

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE KARCINOGENNÍCH DERIVÁTŮ PYRENU A JEJICH METABOLITŮ

OKSANA YOSYPCHUK a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
oksana.yosypchuk@seznam.cz

Úvod

Přímým důsledkem současného bouřlivého rozvoje automobilismu je nárůst zdravotních rizik spojených s expozicí naší populace škodlivým látkám obsaženým v automobilových emisích. Významnou roli v tomto směru hrají polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH)¹ patřící k rozšířeným chemickým karcinogenům². Proto je velice důležité tyto látky v životním a pracovním prostředí vhodnými postupy monitorovat. PAH a NPAH mohou do těla vstupovat po přímém kontaktu s kůží či zažívacím traktem. Proto je důležitý výběr vhodných zástupců těchto polutantů, případně jejich metabolitů, jako vhodných biomarkerů pro sledování expozice těmto nebezpečným látkám. Jeden z nejpoužívanějších markerů expozice PAH je 1-hydroxypyren (1-HP). Poprvé byl identifikován v moči prasete v roce 1983 jako hlavní produkt metabolismu pyrenu³. Pro sledování expozice NPAH se jako biomarkery uplatňují 1-nitropyren a jeho metabolit 1-aminopyren (1-AP).

Vzhledem k tomu, že výše uvedené látky obsahují snadno oxidovatelné hydroxy- a aminoskupiny na aromatickém jádře, nabízí se pro jejich mimořádně citlivé a selektivní stanovení v tělních tekutinách vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Tato technika je levnější nežli metody využívající hmotnostně-spektrometrické detekce a zároveň dostatečně citlivá, takže by mohla být obecně použitelná k monitorování expozice PAH a NPAH.

Velmi důležitou roli v elektrochemické detekci hraje výběr pracovní elektrody. Pro daný projekt byla zvolena borem dopovaná diamantová filmová elektroda. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou, nízkým šumem a odolností vůči pasivaci, což umožňuje využití těchto elektrod v průtokových systémech⁴.

Cílem této práce je na základě studia elektrochemického chování 1-HP a 1-AP nalézt optimální podmínky pro jejich stanovení diferenční pulsní voltametrií ve vodně-methanolicke prostředí na borem dopované diamantové filmové elektrodě a rovněž jejich stanovení v moči metodou HPLC-ED po předběžné separaci a prekoncentraci pomocí extrakce na tuhou fázi.

Experimentální část

Studované látky

Zásobní roztok 1-HP (čistota p. a., 98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) byl připraven rozpuštěním 0,02183 g 1-HP v methanolu (čistota p. a., 99,8%, Penta, ČR) za pomoci ultrazvuku a doplněním na celkový objem 100 ml. Zásobní roztok 1-AP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) byl připraven rozpuštěním 0,02171 g 1-AP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků. Všechny roztoky studovaných látek byly skladovány ve skleněných nádobách ve tmě za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie

Kyselina boritá (čistota p. a., Lachema, Brno), kyselina orthofosforečná (čistota p. a., 85%, Lach-Ner, ČR), octová kyselina (čistota p. a., 99,8%, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný (čistota p. a., Lach-Ner, ČR), deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Britton-Robinsonův pufr (dále BR pufr) o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselé složky (obsahující kyselinu boritou, octovou kyselinu a kyselinu fosforečnou o koncentraci 0,04 mol dm⁻³) a složky zásadité obsahující 0,20 mol dm⁻³ NaOH. Fosforečnanový pufr o pH 3–5 byl připraven smísením kyseliny fosforečné o koncentraci 0,05 mol dm⁻³ s vypočteným množstvím hydroxidu sodného o koncentraci 1,0 mol dm⁻³.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí počítačového Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) v programu PolarPro verze 5. Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení. Referentní elektroda: argenticchloridová (3 mol dm⁻³ KCl, Monokrystaly, Turnov, ČR), pomocná elektroda: platinový plíšek (Monokrystaly, Turnov, ČR) a pracovní elektroda: borem dopovaná diamantová filmová elektroda (Windsor Scientific Ltd, Velká Británie, průměr aktivní části 3 mm). Pro měření pH sloužil digitální pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Dále byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf s elektrochemickou detekcí v uspořádání: gradientová pumpa L-2130 (Merck), dávkovač Front-Loading Sample Injector Model 7725(i) 20 µl (Rheodyne), kolona Lichro-CART 125-4 100 RP-18, Cat. 50825, 5 µm, 119×4 mm (Merck), Amperometric Detector LC-4C (BAS), předko-

