

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Michaela Bergerová

**STANOVENÍ
INDIKANU NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ
ELEKTRODĚ A UHLÍKOVÉ FILMOVÉ KOMPOZITNÍ
ELEKTRODĚ**

Determination of indican
on carbon paste electrode and on carbon film composite electrode

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D

Praha 2017

Tato práce byla finančně podporovaná Grantovou agenturou ČR (projekt P206/12/G151).

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

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku mé diplomové práce. Velmi děkuji své školitelce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D za dobré rady, skvělé vedení a za velkou trpělivost se mnou řešit věci, týkající se mé práce. Také bych poděkovala svým rodičům, příteli a sourozencům za velkou podporu při studiu.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na použití dvou pracovních elektrod z grafitu vhodných pro stanovení oxidovatelných nádorových biomarkerů. Zabývá se studiem elektrochemického chování močového indikantu. Pro jeho stanovení byla použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV) na uhlíkové pastové elektrodě a filmové kompozitní pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru.

V prvním kroku byly určeny optimální podmínky pro nalezení nejnižší meze stanovitelnosti (LQ) této látky. Pro stanovení indikantu na uhlíkové pastové elektrodě byl vybrán BR pufr o pH 3,0. Při aplikaci elektrody filmové kompozitní byl jako optimální prostředí pro stanovení použit BR pufr o pH 2,0. U obou elektrod pro sledování studované látky bylo měřeno v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$. Mez stanovitelnosti dosažena na uhlíkové pastové elektrodě byla 0,7 μ mol \cdot l $^{-1}$ a na filmové kompozitní byla 1,7 μ mol \cdot l $^{-1}$.

Bylo zkoumáno nahromadění indikantu na použitých pracovních elektrodách, aby se zvýšila citlivost a následně snížil limit stanovitelnosti. Nicméně, po 5 minutách byl pozorovaný sorpční krok zanedbatelný a akumulace nebyla vložena. Vyvinutá metoda byla testována stanovením močového indikantu v matrici lidské moči po extrakci v pevné fázi s methanolem jako elučním činidlem, nicméně extrakční krok nebyl dostatečně účinný.

U uhlíkové pastové elektrody byla prokázána dobrá opakovatelnost měření a dobrá shoda naměřeného výsledku. U uhlíkové filmové kompozitní elektrody byly zjištěné hodnoty koncentrací o několik procent nižší a s horší opakovatelností.

Předmětová hesla

Elektrochemie

Voltametrie

Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková filmová kompozitní elektroda

Klíčová slova

Indikan

Diferenční pulsní voltametrie

UV-VIS absorpční spektrofotometrie

Indoxylsulfát

ABSTRACT

This thesis is focused on the application of two working electrodes of graphite suitable for determination of oxidizable tumour biomarkers. It deals with the study of electrochemical behavior of urinary indican. For the determination the technique of differential pulse voltammetry (DPV) was used on carbon paste electrode and film composite paste electrode in Britton-Robinson (BR) buffer.

In the first step optimal conditions were determined to find the lowest limit of determination (LQ) of this substance. BR buffer of pH 3 was chosen as the optimum medium for determination on a carbon paste electrode and BR buffer of pH 2 was used as the optimum medium for the determination using a film composite electrode. Performance for both electrodes was observed in a concentration range of from $1 \cdot 10^{-6}$ to $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The limit of determination for measurements on a carbon paste electrode was $0.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ and the film composite electrode was $1.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Possibility of the accumulation of indican was examined in order to increase sensitivity and decrease of limit of quantification. However, after 5 minute sorption, no increase in response was observed and the accumulation step was not inserted. Developed method was tested on the determination of urinary indican in human urine matrix after solid phase extraction with methanol as a elution reagent, but the extraction step was not efficient enough. Good repeatability and good agreement with measured results was demonstrated using carbon paste electrode. Carbon film composite electrode provided lower concentration values and lower repeatability.

Objective words

Electrochemistry

Voltammetry

Carbon paste electrode

Carbon film composite electrode

Key words

Indican

Differential Pulse Voltammetry

UV-VIS Absorption Spectrophotometry

Indoxylsulfate

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|-----------|--|
| A | absorbance |
| BR pufr | Brittonův-Robinsonův pufr |
| c | molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
| CFE | uhlíková filmová kompozitní elektroda |
| CPE | uhlíková pastová elektroda |
| DPV | diferenční pulzní voltametrie |
| E_p | potenciál píku [V] |
| I_p | elektrický proud píku [A] |
| L_Q | mez stanovitelnosti [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
| λ | vlnová délka [nm] |
| M_r | relativní molekulová hmotnost |
| N | pořadové číslo měření měření |
| pH | záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů |
| RSD | odhad směrodatné odchylky |
| SPE | extrakce na tuhé fázi |
| s_r | relativní směrodatná odchylka [%] |
| UV | spektrometrická detekce v ultrafialové oblasti |

OBSAH

| | |
|--|--------|
| 1. Teoretická část | - 10 - |
| 1.1. Studovaná látka indikan | - 10 - |
| 1.2. Extrakce na tuhé fázi (SPE)..... | - 13 - |
| 1.3. Heterogenní uhlíkové elektrody | - 13 - |
| 2. Experimentální část | - 16 - |
| 2.1. Reagencie | - 16 - |
| 2.2. Aparatura | - 16 - |
| 2.3. Pracovní postupy | - 17 - |
| 3. Stálost zásobních roztoků indikanu..... | - 19 - |
| 4. Voltametrické stanovení indikanu..... | - 21 - |
| 4.1. DP voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě..... | - 21 - |
| 4.1.1. Vliv pH..... | - 21 - |
| 4.1.2. Opakovatelnost stanovení | - 23 - |
| 4.1.3. Ověření možnosti akumulace | - 25 - |
| 4.1.4. Kalibrační závislost..... | - 26 - |
| 4.2. DP voltametrie na filmové uhlíkové kompozitní elektrodě | - 28 - |
| 4.2.1. Vliv pH..... | - 28 - |
| 4.2.2. Opakovatelnost | - 30 - |
| 4.2.3. Ověření možnosti akumulace | - 32 - |
| 4.2.4. Kalibrační závislost stanovení..... | - 33 - |
| 5. Extrakce na tuhé fázi (SPE)..... | - 35 - |
| 5.1. SPE na uhlíkové pastové elektrodě..... | - 35 - |
| 5.2. SPE na uhlíkové filmové kompozitní elektrodě..... | - 42 - |
| 6. Závěr..... | - 43 - |
| 7. Použitá literatura | - 44 - |

1. TEORETICKÁ ČÁST

Cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení močového indikanu pomocí techniky diferenční pulsní voltametrie (DPV) na uhlíkové pastové elektrodě a uhlíkové filmové elektrodě tak, aby bylo dosaženo nejnižší meze detekce. Využitelnost metody byla ověřena stanovením ve vzorku moči.

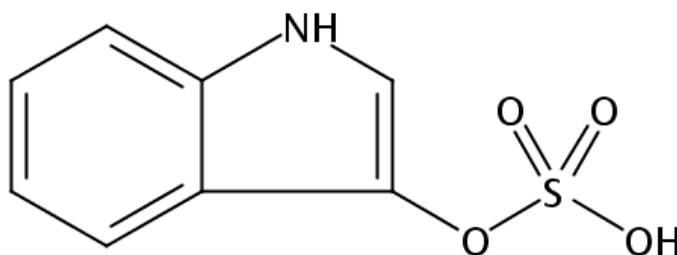
1.1. Studovaná látka indikan

Vlastnosti

Indikan močový nebo-li indoxylsulfát (Indol 3-ol, 3-indoxylsulfát, 3-indoxylsírová kyselina) - CAS registry number: 487-94-5 (Obr. 1) je látka vyskytující se v moči savců¹, a také v krevní plazmě jako normální metabolit tryptofanu². Indoxylsulfát je rozpustný ve vodě a jako uremický, cévní toxin může přispívat k chronickému onemocnění ledvin člověka³.

Část tryptofanu se metabolizuje na indol střevními bakteriemi *Escherichia coli*. Indol se vstřebává do krve ze střeva a je metabolizován na indoxylsulfát (IS) v játrech. IS je poté vylučován do moči. V případě selhání ledvin (urémie) jsou zvýšené sérové hladiny IS. Sérové úrovně jsou zvýšené hlavně u pacientů s chronickým onemocněním ledvin^{4,5}.

Další fyzikální vlastnosti studované látky jsou shrnuty v Tabulce 1⁶.



Obr. 1 Strukturní vzorec indoxylsulfátu

Tabulka 1 Vlastnosti indoxylsulfátu⁶

| | |
|---------------------|---|
| Sumární vzorec | C ₈ H ₇ NO ₄ S |
| Hustota | 1.666±0.06 g/cm ³ |
| Molekulová hmotnost | 213,21 g·mol ⁻¹ |
| pKa | -3.63±0.18 při teplotě 25 °C |
| Molární objem | 127.9±3.0 cm ³ /mol |

Metody stanovení

Zkoumaná látka je elektrochemicky aktivní, doposud však nebyly vyvinuté žádné metody pro její voltametrické stanovení. Nejčastěji používanou technikou stanovení je chromatografie. Uvést můžeme například kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (UPLC – MS) pro stanovení IS ve vzorcích mozku a plasmě savců. Tato analytická metoda zahrnuje zředění vzorku vodou, srážení proteinů acetonitrilem a následnou separací IS na koloně C18. Lineární rozsah koncentrací byl od 0,1 do 100 mg/ml v myší plasmě a 10 až 10,000 ng/g v myším mozku. Spodní limit kvantifikace (LLOQ) v tomto testu byla 0,1 mg/ml plazmy a 10 ng/g pro mozek⁷.

Dalším příkladem je metoda využívající UPLC-MS-MS ke stanovení sedmi uremických toxinů včetně IS. Byla použita separace na koloně C18, po němž následovala negativní ionizace elektrosprejem s tandemovou detekcí hmotnostní spektrometrie. Přesnost byla pod hranicí 15%. Pacienti, kteří darovali vzorky, byli v různých fázích CKD (chronické onemocnění ledvin). Tyto výsledky byly porovnány s výsledky získanými za použití konvenčních HPLC-DAD (kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole) pro všechny sloučeniny⁸.

