

ŤYPICKÉ DEKOMPOSIČNÍ A VZOREK UPRAVUJÍCÍ METODY PRO URČENÍ
NEORGANICKÝH LÁTEK V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH POMOCÍ HPLC NEBO CE

| Typ vzorku | Úprava vzorku | Určované látky | Separační technika |
|--------------------------------|--|--|--------------------|
| Krevní serum | Zředění elektroforetickým pufrem (eluentem) nebo vodou | Na(I), K(I), Li(I), Ca(II), Mg(II), NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ | HPLC, CE |
| | Odstranění bílkovin precipitací s 20% trichloroctovou kyselinou, čišťení supernatantu extrakcí diethyl etherem nebo centrifugací, nastavení pH, complexace (Al nebo Fe) | Ca(II), Al(III), Fe(II) | CE |
| Moč | Zředění vodou nebo pufrem, filtrace | Na(I), K(I), Mg(II), NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ | CE |
| Sliny | Zředění, filtrace | Na(I), K(I), Ca(II), Mg(II), NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , I ⁻ , SCN ⁻ | HPLC, CE |
| Lidské vlasy | Zpopelnění při 750°C a rozpuštění popelu v HNO ₃ nebo přímé ošetření vzorku směsí HNO ₃ -HClO ₄ . Odsušení do sucha a rozpuštění zbytku v mobilní fázi nebo vodě (nebo HCl), dále nastavení pH a complexace | Cu(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II), Be(II), Al(III), Cr(III), etc. | HPLC |
| Rostlinné materiály, rybí tkáň | Vysušení vzorku a digesce s HNO ₃ -H ₂ O ₂ směsí v uzavřené nádobě pomocí mikrovlnné irradiace. Znovurozpuštění zbytku a filtrace. | Na(I), K(I), Ca(II), Mg(II), Mn(II) | HPLC, CE |
| Rostlinné materiály | Extrakce vodou (nebo pufrem) při 60°C, centrifugace a filtrace supernatantu | NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ | HPLC, CE |

VYBRANÉ APLIKACE HPLC PRO ANALÝZU BIOLOGICKY DŮLEŽITÝCH INORGANICKÝCH ANIONTŮ

| Vzorek | Příprava vzorku | Anionty (limita detekce) | Kolona/eluent ^a | Detekce |
|---|--|--|---|------------------------|
| Serum, moč | Přidán NaOH, odpařeno do sucha, tavení se směsí Na ₂ CO ₃ /ZnO, popel smíchán s vodou, přidána kys. askorbová a katexová pryskyřice, neutralizace supernatantu | Γ (7 a 3 μg/l, resp.) (Br ⁻) | Dionex IonPac-AS5 /15 mM NaNO ₃ | Amperometricky |
| Pícniny, bojínek luční | Tavení s NaOH, rozpuštění, neutralizace elektrodialýzou | F ⁻ | Dionex IonPac-AS4A/2.0 mM Na ₂ CO ₃ , 2.0 mM NaHCO ₃ | Konduktivní (AMMS) |
| Zvířecí plazma, nádorový perfuzát | Přídavek acetonitrilu, centrifugace | NO ₂ ⁻ (4.6 μg/l), NO ₃ ⁻ | Dionex IonPac-AS9-SC/1.8 mM Na ₂ CO ₃ , 1.7 mM NaHCO ₃ or 5 mM KHPO ₄ , 25 mM K ₂ HPO ₄ | Přímé UV (214 nm) |
| Lidské a zvířecí slzy | Centrifugace, zředění (1:100), filtrace | Cl ⁻ (2.7), NO ₃ ⁻ (5.6), PO ₄ ³⁻ (5.0), SO ₄ ²⁻ (3.3 μg/l) | Dionex IonPac-AS4A/1.8 mM Na ₂ CO ₃ , 1.7 mM NaHCO ₃ | Konduktivní (AMMS) |
| Špenát | Extrakce horkým roztokem boritanu sodného, filtrace | NO ₂ ⁻ | Hamilton PRP-X100/2 mM fталová kyselina, 10% acetone | Koulometrická (+0.7 V) |
| Kostra korálů | Rozpuštění v 30% HCl, zředění, promytí skrz chlor-odstraňující kartridže | NO ₃ ⁻ (5), HPO ₄ ²⁻ (10 ng/g), SO ₄ ²⁻ | Dionex IonPac-AS4A/1.8 mM Na ₂ CO ₃ , 1.7 mM NaHCO ₃ | Konduktivní (AMMS) |
| Serum | Ultrafiltrace | NO ₂ ⁻ (13), NO ₃ ⁻ (10 μg/l) | Dionex Carbopac PA-100/od 0.12 do 0.30 M chlorid, 5 mM TRIS pufr, pH 7.5 | Přímá UV (214 nm) |
| Serum | SEC-fractionace, lyofilizace, suspenzování suchého prášku ve vodě, filtrace | Γ (0.05 μg/l) | Dionex AS9-SC/4 mM Na ₂ CO ₃ , 1.5 mM NaHCO ₃ | Pulzní amperometrie |
| Jehličí borovice, čajové lístky, rýžová mouka | Homogenizace, přídavek 30% H ₂ O ₂ , UV fotolýza, zředění | Br ⁻ (20), Cl ⁻ (10), PO ₄ ³⁻ (25), SO ₄ ²⁻ (25 μg/l) | Dionex IonPac-AS12A/2.7 mM Na ₂ CO ₃ , 0.3 mM NaHCO ₃ | Konduktivní (ASRS) |

^aCHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonát; TRIS, tris(hydroxymethyl)aminomethan.

AMMS, aniontový micromembranový supresor; ASRS, aniontový samoregenerující supresor.

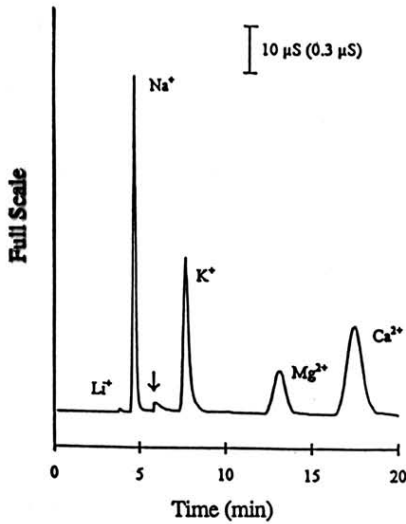
PODROBNOSTI ANALYTICKÉHO STANOVENÍ NĚKTERÝCH KOVOVÝCH IONTŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH POMOCÍ HPLC

| Vzorek | Příprava vzorku ^a | Kovy (limita detekce) | Kolona/eluent ^b | Detekce ^c |
|---|---|---|---|---|
| Lidské vlasy | Digeste s HNO ₃ /HClO ₄ pod tlakem, odpaření do sucha, rozpuštění v mobilní fázi, filtrace | Cu(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II) (Co) | Waters Delta-Pak RP-18 /octansulfonát sodný, hydrogentartrát sodný, 5% acetonitril, pH 3.65 | Přímá VIS (492 nebo 546 nm), post-kolonová reakce s PAR |
| Serum | Zředění (1:80–180) s 2 mM HCl, filtrace | Ca(II) (2.7), Mg(II) (1.3 µg/l) | Dionex IonPac CS10 (2 sériové kolony) / 4 mM (Ca) nebo 2 mM (Mg) DAP.HCl, 40 mM HCl | Konduktivní (CSRS) |
| Sliny | Filtrace | K(I) (1.7), Na(I) (1.0), Ca(II) (2.0), Mg(II) (1.2 mg/l) | Devosil ODS-5 obalený s taurinem-konjugovanými micelami žlučových solí / 2 mM CeCl ₃ or 5 mM CuSO ₄ , pH 4.0 | Přímá UV (253 nebo 210 nm) |
| Listí sóji | Suché zpopelnění při 600°C, zrozpustnění zbytku v HCl, zředění (1:5) | Mn(II) (40 µg/l) (K, Na, Ca, Mg) | Alltech Universal Cation Column / 3 mM kys. vinná, 0.5 mM PDCA | Konduktivní |
| Lidské vlasy | Suché zpopelnění, zrozpustnění popelu v HClO ₄ -HF, odpaření do sucha, zrozpustnění zbytku v HCl, separace Fe extrakcí s MIBK, odpaření vodné fáze do sucha, přidavek H ₂ O ₂ , nastavení pH na 8 pomocí NH ₃ a pak na 4 pomocí HCl, přidavek 5-Br-PADAP a metanolu | Nb(V) (0.5), Ta(V) (2.0), Ti(IV) (2.5 ng/g) | Separon SGX C18 / metanol-tetrahydrofuran-voda (5:15:80), 5% 0.1 M acetátový pufr, 2.2 mM TBABr, 1.2% H ₂ O ₂ | Přímá VIS (590 nm) |
| Jehličí borovice, čajové lístky, rýžová mouka | Homogenizace, přidavek H ₂ O ₂ a HNO ₃ , UV fotolýza, přidavek octanu amonného, zředění | Co(II) (40), Cu(II) (20), Fe(II) (25), Ni(II) (100), Zn(II) (40 µg/l) | Dionex IonPac CS5 / 6 mM PDCA, 50 mM acetátový pufr, pH 4.6 | Přímá VIS (520 nm; post-kolonová komplexace s PAR) |

