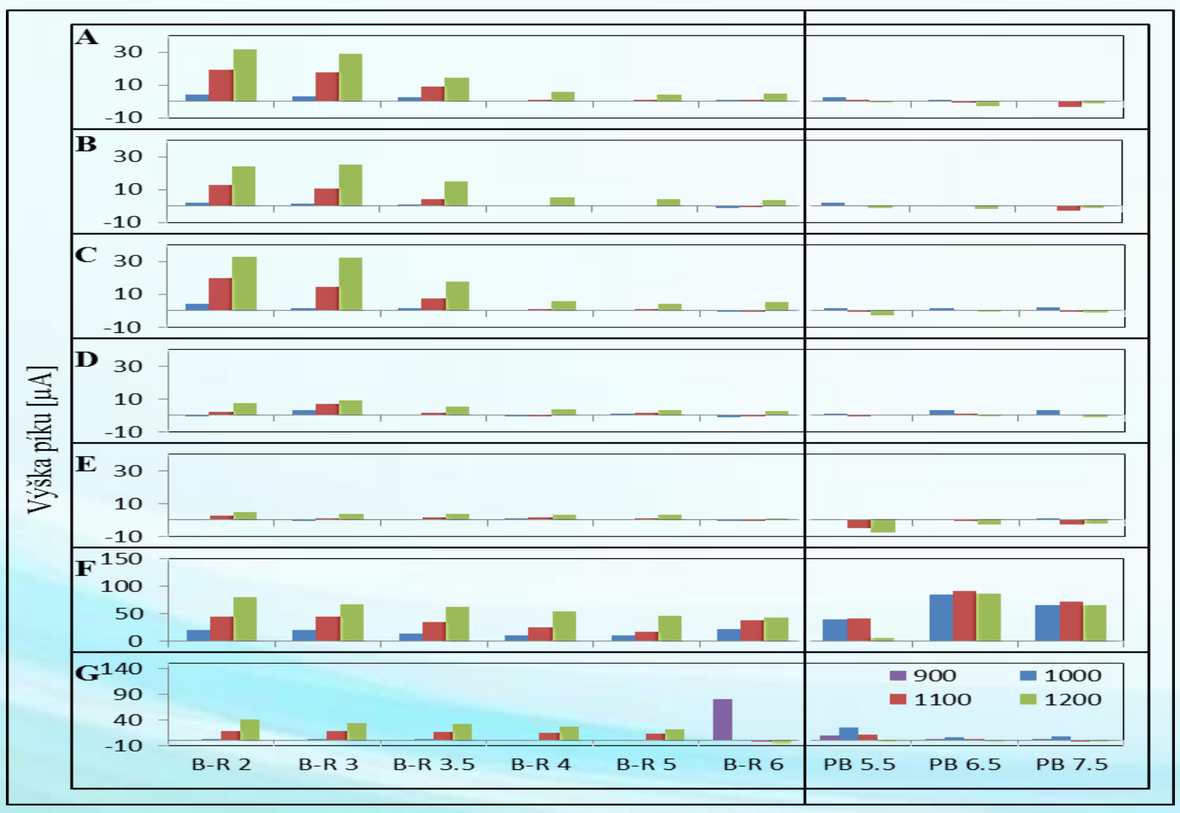
# CIS, OXALI AND CARBOPLATIN DETECTION BY FIA-ED CONFIGURATION

Roman Guráň[1], Zbyněk Heger[1,2,3], Markéta Komínková[1,2,3], Ondřej Zítka[1,2,3], Miroslava Beklová[2,3], Vojtěch Adam[1,3] a René Kizek[1,3*]

[1]*Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie*
[2]*Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika, Evropská unie*
[3]*Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie*
*kizek@sci.muni.cz

**ABSTRAKT**
Byla vyvinuta FIA-ED metoda pro rychlou elektrochemickou detekci cisplatiny, oxaliplatiny a karboplatiny mezi ostatními sloučeninami platiny, rhodia a paladia. Díky naměřeným hydrodynamickým voltamogramům daných analytů jsme zjistili základní informace o jejich chování v různých podmínkách, které byly simulovány pomocí Britton-Robinson pufru a fosfátového pufru. Ze získaných výsledků bylo vytvořeno jednoduché schéma pro určení daných analytů nebo skupiny analytů.

