

## VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH TECHNIK PRO ANALÝZU BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

ONDŘEJ ZÍTKA<sup>a,b\*</sup>, KAREL STEJSKAL<sup>a,b</sup>,  
ANDREA KLECKEROVÁ<sup>c</sup>, VOJTĚCH ADAM<sup>b</sup>,  
MIROSLAVA BEKLOVÁ<sup>d</sup>, ALEŠ HORNA<sup>e,f</sup>,  
VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ<sup>c</sup>, LADISLAV HAVEL<sup>c</sup>  
a RENÉ KIZEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova  
Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie  
a biochemie, a <sup>c</sup> Ústav biologie rostlin, Agronomická fa-  
kulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,  
Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>d</sup> Ústav veterinární ekologie  
a ekotoxikologie, Veterinární a farmaceutická univerzita  
v Brně, Palackého 1–3, 612 42 Brno, <sup>e</sup> Radanal s.r.o.,  
Okružní 613, 530 03 Pardubice, <sup>f</sup> Ústav potravinářského  
inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše  
Bati ve Zlíně, Nám. TGM 275, 762 72 Zlín  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 17.7.06, přijato 30.11.06.

Klíčová slova: elektrochemické techniky, kadmium,  
vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemická  
detekce, diferenční pulzní voltametrie, kukuřice, *Zea mays*

### Úvod

Díky antropogennímu působení dochází v životním prostředí k nárůstu celé řady škodlivých sloučenin, jako jsou pesticidy, ale také těžké kovy. V mnoha zemích je koncentrace těžkých kovů v životním prostředí závažným problémem v ochraně zdraví a produkci potravin<sup>1,2</sup>. Je známo, že těžké kovy jsou vzhledem ke svým vlastnostem jedny z nejnebezpečnějších látek, které se v životním prostředí vyskytují<sup>3–6</sup>. Protože je jejich přítomnost vysoce nežádoucí, byly rostliny i živočíšné nuceny vyvinout řadu ochranných mechanismů pro jejich detoxikaci. Je velmi zajímavé, že byly objeveny rostlinné druhy, které jsou schopny těžké kovy akumulovat bez viditelné deprese a zpomalení růstu. Této schopnosti je právě možné využít v nových biotechnologických procesech zvaných fytoremediace<sup>1</sup>.

Je známo, že pokud jsou rostliny vystaveny účinkům těžkých kovů, zahájí rostlinné buňky syntézu thiolových

sloučenin, jako jsou glutathion a fytochelatiny (PC). Glutathion je malý tripeptid skládající se z glutaminu, cysteinu a glycinu ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycin). Je nejrozšířenějším neproteinovým thiolem vyskytujícím se prakticky ve všech buňkách rostlinných i živočišných organismů, hub a v některých prokaryotických organismech. Glutathion může v organismu existovat ve dvou stavech: redukováném (GSH) a oxidovaném (GSSG). Z glutathionu (GSH) tzv. transpeptidizační reakcí probíhá syntéza PC katalyzovaná enzymem  $\gamma$ -Glu-Cys dipeptidyl transpeptidasou (triviálně fytochelatin syntetasa, PC-syntetasa)<sup>5,6</sup>. Fytochelatiny mají základní strukturu  $(\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly<sup>5,6</sup>, kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ( $\gamma$ -Glu-Cys) může opakovat 2 až 11× (nejčastěji 2–5×)<sup>7</sup>.

Existují rozličné metody pro analýzu thiolových sloučenin<sup>8–17</sup>. Nejčastěji se využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s různými typy detektorů<sup>12–14,18</sup>. K charakterizaci thiolových sloučenin lze také využít elektrochemických metod, jako jsou diferenční pulzní voltametrie<sup>8</sup> či chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza<sup>19</sup>, kde nachází své uplatnění kromě visící rtuťové kapkové elektrody také pevné elektrody, především zlatá elektroda<sup>20</sup>, jejichž povrchy mohou být vhodně modifikovány.

V naší práci byl studován vliv kadmiových iontů na růst rostlin kukuřice. Sledovali jsme hladinu kadmia v jednotlivých částech rostliny kukuřice a navíc bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) pro simultánní stanovení devíti různých thiolových sloučenin.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Acetonitril a methanol (čistota pro HPLC) byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Standardy PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> a DesGlyPC jsme získali od firmy Clonestar Brno. Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4 °C.

