

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POSTUP IZOTACHOFORÉTIČKÉHO STANOVENÍ KYSELINY THIODIGLYKOLOVÉ V MOČI ZA ODSOLENÍ A ÚPRAVY pH ANALYZOVANÉHO VZORKU

JAROMÍRA CHÝLKOVÁ^a a RENÁTA FADRŇÁ^b

^aÚstav ochrany životního prostředí, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Doubravice 41, 533 53 Pardubice; ^bÚstav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8 fadrna@jh-inst.cas.cz

Došlo 3.2.03, přepracováno 1.10.03, přijato 21.10.03.

Klíčová slova: kyselina thiodiglykolová, TDGA, izotachoforéza, vinylchlorid, odsolení vzorku moči

Úvod

Mezi škodlivé látky zatěžující pracovní prostředí patří vinylchlorid (VC), monomer při výrobě polyvinylchloridu.

Akutní intoxikace VC se projevuje narkotickými účinky, při nichž je potlačena činnost dýchacího centra a ovlivněna činnost srdce. Při dlouhodobé expozici dochází k poškození cév, kostí a kůže¹. Na jeho karcinogenní účinky bylo poukázáno až v roce 1971 (cit.²), kdy byly při pokusech na zvířatech pozorovány angiosarkomy jater a jiných orgánů³. U lidí vystavených VC byly zjištěny příznaky poškození jater, funkční změny dýchacího ústrojí, zvýšený výskyt nádorových onemocnění a chromosomové aberace. V současnosti je proto VC řazen mezi prokázané chemické karcinogeny⁴ a mutageny¹.

VC se do organismu dostává nejčastěji inhalační cestou nebo orálně. Určitý podíl je v nezměněné formě vyloučen plicemi, část se postupně odbourává až na oxid uhličitý, který se vydechuje. Jeho metabolity se vylučují močí a stolicí⁵. VC vstupuje také do intermediálního metabolismu a nakonec je vyloučen ve formě fyziologických metabolitů jako je močovina, kyselina glutamová, methionin, serin a jiné⁴. Na základě pokusů na zvířatech uvádí většina autorů tři hlavní metabolity VC vylučované močí: *S*-(karboxymethyl)cystein, thiodiglykolová kyselina (TDGA) a *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxyethyl)cystein⁴. Modelové znázornění mechanismu vylučování TDGA močí bylo zveřejněno v literatuře⁶.

VC není však jediným zdrojem TDGA v moči. TDGA je metabolitem i některých jiných látek, které můžeme rozdělit do dvou skupin: látky související s profesionální expozicí, např. vinylidenchlorid⁷ nebo 1,2-dichlorethan⁸, a látky

obsažené v normální stravě, např. *S*-(karboxymethyl)cystein přítomný v česneku, ředkvičkách, cibuli a dalších druzích zeleniny. Nález TDGA u sledovaných osob je proto třeba uvažovat v kontextu s těmito možnostmi a podle potřeby i stanovení opakovat⁶.

Jednou z používaných metod pro stanovení thiodiglykolové kyseliny v moči je plynová chromatografie. Před vlastní analýzou je ale třeba kyselinu z moči izolovat a následně ji převést na těkavou sloučeninu⁹. Tento vícestupňový proces je časově náročný a je zatížen chybami. Další využitelnou metodou je adsorpční voltametrie. Stanovení TDGA je možné až po oddělení rušivých složek na koloně plněné práškovým PVC (cit.^{10–13}). Vhodnou metodou je také kapilární izotachoforéza^{14,15}. Umožňuje separovat a stanovit iontové látky (buď kationty nebo anionty) na základě různé pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Pohyb nabitých částic je způsoben napěťovým spádem podél dráhy jejich pohybu.

