

VALIDACE STANOVENÍ A SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V MOČI UŽITÍM KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLASMAEM

ŠTĚPÁN EICHLER* a OTO MESTEK

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
stepan.eichler@email.cz

Došlo 8.7.10, přijato 5.8.10.

Klíčová slova: selen, moč, speciální analýza

Úvod

Selen je nepostradatelný prvek pro lidský organismus, poněvadž chrání buňky proti oxidačnímu poškození a je tím důležitý při prevenci nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Při jeho nedostatku je zvýšená pravděpodobnost výskytu rakoviny, poškození imunity, poruchy funkce štítné žlázy, poškození reprodukční funkce atd¹. Zajímavým faktem tohoto prvku je úzké rozmezí mezi dávkami s příznivými a toxickými účinky. Zatímco doporučená denní dávka je 55 µg selenu na den, intoxikace nastává již při příjmu 1000 µg/den a je doprovázena poškozením kůže, nehtů, vypadáváním vlasů, bolestmi hlavy, v horších případech edémem plic. Dávka vyšší než 5 mg kg⁻¹ je již smrtelná². Je proto velmi důležité umět pomocí vhodných postupů sledovat zastoupení a metabolismus selenu v lidském organismu.

Celkové množství selenu obsaženého v lidském těle leží v rozmezí od 10 do 20 mg. Selen se dostává prostřednictvím krve do všech tkání, přičemž více než polovina jeho celkového množství je uložena v játrech. Metabolickými pochody se váže do selenoproteinů, z nichž nejznámější je glutathionperoxidasa (GPx), která katalyzuje oxidaci redukováného glutathionu a převádí peroxid vodíku na vodu a alkoholy, čímž chrání buňky před poškozením. Další významné selenoproteiny jsou trijodthyronindejodasa, thyoreduxinreduktasa a selenoprotein P (cit.³).

Nadbytečné množství selenu je z organismu vylučováno převážně močí⁴. Ačkoliv mechanismy, které regulují vylučování metabolitů, nebyly dosud mnoho pro-

zkoumány, vylučování moči je považováno za hlavní mechanismus udržující konstantní hladinu selenu⁴. Dle rešeršní práce⁵ shrnující výzkumy v oblasti metabolismu selenu byly v moči (lidské nebo krysí) nalezeny tyto specie selenu: seleničitan (Se(IV)), selenan (Se(VI)), methylselenol, methylseleničitan, trimethylselenium (TMSe⁺), selenomethionin (SeMet), selenoglutathion, selenocystin (SeCys₂), selenoethionin (SeEt), selenocystein (SeCys), methylselenomethionin, selenocystamin (SeCya), selenoadenosyl-methionin a selenocukry methyl-2-acetamido-2-deoxy-1-seleno-β-D-glukopyranosa (selenocukr 1), methyl-2-acetamido-2-deoxy-1-seleno-β-D-galaktopyanosa (selenocukr 2) a methyl-2-amino-2-deoxy-1-seleno-β-D-glukopyranosa (selenocukr 3). Z tohoto seznamu byl v lidské moči nalezen v nejvyšší míře TMSe⁺ (cit.⁵). Vztah mezi TMSe⁺ a dalšími sloučeninami selenu není dosud jasný, ačkoliv bylo zjištěno, že nadbytek selenomethioninu podávaný krysám vedl k metabolické přeměně na TMSe⁺ (cit.⁵). Tato forma byla identifikována jako důležitý metabolit selenu, ve kterém je vázáno 10–70 % veškerého obsahu selenu v moči⁶, ačkoliv některé studie uvádějí jako majoritní formu anorganický selen⁷. Dle další studie⁸ obsah TMSe⁺ v moči je za podmínek vyvážené racionální stravy kolem 30 % celkového obsahu selenu, přičemž hladina této specie prudce roste, pokud je strava obohacena nutričními doplňky bohatými na selen. V další práci⁹ bylo zjištěno, že další důležitý metabolit selenu v moči je selenocukr 2. Jak lze pozorovat, údaje od jednotlivých autorů se často velmi rozcházejí. Může to být způsobeno velkou variabilitou obsahu selenu v moči, který není zcela konstantní, ale mění se v závislosti na příjmu z potravy². S tím úzce souvisí také pravděpodobný vliv zeměpisné polohy původce vzorku na zastoupení jednotlivých specií v moči.