#### Kultivace rostlin

Pokusnou rostlinou byla kukuřice setá (*Zea mays* L.) F1 hybrid Gila. Sedmidenní klíční rostliny byly umístěny do opěrných novodurových nádobek a takto vysazeny do kultivačních van naplněných vodou. Kultivační vany byly umístěny v termostataném boxu (Sanyo, Japonsko), kde byly udržovány konstantní podmínky (teplota 20 °C, vlhkost 65 %, 14 h světlo). Po osmi dnech kultivace byla voda ve vanách nahrazena vodnými roztoky o různé koncentraci

\* Ondřej Zítka se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500  $\mu\text{M}$ ) ve formě  $\text{CdCl}_2$ . Expozice rostlin  $\text{Cd}$  trvala 6 dnů, přičemž po 24 h intervalech byly odebrány čtyři rostliny od každé pokusné varianty. Odebrané rostliny byly omyty třikrát v destilované vodě a jednou v roztoku 0,5 M EDTA, a následně rozděleny na část listovou a kořenovou.

#### Příprava vzorku pro stanovení thiolových sloučenin

Listy a kořeny kukuřice (průměrně 0,2 g svěží hmotnosti) byly zmrazeny kapalným dusíkem pro destrukci buněk<sup>21–23</sup>. Zmrazené části rostlin byly rozetřeny v třecí misce a poté byly do misky přidány 2 ml fosfátového pufru o pH 7,0. Vzniklý roztok byl homogenizován na třepačce Vortex–2 Genie (Scientific Industries, USA) po dobu 30 min při 4 °C. Homogenát byl centrifugován (15 000 ot  $\text{min}^{-1}$ ) 30 min při 4 °C pomocí centrifugy Universal 32 R (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo). Supernatant byl před analýzou filtrován přes membránový filtr (0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore, USA).

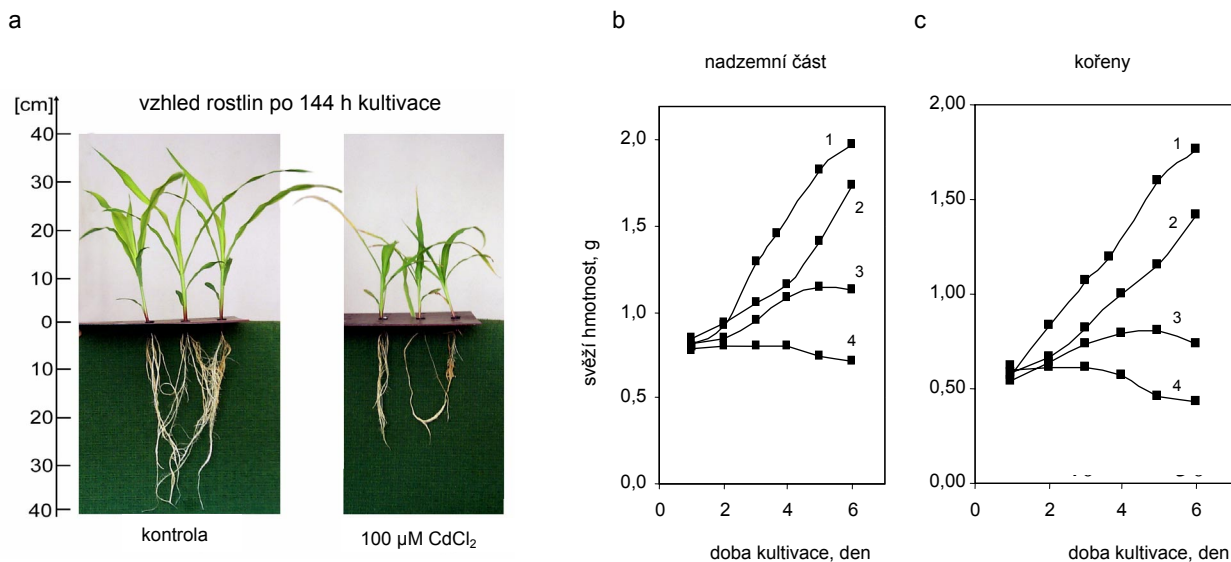
#### Elektrochemické stanovení kadmia

Elektrochemické měření bylo prováděno na přístroji AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém, který se skládal z visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) jako pracovní elektrody s plochou 0,4  $\text{mm}^2$ , argentochloridové elektrody ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ ) jako referenční elektrody a platinového drátku jako

pomocné elektrody. GPES software (EcoChemie, Nizozemí) byl použit pro zpracování hrubých dat. Acetátový pufr o pH 3,6 (0,2  $\text{mol l}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ ) byl použit jako základní elektrolyt. Vzorky kukuřičných obilok byly zbaveny kyslíku probubláváním argonem (99,999 %) po dobu 120 s. Koncentrace kadmia byla měřena pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV). Anodický sken byl započat při  $-0,7 \text{ V}$  a zastaven u  $-0,4 \text{ V}$ . Kadmium bylo vylučováno na HMDE při potenciálu  $-0,7 \text{ V}$  s dobou akumulace 120 s za laboratorní teploty. Roztok byl během vylučování míchán (1450 ot  $\text{min}^{-1}$ ). Další použité parametry metody byly: modulační čas 0,02 s, potenciálový krok 1,05 mV, rychlost skenu 10,5  $\text{mV s}^{-1}$ , modulační amplituda 49,5 mV.

#### Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, USA), chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (150  $\times$  4,6; 3  $\mu\text{m}$  velikost částic, Varian, USA) a osmikanálového elektrochemického detektoru CoulArray (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující čtyři sériově řazené cely. Každá cela obsahuje jednu pracovní uhlíkovou elektrodu, dvě referenční (hydrogenpaládiové) a dvě pomocné elektrody (uhlíkové). Chromatografická kolona a elektrochemický detektor jsou termostatovány na stejnou teplotu. Vzorek (5  $\mu\text{l}$ ) byl injektován manuálně přes dávkovací ventil (Rheodyne).



Obr. 1. a) Fotografie rostlin kukuřice (*Zea mays* L.) kultivovaných po dobu 144 h; charakteristické růstové křivky rostlin kukuřice vystavené působení 0, 150, 400 a 500  $\mu\text{M}$  koncentraci  $\text{CdCl}_2$  získané vážením svěží hmotnosti b) nadzemní části a c) kořenů; rostliny byly kultivovány za podmínek aerohydroponie po dobu 144 h, při teplotě 20 °C, 65 % vzdušné vlhkosti a světelném režimu: 14 h světlo a 10 h tma; 1 – 0  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 2 – 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 3 – 400  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 4 – 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$

## Výsledky a diskuse

Elektrochemické metody se v posledních letech dostávají do popředí zájmů různých vědních i průmyslových odvětví pro jejich rychlost, velmi dobrou citlivost, reprodukovatelnost, nízké provozní náklady a především možnost miniaturizace. Jak je ukázáno v řadě prací, jsou vhodné pro stanovení širokého spektra biologicky významných látek<sup>19,24–27</sup> včetně iontů kovů<sup>10,21,28–31</sup>. Lze je tedy využít nejen pro určení aktuální koncentrace studované látky, ale také pro sledování jejich změn v závislosti na čase a druhu sledovaného organismu či složky životního prostředí.

### Morfologické změny

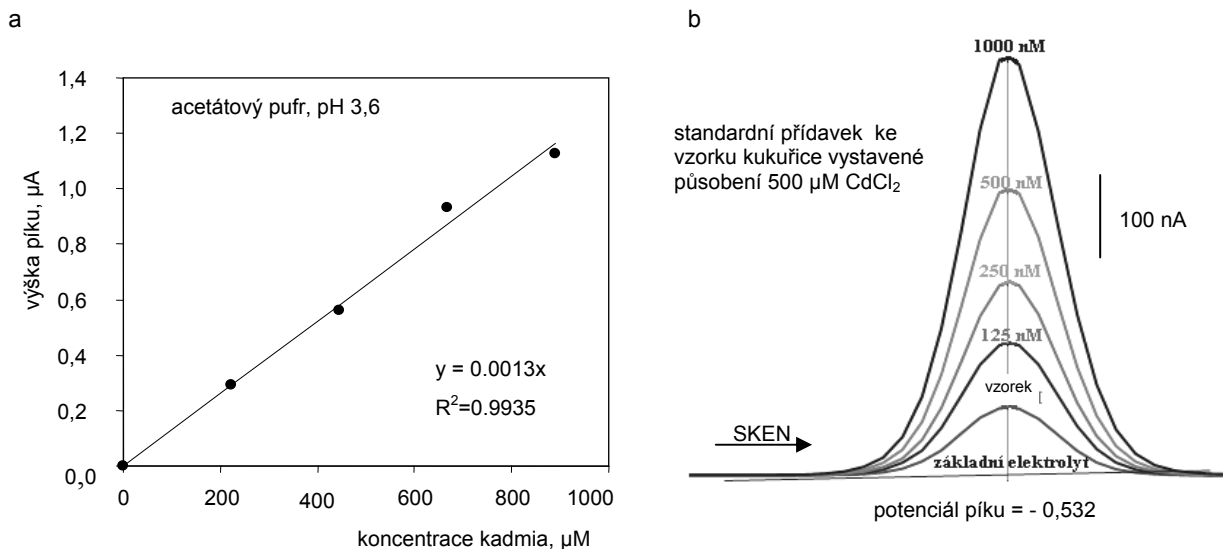
Kademnaté ionty jsou pro většinu organismů velmi toxické a z toho důvodu jsou využívány jako model toxicity<sup>13,32</sup>. Rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) byly vystaveny působení 0, 50, 150, 200, 300, 400 a 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  po dobu šesti dnů. U všech aplikovaných koncentrací kademnatých iontů jsme pozorovali růstovou depresi ve srovnání s kontrolou, přičemž výrazný toxický vliv kadmia na rostliny byl velmi zřejmý u nejvyšších aplikovaných dávek kadmia, kde se kromě růstové deprese objevovala poléhavost a chloróza (obr. 1).