lonka LiChroCARTR PAH 4-4 (Merck). Byl používán tříelektrodový systém (viz výše) v tzv. „wall-jet“ uspořádání. Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona byla termostátována na 40 °C. Používané mobilní fáze byly odvzdušňovány ultrazvukem PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner (Powersonic) po dobu 10 min. Extrakce na tuhé fázi se prováděla na kolonce LiChrolut® RP-18 (Merck).

Pracovní postupy

Při diferenční pulsní voltametrické (DPV) byly použity následující parametry: polarizační rychlost 20 mV s⁻¹, pulsy o šířce 80 ms, modulační amplituda +50 mV. Pro eliminaci problémů s pasivací byl oxidační scan prováděn v případě 1-AP od +230 do +680 mV a od +150 do +500 mV v případě 1-HP. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávána v deionizované vodě.

Při záznamu DP voltamogramů bylo postupováno následovně: do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno dané množství roztoku 1-HP nebo 1-AP v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 7 ml a roztok byl doplněn po značku BR pufrům o daném pH. Vzdušný kyslík byl z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výška pík obou sledovaných látek při DPV byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem.

Mez detekce (LOD) byla počítána podle směrnice IUPAC pomocí trojnásobku směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti a mez stanovitelnosti (LOQ) pomocí desetinásobku této směrodatné odchylky. Při stanovení 1-AP a 1-HP metodou HPLC-ED byla LOD (resp. LOQ) určována jako koncentrace látky, která poskytuje pík třikrát (resp. desetkrát) vyšší než je absolutní hodnota šumu.

Extrakce 1-AP a 1-HP z moči

K 10 ml moči neexponovaného pracovníka bylo přidáno vypočtené množství 1-AP nebo 1-HP v methanolu. K takto připravenému modelovému vzorku moči bylo přidáno 10,0 ml fosforečnanového pufru o pH 5 a vzniklý roztok byl prolit SPE kolonkou, která byla předem aktivována promytím 5 ml MeOH a 10 ml deionizované vody. Kolonka byla následně promyta 10 ml vody a zachycené látky byly vymyty 10 ml MeOH. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku, odparek rozpuštěn v 1,0 ml MeOH a zanalyzován pomocí HPLC-ED. Porovnáním výšek píků daných látek o $c = 4 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ v methanolu s jejich odezvami po předběžné prekoncentraci ze vzorku moči obsahujícím $4 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ 1-AP nebo 1-HP bylo zjištěno, že výtěžnost použité extrakce je 87 % pro 1-HP a 75 % pro 1-AP.

Výsledky a diskuse

Stanovení 1-HP a 1-AP ve vodně-methanolickém prostředí diferenční pulsní voltametrické

Nejdříve byl sledován vliv pH na chování 1-AP a 1-HP v prostředí methanol – BR pufr o pH 2 až 12 (7:3) metodou diferenční pulsní voltametrické. Za optimální bylo pro 1-AP zvoleno prostředí methanol – BR pufr o pH 3,0 (výsledné pH vodně-methanolického roztoku 4,5) a o pH 5,0 pro 1-HP (výsledné pH vodně-methanolického roztoku 6,3), kde byly získány nejvyšší a nejsnáze vyhodnotitelné píky.

U obou látek docházelo k pasivaci elektrody po druhém oxidačním kroku, kterému odpovídá druhý pík. Pro odstranění pasivace byl scan prováděn v případě 1-AP pouze v rozmezí od +230 do +680 mV a v případě 1-HP od +150 do +500 mV. Při dodržení těchto potenciálových rozmezí se pasivace elektrody podstatně snížila, obzvláště u 1-AP, kdy se při potenciálu vyšším než +680 mV tvořil polymerní produkt tvořící elektrochemicky neodstranitelný povlak na elektrodě.