Jedním z hlavních cílů této studie byla validace stanovení celkového obsahu selenu v lidské moči, jež zahrnovala stanovení meze detekce a ověření linearitu a správnosti pro různé porovnávací prvky. Druhým klíčovým úkolem byla separace a identifikace selenových specií obsažených ve vzorcích moči. K tomu byla zvolena chromatografie s reverzní fází, která byla v minulosti již několikrát úspěšně použita a vykazuje vysokou separační účinnost zejména pro dělení organických sloučenin selenu^{10–13}. Další možností by byla aplikace iontově výměnné chromatografie, která umožňuje oproti předchozí technice lepší vzájemnou separaci seleničitanu a selenanu^{14,15}, nevýhodou je však menší vhodnost používaných mobilních fází pro spojení s ICP-MS. Posledním bodem bylo sledování změn specií selenu zastoupených v moči po požití potravinových doplňků bohatých na selen u zdravých jedinců a u kriticky nemocných pacientů (sepsy, stádium akutního selhání orgánů), kterým je selen podáván kontinuálně společně s umělou výživou.

* Štěpán Eichler získal s touto prací 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2010 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

Experimentální část

Reagencie a základní roztoky

Základní roztok selenu (ZR) o koncentraci 2 mg l^{-1} Se byl připraven ředěním roztoku o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ Se (Merck). Roztok porovnávacích prvků (IS) obsahující prvky Ge, Rh, In o koncentraci $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ byl připraven z roztoků obsahujících $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ daných prvků (Merck). Mobilní fáze pro chromatografickou separaci na koloně s obrácenou fází byla převzata ze studie¹⁰ a obsahovala $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ butansulfonátu sodného (Sigma Aldrich, USA), 4 mmol l^{-1} kyseliny malonové (Merck), 8 mmol l^{-1} hydroxidu tetramethylamonia (Sigma Aldrich) a $0,05 \%$ methanolu (Uvasol[®], Merck) a doplněna demineralizovanou vodou (Milli-Q, Millipore, USA). Výsledné pH 6,5 nebylo dále upravováno.

Roztok syntetické moči (SM) obsahoval ve 250 ml $0,5 \text{ ml } 9,5 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové (Suprapur[®], Merck), $3,56 \text{ g}$ chloridu sodného (Suprapur[®], Merck), $0,75 \text{ g}$ chloridu draselného (Suprapur[®], Merck), $4,45 \text{ g}$ močoviny (puriss., Riedel-de Haën, Seelze, SRN), $0,5 \text{ ml}$ 25% amoniaku (Suprapur[®], Merck), $0,17 \text{ g}$ dihydrátu chloridu vápenatého (Suprapur[®], Merck) a $1,1 \text{ g}$ heptahydrátu síranu hořečnatého (p.a., Merck).

Pro identifikaci specií v moči byly použity tyto sloučeniny selenu: seleničitan sodný, selenan sodný, selenomethionin, selenocystin a selenomočovina (vše Sigma Aldrich).

K okyselování roztoků byla použita kyselina dusičná (Suprapur[®], Merck). Všechny roztoky byly připraveny z redestilované a demineralizované vody (Milli-Q, Millipore).

Roztoky pro stanovení celkového obsahu selenu v moči

Roztoky pro ověření linearity kalibrační závislosti byly připraveny ředěním roztoku ZR. Do 50ml odměrných baněk bylo pipetováno postupně 500, 1000, 1500, 2000 nebo 2500 μl ZR, do všech roztoků bylo dále přidáno po 5 ml roztoku SM (odpovídá desetinasobnému ředění reálného vzorku moči), 1 ml kyseliny dusičné a 1 ml roztoku IS a bylo doplněno demineralizovanou vodou. Všechny roztoky byly připraveny dvakrát.

Roztoky pro určení meze detekce byly připraveny vždy do 50ml odměrných baněk. V první sadě bylo přidáno po 5 ml SM (simulace desetinasobného zředění) do pěti odměrných baněk. Pro simulaci různého ředění moči bylo přidáno postupně opět do pěti odměrných baněk 3, 4, 5, 6 nebo 7 ml roztoku SM. Do všech roztoků bylo přidáno 1 ml kyseliny dusičné, 1 ml roztoku IS a baňky byly doplněny demineralizovanou vodou.