Aplikace poslední uvedené metody pro stanovení TDGA, popsaná v lit.¹⁶, má údajně před ostatními výhodu v tom, že není třeba TDGA před analýzou izolovat a moč nijak upravovat. Jako vedoucí elektrolyt přítom sloužil roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,01 mol.l⁻¹, upravený β -alaninem na pH 3,4 pro předseparační kolonu a pH 4,3 pro analytickou kolonu. Koncovým elektrolytem byla kyselina octová o koncentraci 0,01 mol.l⁻¹. Určité problémy však při tomto stanovení pramenily z charakteru vzorku. Litr moči obsahuje totiž v průměru 8 g chloridů, 23 g močoviny, 2,1 g anorganických fosfátů, 1,2 g kreatinu, 0,7 g kyseliny močové, 0,08–0,8 g kyseliny hippurové, 0,05–0,46 g kyseliny citronové¹⁷ a mnoho dalších látek. Koncentrace jednotlivých aniontových složek moči převyšuje ovšem několikanásobně koncentraci sledované TDGA a zmíněné složky mohou proto výrazně ovlivňovat její stanovení.

Problémy pramenící z charakteru moči jako složitého biologického vzorku byly popsány i v diplomové práci¹⁸. Přestože její autorka použila elektrolytový systém doporučený autory v lit.¹⁶, vysoké koncentrace solí (fosforečnanů, citrátů, chloridů) způsobily, že se TDGA nedostatečně separovala od ostatních složek a její stanovení nebylo reprodukovatelné. U vzorků s menším obsahem doprovodných solí bylo stanovení reprodukovatelnější, zatímco u více zasořených vzorků poskytla izotachoforéza podstatně hůře rozlišené zóny, takže stanovené hodnoty TDGA byly v průměru nižší kvůli nedokonalému oddělení zóny TDGA od zón ostatních solí přítomných v moči.

Ukázalo se tak, že se při aplikaci výše popsaného postupu a při výše uvedených relativně vysokých koncentracích solí (fosforečnanů, citrátů, chloridů) často získávají nereprodukovatelná data a přílišný počet odlehlých hodnot. Cílem této práce bylo proto zdokonalit způsob stanovení tak, aby opakovatelnost analýz byla lepší než $\pm 3\text{--}5\%$.

Experimentální část

Přístrojová technika

Izotachoforetické stanovení TDGA v moči bylo prováděno analyzátozem ZKI-01 (ÚRVJ, Spišská Nová Ves). Objem použitého dávkovacího kohoutu byl 27 μl , vnitřní průměr předseparační kapiláry 0,8 mm a analytické kapiláry 0,3 mm a délka předseparační kapiláry byla 22 cm a analytické kapiláry 17 cm. K měření pH sloužil pH-metr MV 870 (Monokrystaly, Turnov) se skleněnou elektrodou. Dále byly při zpracování vzorků použity odstředivka M 52 (Chirana, Stará Turá) a digitální váhy 1702 MP8 (Sartorius, Goettingen).

Chemikálie a roztoky

Jako vedoucí elektrolyt byl použit roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$, upravený kyselinou ε -aminokapronovou (6-aminohexanovou) na pH 4,0, obsahující 0,01 hm.% (hydroxyethyl)celulose. Koncovým elektrolytem byl $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ roztok octové kyseliny.

K odstranění solí ze vzorku moči byl použit 95 obj.% ethanol.

Zásobní $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ roztok TDGA byl připraven rozpouštěním tuhé TDGA 99 hm.% (Fluka) v destilované vodě. Další používané roztoky TDGA byly připravovány jeho ředěním.

Koncentrace dalších použitých zásobních roztoků solí čistoty p. a. (Lachema Brno) činila rovněž $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$.

Vzorky moči byly zpracovány bezprostředně po odběru, popřípadě byly uchovávány v lednici po nezbytně dlouhou dobu.

Výsledky a diskuse

Stanovení TDGA v moči představuje analýzu poměrně složité matrice. Separaci stanovované kyseliny může ovlivnit přítomnost řady aniontů, a to často v koncentracích několikanásobně vyšších, než je koncentrace TDGA.