Koncentrační závislost 1-AP a 1-HP byla proměřena ve výše uvedeném prostředí v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Parametry kalibračních přímků jsou uvedeny v tabulce I. Vybrané DP voltamogramy 1-AP jsou pro ilustraci uvedeny na obr. 1a. Vzhledem k blízkým hodnotám potenciálů píků nelze provést stanovení těchto látek vedle sebe.

Stanovení 1-HP a 1-AP ve vodně-methanolickém prostředí pomocí HPLC-ED

Při hledání optimálních podmínek pro stanovení 1-AP a 1-HP metodou HPLC-ED se zkoumaly následující parametry: vliv složení mobilní fáze na eluční časy a výšku píků látek, potenciál oxidace obou látek a nevhodnější průtoková rychlost mobilní fáze.

Během optimalizace složení mobilní fáze byl smíchán odpovídající objem methanolu (60–85 %) s vodným roztokem 0,05M fosforečnanového pufru o pH v rozmezí 3,0 až 5,0. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze se složením MeOH:0,05M fosforečnanový pufr o pH 5,0 (80:20) pro obě látky, při které hodnoty elučních časů byly do 4 minut.

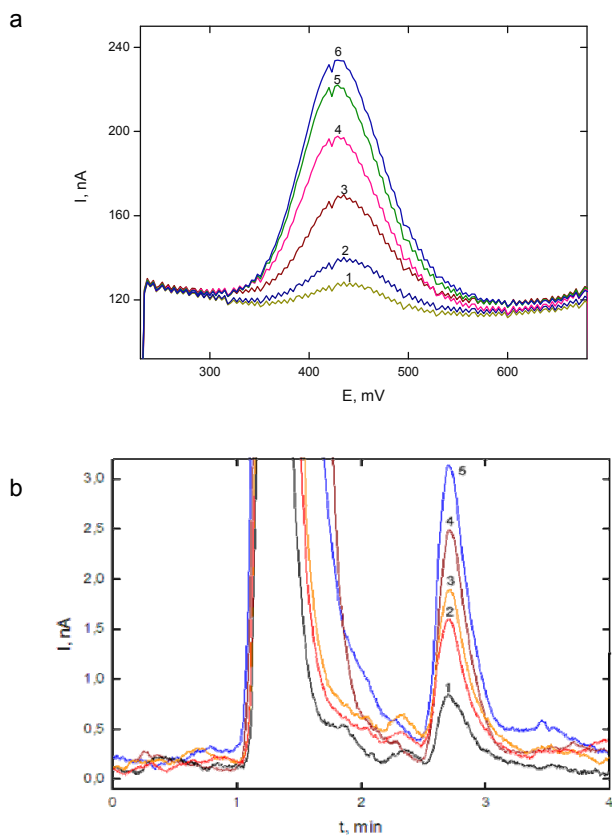
Nejvhodnější potenciál oxidace při různých hodnotách průtokové rychlosti (proměřeno v rozmezí 0,6 až 1,4 ml min⁻¹) mobilní fáze 1-AP a 1-HP byl odečten z příslušných hydrodynamických voltamogramů. Potenciál elektrody byl postupně zvyšován od +400 do +1200 mV. Při nižším potenciálu obě látky už neposkytovaly žádnou odezvu a při hodnotě vyšší než +1200 mV základní linie byla velmi nestabilní. Potenciál detekční elektrody, při kterém obě látky poskytují nejlepší odezvu, byl +1000 mV při průtokové rychlosti 1,0 ml min⁻¹ pro 1-AP a 0,8 ml min⁻¹ pro 1-HP. Při těchto podmínkách byla proměřena koncentrační závislost 1-AP a 1-HP v methanolu (viz tab. I).