Za účelem vyhodnocení užitečnosti metody kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CE-MS) pro studium aniontových metabolitů v moči bylo provedeno srovnání s hydrofilní interakční chromatografií MS (HILIC-MS) za použití negativní elektrosprejové ionizace. Po optimalizaci podmínek HILIC byl vybrán gradient s použitím 10 mM octanu amonného (pH 6,8) v acetonitril-vodě (5 minut 90% acetonitrilu a následně 90% -50% acetonitrilu za 10 minut), čímž bylo zajištěno základní oddělení pěti

reprezentativních aniontových testovaných metabolitů. Detekční limity byly v rozmezí 0,04-2,21 μM ⁹.

Posledním vybraným příkladem je použití kapalinové chromatografie s fluorimetrickým systémem k určení různých indolových metabolitů tryptofanu v mozkomíšním moku, mozku, plazmě a moči. Detekční limity byly 5 až 22 pg. Při 254 nm bylo prováděno měření jejich přirozené fluorescence po excitaci. Citlivost a selektivita systému umožnila využít nové nebo velmi zjednodušené metody, které je třeba ještě dovyvinout¹⁰.

Tabulka 2 Příklady stanovení indikantu

| <i>Metoda</i> | <i>Látka</i> | <i>Matrice</i> | <i>Mez stanovitelnosti</i> | <i>Citace</i> |
|--|----------------------|--|-------------------------------------|---------------|
| UPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií | 3 - indoxylsulfát | mozek plazma | 10 ng / g 0,1 μg / ml | 7 |
| UPLC – MS - MS | indoxylsulfát | moč | 75 ng / ml | 8 |
| Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií | indoxylsulfát | moč potkana a krysy | 0,04 – 2,21 μM | 9 |
| Kapalinová chromatografie s fluorimetrickým systémem | 3 - indoxylsulfát | mozkomíšní mok, mozek, plazma, moč | 5-22 pg | 10 |

1.2. Extrakce na tuhé fázi (SPE)

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci netěkavých a středně těkavých látek. Je to metoda reprodukovatelná, rychlá a přesná, u které můžeme současně zpracovat větší počet vzorků. Podstatou je zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek¹¹. Sorbent je uložen v trubičce ze skla nebo z polypropylenu, popřípadě je slisován se skleněnými vlákny do disků.

SPE kolonka je aktivována promytím vhodnými rozpouštědly, následně je kapalným vzorkem veden přes SPE kolonku, kde dochází k zachycení analytu. Posledním krokem je vymytí analytu z kolonky elučním činidlem, čímž získáváme dostatečně zkoncentrovaný extrakt¹¹.

1.3. Heterogenní uhlíkové elektrody

Pro svoji snadnou obnovitelnost a vyměnitelnost jsou výhodné pracovní elektrody tvořené směsí uhlíkových částic a pojiva. V mé práci byly vybrány dva typy heterogenních elektrod: uhlíková pastová elektroda a uhlíková filmová kompozitní elektroda.

Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda byla poprvé zmíněna v roce 1958 v publikaci od R. Adamse²¹. Adams původně chtěl vyrobit kapající uhlíkovou elektrodu, ale přidáním většího množství uhlíkového prášku nakonec vznikla pevná elektroda na bázi uhlíkové pasty^{21,22}.

Smícháním uhlíkového prášku s organickou kapalinou (tekuté pojivo) dojde k vytvoření pasty se širokým potenciálovým oknem, v kyselém prostředí $-1,0$ V až $+1,5$ V¹⁰. Jako vlastní elektrodový materiál slouží vodivý uhlík. V třecí misce se pasta vyrobí rozetřením obou složek a naplní se do teflonového těla elektrody. První CPE byla vyrobena z 1 g grafitu a 7 ml bromoformu²¹. Aby pasta nevysychala, je vhodné ji uchovávat v destilované vodě²². Elektroda patří mezi heterogenní elektrody²³ a její elektrodový povrch je získán otřením vytlačené části pasty z elektrodového těla^{12,13}.

O vlastnostech pasty rozhoduje kapalná složka elektrody a zároveň slouží jako pojivo uhlíkových částic²². Mezi nejčastější pastovací kapaliny patří minerální či silikonový olej²⁴. Pastovací kapaliny by měly být málo těkavé, vysoce viskózní a minimálně rozpustné ve vodě²⁵ a uhlíkový prášek by měl mít jednotnou velikost částic,

nízkou absorpční schopnost a být chemicky čistý²⁵.

Velkou výhodou uhlíkové pastové elektrody je její široká oblast použití, jednoduchá obnovitelnost povrchu elektrody, široké potenciálové okno, nízký proud pozadí a nenáročná příprava. Důležité je také zlepšování elektrochemického chování elektrody, za co vděčíme jednoduché modifikovatelnosti^{12,22,23,24,25}.

Uhlíková filmová kompozitní elektroda

Pevné kompozitní elektrody získané kombinací polymeru v kombinaci s uhlíkovým materiálem jsou založené na podobném principu jako uhlíková pastová elektroda. Obnova povrchu probíhá mechanickým vyleštěním či chemickým vyčistěním^{14,15}. Další možný využívaný přístup obnovy je u sítotiskových elektrod, většinou s pevným, polymerním pojivem (kompozit), kdy uhlíkový inkoust je přímo natištěn na plastové destičce a elektroda je využívána jako jednorázová^{16,17}. Takovou tištěnou elektrodou je uhlíková filmová elektroda^{18,19,20}.

Tyto elektrody se na rozdíl od pastových elektrod začaly využívat až o 20 let později³⁷. Pevná kompozitní elektroda je složena ze směsi minimálně jedné vodivé fáze a jedné nevodivé fáze, například ve formě polymeru²⁶. Jako vodivá fáze se obvykle používá uhlík (grafit¹⁸, skelný uhlík²⁷ nebo uhlíkové nanotrubičky²⁸) a jako nevodivé pojivo různé druhy polymeru, nejvíce polystyren²⁰, epoxidová pryskyřice²⁹, polyester³⁰ a polyvinylchlorid³¹.

U uhlíkových kompozitních elektrod je možnost změnit základní složku kompozitu podle stanovovaného analytu a také možnost chemické modifikace směsi. Příkladem modifikace uhlíkových kompozitních elektrod může být například stanovení katechinu ve vzorcích čaje, kdy je do elektrodového materiálu přidáván fosforečnan měďnatý pro zvýšení odezvy signálu analytu³³. Elektroda poskytuje vysoké odezvy signálů a nízký šum, má široké potenciálové okno.

Příprava těchto kompozitních elektrod je snadná a je především závislá na typu použitého nevodivého pojiva a způsobu zavedení vodiče. U filmových elektrod je polymer rozpuštěn v rozpouštědle s vysokou tenzí par, a poté smíchán s uhlíkatými částicemi. Pevná kompozitní elektroda vznikne po vytěknání rozpouštědla²⁰.

Pro měření v této práci byla použita měrná cela uhlíkové kompozitní elektrody skládající se z polypropylenové mikrotitrační destičky s integrovaným vodičem na dně nádoby. Každá jednotlivá jamka má objem 400 μl ³⁸. Příkladem dřívější publikace této

elektrody je stanovení triclosanu pomocí voltametrických měření. Pro přípravu kompozitních elektrod byly mikročástice grafitu a skelného uhlíku testovány v kombinaci s několika typy polymerů. Byly vybrány grafitové částice uhlíku s polystyrenem (C-PS) a s polykarbonátem (C-PC). Dosažený limit detekce byl $0,49 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro C-PS elektrodu a $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro C-PC elektrodu ve vybrané optimálním prostředí. Tato metoda byla úspěšně použita pro stanovení triclosanu ve vzorcích říční vody a zubní pasty³⁸.

Další stanovení prováděné na této konstrukci elektrody je voltametrické stanovení kyseliny homovanilové a kyseliny vanilylmandelové. Pomocí diferenční pulzní voltametrie byly stanovovány nádorové biomarkery 2- (4-hydroxy-3-methoxyfenyl) octová kyselina (kyselina homovanilová, HVA) a (RS) -hydroxy(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) octová kyselina (vanilylmandelová kyselina, VMA). Pro přípravu kompozitních elektrod bylo použito nevodivé polystyrenové pojivo a grafitové vodivé mikročástice. Jako optimální prostředí pro měření byl vybrán pufr o pH 2 pro oba analyty. Limity stanovitelnosti byly $0,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro HVA a $0,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro VMA³⁹.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Reagencie

Studovaná látka

Zásobní roztok indoxylsulfátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,00628 g indoxylsulfátu v 25 ml deionizované vody. Roztok nebyl nijak zbarvený a byl uchováván v lednici při teplotě asi 7°C. Další roztoky o nižších koncentracích byly připraveny naředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou.

Další použité chemikálie

Kyselá složka BR pufru ($c = 0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byla připravena rozpuštěním 2,48 g kyseliny trihydrogenborité (p.a., Lachema, Brno) a zředěním 2,81 cm³ octové kyseliny (80%, p.a., Lach-Ner, Neratovice) a 2,70 cm³ kyseliny trihydrogenfosforečné (85%, p.a., Lach-Ner, Neratovice) deionizovanou vodou na 1000 cm³. Její pH bylo 1,7. Zásaditá složka byla připravena rozpuštěním 8,00 g hydroxidu sodného (mikroperly, Lach-Ner, Neratovice) v 1000 cm³ deionizované vody, tento roztok měl pH 13,2. BR pufrů o požadovaném pH byly připravovány mísením kyselé a zásadité složky. Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (rezistivita 18,2 M $\cdot\Omega$ \cdot cm, produkovaná systémem Milli-Q Plus, Millipore, USA).

2.2. Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda nebo uhlíková filmová kompozitní elektroda, jako referenční elektroda argentschloridová (3 mol \cdot l⁻¹ KCl, Elektrochemické detektory, Turnov) a jako pomocná elektroda platinová.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru HP – Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer v křemenných kyvetách.

K měření pH byl používán digitální pH-metr Jenway 4330 se skleněnou elektrodou. Přístroj byl kalibrován pomocí standardních pufrů.