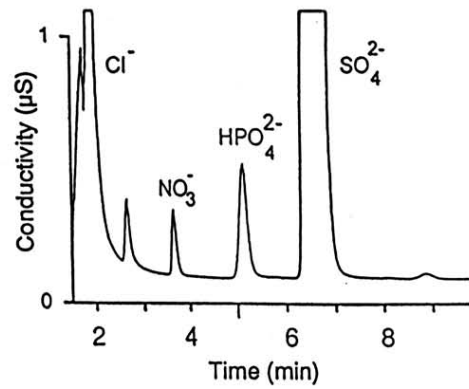
^aBES, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonová kyselina; BPHA, N-benzoyl-N-phenylhydroxylamin; HQ, 8-hydroxyquinolin; MIBK, methyl isobutyl keton; 5-Br-PADAP, 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol.

^bPDCA, pyridine-2,6-dicarboxylová kyselina; DAP, *dl*-2,3-diaminopropionová kyselina; SDS, sodium dodecylsulfát; TBABr, tetrabutylammonium bromid.

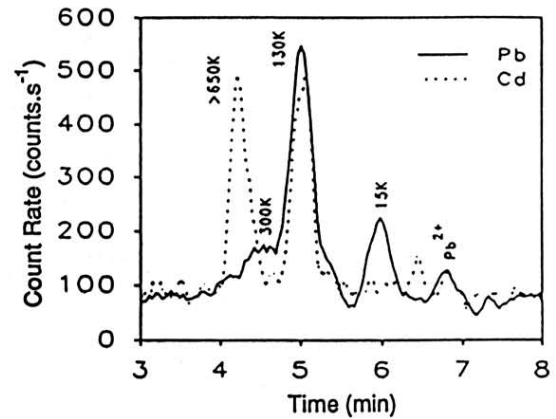
^cCSRS, cationtový samoregenerující supresor



Ion-chromatographic determination of sodium, potassium, calcium, and magnesium in human serum. Column, Ionpac CS12 (250 mm \times 4 mm I.D.); eluent, 14 mM methanesulfonic acid; flow-rate, 1 ml/min; sample volume, 25 μl . Detection, conductivity suppression, electronic (CSRS-1, 4 mm). The detector range was switched from 100 μS to 3 μS after the sodium peak (indicated by the arrow)



Chromatogram showing nitrate (67 ng/g), phosphate (449 ng/g), and sulfate (10.9 $\mu\text{g/g}$) in an HCl digest of a coral skeleton, following injection through an AG chloride-removal cartridge. Column: Ionpac AS4A; eluent: 1.8 mM Na_2CO_3 -1.7 mM NaHCO_3 ; detection: conductivity (membrane suppressor AMMSII)



SEC separation of metalloproteins in human serum. Column: SynChropak GPC 300 (250 mm \times 2 mm I.D.); eluent, 100 mM TRIS/HCl buffer, pH 6.9, flow-rate 0.1 ml/min; injection, 2 μl . Detection, ICP-MS; isotopes monitored, ^{114}Cd and ^{208}Pb ; both chromatograms were obtained from a single injection

