kalibrační závislosti 6-T v rozmezí 0,6 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí fosfátového pufru o pH 2.

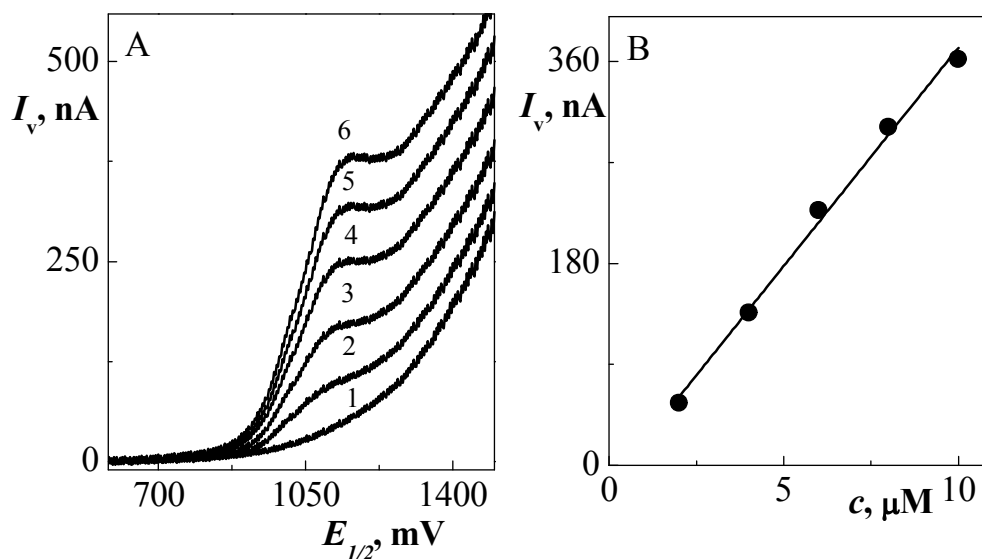
Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
0,6 – 6	0,803	21,9	0,9923	0,6

### 3.3 Stanovení 6-Thioguaninu v pitné a říční vodě pomocí DC voltametrie

Metodami DCV a DPV byla získána podobná mez stanovitelnosti. Pro měření 6-T v reálných vzorcích byla dále používána metoda DCV, u které byl obecně signál v okraji potenciálového okna lépe vyhodnotitelný.

Kalibrační závislost pro 6-T v pitné vodě byla proměřena metodou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2,0 v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Graf závislosti výšky vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  je na obr. 3.12 společně s příslušnými voltamogramy. Závislost výšky vln na koncentraci je lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.9.

Kontrola opakovatelnosti výšky vln při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 2 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti v pitné vodě byla 1,3  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  (RSD = 4,5 %).



Obr. 3.12 Voltamogramy 6-T v pitné vodě měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí fosfátového pufru o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  (6) v pitné vodě (A) a závislost proudu vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v pitné vodě v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  (B).

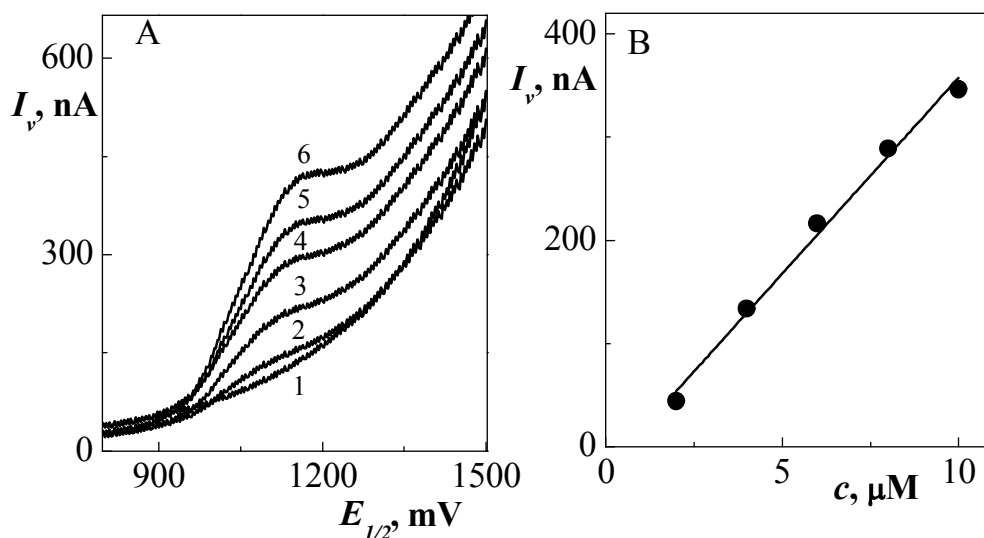
Tab. 3.9 Parametry kalibrační závislosti 6-T v pitné vodě v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí fosfátového pufru o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}\Gamma^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$
2 – 10	-16,9	38,9	0,9950	1,3

Kalibrační závislosti pro 6-T v říční vodě byly proměřeny metodou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2,0 v koncentračním rozmezí 6-T v říční vodě 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Graf závislosti výšky vlny  $I_v$  na koncentraci 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  je na obr. 3.13 společně s příslušnými voltamogramy. Závislost výšky vln na koncentraci je lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.10.

Kontrola opakovatelnosti výšky vln při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ( $c = 2 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla v říční vodě 1,3  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  (RSD = 5,0 %).

Z výsledků je patrné, že lineární dynamický rozsah je při měření v maticích pitné a říční vody vyšší, než byl v samotném PB. To by mohlo souviset se sníženým obsahem základního elektrolytu v měřeném roztoku.



Obr. 3.13 Voltamogramy 6-T v říční vodě měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí fosfátového pufru o pH 2.  $c$  (6-T): 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (6) v říční vodě (A) a závislost proudu vlny  $I$  na koncentraci v říční vodě 6-T v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B)

Tab. 3.10 Parametry kalibrační závislosti 6-T v říční vodě v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí fosfátového pufru o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
2 – 10	-22,1	38,0	0,9930	1,3

### 3.4 Stanovení 6-Thioguaninu v moči a extrakce tuhou fází

Bylo testováno přímé DCV měření v prostředí lidské moči, ale pozadí na BDDFE bylo v oblasti potenciálů přes 800 mV příliš vysoké pro stanovení 6-T. Proto byl modelový vzorek 6-T v moči 20 krát zředěn PB o pH 2 a byl přímo změřen technikou DCV na BDDFE. I v tomto případě při voltametrické interferovala matrice moči tak, že nebylo možné vyhodnotit signál 6-T, proto bylo testováno zjednodušení matrice moči pomocí extrakce tuhou fází. Pro optimalizaci byl použit vzorek lidské moči, do kterého byl přidán zásobní roztok 6-T v PB tak, aby vzorek moči obsahoval  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  6-T.

Podle výrobce kolonek<sup>48</sup> jsou pro extrakci 6-T vhodné kolonky Lichrolut RP-18, CN, NH<sub>2</sub> a EN naplněné 200 mg sorbentu. Extrakce 6-T z 10 ml destilované vody byla úspěšná pouze na kolonce Lichrolut EN s výtěžkem 72,2 %, při eluci 6 ml methanolu. U ostatních kolonek byl získán nulový výtěžek. Dále byla snaha optimalizovat extrakci 6-T z destilované vody o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  na kolonce Lichrolut EN.

Jelikož při eluci 6 ml methanolu byl výtěžek extrakce nižší než 100 %, byl optimalizován objem methanolu pro eluci 6-T. S rostoucím objemem methanolu roste i výtěžek extrakce, a při 9 ml dosáhl přibližně 100 %, viz obr. 3.14. Tento eluční objem byl použit pro další měření.

