

VOLTAMPÉROMETRICKÉ STANOVENIE EPINEFRÍNU V ĽUDSKOM MOČI VYUŽITÍM BÓROM DOPOVANEJ DIAMANTOVEJ FILMOVEJ ELEKTRODY

JOZEF SOCHR a ĽUBOMÍR ŠVORC

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita
v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
lubomir.svorc@stuba.sk

Došlo 27.3.13, prijaté 10.6.13.

Kľúčové slová: epinefrín, bórom dopovaná diamantová
filmová elektroda, square-wave voltampérometria, detekčný
limit

Úvod

Epinefrín (EPI, Schéma 1) je hormón patriaci do skupiny tzv. katecholamínov tvoriaci sa v dreni nadobličiek. Má vazodilatačný účinok na cievy, uľahčuje dýchanie a zvyšuje odolnosť voči fyzickému a psychickému stresu. Je vhodnou voľbou pri liečbe anafylaktického šoku pri silných alergických reakciách a pôsobí aj ako kardiostimulant pri operačných zákrokoch¹. Jeho nízke koncentrácie (10^{-8} až 10^{-6} mol l⁻¹) v telesných tekutinách sú najčastejšie prejavom Parkinsonovej a Alzheimerovej choroby, schizofrénie a anorexie². Vyššie koncentrácie spôsobujú stres, nedostatok hormónov štítnej žľazy, náhle zlyhanie srdca alebo indikujú prítomnosť nádorov³. Z týchto dôvodov je spoľahlivé analytické stanovenie EPI v telesných tekutinách dôležitým aspektom v klinickej chémii. Navyše súčasný trend v analytickej chémii vyžaduje požadovaný analyt v danej matici stanoviť maximálne jednoducho a rýchlo, ale zároveň citlivo a selektívne.

Pre účely stanovenia EPI boli vo výskumných a klinických laboratóriách vypracované viaceré analytické postupy využívajúce HPLC^{4–6} a kapilárnu elektroforézu^{7–9}. Vďaka bázeickej povahe je možné EPI stanoviť aj pomocou ionexovej chromatografie¹⁰. V spektrálnych metódach sa na stanovenie EPI vo veľkej miere využívajú diazotačné¹¹,

enzymatické¹² a komplexotvorné reakcie¹³ a elektrochemiluminiscencia¹⁴. Separačné a spektrálne metódy (ich spojenie) ponúkajú výbornú citlivosť a selektivitu, často krát sú však cenovo a časovo náročné a práce (nutnosť predkoncentračného kroku).

Elektroanalytické metódy predstavujú vďaka svojej jednoduchosti, rýchlosti, cenovej a časovej nenáročnosti často spoľahlivú alternatívu k rutinne používaným separačným a spektrálnym metódam¹⁵. Na základe dostupných informácií z vedeckej literatúry možno konštatovať, že problematika elektroanalýzy EPI je výlučne spojená s využitím modifikovaných elektródových povrchov, obvykle za účelom zvýšenia citlivosti a selektivity stanovenia. Najčastejšími modifikátormi v týchto prípadoch sú uhľikové nanorúrky^{16–19}, polyméry na báze polymetoxifenolu^{20,21}, polypyrolu²², polyrutínu²³ a polytaurínu²⁴ a platinové^{25,26} alebo zlaté nanočastice^{22,27}. Využitie tých (nemodifikovaných) elektród je skôr rarita, čo súvisí s faktom, že pri elektrochemickom stanovení EPI dochádza k ireverzibilnej adsorpcii reakčných produktov elektródovej reakcie. Tu sa otvárajú možnosti pre využitie perspektívneho elektródového materiálu – bórom dopovaného diamantového filmu (BDD). Jeho hlavnými výhodami sú nízka kapacita elektródovej dvojvrstvy majúca za následok nízky šum, široký potenciálový rozsah (pri kvalitných filmoch až 3 V), mechanická robustnosť, biokompatibilita umožňujúca jednoduchú implantáciu týchto elektród do živého tkaniva a minimálna náchylnosť k pasivácii elektródových produktmi elektródovej reakcie vďaka parafinickému charakteru povrchu (sp³ hybridizované atómy „diamantového“ uhlíka)^{28–30}.

V tejto práci je pozornosť venovaná vývoju novej elektrochemickej metódy na stanovenie EPI využitím square-wave voltampérometrie na holej (nemodifikovanej) BDD elektróde. Je potrebné zdôrazniť, že stanovenie EPI na tomto perspektívnom elektródovom materiáli doposiaľ nebolo publikované v žiadnom referáte na základe dostupných informácií z vedeckej literatúry. Výnimku tvoria práce zaoberajúce sa elektrochemickou detekciou katecholamínov vrátane EPI na BDD elektróde využitím elektroforetických metód^{31,32}. V porovnaní s inými elektrochemickými metódami stanovenia EPI je významný aj fakt, že sa jedná o elektródový materiál nevyžadujúci chemickú modifikáciu svojho povrchu. Praktická aplikovateľnosť metódy je demonštrovaná na modelových vzorkách ľudského moču.

