

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2016

Bc. Soňa Záluská



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Vývoj senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce: Bc. Soňa Záluská

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martina Turchichová

Kladno 2016

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2015/2016

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Bc. Soňa Záluská**
Studijní obor: Biomedicínský inženýr
Téma: **Vývoj senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K**
Téma anglicky: Sensor development for the measurement of vitamin K concentration

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vitamín K je důležitým kofaktorem řady biochemických procesů, zejména hemokoagulace. Přesto v současné době v klinicko-biochemické praxi neexistuje běžně používaná metodika pro rychlé stanovení vitamínu K. Na základě údajů dostupných v literatuře definujte parametry, které ovlivňují voltametrické stanovení vitamínu K a dalších chinonů. S využitím standardu vitamínu K stanovte sensitivitu dané metody, detekční limit a oblast stanovitelnosti, přesnost stanovení a jeho selektivitu. Podle získaných poznatků navrhnete konstrukci senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K v diagnostické praxi.

Seznam odborné literatury:

- [1] Shearer, M.J., Seghatchian, M.J., Vitamin K and Vitamin K-Dependent Proteins: Analytical, Physiological, and Clinical Aspects, ed. 1, CRC Press, Inc., 1993, ISBN 0-8493-6423-X
- [2] Fei, J., Wen, X., Zhang, Y., Yi, L., Chen, X., Cao, H. , Voltammetric determination of trace doxorubicin at a nano-titania/nafion composite film modified electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide, Microchimica acta, ročník 164, číslo 1-2, 2009, 85-91 s.
- [3] Kishikawa, N., Kuroda, N. , Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ročník 87, 2014, 261-270 s.

Vedoucí: Ing. Martina Turchichová, Ph.D.
Konzultant: Ing. Zuzana Fílová, RNDr. Jan Krejčí, Ph.D.

Zadání platné do: 20.08.2017

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 20.01.2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Vývoj senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 20.05.2016

.....

Bc. Soňa Záluská

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce Ing. Martině Turchichové, Ph.D., za odborné vedení a předávání cenných vědomostí. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zuzaně Fílové za odbornou pomoc.

Také děkuji firmě BVT Technologies, a.s. a zvláště RNDr. Janu Krejčímu, Ph.D., za možnost naměření prvotních dat a za nahlédnutí do jejich firmy a vývoje.

V neposlední řadě děkuji svému manželovi a celé rodině za podporu při studiu.

Tato práce byla podpořena grantem Zdroje OP VaVpI a státního rozpočtu ČR v rámci projektu „Infrastruktura pro biomedicínské inženýrství II. (BIOKOS II.)“ (reg.č. CZ.1.05/4.1.00/11.0253).

Název diplomové práce:

Vývoj senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K

Abstrakt:

V této práci je popsáno stanovení koncentrace a měření oxidačně-redukčních vlastností vitamínu K (fylochinonu) pomocí elektrochemických analytických technik. Existence vitamínu K a jeho chování je proměřeno pomocí tištěných tříelektrodových tlustovrstvých senzorů. V teoretické části se práce zabývá způsoby a principy detekce voltametrického měření vitamínu K a rozebírá stávající metody dle literatury. V praktické části se práce věnuje proměření vitamínu K v různých podmínkách při použití více druhů elektrod a také při různých nastaveních parametrů. Dále práce rozebírá výsledky praktické části, navrhuje neoptimálnější parametry pro stanovení koncentrace vitamínu K novým způsobem.

Klíčová slova:

Vitamín K, fylochinon, Kanavit, voltametrie, senzor.

Master's Thesis title:

Sensor development for the measurement of vitamin K concentration

Abstract:

The thesis describes the determination and concentration measurements of redox properties of vitamin K (phylloquinone) by electrochemical analytical techniques. Existence of vitamin K and its behavior is probed with the three-electrode printed thick-film sensors. The theoretical part deals with the methods and principles of detection voltammetric measurements of vitamin K and discusses existing methods according to the literature. The practical part deals with the measurement of vitamin K in different conditions using several types of electrodes and at different parameters. The thesis also analyzes the results of the practical part, proposes the optimal parameters for determining the concentration of vitamin K in a new way.

Key words:

Vitamin K, phylloquinone, Kanavit, voltammetry, sensor.

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	10
1 Úvod	11
1.1 Motivace.....	11
1.2 Cíle práce.....	12
2 Současný stav řešené problematiky	13
2.1 Stanovení vitamínu K cyklickou voltametří	13
2.2 Tlustovrstvé elektrochemické senzory	15
3 Materiály a metodika	20
3.1 Instrumentace	20
3.2 Chemikálie	21
3.3 Použité metody.....	21
3.3.1 Pozadí experimentu a šumové vlastnosti přístroje a vliv míchání ..	22
3.3.2 Cyklická voltametrie vitamínu K	23
3.3.3 Průtoková amperometrie Kanavitu.....	25
4 Výsledky.....	27
4.1 Pozadí přístroje a míchání	27
4.1.1 Šumové vlastnosti přístroje a ověření funkčnosti voltametrického systému	27
4.1.2 Vliv míchání.....	28
4.2 Cyklická voltametrie vitamínu K	29
4.2.1 Měření s chloroformem.....	29
4.2.2 Měření s propanolem.....	29
4.2.3 Měření s acetonitrilem.....	31
4.2.4 Měření bez organického rozpouštědla s destilovanou vodou s přídavkem 1M KCl.....	38
4.2.5 Cyklická voltametrie standardu vitamínu K.....	39

4.2.6	Měření cyklické voltametrie kyseliny sorbové	41
4.3	Průtoková amperometrie vitamínu K	43
4.3.1	Měření průtokové amperometrie s grafitovou elektrodou.....	43
4.3.2	Měření průtokové amperometrie s platinovou elektrodou	44
5	Diskuse	47
5.1	Použití přístroje	47
5.2	Vliv míchání.....	47
5.3	Cyklická voltametrie Kanavitu.....	47
5.4	Cyklická voltametrie standardu vitamínu K.....	49
5.5	Průtoková amperometrie vitamínu K	50
5.6	Senzitivita (citlivost) dané metody.....	50
5.7	Detekční limit a oblast stanovitelnosti	51
5.8	Přesnost stanovení a jeho selektivita.....	51
5.9	Konstrukce	52
6	Závěr.....	53
	Seznam použité literatury	54
	Seznam obrázků a příloh.....	56

Seznam symbolů a zkratk

Fe/Fe – Fe(CN)₆, redoxní pár jako elektrochemický standard

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC – FL – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem

LC-APCI(+)-MS/MS – spojení kapalinová chromatografie s ionizací za atmosférického tlaku s tandemovou hmotnostní spektrometrií

LOD – limit of detection - mez detekce

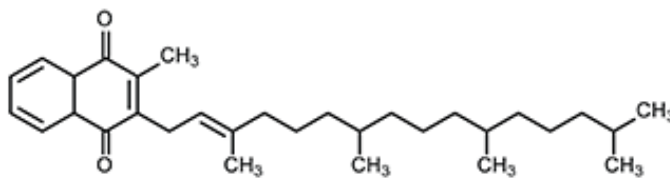
LOQ – limit of quantification – mez stanovitelnosti

1 Úvod

Vitamín K je vitamín rozpustný v tucích, který je důležitý pro správné srážení krve. Důležité tedy je i správné stanovení jeho koncentrace. Práce se zabývá jak analýzou možností stanovení koncentrace vitamínu K, tak aplikací jeho voltametrického stanovení na vyvíjený senzor.

1.1 Motivace

Vitamín K je esenciální kofaktor v syntéze aktivních krevních srážecích faktorů II, VII, IX a X, dále je významný i v procesu mineralizace kostí [1]. Vitamín K patří mezi chinony, je to derivát naftochinonu. Na obrázku 1 je jeho chemická struktura.



Obrázek 1 – Chemická struktura vitamínu K [14]

Hlavní dietní forma vitamínu K je fylochinon (vitamín K1), který je vytvářen zelenými rostlinami a je přítomný v potravinách rostlinného původu, zejména v zelené listové a košťálové zelenině [2]. Z tohoto důvodu je měření plazmatické koncentrace vitamínu K (0,3 – 2,7 nmol/L [3]) užitečným nástrojem stavu vitamínu K u člověka [4]. Důvodem pro hledání možnosti jeho stanovení je rostoucí zájem o jeho biochemické funkce a metabolismus vitamínu K *in vivo*. Praktický důvod potřeby jeho stanovení je antikoagulační léčba, která je v dnešní době realizována právě antagonisty vitamínu K – tedy warfarinem a podobnými preparáty, které jsou velmi často užívány [5] a [6]. Možnosti stanovení vitamínu K má například potenciál zlepšit farmakokinetické studie [7].

Zásadním problémem ve stanovení koncentrace vitamínu K je složitost a finanční nákladnost dosavadních postupů. Je třeba zajistit selektivitu a senzitivitu stanovení odpovídajícím reálným vzorkům, zejména vzorkům plazmy. Mezi analytické metody pro stanovení koncentrace vitamínu K, které poskytují efektivní senzitivitu, patří např. HPLC-FL s redukční kolonou obsahující platinu jako katalyzátor [8],

LC-APCI(+)-MS/MS [9] a modifikovaná HPLC metoda s fluorescenční detekcí po postkolonové derivatizaci se zinkem ve vzorcích séra (validována pro analýzu na vitamínu K), kde je limit detekce (LOD) 0,015 ng/mL a mez stanovitelnosti (LOQ) 0,15 ng/mL. Metoda je vhodná pro rutinní analýzu plazmy nebo séra vitamínu K [7]. Rutinní analýza v běžné klinické laboratoři však v ČR není dostupná, přestože by byl o ní zájem. Např. v Pražské nemocnici Motol potřebují stanovovat vitamín K a kvůli problémům ve stanovení s drahými komerčně dostupnými kity si vyvíjejí pro HPLC svůj vlastní kit [22].

1.2 Cíle práce

Cílem je analyzovat možnosti stanovení koncentrace vitamínu K, navrhnout druh senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K, najít optimální měření koncentrace pro senzor. Je možné použít HPLC senzory, které jsou však finančně vysoce nákladné. Alternativou je stanovení pomocí enzymatických, potenciometrických či voltametrických senzorů. Zatím se zdá nejschůdnější řešení pomocí elektrochemie, zvláště voltametrie, kde kromě zjištění koncentrace vitamínu K je možno sledovat i jeho chování (oxidačně-redukční cyklus).

Tato práce je zaměřena na stanovení koncentrace vitamínu K cyklickou voltametrií a průtokovou amperometrií s využitím tříelektrodových senzorů a nalezení optimálních parametrů a použitých chemikálií. V budoucnu je i vize kontinuálního měření jeho aktivity a využití v diagnostické praxi. Dle literatury z let 1984–1993 byly získány některé experimentální i teoretické údaje existencí elektrochemických vlastností vitamínu K, ale konkrétní metody nebyly zavedeny do běžné praxe [10]. Avšak v posledních letech, kdy byl voltametrií stanovován např. vitamín K₃ (menadion), se k voltametrii vědci postupně vrací díky krátkému času analýzy, levnějším nákladům na činidla a jednoduššímu stanovení s dostatečnými selektivními a senzitivními vlastnostmi [11].

Cílem práce je na základě údajů dostupných v literatuře definovat parametry, které ovlivňují voltametrické stanovení vitamínu K. S využitím standardu vitamínu K stanovit sensitivitu dané metody, detekční limit a oblast stanovitelnosti, přesnost stanovení a jeho selektivitu. Dále podle získaných poznatků navrhnout typ senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K v diagnostické praxi.

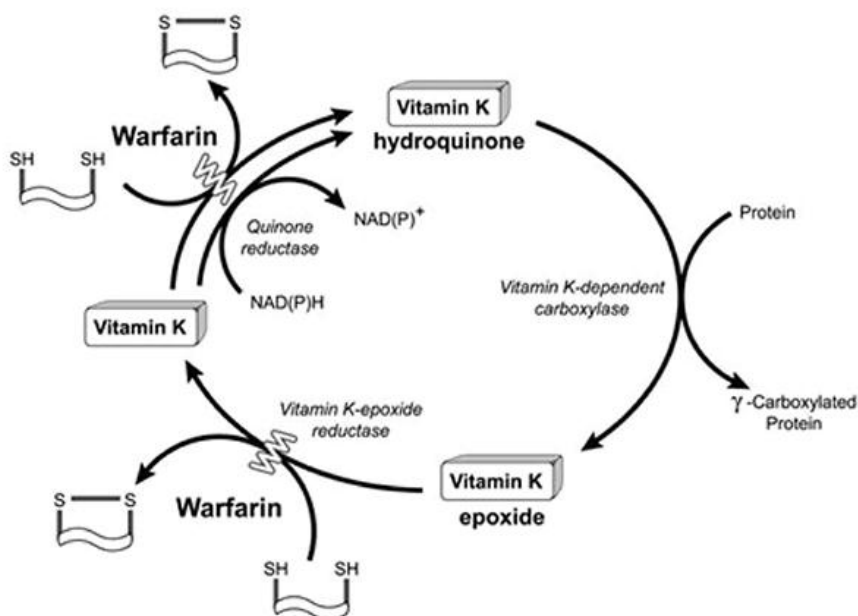
2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Stanovení vitamínu K cyklickou voltametrií

Cyklická voltametrie je metoda odvozená od polarografie, kde zkoumanou látkou prochází elektrický proud. Při cyklické voltametii je potenciál aplikován na elektrody, od počátečního napětí je lineárně zvyšován ke „zlomovému“ napětí a pak snižován ke konečnému potenciálu. Tím získáme dopředný a zpětný sken, kterému říkáme jeden cyklus. Časové okno experimentu určuje rychlost s jakou je potenciál měněn (scan rate – skenovací rychlost [12]).

Voltamogram je výsledek experimentu cyklickou voltametrií, je to závislost proudu protékajícího soustavou na vloženém napětí. Přístroje pro měření se nazývají potenciostaty a využívají tříelektrodové zapojení. Potenciostat dodržuje nastavený potenciálový program mezi pracovní (různé materiály – C, Pt, Au, Hg, ...) a referentní elektrodou, a tím mezi pracovní a pomocnou (zpravidla platinovou) elektrodou prochází proud, který je poté měřen [12]. Chinony patří mezi látky, které lze snadno redukovat. Reakce chinon-hydrochinon jsou vratné [13].

Působení vitamínu K je měřitelné skrz redoxní cyklus, tedy lze stanovit voltametriky. Chemicky se vitamín K redukuje na hydrochinon vitamínu K, poté karboxylací (v lidském těle v tento moment aktivací vitamínu K) na epoxid vitamínu K, díky enzymu vitamin-K-epoxide reductase se recykluje zpět a cyklus se uzavírá [14].



Obrázek 2 – Cyklus vitamínu K [14]

V tabulce č. 1 je uveden přehled publikovaných metod voltametrického stanovení koncentrace vitamínu K.

Tabulka 1 – Parametry voltametrického stanovení vitamínu K

Voltametrická technika	Koncentrace vitamínu K	Medium	Elektroda	Reference
CV	1×10^{-3} M K1	CH ₃ CN / 0,2 M TBAHFP	Skelný uhlík disková	[15]
CV	10×10^{-3} M K3	Dimethylformamid / 0,1M TEABF ₄	Zinek jako referentní elektroda	[16]
CV	$5,6 \times 10^{-9}$ M K1	0,1M vodný roztok HCl; 0,1M HCl s 2,0M KCl	Pyrolytický uhlík	[17]
CV a SWV	5×10^{-6} M K1 2×10^{-5} M K1	CH ₃ CN / 5mM TBAHFP	BCFME	[18]
CV a SWV	5×10^{-6} M K1 5×10^{-5} M K1	HgCl ₂ 0,1mM / CH ₃ CN / 5mM TBAHFP	HgCFMEs	[18]
CV a SWV a DPV	3×10^{-5} M K1 1×10^{-5} M K1	CH ₃ CN / 5mM TBAHFP	HMDE	[18]

CV - cyklická voltametrie

SWV – square - wave voltametrie

DPV – diferenční pulsní polarografie

CH₃CN –acetonitril

TBAHFP – tetrabutylamonium-hexafluorofosfát

TEABF₄ – tetrafluoroborát

BCFME– mikroelektroda z uhlíkových vláken s borem

HgCFME – mikroelektroda z uhlíkových vláken se rtuťí

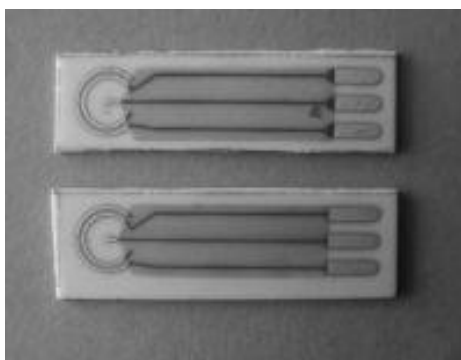
HMDE – visící rtuťová kapková elektroda

Plazmatická koncentrace vitamínu K je 0,3 – 2,7 nmol/L [3], proto je z uvedených metod nejvhodnější cyklická voltametrie podle [17] s elektrodou z pyrolytického uhlíku, protože dosahuje nejnižších hodnot (5,6 nmol/L).

2.2 Tlustovrstvé elektrochemické senzory

Tlustovrstvé elektrochemické senzory jsou vhodné pro cyklickou voltametrii. Rozvoj těchto druhů senzorů (elektrochemické senzory i biosenzory vytvářené sítotiskem na korundových podložkách) výrazným způsobem snižuje cenu. Důležitá je optimalizace topologie senzoru a také kvalitní materiály.

Předními výhodami tlustovrstvých senzorů jsou možnosti miniaturizace, velká variabilita materiálů a možnost vytváření pole elektrod. Dalším cílem výzkumu bylo elektrody zlepšit a zjednodušit, zejména v poměru výkonu a ceny. Toho bylo dosaženo použitím keramických destiček, na které byly pracovní elektrody tištěny. Na obr. 1 je znázorněna první elektroda tohoto typu [19].



Obrázek 3 – První vzorky senzorů tištěných na keramice [19]

Tlustovrstvá technologie v oblasti senzorů má tyto hlavní výhody a nové technologické možnosti (dle literatury [19]):

1. Čistota

V některých případech lze dosáhnout vyšší čistoty, reprodukovatelnější přípravy a chemické odolnosti materiálu než v případě klasických elektrod.

2. Rozšířený výběr materiálů pro přípravu pracovní elektrody

Velmi závažným problémem v klasické elektrochemii je vytvoření aktivní plochy elektrody, která je kompaktně spojena s tělem elektrody tak, že na rozhraní mezi elektroaktivním materiálem a materiálem elektrody nemohou vznikat mikrotrhliny (spáry o velikosti desítek nanometrů), ve kterých se akumuluje elektroaktivní látka, která může způsobovat nestandardní chování

elektrody. Příkladem může být tzv. tailing, tj. když odezva po klasické formě přechází do nestandardní formy a je zpomalená a těžko reprodukovatelná. Mikroelektronické technologie umožňují velmi kompaktní spojení platiny s keramikou nebo korundovou keramikou a její překrytí velmi chemicky odolnými polymery, sklem nebo keramickými materiály. Tak vznikají kompaktní senzory, které jsou zbaveny problému klasických elektrod, tj. nehomogenity materiálu. Lze tak vytvářet elektrody obsahující nejčastěji platinu, zlato a stříbro, méně obvykle měď, iridium nebo nikl. Také existují nové speciální technologie, které umožňují vytvářet elektrody na bázi skelného uhlíku, zlatých a platinových kompaktních vrstev a téměř veškerých materiálů včetně materiálů neobvyklých.

3. Množství použitého kovu

Aktivní materiály, které jsou drahé, jsou použity ve velmi malém množství. Vlastnosti nových elektrod se mohou blížit vlastnostem klasických platinových nebo zlatých elektrod, ale množství užitého kovu je výrazně nižší. To se odráží na ceně senzoru. Znamená to, že tyto elektrody mohou být používány stejně jako klasické elektrody, ovšem vzhledem k jejich menší ceně lze tyto elektrody v případě kontaminace vyměnit za nové. Při dodržení stejné výrobní šarže elektrod lze dosáhnout dobré reprodukovatelnosti, tedy sada experimentů bude poskytovat kvalitní výsledky i při záměně elektrod.

4. Možnost integrace pole elektrod

Díky integraci pole elektrod je umožněno paralelní měření řady elektrolytů nebo elektrochemických reakcí. V klasickém uspořádání elektrod je to také možné, ale vzniká složitý a fakticky nepoužitelný systém. Jakmile je pole elektrod integrováno do senzoru velikosti několika milimetrů, situace se mění a vzniká nový systém, který umožňuje provádět zcela nové fyzikálně-chemické postupy a elektrochemická měření.