K ověření správnosti analýzy byl použit vzorek reálné moči, který byl rozdělen na dva podíly. První byl analyzován neupravený, druhý po přidavku roztoku ZR odpovídajícímu celkovému zvýšení koncentrace o 80 ng ml^{-1} . Ana-

lýza reálných vzorků moči probíhala po jejím naředění. Pipetovalo se 1 nebo 2 ml do 25ml odměrné baňky, roztoky byly okyseleny 0,5 ml kyseliny dusičné a obsahovaly přídatek 0,5 ml roztoku IS. Každý vzorek byl analyzován pětkrát. Kalibrační roztoky o koncentraci 0 a 20 ng ml^{-1} Se byly připraveny ředěním roztoku ZR do 50ml odměrných baněk, oba roztoky byly okyseleny 1 ml kyseliny dusičné a obsahovaly přídatek 1 ml roztoku IS.

Roztoky pro speciální analýzu selenu

Vzorky moči pro speciální analýzu byly před analýzou přefiltrovány (Nylon syringe filter $0,45 \mu\text{m}$, Whatman, USA). Vzorky moči obohacené speciemi selenu byly připraveny tak, že z jednotlivých specií selenu byly nejprve v demineralizované vodě připraveny základní roztoky o koncentraci odpovídající cca 20 mg l^{-1} Se. Z těchto základních roztoků bylo odpipetováno $10 \mu\text{l}$ do 10 ml odebrané přefiltrované moči, konečná koncentrace specií odpovídala cca $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Se. Moč pocházející od dárce po konzumaci potravinového doplňku bohatého na selen ($100 \mu\text{g}$ Se získaného z kvasnic v jedné tabletě, Nature's Bounty, USA) byla odebírána 12 hodin po požití (první ranní moč) a okamžitě přefiltrována. Také moč od pacientů v kritickém stavu byla odebírána po nitrožilní aplikaci dávky selenu (max. $120 \mu\text{g}$ selenu/den ve formě seleničitanu) a upravena jako v předchozím případě. Vzorky moči byly skladovány v chladničce při $-35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Instrumentace

Všechna měření metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (ICP-MS) byla prováděna na spektrometru Elan DRC-e (Perkin Elmer, Concord, Kanada) vybaveném koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou a reakční/kolizní celou (DRC) pro eliminaci interferencí. Optimalizované parametry pro kvantitativní stanovení celkového obsahu selenu jsou uvedeny v tab. I. Speciace selenových specií probíhá-

Tabulka I

Parametry ICP-MS pro kvantitativní stanovení celkového obsahu selenu

Parametr	Hodnota
Příkon do plasmatu	1100 W
Průtok Ar zmlžovačem	$0,7 \text{ l min}^{-1}$
Počet scanů na opakování	10
Počet opakování	10
Spotřeba vzorku	1 ml min^{-1}
Sledovaný isotop	^{80}Se , ^{70}Ge , ^{72}Ge , ^{73}Ge , ^{74}Ge , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{130}Te ,
Parametr Rpq	0,4
Průtok methanu v DRC	$0,7 \text{ l min}^{-1}$

Tabulka II
Parametry HPLC-ICP-MS pro speciální analýzu

Parametr	Hodnota
Příkon do plasmatu	1100 W
Průtok Ar zmlžovačem	0,7 l min ⁻¹
Parametr Rpq	0,4
Průtok methanu v DRC	0,7 l min ⁻¹
Počet scanů na opakování	1
Počet opakování	1200
Sledovaný isotop	⁸⁰ Se
Celková doba analýzy	20 min
Kolona	RP-C18e (Lichrocart 250 × 4,6 mm)
Složení mobilní fáze	butansulfonát sodný 2,5 mmol l ⁻¹ , kyselina malonová 4 mmol l ⁻¹ , hydroxid tetramethylamonia 8 mmol l ⁻¹ a methanol 0,05 % (v/v)
Průtok mobilní fáze	1 ml min ⁻¹
Tlak na koloně	170 Bar

la na aparatuře HPLC, která se skládala z vysokotlaké pumpy (Series 200, Perkin Elmer), injektoru Rheodyne 9125 vybaveného 50 μl nástřikovou smyčkou z materiálu PEEK, stejně jako kapiláry spojující jednotlivé části aparatury, a kolony s obrácenou fází RP-C18e (Lichrocart 250 × 4,6 mm, Merck). Separace probíhala isokraticky a jako mobilní fáze byla použita směs butansulfonátu sodného, kyseliny malonové, hydroxidu tetramethylamonia a methanolu (viz výše). Separace probíhala za optimalizovaných podmínek uvedených v tab. II.