PŘÍKLADY URČOVÁNÍ PODÍLU PRVKŮ POMOCÍ HPLC (speciace)

| Vzorek | Příprava vzorku | Druh (limita detekce) | Kolona/eluent ^a | Detekce |
|---------------|---|--|---|---|
| Serum | Žádná | Metalloproteiny: Ba, Cd (0.3), Cu (0.4), Fe (2), Na, Pb (0.3), Zn (0.5 µg/l) | SynChropak GPC 300 / 100 mM TRIS/HCl pufr, pH 6.9 | ICP-MS |
| Delfíní játra | Přídavek NaCl a HCl, homogenizace, centrifugace, ředění (1:5) supernatantu mobilní fází | Hg(II), CH ₃ Hg ⁺ (200 ng/g) (C ₂ H ₅ Hg ⁺) | Bishoff ODS-II / 40 mM cystein, 100 mM kys. octová, pH 2.9 | AAS s tvorbou studené páry |
| Rybí tkáň | Homogenizace, superkritická fluidní extrakce (CO ₂ -10% methanol) | Bu ₃ Sn ⁺ , Ph ₃ Sn ⁺ | Anspec PRP-1 / metanol-voda-acetátový pufr (94:5:1), 4 mM sodium pentanesulfonát, pH 6 | ICP-MS |
| Celá krev | Přídavek extrakčního roztoku (aceton-pyridin-sterox sln., 20:1:1), centrifugace, vysušení supernatantu, zbytek rozpuštěn v metanolu | Zn(II), Zn-protoporphyrin (46 µg/l) | Hypersil SAS C ₁ / metanol-50 mM acetátový pufr (68:32), pH 4.5 | ICP-MS |
| Serum | Filtrace, ředění | Metalloproteiny: Al (0.12), Fe (0.17 µg/l) | TSK DEAE 5PW / lineární gradient z 50 mM TRIS/HCl do 50 mM TRIS/NaCl, pH 9.2 | Electrothermální AAS (off-line) |
| Moč | Centrifugace, filtrace | Dimethylarsenová kys. (10), arsenobetain (10) [As(III) (10), As(V) (20), monomethyl arsonová kys. (15 µg/l)] | BDH PolySpher SAW / 50 mM fosfátový nebo karbonátový pufr, pH 7.5, 9.0 nebo 10.3; Phenomenex µ Bondclone C18 / 10 mM heptane-sulfonová kys., 0.1% metanol, pH 3.5 | AAS s tvorbou hydridu; ICP-MS |
| Kapusta | Sběr xylému z řezu stonku plastickou stříkačkou | Cr(VI) (5), Cr(III)-oxalát (80), Cr(III)-EDTA (3 µg/l) | FPLC Mono Q HR 5/5 / 5 mM TRIS-HCl pufr (pH 5.5-8.5) s lineárním gradientem NaCl (0-0.5 M) | Přímé UV (234 nebo 273 nm) a off-line AAS |
| Moč | Filtrace | Se(IV), Se(VI), selenocystin, selenomethionin, selenoethionin (ca. 1 µg/l) | Spherisorb C18 modifikovaný DDAB / sodno acetátový pufr, 0.5% metanol, 10 ⁻⁵ M DDAB s gradientem CH ₃ COONa a pH | AAS s tvorbou hydridu |

^aDDAB, dodecyldimethylammonium bromid.