Experimentálna časť

Chemikálie

Zásobný roztok EPI (99,5%, p.a., Sigma-Aldrich, Bratislava, SR) o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ bol pripravený rozpustením príslušného množstva štandardu v metanole (99,5%, Centralchem, Bratislava, SR) a následne riedený deionizovanou vodou (Eurowater, Bratislava, SR) v objemovom pomere 1:10. Pracovné roztoky

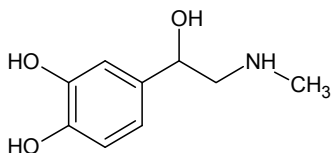


Schéma 1. Štruktúrny vzorec epinefrínu

nižších koncentrácií boli pripravené presným riedením zásobného roztoku s príslušným základným elektrolytom. Zriedené roztoky kyseliny dusičnej (65%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), sírovej (96%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorovodíkovej (30%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), chloristej (60%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a acetátový pufor boli použité ako základné elektrolyty. Acetátový pufor (ABS) s požadovaným pH bol prichystaný príslušným zmiešaním odpovedajúcich objemov $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny octovej (99,8%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Roztoky potenciálnych interferujúcich látok ako kyselina močová, močovina, kyselina askorbová, kyselina barbiturová, kyselina listová a glukóza (u všetkých čistota väčšia ako 99,5%, p.a., Zentiva, Hlohovec, SR) boli pripravené v deionizovanej vode. Zásobné roztoky boli uchovávané v chladničke pri teplote $+3^\circ\text{C}$.

Aparatúra

Voltampérometrické merania boli realizované pomocou elektrochemického analyzátora AUTOLAB PGSTAT 302N (EcoChemie, Holandsko), pričom obsluha a zber dát bola zabezpečená programom NOVA 1.9. V trojelektrodovom zapojení bola ako pracovná elektróda použitá komerčná BDD elektróda s priemerom aktívnej časti 3 mm, odporom $0,075 \Omega \text{ cm}$ a koncentráciou bóru 1000 ppm (Windsor Scientific, Berkshire, Veľká Británia), platinový drôtik ako pomocná elektróda a argentochloridová ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$) ako referenčná elektróda. Hodnoty pH boli merané na pH metri Model 215 s kombinovanou sklenou elektródou (Denver Instrument, USA).

Voltampérometrické merania

Príslušný objem zásobného roztoku EPI bol v odmernej banke doplnený základným elektrolytom na objem 25 ml a následne bol zaznamenaný príslušný voltampérogram na BDD elektróde. Všetky experimenty boli uskutočnené pri laboratórnej teplote. Ako voltampérometrické techniky pre účely práce boli použité cyklická (CV) a square-wave voltampérometria (SWV), pričom pred použitím boli optimalizované SWV inštrumentálne parametre (amplitúda, frekvencia a potenciál kroku). Povrch BDD elektródy bol vždy pred prvým meraním elektrochemicky predupravovaný pomocou cyklickej voltampérometrie (20 cyklov) v potenciálovom rozsahu -2 až $+2 \text{ V}$ v prostredí $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Následne bola elektróda opláchnutá deionizovanou vodou, jemne vyleštená navlhčeným kúskom odevu do zrkadlového lesku a pripravená na použitie.

Všetky voltampérogramy s výnimkou merania opakovateľnosti stanovenia (záznamy merané 50krát) boli nameované šesťkrát a následne štatisticky vyhodnotené. Pre potreby zostrojenia kalibračnej priamky a tvorby grafu bol použitý program OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) s pravdepodobnosťou $P = 95\%$ a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond,

USA). Detekčný limit (LOD) bol vypočítaný ako trojnásobok smerodajnej odchýlky úseku vydelený smernicou kalibračnej priamky (pre počet meraní $n = 6$).

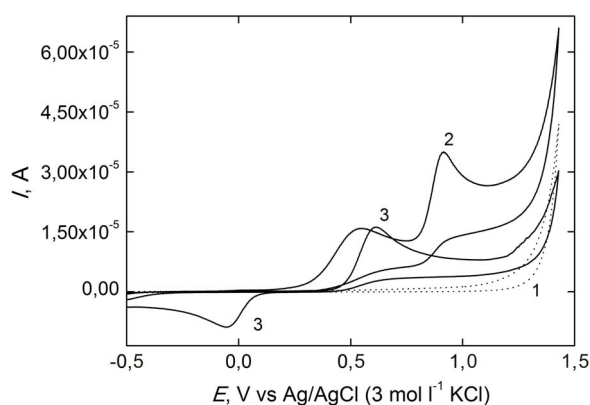
Priprava modelovej vzorky moču

Modelové vzorky moču od troch zdravých dobrovoľníkov (D1–D3) boli pripravené pridaním príslušného množstva zásobného roztoku EPI s koncentráciou $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ k 1 ml moču a zriedené základným elektrolytom na objem 25 ml. Dobrovoľníci boli nefajčiari a v danom období neužívali farmaceutické prípravky s obsahom EPI a iných elektroaktívnych látok (vitamíny, antibiotiká a analgetiká). Stanovenie bolo vykonané metódou prídavku štandardu (vždy štyri prídavky) kvôli eliminácii matricového efektu, pričom každé meranie bolo vykonané šesťkrát.