5. Spojení s dalšími novými technologiemi

Existuje možnost využití nových technologií, jako jsou integrace kanálů, modifikace povrchů elektrod (nanostrukturované elektrody) a předfiltrace.

6. Různorodost povrchových struktur

Použití tlustovrstvé technologie na elektrochemické senzory umožňuje používat nejen čisté elektrodové materiály ale i slitiny, a navíc lze vytvářet struktury povrchů.

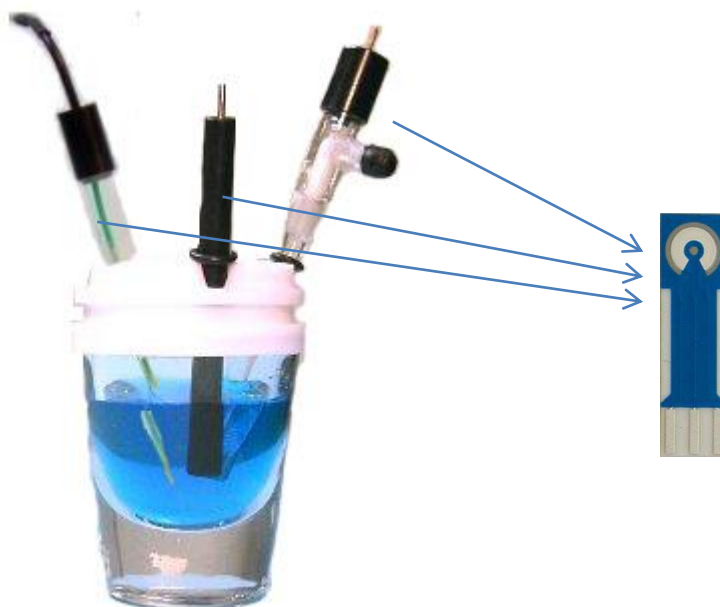
Tlustovrstvá technologie má však i jednu nevýhodu, která pravděpodobně způsobovala pomalé uplatnění na trhu. Vývoj používá drahé materiály. I přesto, že se na aktivní ploše použije řádově miligramové množství aktivního elektrodového materiálu, při vývoji jsou nutná gramová i větší množství. Na vývoj senzorů jsou tedy náklady výrazně vyšší než na vývoj klasických elektrod. Hlavní výhody nových technologických postupů se tedy projeví až při sériové výrobě [19].

Senzor AC1

Prvním výrobkem, který firma BVT Technologies a.s. zavedla na trh v oblasti tlustovrstvých elektrochemických senzorů, byl senzor AC1.W*.R*.

Protože tento senzor jsem používala při své práci, popíši ho podrobně.

Elektrochemická myšlenka, která se skrývá v návrhu senzoru AC1 je schematicky znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4 - Princip elektrochemických senzorů – integrace elektrochemické cely tří elektrod do malého kompaktního senzoru [19,22]

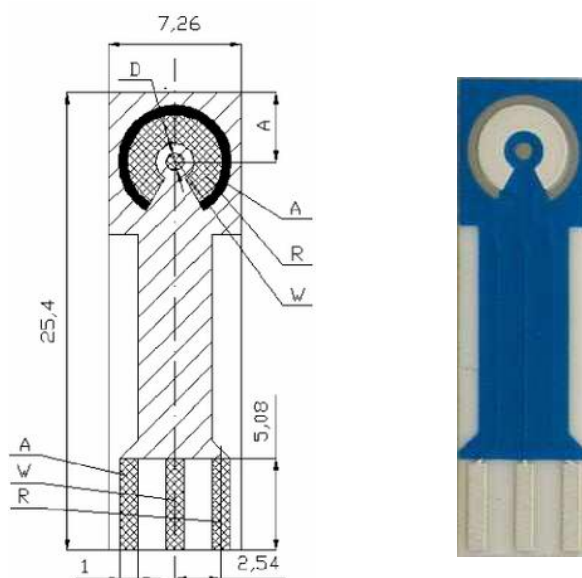
Snahou vývoje bylo integrovat klasické elektrody do jednotného, levného a robustního senzoru a také vytvoření velmi homogenního pole v oblasti pracovní elektrody. Senzory AC1 jsou použity např. jako senzory DNA používané při testování

vlivu prostředí v atomových elektrárnách na zaměstnance, dále při stanovení toxických látek (např. arsenu) v pitné vodě či pro stanovení pesticidů [19].

Pro senzor AC1 je zavedená následující struktura označení pro senzory, umožňující jejich specifikaci, snadnou orientaci v jejich typech i v možnostech, které nabízejí. Pro senzor AC1 má formule tvar: **AC1.W*.R***

První písmeno charakterizuje základní elektrochemickou metodu, která je pro senzor vhodná (A – amperometrie či C – konduktometrie). Druhé písmeno charakterizuje nosný substrát, na kterém je senzor natištěn (C – keramika či P – plast). Následuje číslice charakterizující pořadí topologie senzoru. Další písmeno W specifikuje pracovní elektrodu, za ní následující znak charakterizuje materiál pracovní elektrody (S – vrstva zlata a platiny, 1 – čisté zlato, 2 – čistá platina, 3 – čisté stříbro, 4, 5 – různé typy grafitu). Následuje specifikace referentní elektrody označené písmenem R a číslem, které opět specifikuje použitý materiál (S – stříbro, 1 – směs stříbra a chloridu stříbrného, 2 – pochloridované stříbro). Pro každý typ elektrody je vybrán základní standardní materiál [19,20].

Ve své práci jsem nejčastěji pracovala se senzorem AC1.W2.RS (viz obrázek 5), která je určena pro amperometrická měření, je vytvořena na keramické podložce (99 % Al₂O₃), její topologie má číslo 1, jako referentní elektroda slouží vrstva Ag.



Obrázek 5 – Struktura a základní rozměry použitého senzoru – Pracovní – referentní – pomocná – od středu ven [20]

Tento typ senzorů AC1 je vhodný pro mnoho druhů použití. Například pro měření koncentrace H_2O_2 , glukosy, ferrikyanidu, dále pro měření enzymové aktivity. Je možnost je využít i jako imunosenzory, senzory DNA či při detekci herbicidů.

3 Materiály a metodika

V této kapitole popisují přístroje, chemikálie a metodiku, kterou jsem používala při své práci.

3.1 Instrumentace

Pro elektrochemické měření (voltametrie / cyklická voltametrie) jsou použity dva přístroje: eDAQ-ECHEM (produkt firmy eDAQ) a EmStat (produkt firmy PalmSensBV).

Pro průtokovou amperometrii jsem navíc použila lineární dávkovač a průtokovou FC2 celu (BVT Technologies, a.s.).

Měření jsem prováděla pomocí senzorů firmy BVT Technologies a.s. Všechna měření byla termorována na 20°C v termostatu Minithermostat MT-1 (BVT technologies a.s.). Pipetou (4mL) bylo před každým měřením vše promícháno.

Měření pro větší objemy probíhala ve skleněné cele TC4 (BVT Technologies a.s.) viz obr. 4, která má minimální objem vzorku 5mL a maximální 20 mL, a je přímo dělaná na termostat MT-1. Měření pro malé objemy probíhala v 2mL mikrozkušavce (Bio-Rad).



Obrázek 6 -Skleněná cela TC4 [20]

3.2 Chemikálie

Při své práci jsem používala tyto chemikálie: Kanavit (ZENTIVA, a. s.), analytický standard fylochinon (vitamín K 1) (Sigma-Aldrich s.r.o.), propanol (Lach-Ner, s.r.o.), chloroform (Lach-Ner, s.r.o.), acetonitril (Sigma-Aldrich s.r.o.), chlorid draselný (Lach-Ner, s.r.o.), chloristan draselný (Lach-Ner, s.r.o.), hexakynoželezitan draselný (Lach-Ner, s.r.o.), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o.), kyselina sorbová (Lach-Ner, s.r.o.), citrátový pufr o pH 3,5, fosfátový pufr o pH 7.

Pro měření vitamínu K jsem používala dvě formy vitamínu K.

První forma je léčivo Kanavit (Zentiva, a. s.), který má koncentraci vitamínu K – Phytomenadionum – 0,1000 g v 5mL, $C_{31}H_{46}O_2$, $M = 450,70$ g/mol
Pomocné látky v kanavitu jsou polysorbát 80-E433, kyselina sorbová, dihydrát dinatrium-edetát a čištěná voda. Kvůli výrobnímu tajemství farmaceutické firmy není známo, jaká je koncentrace pomocných látek.

Koncentrace vitamínu K v Kanavitu je

$$c = \frac{m}{M \times V} = \frac{0,02}{450,7 \times 0,001} \frac{mol}{L} = 0,0444 \text{ mol/L}$$

Druhá forma je čistý standard vitamínu K1 – fylochinon (K1) analytický standard (Sigma-Aldrich s.r.o.) – $M = 450,70$ g/mol.

Vyrobila jsem si roztoky standardu vitamínu K, kde je stejné množství vitamínu K jako v Kanavitu, tedy 0,0444 mol/L.

- 30mg VK1 do 1,5mL acetonitrilu
- 30mg VK1 do 1,5mL propanolu

3.3 Použité metody

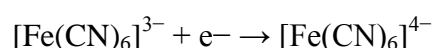
V této práci jsou použity elektrochemické metody, mezi něž patří cyklická voltametrie a průtoková amperometrie.

3.3.1 Pozadí experimentu a šumové vlastnosti přístroje a vliv míchání

Cílem experimentu bylo ověřit velikost šumu způsobeného fluktuacemi přenosu látky k elektrodě, ověřit vliv na limit detekce (LOD), prověřit vliv míchání na zkoumaný roztok, tj. pokus s míchátky a poté bez míchání.

Zkušebními roztoky pro tyto experimenty byly roztok 1M KCl (7mL) a poté tentýž roztok s přídavkem 1mM redoxního páru hexakynoželezitanu draselného.

Redoxní pár hexakynoželezitan draselný je vlastně elektrochemický standard s dobře vyvinutým katodickým i anodickým peakem s rovnicí:



Odezva elektrody je proud i . Odezva je určena elektrodovou reakcí a přenosem látky k elektrodě. LOD je určen poměrem užitečného signálu z odezvy elektrody i a šumu δi , standardně jako

$$LOD: i \geq 3 \times \Delta i$$

Šum je ovlivněn:

1. Vnějšími elektrickými poli, vlastní elektronikou a elektrickými vlastnostmi vlastní cely
2. Fluktuacemi přenosu látky
3. Fluktuacemi elektrodové reakce

Je nutné mít představu o LOD, protože koncentrace vitamínu K v lidské plazmě je nízká. To znamená odhadnout zdroje šumu a jejich příspěvků.

Ad 1 - ukázka vlivu uzemnění, rozdíl přístrojů eDAQ a PalmSens

Ad 2 - vliv míchání, experimentálního uspořádání

Ad 3 - různé materiály elektrody

Při testování vlivu míchání bylo třeba proměřit zkušební roztok cyklickou voltametrií bez míchání a poté s mícháním, a to nejprve pro senzor AC1 a poté pro běžné voltametrické tříelektrodové zapojení, to vše pro obě míchátky. Počet otáček za minutu se zvyšoval, a to takto: 20, 40, 80, 160, 320, 640 a 1280.

Obě míchátko jsou znázorněna na následujících obrázcích:



Obrázek 7 - Míchátko č. 1 - Plochý obdélníček



Obrázek 8 - Míchátko č. 2 - BVT míchátko (83 mm x23 mm) [20]

3.3.2 Cyklická voltametrie vitamínu K

Cílem experimentu bylo prozkoumat elektrochemické vlastností vitamínu K dle literatury, za jakých podmínek dochází k elektrochemické redukci a oxidaci vitamínu K. A to nejprve v léčivu Kanavitu, který je mnohokrát levnější než čistý standard, a poté proměřit totéž s čistým standardem vitamínu K. To vše proměřit pro různé kombinace chemikálií a pro senzory s pracovní elektrodou grafitovou a platinovou, proměřit slepý vzorek samotný a poté s přidavkem léčiva Kanavit.

Měření probíhala pro všechny možné kombinace tří různých rozpouštědel (acetonitril, isopropanol, chloroform), s přidavkem soli KCl (bez KCl, 0,1M, 2M) a s přidavkem pufru (bez pufru, s 0,1M fosfátovým pufrem pH 7,5 a s 0,1M citrátovým pufrem pH 3), viz tabulka 2.

Tabulka 2 – Kombinace cyklické voltametrie proměření Kanavitu

rozpouštědlo	ACETONITRIL / ISOPROPANOL / CHLOROFORM					
	7,5 - Fosfát 0,1M			3,0 - Citrát 0,1M		
pH						
Sůl KCl	0	0,1M	2,0M	0	0,1M	2,0M

V tabulce č. 3 je přehled koncentrace vitamínu K v roztoku.

Tabulka 3 - Přehled koncentrace vitamínu K v roztoku

Přidání roztoku Kanavitu ($c_{VK} = 44,3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) do celkového roztoku ($\mu\text{L}$)	Celková koncentrace vitamínu K v roztoku (mol/L)
100	$439,4 \times 10^{-6}$
200	$870,2 \times 10^{-6}$
250	$1,082 \times 10^{-3}$
300	$1,3 \times 10^{-3}$

Parametry měření cyklické voltametrie pro vitamín K v Kanavitu jsou tyto:

počáteční a konečný potenciál: -2V,

zlomový potenciál: +1V,

E step: 0,005V,

Skenovací rychlost: 200 mV/s.

Pro každý roztok byly proměřeny tři skeny a jako výsledek se použil pouze třetí sken, což je běžná voltametrická praxe.

Jelikož jsou v Kanavitu i jiné látky než vitamín K, bylo třeba ověřit, zda také nejsou elektrochemicky aktivní. Proto se musela voltametricky prověřit kyselina sorbová, která je elektrochemicky aktivní (dle literatury [21]).

Pro přípravu experimentu bylo třeba rozpustit 500 mg kyseliny sorbové do 100 mL rozpouštědla (acetonitrilu popř. propanolu). Tím se vyrobily roztoky o koncentraci kyseliny sorbové $c = 0,04459 \text{ mol/L}$. Tyto roztoky se proměřily v 9 mL acetonitrilu (později propanolu), s přidavkem 1 mL 0,1M KCl a po 20 μL byl přidáván roztok kyseliny sorbové v acetonitrilu (později propanolu) až do celkem 600 μL roztoku kyseliny sorbové. Dle literatury [21] by se měl objevit peak této kyseliny okolo 0,6 – 0,8 V.

Cílem bylo nalézt odpovídající elektrochemické vlastnosti vitamínu K (v Kanavitu a ve standardu vitamínu K), nalézt optimální parametry a vyloučit vliv kyseliny sorbové na stanovení koncentrace vitamínu K v Kanavitu.

3.3.3 Průtoková amperometrie Kanavitu

Průtoková amperometrie je elektroanalytická metoda, kde se měří procházející elektrický proud při konstantním napětí. Vhodnou konkrétní hodnotu napětí lze zjistit z výsledků cyklické voltametrie (kvalitativní napětí konkrétní látky, kdy se redukuje nebo oxiduje). Díky průtokové amperometrii lze dojít do daleko nižších koncentrací než u cyklické voltametrie. Z toho důvodu byla proměřena koncentrační kalibrační řada (kvantitativní stanovení) pro průtokovou amperometrii. Koncentrační řadu jsem si připravila do 2mL ependorfeček – viz tabulka č. 4.

Tabulka 4 – Koncentrační kalibrační řada

Acetonitril nasycen KCl (μL)	Kanavit (μL)	Koncentrace vitaminu K (mol/L)
1999,99	0,01	2,21877E-10
1999,98	0,02	4,43754E-10
1999,95	0,05	1,10939E-09
1999,9	0,1	2,21877E-09
1999,8	0,2	4,43754E-09
1999,5	0,5	1,10939E-08
1999	1	2,21877E-08
1998	2	4,43754E-08
1995	5	1,10939E-07
1990	10	2,21877E-07
1985	15	3,32816E-07
1980	20	4,43754E-07
1975	25	5,54693E-07
1970	30	6,65631E-07
1965	35	7,7657E-07
1960	40	8,8915E-07
1940	60	9,9625E-07

Pro průtokovou amperometrii je potřeba lineární dávkovač pro průtok nosného elektrolytu. Dále je nutný mít přepínací dávkovací kohout, kterým je možnost stříknout látku, která se má analyzovat. V neposlední řadě je potřeba průtoková cela pro senzor. Základní uspořádání průtokové cely je na obrázku 9.



Obrázek 9 - Průtoková cela – FC2 Flow cell (42 mm x 24 mm x 16 mm) [20]

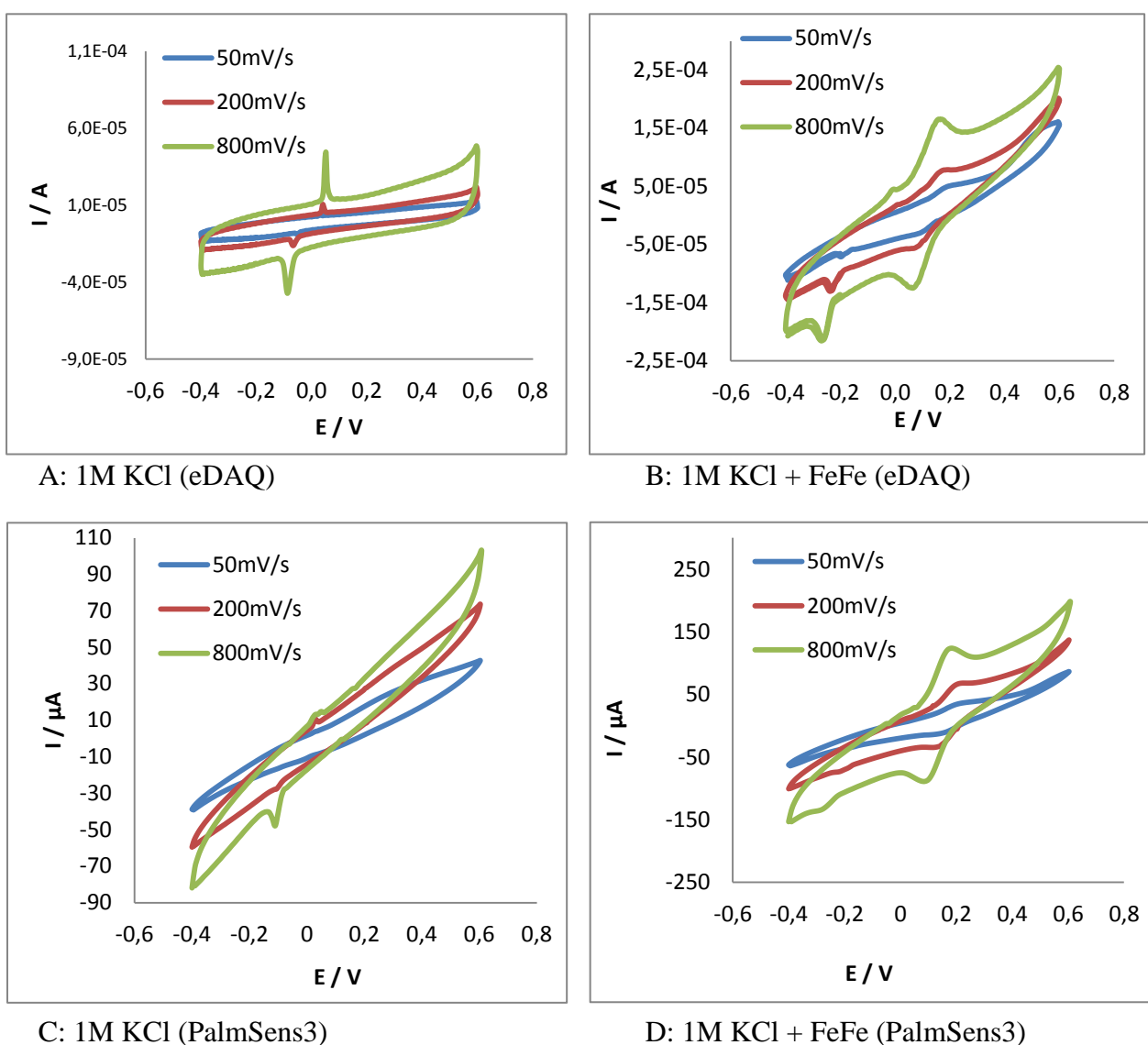
Koncentrace vitamínu K v Kanavitu je vyšší než v lidském těle [3]. Aby mělo stanovení pro vitamín K smysl do diagnostiky a do praxe, je třeba dosáhnout nízkých koncentrací, tj. řádově desítky nmol/L. Na toto stanovení do nižších řádů jsme použili průtokovou amperometrii. Cílem bylo dosáhnout nízké citlivosti pro vitamínu K do jednotek nmol/L.