Dále byla kontrolována schopnost kolonky udržet 6-T po nanesení většího objemu vzorku v destilované vodě. Na kolonky byly dávkovány různé objemy vzorku destilované vody (10 – 100 ml) vždy s koncentrací  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  6-T, které byly následně eluovány methanolem. Výtěžek extrakce klesal s rostoucím objemem, viz obr. 3.15. To znamená, že v průběhu nanášení vzorku ve větším objemu se na kolonce neudrželo celé množství 6-T. Maximální objem, který lze na kolonku nanášet bez ztráty 6-T bylo 10 ml.

Zjištěné optimální podmínky byly aplikovány na extrakci 6-T z modelového vzorku moči. Extrakce byla provedena kolonkou Lichrolut EN bez jakékoliv úpravy vzorku moči. Matrice moči i po SPE interferovala při DCV, a proto nebylo možno 6-T v moči stanovit.

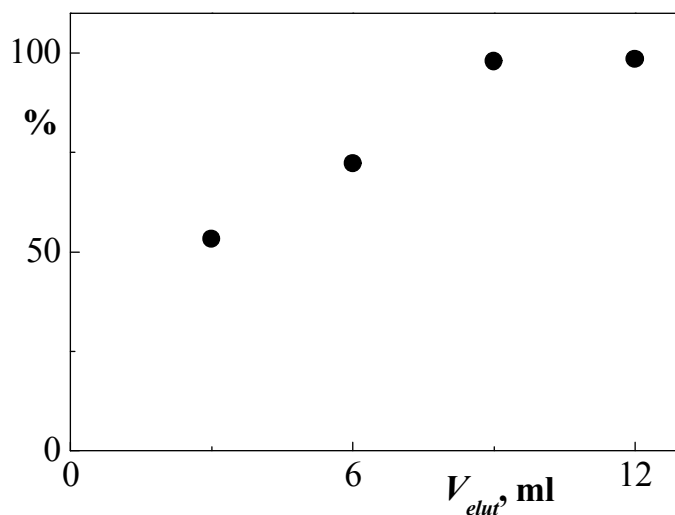
Pro odstranění interferujících látek z moči byla kolonka po nanesení vzorku pročištěna promytím 20% methanolem anebo acetonitrilem.<sup>49</sup> Čištění kolonky bylo nejdříve vyzkoušeno na extrakci 6-T z destilované vody, aby byl zjištěn vliv čištění na

výtěžek extrakce. Po čištění kolonky 20% methanolem klesl výtěžek extrakce z 97,9 % na 76,1 % a u acetonitrilu na 50,0 %.

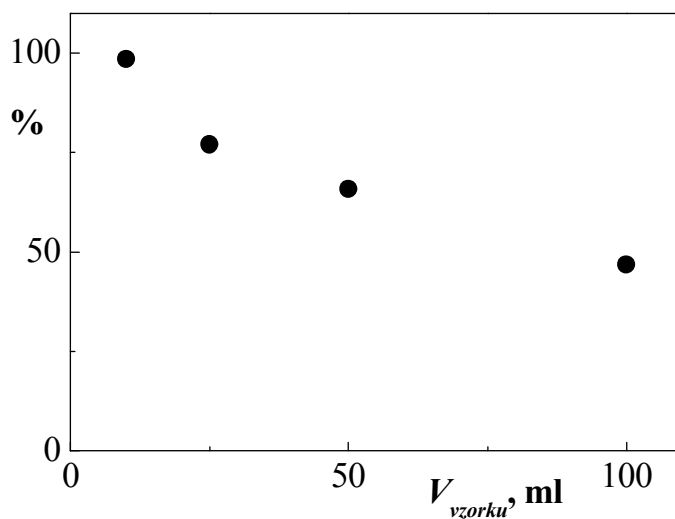
Po aplikaci čištění na modelový vzorek 6-T v moči byl vzorek po propláchnutí kolonky acetonitrilem a eluci methanolem odbarvený, na rozdíl od čištění 20% methanolem, kdy eluent zůstal zažloutlý. Ani jedna z možností čištění kolonky neodstranila matici moči dostatečně, aby bylo možno vyhodnotit signál 6-T při DCV na BDDFE.

Dále bylo vyzkoušeno odstranit interferující matrice z moči filtrací modelového vzorku před extrakcí.<sup>50</sup> Modelový vzorek moči byl před nanesením na kolonku filtrován přes fritu S4 a poté nanesen na kolonku, kde byl dále pročištěn acetonitrilem, který se zdál být účinnější než 20% methanol. Signál při DCV na BDDFE byl stále nevyhodnotitelný.

Selektivita námi navržené metody nebyla dostatečná, aby bylo možné ji použít pro stanovení 6-T v lidské moči i při použití jednoduchých separačních postupů. Pro využití elektrochemické detekce s pomocí BDDFE by bylo nutné použít např. HPLC, aby se oddělil signál analytu a interferujících složek moči.



Obr. 3.14 Závislost výtěžku SPE 6-T o  $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  na kolonce Lichrolut EN z destilované vody na objemu methanolu použitého k eluci 6-T, měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.



Obr. 3.15 Závislost výtěžku SPE 6-T o  $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  na kolonce Lichrolut EN z destilované vody na objemu 6-T v destilované vodě nanášeného na kolonku, měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.

## 4 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA

### 4.1 Optimalizace

Pro stanovení 6-T v průtoku bylo použito optimální prostředí z předchozích voltametrických měření. Byl použit methanol a PB o pH 2,0 (6:4) jako nosný roztok. U všech měření byl elektrochemickému detektoru představen UV detektor pro porovnání s nastavenou  $\lambda = 344$  nm (viz obr. 4.1), kde má 6-T v prostředí methanolu a PB o pH 2 (6:4) absorpční maximum. Optimalizace metody byla provedena se vzorkem 6-T o koncentraci  $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

U FIA (polarizační potenciál 1000 mV, dávkování vzorku 0,1 ml, průtok  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) byla nejprve použita BDDFE po aktivaci, jako byla při voltametrických měřeních, cyklickou voltametrií v 1M HNO<sub>3</sub> a 1M KCl ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od -2500 do +2500 mV a rychlosti nárůstu potenciálu  $400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Po této aktivaci nebyly získány vyhovující výsledky z FIA, protože signál během 12 nástřiků klesl na 71 % své původní výšky. Proto byla pracovní elektroda opět aktivována voltametricky v 1M HNO<sub>3</sub> jedním potenciálovým skokem mezi +2500 mV a -2500 mV po dobu 30 s na obou potenciálech, ale signál opět během 12 měření klesal, a to na 56 % své původní výšky.