### Analýza kademnatých iontů v různých částech kukuřice

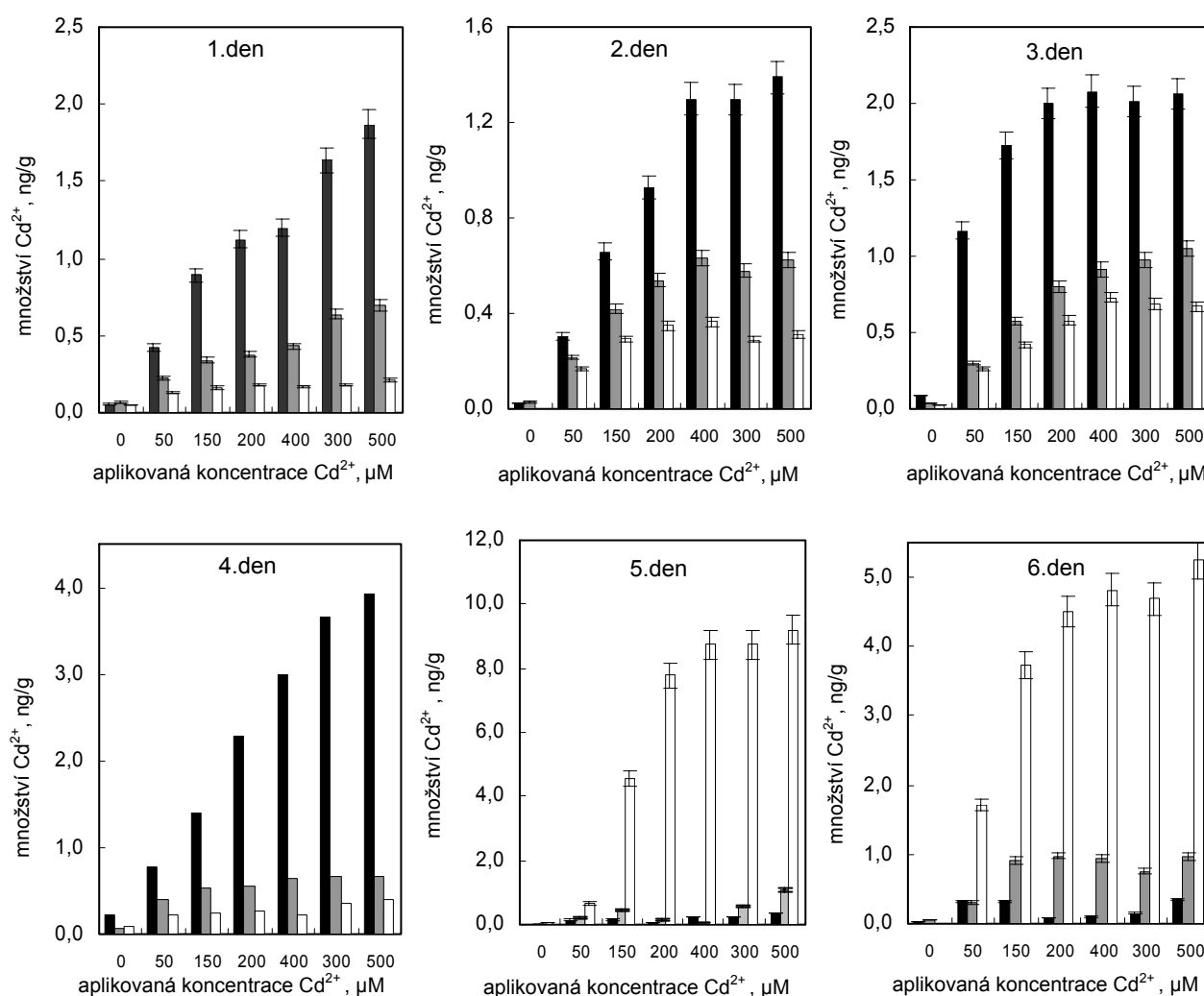
Pro zjištění obsahu kademnatých iontů v různých