4 Výsledky

4.1 Pozadí přístroje a míchání

4.1.1 Šumové vlastnosti přístroje a ověření funkčnosti voltametrického systému

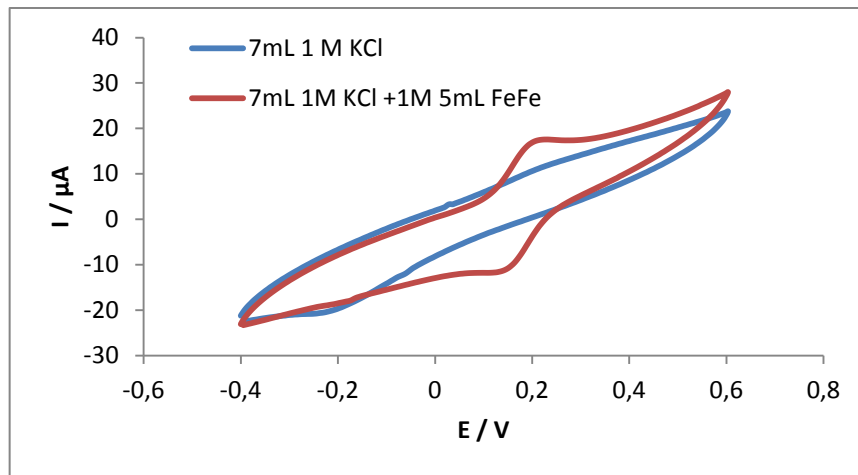
Provedla jsem ověření dvou potenciostatů – voltametrických zařízení eDAQ a PalmSens3 na roztoku 7 mL 1M chloridu draselného při skenovacích rychlostech 50 mV/s, 200 mV/s a 800 mV/s a poté s přidavkem 5 mL FeFe. Experiment se prováděl od napětí -400mV do +600 mV a zpět. Na obrázku 10 je výsledek.



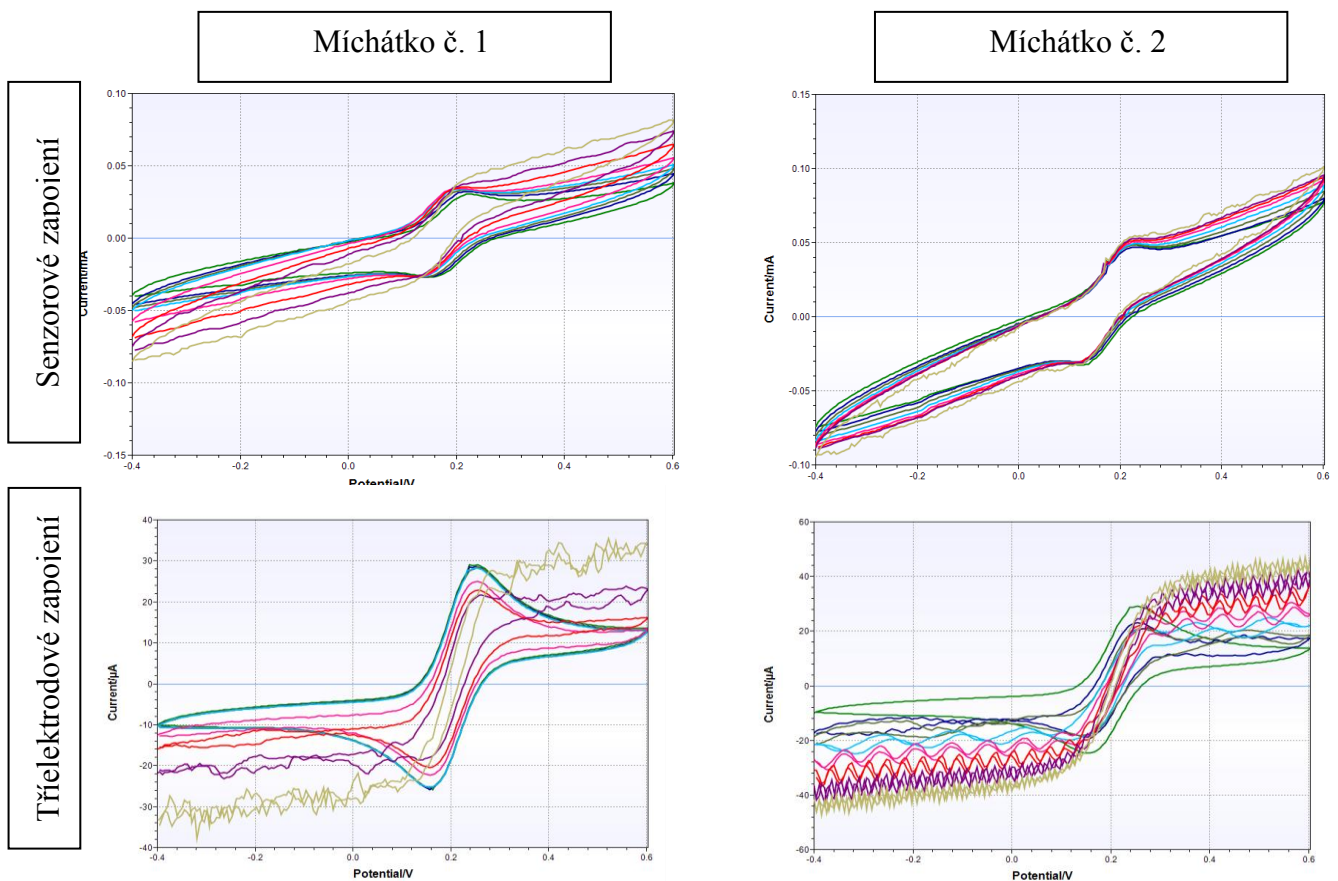
Obrázek 10 - Porovnání potenciostatů eDAQ a PalmSens3 při různých skenovacích rychlostech

4.1.2 Vliv míchání

Dále jsem zkoumala vliv míchání na experiment. Výsledky jsou na obrázcích 11 a 12, experiment bez míchání má zřetelnější křivky než výsledky s mícháním.



Obrázek 11 - Roztok 1M KCl a poté s přidavkem 1M 5mL FeFe - měřeno bez míchání



Obrázek 12 - Porovnání vlivu míchání

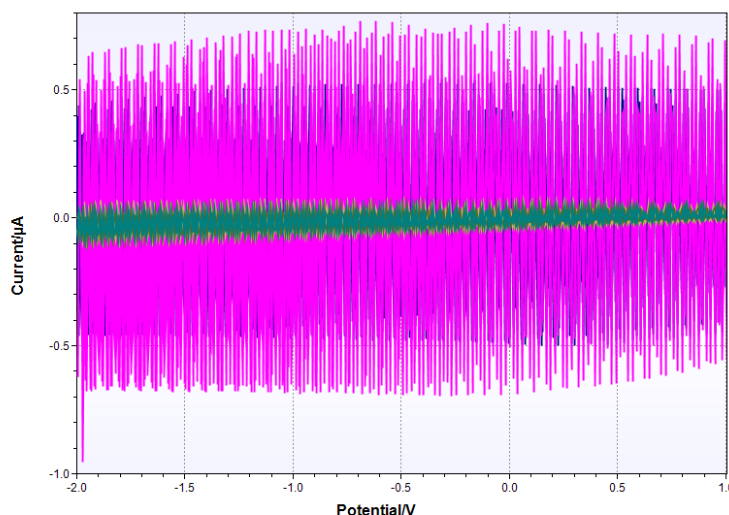
4.2 Cyklická voltametrie vitamínu K

Postupovala jsem dle tabulky č. 2 – pro tři různá rozpouštědla, pro dva druhy pufrů při různých pH a také pro tři různé koncentrace soli chloridu draselného. Vše jsem proměřila pro senzor AC1 (BVT, Technologies a.s.) s pracovní elektrodou platinovou a poté také s elektrodou vyrobenou z grafitu.

Z velké části naměřených dat za různých podmínek zde uvádím ukázkou výsledků měření. Některé výsledky se dají dále využít, ale jiné (obrázek 13) se využít nedají, ale i tak ukazují, kudy nepostupovat.

4.2.1 Měření s chloroformem

Všechna měření (s platinovou i grafitovou pracovní elektrodou) s rozpouštědlem chloroform jsou podobná tomu, které je znázorněno na obrázku 13. Samotný chloroform je zobrazen modře v pozadí. Růžově je zobrazeno přidání roztoku chloridu draselného (1M KCl) do chloroformu. Zeleně je zobrazena směs po přidání 100 μL Kanavitu ($439,4 \times 10^{-6}$ mol/L) do roztoku. Kvůli své vysoké těkavosti není chloroform vhodný pro voltametrická měření.



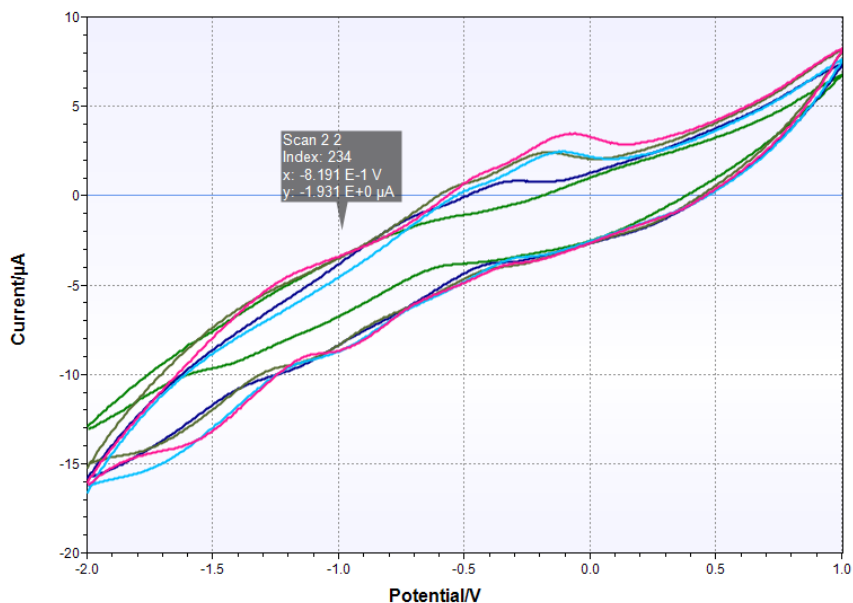
Obrázek 13 – Měření s 10mL chloroformu, 100 μL 1M KCl a 100 μL Kanavitu

4.2.2 Měření s propanolem

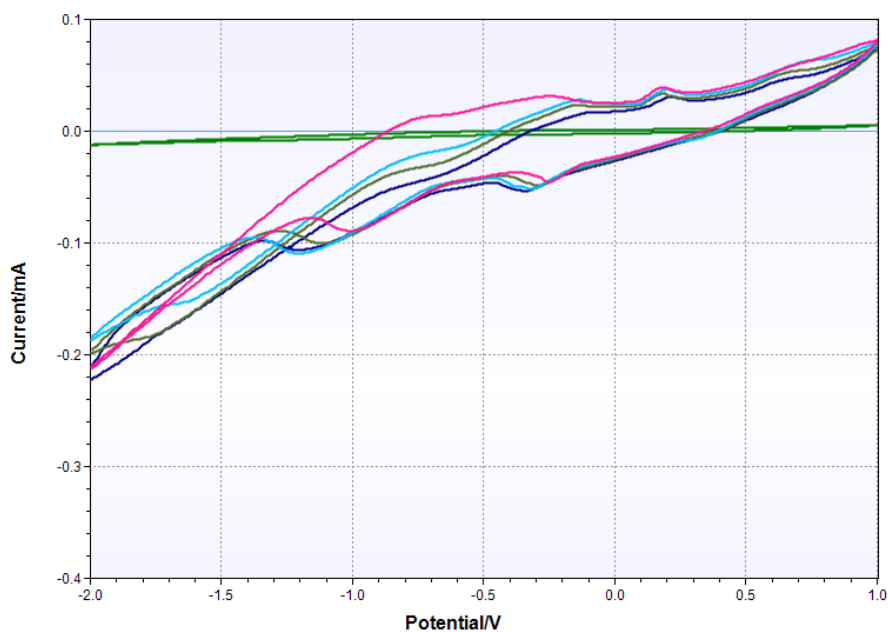
Použila jsem senzor AC1.W2.RS. Nejprve jsem připravila roztok 9 mL propanolu a 1 mL fosfátového pufru o pH 7,5 a k tomu byl postupně přidáván Kanavit. Totéž jsem

zkoušela s přidáním 0,1M KCl a také 2M KCl. Ale výsledky neměly vypovídající hodnotu pro měření vitamínu K.

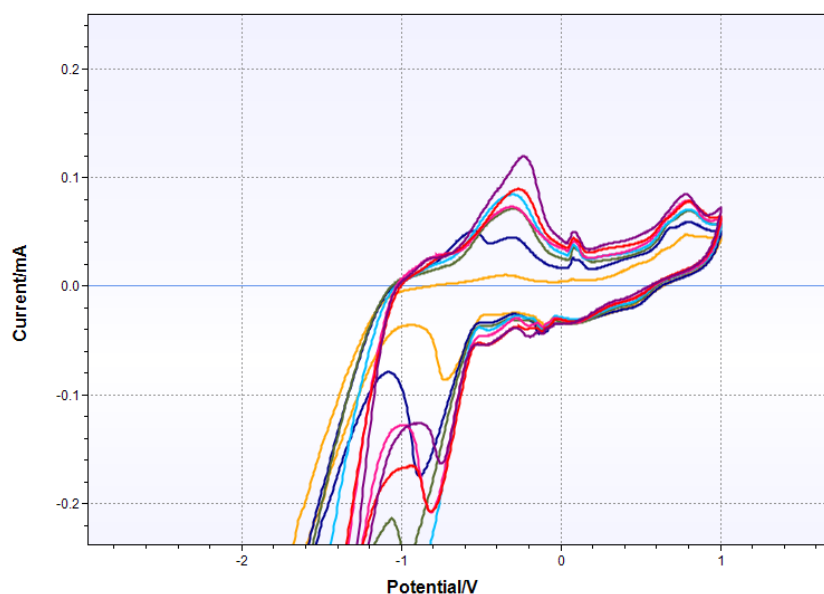
Výsledky pro kombinaci 9 mL propanolu a 1 mL citrátového pufru o pH 3 jsou zobrazeny na obrázcích 14 až 16.



Obrázek 14 - Měření s propanolem (tmavě zelená) bez KCl: 200 µL Kanavitu postupně přidávaného (postupně: tmavě modrá, khaki, světle modrá, růžová)



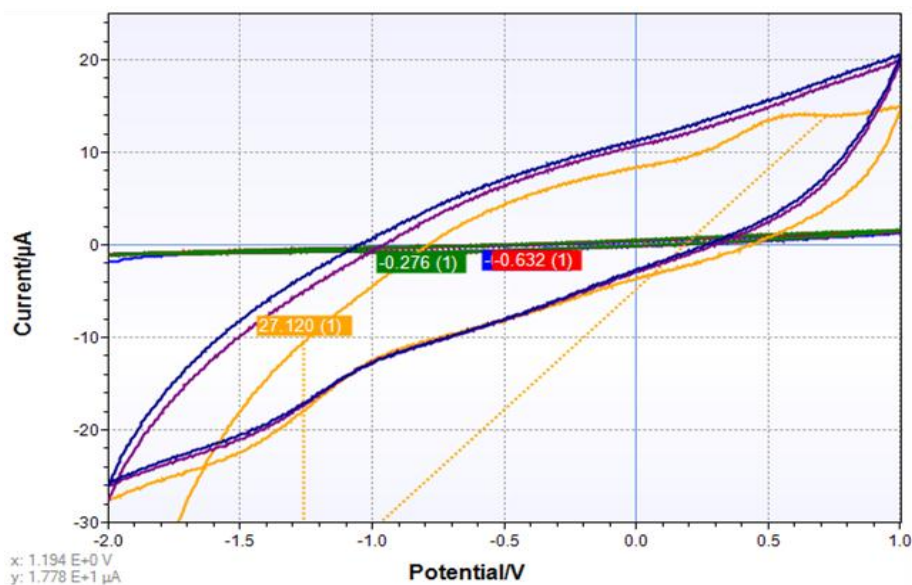
Obrázek 15 - Měření s propanolem (tmavě zelená) s KCl 0,1M (tmavě modrá): 200 µL Kanavitu postupně přidávaného (postupně: khaki, světle modrá, růžová)



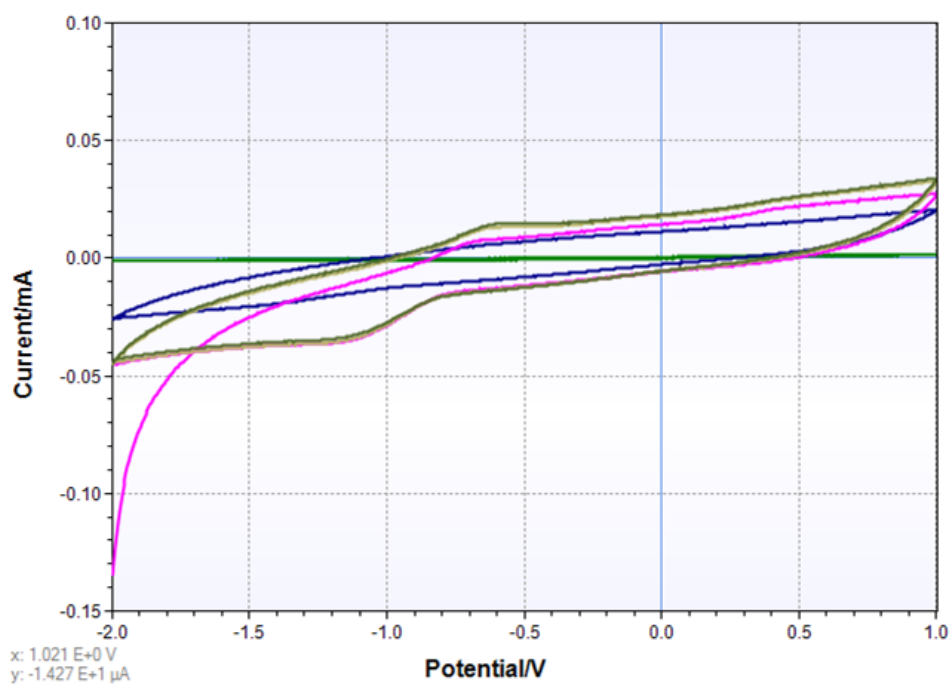
Obrázek 16 - Měření s propanolem s KCl 2M (žlutá): 200 µL Kanavitu postupně přidávaného (postupně: tmavě modrá, khaki, světle modrá, růžová, červená, fialová) – přiblíženo

4.2.3 Měření s acetonitrilem

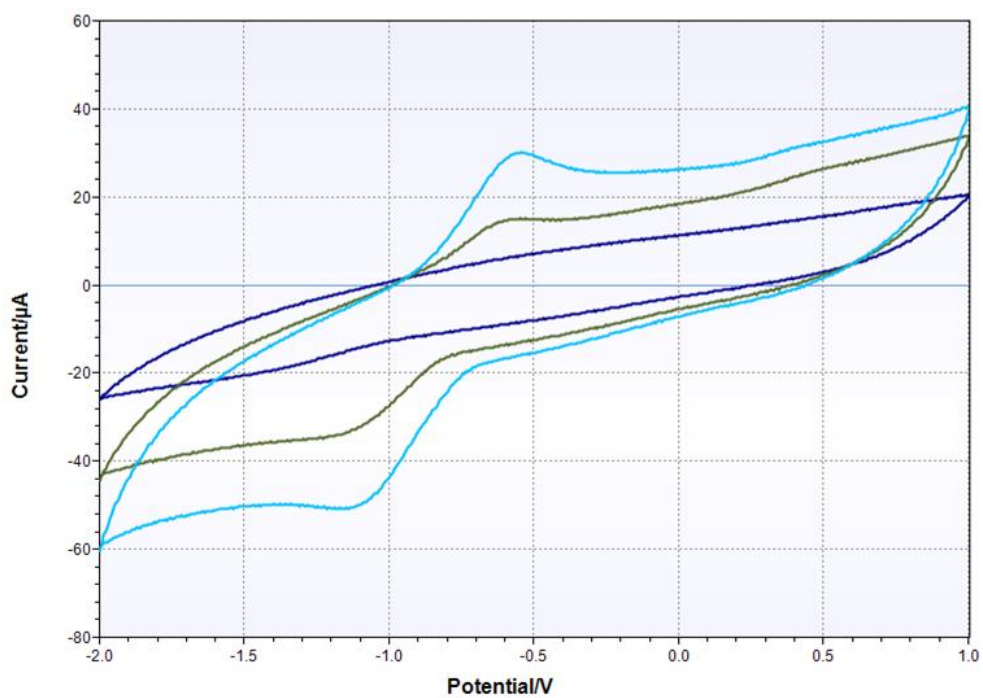
Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s rozpouštědlem acetonitrilem při použití grafitové pracovní elektrody. Do 10 mL acetonitrilu bylo přidáno 100 µL 1M KCl pro zlepšení vodivosti (obrázek 17). Na obrázcích 18 až 20 jsou již zřetelné první peaky vitamínu K při napětí -1 V a -0,6 V.



