

# 17. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE

„O CENU FIRMY MERCK 2014“

5. a 6. února 2014

Pardubice



**Editoři sborníku:**  
Jiří Barek  
Vlastimil Vyskočil

## 17. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE „O CENU FIRMY MERCK 2014“

V neúprosném kolotoči zpráv, hlášení, žádostí a dalších – duší analytického chemika nepříliš uspokojujících – akcí, se objevilo radostné světélko, které většinou zúčastněných udělalo podle mého názoru velkou radost. Ve dnech 5. a 6. února 2014 proběhl v moderních prostorách Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice v inspirující atmosféře v pořadí již 17. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck 2014“ za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie. Stejně jako v minulých letech proběhla tato akce ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické a zúčastnilo se jí 25 účastníků ze sedmi českých vysokých škol. Odborná zástupka letos připadla kolegům z Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice pod vedením prof. Ing. Karla Ventury, CSc. a doc. Ing. Martina Adama, Ph.D. Jímí zkušeně dirigovaný kolektiv (ve složení Ing. Petra Bajerová, Ph.D.; Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.; Ing. Aleš Eisner, Ph.D.; Ing. Andrea Čížková; Ing. Silvie Surmová a Ing. Daniel Kremr) zajistil bezchybný průběh soutěže a vytvoření příjemné a přátelské atmosféry. Můj dík patří i Ing. Ivě Ulbrichové, CSc., asistentce proděkanů, za účinnou organizační podporu soutěže a Milanu Reinberkovi, DiS. za tvorbu webových stránek soutěže a její fotografickou dokumentaci. A pochopitelně i prof. Ing. Petru Lošťákoví, DrSc., děkanovi Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, který si i ve svém jistě nabitém programu našel čas na pozdravení účastníků soutěže. Než se dostanu k informaci o udělených oceněních, dovoluji mi, abych vyjádřil svůj obdiv nad výkony a odvedenou prací všech soutěžících bez ohledu na výsledné pořadí. Kvalita a v nejlepší slova smyslu profesionalita jejich vystoupení by byla ozdobou řady významných mezinárodních konferencí a snesla i přísná mezinárodní měřítka. Úkolem vybrat ty nejlepší z nejlepších se velmi dobře zhostila porota ve složení doc. Ing. Martin Adam, Ph.D., prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., doc. Ing. Zdeňka Kolská, Ph.D., Ing. Marcela Kubásková, doc. RNDr. Přemysl Lupal, Ph.D., doc. Ing. Zuzana Navrátilová, CSc., RNDr. Helena Pokorná, prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. a doc. Ing. Kamil Záruba, CSc., kteří si rovněž zaslouží poděkování. Výsledný verdikt této poroty byl následující:

1. místo získala **Bc. Simona Janků** z Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za práci *Příprava a charakterizace vysoce zesítěných molekulárních stacionárních fází pro separace malých molekul.*
2. místo získala **Bc. Aneta Laryšová** z Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Ostravské Univerzity v Ostravě za práci *Analýza alkaloidů v makovině metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie.*
3. místo získal **Bc. Kamil Mikulášek** z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně za práci *Studium retenčního chování trinukleotidů v HPLC.*

Vzhledem k mimořádné kvalitě přednesených prací se porota rozhodla udělit tři zvláštní ceny poroty následujícím soutěžícím: **Bc. Vít Kosek** z Ústavu analýzy potravin a výživy Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze za práci *Vývoj analytické metody pro studium osudu*



Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2014“. Zleva doc. Ing. M. Adam, Ph.D. (předseda poroty), Bc. K. Mikulášek (MU Brno), Bc. M. Nagyová (VŠCHT Praha), Bc. S. Janků (UPA Pardubice), Bc. A. Laryšová (OU Ostrava), Bc. V. Kosek (VŠCHT Praha) a Ing. M. Kubásková (zástupce firmy Merck)