Výsledky a diskuse

Optimalizace nastavení reakční cely

Analýza na linii nejvíce zastoupeného isotopu selenu ⁸⁰Se (49,6 % mol/mol) je velice ztížena spektrálními interferencemi způsobenými ionty dimeru argonu ⁴⁰Ar₂⁺. K potlačení těchto interferencí bylo měření prováděno v DRC módu za použití reakčního plynu methanu. Během optimalizace se hledal vhodný průtok methanu (0,3–1,3 ml min⁻¹) a hodnota parametru Rpq (0,1–1). Tento parametr úzce souvisí s intenzitou elektrického pole na tyčích kvadrupólu uvnitř DRC a ovlivňuje významně průchod iontů reakční celou. Pro optimalizaci byl připraven roztok 1 s obsahem selenu 20 ng ml⁻¹ a roztok 2 bez selenu obsahující pouze zředěnou kyselinu dusičnou (1 % v/v). Optimalizačním kritériem byla citlivost (*S*) a odstup signálu od pozadí vyjádřený pomocí koncentrace ekvivalentní pozadí (BEC).

$$S = \frac{I_1 - I_2}{c} \quad (1)$$

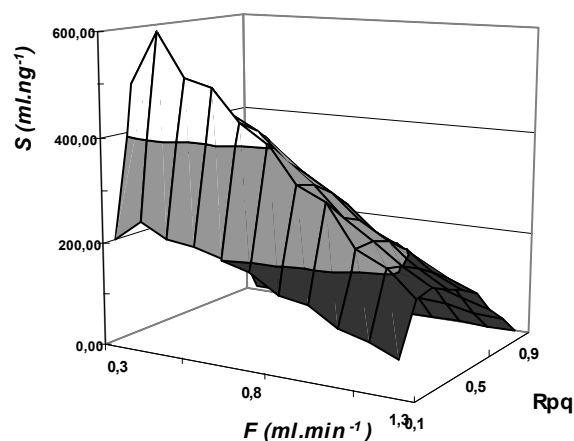
$$BEC = \frac{I_2}{S} \quad (2)$$

kde *I*₁ je signál naměřený s roztokem obsahující Se a odpovídající součtu signálů analytu ⁸⁰Se a interferentu ⁴⁰Ar₂; *I*₂ je signál naměřený s roztokem neobsahujícím Se a odpovídající pouze interferentu ⁴⁰Ar₂ a *c* je koncentrace Se v analyzovaném roztoku.

Z grafu závislosti citlivosti na průtoku methanu a parametru Rpq (obr. 1) je patrné, že nejvyšší citlivosti se dosahuje v rozmezí Rpq 0,3–0,6 při průtoku methanu 0,3 až 0,7 ml min⁻¹. Ovšem vzhledem k hodnotám odstup signálu od pozadí (obr. 2) byly pro měření vybrány kompromisní hodnoty průtoku methanu 0,7 ml min⁻¹ a Rpq 0,4.

Určení meze detekce pro stanovení celkového obsahu Se

Určení meze detekce (LOD) bylo provedeno pomocí analýzy slepých pokusů. Těmi byly roztoky s obsahem 3 až 7 ml syntetické moči simulující různě zahuštěnou reálnou moč, i roztoky se shodným obsahem syntetické moči odpovídající průměrné hodnotě. Měření byla vyhodnocena pomocí tří různých vnitřních standardů Ge, Rh, In. Z výsledků měření je patrné, že všechny tři porovnávací prvky Ge, Rh, In poskytují srovnatelné meze detekce (tab. III). Mez detekce počítaná z dat vzorků s konstantním obsahem 5 ml syntetické moči je nižší.