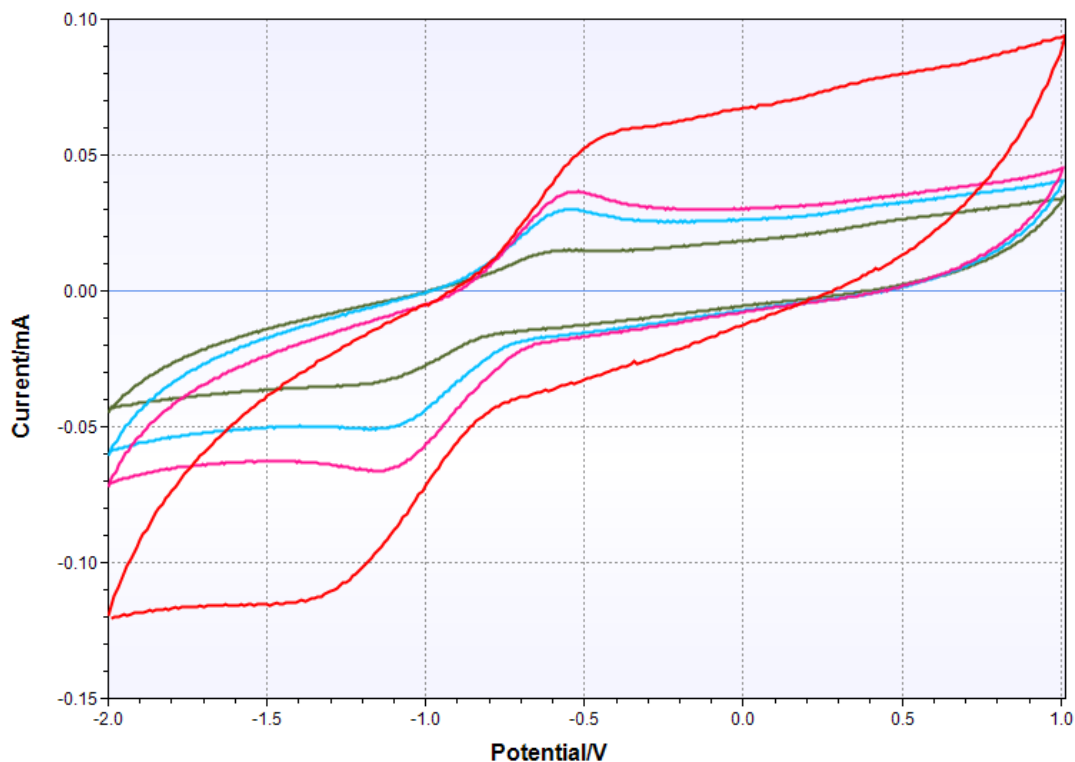
Obrázek 17 Měření s acetonitrilem (zelená), acetonitril + KCl (tmavě modrá)



Obrázek 18 - Měření s acetonitrilem (zelená), acetonitril + KCl (tmavě modrá), po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená)



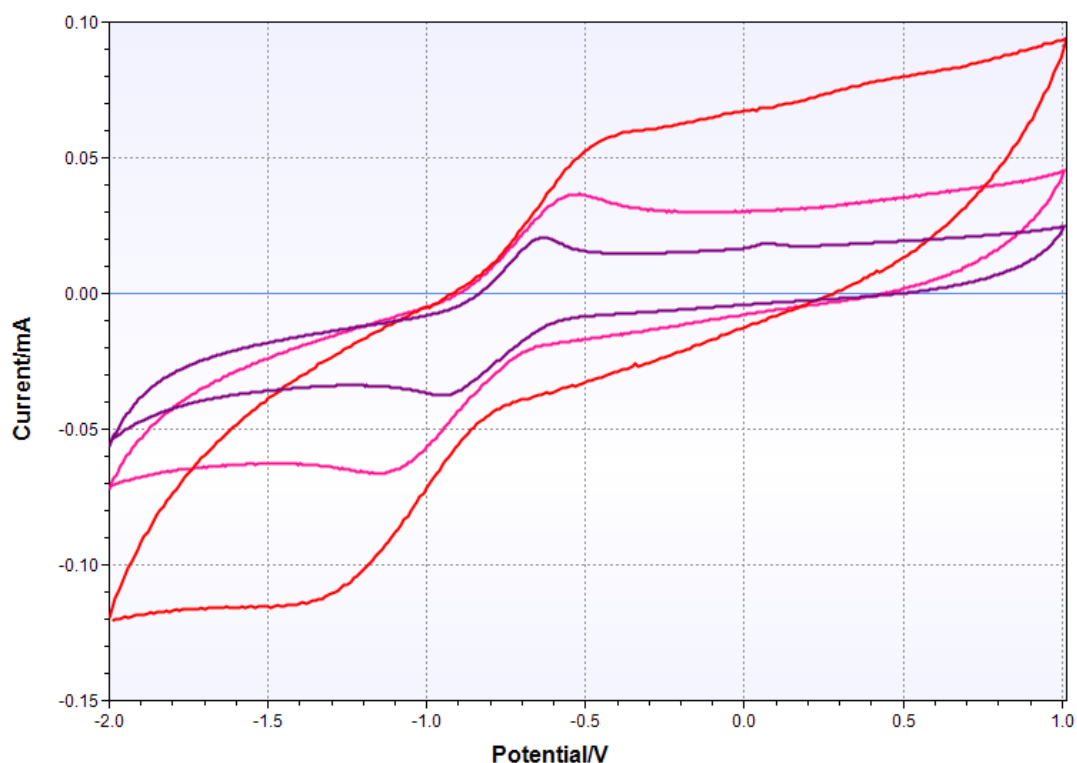
Obrázek 19 - Měření s acetonitrilem, acetonitril + KCl (tmavě modrá), po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená), po přidání dalších 100 μ L Kanavitu (světle modrá)



Obrázek 20 - Měření s acetonitrilem + KCl, po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená), po přidání dalších 100 μ L Kanavitu (světle modrá), po přidání dalších 100 μ L Kanavitu (růžová). Při změně parametru skenovací rychlost 800 mV/s, pak i Estep 0.01 V (červená)

Obrázek 20 znázorňuje pokračování měření po dalším přidání Kanavitu. Je zřejmé, že proud dále roste, tedy ukazuje kvantitu vitamínu K.

Poté, co jsem zvýšila skenovací rychlost čtyřikrát na 800 mV/s, nastal dvakrát větší proud, což je důkaz správnosti měření. Na obrázku 21 je znázorněna zkouška funkčnosti a správnosti voltametrického měření pro tři rychlosti skenu (skenovací rychlost) a to pro 50 mV/s, 200 mV/s a 800 mV/s. Čím je větší skenovací rychlost, tím je větší citlivost (vyšší proud), je rychlejší měření, avšak je vyšší rušivá kapacita (voltagram je na výšku moc široký). Proto je důležité najít optimální parametry měření.



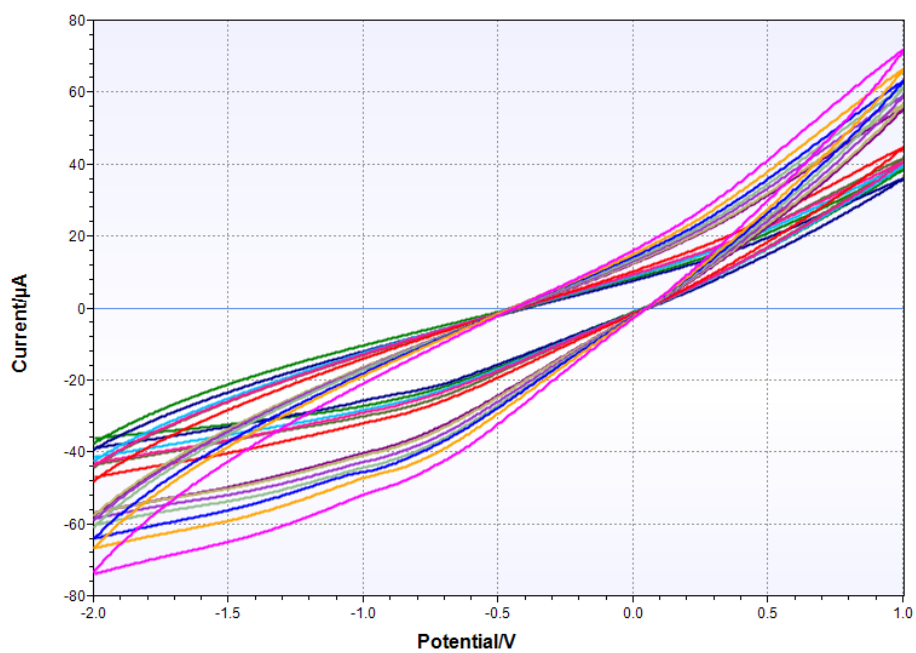
Obrázek 21 - Zkouška funkčnosti a správnosti voltametrického měření (300 μ L Kanavitu v 10 mL roztoku acetonitrilu a 100 μ L 1M KCl): 50 mV/s (fialová), 200 mV/s (růžová), 800 mV/s (červená)

Jelikož byla tato měření úspěšná, rozhodla jsem se je zopakovat s jiným senzorem z jiné šarže výroby pro grafitovou pracovní elektrodu a posléze pro platinovou pracovní elektrodu.

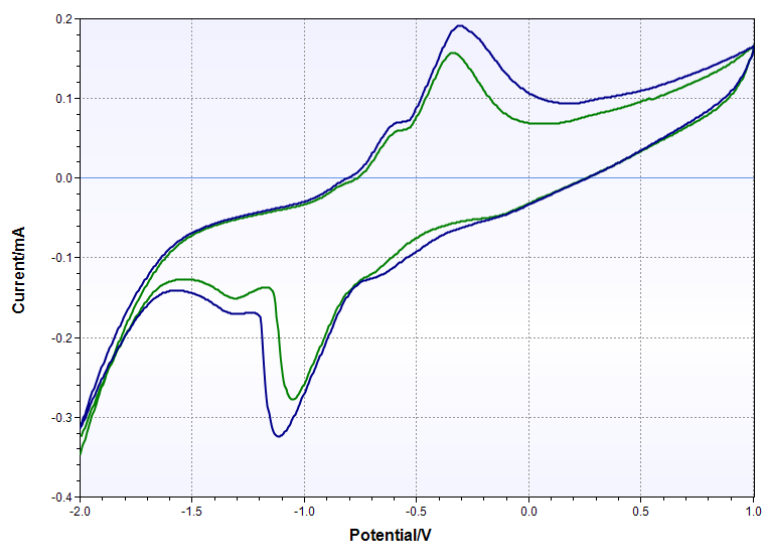
Na obrázcích 22 až 25 jsou znázorněné výsledky s grafitovou pracovní elektrodou. Na obrázku 22 je znázorněno měření postupného přidávání Kanavitu do čistého acetonitrilu. Na obrázcích 23 až 25 je znázorněno měření postupného přidávání Kanavitu do acetonitrilu s 0,5 mL 1M KCl.

Přidání 0,5 mL 1M KCl do měřeného roztoku je pro měření důležité, jelikož je potřeba, aby roztok byl vodivý. Když není roztok vodivý, vitamín K se ztratí v kapacitě roztoku (viz obrázek 22) a nezvýrazní se.

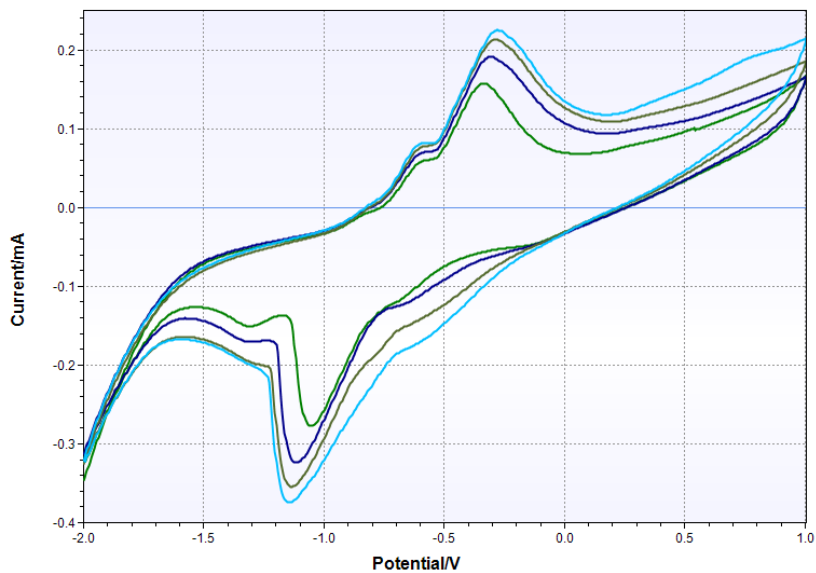
Na obrázcích 23 až 25 jsou zřetelné peaky vitamínu K při napětí -1 V a -0,4 V. Ovšem grafitová elektroda má tu nevýhodu, že se po určitém čase v acetonitrilu rozdrolí, což jsem při měřeních zjistila, a proto tuto elektrodu nedoporučuji pro měření v organických rozpouštědlech.



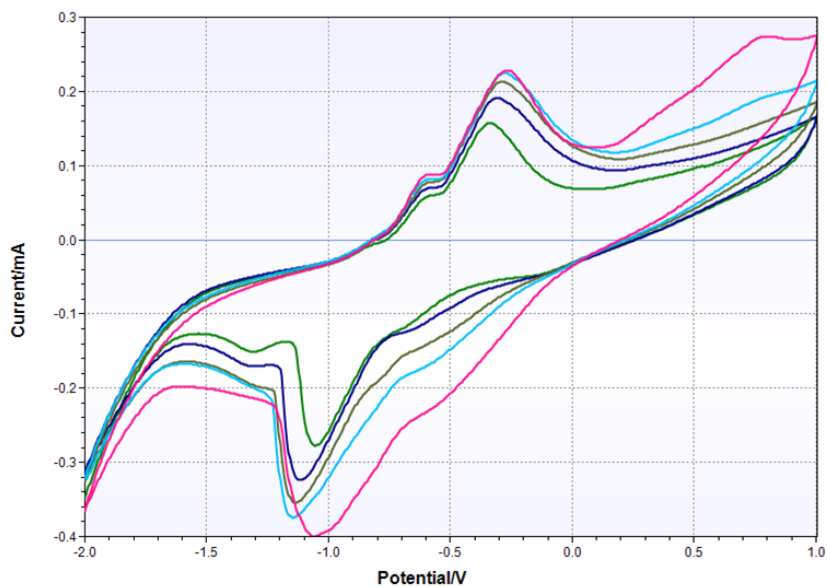
Obrázek 22 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu a po 25µL přidání Kanavitu



Obrázek 23 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu a 200µL Kanavitu po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 µL Kanavitu (tmavě modrá)



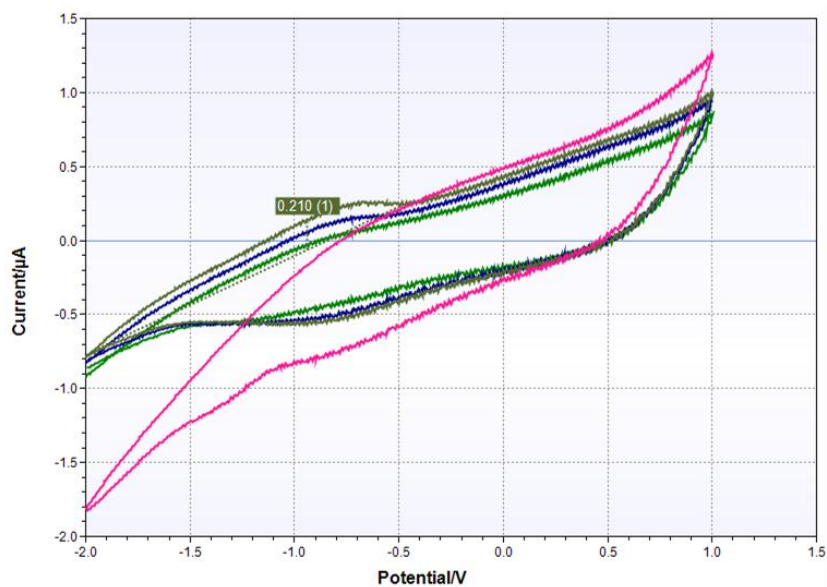
Obrázek 24 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu, 200 μ L Kanavitu, po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (olivově zelená), opět po přidání 25 μ L Kanavitu (světle modrá)



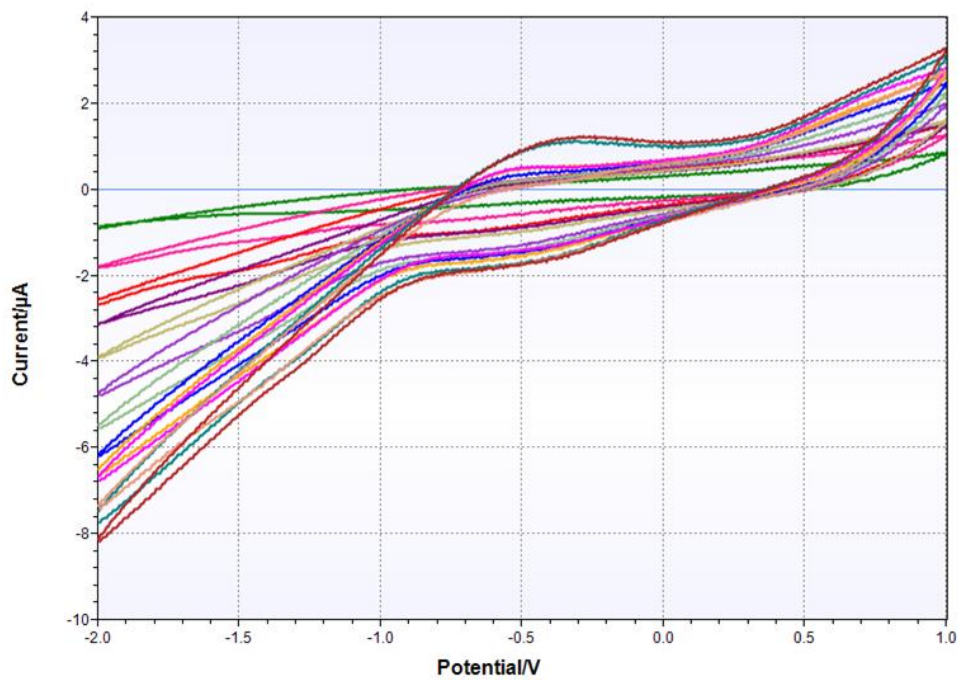
Obrázek 25 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu, 200 μ L Kanavitu, po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (olivově zelená), opět po přidání 25 μ L Kanavitu (světle modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (růžová)

Na obrázcích 26 a 27 jsou znázorněny výsledky s platinovou pracovní elektrodou při postupném přidávání Kanavitu do acetonitrilu s 0,5 mL 1M KCl.

Peaky vitamínu K jsou méně zřetelné než při pokusu s grafitovou elektrodou.