Výsledky a diskusia

Elektrochemické správanie EPI na BDD elektróde

V prvom kroku bolo pomocou cyklickej voltampérometrie (CV) študované elektrochemické správanie EPI na povrchu BDD elektródy. Pre tieto účely bol pripravený roztok EPI s koncentráciou $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v rôznych prostrediach. Cyklické voltampérogramy EPI v prostredí $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ a ABS (pH 6) s malým množstvom metanolu (objemový pomer metanolu k základnému elektrolytu 1:10) sú zobrazené na obr. 1. V prípade ABS (pH 6) boli v anodickej oblasti pozorované dva oxidačné píky pri potenciáloch $+0,5 \text{ V}$ a $+0,9 \text{ V}$, pričom každý prislúcha jedoelektrónovému procesu na povrchu elektródy (krivka 2). Tento jav bol pozorovaný pri pH hodnotách elektrolytu v rozmedzí 2–7. V zásaditom prostredí sa oxidačné píky EPI výrazne deformovali a súčasne narastalo



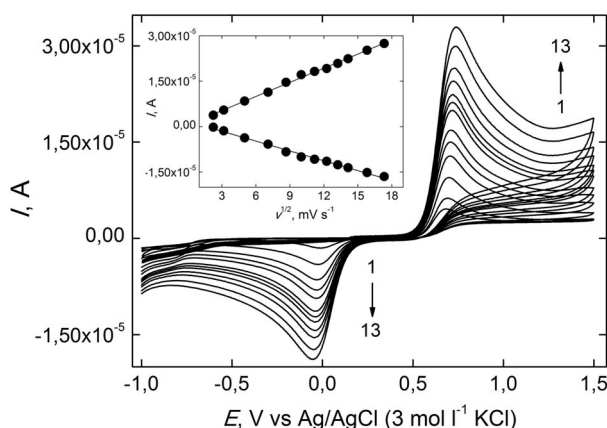
Obr. 1. Cyklické voltampérogramy základného elektrolytu $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ (krivka 1) a EPI ($c_{\text{EPI}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostredí ABS (pH 6):MeOH (10:1 v/v, krivka 2) a $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$:MeOH (100:1 v/v, krivka 3) na BDD elektróde pri polarizačnej rýchlosti 100 mV s^{-1}

pozadie (grafické výsledky neuvádzame). S klesajúcou hodnotou pH elektrolytu však klesal oxidačný pík pri +0,9 V a súčasne narastal oxidačný pík pri +0,5 V. V silne kyslom prostredí ($\text{pH} < 1$) sa oxidačný pík pri +0,9 V už neobjavoval. Treba podotknúť, že EPI ako sekundárny amín je vzhľadom na svoju bázičnú povahu v kyslom prostredí protonizovaný. Pre kvantifikačné účely bolo preto vhodné vybrať silno kyslé prostredie, kedy sa v príslušnom voltampérograme nachádza len jeden dobre definovaný oxidačný pík.

Z obr. 1 (krivka 3) je zrejmé, že EPI podlieha elektrochemickej premene v prostredí HClO_4 , čo sa prejavilo výrazným oxidačným píkom pri +0,6 V, pričom redukčný pík dosahoval maximum pri -0,1 V. Zvyškový prúd (jeho hlavnou zložkou je kapacitný prúd) bol nízky (krivka 1), čo potvrdzuje výhody a aj opodstatnenosť použitia BDD elektródy. Navyše slabo metanolový roztok HClO_4 vykazoval spomedzi ostatných študovaných kyselín (HNO_3 , H_2SO_4 , HCl) najmenší šum a vďaka najvyššiemu oxidačnému píku EPI predstavuje najlepšie médium pre kvantifikačné účely. Ako optimálna koncentrácia bola zo škály roztokov HClO_4 (0,1 až 2 mol l^{-1}) vybraná 0,5 mol l^{-1} . Pri elektrochemickej oxidácii EPI dochádza k výmene dvoch elektrónov a súčasne sa odštiepujú dva protóny za vzniku adrenalinínónu¹⁶.