*statinů v tkáňových kulturách s využitím tandemové a vysoko-rozlišující hmotnostní spektrometrie, Simona Lupinková* z Ústeckého materiálového centra a Katedry fyziky Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem za práci *Analýza povrchů polymerů aktivovaných plazmatem a následně roubovaných vicinálními sloučeninami* a **Bc. Michaela Nagyová** z Ústavu inženýrství pevných látek Fakulty chemicko-technologické VŠCHT v Praze za práci *Analýza povrchu polymérov očkovaných cysteminom pre tkanivové inžinierstvo.* Všem oceněným patří naše srdečné blahopřání a všem účastníkům náš vřelý dík za odvedenou práci, lásku k analytické chemii a perfektní prezentace. Poděkování si nepochybně zaslouží i Ing. Radmila Řápková, výkonná redaktorka časopisu Chemické listy, RNDr. Vlastimil Vyskočil, PhD. za pečlivou přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Chemické listy věnovaného této soutěži a RNDr. Helena Pokorná za pomoc při organizačním zajištění této soutěže. A v nespoleční řadě považují za milou povinnost poděkovat Dr. Arturovi Stawiskému, Ing. Lence Ungermanové a Ing. Marcelce Kubáskové z firmy Merck za jejich laskavou a účinnou podporu této soutěže.

Na závěr nezbývá než všechny zájemce pozvat na již 18. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie, který bude zajišťován kolektivem vedeným doc. Ing. Zuzanou Navrátilovou, CSc. z Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v Ostravě ve dnech 4. a 5. února 2015.

Jiří Barek,  
předseda Odborné skupiny analytické chemie ČSCH

## ANALÝZA AROMAPROFILU U VZORKŮ JEČNÉHO A PŠENIČNÉHO SLADU

**KAROLÍNA ADÁMKOVÁ, DANIEL KREMR,  
ANDREA ČÍŽKOVÁ, MARTIN ADAM a KAREL  
VENTURA**

*Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,  
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Pardu-  
bice*

*Karolina.Adamkova@student.upce.cz*

### Úvod

Slad je jednou ze základních surovin pro výrobu piva. Jednotlivé typy sladů s požadovanými vlastnostmi se vyrábí nejrůznějšími úpravami technologie máčení a klíčení určité obiloviny. Těmito úpravami lze regulovat aktivitu a biosyntézu enzymů, které působí na určité složky extraktu. Tvorbu barevných a aromatických produktů lze pak regulovat především teplotními úpravami při hvozdnění sladu<sup>1</sup>.

V České republice se vyrábí slady převážně ze sladovnického ječmene a pouze zlomek procenta připadá na slady pšeničné<sup>2</sup>. Pšeničný slad dodává pivu speciální chuťové vjemy, podporuje pěnivost, a proto se často využívá jako přídatek při výrobě piv klasických se špatnou stabilitou pěny<sup>1</sup>.

Jako vhodná a dostupná metoda pro získání těkavých látek ze sladu se jeví mikroextrakce tuhou fází z „headspace“ prostoru (HS-SPME). Pro samotnou detekci je pak vhodné použít GC-MS, tedy plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním detektorem. Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je metoda, která kombinuje extrakci a prekoncentraci analytů v jednom kroku za použití jednoduchého zařízení. Principem je sorpce těkavé složky vzorku na stacionární fázi (vrstvička polymeru) pokrývající křemenné vlákno umístěné uvnitř ocelové jehly jednoduchého aplikátoru, která ho chrání před mechanickým poškozením. Při HS-SPME vzorkování dochází k extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v nádobě uzavřené víčkem se septem, které je propichováno aplikátorem pro SPME. Tato varianta extrakce je vhodná právě pro těkavé látky. Množství nasorbované látky závisí zejména na rozdělení sloučenin mezi headspace a matici vzorku a také na rozdělení mezi stacionární fází na vlákne a headspace. Na vlákne nasorbovaná složka se následně tepelně desorbují přímo v nástřikovém prostoru plynového chromatografu spojeného s hmotnostním detektorem. HS-SPME v kombinaci s GS-MS byla vyhodnocena jako účinná metoda, nevyužívající rozpouštědel, vhodná pro analýzu těkavých složek z rostlinných materiálů.

Hlavním cílem této práce je prozkoumat použitelnost této metody pro analýzu těkavých látek ve vzorcích ječného a pšeničného sladu<sup>3</sup>.

### Experimentální část

Pro extrakce těkavých látek bylo použito SPME vlákno 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS (divinylbenzen/Carboxen/polydimethylsiloxan) a držák pro manuální vzorkování (vše Supelco, Bellefonte, PA, USA). Vzorky sladu plzeňského typu byly dodány z humnové sladovny Záhlinice (ČR).