2.3. Pracovní postupy

Příprava filmové uhlíkové kompozitní pastové elektrody

Měrná cela byla vytvořena z polypropylenové mikrotitrační destičky. Každá jednotlivá jamka o objemu 400 μ l se železným vodičem na dně nádoby fungovala jako měrná cela.

Pro výrobu uhlíkového inkoustu bylo odváženo 0,9 g grafitového prášku CR-2 (Grafit Týn, Česká republika), 0,1 g polystyrenu a přidáno 5 ml toluenu (p.a., Lachema, Česká republika). Poté byla celá směs řádně promíchána, aby došlo k rozpuštění. Po úplném rozpuštění polymeru bylo napipetováno 370 μ l do každé jamky, aby vznikla pevná kompozitní filmová elektroda.

Příprava uhlíkové pastové elektrody

Bylo naváženo 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (Alfa Aesar, Karlsruhe, Německo) o průměru 0,4 – 12 μ m a rozetřeno v porcelánové třecí misce se 100 μ l minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA). Poté byla tato pasta naplněna do teflonového těla elektrody o průměru 2,5 mm.

Optimalizace měření kompozitní elektrody a pastové elektrody

Vzorek pro voltametrická měření pro kompozitní elektrodu byl připravován odpipetováním potřebného objemu základního roztoku indoxylsulfátu do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku BR pufrem, promícháním a převedením 370 μ l roztoku do měrné cely.

U pastové elektrody byl vzorek připravován odpipetováním potřebného objemu základního roztoku indoxylsulfátu do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku BR pufrem, promícháním a převedením celého roztoku do měrné cely. Všechna měření byla opakována nejméně třikrát, není-li uvedeno jinak, a prováděna za laboratorní teploty. Křivky byly měřeny v potenciálovém rozsahu 300 až 1200 mV. Při měřeních kalibračních závislostí indoxylsulfátu byly hodnoty zpracovávány metodou lineární regrese a meze detekce a stanovitelnosti byly stanoveny jako trojnásobek a desetinásobek poměru směrodatné odchylky (nejnižší naměřené kalibrační koncentrace) ke směrnici kalibrační křivky.

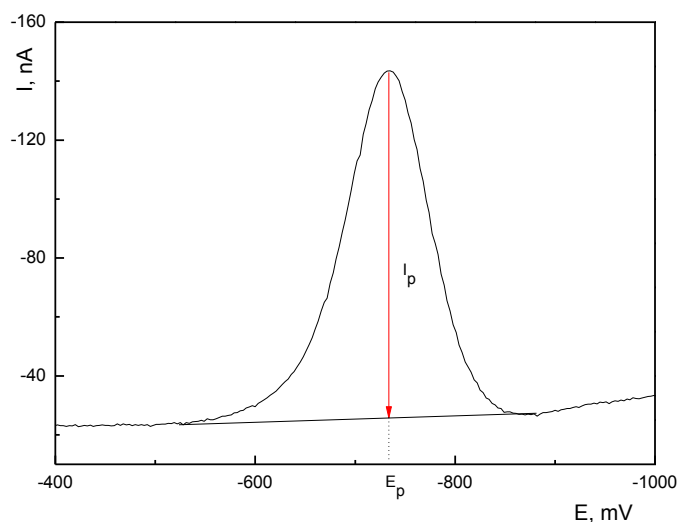
Extrakce na tuhé fázi

Všechny testované SPE kolonky byly před nanesením vzorku aktivovány promytím 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody. Po projití vodného vzorku SPE kolonkou byla kolonka vysušena proudem vzduchu pomocí vakua. Jako eluční činidlo byl použit methanol, voda nebo jejich směs nebo BR pufr o zvoleném pH. Eluce byla prováděna postupnými objemy elučního činidla (2 až 4 ml). Při použití vzorku moči bylo pH vzorku upraveno pomocí kyseliny fosforečné na pH 3 a vzorek byl před vlastní SPE zfiltrován přes filtrační papír. Byla prováděna tři paralelní stanovení.

Vyhodnocení

Vyhodnocením jednotlivých měření DP voltamogramů byly získány hodnoty proudů (I_p) a potenciálů (E_p). Způsob vyhodnocení DPV záznamů je zobrazen na Obr. 2.

Pomocí metody lineární regrese byla vyhodnocena naměřená data. Koncentrace, vynásobena trojnásobkem směrodatné odchylky měření nejnižší stanovované koncentrace a vydělená směrnici dané kalibrační závislosti, určila hodnotu meze detekce. Každé měření bylo provedeno nejméně třikrát.



Obr. 2 Ukázka vyhodnocení DP voltamogramů – I_p značí proud píku a E_p značí potenciál píku.

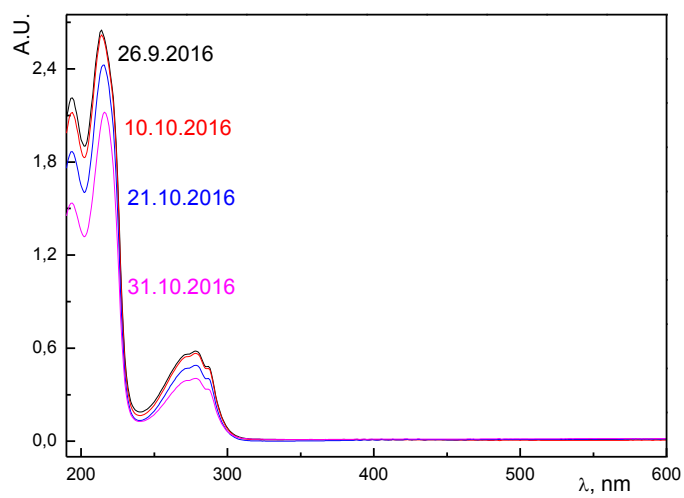
3. STÁLOST ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ INDIKANU

Stálost zásobního roztoku studované látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve vodě byla sledována spektrofotometricky v křemenné kyvetě pomocí absorbance (Obr. 3). Výsledky měření stálosti zásobního roztoku při vlnové délce 270 nm jsou shrnuty v Tabulce 3.

Je vidět, že během 14 dnů nedošlo k výraznému poklesu absorbance. Proto bylo možné zásobní roztok indoxylsulfátu při uchování v lednici považovat po tuto dobu za stálý. Po měsíci klesla absorbance o 30%, bylo tedy potřeba každých 14 dnů vyrobit nový roztok.

Tabulka 3 Stálost zásobního roztoku studovaného vzorku

| <i>Dny</i> | <i>Absorbance</i> | <i>%</i> |
|------------|-------------------|----------|
| 26.9.2016 | 0,55296 | 100 |
| 10.10.2016 | 0,53565 | 97 |
| 21.10.2016 | 0,46179 | 84 |
| 31.10.2016 | 0,38491 | 70 |



Obr. 3 Absorpční spektrum roztoku indoxylsulfátu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Měřeno proti deionizované vodě v 1 mm křemenných kyvetách. U každé křivky je uvedené datum měření.

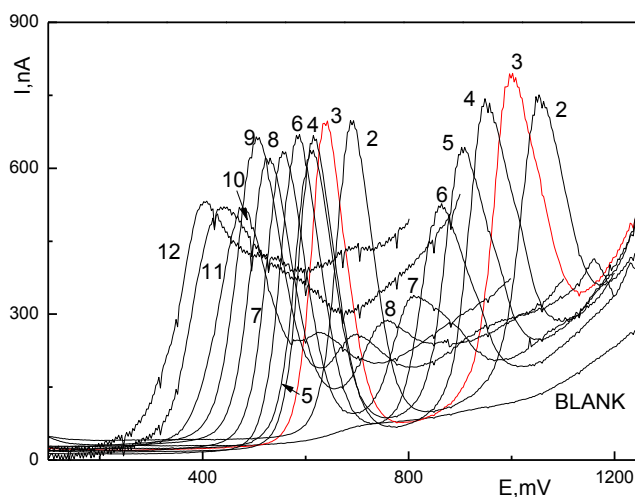
4. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ INDIKANU

4.1. DP voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě

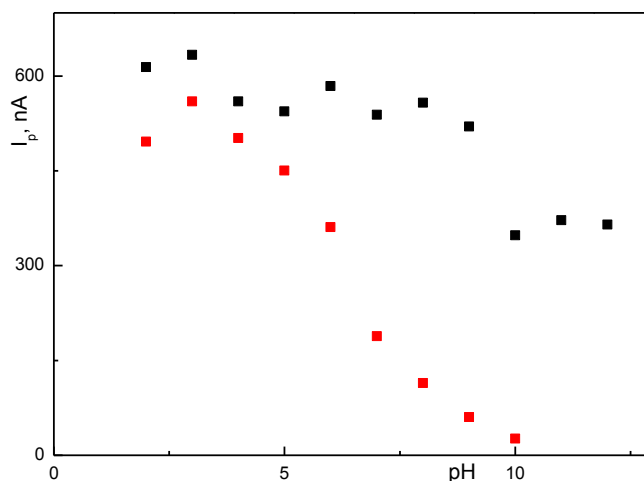
4.1.1. Vliv pH

Ke sledování vlivu pH na voltametrické chování indoxylsulfátu na uhlíkové pastové elektrodě byla použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV). Byly měřeny roztoky indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 2 – 12. Povrch CPE byl před každým měřením mechanicky očištěn pomocí filtračního papíru navlhčeného destilovanou vodou, pokud není napsáno jinak.