Při stejném nastavení FIA byla dále zkoušena aktivace přímo v průtoku nosného roztoku. BDDFE byla aktivována potenciálovým skokem mezi +2000 mV a -2000 mV po dobu 30 s na obou potenciálech. Signál stále klesal. Z výsledků je patrné, že nebylo možné elektrodu aktivovat tak, aby nedocházelo při opakovaných měřeních k poklesu signálu, proto byla do měřicího programu zařazena aktivace před každým měřením. Byla vyzkoušena aktivace v průtoku vložení na potenciálu +2000 mV po dobu 30 s a porovnána s aktivací pouze po dobu 10 s na +2000 mV. U obou aktivací signál z počátku stoupal a pak se ustálil, rozdíl mezi aktivací po dobu 10 s a 30 s byl nepatrný. Pro dosažení rychlejšího ustálení výšky signálu byl proto vložen před prvním měřením potenciál +2000 mV na dobu 2 minut a následně se aktivace prováděla jen po dobu 10 s na potenciálu +2000 mV před každým měřením. Při dodržování tohoto postupu bylo dosaženo opakovatelných měření, tudíž bylo možné vzorek dávkovat s frekvencí jedné

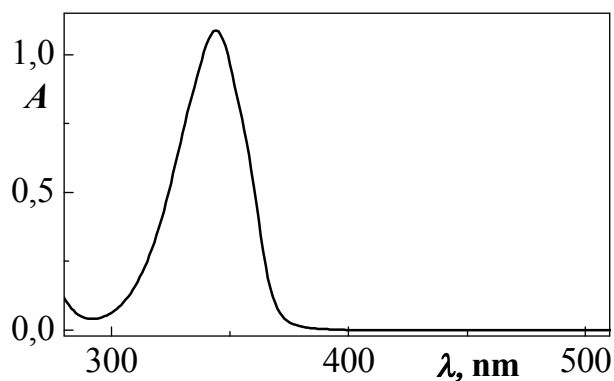
minuty. Ukázky jednotlivých aktivací jsou znázorněny na obrázku 4.2.

Po optimalizaci aktivace byl nejprve sledován vliv polarizačního potenciálu na odezvu elektrochemického detektoru při objemu dávkovací smyčky 100  $\mu\text{l}$  a rychlosti průtoku nosného roztoku 2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Byl proměřen rozsah 800 až 1600 mV. Jako optimální byl zde zvolen polarizační potenciál  $E_{\text{pol}} = 1300$  mV, jelikož při tomto potenciálu byl poskytován vysoký pík s nízkým pozadím měření. Při vyšších potenciálech vlivem rostoucího pozadí začala stoupat relativní směrodatná odchylka měření. Hydrodynamický voltamogram je znázorněn na obr. 4.3.

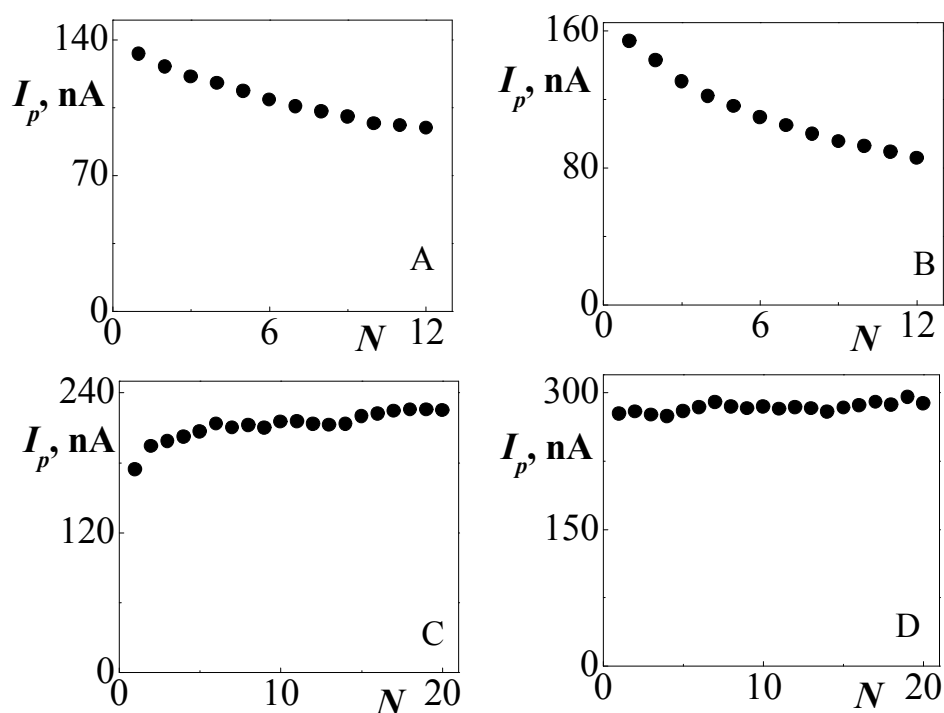
Následně byl sledován vliv průtokové rychlosti  $Q$  na odezvu elektrochemického detektoru a UV detektoru. Byly testovány průtokové rychlosti v rozsahu 0,5 až 7  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Závislost je zobrazena na obr. 4.4. Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost  $Q = 5$   $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  z důvodu nejvyššího píku, při kterém ještě nezačal vzrůstat interval spolehlivosti opakovaných měření.

Dále byl sledován vliv dávkovaného objemu na odezvu elektrochemického detektoru a UV detektoru. Byly testovány objemy 10, 50, 100, 200, 300 a 400  $\mu\text{l}$ . Závislost je zobrazena na obr. 4.5. Jako optimální byla zvolena dávkovací smyčka o objemu  $V = 50$   $\mu\text{l}$ , a to s ohledem na velikost píku a spotřebu vzorku.

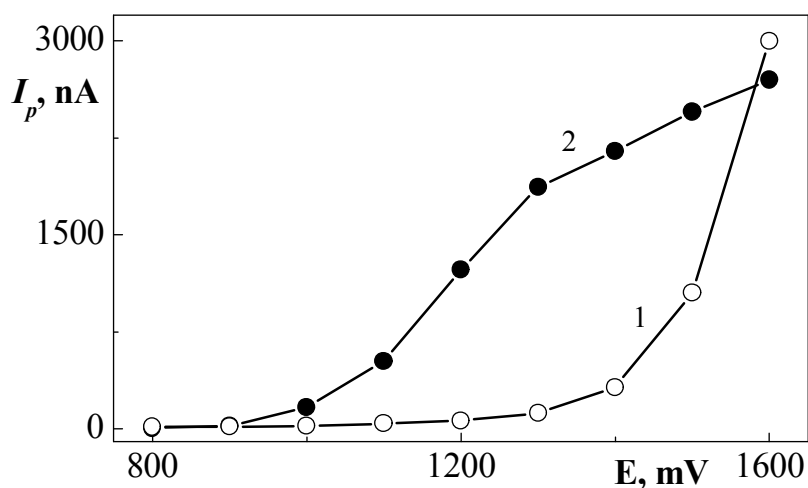
Při zvolených optimálních podmínkách ( $E_{\text{pol}} = 1300$  mV,  $Q = 5$   $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $V = 50$   $\mu\text{l}$ ) byla sledována opakovatelnost signálu elektrochemického detektoru při použití koncentrace 6-T  $6\cdot 10^{-5}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo nadávkováno 20 nástřiků v co nejkratší možné době (RSD = 1,0 %). Nízkou RSD bylo potvrzeno, že aktivace v průtoku na potenciálu +2000 mV po dobu 10 s po každém měření za optimálních podmínek je dostatečná. Příslušný záznam je na obr. 4.6.