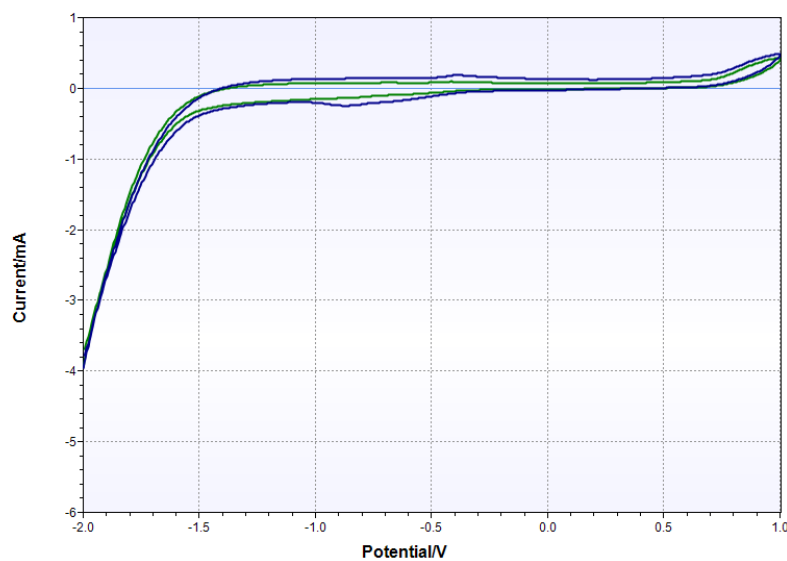
Obrázek 26 - Acetonitril s 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), po přidání 25 μL Kanavitu (růžová)



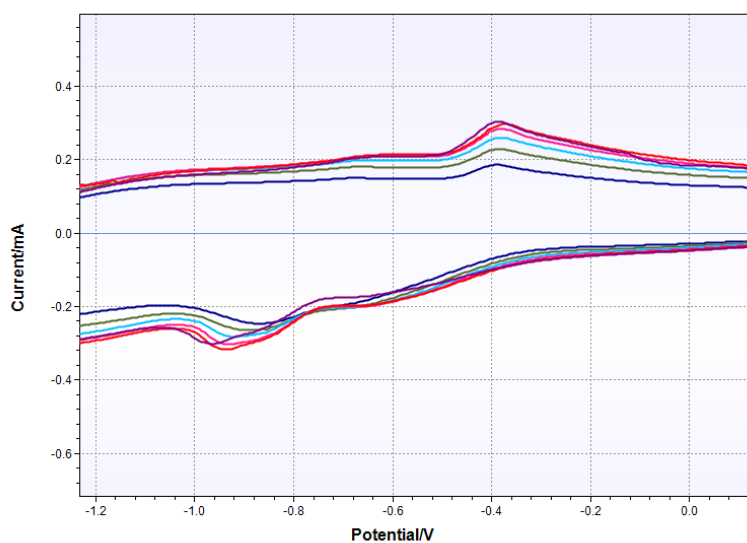
Obrázek 27 - Acetonitril s 10 mM KCl (tmavě zelená), při navyšující se koncentraci o 25 μL Kanavitu (ostatní barvy)

4.2.4 Měření bez organického rozpouštědla s destilovanou vodou s přídavkem 1M KCl

Proměřila jsem cyklickou voltametrií Kanavit s grafitovou pracovní elektrodou v destilované vodě se stejnými parametry jako v přechozích měřeních. Výsledky jsou na obrázcích č. 28 a 29. Na obrázku 29 jsou zřetelné peaky vitamínu K při napětí -0,9 V a -0,4 V.



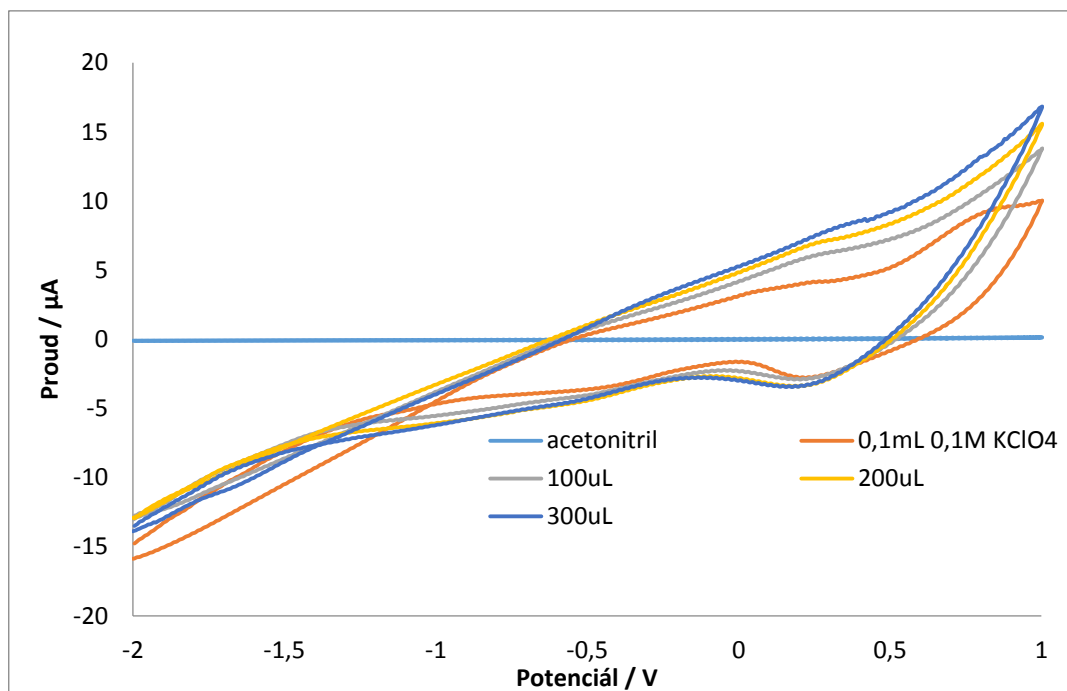
Obrázek 28 – Měření s vodou a 1M KCl (zelená), po přidání 25 µL Kanavitu (tmavě modrá)



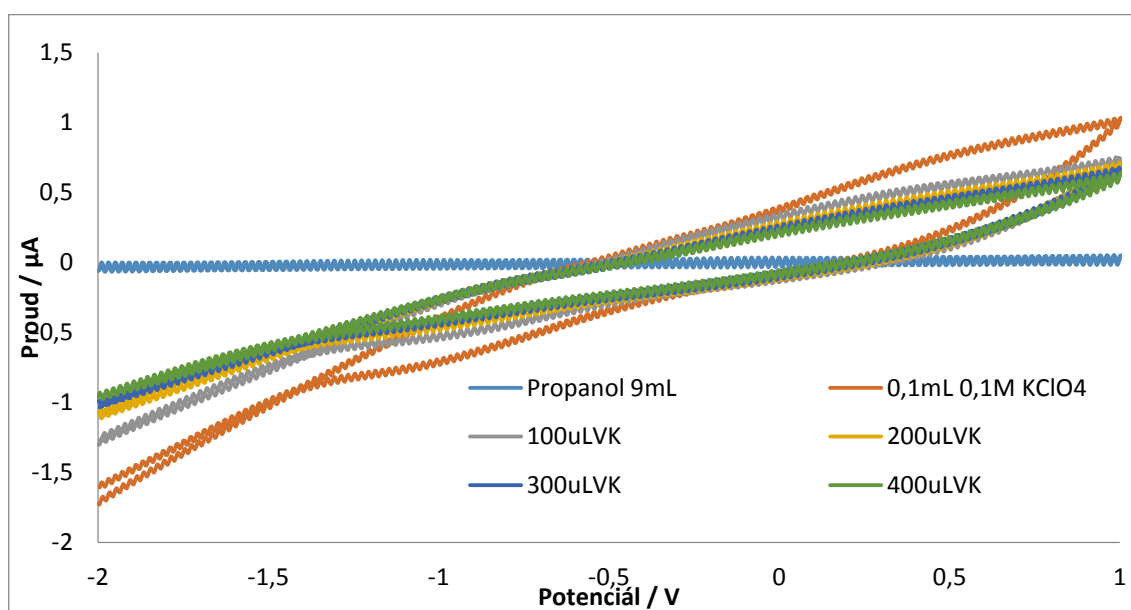
Obrázek 29 – Měření s vodou s 1M KCl s Kanavitem při 25 µL Kanavitu (tmavě modrá) a po 25 µL přidáváno až do 150 µL (fialová)

4.2.5 Cyklická voltametrie standardu vitamínu K

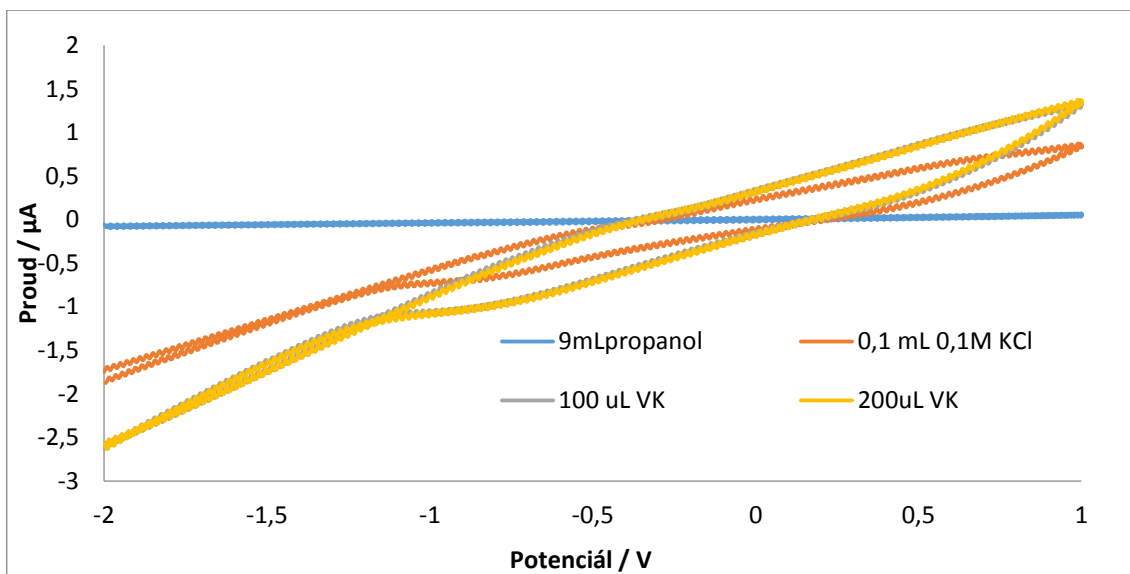
Při měření cyklické voltametrie standardu vitamínu K jsem postupovala podobně jako při měřeních cyklické voltametrie Kanavitu. Jelikož cena standardu vitamínu K je mnohonásobně vyšší než cena Kanavitu, neproměřovala jsem s rozpouštědlem chloroform, které se při Kanavitu neosvědčilo. Použila jsem pouze platinovou elektrodu, protože grafitová elektroda se též neosvědčila. Výsledek cyklické voltametrie standardu vitamínu K jsou na obrázcích 30 až 32.



Obrázek 30 – Cyklická voltametrie 9mL acetonitrilu + 0,1 mL 0,1M KClO₄ + standard VK1

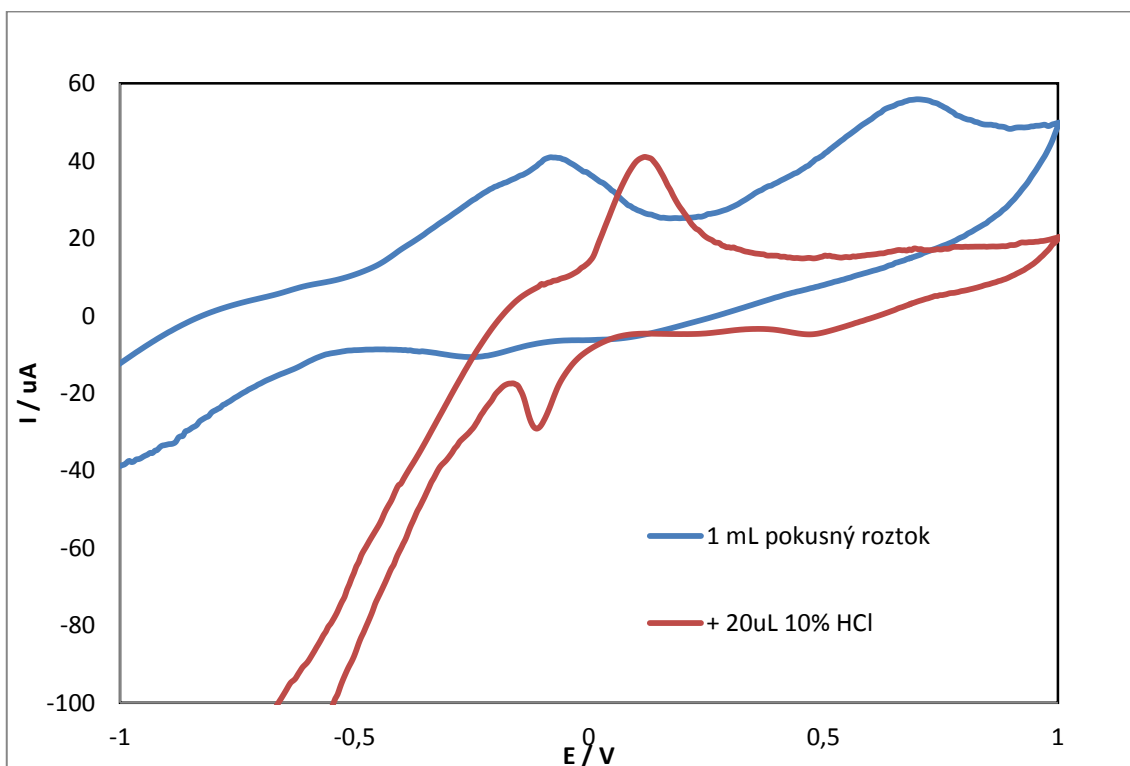


Obrázek 31 – Cyklická voltametrie 9mL propanolu + 0,1 mL 0,1M KClO₄ + standard VK1

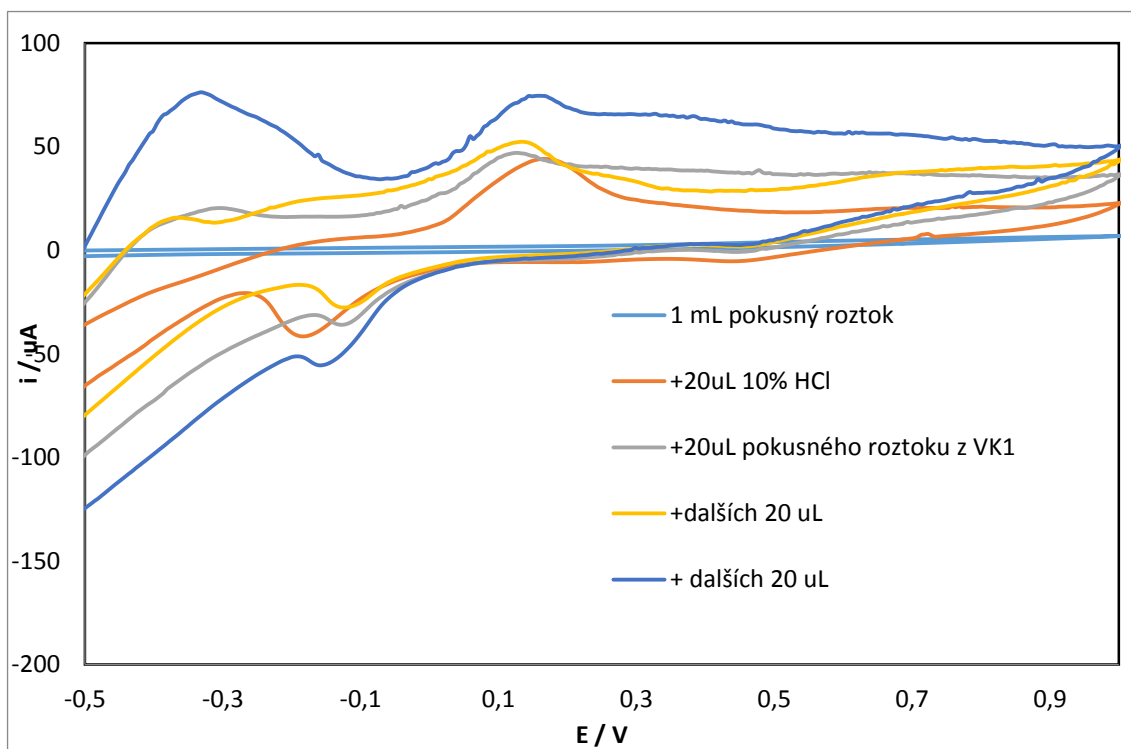


Obrázek 32 - Cyklická voltametrie 9mL propanolu + 0,1 mL 0,1M KCl + standard VK1

K dalšímu měření mě inspiroval článek [17], kde byla použita chemikálie 0,1M HCl. Výsledky cyklické voltametrie standardu vitamínu K s použitím 0,1M HCl jsou na obrázcích 33 a 34. Na obrázku 33 jsou zřetelné peaky vitamínu K při napětí -0,1 V a +0,2 V. Na obrázku 34 jsou zřetelné tři peaky vitamínu K při napětí -0,4 V, -0,2 V a +0,2 V.



Obrázek 33 – Cyklická voltametrie 1 mL pokusného roztoku s neznámým objemem vitamínu K (modrá), cyklická voltametrie pokusného roztoku po přidání 20μL 10% HCl (červená)



Obrázek 34 – Cyklická voltametrie 1 mL pokusného roztoku s neznámým objemem vitamínu K (modrá), cyklická voltametrie pokusného roztoku po přidání 20 μ L 10% HCl (oranžová), po přidání dalších 20 μ L pokusného roztoku (šedá, žlutá a tmavě modrá)

4.2.6 Měření cyklické voltametrie kyseliny sorbové

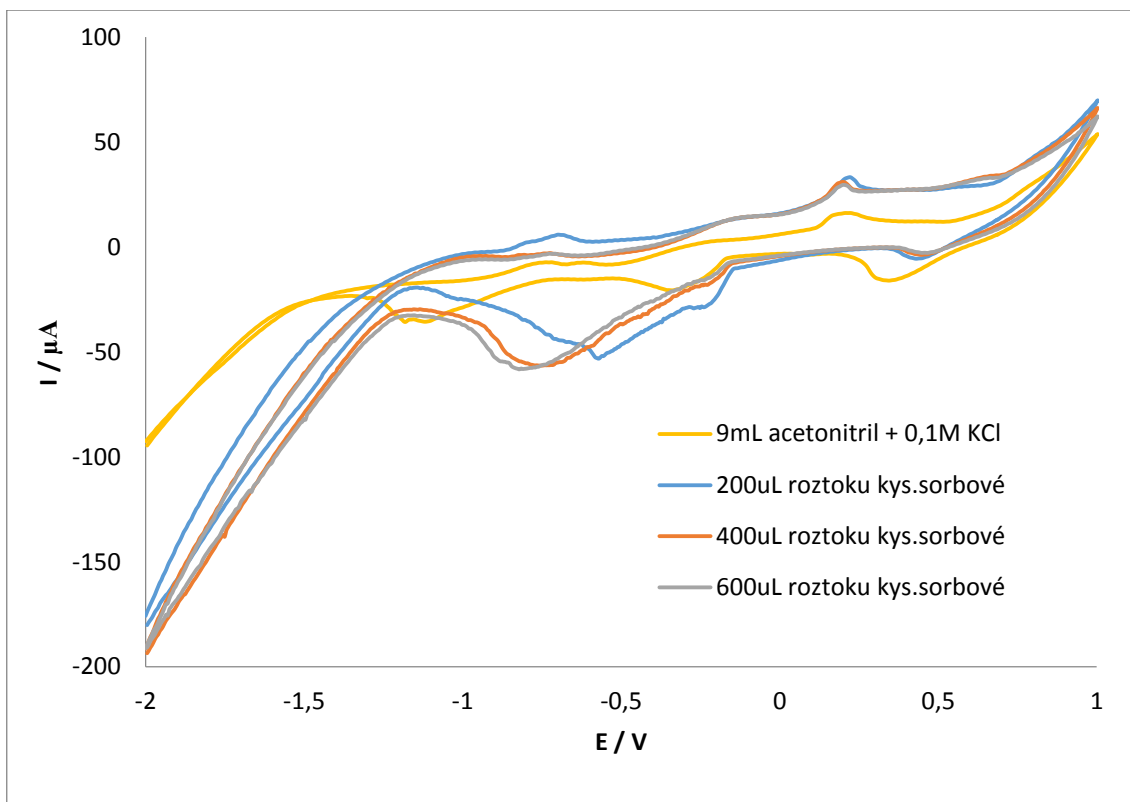
Jelikož jsou v Kanavitu i jiné látky, je třeba ověřit, zda také nejsou elektrochemicky aktivní. Proto jsem voltametricky prověřila kyselinu sorbovou, a to při stejných parametrech, které jsem použila pro Kanavit.