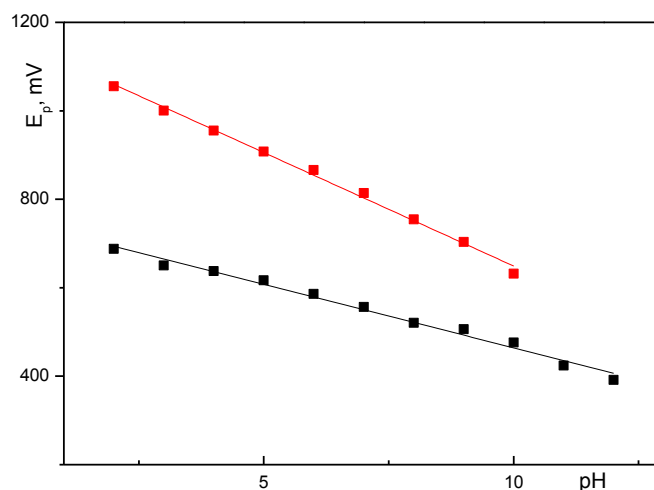
Získané křivky jsou zobrazeny na Obr. 4. Látka vykazuje při pH 2 – 10 dva píky, při pH 11 a 12 pak pouze jeden pík, což odpovídá oxidaci NH skupiny. Poloha obou píků se posunuje se zvyšujícím se pH směrem k nižším hodnotám potenciálu podle rovnice pro E_p (mV) = $-28,68\text{pH} + 750,99$ ($R^2 = 0,9865$) pro první pík a E_p (mV) = $-2,63\text{pH} + 1168,86$ ($R^2 = 0,9954$) pro druhý pík. Nejvyšší odezvy byly získány v kyselém prostředí. Úplně nejvyšší odezvu má uhlíková pastová elektroda při pH 3,0 (Obr. 4). Toto pH bylo zvoleno jako nejvhodnější pro další měření techniky DPV na uhlíkové pastové elektrodě.



Obr. 4 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na CPE v prostředí BR pufru. Čísla nad křivkami odpovídají hodnotě pH měřeného roztoku. Červeně označená křivka zobrazuje nejvyšší odezvu (pH = 3) zvolenou pro další měření.



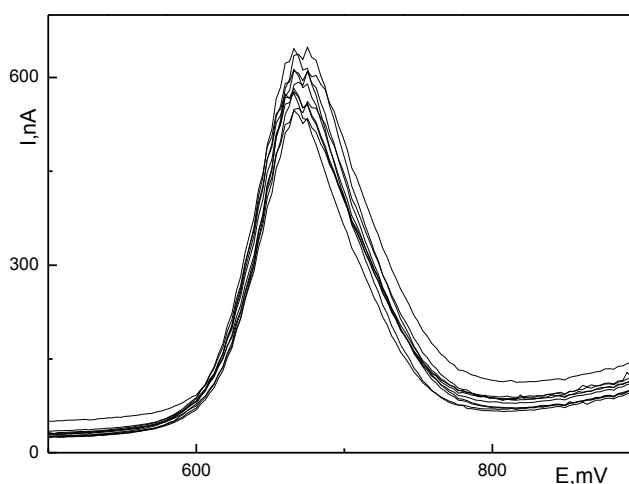
Obr. 5 Závislosti proudu píků I_p indoxylsulfátu na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Černé body zobrazují první pík, červené pík druhý.



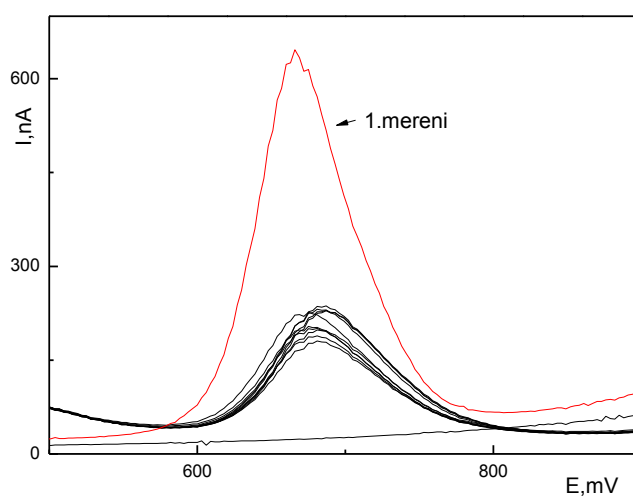
Obr. 6 Závislosti potenciálu píků E_p indoxylsulfátu na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Černé body zobrazují první pík, červené pík druhý.

4.1.2. Opakovatelnost stanovení

Opakovaným měřením roztoku indoxylsulfátu ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) v prostředí BR pufru o pH 3,0 byla sledována možná pasivace povrchu elektrody. Měření bylo opakováno celkem 10 krát. Na Obr. 7 je patrný vývoj výšky píků při opakovaných měřeních při pH 3,0 s otíráním pasty a na Obr. 8 bez otírání pasty. Mezi každým měřením byl roztok vždy promíchán. Měření s otíráním pasty má stabilní odezvu s relativní směrodatnou odchylkou 3,4 %. U měření bez otírání pasty proud klesne téměř na 30% v porovnání s měřením s otíráním pasty.



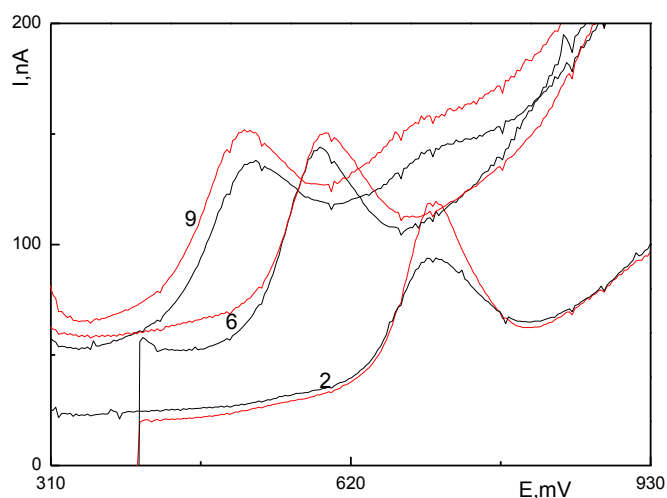
Obr. 7 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ na CPE v prostředí BR pufru o pH 3,0. Opakované měření s otíráním pasty.



Obr. 8 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ na CPE v prostředí BR pufru o pH 3,0. Opakované měření bez otírání pasty.

4.1.3. Ověření možnosti akumulace

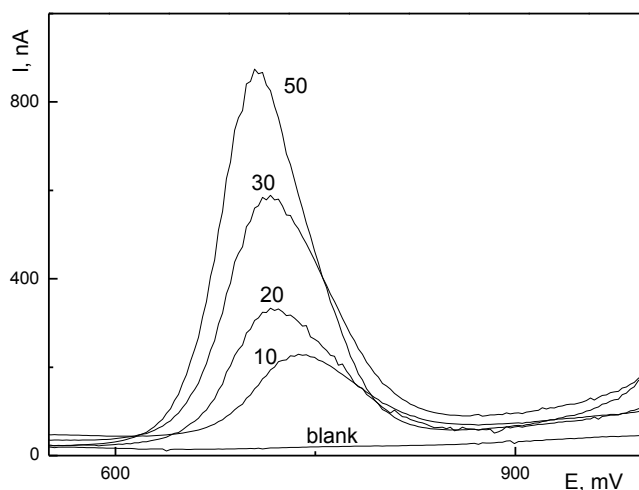
Dále byla prozkoumána možnost akumulace stanovovaných látek na CPE za účelem zvýšení odezvy. Měření byla provedena v míchaných roztocích o pH 2, 6 a 9 a elektroda byla ponořena v roztoku v časovém intervalu 300 s před měřením. Koncentrace roztoku indoxylsulfátu byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V neutrálním a zásaditém prostředí nebyl pozorován nárůst výšky píků s dobou akumulace, jen u pH 2 lze pozorovat akumulaci, ale vede ke zvětšení výšky píku jen o 40 % (Obr. 9). Využití akumulčního kroku ke zvýšení odezvy se proto jeví nevýhodné vzhledem k jeho časové náročnosti.



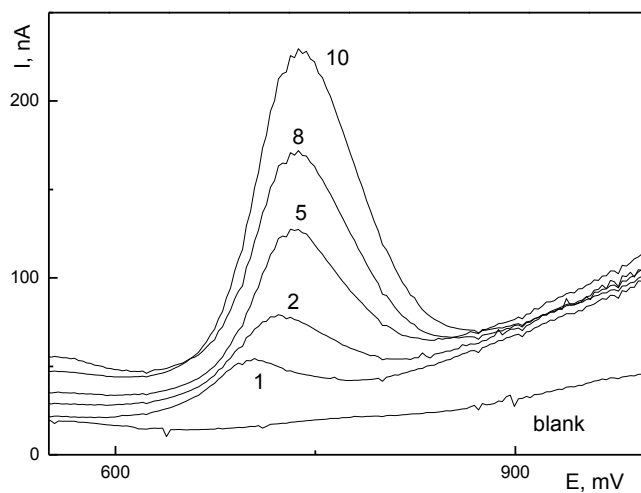
Obr. 9 Vliv akumulace. DP voltamogramy na CPE při pH 2, 6 a 10, koncentrace roztoků $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Červené křivky zobrazují měření po 300 s akumulací, černé bez využití akumulace.

4.1.4. Kalibrační závislost

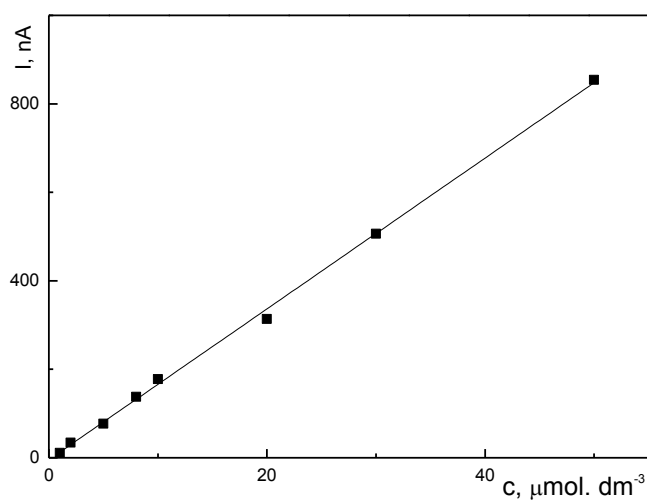
Měření kalibrační závislosti indoxylsulfátu bylo prováděno technikou DPV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3,0 bez vloženého akumulčního kroku. Na Obr. 10 a 11 jsou zobrazené voltamogramy získané měřením v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a na Obr. 12 jsou uvedeny kalibrační závislosti výšky píků na koncentraci. Koncentrační závislost byla lineární v celém koncentračním rozmezí. Poloha píku se posunuje se zvyšující se koncentrací směrem k vyšším hodnotám proudu podle rovnice pro $I \text{ (nA)} = 17,04c \text{ (mol} \cdot \text{l}^{-1}) - 4,42$ ($R^2 = 0,9985$). Vypočtená mez stanovitelnosti píků měřených na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3,0 byla $0,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 10 DP voltamogramy indoxylsulfátu v rozmezí od $1 \cdot 10^{-5}$ do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3,0. Čísla nad křivkami odpovídají koncentracím v μmol .