Pro izolaci těkavých látek metodou HS-SPME byly naváženy 3 g čerstvě rozdrceného sladu. Tato navážka byla převedena do skleněné vzorkovací nádoby se septovým uzávěrem (20 ml, Supelco). Průběh extrakce byl podpořen přidávkou 5 ml roztoku NaCl s různými koncentracemi. Po uzavření nádoby byla připravená suspenze promíchána na třepačce Yellow Line TTS 2 (2500 ot.  $\text{min}^{-1}$ ). Nádobka s promíchanou suspenzí byla vložena do vyhřátého prostoru o příslušné teplotě, kde byla temperována 20 min. Po ukončení temperace bylo propíchnuto septum pomocí SPME aplikátoru a následně bylo vysunuto vlákno do výšky cca 1 cm nad suspenzí vzorku sladu. Takto byla zahájena mikroextrakce. Doba extrahování a teplota byly zvoleny na základě optimalizace.

Těkavé látky nasorbované na křemenném vlákne (DVB/CAR/PDMS) byly analyzovány na plynovém chromatografu GC 17A ve spojení s hmotnostním spektrometrem QP 5050A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Standardní konfigurace byla vybavena kapilární kolonou DB-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$  film, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), GC-MS převodníkem, elektronovým iontovým zdrojem, kvadrupólovým analyzátozem a elektronovým násobičem.

Nosným plynem bylo helium 5.0 (Linde, Praha, ČR) s lineární rychlostí 30  $\text{cm s}^{-1}$ . Teplota nástřiku byla udržována na 250  $^{\circ}\text{C}$ . Desorpce analytů z vlákna probíhala 1 min při nástřikové teplotě 250  $^{\circ}\text{C}$ , teplota iontového zdroje byla 230  $^{\circ}\text{C}$ . Teplotní program byl následující: 35  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), lineární nárůst na 270  $^{\circ}\text{C}$  (6  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Dávkování vzorku probíhalo při splitovacím poměru 1:6. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu elektronové ionizace při 70 eV v rozsahu skenování 40–400  $m/z$ .

K vyhodnocování dat byla použita datová stanice vybavená programem GCMS Solution 1.20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Tento program umožňuje integraci pík, porovnání hmotnostních spekter v knihovně spekter, porovnání a vyhodnocování chromatogramů.

### Výsledky a diskuse

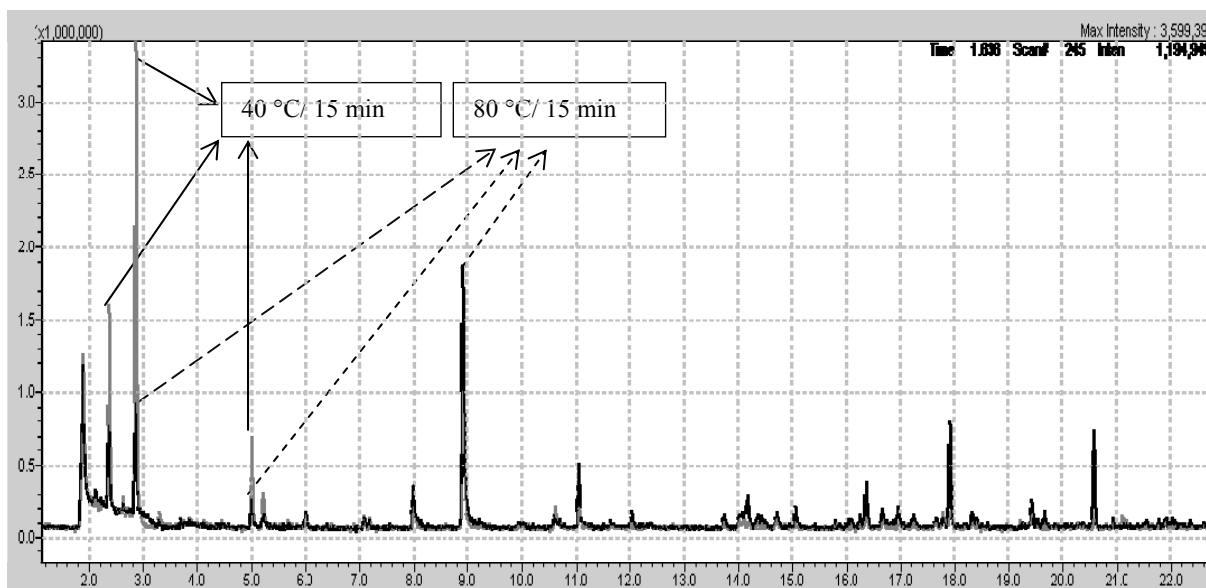
Vliv splitovacího poměru při GC-MS

Splitování je jedna z technik nástřiku, při které dochází k mísení nosného plynu a vzorku v nestejném poměru,