Polarizačná rýchlosť (ν) má veľký význam pre charakterizáciu mechanizmu redoxného deja. Jednotlivé cyklické voltampérogramy boli registrované pri rôznych polarizačných rýchlostiach (5 až 500 mV s^{-1}) ako je uvedené na obr. 2. S rastúcou polarizačnou rýchlosťou narastala aj veľkosť oxidačného (I_{ox}) a redukčného prúdu (I_{red}) EPI, pričom obidva prúdy boli priamo úmerné druhej odmocnине polarizačnej rýchlosti ($\nu^{1/2}$) podľa rovníc (1) a (2):

$$I_{\text{ox}} (\text{A}) = (7,640 \pm 0,295) \cdot 10^{-7} + (1,553 \pm 0,027) \cdot 10^{-6} \nu^{1/2} (\text{mV s}^{-1}) \quad (1)$$



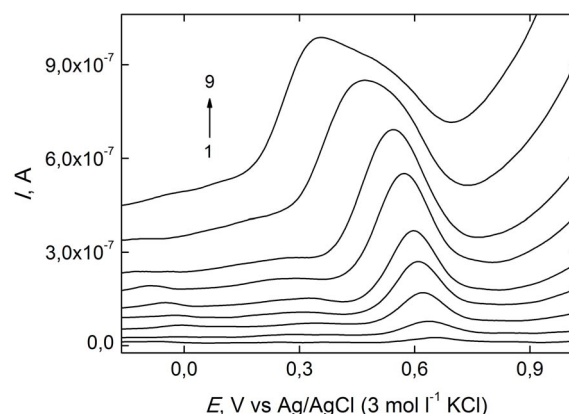
Obr. 2. Cyklické voltampérogramy EPI ($c_{\text{EPI}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostredí 0,5 mol l^{-1} HClO_4 :MeOH (10:1 v/v) na BDD elektróde pri rôznych polarizačných rýchlostiach: 5 (1), 10 (2), 25 (3), 50 (4), 75 (5), 100 (6), 150 (7), 175 (8), 200 (9), 250 (10), 300 (11), 400 (12) a 500 (13) mV s^{-1} . Zodpovedajúce lineárne závislosti I_{ox} a $I_{\text{red}} = f(\nu^{1/2})$ sú vložené vo vnútri grafu

$$I_{\text{red}} (\text{A}) = (5,721 \pm 0,317) \cdot 10^{-7} - (1,083 \pm 0,029) \cdot 10^{-6} \nu^{1/2} (\text{mV s}^{-1}) \quad (2)$$

Z hodnôt vysokého koeficientu determinácie a nízkeho úseku v daných rovniciach je zrejmé, že elektródový dej je výlučne kontrolovaný difúziou a nie napr. adsorpciou alebo kinetikou deja. Táto skutočnosť potvrdzuje výborné vlastnosti použitého elektródového materiálu, ktorý je vďaka svojmu parafinickému charakteru málo náchylný na adsorpciu polárnych zlúčenín. Bol pozorovaný aj mierny posun oboch potenciálových maxim smerom k pozitívnejším (oxidačný pík) a negatívnejším (redukčný pík) potenciálom (obr. 2).

Voltampérometrické stanovenie EPI

Square-wave voltampérometria (SWV) bola použitá ako citlivá elektrochemická metóda pre účely zostrojenia kalibračnej krivky, t.j. závislosti výšky oxidačného píku od koncentrácie EPI. Najskôr bolo potrebné optimalizovať SWV inštrumentálne parametre vplyvajúce na polohu, veľkosť a tvar oxidačného píku EPI (amplitúda, frekvencia a potenciál kroku). Pre tieto účely bolo vybraných niekoľko hodnôt amplitúdy v rozmedzí od 10 do 300 mV pri konštantnej frekvencii 50 Hz a potenciálu kroku 5 mV. Výsledky sú zobrazené na obr. 3. Zistilo sa, že čím väčšia je hodnota amplitúdy, tým je aj prúdová odozva EPI väčšia, avšak tento efekt je súčasne sprevádzaný aj rozširovaním oxidačného píku. Nad hodnotou 150 mV bol oxidačný pík príliš široký, keď jeho základná šírka presahovala cez 0,4 V. V prípade frekvencie bol študovaný rozsah 10 až 100 Hz a SW voltampérogramy boli registrované pri konštantnej hodnote amplitúdy (100 mV). S rastúcou frekvenciou sa oxidačný pík EPI zväčšoval, pričom stabilná a najvyššia hodnota bola pozorovaná pri 50 Hz (grafické výsledky neuvádzame). V ďalších meraniach bola preto



Obr. 3. SW voltampérogramy EPI ($c_{\text{EPI}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v prostredí 0,5 mol l^{-1} HClO_4 :MeOH (10:1 v/v) na BDD elektróde pre rôzne amplitúdy: 10 (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4), 100 (5), 150 (6), 200 (7), 250 (8) a 300 (9) mV pri frekvencii 50 Hz a potenciálovom kroku 5 mV

použitá amplitúda s hodnotou 100 mV, frekvencia 50 Hz a potenciál kroku 5 mV. Následne boli optimalizované hodnoty využité pri meraniach kalibračných roztokov EPI.