Rozsah potenciálu: -2V do +1V

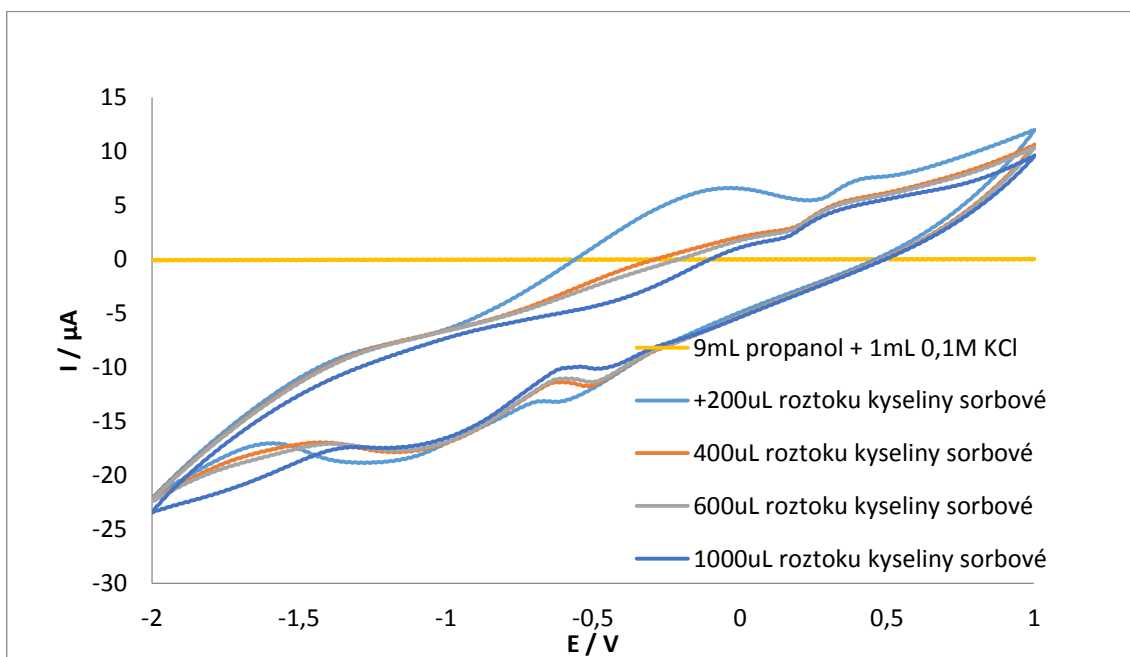
Skenovací rychlost: 200 mV/s

Estep: 0,005V

Při měření se neprojeví žádné významné voltametrické vlastnosti kyseliny sorbové vzhledem k měření vitamínu K, protože s dalším postupným přidáváním kyseliny sorbové peaky nerostou, ale klesají (viz obrázek 36) nebo obkreslují křivku po prvním přidání kyseliny sorbové (viz obrázek 35).



Obrázek 35 - Roztok kyseliny sorbové v acetonitrilu proměřen voltametriky



Obrázek 36 - Roztok kyseliny sorbové v propanolu proměřen voltametriky

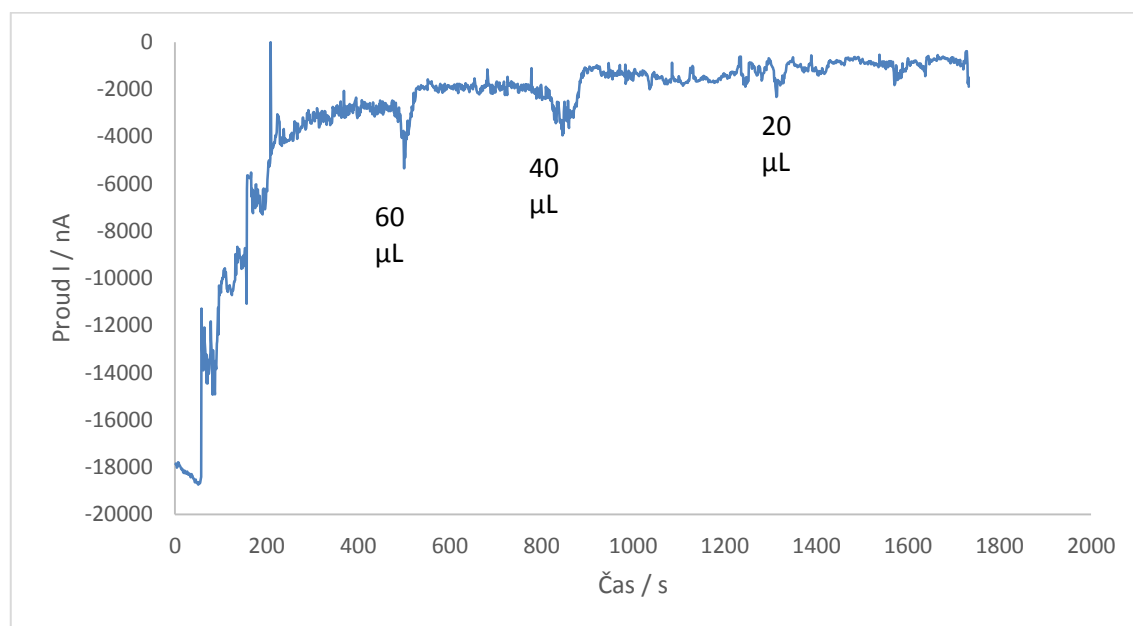
4.3 Průtoková amperometrie vitamínu K

Z předchozích měření cyklické voltametrie vitamínu K je zřejmé, že vitamín K je nejvíce elektrochemicky aktivní při napětí -1000 mV, -600 mV a -400 mV. Proto jsem se při měření průtokové amperometrie soustředila na měření v okolí těchto hodnot. Rozhodla jsem se použít acetonitril, se kterým jsem měla uspokojivé výsledky.

Průtok acetonitrilu je dodáván lineárním dávkovačem většinou 6 nebo 3 mL/s. Z toho důvodu, že acetonitril je organické rozpouštědlo, jsem použila teflonové hadičky. Pro měření jsem použila koncentrační řady Kanavitu. Provedla jsem měření opět pro dva druhy senzorů s pracovní elektrodou z grafitu a z platiny.

4.3.1 Měření průtokové amperometrie s grafitovou elektrodou

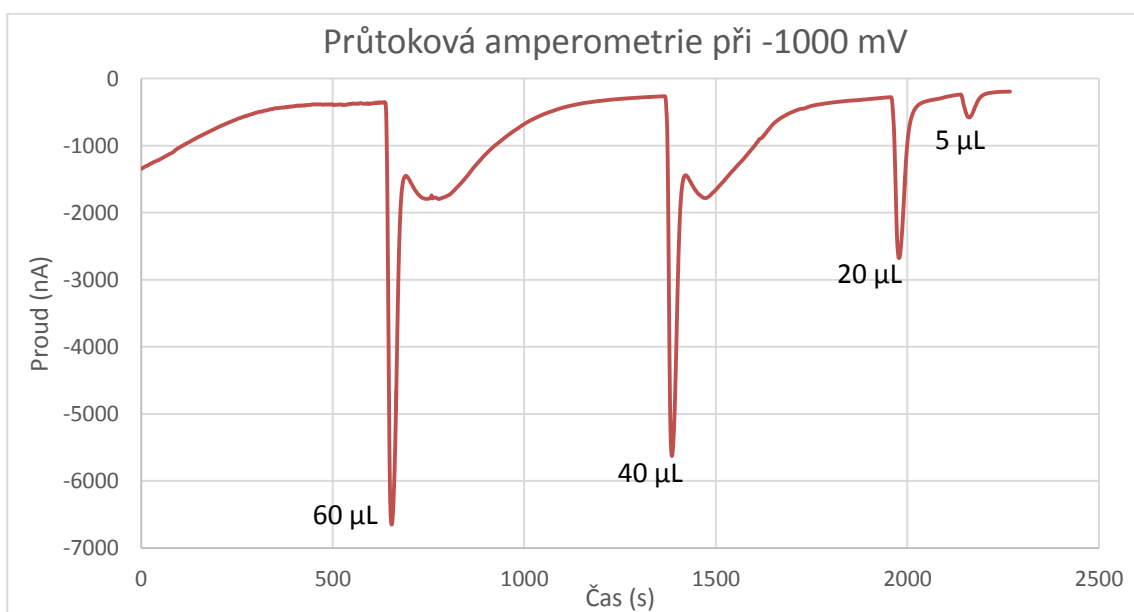
Na obrázku 37 je vidět výsledek průtokové amperometrie v FC2 cele z plexiskla (polymethyl metakrylát) na senzoru **AC1.W4.RS** s grafitovou pracovní 2mm² elektrodou při -1000 mV. Výsledek není uspokojivý, protože se ztrácí užitečný signál kvůli rozpouštění grafitu acetonitrem.



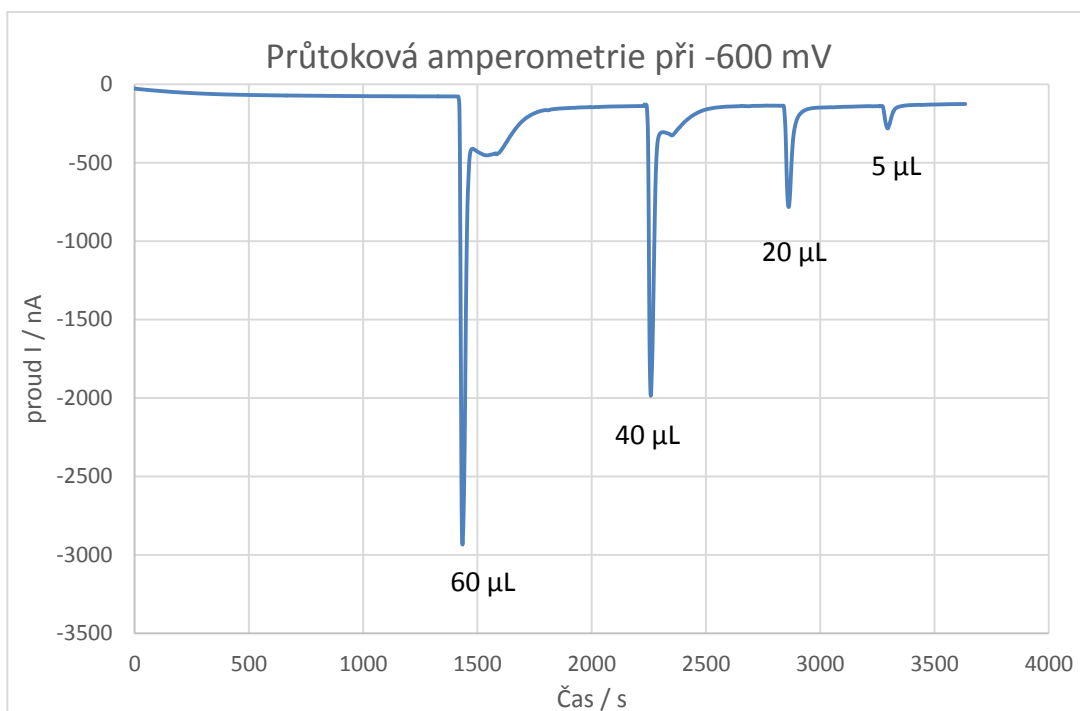
Obrázek 37 - Průtoková amperometrie s grafitovou elektrodou při -1000 mV

4.3.2 Měření průtokové amperometrie s platinovou elektrodou

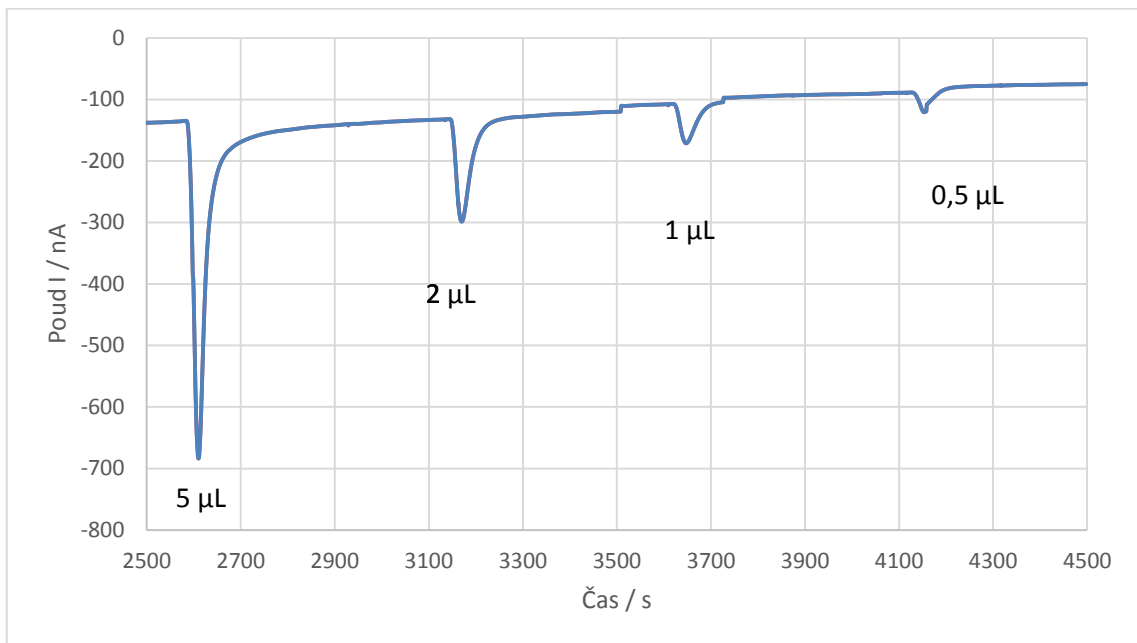
Další měření má tyto parametry: polyethylenová cela, senzor AC1.W2.RS platinová pracovní 2mm² elektroda při -1000 mV. Platinová elektroda je odolnější, a proto jsou peaky zřetelnější než s použitím grafitové elektrody při metodě průtokové amperometrie, viz obrázky 38 až 41.



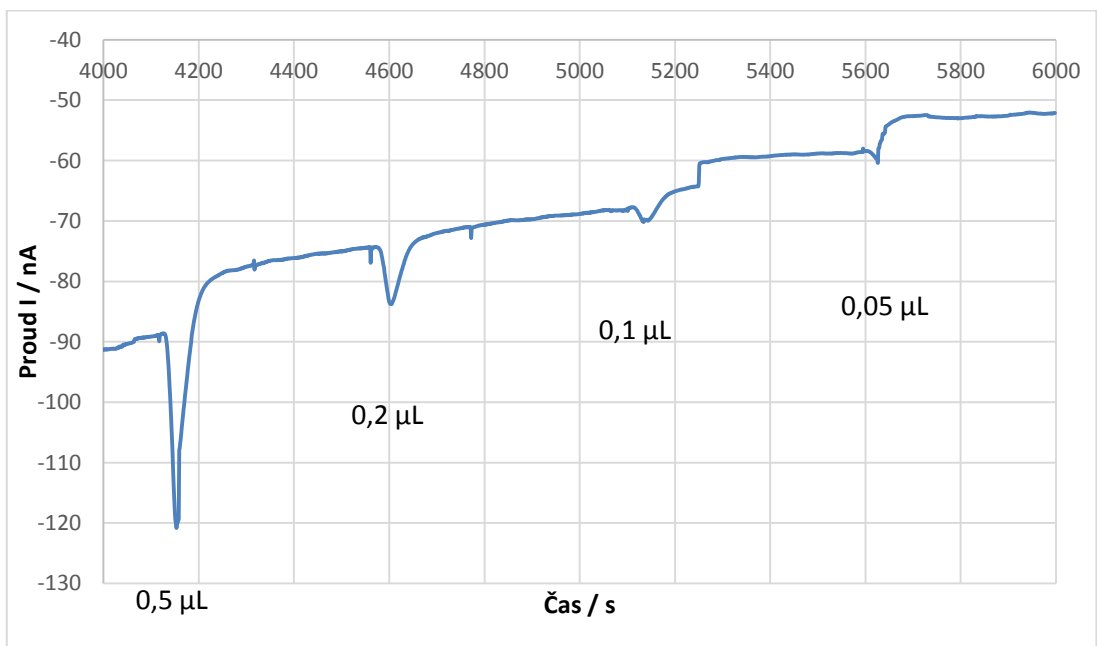
Obrázek 38 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV



Obrázek 39 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -600 mV

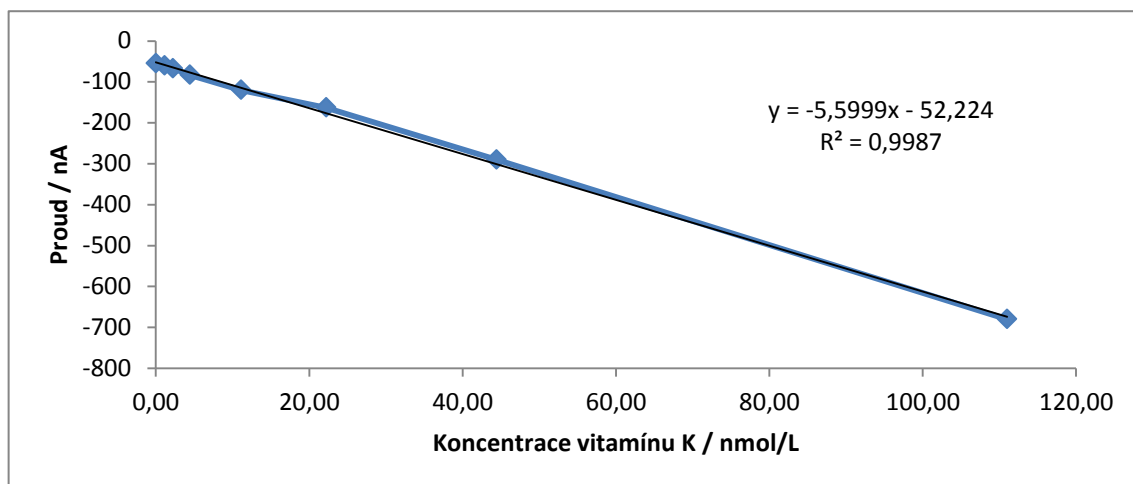


Obrázek 40 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV (přibliženo pro nižší koncentrace)



Obrázek 41 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV (přibliženo pro ještě nižší koncentrace)

Na obrázku 41 si lze všimnout přepnutí dávkovacího kohoutu, jsou to svislé čárky v okolí peaku.



Obrázek 42 - Kalibrační křivka pro koncentrace vitamínu K od 1 do 111 nmol/L (měřeno průtokovou amperometrií při -1000 mV)

Kalibrační křivku pro měření koncentrace vitamínu K znázorňuje obrázek 42. Kalibrační křivka je lineární s rovnicí:

$$y = -5,5999 x - 52,224$$

5 Diskuse

5.1 Použití přístroje

V první řadě jsem se měla rozhodnout, který systém zvolím, připadaly v úvahu EDAQ či PalmSens3. Oba přístroje měřily uspokojivě (viz obrázek 10). Zvolila jsem systém PalmSens, jelikož je uživatelsky jednodušší a také má intuitivní ovládání.

5.2 Vliv míchání

Míchátko č. 1 nemělo osu otáčení v centru symetrie, což mělo vliv na výsledky měření hlavně při vyšších rychlostech. Míchátko č. 2 bylo v tomto ohledu lepší.

Avšak při kontinuálním promíchávání roztoku při vyšších rychlostech otáčení se dostal roztok do konektoru a poté senzor zkratově měřil, to byla další nevýhoda míchání. Proto jsem se nakonec rozhodla pro míchání pipetou pouze po přidání přídavku do roztoku.

Dále z měření vyplynulo, že pokud zvýšíme dvakrát rychlost, tak jsou také dvakrát hustější vlny. Je to nejspíše díky tomu, že v roztoku není dostatek elektroaktivní látky. Přenos látky s mícháním je pak daleko větší než samotná difúze látky v roztoku, jelikož se více látky vyčerpává (reaguje). Toto je hlavní důvod proč jsem poté zvolila cyklickou voltametrii bez míchání. Na obrázku 12 je vidět, že do 100 otáček za minutu je měření skoro bez šumu, nejspíše díky povrchové viskozitě na elektrodě.

Experimentálně bylo ověřeno, že míchání pro toto měření nemá větší smysl, proto jsem ho poté už neaplikovala na měřené roztoky. Další možnost, jak využít promíchávání roztoku, by bylo použití přesného míchání rotační diskové elektrody, což v tomto měření nebylo použito.

Celé toto měření mělo hlavní důvod poskytnout prvotní informace a vytvořit tak zázemí pro náročnější měření.