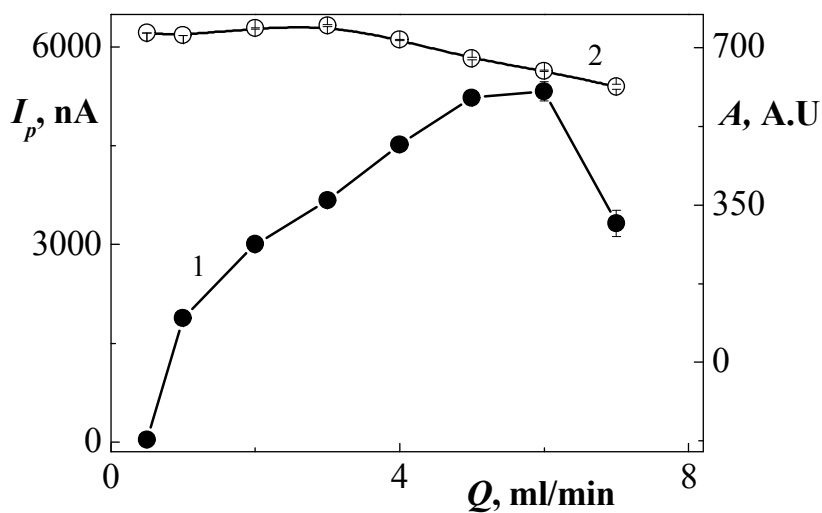
Obr. 4.1 Absorpční spektrum roztoku 6-T ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v 60% methanolu a PB o pH 2. Měřeno proti 60% methanolu a PB o pH 2 v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 10 mm.



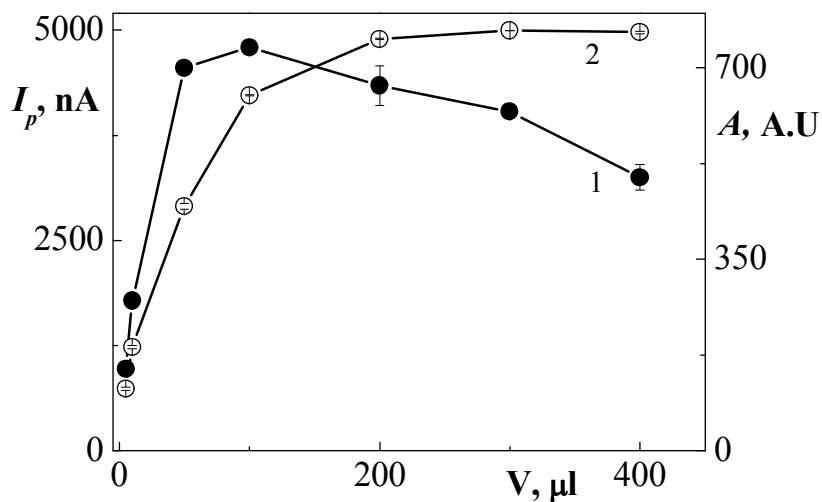
Obr. 4.2 Vývoj signálu 6-T ( $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při opakovaných ampérometrických měřeních v závislosti na aktivaci BDDFE: CV (A),  $\pm 2,5 \text{ V}$  (B), v průtoku 10 s na 2 V po každém měření (C), v průtoku s první aktivací 2 min na potenciálu 2 V, poté pouze 10 s na 2V po každém měření (D). Měřeno technikou FIA při  $E_{\text{pol}} = 1000 \text{ mV}$ , průtoku  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a dávkování  $0,1 \text{ ml}$  vzorku.



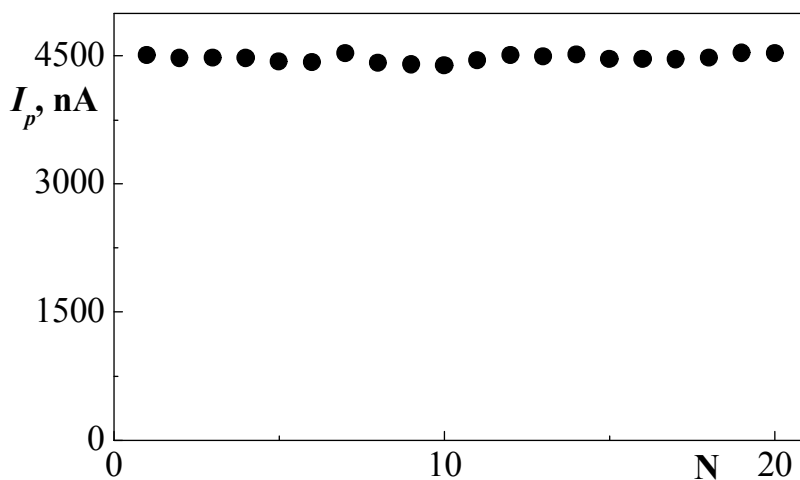
Obr. 4.3 Závislost signálu 6-T ( $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) z elektrochemického detektoru na polarizačním potenciálu  $E_{pol}$  (2), měřeno technikou FIA v prostředí methanolu a PB o pH 2,0 (6:4), objem smyčky  $V = 100 \mu\text{l}$ , průtoková rychlost  $Q = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Křivka (1) znázorňuje pozadí detektoru.



Obr. 4.4 Závislost signálu 6-T ( $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) z elektrochemického detektoru (1) při  $E_{pol} = 1300 \text{ mV}$  a UV detektoru (2) při  $\lambda = 344 \text{ nm}$  na průtokové rychlosti  $Q$ , měřeno technikou FIA v prostředí methanolu a PB o pH 2,0 (6:4), dávkováno  $100 \mu\text{l}$  vzorku.



Obr. 4.5 Závislost signálu 6-T ( $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) z elektrochemického detektoru (1) při  $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$  a UV detektoru (2) při  $\lambda = 344 \text{ nm}$  na nadávkovaném objemu  $V$ , měřeno technikou FIA v prostředí methanolu a PB o pH 2,0 (6:4), při  $Q = 5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

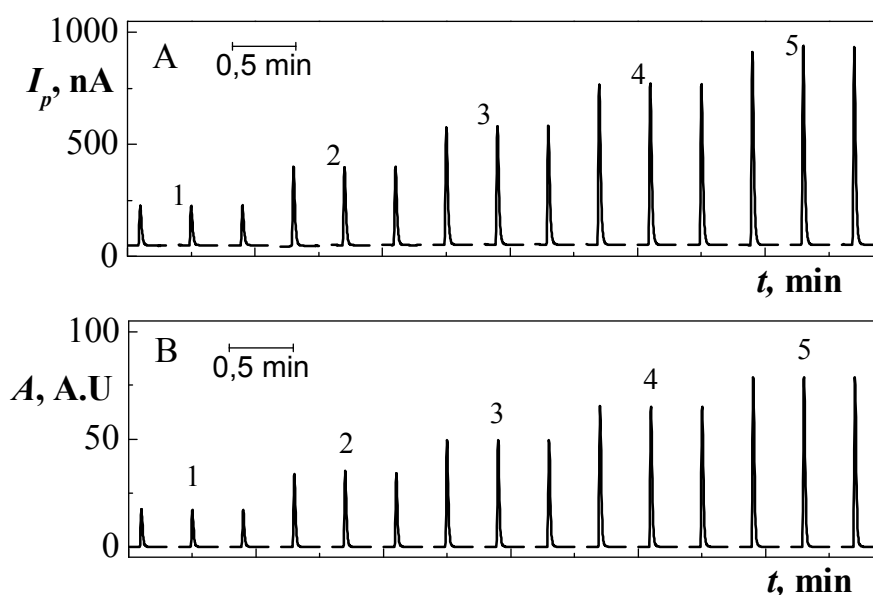


Obr. 4.6 Závislost proudu píku  $I_p$  6-T ( $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na počtu měření  $N$ . Měřeno technikou FIA při stanovených optimálních podmínkách ( $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$ ,  $Q = 5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $V = 50 \mu\text{l}$ ) na elektrochemickém detektoru s BDDFE v prostředí methanolu a PB o pH 2 (6:4).