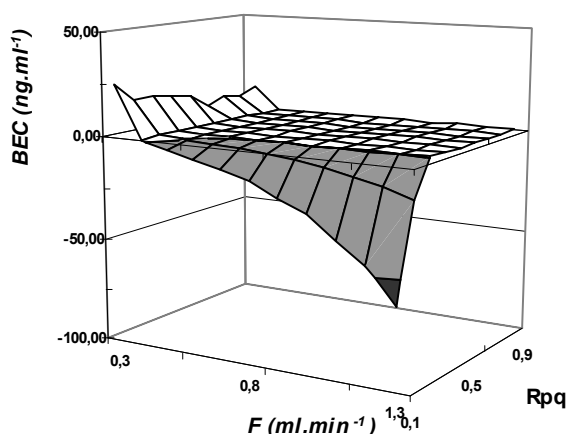


Obr. 1. Závislost citlivosti stanovení *S* na průtoku methanu *F* a parametru Rpq

Tabulka III
 Detekční limity (LOD)^a pro tři různé porovnávací prvky

Roztok	Porovnávací prvky		
	Ge	In	Rh
5 roztoků s přidavkem moči 3-7 ml SM	0,462	0,709	0,693
5 roztoků s přidavkem 5 ml SM	0,074	0,089	0,082

^a Mez detekce určená jako $LOD = \bar{x} + 3 \cdot s$, kde \bar{x} je průměrná hodnota koncentrace a s směrodatná odchylka



Obr. 2. Závislost parametru BEC na průtoku methanu F a parametru R_{pq}

Tabulka IV

Ověření správnosti metodou standardního přidavku selenu (teoretická hodnota přidavku 80 ng ml⁻¹)

Vnitřní standard	Průtok Ar zmlžovačem [l min ⁻¹]	Nalezené hodnoty přidavku Se [ng ml ⁻¹]	Testovací kritérium (t) [$t_k=2,31$]	Shoda
Bez IS	0,70	57,0	8,00	NE
IS ⁷⁰ Ge		79,3	0,12	ANO
IS ⁷² Ge		27,9	50,94	NE
IS ⁷³ Ge		79,0	0,14	ANO
IS ⁷⁴ Ge		83,2	0,50	ANO
IS ¹¹⁵ In		114,8	3,98	NE
IS ¹⁰³ Rh		121,3	4,19	NE
IS ¹³⁰ Te		103,4	3,07	NE
Bez IS	0,63	94,2	2,16	ANO
IS ⁷⁰ Ge		63,5	4,57	NE
IS ⁷² Ge		32,7	39,16	NE
IS ⁷³ Ge		70,9	2,25	ANO
IS ⁷⁴ Ge		72,7	1,72	ANO
IS ¹¹⁵ In		123,4	5,04	NE
IS ¹⁰³ Rh		121,6	4,89	NE

Ověření linearity kalibrační závislosti pro stanovení celkového obsahu Se

Pro ověření linearity byla připravena kalibrační řada roztoků s obsahem 20–100 ng ml⁻¹ selenu. Jako matrice byla použita syntetická moč simulující reálnou moč ve zředění 1:10. Měření probíhalo opět s vnitřními standardy Rh, In a Ge. Z naměřených dat byly vytvořeny kalibrační závislosti a linearita se testovala Mandelovým testem¹¹, jenž srovnává reziduální standardní odchylku lineárního regresního modelu s reziduální standardní odchylkou kvadratického regresního modelu pro daný soubor dat. Pro všechny způsoby měření je hodnota testovacího kritéria nižší než kritická hodnota a tedy u všech třech porovnávacích prvků může být kalibrační závislost považována za lineární.

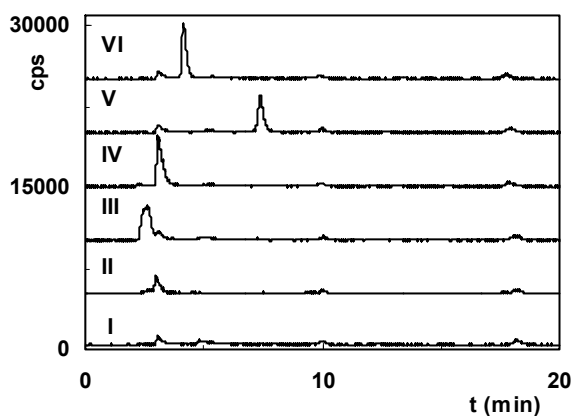
Ověření správnosti pro stanovení celkového obsahu Se