SEPARAČNÍ PODMÍNKY A DETEKČNÍ SYSTÉMY POUŽÍVANÉ PRO URČENÍ KOVOVÝCH IONTŮ POMOCÍ CE

| Vzorek | Příprava vzorku ^a | Kovy (limita detekce) | Elektrolyt ^b | Detekce |
|--|---|--|---|---|
| Serum | Zředění (1:100), přidavek $1 \cdot 10^{-3}$ M HBED | Ca(II), Mg(II) | 20 mM boráte sodný $2 \cdot 10^{-3}$ M HBED, pH 9.3 | Přímé UV (294 or 236 nm) |
| Mléko | Ultrafiltrace, zředění (1:250) | Na(I), Ca(II) | 5 mM UV-Cat 1, 6.5 mM HIBA, pH 4.4 | Nepřímé UV (214 nm) |
| Serum | Zředění (1:20) | K(I), Na(I), Ca(II), Mg(II) | 5 mM síran měďnatý | Nepřímé UV (214 nm) |
| Lidské erythrocyty | Zředění v pufru, centrifugace, suspenzování buněk v pufru | K(I), Na(I) | 0.25 mM 2-aminopyridin, 1.5% glukóza, pH 4.8 | Nepřímá laserem indukovaná fluorescence |
| Zvířecí oční čočky | Homogenizace ve vodě, precipitace bílkovin 20% TCA, centrifugace, promytí supernatantu etherem | K(I), Na(I), Ca(II), Mg(II) | 20 mM imidazol, 0.1% hydroxypropylmethylcelulóza, pH 6.0 | Nepřímá UV (214 nm) |
| Čaj | Spaření ve vařící vodě, zředění (1:600) | K(I) (10), Na(I) (2.5), Ca(II) (1), Mg(II) (0.4), Mn(II) (120 μ g/l) | 5 mM imidazol–6.5 mM HIBA– 20% metanol–0.53 mM 18-crown-6, pH 4.5 | Nepřímá UV (214 nm) |
| Serum | Deproteinizace přidavkem 30% TCA a centrifugace, nastavení pH na 5.5 a complexace s lumogallionem | Al(III) (0.6 μ g/l) | 100 mM octanový pufr, pH 4.0 | Přímá laserem indukovaná fluorescence |
| Moč | Zředění (1:100) elektroforetickým pufrem | Mg(II) (150 μ g/l) (K, Na) | 10 mM pyridin, 0.8 mM EDTA, pH 5.0 | Nepřímá UV (254 nm) |
| Hovězí játra, tkáň ryb a ustříc, čaj, etc. | Mikrovlnná kyselá digesce v uzavřené nádobě ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), zředění | K(I) (400), Na(I) (130), Ca(II) (170), Mg(II) (50), Mn(II) (220 μ g/l) | 5 mM imidazol, 6.5 mM HIBA, 20% metanol, 0.55 mM 18-crown-6, pH 4.5 | Nepřímá UV (214 nm) |
| Sliny | Zředění (1:5) | K(I), Na(I), Ca(II), NH_4^+ | 30 mM histidin/2-morpholinoethanesulfonová kys., 3 mM 18-crown-6, pH 6.1 | Konduktivní |

^aHBED, N,N'-di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-dioctová kys.; TCA, trichloroactová kys.; HIBA, α -hydroxyizomáselná kys.

^bNeošetřená křemenná kapilára

SEPARAČNÍ PODMÍNKY A DETEKČNÍ SYSTÉMY POUŽÍVANÉ PRO URČENÍ ANORGANICKÝCH ANIONTŮ POMOCÍ CE

| Vzorek | Příprava vzorku | Anionty (limita detekce) | Electrolyt ^{a,b} | Detekce |
|--|---|---|---|---------------------|
| Mléko | Ultrafiltrace, zředění (1:250) | Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ | Chroman, NICE-Pak OFM Anion-BT | Nepřímé UV (254 nm) |
| Serum Moč | Centrifugace, zředění (1:25) Zředění (1:50) | Cl ⁻ (1), NO ₂ ⁻ (3), NO ₃ ⁻ (2), SO ₄ ²⁻ (1 mg/l) | 2.25 mM pyromelová kys., 6.5 mM NaOH, 0.75 mM hexamethonium hydroxid, 1.6 mM triethanolamin, pH 7.7 | Nepřímé UV (250 nm) |
| Kryší moč | Zředění (1:40), filtrace | NO ₂ ⁻ (0.5), NO ₃ ⁻ (0.5 mg/l) | 25 mM fosfátový pufr, 0.5% DMMAAPS, 1% Brij-35, pH 3.0 (polyakrylamidem obalená kapilára) | Přímá UV (214 nm) |
| Krevní plasma, mléko | Iontově-výměná izolace, odpaření eluátu do sucha, znovuzpuštění ve vodě | NO ₂ ⁻ (12.4), NO ₃ ⁻ (55.8), I ⁻ (2.5), SCN ⁻ (8.7 mg/l) | 50 mM DTAB, 18 mM borát sodný, 30 mM Na ₂ HPO ₄ , 10% metanol, pH 7.0 | Přímá UV (235 nm) |
| Krevní plasma | Centrifugace, deproteinizace ultrafiltrací | NO ₂ ⁻ (0.1), NO ₂ ⁻ (0.1 mg/l) | 750 mM chlorid sodný, 5% NICE-Pak OFM Anion-BT | Přímá UV (214 nm) |
| Kryší povrchová kapalina ve vzdušnicích | Odebírání vzorku kapilárou | Cl ⁻ (7.8 mg/l) | 5 mM chroman sodný, 0.5% hydroxypropylmethylcelulóza, pH 7.0 | Nepřímé UV (273 nm) |
| Zelenina | Inkubace v horké vodě, homogenizace, filtrace | NO ₂ ⁻ (34), NO ₃ ⁻ (37 µg/l) | 10 mM chroman sodný, 2.3 mM CTAB, pH 11.5 | Nepřímé UV (254 nm) |
| Moč | Zředění (1:10), filtrace | Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ | 100 mM CHES, 40 mM LiOH, 3 mM hexamethonium hydroxid | Konduktivní |
| Sójová mouka | Extrakce vodou při 60°C, centrifugace, filtrace supernatantu | PO ₄ ³⁻ | 50 mM kys. benzoová, 90 mM histidin, pH 6.3 (metylovaná křemenná kapilára) | Nepřímé UV (237 nm) |