Byl proto vyzkoušen postup, při kterém byla solnost vzorků moče před jejich analýzou výrazně snížena. Vzorky moči byly zbavovány solí přidávkem ethanolu (95 obj.%) v poměru 1:8 nebo 1:10. Poté byla směs chlazená po dobu jedné hodiny při teplotě $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Vyloučily se krystaly, které byly odstředěny. Výsledný čirý roztok byl podroben izotachoforetické separaci. Předseparační kolonou procházel konstantní proud o velikosti $250 \mu\text{A}$, analytickou pak proud $50 \mu\text{A}$. Signál konduktometrických detektorů byl zaznamenáván liniovým zapisovačem při rychlosti posunu papíru $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$. Vzorky moči byly dávkovány dávkovacím kohoutem. Na izotachoforeogramech vzorků moči byly identifikovány zóny chloridů, fosforečnanů, citrátů, siřičitanů, síranů

a šťavelanů. Na většině záznamů byla také zóna solí TDGA. Po provedeném odsolení bylo třeba upravit pH prostředí, v němž probíhá separace tak, aby isotachoforetické zóny byly dobře rozlišitelné a měřitelné.

Ze získaných záznamů vyplývalo, že nejvýznamnějšími doprovodnými anionty ovlivňujícími zónu TDGA byly fosforečnany, protože jich ve vzorku po odsolení zůstalo relativně nejvíce. Rozdělení těchto dvou zón v závislosti na pH vedoucího elektrolytu bylo sledováno na modelových vodných roztocích. Roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ TDGA a $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu draselného byl izotachoforeticky proměřován v operačním systému vedoucího elektrolytu $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl a koncového elektrolytu $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ CH_3COOH za stejných podmínek, lišících se pouze hodnotou pH vedoucího elektrolytu. Ta byla upravována přidávkem β -alaninu nebo ε -aminokapronové kyseliny tak, aby se nacházela mezi 3,3 až 4,8.

Bylo zjištěno, že probíhala-li separace při pH 3,4, jsou rozdíly v pohyblivostech sledovaných iontových látek velmi malé a hrozí nebezpečí, že při malé odchylce v nastavení pracovní hodnoty pH (například na 3,3) se tyto látky nerozdělí a splynou v jednu zónu. Odečtené a tedy i vyhodnocené množství TDGA je pak výrazně vyšší, než její skutečná koncentrace. Při vyšších hodnotách pH, a to v rozmezí 4,0–4,8, se relativní výška zón $((h_x - h_L) / (h_T - h_L))$, kde h_x je výška zóny sledovaných iontů, h_L je výška zóny vedoucího elektrolytu a h_T výška zóny koncového elektrolytu u TDGA zvyšuje jen nepatrně, a to v rozmezí 0,37–0,47, kdežto u fosforečnanových iontů jsou změny významnější, a to od 0,58 do 1 (kdy fosforečnanové ionty splynou s koncovým elektrolytem). Vyšší hodnoty pH ze sledovaného intervalu jsou tedy pro analýzu TDGA ve vztahu k rušivým fosforečnanům vhodnější.

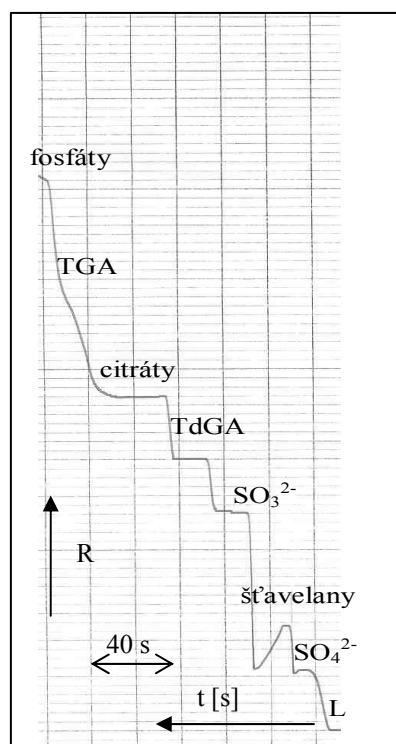
Při analýze moči bylo třeba počítat s množstvím látek acidobazického charakteru o vysokých koncentracích ovlivňujících chování této matrice. Dosažení vyšších hodnot pH bylo však mimo pufrční oblast β -alaninu a ten byl proto na rozdíl od práce¹⁶ ve vedoucím elektrolytu nahrazen ε -aminokapronovou kyselinou (ε -AMK), jejíž pK_A je 4,43, což vysvětluje lepší pufrční kapacitu ε -AMK při daných podmínkách.