Ověření správnosti bylo provedeno pomocí roztoků reálné moči s přidavkem a bez přidavku selenu a s dvojím

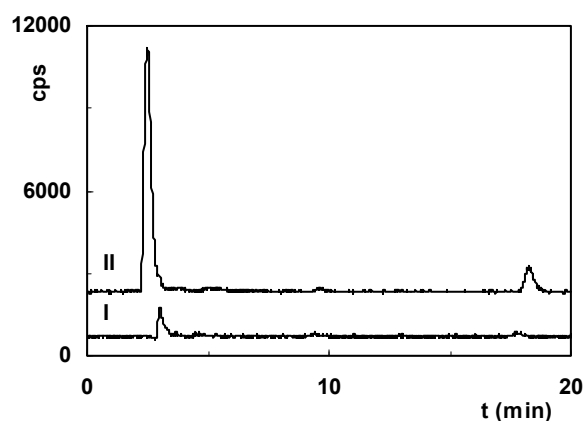
stupněm ředění (1 ml moči do 25ml odměrné baňky a 2 ml moči do 25ml odměrné baňky). Při ředění 2 ml moči do 25ml odměrné baňky bylo dosaženo významně lepších výsledků. Měření bylo provedeno opět pro tři různé vnitřní standardy, v případě Ge i různé isotopy, a za dvou různých průtoků argonu zmlžovačem. První hodnota $0,63 \text{ l min}^{-1}$ odpovídala optimální hodnotě v normálním režimu měření (bez DRC) nastavené konvenčním postupem, tedy odpovídající maximálnímu signálu na linii ^{115}In a podílu oxidových iontů CeO^+ menšímu než 3 %. Druhá hodnota průtoku argonu zmlžovačem ($0,70 \text{ l min}^{-1}$) odpovídala maximální intenzitě signálu ^{80}Se v DRC režimu. Pro ověření správnosti byl použit Studentův test shodnosti výsledků¹⁶. Z výsledků je patrné (tab. IV), že průtok odpovídající maximální intenzitě signálu poskytuje mnohem lepší výsledky než při použití průtoku nastaveného konvenčním způsobem. Ze sledovaných vnitřních standardů se jako vhodné jeví ^{70}Ge , ^{73}Ge a ^{74}Ge . Prvky ^{115}In a ^{103}Rh není vhodné používat vzhledem k odlehlym hodnotám testovacího kritéria, stejně jako dosud používané ^{72}Ge , jehož sledování je pravděpodobně rušeno interferencemi dalších polyatomických iontů. Vzhledem k nemožnosti potlačení těchto interferencí pomocí DRC je pravděpodobné, že tyto interference vznikají přímo v DRC reakci prvků obsažených v matrici s přiváděným methanem.

Speciální analýza selenu v reálných vzorcích moči

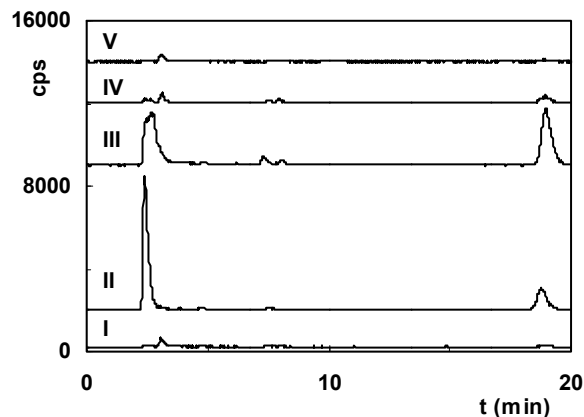
Pro identifikaci specií selenu byly analyzovány vzorky odebrané reálné neředěné moči obohacené cca 20 ng ml^{-1} pěti specií selenu (Se(VI), Se(IV), SeMet, SeUr, SeCys₂). Jak je patrné (obr. 3), specie Se(VI), SeMet, SeUr se podařilo na koloně spolehlivě oddělit. Pouze SeCys₂ a Se(IV) se nepodařilo separovat. Vzhledem k možnému obsahu jedné či obou těchto forem selenu v moči bude třeba dále optimalizovat proces separace, zejména složením mobilní