**ÚVOD**
Platina má silné katalytické vlastnosti a je obtížně oxidovatelná. Díky tomu je platina rezistentní vůči jiným chemikáliím a má stálé elektrochemické vlastnosti [1]. Vzhledem k chemické odolnosti je platina (a slitiny obsahující platinu) používána například v lékařských implantátech. Platina je hojně využívaná i jako součást protinádorových léčiv s vysokou cytotoxicitou a efektivitou léčby různých typů rakoviny [2]. Díky širokému použití platiny a platinových kovů dochází k jejich akumulaci a negativnímu ovlivnění životního prostředí [3, 4]. Za cíl naší studie jsme si proto zvolili optimalizaci podmínek FIA-ED s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku pro elektrochemickou charakterizaci cisplatiny, oxaliplatiny a karboplatiny. Byl také zkoumán vliv průtoku mobilní fáze, složení pufru a pH pufru na detekci analytů. Dané analyty byly následně stanovovány ve vzorcích vody při optimalizovaných podmínkách. Vyvinutá metoda může sloužit k rychlé a kvalitativní analýze vod kontaminovaných průmyslovou činností nebo ekologickou katastrofou, případně lze danou metodu použít k analýze odpadních vod z nemocnic.




**Obr. 2:** Vyjádření ideálních potenciálů (900-1200 mV) v testovaných pufrech (Britton-Robinson pufr (B-R) a fosfátový pufr (PB)) pro všechny analyty. Maxima píků byly odečteny ze získaných hydrodynamických voltamogramů. Koncentrace všech analytů byla 10 µg.ml$^{-1}$. Ideální potenciály pro (**A**) oxaliplatinu, (**B**) karboplatinu, (**C**) cisplatinu, (**D**) $PtCl_2$, (**E**) $PtCl_4$, (**F**) $RhCl_3$ a (**G**) $PdCl_2$.

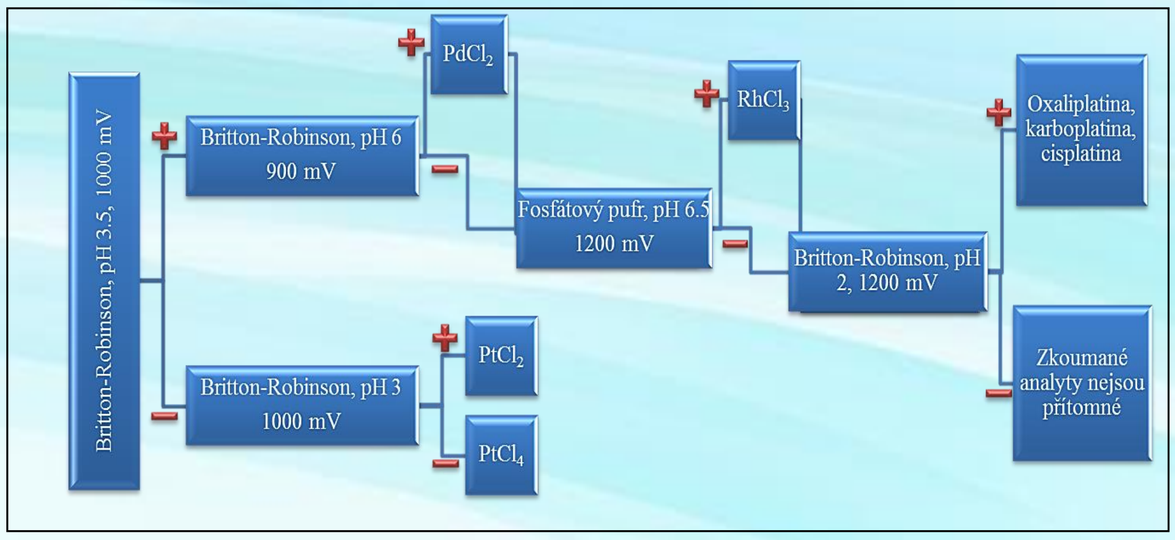
**Příprava směsí vzorků**
Vzorky byly připraveny vždy chvíli před použitím ze zásobních roztoků (1 mg.ml$^{-1}$). Pro kvantifikaci platinových sloučenin v reálných vzorcích byly vytvořeny kalibrační křivky závislosti výšky píku na koncentraci. Byly připraveny následující směsi vzorků – Pd : Rh, Rh : Pd, Pt : Rh, Rh : Pt, Pt : Pd a Pd : Pt v koncentračních poměrech 1 : 1; 1 : 10; 1 : 50, a 1 : 100, kde 1 odpovídá koncentraci 10 µg.ml$^{-1}$. FIA-ED analýza byla provedena při následujících optimálních podmínkách: průtok mobilní fáze 1.0 ml.min$^{-1}$; Britton-Robinson (B-R) pufr o pH 6 při potenciálu 900 mV pro analýzu $PdCl_2$; fosfátový pufr o pH 6.5 při potenciálu 1200 mV pro určení $RhCl_3$; B-R pufr o pH 3 při potenciálu 1000 mV pro odlišení $PtCl_2$ a $PtCl_4$; B-R pufr o pH 2 při potenciálu 1200 mV pro určení přítomnosti oxaliplatiny, karboplatiny a cisplatiny.