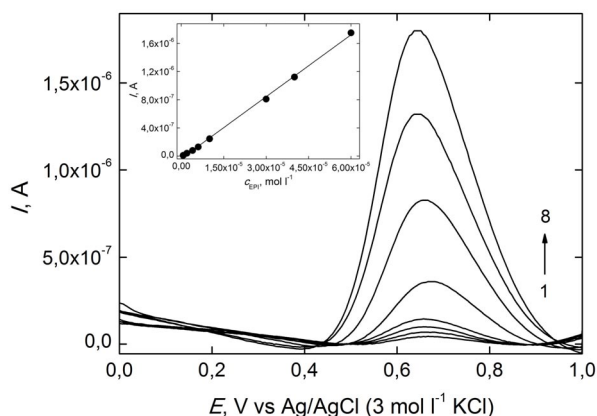
Na obr. 4. sú zobrazené SW voltampérogramy rôznych koncentrácií EPI v 0,5 mol l⁻¹ HClO₄ s malým množstvom metanolu (10:1, v/v) na BDD elektróde. Dynamický rozsah charakterizujúci rozsah hodnôt koncentrácie EPI (c_{EPI}), v ktorom je prúdová odozva EPI (I) lineárna, predstavuje $7 \cdot 10^{-7}$ až $6 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ (obr. 4). Metódou najmenších štvorcov boli zistené parametre kalibračnej priamky pre daný rozsah (rovnica (3)):

$$I \text{ (A)} = (-85 \pm 2) \cdot 10^{-9} + (293 \pm 4) \cdot 10^{-4} c_{\text{EPI}} \text{ (mol l}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

$(R^2 = 0,998)$

Detekčný limit (LOD) dosiahol hodnotu $2 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹, čo je dôsledkom vysokého pomeru signálu k šumu (S/N). Opakovateľnosť metódy vyjadrená vo forme relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) predstavuje 3,5 % pre päťdesiat za sebou idúcich meraní vykonaných na koncentračnej hladine EPI $1 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ v krátkych časových intervaloch, na tom istom prístroji a tým istým pracovníkom. Nízka RSD hodnota potvrdzuje výborné vlastnosti BDD elektródy, keď adsorpcia produktov elektródovej reakcie EPI je vďaka spomínanému parafrinickému charakteru materiálu zanedbateľná. Na základe vyššie uvedených faktov možno konštatovať, že daná voltampérometrická metóda na stanovenie EPI má výbornú opakovateľnosť.

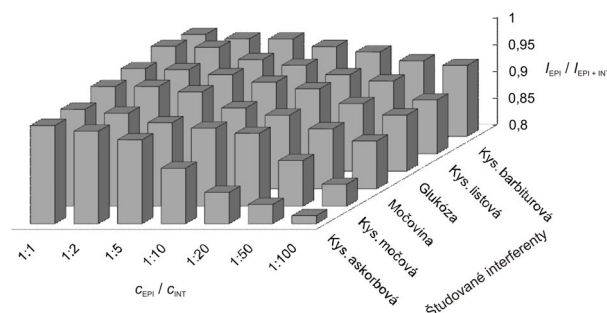
Interferenčné štúdium bolo vykonané za účelom overenia dostatočnej selektivity navrhovanej metódy. Moč je z analytického hľadiska zložitá matrica s premenlivým zložením závisiacim od množstva faktorov (životospráva, príjem jedla atď.). Jednotlivé merania boli uskutočnené na konštantnej koncentračnej úrovni EPI $1 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ za rovnakých experimentálnych podmienok. Z pomedzi širokej škály potenciálnych interferentov bežne sa nachádzajú-



Obr. 4. SW voltampérogramy EPI v slabo metanolovom prostredí 0,5 mol l⁻¹ HClO₄ na BDD elektróde pre koncentrácie c_{EPI} : $7 \cdot 10^{-7}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-5}$ (5), $3 \cdot 10^{-5}$ (6), $4 \cdot 10^{-5}$ (7) a $6 \cdot 10^{-5}$ (8) mol l⁻¹. SWV parametre: amplitúda 100 mV, frekvencia 50 Hz a potenciál kroku 5 mV. Z odpovedajúcej kalibračnej priamky $I = f(c_{\text{EPI}})$ je vložená vo vnútri grafu