5.3 Cyklická voltametrie Kanavitu

Podle informací z tabulky 1 z literatury jsem ověřila skutečnost, že vitamín K v Kanavitu je elektrochemicky aktivní. Díky tomu jsem mohla postupovat dle tabulky 2 – pro tři různá rozpouštědla, pro dva druhy pufrů při různých pH a také pro tři

různé koncentrace soli chloridu draselného a ověřit elektrochemickou aktivitu vitamínu K. Vše jsem proměřila pro senzor druhu AC1 (BVT Technologies a.s.) s pracovní elektrodou platinovou a také s elektrodou vyrobenou s grafitu. Kvůli redukci kyslíku ze vzduchu je při experimentech použito probublávání dusíku nad zkoumaným roztokem.

Měřením jsem dospěla k těmto závěrům:

- Co se týká vhodnosti rozpouštědla

Chloroform není vhodný pro voltametrická měření kvůli své vysoké těkavosti a nízké vodivosti (kapitola 4.2.1). Výsledky propanolu a fosfátového pufru o pH 7,5 neměly vypovídající hodnotu pro měření koncentrace vitamínu K. Měření propanolu a citrátového pufru o pH 3 mělo již zřetelné peaky (kapitola 4.2.2). Měření bez rozpouštědla pouze v destilované vodě s přidavkem 1M KCl mělo také zřetelné peaky (kapitola 4.2.4). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s rozpouštědlem acetonitril (kapitola 4.2.3), popř. acetonitril s 10% HCl (obrázky 33 a34).

- Co se týká použití elektrod

Je zřetelné, že výsledky s grafitovou elektrodou vypadají obstojně (obrázek 20). Ovšem grafitová elektroda má tu nevýhodu, že se po určitém čase v acetonitrilu rozdrolí, a proto tuto elektrodu nedoporučuji pro delší měření v organických rozpouštědlech. S platinovou pracovní elektrodou byly výsledky také uspokojivé (obrázek 27), i když peaky vitamínu K byly méně zřetelné než s grafitovou elektrodou. Ovšem senzor s platinovou pracovní elektrodou měl lepší odolnost pro měření v organických rozpouštědlech.

- Co se týká použití Kanavitu jako standardu vitamínu K

Zkoumala jsem elektrochemické vlastnosti kyseliny sorbové, která je obsažena v léčivu Kanavitu. Kyselina sorbová je s vitamínem K elektrochemicky aktivní látka, proto jsem musela ověřit její aktivitu za stejných podmínek jako s Kanavitem. Elektrochemické vlastnosti kyseliny sorbové se při mých měřeních nepotvrdily (kapitola 4.2.6).

Dle literatury [21] by se měl objevit peak této kyseliny okolo 0,6 – 0,8 V. V acetonitrilu byly zřejmé peaky, avšak při opakovaném přidání roztoku kyseliny sorbové se nezvětšily, tedy to bylo nejspíš způsobeno nečistotou v nádobce či adsorpcí na elektrodě, jelikož celkové pozadí pouze acetonitrilu a roztoku KCl je už s těmi peaky. Při proměření kyseliny sorbové v propanolu je mnohem lépe vidět, že elektroaktivita, kterou je vidět na obrázcích 35 a 36, není výrazná, spíše lze říci, že čím

více kyseliny sorbové jsem přidala, tím více klesají peaky. Nejvýraznější peaky jsou okolo 0 V a 0,5 V, což mě pro vitamín K vyšlo spíše -0,6 V, -0,4 V a -1 V. Ověřila jsem, že se při měření neprojeví žádné významné voltametrické vlastnosti kyseliny sorbové vzhledem k měření vitamínu K. tedy si troufám tvrdit, že proměření cyklické voltametrie Kanavitu a zachycení rostoucích peaků s objemem Kanavitu je přímo úměrné vitamínu K. Tedy Kanavit lze použít jako standard vitamínu K.

5.4 Cyklická voltametrie standardu vitamínu K

Výsledky voltametrie standardu vitamínu K jsou v kapitole 4.2.5. Tyto výsledky nejsou v této práci dostatečně podrobně prozkoumány, a to z důvodu neuspokojivých výsledků kvůli použití pouze jedné šarže senzorů a nemožnosti získání organické soli TBAHFP (Tetrabutylammonium hexafluorofosfát, Bu_4NPF_6).

Dle tabulky 1 podle literatury [18] je zřejmé, že nejlepší výsledky by měly být s použitím rozpouštědla acetonitrilu, avšak za použití organické soli TBAHFP jako nosné iontové síly. Protože jsem neměla možnost pracovat se solí TBAHFP, použila jsem sůl KCl [17] a pro organická rozpouštědla vhodnější sůl KClO_4 . Na obrázcích 35 až 37 jsou výsledky. Obrázky 36 a 37 znázorňují měření vitamínu K v propanolu, ve kterém je šum, a standard vitamínu K není znatelný. Na obrázku 35 je voltamogram vitamínu K v acetonitrilu, tento výsledek měření ukazuje, že se objevují rostoucí peaky po přidání standardu vitamínu K při -1 V a +0,4 V.

Pouze v případě měření [17] byly použity chemikálie 0,1M HCl s 2,0M KCl. Na obrázcích 38 a 39 výsledek měření ukazuje, že se objevují rostoucí peaky po přidání standardu vitamínu K při -0,2 V a +0,1 V.

Do budoucna by se mohla při napětí -600 mV zkusit také průtoková amperometrie standardu vitamínu K, jelikož by to mělo dosáhnout nižšího detekčního limitu a celkově by to mělo potvrdit správnost celé teorie o možnosti měření koncentrace vitamínu K pro diagnostický senzor.

Pro ověření dosažení podobně nízkých koncentrací vitamínu K jako je v lidské plazmě, by bylo vhodné proměřit průtokovou amperometrií na standard vitamínu K při velmi nízkých koncentracích.

5.5 Průtoková amperometrie vitamínu K

Výsledky jsou v kapitole 4.3.

- Co se týká použití elektrod

Ve výsledcích měření s grafitovou pracovní elektrodou bylo šum (viz obrázek 30), jelikož kvůli acetonitrilu ze senzoru na povrchu zmizel grafit (organické rozpouštědlo postupně rozpouští grafit). Grafit je nanášen pomocí past, není naleptán jako např. platina. Pro další měření byla použita platinová pracovní elektroda, kde je platina vypálená, a není rozpustná v acetonitrilu. Na obrázcích 31 až 33 lze vidět výborné výsledky s použitím platinové elektrody.

- Co se týká použití průtokové cely

Použitou celu FC2 z plexiskla acetonitril rozpustil, proto ji jsem ji dále nemohla použít. Dále byla použita cela FC2 z čistého polyethylenu, která byla pro acetonitril vyhovující.

- Poznámky ke koncentraci vitamínu K

Díky ověření, že v Kanavitu byl měřen vitamín K cyklickou voltametrií (kapitola 4.2), jsem mohla zmenšit koncentraci vitamínu K až na koncentraci podobnou vitamínu K v lidské plazmě (jednotky nmol/L). Tedy je důležitý výsledek, že díky průtokové amperometrii při použití -600 mV a -1000 mV jsem dokázala elektrochemicky změřit i takto nízkou koncentraci vitamínu K. Kalibrační křivka pro měření koncentrace vitamínu K od 1 do 111 nmol/L je na obrázku 42.

Výhodou průtokové amperometrie je to, že se dají měřit i velmi nízké koncentrace vitamínu K, až do jednotek nmol/L, kdežto u cyklické voltametrie jsem dosáhla pouze jednotek $\mu\text{mol/L}$.

5.6 Senzitivita (citlivost) dané metody

Citlivost je míra schopnosti rozlišit dva vzorky nebo také je určena směrnici kalibrační křivky. Směrnice kalibrační křivky je $-5,5999$ (kapitola 4.3, obrázek 42).

Změřila jsem pomocí průtokové amperometrie koncentraci analytu až jednotky nmol/L, tedy podobné koncentrace vitamínu K jako je lidské plazmě či krvi.

Citlivost lze také řídit a snížit i díky předzpracování vzorku.

Voltametrické metody mají omezenou citlivost vlivem kapacitního proudu, který nenese žádnou informaci o koncentraci analytu ve vzorku. To by šlo eliminovat pulzní

voltametrií, kde se odečítá proud v době, kdy kapacitní proud poklesl na zanedbatelnou hranici. Také volba parametrů elektrochemického měření ovlivňuje citlivost.

5.7 Detekční limit a oblast stanovitelnosti

Detekční limit a oblast stanovitelnosti spolu úzce souvisejí, proto je diskutuji společně v jedné kapitole. Díky průtokové amperometrii pro vitamín K jsem dosáhla limitu detekce (LOD) až na $1,11 \times 10^{-09}$ mol/L, což je velice důležité, protože tato koncentrace je podobná koncentraci vitamínu K v lidské krvi. O tom se zmiňuji již v kapitole 4.3. Mez detekce by měla být 10x nižší než požadovaná koncentrace analytu, tedy by bylo vhodné ještě o jeden řád snížit.

Oblast stanovitelnosti (LOQ) je většinou třikrát větší než detekční limit. Zde mohu říci dle výsledků, že se dá stanovit pomocí použité metody od $4,44 \times 10^{-09}$ mol/L (viz obrázky 38 až 42).

Do budoucna doporučuji snížit detekční limit a tím i oblast stanovitelnosti tak, že budou přesně stanoveny podmínky elektrochemické metody a také předzpracováním vzorků.

5.8 Přesnost stanovení a jeho selektivita

Přesnost analytického stanovení znamená shodu výsledků souboru opakovaných měření téhož vzorku nebo materiálu. Při mých opakovaných měřeních bylo dosaženo uspokojivé přesnosti, protože pozice peaku, která charakterizuje látku kvalitativně, jsou vždy kolem -1000 mV (viz např. obrázky 16, 25 a 29).

Selektivita analytické metody znamená schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek. Ve stanovení vitamínu K v Kanavitu jsem dokazovala, že kyselina sorbová nemá podstatný vliv na toto měření (viz kapitola 3.2.5). Do budoucna lze ke zlepšení selektivity zkusit změnit pH analyzovaného vzorku, tím by se mohly omezit interferující látky.

5.9 Konstrukce

Částí zadání práce byl i návrh konstrukce senzoru pro stanovení koncentrace vitamínu K. Ve svých měřeních jsem použila tyto senzory: AC1.W2.RS (s platinovou pracovní elektrodou), AC1.W4.RS (s grafitovou pracovní elektrodou) a běžné tříelektrodové voltametrické zapojení.

Po zanoření do problematiky elektrochemického stanovení jsem zjistila, že pro měření jsou důležitější celkové parametry měření a použité chemikálie nežli samotný senzor. Toto zjištění lze vyčíst z obrázků 18 (senzor AC1.W4.RS), 22 a 23 (senzor AC1.W2.RS), které vykazují podobné hodnoty. Vliv pracovní elektrody je zásadnější než geometrie celého senzoru, který byl vyvíjen řadu let, proměřován a pozměňován.

Po svých měřeních si trůfám tvrdit, že topologie senzoru AC1 je opravdu nadčasová a není potřeba ji měnit. Za zkoušku by stálo proměřit i další materiály pracovní elektrody či senzor pouze lehce modifikovat. Podle literatury [18] by šlo použít elektrody BCFME (mikroelektroda z uhlíkových vláken s borem) či HgCFME (mikroelektroda z uhlíkových vláken se rtutí), dle [15] pracovní elektrodu ze skelného uhlíku. Navrhuji také změnu referentní elektrody za kov zinek [16] a změnu pracovní elektrody na materiál pyrolytický uhlík [17].

Dále navrhuji, že by se mohla použít organická sůl TBAHFP namísto KCl či KClO_4 . Lze také jako rozpouštědlo vyzkoušet DMF (Dimethylformamid) [16], který je však toxický a pravděpodobně by byl překážkou při zavádění sensorového měření do klinické praxe.

Namísto konstrukce nového senzoru navrhuji ponechat senzor AC1.W2.RS s využitím platinové pracovní elektrody popř. grafitové pracovní elektrody, která by musela být modifikovaná na uhlíková vlákna, aby vydržela chemické prostředí dané metody.

6 Závěr

Definovala jsem parametry, které ovlivňují voltametrické stanovení vitamínu K. Mezi hlavní parametry patří druh použité elektrody, medium (rozpouštědlo) a typ voltametrické techniky a její parametry, které jsem experimentálně ověřila.

Nejvhodnější parametry pro měření vitamínu K cyklickou voltametrií jsou tyto: rozpouštědlo acetonitril popř. vodný roztok kyseliny chlorovodíkové, pomocný elektrolyt 1M KCl, počáteční a konečný potenciál -2V, zlomový potenciál +1V, E step 0,005V, skenovací rychlost 200 mV/s, platinová pracovní elektroda.

Dle výsledků se domnívám, že elektrochemické metody, které jsem použila, se zdají být pro stanovení koncentrace vitamínu K vhodnou alternativou pro svoji citlivost, nízkou spotřebu reagensů, selektivitu a nenáročnost.

Seznam použité literatury

- [1] Shearer, M. J.; Vitamin, K. *Lancet*, 1995, 345(8944), 229-234.
- [2] Suttie, J. W. Vitamin K and human nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1992, 92(5), 585-590.
- [3] Sadowski, J. A.; Hood, S. J.; Dallal, G. E.; Garry, P. J. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, 50(1), 100- 108.
- [4] Booth, S.; Tucker, K.; McKeown, N.; Davidson, K.; Dallal, G.; Sadowski, J. Relationships between dietary intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in humans. *J. Nutr.*, 1997, 127(4), 587-592.
- [5] Blood Thinner Pills: Your Guide to Using Them Safely. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville [online] 2010-8--- [cit. 2014-5-17] Dostupné na: <http://www.ahrq.gov/patientsconsumers/diagnosis-treatment/treatments/btpills/index.html>
- [6] Prof. MUDr. Jindřich Špinar, CSc., FESC, doc. MUDr. Růžena Lábrová, Ph.D.; REMEDIA -internetové stránky českého farmakoterapeutického dvouměsíčníku [online]. 2011-4--- [cit. 2014- 5-17] Dostupné na: <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Antikoagulacniterapie-u-fibrilace-sini/6-F-14T.magarticle.aspx>
- [7] Marinova M.; Lütjohann D.; Westhofen P.; A Validated HPLC Method for the Determination of Vitamin K in Human Serum – First Application in a Pharmacological Study, *The Open ClinicalChemistry Journal*, 2011, 4, 17-27
- [8] J.P. Langenberg, U.R. Tjaden, Determination of (endogenous) vitamin K1 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using fluorometric detection after postcolumn electrochemical reduction. Comparison with ultraviolet, single and dual electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 305 (1984) 61–72.
- [9] V. Ducros, M. Pollicand, F. Laporte, A. Favier, Quantitative determination of plasma vitamin K1 by high-performance liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 7–14.

- [10] M. J. Shearer,; M. J. Seghatchian; Vitamin K a Vitamin K-Dependent Proteins: Analytical, Physiological, and Clinical Aspects, 1993, 27-52
- [11] Ziyatdinova G.,;Ziganshina E.; Budnikov H.; Electrochemical reduction and quantification of menadione in sodium dodecyl sulfate micellar media, J.Solid State Electrochem, 2013, 17:26792685
- [12] Univerzita Palackého v Olomouci. Katedra fyzikální chemie. [online]. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/pok1/Cyklicka_voltametrie.pdf
- [13] Mindl J.:Základy elektroorganické chemie, Academia, 2000
- [14] Jane Higdon, Ph.D., Sarah L. Booth, Ph.D.. Linus Pauling Institute |. Micronutrient Information Center. [online]. 2010 [cit. 2015-05-15]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-K>
- [15] Webster R. D.,Voltammetry of the Liposoluble Vitamins (A, D, E and K) in Organic Solvents, The Chemical Record, Vol. 12, 188–200 (2012)
- [16] Thomas H., Heide R., Terfort A., Thin film reference electrodes for aqueous and organic media, Elsevier, Sensors and Actuators B: Chemical (2012)
- [17] Electrochemistry of Immobilized Particles and Droplets, Fritz Scholz, Uwe Schreder, Rubin Gulaboski, Springer, 17. 1. 2005 - Počet stran: 290
- [18] Alegret S., Mekroci A., Electrochemical Sensor Analysis, Elsevier, Vol. 49, (2007)
- [19] Krejčí J, Stejskalová R., Krejčová D., Grosmanová Z. : Senzory, 8. Kapitola- Tlustovrstvé elektrochemické senzory, VŠCHT, 91-109, (2007)
- [20] BVT. BVT Technologies a.s.. [online]. 15.5.2016 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.bvt.cz/>
- [21] Ilanna C. Lopes, Paulina V. F. Santos, Victor C. Diculescu,;Sorbic acid and its degradation products: Electrochemical characterization, Analytical Letters, 45: 408–417, (2012)
- [22] Podle ústního sdělení Bc. Lenka Šafaříková (klinická biochemie RADANAL s.r.o.,Pardubice) dne 14. března 2015
- [23] International Chemistry Co., LTD. [online]. 15.5.2016 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.autolabj.com/construction.files/electrode.files/E-20ml%20cell.htm>

Seznam obrázků a příloh

Obrázek 1 – Chemická struktura vitamínu K [14].....	11
Obrázek 2 – Cyklus vitamínu K [14].....	13
Obrázek 3 – První vzorky senzorů tištěných na keramice [19]	15
Obrázek 4 - Princip elektrochemických senzorů – integrace elektrochemické cely tří elektrod do malého kompaktního senzoru [19,22]	17
Obrázek 5 – Struktura a základní rozměry použitého senzoru – Pracovní – referentní – pomocná – od středu ven [20].....	18
Obrázek 6 -Skleněná cela TC4 [20].....	20
Obrázek 7 - Míchátko č 1 - Plochý obdélníček	23
Obrázek 8 - Míchátko č. 2 - BVT míchátko (83 mm x23 mm) [20]	23
Obrázek 9 - Průtoková cela – FC2 Flow cell (42 mm x 24 mm x 16 mm) [20].....	26
Obrázek 10 - Porovnání potenciostatů eDAQ a PalmSens3 při různých skenovacích rychlostech	27
Obrázek 11 - Roztok 1M KCl a poté s přidavkem 1M 5mL FeFe - měřeno bez míchání	28
Obrázek 12 - Porovnání vlivu míchání	28
Obrázek 13 – Měření s 10mL chloroformu, 100 μ L 1M KCl a 100 μ L Kanavitu	29
Obrázek 14 - Měření s propanolem (tmavě zelená) bez KCl: 200 μ L Kanavitu postupně přidávaného (postupně: tmavě modrá, khaki, světle modrá, růžová)	30
Obrázek 15 - Měření s propanolem (tmavě zelená) s KCl 0,1M (tmavě modrá): 200 μ L Kanavitu postupně přidávaného (postupně: khaki, světle modrá, růžová)	30
Obrázek 16 - Měření s propanolem s KCl 2M (žlutá): 200 μ L Kanavitu postupně přidávaného (postupně: tmavě modrá, khaki, světle modrá, růžová, červená, fialová) – přiblíženo	31
Obrázek 17 Měření s acetonitrilem (zelená), acetonitril + KCl (tmavě modrá).....	31
Obrázek 18 - Měření s acetonitrilem (zelená), acetonitril + KCl (tmavě modrá), po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená).....	32
Obrázek 19 - Měření s acetonitrilem, acetonitril + KCl (tmavě modrá), po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená), po přidání dalších 100 μ L Kanavitu (světle modrá). 32	
Obrázek 20 - Měření s acetonitrilem + KCl, po přidání 100 μ L Kanavitu (olivově zelená), po přidání dalších 100 μ L Kanavitu (světle modrá), po přidání dalších 100 μ L	