částech kukuřice bylo využito diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV) v 0,2 M acetátovém pufru (pH 3,6). Kadmium bylo akumulováno na rtuťové kapkové elektrodě (tvorba sloučeniny kadmia se rtuťí) při potenciálu  $-0,7$  V po dobu 120 s. Poté byla vzniklá sloučenina kadmia a rtuť rozpouštěna. Signál studovaného kadmia byl pozorován při potenciálu  $-0,53$  V. Za výše uvedených podmínek bylo postupně k základnímu elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 3,6) přidáváno zvyšující se množství  $\text{CdCl}_2$ . Pozorované voltametrické signály lineárně vzrůstaly s rostoucí koncentrací kadmia ( $y = 0,0013x$ ;  $R^2 = 0,9935$ ) (obr. 2). Ze získaných experimentálních dat bylo možné určit limit detekce kademnatých iontů (určený jako 3 S/N) 335 fM s chybou stanovení 1,5 %. Elektroanalytická metoda byla použita pro analýzu volných kademnatých iontů v biologickém vzorku (extrakty z kořenů a listů kukuřice). Na DPAS voltamogramech reálných vzorků byl pozorován velmi dobře vyvinutý, DPASV symetrický signál kadmia při potenciálu  $-0,53$  V (obr. 2). Zjistili jsme, že rostliny kukuřice přijaly kořeny průměrně 6  $\text{pg g}^{-1}$  kadmia za hodinu (u dávky kadmia 50  $\mu\text{M}$ ) a 23  $\text{pg g}^{-1}$  kadmia za hodinu (u dávky 500  $\mu\text{M}$ ). Obsah kadmia v rostlinách velmi rychle stoupá do aplikované dávky 200  $\mu\text{M}$ , pak již jeho obsah stoupá méně strmě (obr. 3). Nejvyšší obsahy kadmia byly pozorovány v kořenech od  $0,5 \pm 0,1 \text{ ng g}^{-1}$  (na počátku experimentu) až do  $4 \pm 0,3 \text{ ng g}^{-1}$  (ve čtvrtém dni). Obsahy kadmia v listové části rostlin byly do čtvrtého dne velmi nízké a pohybovaly se do  $1 \pm 0,2 \text{ ng g}^{-1}$ .

Jak je známo, kořeny jsou místem prvního kontaktu rostliny s okolním prostředím, ve kterém je přítomno mno-



Obr. 2. a) Kalibrační závislost proudové odpovědi na koncentraci kademnatých iontů detegovaných v prostředí 0,2 M acetátového pufru (pH 3,6); anodický sken byl započat při  $-0,7$  V a ukončen při  $-0,4$  V. Kadmium bylo vylučováno na HMDE při potenciálu  $-0,7$  V s dobou akumulace 120 s za laboratorní teploty. Roztok byl během vylučování míchán ( $1450 \text{ ot. min}^{-1}$ ). Další použité parametry metody byly: modulační čas 0,02 s, potenciálový krok 1,05 mV, rychlost skenu  $10,5 \text{ mV. s}^{-1}$ , modulační amplituda 49,5 mV; b) Voltamogramy kademnatých iontů o různé koncentraci, které byly přidány do vzorku získaného z kukuřice vystavené působení 500  $\mu\text{M}$  koncentraci  $\text{CdCl}_2$ ; elektrochemická analýza probíhala v prostředí 0,2 M acetátového pufru (pH 3,6)



Obr. 3. Množství detegovaného kadmia u kukuřice vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů; byly analyzovány mladší a starší listy a kořeny. Podrobnosti analýzy jsou uvedeny na obr. 2; ■ kořeny, ■ mladší listy, □ starší listy

ho látek, např. volné ionty. Rostliny byly proto nuceny k vytvoření velmi důmyslných aktivních mechanismů příjmu, aby v takovém prostředí byly schopny existence. Pravděpodobně díky těmto ochranným mechanismům byl obsah kadmia právě v kořenech nejvyšší, přičemž k transportu těžkého kovu dále rostlinou docházelo pouze minimálně. Kadmium je nejvíce imobilizováno v buňkách rhizodermis. V pátém dni experimentu byl pozorován velmi výrazný pokles obsahu kadmia v kořenech kukuřice, přičemž v šestém dnu došlo pouze k minimálnímu zpětnému nárůstu (obr. 3). Oproti tomu velmi prudce stoupal obsah kadmia ve starších listech v pátém a šestém dni. Nárůst obsahu kadmia ve starších listech může souviset s transportem kadmia do částí rostlin, kde je toxický kov více imobilizován. Šestý den obsah kadmia mírně klesal,

což může být způsobeno selháním obranných mechanismů, které souvisí s vážným poškozením rostlin vedoucím k jejich smrti. Zjistili jsme, že v pátém dni experimentu byl pozorován výrazný nárůst obsahu oxidovaného glutathionu, což právě souvisí s nárůstem obsahu kadmia v rostlinách a vzestupem množství kyslíkových radikálů. V ostatních částech rostlin byly obsahy kadmia velmi nízké. Pozorovaný jev pravděpodobně souvisí s porušením ochranných mechanismů v kořenech rostlin. Zatím není zcela zřejmé, proč nedochází k výraznému nárůstu obsahu kadmia v mladších listech (vyšší metabolická aktivita, intenzivnější transpirační tok), ale pouze v listech starších. U mladších listů byla pozorována výrazná variabilita v obsahu kadmia, avšak jeho obsah v listech s aplikovanou dávkou kademnatých iontů roste. Nejvyšší obsah kadem-

natých iontů byl pozorován ve třetím dni experimentu. V šestém dni experimentu obsah kadmnatých iontů mírně vzrůstal, což podporuje hypotézu o porušení ochranných mechanismů u rostliny.