cich v moči boli na základe aktuálnej dostupnosti referenčných materiálov v laboratóriu vybrané kyselina močová, močovina, kyselina askorbová, kyselina barbiturová, kyselina listová a glukóza. O týchto látkach je všeobecne známe, že okrem významnej biologickej účinnosti sú aj elektrochemicky aktívne. Výsledky ukázali (obr. 5), že 100násobný nadbytok kyseliny barbiturovej, kyseliny listovej a glukózy nemá závažný vplyv na veľkosť prúdovej odozvy oxidácie EPI (zmena signálu je menšia ako 10 %). V prípade močoviny a kyseliny močovej bol zvýšený vplyv pozorovaný pri 50násobnom nadbytku (zmena signálu väčšia ako 10 %). Najväčší vplyv vykazovala kyselina askorbová (už pri koncentračnom pomere 1:20), čo súvisí s výrazným prekryvom jej oxidačného píku s píkom EPI a následných ťažkostiach pri vyhodnocovaní signálu. V tejto súvislosti bola problematika selektivity stanovenia štruktúrne podobných neurotransmiterov v prítomnosti kyseliny askorbovej na BDD elektróde predmetom niekoľkých štúdií^{33–35}. Navrhovanú metódu možno považovať za dostatočne selektívnu a aplikovať ju na modelové vzorky ľudského moču.

Modelové vzorky moču od troch dobrovoľníkov (D1–D3) boli študované za účelom overenia správnosti a praktickej aplikovateľnosti navrhovanej metódy. Výsledky vyjadrené ako interval spoľahlivosti pre $P = 95 \%$ a príslušné výťažnosti sú prehľadne zobrazené v tab. I. Výťažnosti (vypočítané ako podiel stanoveného množstva k pridanému množstvu EPI) poukazujú na správnosť metódy, keď ich hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 98 až 102 %. Ako ilustratívny príklad, obr. 6 znázorňuje SW voltampérogramy analýzy vzorky moču jedného z dobrovoľníkov. Z obrázku je zrejmé, že voltampérogram modelovej vzorky zriedeného moču (krivka 2) vykazoval pomerne vysoké pozadie. S postupnými prídavkami štandardu však prúdová odozva oxidácie EPI proporcionálne narastala.

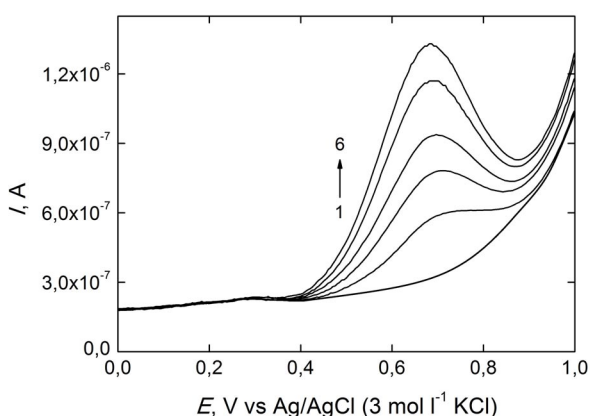


Obr. 5. Vplyv vybraných interferentov (INT) vyjadrený ako pomer prúdovej odozvy EPI bez interferentu (I_{EPI}) a s príslušným nadbytkom interferentu ($I_{\text{EPI} + \text{INT}}$) pre rozličné koncentračné pomery ($c_{\text{EPI}}/c_{\text{INT}}$) v prostredí 0,5 mol l⁻¹ HClO₄:MeOH (10:1 v/v) na BDD elektróde

Tabuľka I

Analýza EPI navrhovanou metódou v modelových vzorkách moču ($n = 6$)

Vzorka	Pridaná koncentrácia [mol l ⁻¹]	Stanovená koncentrácia ^a [mol l ⁻¹]	Výťažnosť [%]
D1	$6,19 \cdot 10^{-6}$	$(6,29 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	102
D2	$5,54 \cdot 10^{-6}$	$(5,60 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$	102
D3	$7,86 \cdot 10^{-6}$	$(7,73 \pm 0,17) \cdot 10^{-6}$	98

^a Interval spoľahlivosti vypočítaný podľa $[\bar{x} \pm t_{n-1,\alpha} SD/n^{1/2}]$; $t_{5; 0,05} = 2,0150$ 

Obr. 6. SW voltampérogramy EPI v prostredí $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4\text{:MeOH (10:1 v/v)}$ na BDD elektróde pre modelovú vzorku moču s obsahom: 0 (1), $6,19 \cdot 10^{-6}$ (2) a po prídavku štandardu: $3,02 \cdot 10^{-6}$ (3), $1,01 \cdot 10^{-5}$ (4), $2,19 \cdot 10^{-5}$ (5) a $2,53 \cdot 10^{-5}$ (6) mol l^{-1} . SWV parametre: amplitúda 100 mV, frekvencia 50 Hz a potenciál kroku 5 mV

V porovnaní s inými elektrochemickými metódami stanovenia EPI uvedených v tab. II je LOD porovnateľný s hodnotami LOD dosiahnutými na chemicky modifikovaných povrchoch. To dokazuje výborné vlastnosti použitého elektródového materiálu z pohľadu citlivosti a to bez nutnosti chemickej modifikácie jeho povrchu. Navyše príprava modifikovaných elektród je niekedy časovo náročný proces, ktorý zahŕňa naviazanie modifikátora na povrch pracovnej elektródy za účelom zvýšenia citlivosti alebo selektivity stanovenia požadovaného analytu, pričom dosiahnuté výsledky sú často krát slabšie reprodukovateľné. V praxi v procese analýzy často krát nie je potrebné modifikovať povrch elektródy za účelom zlepšenia analytických charakteristík. Tento fakt jednak redukuje náklady a celkový počet operácií v analytickom postupe (znižuje riziko chýb merania) a rovnako aj znižuje potrebné zručnosti analytického chemika súvisiace s prípravou chemicky modifikovaného povrchu elektródy.