Obr. 11 Voltamogramy indoxylsulfátu u v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $8 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot l $^{-1}$, měřeno technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3,0. Čísla nad křivkami odpovídají koncentracím v μ mol.



Obr. 12 Kalibrační přímka píku zkoumané látky na CPE metodou DPV při pH 3,0 v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$.

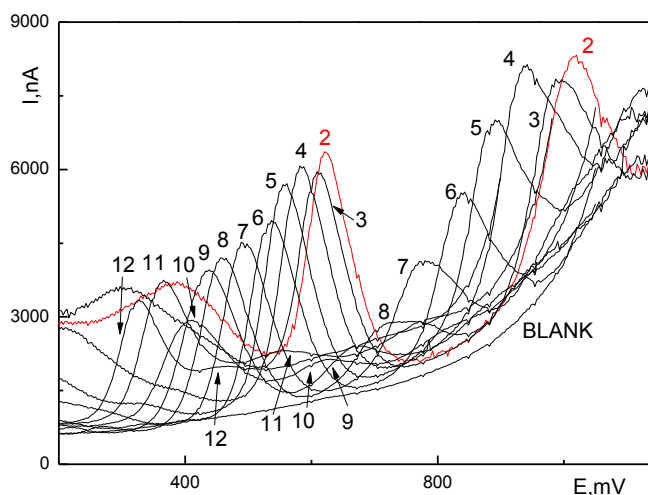
4.2. DP voltametrie na filmové uhlíkové kompozitní elektrodě

4.2.1. Vliv pH

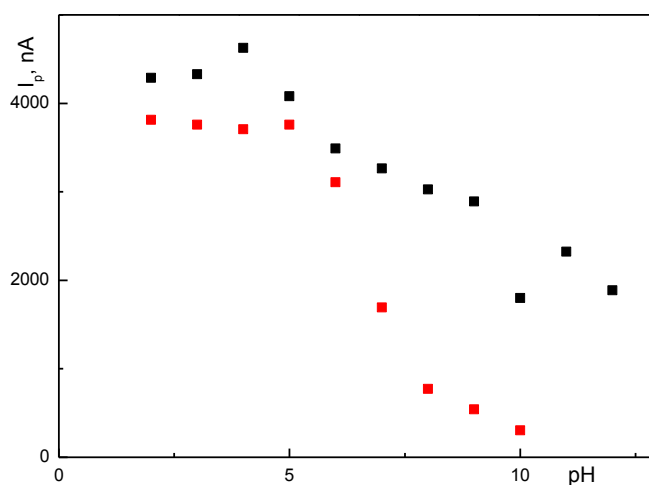
Obdobně jako v případě měření u CPE byl vliv pH na elektrochemické chování indoxylsulfátu sledován na uhlíkové filmové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufru o různém pH 2 - 12 (Obr. 13). Měřené roztoky měly koncentraci látky $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$.

Získané křivky jsou zobrazeny na Obr. 13. Na rozdíl od měření na CPE lze v celé oblasti pH identifikovat dva píky, i když u nejvyšších pH je druhý pík poměrně nevýrazný. Pro další měření bylo vzhledem k největší odezvě zvoleno jako nejvhodnější pH 2. Přítomnost dalších píků při nízkých potenciálech byla nesystematická a pravděpodobně souvisí s kontaminací povrchu elektrod. Závislost proudu píků na pH roztoku je zobrazena na Obr. 14.

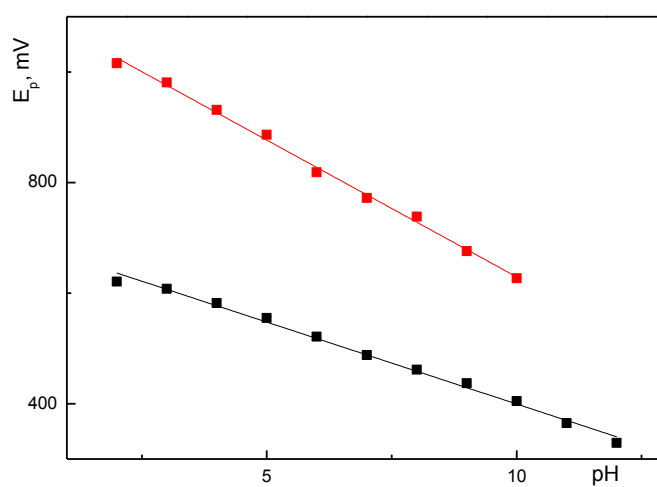
Závislost potenciálu píku na pH (Obr. 15) sleduje pro první pík rovnicí $E_p \text{ (mV)} = -9,62\text{pH} + 695,73$ ($R^2 = 0,9934$), pro druhý pík $E_p \text{ (mV)} = -49,49\text{pH} + 1124,35$ ($R^2 = 0,9963$), při porovnání s CPE (kapitola 4.1.1) můžeme říci, že hodnoty jsou velmi podobné.



Obr. 13 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ na CFE v prostředí BR pufru. Čísla nad křivkami odpovídají hodnotě pH měřeného roztoku.



Obr. 14 Závislosti proudu píků I_p indoxylsulfátu na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$. Černé body zobrazují první pík, červené pík druhý.



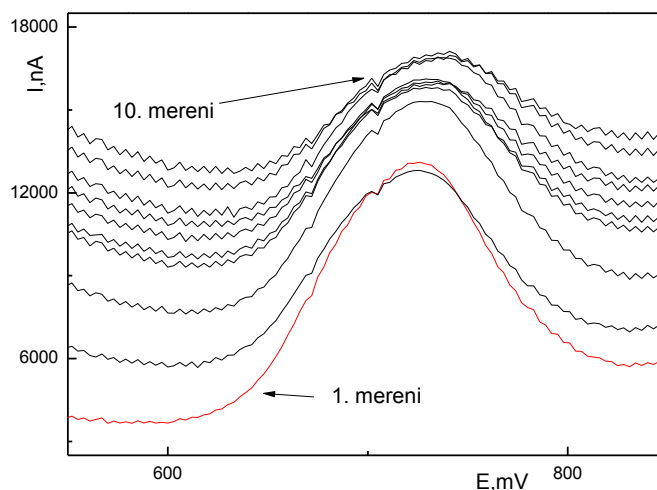
Obr. 15 Závislosti potenciálu píků E_p indoxylsulfátu na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$. Černé body zobrazují první pík, červené pík druhý.

4.2.2. Opakovatelnost

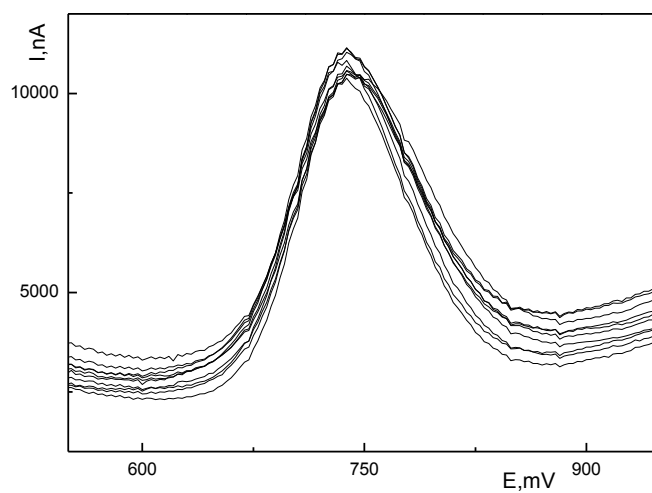
Opakovaným měřením roztoku indoxylsulfátu ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) v prostředí BR pufru o pH 2,0 byla sledována možná pasivace povrchu elektrody. Byly provedeny dvě série měření – 10 opakovaných měření v jedné jamce (Obr. 16) a 10 měření v nových jamkách (1 měření v 1 jamce – Obr. 17).

Na Obr. 16 je patrný vývoj výšky píků při opakovaných měřeních o pH 2,0 v jedné jamce. Zvyšuje se proudové pozadí a snižuje pík, pro další měření je opakované používání jedné jamky nevhodné.

Při opakovaném měření na novém povrchu elektrody (1 měření v 1 jamce) jsou píky skoro stejné, z celého souboru měření byla vypočtena relativní směrodatná odchylka 4,2%.



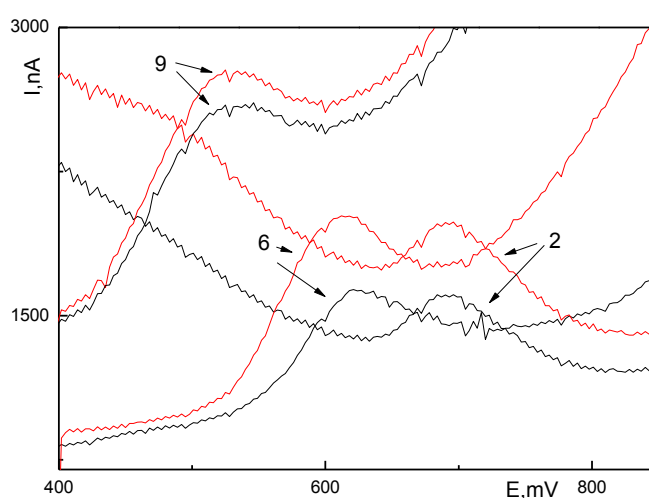
Obr. 16 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ na CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0. Opakované měření v jedné jamce.



Obr. 17 DP voltamogramy indoxylsulfátu o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0. Opakované měření v nových jamkách.