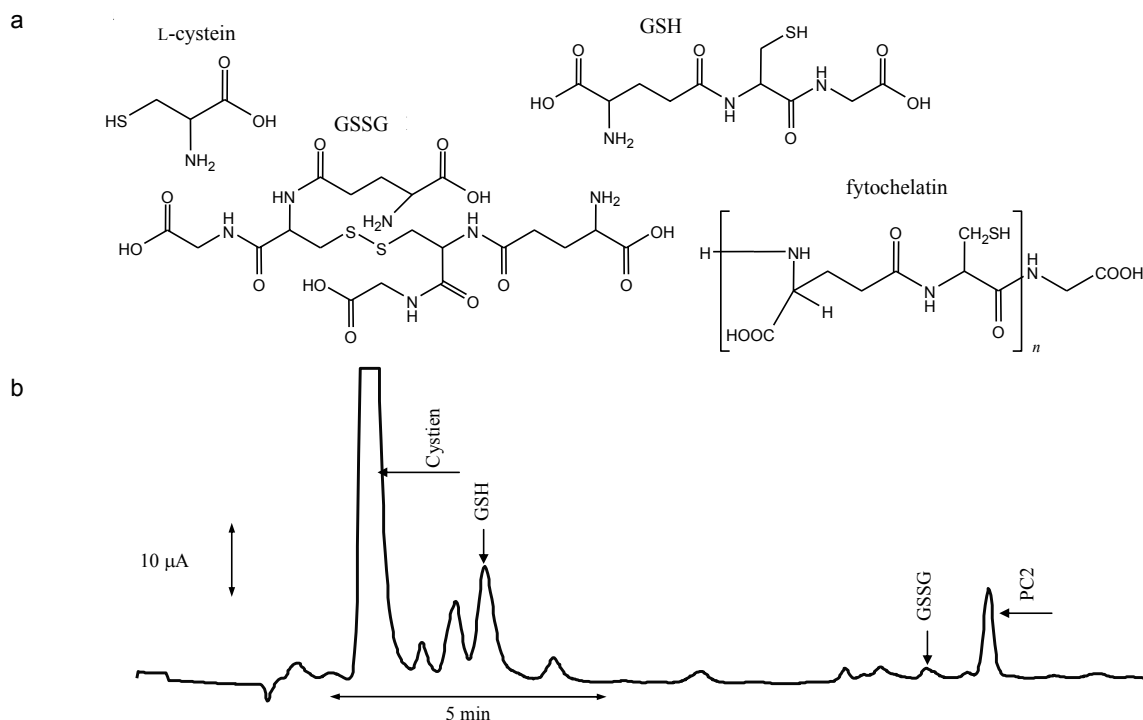
#### Změny obsahu detegovaných thiolů v rostlinách kukuřice

Pomocí námi nedávno publikované metodiky jsme studovali obsah thiolových sloučenin v různých částech kukuřice vystavené působení různých koncentrací kadmnatých iontů<sup>14,15</sup>. V této práci jsme se zaměřili na studium cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu a fytochelatinu 2 (obr. 4). Pro analýzu jsme využili vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Na obr. 4b je chromatografický záznam analýzy rostlinného extraktu z kořenů kukuřice vystavené působení 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Na chromatogramu jsou velmi dobře rozlišitelné a odečitatelné píky všech studovaných thiolů. Na základě řady analýz jsme zjistili, že obsah cysteinu u všech rostlin se vzrůstající koncentrací kadmnatých iontů a dobou expozice vzrůstá přibližně o 500–800 % (v porovnání s kontrolou). Šestý den experimentu byl pozorován mírný pokles obsahu cysteinu, což může souviset s intenzivním zapojením této látky do metabolismu rostliny právě