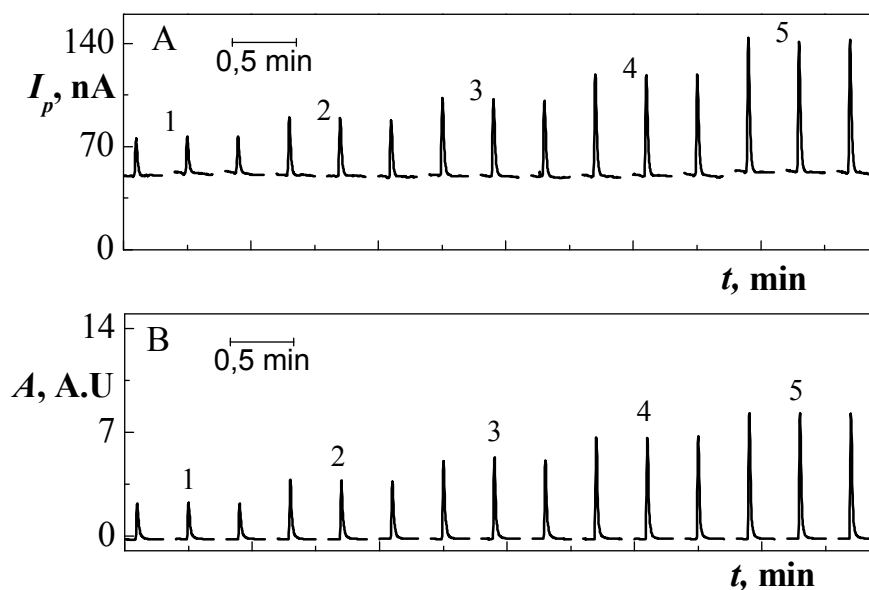
## 4.2 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti v rozmezí 2 – 10 a 0,2 – 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro 6-T byly proměřeny technikou FIA za optimálních podmínek ( $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$ ,  $Q = 5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $V = 50 \mu\text{l}$ ) v prostředí methanolu a PB o pH 2 (6:4). Zaznamenané signály z elektrochemického a UV detektoru jsou uvedeny na obr. 4.7 a 4.8. Příslušné kalibrační závislosti jsou znázorněny na obr. 4.9 a 4.10. Kalibrační závislosti byly lineární v celém rozsahu měřených koncentrací. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 4.1 a 4.2.

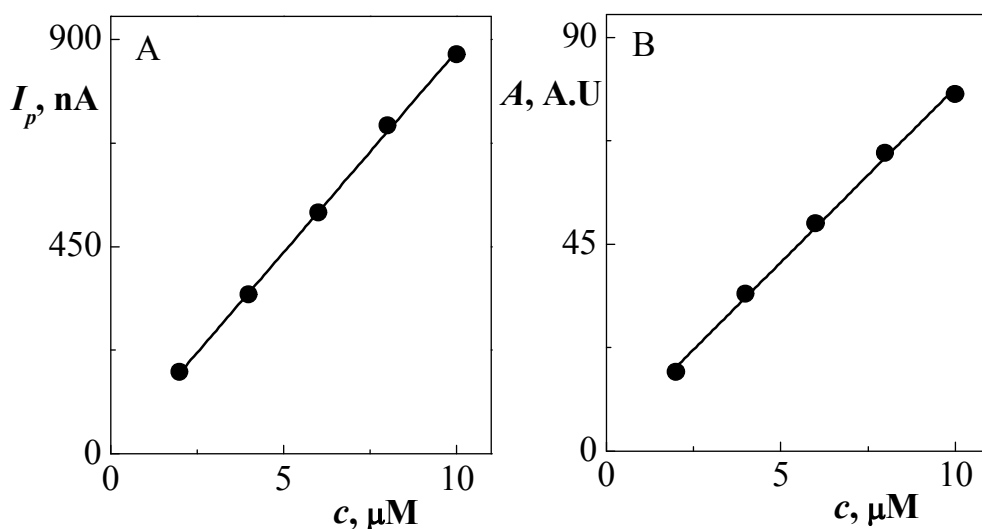
Kontrola opakovatelnosti výšky píku při použitím režimu byla provedena opakovaným změřením 6-T při nejnižší stanovované koncentraci ( $c = 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dosažená mez stanovitelnosti byla pro elektrochemický detektor  $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (RSD = 1,6 %) a pro UV detektor  $0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (RSD = 1,8 %).



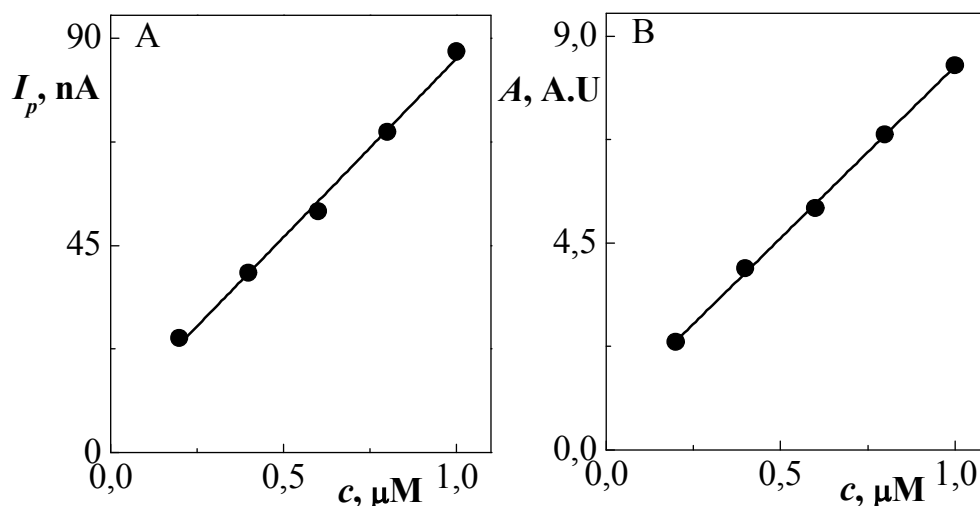
Obr. 4.7 Záznamy FIA z měření kalibrační závislosti 6-T o koncentraci: 2,0 (1), 4,0 (2), 6,0 (3), 8,0 (4), 10 (5)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Elektrochemická detekce (A) na BDDFE při  $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$  a UV detekce (B) při vlnové délce 344 nm. Měřeno v prostředí nosného roztoku (methanol a PB o pH 2 (6:4)) při průtoku  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a dávkování  $50 \mu\text{l}$  vzorku.



Obr. 4.8 Záznamy FIA z měření kalibrační závislosti 6-T o koncentraci: 0,2 (1), 0,4 (2), 0,6 (3), 0,8 (4), 1,0 (5)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Elektrochemická detekce (A) na BDDFE při  $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$  a UV detekce (B) při vlnové délce 344 nm. Měřeno v prostředí nosného roztoku (methanol a PB o pH 2 (6:4)) při průtoku  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a dávkování  $50 \mu\text{l}$  vzorku.



Obr. 4.9 Kalibrační závislosti 6-T v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou FIA s elektrochemickou detekcí (A) na BDDFE při  $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$  a UV detekcí (B) při vlnové délce 344 nm. Měřeno v prostředí nosného roztoku (methanol a PB o pH 2 (6:4)) při průtoku  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a dávkování  $50 \mu\text{l}$  vzorku.



Obr. 4.10 Kalibrační závislosti 6-T v koncentračním rozmezí 0,2 – 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou FIA s elektrochemickou detekcí (A) na BDDFE při  $E_{\text{pol}} = 1300 \text{ mV}$  a UV detekcí (B) při vlnové délce 344 nm. Měřeno v prostředí mobilní fáze (methanol a PB o pH 2 (6:4)) při průtoku  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a dávkování  $50 \mu\text{l}$  vzorku.