4.2.3. Ověření možnosti akumulace

Dále byl prozkoumán vliv akumulace stanovovaných látek na CFE jednak pro případné zvýšení odezvy, jednak pro zjištění, jestli nedochází k interakci roztoku s elektrodou před tím, než je provedeno samotné měření. Měření byla provedena v roztocích o pH 2, 6, 9 a elektroda byla vkládána do roztoku 5 minut před každým měřením. Koncentrace indoxylsulfátu v použitých roztocích byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nebyl pozorován nárůst výšky píků s dobou akumulace (Obr. 18), jen pozadí mírně stoupá. Proto nebylo možné využít akumulčního kroku ke zvýšení odezvy, ale současně není vhodné nechávat vzorek napipetovaný v jamce před měřením.

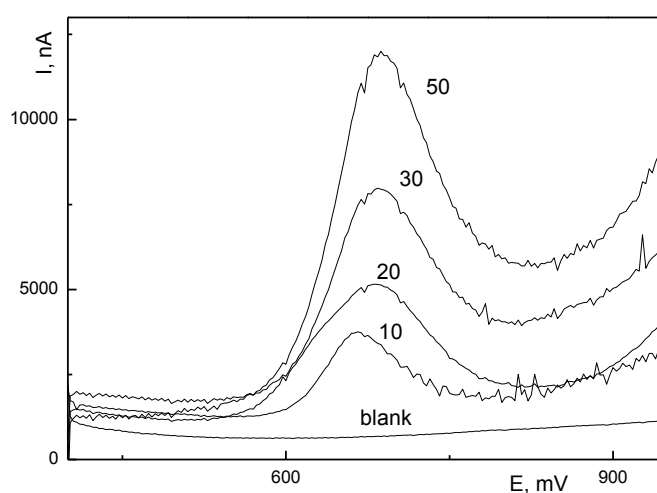


Obr. 18 Vliv akumulace. DP voltamogramy na CFE při pH 2, 6 a 9, koncentrace roztoků $5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Červené křivky zobrazují měření po 5 minutách.

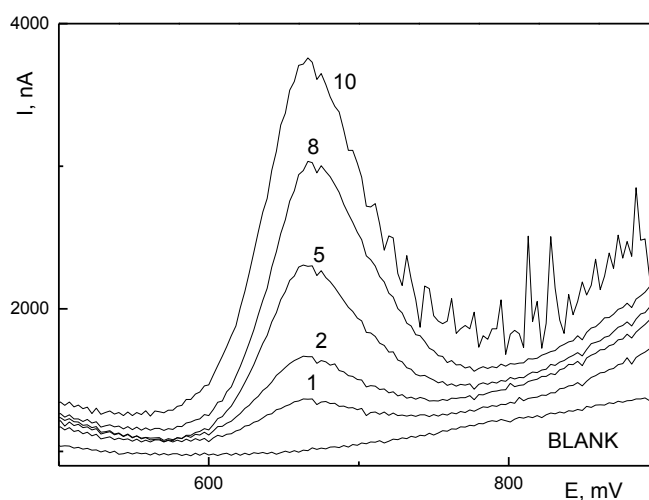
4.2.4. Kalibrační závislost stanovení

Měření kalibrační závislosti indoxylsulfátu bylo prováděno technikou DPV na uhlíkové filmové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2,0. Na Obr. 19 a 20 je zobrazeno měření v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrační závislost uvedena na Obr. 21 byla lineární v celém koncentračním rozmezí stejně jako u uhlíkové pastové elektrody. Poloha píku se posunuje se zvyšující se koncentrací směrem k vyšším hodnotám proudu podle rovnice pro $I \text{ (nA)} = 155,77c \text{ (mol} \cdot \text{l}^{-1}) + 226,22$ ($R^2 = 0,9959$).

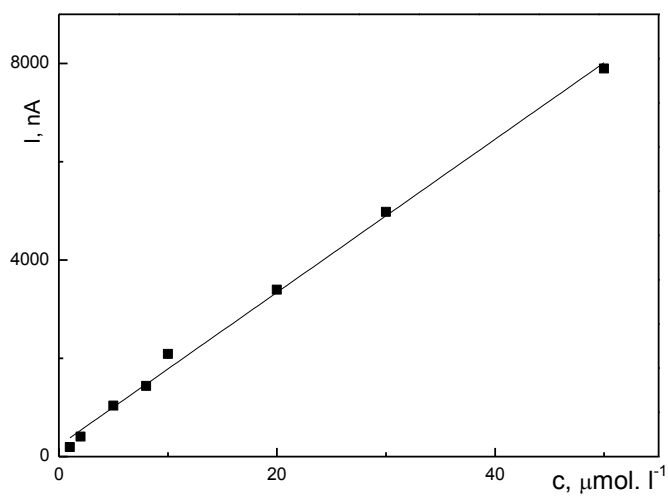
Vypočtená mez stanovitelnosti píku měřených na uhlíkové kompozitní filmové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3,0 byla $1,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 19 Voltamogramy indoxylsulfátu v rozmezí od $1 \cdot 10^{-5}$ do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0.



Obr. 20 DP voltamogramy indoxylsulfátu v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0.



Obr. 21 Kalibrační přímka píku zkoumané látky na CFE metodou DPV při pH 2,0 v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

5. EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI (SPE)

5.1. SPE na uhlíkové pastové elektrodě

Nejprve bylo provedeno měření lidské moči pomocí DPV bez extrakce (Obr. 22). K 1 ml moči bylo přidáno 9 ml BR pufru o pH 3 (poměr 9:1 do 10 ml odměrné baňky). Poté byl postupně přidáván indoxylsulfát o objemu 0,5, 1,0 a 1,5 ml. Koncentrace roztoků byly tedy $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (1,5 ml), $9,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (1 ml), $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (0,5 ml). Křivky byly porovnány s roztokem, který se skládal pouze z indoxylsulfátu a BR pufru o pH 3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Voltamogramy s močí jsou mnohonásobně větší s porovnáním s křivkou indoxylsulfátu s BR pufrem, což ukazuje na přítomnost dalších látek ve vzorku. Z toho důvodu bylo přistoupeno k extrakci pomocí SP. Shrnutí všech měření prováděných pomocí SPE na CPE je uvedeno v Tabulce 7.

Tabulka 7 Shrnutí celého postupu SPE na CPE

| Analyzovaný roztok | Promývací roztok | Eluční činidlo | Objem elučního činidla v ml | Výtěžnost |
|--|--------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| indoxylsulfát + BR pufr o pH 3 ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | 1 ml BR pufru o pH 3 | methanol | 2 a 2 | 1. frakce 99% 2. frakce 3% |
| indoxylsulfát + BR pufr o pH 3 ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | 1 ml BR pufru o pH 3 | methanol | 2 a 2 | 1. frakce 71% 2. frakce - |
| indoxylsulfát + BR pufr o pH 3 ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | 5 ml BR pufru o pH 8 | deionizovaná voda | 3 | 43% |
| | | 5% methanol | 3 | 52% |
| | | 10% methanol | 3 | 7% |
| indoxylsulfát + BR pufr o pH 3 ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | 5 ml BR pufru o pH 8 | 5% methanol | 3 | 101% |
| Lidská moč o pH = 3 | 1 ml BR pufru o pH 3 | methanol | 2 | nevyhodnotitelné |
| Lidská moč o pH = 3 | 10 ml BR pufru o pH 8 | methanol | 2 | nevyhodnotitelné |
| Lidská moč o pH = 3 | 5 ml BR pufru o pH 8 | 5% methanol | 3 | nevyhodnotitelné |

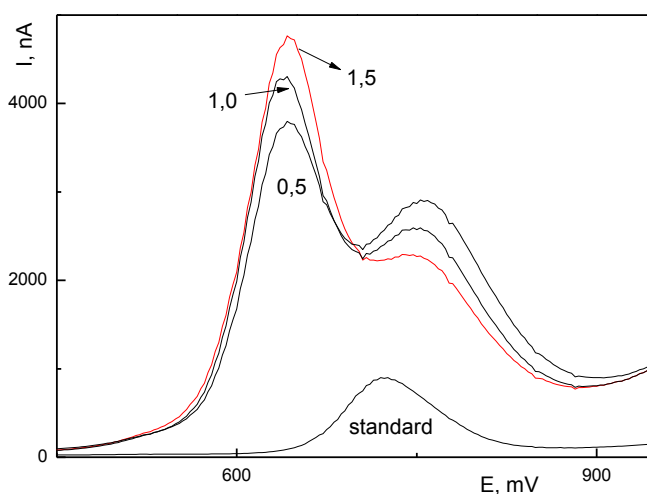
Na kolonkách typu LiChrolut EN 200mg/3ml byly zkoušeny různé druhy a objemy elučnicích činidel (Obr. 23). První roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl indoxylsulfát, jehož koncentrace byla $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, s BR pufrům o pH 3. Tento roztok byl promyt 1 ml BR pufru o pH 3 a jako elučnicí činidlo byl vybrán methanol. Byly tedy přidány dvě frakce po 2 ml methanolu. Celý tento postup byl porovnán se standardním roztokem složeným z 2 ml methanolu, 7,9 ml BR pufru o pH 3 s přidávkem 100 μl zásobního roztoku indoxylsulfátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Bylo zjištěno, že extrakce probíhá v pořádku, její výtěžek je 99% pro první frakci a 3% pro druhou frakci.

Dalším krokem bylo ověření, jak významný vliv na extrakci má objem extrahovaného roztoku. Na kolonku byl nanesen roztok indoxylsulfátu s BR pufrům o pH 3 obsahující stejné množství indoxylsulfátu jako v předchozím pokusu, ale ve 100 ml, tedy o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po extrakci byla kolonka promyta 1 ml BR pufrům o pH 3 a poté eluována dvěma frakcemi po 2 ml MeOH (Obr. 24). Výtěžnost byla v tomto případě pouze 71% v první frakci, ve druhé frakci nebyla žádná odezva indoxylsulfátu nalezena. Můžeme tedy usoudit, že velké množství vodného roztoku začne indoxylsulfát vymývat z kolonky a proto musíme na kolonku nadále nanášet pouze 10 ml vzorku. Na Obr. 25 jsou ukázána měření extrakce indikanu ze spikované lidské moči, jejíž pH bylo upraveno pomocí kyseliny fosforečné na hodnotu 3, a poté byla přefiltrována přes filtrační papír, abychom se zbavili případných pevných částic. Stejně jako v předešlých případech byla kolonka po extrakci promyta 1 ml BR pufru o pH 3. Elučnicím činidlem pro tento roztok byly 2 ml methanolu. Je patrné, že i po extrakci obsahuje vzorek mnoho interferentů a vyhodnocení píku indoxylsulfátu není možné.