Obdobná studie vlivu pH na stanovení TDGA byla provedena i u vzorků moči, neboť vedle fosforečnanů zde hrála značnou roli i přítomnost siřičitanů s pohyblivostí blízkou TDGA. Vzorek moči byl přítomně analyzován stejným způsobem jako modelový roztok. Ze získaných izotachoforeogramů bylo patrné, že hodnota pH výrazně ovlivňuje separaci jednotlivých složek, celkový vzhled, přehlednost a vyhodnotitelnost záznamu. Probíhala-li separace při pH 3,8–4,0, byly jednotlivé sousedící zóny přítomných složek dostatečně odděleny a měření byla dobře opakovatelná. Se zvyšující se hodnotou pH se začínala zóna TDGA přibližovat předchozí zóně (patřící zřejmě siřičitanům), při pH 4,6 se tyto zóny úplně neseparovaly, což se projevilo vznikem smíšené zóny. Nalezené množství TDGA se proto snížilo. Vyšší hodnoty pH pak způsobily splynutí zón výše uvedených iontů a vedly tedy k podstatně vyšším výsledkům, než byla

Tabulka I

Srovnání výsledků izotachoforetického a voltametrického stanovení TDGA v deseti různých vzorcích moči

Číslo vzorku	TDGA [mg.l^{-1}]	
	izotachoforeticky	voltametricky
1	79,1	88,2
2	29,4	24,1
3	7,3	5,2
4	54,7	45,2
5	39,5	35,8
6	26,4	26,5
7	113,7	95,6
8	125,2	124,0
9	116,0	117,0
10	89,3	75,4



Obr. 1. Záznam izotachoforetické analýzy vzorku moči po odsolení v prostředí 86,4 obj.% ethylalkoholu (vedoucí elektrolyt 0,01 mol.l⁻¹ HCl, pH 4,0 (kyselina ε-aminokapronová), 0,01 hm.% (hydroxyethyl)celulosa; koncový elektrolyt 0,01 mol.l⁻¹ CH₃COOH; proud pro předseparační kolonu 250 μA, proud pro analytickou kolonu 50 μA)

skutečná koncentrace TDGA. Z výše uvedených výsledků vyplynulo, že pro stanovení TDGA v moči je vhodné pH v rozmezí 3,8 až 4,0.

Příklad izotachoforeogramu odsoleného vzorku moči, získaného za popsaných optimálních podmínek v analytické koloně, je uveden na obr. 1 a ilustruje zřetelné oddělení zóny TDGA od okolních zón a její dobrou vyhodnotitelnost. Velmi dobrou lineární závislost délky zóny TDGA na jejím zvyšujícím se obsahu ve vzorku moči, zpracované navrženým postupem, dokumentuje rovnice kalibrační křivky: $l = 0,2788c + 8,554l$, kdy $R^2 = 0,9987$ (kde l je délka zóny [mm], c je koncentrace TDGA [mg.l^{-1}] a R^2 je koeficient determinance). Relativně významná nenulová délka zóny při nulové koncentraci TDGA je dána tím, že kalibrační přímka byla měřena přímo ve vzorku moči, který obsahoval nízkou koncentraci TDGA, a ne v základním elektrolytu. Proto i při nulovém objemu přidávaného standardního roztoku byla zaznamenána zóna TDGA. Zjištěná opakovatelnost stanovení TDGA testovaná ve vzorcích moči byla velice dobrá, $c_{\text{TDGA}} = 90,3 \pm 1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ ($n=5$).

Vzhledem k tomu, že analyzované moči se značně liší jak kvalitativně, tak obsahem přítomných solí, může u koncentrovanějších vzorků nastat situace, že zvolený operační systém vykazuje nedostatečnou pufrací kapacitu. To se projeví tak, že zóny analyzovaných iontů nemají konstantní vodivost (vodivost zóny klesá či stoupá). V tomto případě je třeba zvýšit koncentraci vedoucích iontů (Cl^-) na hodnotu 0,02 mol.l⁻¹. Tato změna vede zároveň ke zvýšení koncentrace pufrujícího protiiontu, kterým je upravováno pH vedoucího elektrolytu.