Tab. 4.1 Parametry kalibračních závislostí 6-T v koncentračním rozmezí 2 – 10 a 0,2 – 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou FIA s elektrochemickou detekcí v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
2 – 10	1,48	87,3	0,9992	–
0,2 – 1,0	8,04	77,6	0,9963	0,05

Tab. 4.2 *Parametry kalibračních závislostí 6-T v koncentračním rozmezí 2 – 10 a 0,2 – 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Měřeno technikou FIA s UV detekcí v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2.*

Koncentrace, $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$	Úsek, A·U	Směrnice, A·U· $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$	Korelační koeficient	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$
2 – 10	3,10	7,59	0,9977	–
0,2 – 1,0	0,865	7,48	0,9992	0,06

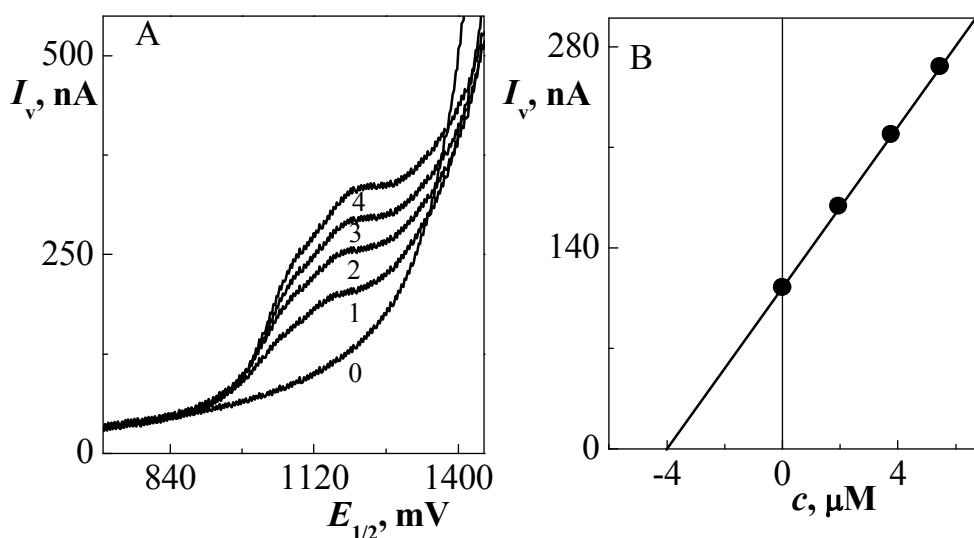
## 5 STANOVENÍ 6-THIOGUANINU V TABLETĚ LANVIS

### 5.1 DC voltametrie

6-T byl stanoven pomocí DCV v tabletě Lanvisu, která má deklarovaný obsah 40 mg 6-T. Tableta byla rozpuštěna v methanolu za pomoci ultrazvukové lázně tak, aby vzniklý roztok měl koncentraci cca  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$  6-T (viz kapitola 2.3.1)

Obsah 6-T v tabletě byl stanoven metodou standardního přídatku a měřen pomocí DCV v prostředí 60% methanolu a PB o pH 2 (podle již popsaných podmínek pro 6-T, viz kapitola 3.1). K 0,4 ml roztoku vzorku bylo přidáno 5,6 ml methanolu a PB o pH 2 na celkový objem 10 ml, byla zaznamenána křivka a následně byly provedeny tři přídatky standardu 6-T v methanolu ( $200 \text{ } \mu\text{l}$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ), které odpovídaly nárůstu koncentrace vždy o  $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$ . Dosazením do rovnice vzniklé lineární závislosti byla vypočtena koncentrace 6-T v tabletě.

Výtěžek stanovení byl  $101,3 \pm 1,0 \%$ . Graficky je metoda standardního přídatku zobrazena na obrázku 5.1 a parametry křivky jsou uvedeny v tabulce 5.1.



Obr. 5.1 Stanovení 6-T metodou standardního přídatku, v koncentračním rozmezí standardních přídatků  $0 - 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2 a 60% methanolu. Základní elektrolyt (0), vzorek tablety (1), první (2), druhý (3) a třetí (4) standardní přídatek.

Tab. 5.1 *Parametry metody standardního přídavku 6-T v rozmezí 2 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí PB o pH 2 a 60% methanolu.*

Úsek, nA	Směrnice, $\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	$c_{\text{vz}}, \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$		Výtěžek (%)
			Očekávaná	Stanovená	
113,2	28,2	0,9998	4,0	4,1	$101,3 \pm 1,0$

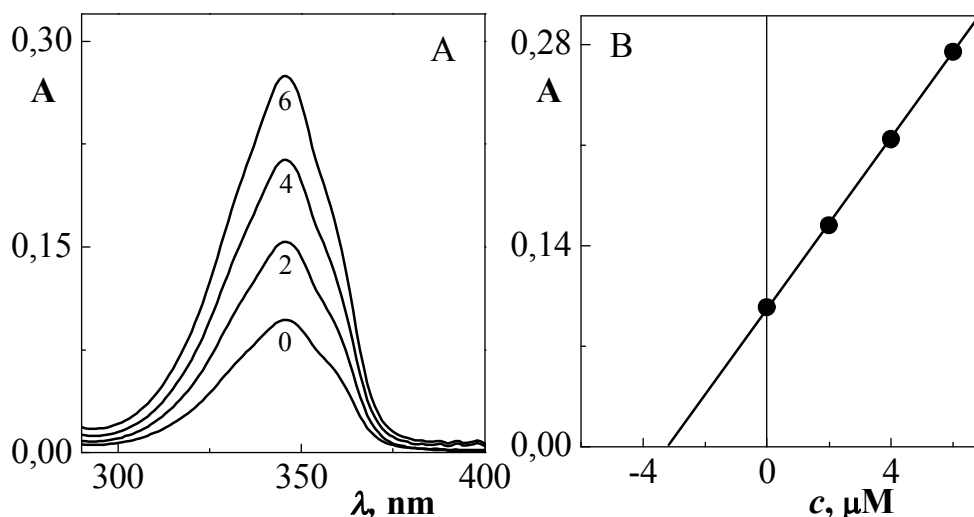
## 5.2 Průtoková injekční analýza

Stanovení 6-T v tabletě Lanvis bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Příprava vzorku probíhala stejně, jako v případě stanovení spektrometrického (viz kapitola 2.3.3). Byl proměřen vzorek tablety o očekávané koncentraci  $4,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a získaný signál byl dosazen do rovnice regrese z kalibračních křivek v rozsahu  $2 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  z elektrochemického a UV detektoru viz tabulky 4.1 a 4.2. Výtěžek byl pro elektrochemický detektor  $95,2 \pm 0,4 \%$  a  $96,7 \pm 0,8 \%$  pro UV detektor.

## 5.3 UV spektrometrie

Stanovení 6-T bylo provedeno pro srovnání spektrometricky metodami kalibrační křivky a standardního přídavku při vlnové délce 345 nm. Pro spektrometrické stanovení byl roztok vzorku připraven dle postupu v kapitole 2.3.3. Jako slepý vzorek byl použit methanol.

Výtěžek stanovení metody standardního přídavku a kalibrační křivky byl přes 80 % pro obě metody. Absorpční spektrum 6-T standardního přídavku je na obrázku 5.2, parametry závislostí jsou v tabulkách 5.2 a 5.3. Nižší výtěžek spektrometrického stanovení může souviset s interferujícími částicemi, které zůstaly v roztoku i po centrifugaci vzorku.