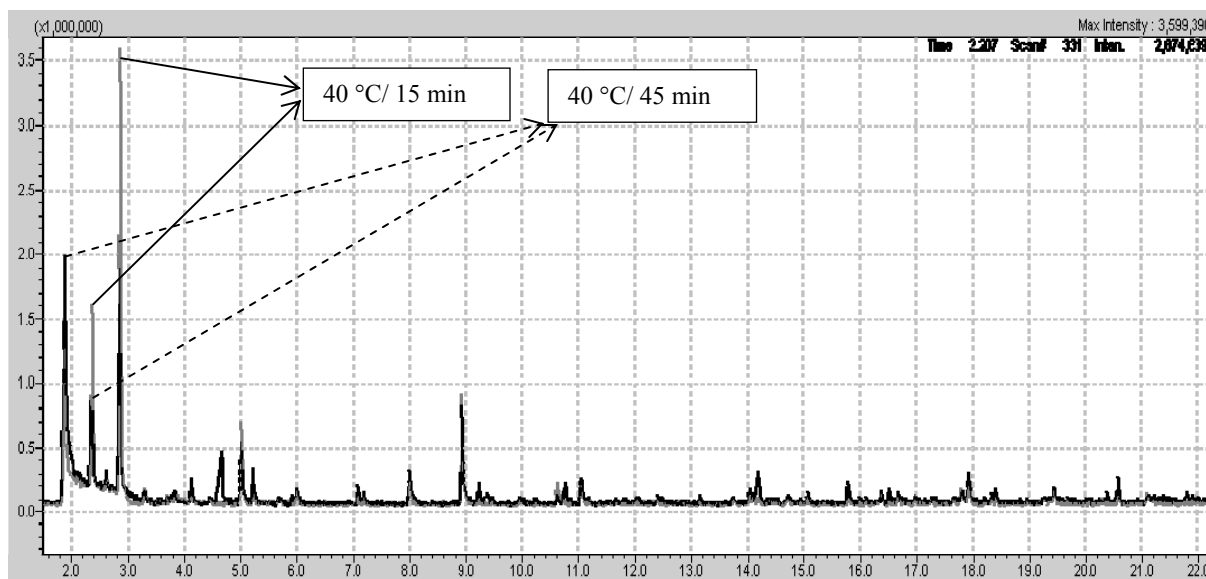
kdy menší část odchází na kolonu a větší mimo kolonu. Přímý nástřik se používá spíše u stopových analýz. Volba tohoto poměru má zásadní vliv na kvalitu odezvy detektoru. Celkem byly při optimalizaci této metody aplikovány 2 poměry, a to nejprve 1:3 a poté 1:6. Při splitovacím poměru 1:3 došlo k tomu, že velikost intenzivnějších pík byla příliš velká, a hrozilo tak přepálení žhavicího vlákna v MS detektoru. Toto riziko bylo eliminováno zvýšením poměru na 1:6. Při tomto poměru byla současně zachována dostatečná citlivost metody i pro analýzu méně koncentrovaných složek.

### Vliv teploty a doby extrakce

Vysoká teplota poskytuje dostatek energie pro překonání energetické bariéry, kterou jsou těkavé látky zadržovány v matrici. Dále má vliv na zvýšení tenze par, což je důležité pro proces převodu hmoty. Celé to znamená, že dochází ke snadnějšímu uvolnění těkavých látek do volného prostoru<sup>4</sup>. Rozdíly v účincích teploty a doby sorpce jsou patrné na chromatogramech sorpce při teplotě 40 a 80 °C po dobu 15 min (obr. 1). Z chromatogramu těkavých látek ječného sladu je patrné, že teplota sorpce 40 °C je vhodnější pro látky s kratším retenčním časem, kdy je odezva detektoru vyšší v porovnání s látkami eluovanými později,



Obr. 1. Chromatogramy sladu při teplotě extrakce 40 a 80 °C, doba sorpce 15 min



Obr. 2. Chromatogramy sladu při teplotě extrakce 40 °C a době sorpce 15 a 45 min

kterým naopak vyhovuje extrakční teplota 80 °C. Teplota má tedy značný vliv na detekci těkavých analytů ve vzorcích sladu.