Výsledky izotachoforetického stanovení TDGA byly porovnávány s výsledky získanými voltametrickou metodou¹³. Bylo proměřeno 10 různých vzorků moči s různým obsahem TDGA. Stanovené koncentrace jsou uvedeny v tabulce I, z níž je vidět poměrně dobrá shoda mezi oběma metodami v širokém koncentračním rozsahu. V souladu s literaturou lze pak eventuelně přepočítat obsah TDGA na obsah kreatininu. Každý vzorek moči v závislosti např. na denní době odběru, zdravotním stavu atd. má různou hustotu, která je charakterizována právě obsahem kreatininu. Proto se často uvádí v biochemické literatuře hodnoty mg TDGA na g kreatininu¹⁹ a nikoli mg TDGA na litr moči.

Navržený postup měření se ukázal vhodným pro stanovení TDGA jako produktu metabolismu VC v moči.

LITERATURA

1. Marhold J.: *Přehled průmyslové toxikologie – Organické látky*, sv. 1, str. 103. Avicenum, Praha 1986.
2. Viola P. L., Bigotti A., Caputo A.: *Cancer Res.* 31, 516 (1971).
3. Creech J. L. Jr., Johnson M. N.: *J. Occup. Med.* 16, 150 (1974).
4. Samcová E.: *Chem. Listy* 88, 723 (1994).
5. Watanabe P. G., McGowan G. R., Gehring P. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 339 (1976).
6. Samcová E., Roth Z.: *Prac. Lek.* 47, 64 (1995).
7. McKenna M. J., Zempel J. A., Braun W. H., Gehring P.

- J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 821 (1978).
8. Yllner S.: *Toxicology* 30, 257 (1971).
9. Samcová E.: *Prac. Lek.* 47, 58 (1995).
10. Dlasková Z., Dvořáková L., Bašová P., Pelclová D., Navrátil T.: *Chem. Listy* 95, 184 (2001).
11. Dlasková Z., Pelclová D., Surovcová H., Navrátil T.: *Lek. Listy* 30, 5 (2000).
12. Dlasková Z., Chýlková J., Navrátil T., Pelclová D.: *Chem. Listy* 94, 837 (2000).
13. Dlasková Z., Navrátil T., Heyrovský M., Pelclová D., Novotný L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 164 (2003).
14. Boček P. a kol.: *Analytická kapilární izotachofóreza*. Academia, Praha 1987.
15. Everaerts F. M., Beckers J. Z., Verheggen Th. P. E. M.: *Isotachopheresis. Theory, instrumentation and applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
16. Křivánková L., Samcová E., Boček P.: *Electrophoresis* 5, 226 (1984).
17. Murray R. K.: *Harperova biochemie* (J. Kraml Ed.). Nakladatelství a vydavatelství H+H, Praha 1998.
18. Panušová P.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1998.
19. Bardoděj Z., David A., Šedivec V., Škramovský S., Teisinger J.: *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. Avicenum, Praha 1989.

J. Chýlková and R. Fadrná (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Procedure for Isotachophoretic Determination of Thiodiglycolic Acid in Urine Using Desalination of the Analyzed Sample**

A procedure for the isotachophoretic determination of thiodiglycolic acid (TDGA) in urine after desalination and pH adjustment of analyzed samples was elaborated. The salts present in urine were precipitated by addition of ethanol. TDGA was determined in anionic isotachophoretic mode in 0.01 M HCl as a leading electrolyte containing 0.01 % (2-hydroxyethyl)cellulose at pH 4.0 (adjusted with 6-aminohexanoic acid). 0.01 M acetic acid was used as a terminating electrolyte. The reproducibility of TDGA determination was very good, the relative standard deviation was less than 1.5 % for a concentration of TDGA 90 mg.l⁻¹.