Obr. 5.2 *Spektrofotometrické stanovení 6-T metodou standardního přidavku, v koncentračním rozmezí standardního přidavku 0 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 10 mm. Čísla křivek odpovídají koncentraci přidavku standardního přidavku v měřeném vzorku. (A) Závislost absorbance při vlnové délce 345 nm na koncentraci standardního přidavku 6-T v rozmezí 0 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (metoda standardního přidavku). (B)*

Tab. 5.2 *Parametry metody standardního přidavku 6-T v rozmezí 2 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno UV-VIS spektrometrií proti methanolu.*

Úsek	Směrnice, $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	$c_{\text{vz}}, \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$		Výtěžek, %
			Očekávaná	Vypočtená	
0,0975	0,0286	0,9988	4,0	3,4	$85,4 \pm 3,2$

Tab. 5.3 *Parametry kalibrační křivky 6-T v rozmezí 2 – 6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřeno UV-VIS spektrometrií proti methanolu.*

Úsek	Směrnice, $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	Korelační koeficient	$c_{\text{vz}}, \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$		Výtěžek, %
			Očekávaná	Vypočtená	
0,00250	0,0271	1,000	4,0	3,4	$85,5 \pm 1,2$

Pomocí námi navržené metody s využitím UV-VIS spektrometrie v prostředí methanolu byl 6-T ve vzorku léčiva stanoven s relativně nízkým výtěžkem. Proto byl pro kontrolu stanovení 6-T v léčivu pomocí spektrometrie proměřen postup stanovení podle amerického lékopisu.<sup>21</sup> Zásobní roztoky standardu 6-T a vzorku tablety léčiva s obsahem 6-T 40 mg byly připraveny v 0,1M NaOH. Ze zásobních roztoků bylo odebráno 0,5 ml a převedeno do dvou 10 ml odměrných baněk a obě baňky byly doplněny po rysku 10krát ředěnou HCl. Takto byly připravené roztoky kyselého standardu a vzorku. Pro přípravu bazického standardu a vzorku bylo ze zásobních roztoků odebráno dalších 0,5 ml a převedeno do 10 ml odměrných baněk. Do baněk byl přidán 1 ml 1M NaOH a baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku.

Při spektrometrickém měření byly bazické roztoky použity jako blank. Absorbance kyselých roztoků při vlnové délce 349 nm byly dosazeny do uvedeného vzorce:

$$m = 10 \cdot C \cdot (A_a/A_s)$$

kde  $C$  je koncentrace standardu 6-T v  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  v kyselém standardu,  $A_a$  a  $A_s$  jsou absorbance kyselého vzorku a standardu a  $m$  je získaná hmotnost 6-T z léčiva v mg.

Výtěžek stanovení 6-T byl  $93,4 \pm 0,4 \%$ .

#### 5.4 Porovnání metod stanovení

6-T byl stanoven v tabletách léčiva Lanvis několika metodami, viz tab. 5.4. V postupu podle amerického lékopisu<sup>21</sup> je určeno, že vzorek má být připraven z 20 tablet léčiva. To nemohlo být dodrženo vzhledem k tomu, že jsme neměli k dispozici dostatečné množství léčiva. Proto byl metodou standardního přídatku pomocí spektrometrie 6-T stanoven v několika jednotlivých tabletách a byl určen obsah na úrovni  $85,4 \pm 3,2 \%$  deklarovaného množství. Podle amerického lékopisu je, že tableta nesmí obsahovat méně než 93,0 % a ne více než 107,0 % udávaného množství 6-T. Proto se dá předpokládat, že vyjma námi navržené spektrometrické metody poskytují všechny ostatní správné výsledky. Pro potvrzení této domněnky však nebylo léčivo dostupné v dostatečném množství.

Tab. 5.4 Přehled výtěžků stanovení 6-T v tabletě Lanvis s uvedením pořadových čísel tablety užitá pro danou metodu

Metoda		Číslo tableta	Výtěžek, %
DCV		1	101,3 ± 1,0
UV-VIS spektrometrie	Standardní přídavek	1, 2, 3	85,4 ± 3,2
	Kalibrační křivka	1	85,5 ± 1,2
UV-VIS spektrometrie	Podle U.S. lékopisu	5	93,4 ± 0,4
FIA	ED detektor	4	95,2 ± 0,4
FIA	UV detektor	4	96,7 ± 0,8

## 6 ZÁVĚR

Pro stanovení 6-Thioguaninu (6-T) byly vypracovány metody DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a průtokové injekční analýzy (FIA) s elektrochemickou detekcí (ED) na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE).

Před použitím technik DCV a DPV byla optimalizována aktivace elektrody cyklickou voltametrií (CV). Aktivace byla prováděna CV o rychlosti nárůstu potenciálu  $400 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od  $-2500$  do  $+2500$  mV v kyselině dusičné a chloridu draselném o koncentracích  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR-pufry o pH 2,0 – 12,0 jednu nebo dvě vlny při DCV a jeden nebo dva píky při DPV. U metod DCV a DPV bylo jako optimální prostředí určen PB o pH 2,0 s přídavkem 60% methanolu, při kterém byla získána lineární kalibrační závislost v rozsahu koncentrací  $2 - 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vypočítaná mez stanovitelnosti byla  $0,9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro DCV a  $1,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro DPV. Pro zvýšení citlivosti byla měření provedena v prostředí bez methanolu. Byly změřeny kalibrační závislosti v rozmezí  $0,6 - 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Závislosti byly lineární v rozsahu  $0,6 - 6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Mez stanovitelnosti byla  $0,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro DCV i DPV. Meze stanovitelnosti byly u metod DCV i DPV srovnatelné, ale při nízkých koncentracích byl signál u DCV lépe vyhodnotitelný.

V prostředí pitné a říční vody byly metodou DCV naměřeny kalibrační závislosti v rozmezí  $2 - 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , které byly lineární v celém měřeném rozsahu. Dosažené limity stanovitelnosti byly  $1,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v pitné i říční vodě.

Pokus o využití DCV pro stanovení 6-T ve vzorcích moči nebyl úspěšný, protože ani s použitím extrakce tuhou fází nebyl nalezen vhodný postup k odstranění interferující matrice vzorku.

Optimální prostředí z DCV (60% methanol a PB o pH 2) bylo použito pro stanovení 6-T metodou FIA s ampérometrickou detekcí na BDDFE a UV detekcí. Byly nalezeny následující optimální podmínky pro stanovení 6-T v průtoku: polarizační potenciál 1300 mV, rychlost průtoku nosného roztoku  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a dávkovaný objem vzorku

50  $\mu\text{l}$ . Za těchto podmínek byly získány lineární kalibrační závislosti v rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  a 0,2 – 1,0  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ . Vypočítaná mez stanovitelnosti byla 0,05  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  pro elektrochemický a 0,06  $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$  pro UV detektor.