**Popisná statistika**
Analýza dat a jejich grafická interpretace byla provedena pomocí Microsoft Office (MS Excel®, MS Word® a MS PowerPoint®). Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní odchylka (SD), není-li uvedeno jinak. Limity detekce (3 S/N) byly počítány podle Longa a Winefordnera [5], kde N vyjadřuje standardní odchylku šumu v okolí signálu.

**Obr. 1:** Schéma FIA-ED.

**MATERIÁL A METODY**
**Chemikálie**
Standardy $RhCl_3$, $PdCl_2$, $PtCl_2$ a $PtCl_4$ byly získány ze Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Oxaliplatina byla získána z Merck&Co (Whitehouse Station, NJ, USA), karboplatina Teva byla získána z Teva UK (Castleford, Spojené království) a cisplatina EBEWE byla získána z EBEWE Pharma (Unterach am Attersee, Rakousko). Další chemikálie byly nakoupeny v Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) v ACS čistotě, nebude-li uvedeno jinak. Zásobní standardní roztoky (1 mg.ml$^{-1}$) byly připraveny v ACS vodě s 1 % HCl (v/v) přidanou pro zvýšení rozpustnosti analytů. Pracovní standardní roztoky analyzovaných látek byly připravovány denně ihned před použitím pomocí ředění zásobních roztoků na konečnou koncentraci 10 µg.ml$^{-1}$. Všechny roztoky byly připraveny v deionizované vodě získané díky reverzní osmóze na přístroji Aqual 25 (Aqual s.r.o., Brno, CZ).

**Průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí (FIA-ED)**
Zařízení pro FIA-ED se skládalo z pumpy operující v rozsahu 0.001-9.999 ml.min$^{-1}$ (Model 582 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), automatického dávkovače vzorků (Model 542, ESA, USA) a z elektrochemického detektoru. Elektrochemický detektor obsahoval jednu nízkoobjemovou průtokovou analytickou celu (Model 5040, ESA, USA), která se skládala z pracovní elektrody ze skelného uhlíku, z referenční vodíkovo-paladiové elektrody a z pomocné elektrody, a Coulochem III jako řídicí modul potenciostatu. Pro automatické dávkování vzorků byla využita 20 µl smyčka. Jako mobilní faze byly použity pufry s různým pH, které udržovaly konstantní podmínky během měření – byly použity následující pufry: Britton-Robinson pufr (pH 2, 3, 3.5, 4, 5 a 6) a fosfátový pufr (pH 5.5, 6.5 a 7.5). Pro získání hydrodynamických voltamogramů (HDV) byla provedena detekce v potenciálovém rozsahu 100 – 1200 mV s potenciálovým skokem 100 mV. Pro další analýzu vzorků byly zvoleny optimální potenciály a pH pufru. Byla také optimalizována průtoková rychlost mobilní faze v rozsahu 0.6 – 1.4 ml.min$^{-1}$. 1% HCl v ACS vodě byla použita jako blank. Získaná data byla zpracována pomocí Clarity software (Version 1.2.4, Data Apex, CZ). Všechna měření byla provedena při 25 °C. Elektroda ze skelného uhlíku se mechanicky leští pomocí aluminy ($Al_2O_3$, 0.1 µm, ESA Inc., USA) a ultrazvukuje se 5 minut při 40 W v Sonorex Digital 10 P Sonicator (Bandelin, Berlin, Germany) každý sedmý den měření.




**Obr. 3:** Schéma pro určení Pt, Rh a Pd sloučenin. Znaménko "plus" znamená pozitivní signál; znaménko "minus" znamená negativní signál nebo nulový signál.

**VÝSLEDKY A DISKUZE**
Jelikož pH prostředí významně ovlivňuje elektrochemickou detekci vybraných analytů, bylo potřeba provádět analýzu v pufrech udržujících konstantní pH [6]. Po provedení experimentů při různém pH pufrů v potenciálovém rozsahu 100 – 1200 mV byl vytvořen graf (viz *Obr. 2*) znázorňující výšku píku v závislosti na použitém pH pufru a aplikovaném ideálním potenciálu. Potenciály 900, 1000, 1100 a 1200 mV byly vybrány jako nejvhodnější – poskytovaly nejlepší odezvy detektoru. Výšky píků byly získány odečtením výšky píku blanku od výšky píku analytu. Na *obr. 2* jsou znázorněny výsledky pro oxaliplatinu (A), karboplatinu (B), cisplatinu (C), $PtCl_2$ (D), $PtCl_4$ (E), $RhCl_3$ (F) a $PdCl_2$ (G). $RhCl_3$ poskytoval největší výšky píků v obou pufrech. Zvyšováním pH Britton-Robinson pufru docházelo ke snižování výšky píků téměř u všech analytů; v případě fosfátového pufru bylo dosaženo největších výšek píků při pH 6.5 u $RhCl_3$ a při pH 5.5 u $PdCl_2$ (*obr. 2*). Na druhou stranu, v případě $PdCl_2$ bylo největší výšky píku dosaženo v B-R pufru o pH 6 při potenciálu 900 mV (*obr. 2G*). Získané výsledky poukazují na fakt, že elektrodepozice analytů je ovlivněna pH prostředí. Pro určení přítomnosti $RhCl_3$ je nejlepší použít fosfátový pufr o pH 6.5 při potenciálu 1200 mV; jak je patrné z *obr. 2*, tak při těchto podmínkách poskytuje daný analyt největší výšku píku a ostatní analyty poskytují záporné hodnoty. Pro určení přítomnosti $PdCl_2$ se nejvíce hodí B-R pufr o pH 6 při potenciálu 900 mV, kdy daný analyt poskytuje největší a jediný pozitivní signál. Pro odlišení $PtCl_2$ a $PtCl_4$ od ostatních analytů se jeví jako nejlepší použití B-R pufru o pH 3.5 při potenciálu 1000 mV, kdy $PtCl_2$ a $PtCl_4$ poskytují téměř nulový signál, zatímco ostatní analyty poskytují signifikantně odlišný pozitivní signál. Pro zjištění přítomnosti oxaliplatiny, karboplatiny a cisplatiny se může použít B-R pufr o pH 2 při potenciálu 1200 mV, kdy tyto 3 analyty poskytují výrazný pozitivní signál. Je-li přítomen $RhCl_3$ nebo $PdCl_2$, ověří se přítomnost oxaliplatiny, cisplatiny a karboplatiny ve fosfátovém pufru o pH 6.5 při potenciálu 1100 mV, kdy ověřované látky poskytují nulový nebo záporný signál, zatímco $PdCl_2$ a $RhCl_3$ poskytují kladný signál. Na základě těchto faktů bylo vytvořeno determinační schéma na obr. 2. Pro kvalitativní analýzu znečištění životního prostředí sloučeninami Pt, Rh a Pd jsou jednoduché a rychlé metody velice důležité. Jelikož naše metoda nedokáže docela dobře rozlišit oxaliplatinu, karboplatinu a cisplatinu mezi sebou, je nutné tyto analyty dále stanovit pomocí přesnějších a kvantitativních analytických metod jako je AAS [7], AES [8], hmotnostní spektrometrie [9] a další. Nicméně tyto metody jsou obvykle více časově náročné a dražší a proto pro rychlé určení některých analytů doporučujeme tuto metodu.