Obr. 3. Separace jednotlivých specií selenu v moči (I - čistá moč; II - moč + Se(IV) $t_r=2,57 \text{ min}$; III - moč + Se(VI) $t_r=2,98 \text{ min}$; IV - moč + SeCys₂ $t_r=3,02 \text{ min}$; V - moč + SeMet $t_r=7,52 \text{ min}$; VI - moč + SeUr $t_r=4,02 \text{ min}$)



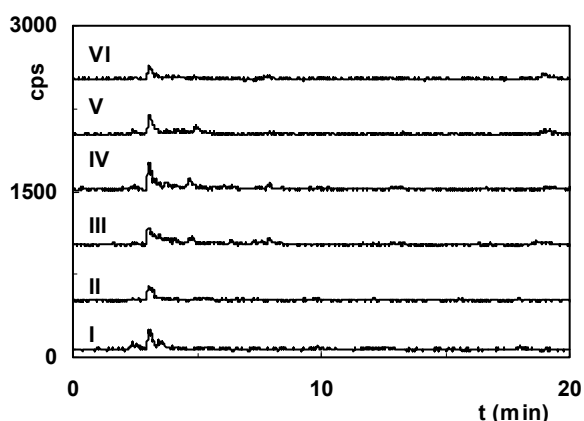
Obr. 4. Vzorek moči zdravého jedince po požití tablety potravinového doplňku s obsahem selenu (I - moč před požitím tablety; II - moč zřed. 1:3, 12 h po požití tablety -100 μg selenu na 1 tabletu)



Obr. 5. Vzorek moči zdravého jedince po požití tablety (I - moč před požitím; II - moč 3 h po požití; III - moč 9 h po požití; IV - moč 12 h po požití; V - moč 15 h po požití)

fáze a volbou gradientové eluce. V signálu moči je možno rovněž pozorovat slabé píky zatím bližšie neidentifikovatelných specií.

Speciální analýza selenu byla prováděna rovněž na vzorcích moči odebrané 12 h (první ranní moč) po požití tablety potravinového doplňku bohatého na selen. Po požití tablety se v moči ve vysokém zastoupení objevil zejména selenan, v menší míře ale i nová zatím neidentifikovaná specie s retenčním časem 18,3 min (obr. 4). Na základě srovnání s literárními údaji se lze domnívat, že by se mohlo jednat o methyl-2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -galaktopyranosa (selenocukr 2), který je dle literatury rovněž dominantní specií vyskytující se v moči získané od jedinců užívajících potravinové doplňky obohacené selenem⁹. Rovněž byla provedena studie popisující časový průběh vylučování selenových specií do moči (obr. 5). Jak lze



Obr. 6. Vzorek moči kriticky nemocných pacientů, kterým je selen přidáván do umělé výživy (I, II – pacienti bez zatížení; III, IV, V, VI – pacienti se zatížením 32–120 μg selenu na den)

pozorovat, v moči odebrané již 3 h po požití tablety je patrný prudký nárůst selenanu, zatímco maximální zastoupení neznámé specíe s retenčním časem 18,3 min je až v moči odebrané 9 h po požití.

Analýza specií selenu byla také prováděna na vzorcích kriticky nemocných pacientů (sepsy) s akutním selháním orgánů, kterým byl selen podáván denně kontinuálně společně s umělou výživou (max. 120 μg Se denně). Jak lze pozorovat z chromatogramů (obr. 6), moč těchto pacientů nevykazuje velké zastoupení žádných specií selenu. Jejich organismus zřejmě veškerý přijatý selen začlenil do svého metabolismu, zatímco u zdravého člověka vede požití jediné tablety potravinového doplňku k prudkému nárůstu celkové koncentrace selenu v moči, zejména selenanu.

Závěr

Pro stanovení celkového obsahu selenu v moči byl s ohledem na linearitu, mez detekce a správnost stanovení vybrán jako porovnávací prvek isotop germania ^{73}Ge . Při speciální analýze pěti selenových specií (Se(VI) , Se(IV) , SeMet , SeUr , SeCys_2) se podařilo rozdělit Se(VI) , SeMet a SeUr . Zbylé dvě specíe měly blízké retenční časy a s ohledem na výskyt těchto specií v moči bude třeba optimalizovat podmínky separace, zejména upravením složení mobilní fáze či použitím gradientové eluce.