^aNeošetřená křemenná kapilára, pokud není uvedeno jinak

^bDMMAAPS, 3-(N,N-dimethylmyristylammonio)propanesulfonát; DTAB, dodecyltrimethylammonium bromid; CTAB, cetyltrimethylammonium bromid; CHES, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonová kys.; OFM Anion-BT, obchodní značka EOF-modifikátoru firmy Waters

CIA™ analysis of a standard solution of **alkali and alkaline earth metals** in the

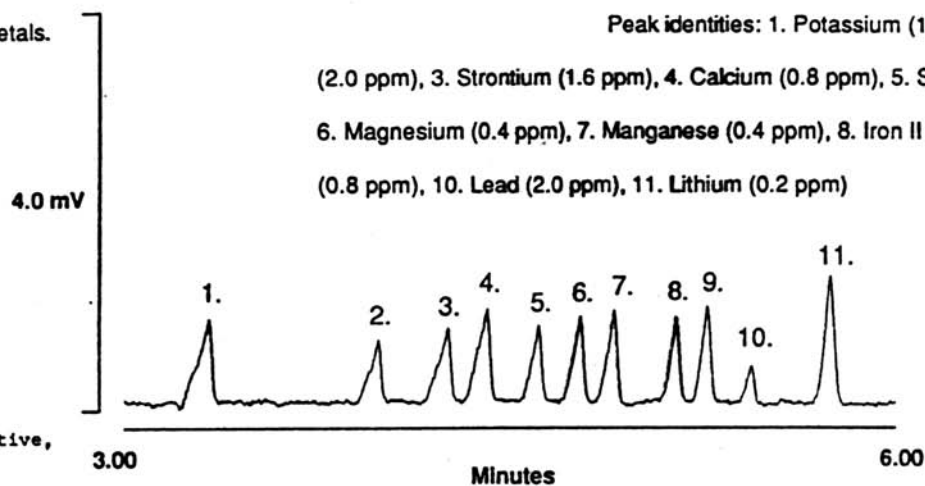
presence of transition metals.

Peak identities: 1. Potassium (1.6 ppm), 2. Barium

(2.0 ppm), 3. Strontium (1.6 ppm), 4. Calcium (0.8 ppm), 5. Sodium (0.6 ppm),

6. Magnesium (0.4 ppm), 7. Manganese (0.4 ppm), 8. Iron II (0.8 ppm), 9. Cobalt

(0.8 ppm), 10. Lead (2.0 ppm), 11. Lithium (0.2 ppm)



Carrier electrolyte
5 mmol UV CAT-1, 6.5 mM
HIBA, pH 4.4; capillary
60 cm x 75 μ m, 20 kV positive,
hydrostatic injection,
UV detection at 214 nm,
upper panel, 184 nm, lower
panel