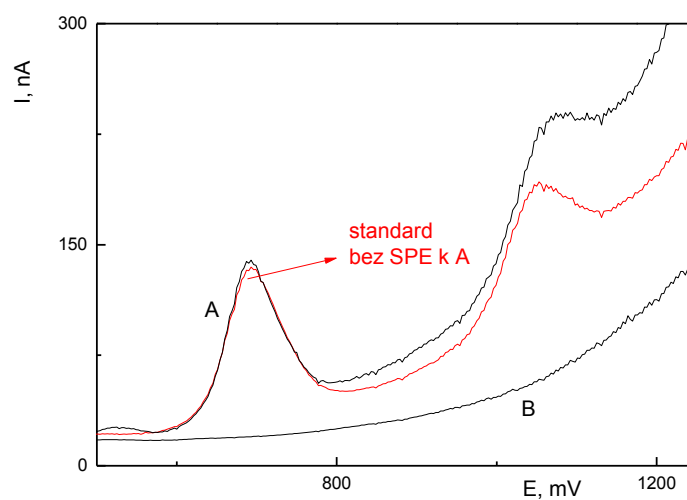
Ve snaze odstranit část interferentů bylo otestováno vsunutí dalšího kroku, promytí kolonky s adsorbovaným analytem 10 ml BR pufru o pH 8 ještě před samotnou elucí. Jako elučnicí činidlo byly i nadále používány 2 ml methanolu. Promytí nesnížilo výtěžek extrakce, vzhledem k variabilitě vzorků moči je obtížné zhodnotit, jaký podíl interferentů se vymyl, nicméně ve vzorku i po promytí zůstalo interferentů velké množství.

Pro omezení vymytí silněji se sorbujícími interferenty z kolonky byla zjištěná nejmenší koncentrace methanolu, kterým lze indoxylsulfát eluovat. K eluci byla použita řada elučních činidel – deionizovaná voda, 5% methanol a 10% methanol (Obr. 26). Analyzovaným roztokem byl indikan s BR pufrům o pH 3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, který byl promyt 5 ml BR pufru o pH 8. Prvním elučním činidlem byly 3 ml deionizované vody. Výtěžnost v této frakci byla 43 %. Poté byla kolonka promyta ještě 3 ml 5% methanolu. V grafu se objevil pík, který zobrazuje zbytek vymyté analyzované látky s výtěžkem 52 %. K ověření vymytí veškeré látky byly do stejné kolonky přidány 3 ml 10% methanolu, čímž byl zjištěn zbytkový výtěžek 7%.

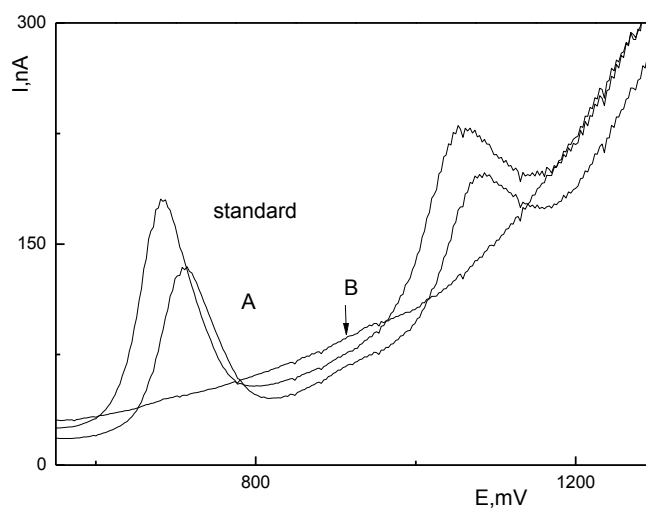
Konečný extrakční postup tedy zahrnoval adsorpci indoxylsulfátu z roztoku o pH 3, promytí SPE kolonky 5 ml BR pufru o pH 8 a eluci 5% methanolem o objemu 3 ml. Na roztoku standardu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo zjištěno, že tento postup poskytuje výtěžek 101%. Testování tohoto postupu ve spikovaném vzorku moči (Obr. 27) nicméně ukazuje, že ani tento postup neumožňuje oddělení složek od matrice.



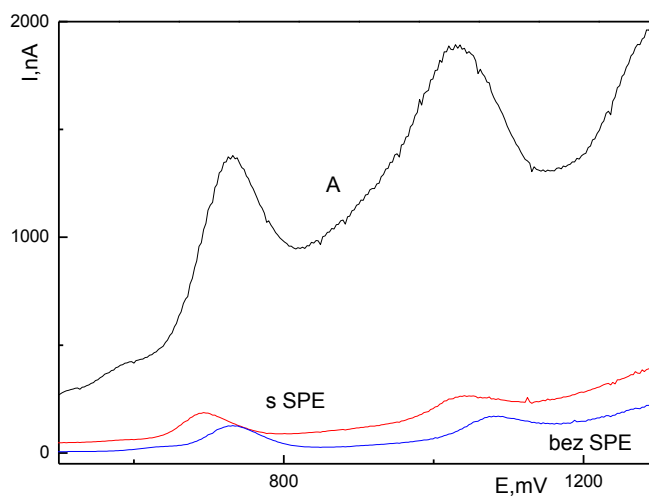
Obr. 22 Voltamogramy spikovaných vzorků moči. Měřeno pomocí DPV na CPE. Čísla nad křivkami zobrazují přidávané objemy indikantu v ml, standard odpovídá roztoku indoxylsulfátu s BR pufrům o pH 3 ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).



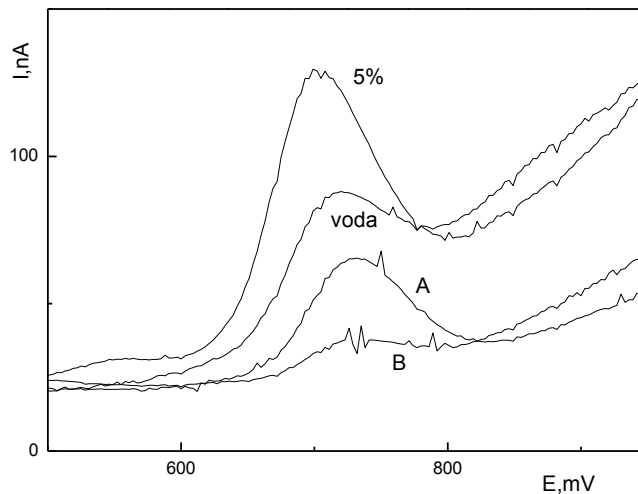
Obr. 23 DP voltamogramy na CPE po extrakci. roztok IS o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a BR pufru o pH 3, eluce prvními 2 ml MeOH (A) a druhými 2 ml MeOH (B).



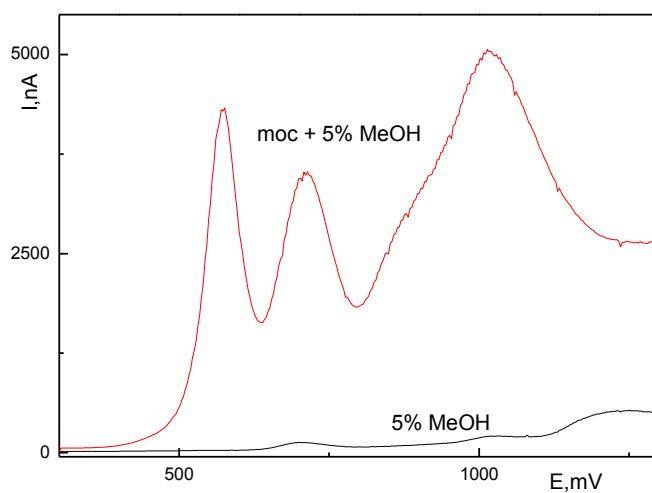
Obr. 24 DP voltamogramy po extrakci, IS o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a BR pufru o pH 3, eluce prvními 2 ml MeOH (A) a druhými 2 ml MeOH (B); standard odpovídá roztoku 2 ml methanolu, 7,9 ml BR pufru o pH 3 s přidavkem 100 μl zásobního roztoku indoxylsulfátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 25 DP voltamogramy po SPE. Měřeno na CPE. (A) vzorek moči promytý 1 ml BR pufru o pH 3 a eluovaný 2 ml MeOH. Porovnáno se standardy po SPE (červeně) a bez SPE (modře). Koncentrace roztoku indoxylsulfátu ve standardech byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



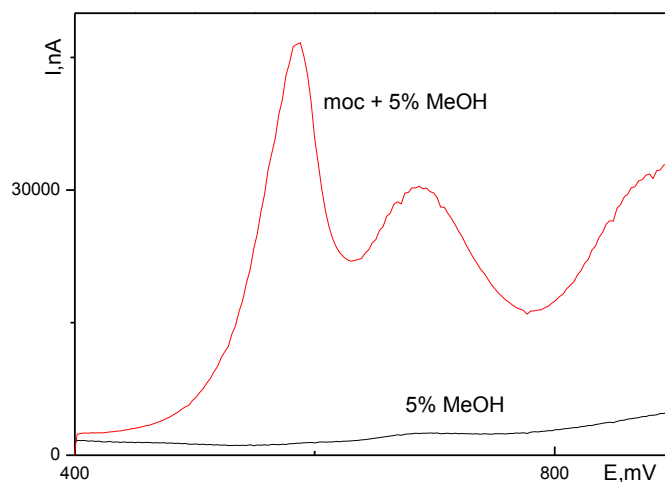
Obr. 26 DP voltamogramy po SPE na CPE. IS o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a BR pufru o pH 3, eluce 3ml vody (voda), eluce dalšími 3 ml 5% methanolu (A), eluce dalšími 3 ml 10% methanolu (B), vzorek o stejné koncentraci eluovaný pouze 3ml 5% MeOH (5%).