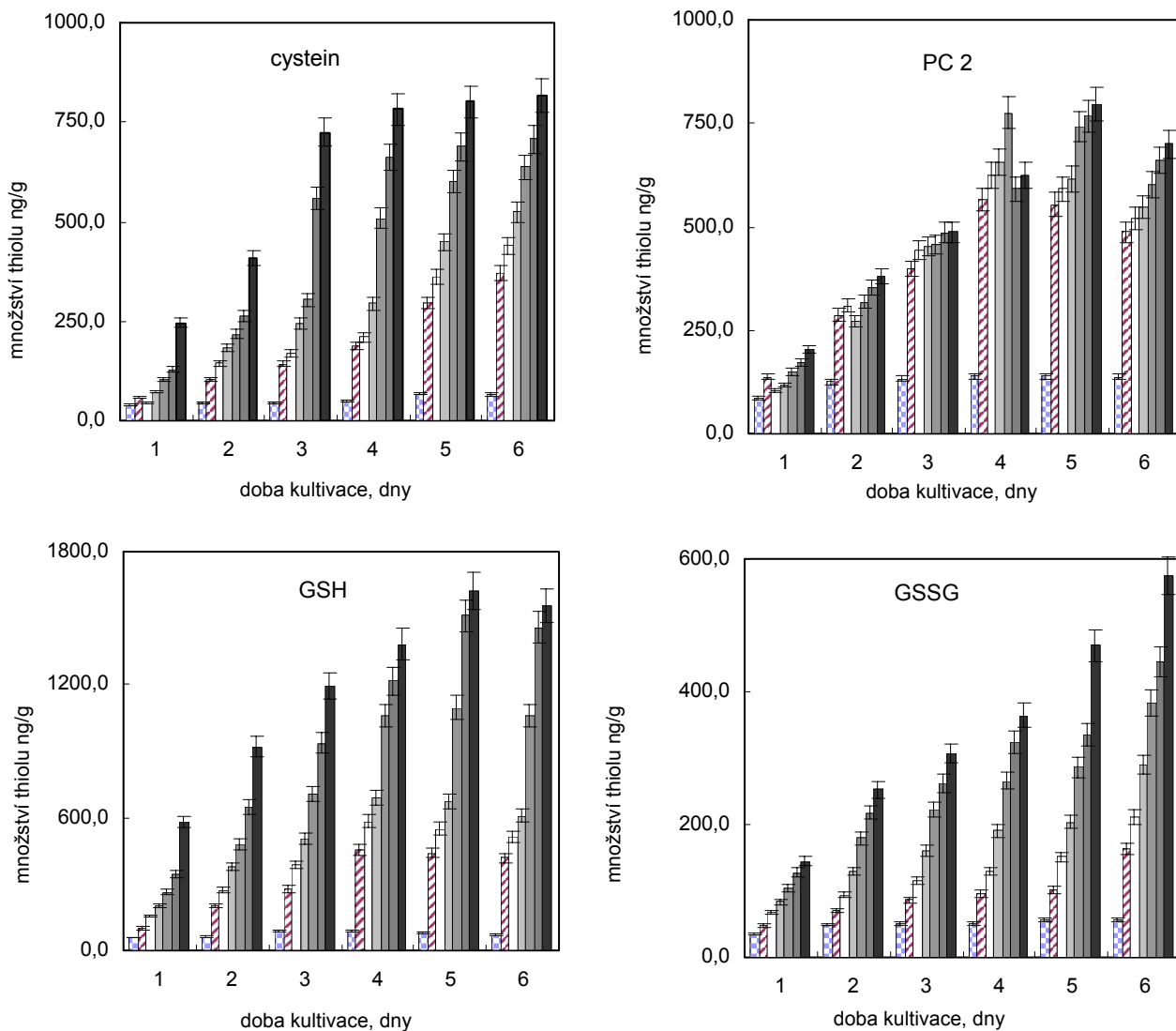
v detoxikačním procesu. Obsah GSH a  $\text{PC}_2$  po celou dobu experimentu velmi rychle vzrůstal. Již první den experimentu byl při nejvyšší aplikované koncentraci pozorovaný nárůst obsahu thiolů o více než 200 % (v porovnání s kontrolou). Po následující dva dny expozice se obsah GSH a  $\text{PC}_2$  zvyšoval přibližně o 30–60 % v závislosti na aplikované dávce kadmia vyjma kontrolních rostlin. Od třetího dne experimentu byly tyto změny pozvolnější (nárůst obsahu o 10–30 %). Pozorovaný jev pravděpodobně souvisí s výraznou toxicitou kadmia, která byla ve třetím dni experimentu velmi dobře patrná jak na růstové křivce, tak na morfologii rostlin. Obsah GSSG v rostlinách s rostoucí aplikovanou dávkou kadmia a dobou expozice také rostl. V šestém dni experimentu byl jeho obsah o 100 až 600 % vyšší v porovnání s kontrolou. Takový nárůst obsahu GSSG ukazuje na porušení glutathionového cyklu a silný oxidační stres exponovaných rostlin (obr. 5).

#### Závěr

Vzrůstající množství polutantů různého druhu a původu v životním prostředí vede organismy k aktivaci detoxikačních mechanismů. Studium způsobu adaptace na jednotlivé druhy znečištění je velmi důležitým úkolem mo-



Obr. 4. a) Chemická struktura L-cysteinu, redukovaného glutathionu (GSH), oxidovaného glutathionu (GSSG) a fytochelatinu. b) Chromatogram současného stanovení několika thiolů ve vzorku kořenů kukuřice exponovaných 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  po 144 h kultivace



Obr. 5. Změna celkové hladiny cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu a phytochelatinu u kukuřice vystavené  $\square$  0,  $\square$  50,  $\square$  100,  $\square$  150,  $\square$  200,  $\blacksquare$  400 a  $\blacksquare$  500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> v průběhu šestidenního experimentu; podrobnosti jsou na obr. 1 a 4

derní analytické chemie, biochemie a molekulární biologie. Jak je ukázáno, elektrochemické stanovení v průtokovém systému umožňuje citlivé, rychlé a automatizované měření řady thiolů, které jsou rostlinami aktivně syntetizovány proti působení těžkých kovů. Kadmium také ovlivňuje růst rostlin kukuřice. Vstup kadmia do rostlin kukuřice je ovlivněn řadou ochranných mechanismů.