Obsah 6-T v léčivu Lanvis (užívaného při léčbě leukemie) byl stanoven metodou standardního přídávku pomocí DCV. Výtěžek metody byl  $101,3 \pm 1,0$  % oproti deklarovanému množství 40 mg v tabletě. Stanovení obsahu 6-T v léčivu pomocí FIA bylo provedeno metodou kalibrační křivky s výtěžkem  $95,2 \pm 0,4$  % pro elektrochemický detektor a  $96,7 \pm 0,8$  % pro UV detektor. Jako srovnávací technika byla použita UV/VIS spektrometrie, kdy metoda standardního přídávku poskytla výtěžek  $85,4 \pm 3,2$  % a metoda kalibrační křivky poskytla výtěžek  $85,5 \pm 1,2$  %. Rozdíl ve výsledcích spektrometrie a voltametrie může být dáný tuhými částicemi v tabletě, které při spektrometrickém měření interferují. Proto byl pro kontrolu 6-T v tabletě Lanvis dále stanoven spektrometricky podle amerického lékopisu<sup>21</sup> s výtěžkem  $93,4 \pm 0,4$  %. Rozdílnost výsledků mohla být dána tím, že bylo použito rozdílných tablet vzorku, ale podle lékopisu je přijatelné rozmezí (93 – 107 %) obsahu 6-T v tabletě léčiva. Tento požadavek splňují všechny námi vyvinuté metody, kromě spektrometrie v prostředí methanolu.

V tabulce 6.1 jsou shrnuty dosažené meze stanovitelnosti všemi použitými technikami. Pro stanovení 6-T byla nejcitlivější metoda FIA s ampérometrickou detekcí, kde byl získán nejnižší LOQ a technika byla také oproti DCV a DPV rychlejší. Při volbě metody je ale také potřeba zohlednit menší selektivitu ampérometrické detekce oproti voltametii.

Tab. 6.1 *Přehled limitů stanovitelnosti v daném prostředí pro použité metody stanovení 6-T.*

Metoda	Prostředí	LOQ, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
DCV	Methanol a PB o pH 2 (6:4)	0,9
DPV	Methanol a PB o pH 2 (6:4)	1,5
DCV	PB o pH 2	0,6
DPV	PB o pH 2	0,6
DCV	Pitná voda, PB o pH 2	1,3
DCV	Říční voda, PB o pH 2	1,3
FIA (ED detektor)	Methanol a PB o pH 2 (6:4)	0,05
FIA (UV detektor)	Methanol a PB o pH 2 (6:4)	0,06

## 7 LITERATURA

1. Shahrokhian S., Ghalkhani M.: *Electrochemistry Communications* 11, 1425 (2009).
2. Sato Y., Ishikawa Y., Matsuura H., Uosaki K., Mizutani F., Niwa O.: *Electroanalysis* 17, 965 (2005).
3. Warren D. J., Sloerdal L.: *Analytical Biochemistry* 215, 278 (1993).
4. Sahasranaman S., Howard D., Roy S.: *European Journal of Clinical Pharmacology* 64, 753 (2008).
5. Zakrzewski R.: *Journal of Analytical Chemistry* 64, 1235 (2009).
6. Issaeva N., Thomas H. D., Djurenovic T., al. e.: *Cancer research* 70, 6268 (2010).
7. Wang H., Wang Y.: *Biochemistry* 48, 2290 (2009).
8. LePage G. A., J. P. Whitecar J.: *Cancer research* 31, 1627 (1971).
9. Zakrzewski R.: *Journal of separation science* 31, 2199 (2008).
10. Chalupná P., Lukáš M., Šroubková R., Bortlík M., Stříteský J., Kumšta M., Šebesta I., 112 (2004).
11. Leszczyński J.: *The Journal of Physical Chemistry* 97, 3520 (1993).
12. Sýpöner J., Leszczyński J., Hobza P.: *The Journal of Physical Chemistry* 101, 9489 (1997).
13. Elion G. B., Hitchings G. H.: *Journal of the American Chemical Society* 77, 1676 (1955).
14. Bugg C. E., Thewalt U.: *Journal of the American Chemical Society* 92, 7441 (1970).
15. Luo H., Zheng C., Cheng Y.-K.: *Journal of Chromatography B* 847, 245 (2007).
16. Bi N., Hu M., Zhu H., Qi H., Tian Y., Zhang H.: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 107, 24 (2013).
17. Huang Y., Zhao S., Shi M., Liang H.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 889 (2011).
18. Chuan D., Wen Y., Shaomin S., Pin Y.: *The Analyst* 125, 1327 (2000).

19. Jacobsen J. H., Schmiegelow K., Nersting J.: *Journal of Chromatography B* 881-882, 115 (2012).
20. Dooley T., Maddocks J. L.: *British Journal of Clinical Pharmacology* 9, 77 (1980).
21. Pharmacopeia U. S.: *USP 2007*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville 2007.
22. Dervieux T., Bouliou R.: *Drug Monitoring and Toxicology* 44, 551 (1998).
23. Ensafi A. A., Karimi-Maleh H.: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 640, 75 (2010).
24. Mirmomtaz E., Ensafi A. A., Karimi-Maleh H.: *Electroanalysis* 20, 1973 (2008).
25. Beitollahi H., Raoof J.-B., Hosseinzaden R.: *Analytical Sciences* 27, 991 (2011).
26. Ensafi A. A., Hajian R.: *Journal Of The Brazilian Chemical Society* 19, 405 (2008).
27. Mirmomtaz E., Ensafi A. A.: *Electrochimica Acta* 54, 4353 (2009).
28. Arias Z. G., Alvarez J. L. M., Fonseca J. M. L.: *Journal of Colloid and Interface Science* 250, 295 (2002).
29. Compton R. G., Foord J. S., Marken F.: *Electroanalysis* 15, 1349 (2003).
30. Henychová P., Hiřmanová K., Vraný M.: *Acta Polytechnica* 52, 58 (2012).
31. Musilová J., Berek J., Pecková K.: *Chemické Listy* 103, 469 (2009).
32. Fischer A. E., Show Y., Swain G. M.: *Analytical Chemistry* 76, 2553 (2004).
33. Luong J. H. T., Male K. B., Glennon J. D.: *Analyst* 134, 1965 (2009).
34. He Q., Yang D., Deng X., Wu Q., Li R., Zhai Y., Zhang L.: *Water research*, 1 (2013).
35. Poole C. F.: *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362 (2003).
36. Ruzicka J., Hansen E. H.: *Analytica Chimica Acta* 1975, 78, 145. *Chem. Abstr* 1975:572065
37. Hansen E. H., Ruzicka J.: *Journal of Chemical Education* 56, 677 (1979).
38. Staden J. F. v., Staden R. I. S. v.: *Talanta* 102, 34 (2012).
39. Mansour F. R., Danielson N. D.: *Trends in Analytical Chemistry* 40, 1 (2012).
40. Souza F. C. d., Silva D. A. I. d., Simões M., Faria R. B., Melo M. A. d., Toledo R. M., D'Elia E.: *Journal of Applied Electrochemistry* 42, 585 (2012).
41. Trojanowicz M.: *Talanta* 96, 3 (2012).

42. Douglas J. G.: *Analytical Chemistry* 61, 922 (1989).
43. Rumlova T.: Master Thesis, Charles Univesity in Prague, Prague, 2011.
44. Gunasingham H., Ang K. P., Ngo C. C.: *Analytical Chemistry* 57, 505 (1985).
45. Jecminkova J.: Master Thesis, Charles University in Prague, Prague, 2011.
46. Inczedy J., Lengyel T., Ure A. M.: Blackwell Science (1997).
47. Kraske P. J., Brajter-Toth: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1986**, 207, 101. *Chem. Abstr.* 1986:522777
48. Millipore M.: *ChromBook*. Merck Millipore, Darmstadt 2011.
49. Renner T., Fechner T., Scherer G.: *Journal of Chromatography B* 738, 311 (2000).
50. Mikes M.: Master Thesis, Charles Univesity in Prague, Prague, 2012.