Obr. 27 DP voltamogramy na CPE po SPE. (Červeně) moč eluovaná 3 ml 5% MeOH, (černá) indoxylsulfát eluovaný 3 ml 5% MeOH.

5.2. SPE na uhlíkové filmové kompozitní elektrodě

Postup SPE byl prováděn tak, jak bylo optimalizováno u uhlíkové pastové elektrody a bylo ověřeno, jestli je citlivost elektrody k interferentům stejná jako na CPE. Testování tohoto postupu ve spikovaném vzorku moči (Obr. 28) ukazuje, že signál obsahuje velký počet interferentů a neumožňuje oddělení složek od matrice.



Obr. 28 DP voltamogramy po SPE. Měřeno na CFE. Červeně označená křivka zobrazuje SPE moči s 3 ml 5% MeOH, černá křivka SPE indoxylsulfátu s 3 ml 5% MeOH. Koncentrace roztoku indoxylsulfátu byla $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo prostudováno voltametrické stanovení indoxylsulfátu na dvou různých elektrodách, konkrétně na uhlíkové pastové elektrodě a na filmové kompozitní uhlíkové elektrodě. Byly zkoumány pH závislosti, opakovatelnost výsledků, možnost akumulace na elektrodě a kalibrační závislosti za optimálních podmínek s určením mezí detekce a stanovitelnosti.

Při studování elektrochemického chování na uhlíkové pastové elektrodě bylo zjištěno, že optimální prostředí pro měření je v BR pufru o pH 3. Byla prokázána dobrá opakovatelnost naměřených výsledků, ale je potřeba otírat před každým měřením elektrodu. Akumulace prakticky neprobíhala a nebyla použita pro další měření.

Při studování elektrochemického chování na uhlíkové filmové kompozitní elektrodě bylo zjištěno, že optimální prostředí pro měření je v BR pufru o pH 2. Nízká opakovatelnost naměřených výsledků při měření na jedné elektrodě rovněž vyžadovala použití nového povrchu elektrody pro každé měření. Při měření roztoku indoxylsulfátu nebyla potřebná akumulace pro další měření, voltamogramy byly téměř stejné.

Vypočtená mez stanovitelnosti píků měřených na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3,0 byla $0,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočtená mez stanovitelnosti píků měřených na uhlíkové kompozitní filmové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3,0 byla $1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Poslední část této práce byla zaměřena na extrakci na tuhé fázi. Optimalizovaný extrakční postup zahrnoval adsorpci indoxylsulfátu z roztoku o pH 3, promytí SPE kolonky 5 ml BR pufru o pH 8 a eluci 5% methanolem o objemu 3 ml, ale ani tímto postupem se nepodařilo extrahovat indoxylsulfát ze vzorku moči bez interferentů tak, aby mohl být voltametricky stanoven.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. da Silva, I. B.; Rangel, I. L.; Lima, R. M. L.; Lima, E. O.; de Medeiros, P. L.; Leite, S. P.: Antibacterial and antifungal activities of indican (indoxyl β -D-glucoside), *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(11), 200-205 (2016).
2. Pubchem : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007200>, staženo dne 8.12.2016.
3. Ayinuer, A.; Sumie, G.; Satsuki, U.; Fuyuhiko, N.; Toshimitsu, N.: Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats, *Nephrol Dial Transplant*, (6,)23 (1892-1901).
4. Niwa, T.; Takeda, N.; Tatematsu, A.; Maeda, K.: Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uraemic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography, *Clinical Chemistry* 34, 2264–2267 (1988).
5. Niwa, T.; Ise, M.: Indoxylsulfate, a circulating uraemic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 124, 96-104 (1994).
6. ACD/Labs (Calculated using Advanced Chemistry Development): <http://www.acdlabs.com>, staženo dne 8.12.2016
7. Wang, G.; Korfmacher, W. A.: Development of a biomarker assay for 3-indoxyl sulfate in mouse plasma and brain by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 23, 2061–2069 (2009).
8. Boelaert, J.; Lynen, F.; Glorieux, G.; Eloot, S.; Van Landschoot, M.; Waterloos, M. A.; Sandra, P.; Vanholder, R.: A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(6), 1937-47 (2013).

9. Kok, M.G.M.; G.W. Somsen; Jong, de G.J.: Comparison of capillary electrophoresis–mass spectrometry and hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry for anionic metabolic profiling of urine, *Talanta* 132, 1-7 (2015).
10. Anderson, G. M.; Purdy, C. W.: Liquid chromatographic-fluorometric system for the determination of indoles in physiological samples, *Analytical Chemistry* 51, 283-286 (1979).
11. Procházková, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů, *Chemické listy* 96, 827-852 (2002).
12. Švancara, I., Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod, *Chemické listy* 88, 138-146 (1994).
13. Zima, J.; Švancara, I.; Barek, J.; Vytřas K.: Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39, 204-227 (2009).
14. Navratil, T.; Senholdova, Z.; Shanmugam, K.; Barek, J.: Voltammetric determination of phenylglyoxylic acid in urine using graphite composite electrode, *Electroanalysis* 18, 201–206 (2006).
15. Stulik, K.; Pacakova, V.; Starkova, B.: Carbon pastes for voltammetric detectors in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 213, 41-46. (1981).
16. Renedo, O. D.; Alonso-Lomillo, M. A.; Martínez, M. J. A.: Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73, 202-219 (2007).
17. Falcicola, L.; Pifferi, V.; Mascheroni, E.: Platinum-Based and Carbon-Based screen printed electrodes for the determination of benzidine by differential pulse voltammetry, *Electroanalysis* 24, 767-775 (2012).

18. Ryabchikov, A. I.; Petrov, A. V.; Polkovnikova, N. M.; Struts, V. K.; Usov, Y. P.; Arfyev, V. P.: Carbon film deposition by powerful ion beams, *Surface and Coatings Technology* 201, 8499-8502 (2007).
19. Marcinauskas, L.; Valincius, V.; Grigonis, A.: Deposition and structure characterization of carbon films prepared at atmospheric pressure by plasma jet, *Surface and Coatings Technology* 205, 71-74 (2011).
20. Yosypchuk, B.; Barek, J.; Fojta, M.: Carbon powder based films on traditional solid electrodes as an alternative to disposable electrodes, *Electroanalysis* 18, 1126-1130 (2006).
21. Adams, R.: Carbon paste electrodes, *Analytical Chemistry* 30.9, 1576-1576 (1958).
22. Švancara, I.: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii, 49 - 58 (2006).
23. Barek, J.; Fischer, J.; Navratil, T.; Peckova, K.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds, *Electroanalysis*, 19-20, 2003-2014. (2007).
24. Švancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytřas, K.: Carbon paste electrodes in the new millenium, *Open Chemistry* 7.4, 598-656 (2009).
25. Švancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytřas, K.; Wang, J.: Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50 Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis, *Electroanalysis*, 21.1, 7-28 (2009).
26. Petersen, S. L.; Tallman, D. E.: Silver composite electrode for voltammetry, *Analytical Chemistry* 60, 82-86 (1988).

27. Ping, J. F.; Wu, J.; Ying, Y. B.; Wang, M. H.; Liu, G.; Zhang, M.: Development of a novel carbon composite electrode for trace determination of heavy metals in milk, *Transactions of the ASABE* 54, 1829-1835 (2011).
28. Merkoci, A.: Carbon nanotubes in analytical science, *Microchimica Acta* 152, 157-174 (2006).
29. Navratil, T.; Barek, J.; Kopanica, M.: Anodic stripping voltammetry using graphite composite solid electrode, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 74, 1807-1826 (2009).
30. Cespedes, F.; Alegret, S.: New materials for electrochemical sensing: glucose biosensors based on rigid carbon-polymer biocomposites, *Food Technology and Biotechnology* 34, 143-146 (1996).
31. Albertus, F.; Llerena, A.; Alpizar, J.; Cerda, V.; Luque, M.; Rios, A.; Valcarcel, M.: A PVC-graphite composite electrode for electroanalytical use, Preparation and some applications, *Analytica Chimica Acta* 355, 23-32 (1997)
32. Ping, J.; Wang, Y.; Wu, J.; Ying, Y.; Ji, F.: Determination of ascorbic acid levels in food samples by using an ionic liquid-carbon nanotube composite electrode, *Food Chemistry* 135, 362-367 (2012).
33. Freitas, K. H. G.; Fatibello-Filho, O.: Carbon composite electrode modified with copper(II) phosphate immobilized in a polyester resin for voltammetric determination of catechin in teas, *Analytical Letters* 43, 2091-2104 (2010).
34. Noskova, G.N.; Zakharova, E.A.; Kolpakova, N.A.; Kabakaev, A.S.: Electrodeposition and stripping voltammetry of arsenic(III) and arsenic(V) on a carbon black-polyethylene composite electrode in the presence of iron ions, *Journal of Solid State Electrochemistry* 16, 2459-2472 (2012).

35. Prasek, J.; Huska, D.; Jasek, O.; Zajickova, L.; Trnkova, L.; Adam, V.; Krizek, R.; Hubalek, J.: Carbon composite micro- and nano-tubes-based electrodes for detection of nucleic acids, *Nanoscale Research Letters* 6, 385-390 (2011).
36. Barsan, M. M.; Brett, C. M. A.: A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose, *Bioelectrochemistry* 76, 135–140 (2009).
37. Tallman, D. E.; Petersen, S. L.: Composite electrodes for electroanalysis – principles and applications, *Electroanalysis*, 2, 499-510 (1990).
38. Libansky, M.; Zima, J.; Barek, J.; Dejmkoval, H.: Construction of an Electrochemical Cell System Based on Carbon Composite Film Electrodes and its Application for Voltammetric Determination of Triclosan, *Electroanalysis* 26, 1920–1927 (2014).
39. Libansky, M.; Zima, J.; Barek, J.; Dejmkoval, H.: Voltammetric determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid on a disposable electrochemical measuring cell system with integrated carbon composite film electrodes, *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* (2016).