**ZÁVĚR**
Vyvinuli jsme FIA-ED metodu pro detekci a rozlišení sloučenin na bázi Pt, Rh a Pd na základě jejich rozdílného chování při různých aplikovaných potenciálech a v pufrech o různém pH. Bylo vytvořeno jednoduché determinační schéma pro detekci a odlišení vodu znečišťujících látek jako oxaliplatiny, cisplatiny a karboplatiny od ostatních sloučenin Pt, Rh a Pd. Shrneme-li získané výsledky, tak můžeme říct, že díky naší robustní metodě, využívající elektrochemickou detekci, jsme schopni poměrně rychle, selektivně a citlivě detekovat cisplatinu, oxaliplatinu a karboplatinu v znečištěné vodě společně s dalšími sloučeninami Pt, Rh a Pd. Díky možnosti modifikování elektrody je navíc možné snížit limit detekce vybraných analytů v dané matrici (vodě).

**PODĚKOVÁNÍ**
Tato práce je podpořena projekty CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068, MŠMT 6215712402 a NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023

**LITERATURA**
1. Rao, C.R.K. and D.C. Trivedi, *Chemical and electrochemical depositions of platinum group metals and their applications.* Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(5-6): p. 613-631.
2. Cutillas, N., et al., *Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold.* Coordination Chemistry Reviews, 2013. **257**(19-20): p. 2784-2797.
3. Fumagalli, A., et al., *Platinum, palladium, and rhodium deposition to the Prunus laurus cerasus leaf surface as an indicator of the vehicular traffic pollution in the city of Varese area.* Environmental Science and Pollution Research, 2010. **17**(3): p. 665-673.
4. Sobrova, P., et al., *The effects on soil/water/plant/animal systems by platinum group elements.* Central European Journal of Chemistry, 2012. **10**(5): p. 1369-1382.
5. Long, G.L. and J.D. Winefordner, *Limit of detection.* Analytical Chemistry, 1983. **55**(7): p. A712-A724.
6. Persat, A., R.D. Chambers, and J.G. Santiago, *Basic principles of electrolyte chemistry for microfluidic electrokinetics. Part I: Acid-base equilibria and pH buffers.* Lab on a Chip, 2009. **9**(17): p. 2437-2453.
7. Hagarova, I., et al., *Direct spectrochemical determination of carboplatin species in human blood serum after their chemotherapy application for pharmacokinetic study.* Fresenius Environmental Bulletin, 2012. **21**(2): p. 343-350.
8. Petrova, P., et al., *Problems, possibilities and limitations of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in the determination of platinum, palladium and rhodium in samples with different matrix composition.* Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 2010. **65**(2): p. 130-136.
9. Castillo, M.L.A., et al., *Multi-element determination of Pt, Pd and Ir traces in environmental samples by ICP-MS after pre-concentration.* Talanta, 2012. **99**: p. 853-858.

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Mendelova univerzita v Brně
CEITEC