Tabuľka II

Elektrochemické metódy stanovenia EPI na chemicky modifikovaných elektródových povrchoch a ich porovnanie s BDD elektródou

Elektróda	Modifikátor	Technika	LDR [mol l ⁻¹]	LOD [mol l ⁻¹]	Použitie	Lit.
GCE	HT/MWCNT	DPV	$2 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-8}$	Moč	16
CPE	FePC/MWCNT	DPV	–	$2 \cdot 10^{-7}$	Sérum	17
GCE	SWCNT/CHIT/IL	DPV	$1 \cdot 10^{-6} - 5,8 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-8}$	Moč, krv	18
GCE	PP/MWCNT	DPV	$1 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-8}$	Sérum	19
AuE	PMP	DPV	–	$1 \cdot 10^{-7}$	–	20
GCE	PMP	SWV	$7,5 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	Liečivá	21
GCE	Au/PP	DPV	$3 \cdot 10^{-7} - 2,1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-8}$	Moč	22
PIGE	PR	DPV	$3 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-7}$	–	23
GCE	PT	DPV	$2 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-7}$	–	24
CPE	PtNP/IL/LAC	SWV	$9,9 \cdot 10^{-7} - 2,1 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-7}$	Liečivá	25
AuE	AuNP/DTT	CV	$1 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-8}$	Liečivá	27
BDDE	–	SWV	$7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-7}$	Moč	–

Záver

V tejto práci sme sa zaoberali vývojom novej metódy na stanovenie epinefrínu (EPI) využitím BDD elektródy ako citlivého elektrochemického senzora bez chemickej modifikácie povrchu. Navrhovaná analytická metóda je jednoduchá, rýchla a dostatočne citlivá v porovnaní s inými elektrochemickými metódami stanovenia EPI využívajúcimi rôzne modifikátory pre účely zvýšenia citlivosti a selektivity. Relatívne nízky detekčný limit ($2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a široký lineárny dynamický rozsah ($7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) boli dosiahnuté v slabo metanolovom prostredí $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ využitím square-wave voltampérometrie. Selektivita metódy je postačujúca v prítomnosti nízkych koncentrácií kyseliny askorbovej. Praktická aplikovateľnosť metódy bola overená na modelových vzorkách ľudskej moču, pričom vysoké hodnoty výťažnosti (98–102 %) poukazujú aj na správnosť metódy. Navrhovaný postup zapadá do koncepcie zelenej analytickej chémie a ponúka citlivú možnosť pre monitorovanie obsahu EPI v ľudskom moči. Práca nadväzuje aj na aktuálny trend v oblasti využitia nových elektródových materiálov na riešenie úloh potravinárskej, klinickej a environmentálnej stopovej analýzy v našom laboratóriu.

Práca vznikla za podpory Vedeckej grantovej agentúry VEGA, projekt č. 1/0051/13 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0797-11.

Zoznam symbolov a skratiek

ABS	acetátový pufo
BDD	bórom dopovaný diamantový film
CHIT	chitozán
CPE	uhlíková pastová elektróda
CV	cyklická voltampérometria
DTT	ditiotreitol
DPV	diferenčná pulzová voltampérometria
EPI	epinefrín
GCE	elektróda zo sklovitého uhlíka
HT	hematoxylin
IL	iónová kvapalina
LAC	laktóza
LOD	detekčný limit
LDR	lineárny dynamický rozsah
MWCNT	mnohostenná uhlíková nanorúrka
NP	nanočastica
PC	ftalocyanin
PIGE	parafrínom impregnovaná uhlíková elektróda
PMP	polymetoxifenol
PP	polypyrol
PR	polyrutín
PT	polytaurín
RSD	relatívna smerodajná odchýlka
S/N	pomer signálu k šumu
SWCNT	jednostenná uhlíková nanorúrka
SWV	square-wave voltampérometria