Práce na tomto příspěvku byla financována díky projektům: GAČR 522/07/0692, MSMT 6215712402 a Výzkumného centra I M06030.

#### LITERATURA

1. Zehnálek J., Vacek J., Kizek R.: Lis. Cukrov. Reparske 120, 220 (2004).
2. Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: Lis. Cukrov. Reparske 120, 222 (2004).
3. Meister A.: J. Biol. Chem. 263, 17205 (1988).
4. Cobbett C. S.: Curr. Opin. Plant Biol. 3, 211 (2000).
5. Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6838 (1989).
6. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Science 320, 674 (1985).

7. Cobbett C. S., Goldsbrough P. B.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159 (2002).
8. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
9. Vodičková H., Pacakova V., Šestáková I., Máder P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
10. Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: *Bioelectrochemistry* 63, 347 (2004).
11. Fojta M., Fojtova M., Havran L., Pivonkova H., Dorcak V., Sestakova I.: *Anal. Chim. Acta* 558, 171 (2006).
12. Camera E., Rinaldi M., Briganti S., Picardo M., Fanali S.: *J. Chrom., B* 757, 69 (2001).
13. Klejdus B., Zehnalek J., Adam V., Petrek J., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Rozik R., Havel L., Kuban V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 117 (2004).
14. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
15. Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejdus B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: *J. Chrom., A* 1084, 134 (2005).
16. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).
17. Vitecek J., Petrlova J., Petrek J., Adam V., Potesil D., Havel J., Mikelova R., Trnkova L., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5087 (2006).
18. Camera E., Picardo M.: *J. Chrom., B* 781, 181 (2002).
19. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
20. Zhang W., Wan F. L., Zhu W., Xu H. H., Ye X. Y., Cheng R. Y., Jin L. T.: *J. Chrom., B* 818, 227 (2005).
21. Petrek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 576 (2005).
22. Viteček J., Adam V., Petřek J., Babula P., Novotná P., Kizek R., Havel L.: *Chem. Listy* 99, 496 (2005).
23. Babula P., Mikelová R., Adam V., Potěšil D., Zehnálek J., Kizek R., Havel L., Sladký Z.: *Chem. Listy* 100, 271 (2006).
24. Kizek R., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 119 (2002).
25. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejdus B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1167 (2005).
26. Billova S., Kizek R., Jelen F., Novotna P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 362 (2003).
27. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
28. Kudravná M., Růriková D.: *Chem. Listy* 99, 731 (2005).
29. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 1003 (2003).
30. Davis A. C., Wu P., Zhang X. F., Hou X. D., Jones B. T.: *Appl. Spectrosc. Rev.* 41, 35 (2006).
31. Mader P., Musil J., Čurdová E., Korečková J., Cibulka J.: *Chem. Listy* 81, 1190 (1987).
32. Fojtova M., Kovarik A.: *Plant Cell Environ.* 23, 531 (2000).

**O. Zítka<sup>ab</sup>, K. Stejskal<sup>ab</sup>, A. Kleckerová<sup>b</sup>, V. Adam<sup>b</sup>, M. Beklová<sup>d</sup>, A. Horna<sup>e</sup>, V. Šupálková<sup>c</sup>, L. Havel<sup>c</sup>, and R. Kizek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, <sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, and <sup>c</sup>Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, <sup>d</sup>Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, <sup>e</sup>Radanal Ltd., Pardubice, <sup>f</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Technology, Zlín): **Utilizing Electrochemical Techniques for Detection of Biological Samples**

Heavy metals rank among the most toxic compounds occurring in the environment; they are also dangerous due to bioaccumulation. Plants and animals have developed a number of protective mechanisms. The detoxification mechanisms of heavy metals in different organisms have been intensively studied for many years. We aimed at investigation of detoxification mechanisms of maize plants treated with 0, 50, 100, 150, 200, 400 and 500 µM Cd(II) solutions for six days. In particular, we observed their growth and determined the Cd content (by differential pulse anodic stripping voltammetry) and thiol concentration (by HPLC) in the treated plants. Maize plants took up 6 pg of Cd per gram per hour at the lowest dose and 23 pg Cd per g per hour at the highest Cd dose. The relations of glutathione and phytochelatin contents, applied Cd dose, cultivation time, growth curve and plant morphology were investigated.