Tabulka I

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolickém prostředí pomocí DPV a HPLC-ED na BDDE

| Látka | c [mol dm ⁻³] | Směrnice [nA mol ⁻¹ dm ³] | R | LOD [mol dm ⁻³] | LOQ [mol dm ⁻³] |
|----------------------------|-------------------------------------|---|--------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>DPV^a</i> | | | | | |
| 1-AP | $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ | $1,18 \cdot 10^7$ | 0,9969 | $6 \cdot 10^{-8}$ | $2 \cdot 10^{-7}$ |
| 1-HP | $2 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6}$ | $1,38 \cdot 10^7$ | 0,9934 | $1 \cdot 10^{-7}$ | $3 \cdot 10^{-7}$ |
| <i>HPLC-ED^b</i> | | | | | |
| 1-AP | $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ | $5,42 \cdot 10^6$ | 0,9990 | $5 \cdot 10^{-8}$ | $2 \cdot 10^{-7}$ |
| 1-HP | $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ | $2,09 \cdot 10^6$ | 0,9992 | $9 \cdot 10^{-8}$ | $3 \cdot 10^{-7}$ |

^a Potenciál píku při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ +443 mV (1-AP) a +310 mV (1-HP), podmínky a prostředí viz text; ^b retenční čas 2,76 min (1-AP) a 3,93 (1-HP), mobilní fáze a potenciál pracovní elektrody viz text



Obr. 1. (a) Voltamogramy 1-AP. Koncentrace v měřeném roztoku $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) mol dm⁻³. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0. (b) Chromatogramy 1-AP v moči. Koncentrace v moči $2 \cdot 10^{-8}$ (1), $4 \cdot 10^{-8}$ (2), $6 \cdot 10^{-8}$ (3), $8 \cdot 10^{-8}$ (4) a $1 \cdot 10^{-7}$ (5) mol dm⁻³. Píky neodpovídají MF: MeOH:0,05M fosforečnanový pufr pH 5,0 (80:20), $E = 1000$ mV, průtoková rychlost 1 ml min^{-1} . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDE

Při porovnání stanovení 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolickém prostředí metodou DPV a HPLC-ED výsledky ukazují, že citlivější metodou je DPV, ale HPLC-ED je pochopitelně selektivnější. Souvisí to pravděpodobně s tím, že při měření v průtokovém systému jsou menší problémy s pasivací vzhledem k odplavování produktů elektrodové reakce od povrchu elektrody. Meze stanovitelnosti jsou téměř totožné.

Stanovení 1-HP a 1-AP v moči pomocí HPLC-ED

Na základě zjištěných optimálních parametrů pro stanovení obou látek v methanolu byla proměřena koncentrační závislost pro 1-AP a pro 1-HP v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ v modelovém vzorku moči po předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí na tuhé fázi. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedené v tab. II, vybrané chromatogramy na obr. 1b.

Závěr

Na základě provedeného výzkumu elektrochemického chování 1-AP a 1-HP na borem dopované diamantové filmové elektrodě metodami DPV a HPLC-ED byly nalezeny optimální podmínky pro jejich stanovení ve vodně-methanolickém prostředí a v moči. Závěrem lze konstatovat, že v případě monitorování profesionální expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům by citlivost elektrochemického detektoru měla být zcela postačující pro provedení přesné a rychlé analýzy.

Tabulka II

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 1-AP a 1-HP v moči po extrakci na tuhé fázi. Měřeno metodou HPLC-ED

| Látka | Retenční čas [min] | c [mol dm ⁻³] | Směrnice [nA mol ⁻¹ dm ³] | R | LOD [mol dm ⁻³] | LOQ [mol dm ⁻³] |
|-------|-----------------------|-------------------------------------|---|--------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1-AP | 2,70 | $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$ | $3,35 \cdot 10^7$ | 0,9996 | $1 \cdot 10^{-8}$ | $3 \cdot 10^{-8}$ |
| 1-HP | 3,95 | $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$ | $1,92 \cdot 10^7$ | 0,9996 | $1 \cdot 10^{-8}$ | $3 \cdot 10^{-8}$ |

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63).

LITERATURA

1. Barek J., Bencko V., Cvačka J., Šuta M.: Chem. Listy 92, 794 (1998).
2. Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: Chem. Listy 90, 805 (1996).
3. Keimig S. D., Kirby K. W., Morgan D. P., Keiser J. E., Hubert T. D.: Xenobiotica 13, 415 (1983).
4. Pecková K., Musilová J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39,148 (2009).