Bylo prokázáno, že obsah selenu v moči odpovídá množství selenu přijímaného lidským organismem ve formě potravy. Ve vzorcích moči odebraném již tři hodiny po požití selenového preparátu byl prokázán velký nárůst selenanu, který se v nezatížených vzorcích moči vůbec nevyskytoval. Rovněž došlo ke vzniku nových specií, které bude třeba s použitím vhodného standardu v budoucnu identifikovat. V moči pacientů léčených přípravky obsahujícími Se nedošlo při stejných denních dávkách k žádné

radikální změně v obsahu a speciaci selenu v moči a lze se tedy domnívat, že organismus těchto nemocných pacientů veškerý přijatý selen začlenil do svého metabolismu.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307.

LITERATURA

1. Drexlerová M.: *Sborník semináře Mikroelementy 2004, Medlov, 1.-3.9. 2004*, (Helán V., ed.), str. 64-68.
2. Střítecká H., Hlúbik P.: *Sborník semináře Mikroelementy 2007, Kouty na Desnou, 3.-5.9. 2007*, (Helán V., ed.), str. 126-132.
3. Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C.: *Sci. Total. Environ.* **115**, 400 (2008).
4. Zachara B., Gromadzinska J., Wasowicz W.: *Acta Biochim. Pol.* **53**, 663 (2006).
5. Francesconi K., Panier F.: *Clin. Chem.* **50**, 2240 (2004).
6. Angeles Quijano M.: *Talanta* **50**, 165 (1999).
7. Das A. K., Chakraborty R., Cervera M. L.: *Mikrochim. Acta* **122**, 209 (1996).
8. Blotcky A. J., Hansen G. T., Opeliano-Buencamino L. R.: *Anal. Chem.* **57**, 1937 (1985).
9. Das A. K., Chakraborty R., Cervera M. L.: *Mikrochim. Acta* **122**, 209 (1996).
10. Zheng J., Masaki O., Naoki F.: *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, 730 (2002).
11. Zheng J., Kosmus. W.: *Chromatographia* **51**, 338 (2000).
12. Fumin P.: *J. Anal. At. Spectrom.* **22**, 931 (2007).
13. Kuehnelt D., Kienzl N., Traar P.: *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 235 (2005).
14. Chia-Yi K., Shih-Jen J.: *J. Chromatogr., A* **60**, 60 (2008).
15. Ruoh-Yun W., Ying-Ling H., Lan-Fang C., Shih-Jen J.: *Anal. Chim. Acta* **590**, 239 (2007).
16. Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J.: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam 1997.

Š. Eichler and O. Mestek (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Validation of Determination and Speciation Analysis of Selenium in Urine by HPLC and Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry**

The first part of this study describes determination of total Se in urine by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Determination of the most abundant Se isotope, ^{80}Se , by ICP-MS is complicated by interference of $^{40}\text{Ar}_2$. This was suppressed using a dynamic reaction cell with methane. The limit of Se detection was determined and the linearity of the obtained dependence was verified by the Mandel test. The accuracy was verified by

analysis of urine with a standard Se solution. In the other part, a method for separation of selenite, selenate, selenocystine, selenomethionine and selenourea in urine was elaborated using HPLC and ICP-MS. Separation of selenate, selenomethionine, selenourea was good, but the re-

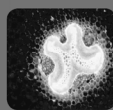
tention times of selenite and selenocystine were very close. The optimized separation parameters were used for urine analysis in septic patients and healthy volunteer control, the food of both groups being supplemented with Se. The Se concentration in the former group was very low.

Charles University in Prague, Faculty of Science

STARS

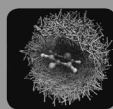
Supporting Talented PhD Research Students

PhD research topics available:
February 3, 2011



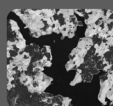
13 PhD positions
BIOLOGY and
LIFE SCIENCES

Application deadline:
March 7, 2011

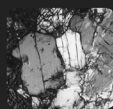


6 PhD positions
CHEMISTRY

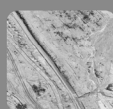
Beginning of the PhD study:
October, 2011



6 PhD positions
GEOGRAPHY



3 PhD positions
GEOLOGY



2 PhD positions
ENVIRONMENT

www.natur.cuni.cz/stars