LITERATÚRA

1. Linner R., Werner O., de-Sa V. P., Cunha-Goncalves D.: Resuscitation 83, 1298 (2012).
2. Xu Y., Yan J., Zhou P., Li J., Gao H., Xia Y., Wang Q.: Prog. Neurobiol. 97, 1 (2012).
3. George N., Peter V. S., Peter M. C. S.: Gen. Comp. Endocr. 181, 122 (2013).
4. Fotopoulou M. A., Ioannou P. C.: Anal. Chim. Acta 462, 179 (2002).
5. Lin Z., Wu X., Lin X., Xie Z.: J. Chromatogr., A 1170, 118 (2007).
6. Sakaguchi Y., Youshida H., Hayama T., Itoyama M., Todoroki K., Yamaguchi M., Nohta H.: J. Chromatogr., A 1218, 5581 (2011).
7. Sängers van de Griend C. E., Ek A. G., Widahl-Näsman M. E., Andersson E. K. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 77 (2006).
8. Schwarz M. A., Hauser P. C.: J. Chromatogr., A 928, 225 (2001).
9. Wei S., Song G., Lin J. M.: J. Chromatogr., A 1098, 116 (2005).
10. Hay M., Mormède P.: J. Chromatogr., B 703, 15 (1997).
11. Nagaraja P., Vasantha R. A., Sunitha K. R.: Talanta 55, 1039 (2001).
12. Zhu M., Huang X., Li J., Shen H.: Anal. Chim. Acta 357, 261 (1997).
13. Du J., Shen L., Lu J.: Anal. Chim. Acta 489, 183 (2003).
14. Li F., Cui H., Lin X. Q.: Anal. Chim. Acta 471, 187 (2002).
15. Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: Chem. Listy 103, 889 (2009).
16. Zare H. R., Nasirizadeh N.: Sens. Actuators, B 143, 666 (2010).
17. Patrascu D., David I., David V., Mihailciuc C., Stamin I., Ciurea J., Nagy L., Nagy G., Ciucu A. A.: Sens. Actuators, B 156, 731 (2011).
18. Shahrokhian S., Saberi R. S.: Electrochim. Acta 57, 132 (2011).
19. Beitollahi H., Karimi-Maleh H., Khabazzadeh H.: Anal. Chem. 80, 9848 (2008).
20. Erdoğan G.: J. Anal. Chem. 57, 620 (2002).
21. Aslanoglu M., Kutluay A., Karabulut S., Abbasoglu S.: J. Chin. Chem. Soc. 55, 794 (2008).
22. Li J., Lin X. Q.: Anal. Chim. Acta 596, 222 (2007).
23. Jin G. P., Chen Q. Z., Ding Y. F., He J. B.: Electrochim. Acta 52, 2535 (2007).
24. Wang Y., Chen Z. Z.: Colloids Surf., B 74, 322 (2009).
25. Brondani D., Scheeren C. W., Dupont J., Vieira I. C.: Sens. Actuators, B 140, 252 (2009).
26. Thiagarajan S., Chen S. M.: J. Solid State Electrochem. 13, 445 (2009).
27. Wang L., Bai J., Huang P., Wang H., Zhang L., Zhao Y.: Electrochem. Commun. 8, 1035 (2006).
28. Musilová J., Barek J., Pecková K.: Chem. Listy 103,

- 469 (2009).
29. Maixnerová L., Pecková K., Barek J.: Chem. Listy 103, s175 (2009).
 30. Kraft A.: Int. J. Electrochem. Sci. 2, 355 (2007).
 31. Shin D. C., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A., Wang J.: Anal. Chem. 75, 530 (2003).
 32. Park J., Quaiserova-Mocko V., Peckova K., Galligan J. J., Fink G. D., Swain G. M.: Diamond Relat. Mater. 15, 761 (2006).
 33. Suzuki A., Ivandini T. A., Yoshimi K., Fujishima A., Oyama G., Nakazato T., Hattori N., Kitazawa S., Einaga Y.: Anal. Chem. 79, 8608 (2007).
 34. Kondo T., Niwano Y., Tamura A., Imai J., Honda K., Einaga Y., Tryk D. A., Fujishima A., Kawai T.: Electrochim. Acta 54, 2312 (2009).
 35. Medeiros R. A., Benchick A., Rocha-Filho R. C., Fati-bello-Filho O., Saidani B., Debiemme-Chouvy C., Deslouis C.: Electrochem. Commun. 24, 61 (2012).

J. Sochr and E. Švorc (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Voltammetric Determination of Adrenaline in Human Urine Using Boron-Doped Diamond Film Electrode**

An unmodified boron-doped diamond (BDD) electrode was used in combination with square-wave voltammetry (SWV) in a simple, rapid and inexpensive method for the detection and determination of adrenaline. A low detection limit of $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ attained on BDD electrode was due to a very high signal-to-noise (S/N) ratio. The proposed procedure was applied to analysis of human urine spiked with adrenaline giving good recovery values. Matrix effects did not present any significant interference. BDD electrode may be used as a sensitive drug sensor in clinical analysis of various biologically active compounds and may replace complex and expensive chromatographic and spectral methods. However, the usefulness of this method can be limited in clinical analysis in the presence of other drugs in urine, e.g. ascorbic acid and uric acid.