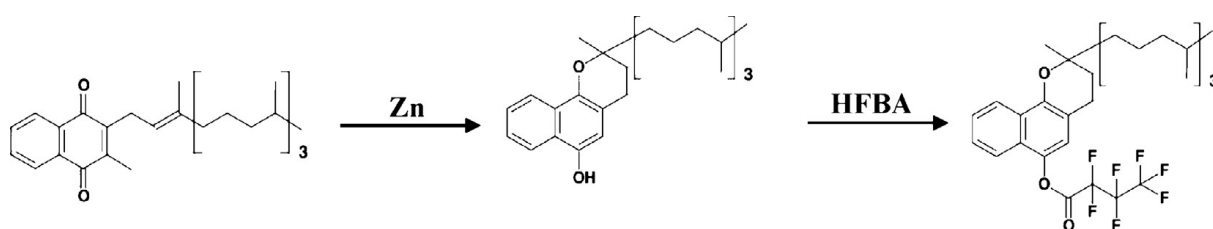
Kanavitu (růžová). Při změně parametru skenovací rychlost 800 mV/s, pak i Estep 0.01 V (červená)	33
Obrázek 21 - Zkouška funkčnosti a správnosti voltametrického měření (300 μ L Kanavitu v 10 mL roztoku acetonitrilu a 100 μ L 1M KCl): 50 mV/s (fialová), 200 mV/s (růžová), 800 mV/s (červená).....	34
Obrázek 22 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu a po 25 μ L přidávání Kanavitu.....	35
Obrázek 23 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu a 200 μ L Kanavitu po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá)	35
Obrázek 24 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu, 200 μ L Kanavitu, po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (olivově zelená), opět po přidání 25 μ L Kanavitu (světle modrá)	36
Obrázek 25 - Grafitová pracovní elektroda - 10 mL acetonitrilu, 200 μ L Kanavitu, po přidání 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), dále po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (olivově zelená), opět po přidání 25 μ L Kanavitu (světle modrá), po dalším přidání 25 μ L Kanavitu (růžová)	36
Obrázek 26 - Acetronitril s 0,5 mL 1M KCl (tmavě zelená), po přidání 25 μ L Kanavitu (růžová).....	37
Obrázek 27 - Acetronitril s 10 mM KCl (tmavě zelená), při navyšující se koncentraci o 25 μ L Kanavitu (ostatní barvy).....	37
Obrázek 28 – Měření s vodou a 1M KCl (zelená), po přidání 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá).....	38
Obrázek 29 – Měření s vodou s 1M KCl s Kanavitem při 25 μ L Kanavitu (tmavě modrá) a po 25 μ L přidáváno až do 150 μ L (fialová)	38
Obrázek 30 – Cyklická voltametrie 9mL acetonitrilu + 0,1 mL 0,1M KClO ₄ + standard VK1	39
Obrázek 31 – Cyklická voltametrie 9mL propanolu + 0,1 mL 0,1M KClO ₄ + standard VK1	39
Obrázek 32 - Cyklická voltametrie 9mL propanolu + 0,1 mL 0,1M KCl + standard VK1	40

Obrázek 33 – Cyklická voltametrie 1 mL pokusného roztoku s neznámým objemem vitamínu K (modrá), cyklická voltametrie pokusného roztoku po přidání 20 μ L 10% HCl (červená)	40
Obrázek 34 – Cyklická voltametrie 1 mL pokusného roztoku s neznámým objemem vitamínu K (modrá), cyklická voltametrie pokusného roztoku po přidání 20 μ L 10% HCl (oranžová), po přidání dalších 20 μ L pokusného roztoku (šedá, žlutá a tmavě modrá). 41	41
Obrázek 35 - Roztok kyseliny sorbové v acetonitrilu proměřen voltametriky	42
Obrázek 36 - Roztok kyseliny sorbové v propanolu proměřen voltametriky	42
Obrázek 37 - Průtoková amperometrie s grafitovou elektrodou při -1000 mV	43
Obrázek 38 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV	44
Obrázek 39 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -600 mV	44
Obrázek 40 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV (přiblíženo pro nižší koncentrace)	45
Obrázek 41 - Průtoková amperometrie s platinovou elektrodou při -1000 mV (přiblíženo pro ještě nižší koncentrace).....	45
Obrázek 42 - Kalibrační křivka pro koncentrace vitamínu K od 1 do 111 nmol/L (měřeno průtokovou amperometrií při -1000 mV)	46

Příloha 1: Metodika parametrů stanovení chinonů

Všechny chinony jsou si ve své chemické podstatě podobné, chemická reakce chinon – hydrochinon u nich probíhá a je vratná. Tím lze elektrochemicky proměřit jejich oxidativně-redukční cyklus. Mezi zástupce chinonů, které jsou pro člověka významné a lze je měřit, lze zařadit vitamín K, Koenzym Q10 (ubichinon), léčiva (Doxorubicin) a barviva. Jejich teoretický přehled je v této příloze.

Existuje velké množství možností stanovení chinonů v chromatografii – LC-MS, GC-MS, HPLC s různými druhy detekce UV, FL, CL, ECD. K dalším možnostem stanovení lze řadit voltametrii, potenciometrii či imunosenzor.



Obrázek 43- Derivatizace fylochinonu (vitamín K) s heptafluorbutyric anhydridem (HFBA) po redukcí zinkem při GC-MS stanovení).

Hlavně jsem se zajímala o elektrochemické stanovení chinonů, nejvíce však o vitamín K.

Například existuje voltametrická metoda pro stanovení onkologického léčiva doxorubicin v lidské plazmě díky modifikované elektrodě GCE vrstvou nano oxidu titaničitého (LOD 1.0×10^{-9} mol L⁻¹). [2]

Elektrochemická redukce a kvantifikace menadionu v dodecylsulfát sodný micelárních médií Menadion- Vitamín K3.

V tabulce 1 uvádím možnosti analytické charakteristiky stanovení menadionu (vitamínu K3) voltametricky [10].

Tabulka 5 – Voltametrické parametry vitamínu K3 (menadionu)

Elektroda	Metoda	Podmínky	LOD	Analytický rozsah	Reference
DME		0.2 M HOAc–NaOAc (pH 4.7) a 2.0 mL of 0.05 M KIO ₃	20 nM	40–2,000 nM	[3]
DME	DPP	CHCl ₃	0.5 μM	-	[4]
DME	DPP	CH ₃ OH–0.2 M borátový pufr (9:1) (pH 6.8)	0.3 μM	0.6–10 μM	[5]
DME	Přímá DPP	0.2 M HAc a 0.002 M HCl	0.7 μM	-	[6]
DME	Nepřímá DPP	Acetate buffer (pH 5.5)	0.15 μM	0.5–30 μM	[7]
GCE	AdSSWV	0.1 M HClO ₄	0.13 nM	0.2–500 nM	[8]
GCE	CV	CV 9 mM SDS v 0.1M H ₃ PO ₄ obsahující 10 % ethanol	1.66 μM	7–560 μM 600–2,550 μM	[9]

CV - cyklická voltametrie

DME – kapková rtuťová elektroda

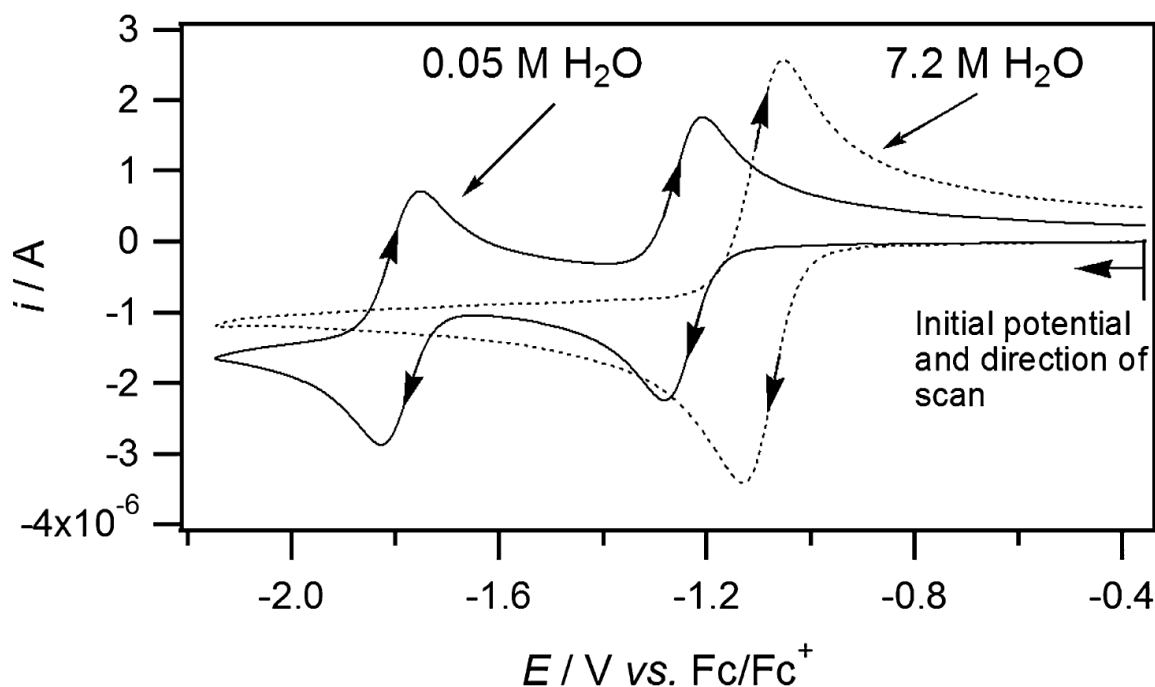
GCE – elektroda ze skelného uhlíku

P - polarografie

DPP - diferenční pulsní polarografie

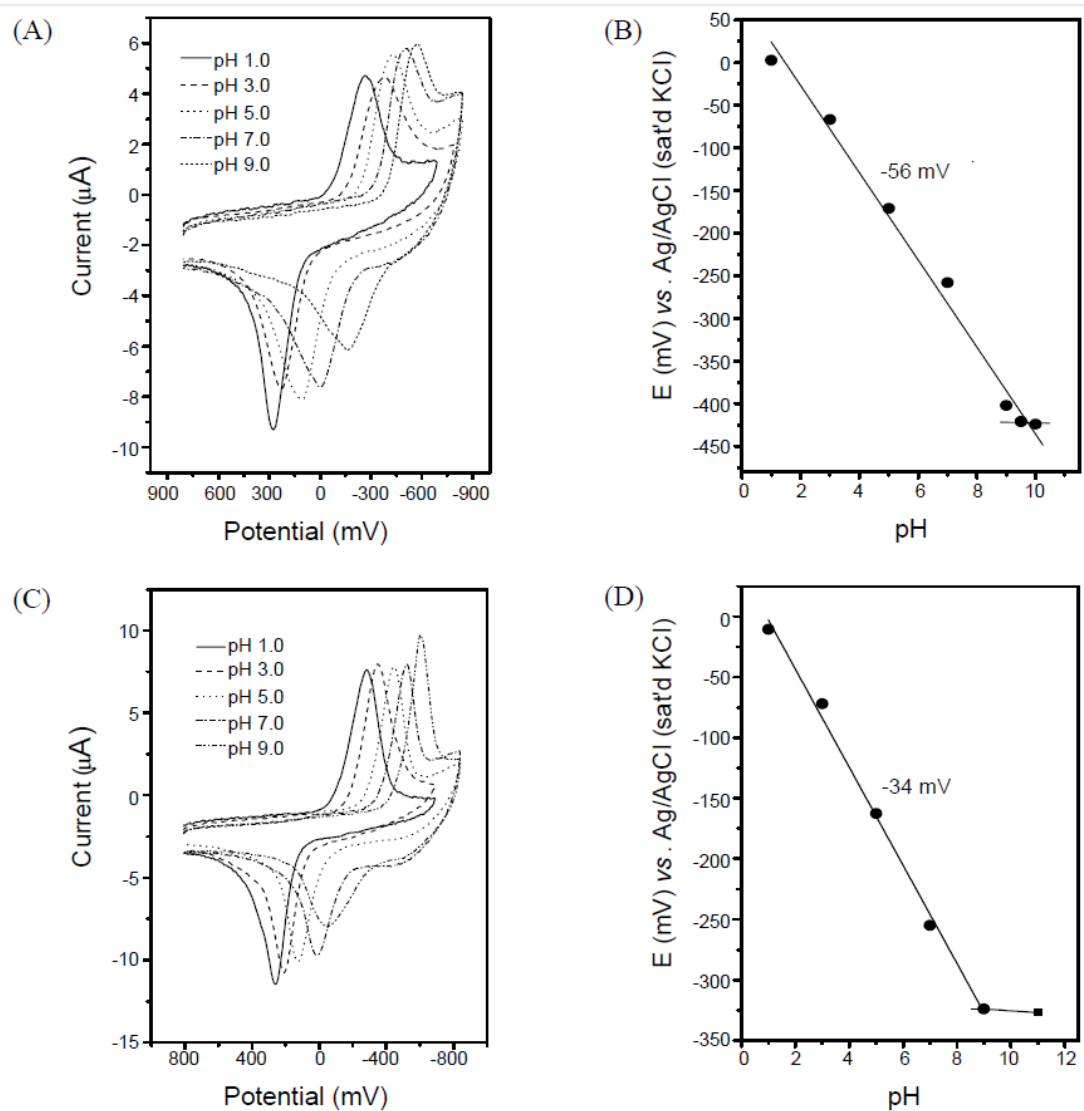
AdSSWV - adsorpční stripping square-wave voltametrie

Vitamin K se v určitých případech chová podle očekávání s chinonovou strukturou a podstoupí dva procesy redukce o jeden elektron. V acetonitrilu se vitamin K1 (VK1) nejprve sníží o jeden elektron přibližně -1,2 V vs. Fc / Fc + a vytvoří radikální aniont (VK1• -). Dále se VK1• - redukuje o jeden elektron přibližně při -1,7 V vs. Fc / Fc + pro vytvoření dianiontu (VK1²⁻). Postup elektron přenosu pro oba jednoelektronové kroky jsou chemicky reversibilní, takže dopředné a zpětné vrcholy jsou v blízkosti stejné velikosti (obrázek 2, plná čára) [11]



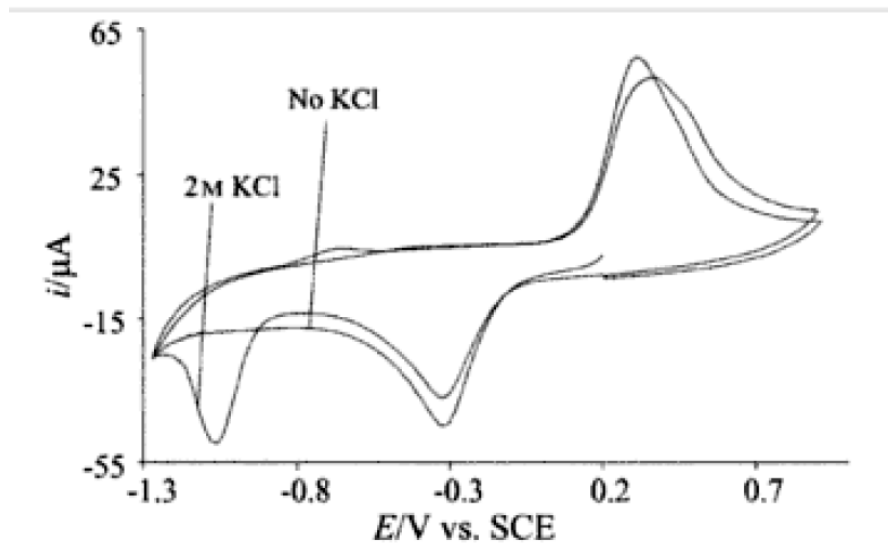
Obrázek 44 - Cyklická voltametrie 1×10^{-3} M vitaminu K1 v acetonitrilu obsahující 0,2 M Bu4NPF6 při 22°C zaznamenaná na 1 mm průměru GC diskové elektrodě při rychlosti skenování 0,1 V.s⁻¹ s různými koncentracemi H₂O [11]

Dále byly studovány elektrochemické vlastnosti vitaminu K1 rozpustného v tučích adsorbované na holé a lipidem potažené skelné uhlíkové elektrody (GCEs) v nepufrovaném a dobře pufrovaném vodním prostředí. Tyto produkty redukce vitaminu K1 byly charakterizovány použitím cyklické voltametrie a in situ UV-viditelné spektroeletrochemické technice. Radikální druhy vitaminu K1 nelze pozorovat na holé GCE v dobře pufrovaném médiu. Tvorba aniontu radikálního vitaminu K1 byla pozorována v nepufrovaném roztoku při pH vyšším než 5,9 nebo na GCE potažené lipidem v dobře pufrovaném roztoku (viz obrázek 2) [12].



Obrázek 45 – (A) Cyklické voltamogramy zaznamenané na modifikované elektrody při různých pH v dobře pufovaném roztoku vitamínu K1 (B) E-pH diagram získaný na modifikované elektrodě (C) Cyklické voltamogramy zaznamenané na lipidem modifikované elektrodě v různých hodnotách pH v dobře pufovaném roztoku vitamínu K1 (D) E-pH diagram získaný pro lipidem modifikovanou elektrodu [12]

Na dalším obrázku 4 je znázorněny voltametrické vlastnosti vitamínu K1. Cyklický voltamogram (skenovací rychlost 20 mV/s) na imobilizované na 4,9mm diametrální basální pyrolitická grafitová elektroda ponořená do 0,1M HCl a do 0,1MHCl obsahující 2M KCl.



Obrázek 46 - Cyklický voltamogram pro redukcí 5,6 nmol vitamínu K1[13]

V literatuře [14] jsou polarografické půl-vlnné potenciály pro redukcí vitamínu K ve vodném roztoku - viz tabulka 2.

Tabulka 6 – Polarografické půl-vlnné potenciály pro redukcí vitamínu K [14]

Látka	rozpuštědlo	pH	E1/2	
VK1	Isopropanol- voda(1:1) obsahující 0,05M KCl	-	-0,58	
VK3	Vodný pufr	3-9	+0,11-0,06 pH	Versus
VK	Vodný pufr	<5-vlna I	-0,38-0,066 pH	normální
NaHSO ₃ adukt		>5	-0,71	kalomelová elektroda.
		<7 vlna II	-0,70-0,06 pH	
		>7	-0,97-0,03 pH	
VK3	Ethanol- voda(3:1)	6,24	-0,17	Versus
	pufrovací roztoky	7,40	-0,24	saturovaná kalomelová elektroda.
		0,1M KCl	-0,33	

REFERENCE Z LITERATURY PRO PŘÍLOHU Č.1:

- [1] N. Kishikawa, N. Kuroda, Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87 (2014) 261–270
- [2] J. Fei, X. Wen, Y. Zhang, L. Yi, X. Chen, H. Cao, Voltammetric determination of trace doxorubicin at a nano-titania/nafion composite film modified electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide, *Mikrochim. Acta* 164(2009) 85–91
- [3] Song JF, He P, Guo W (2001) Determination of menadione based on its polarographic catalytic wave in the presence of potassium iodinate. *Anal Lett* 34:1677–1688
- [4] Pournaghi-Azar MH, Golabi SM (1987) Polarographic determination of K group vitamins in chloroform, application to pharmaceutical preparations and food additions. *J Pharm Belg* 42:315–322
- [5] Akman SA, Kusu F, Takamura K, Chlebowski R, Block J (1984) Differential pulse polarographic determination of plasma menadione. *Anal Biochem* 141:488–493
- [6] Somer G, Doğan M (2008) Direct and indirect methods for the determination of vitamin K3 using differential pulse polarography and application to pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry* 74:96–100
- [7] Somer G, Doğan M (2008) Direct and indirect methods for the determination of vitamin K3 using differential pulse polarography and application to pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry* 74:96–100
- [8] Vire J-C, Abo El Maali N, Patriarche GJ, Christian GD (1988) Square-wave adsorptive stripping voltammetry of menadione (vitamin K3). *Talanta* 35:997–1000
- [9] Guzel Ziyatdinova & Endzhe Ziganshina & Herman Budnikov. Electrochemical reduction and quantification of menadione in sodium dodecyl sulfate (SDS - anionic detergent) micellar media *J Solid State Electrochem* (2013) 17:2679–2685
- [10] Guzel Ziyatdinova & Endzhe Ziganshina & Herman Budnikov. Electrochemical reduction and quantification of menadione in sodium dodecyl sulfate (SDS - anionic detergent) micellar media *J Solid State Electrochem* (2013) 17:2679–2685
- [11] Richard D. Webster, Voltammetry of the Liposoluble Vitamins (A, D, E and K) in Organic Solvents, *The Chemical Record*, Vol. 12, 188–200 (2012)

[12] Electrochemical and Spectroelectrochemical Behaviors of Vitamin K1/Lipid Modified

Electrodes and the Formation of Radical Anion in Aqueous Media, JeeEun Yang,‡ Jang-Hee Yoon, Mi-Sook Won,* and Yoon-Bo Shim‡,* , Bull. Korean Chem. Soc. 2010, Vol. 31, No. 11

[13] Electrochemistry of Immobilized Particles and Droplets, Fritz Scholz, Uwe Schreder, Rubin Gulaboski, Springer, 17. 1. 2005 - Počet stran: 290

[14] Glenn Dryhurst, Biological Electrochemistry, Svazek 1 Biological electrochemistry, Elsevier, 1982, Počet stran: 560