Dobu extrakce a její účinky na detekci těkavých látek sladu charakterizuje chromatogram na obr. 2, kdy měření probíhalo po extrakci při teplotě 40 °C a dvou různých dobách trvání HS-SPME (15 a 45 min). Chromatogram ukazuje, že doba sorpce má podobný dopad jako teplota, kdy dříve eluované látky po kratší sorpci (15 min) poskytují větší odezvu, zatímco po delší sorpci (45 min) poskytují odezvu méně intenzivní. Avšak u většiny látek zadržovaných na koloně déle je tomu naopak.

#### Vliv přidavku soli

Jednou z možností, jak zvýšit množství extrahované látky, je přidavek NaCl. Tímto přidavkem vzroste iontová síla roztoku, a tím se sníží rozpustnost některých látek přítomných ve vzorku a urychlí se jejich přenos k SPME vláknu. Tohoto jevu se využívá zejména u polárních a těkavých látek<sup>5</sup>. Jak přidavek soli ovlivňuje analýzu, lze pozorovat na chromatogramech extraktů, které byly získány extrakcí při stejné teplotě (40 °C) a po stejnou dobu (15 min), avšak za přidavku roztoku NaCl o koncentracích 10 a 30 g/100 ml. Na obr. 3 lze pozorovat, jak vyšší koncentrace soli zvýšila odezvu analytů, a to až dvojnásobně.

#### Optimalizace podmínek extrakce dle principů plánování experimentu

Optimalizace teploty, doby extrakce a přidavku soli probíhala dle následující tabulky (tab. I) vypracované ve statistickém programu STATISTICA 12, a to dle principů centrálně kompozitního plánování experimentu (Central

Composite Design). V tomto návrhu představují pokusy 1–4 a 7–10 body faktorového plánu, pokusy 13–18 body hvězdicovitého plánu a body s označením (C) opakování ve středu.

Na základě vyhodnocení celkové odezvy plochy byly jako vhodné zvoleny podmínky: teplota 70 °C, doba extrakce 40 min a koncentrace NaCl 35 g/100 ml. Vztah mezi odezvou detektoru a extrakčními podmínkami by bylo možné popsat rovnicí (1). Tučně zvýrazněné parametry byly vyhodnoceny jako statisticky významné na hladině významnosti  $p = 0,05$ .

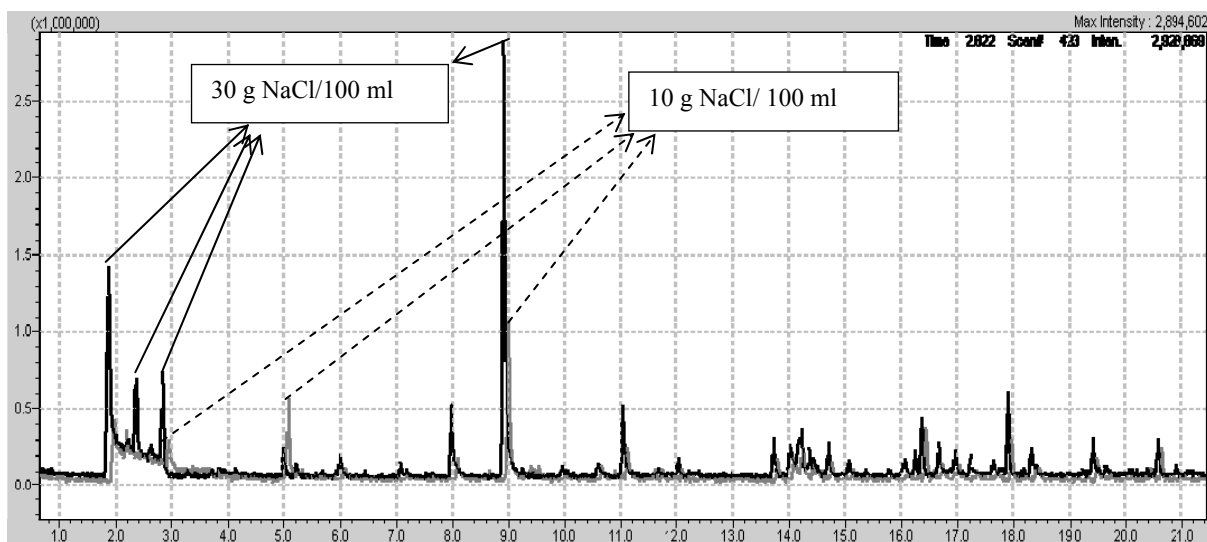
$$Y = 5846915 - 434723 x_1 - 727747 x_1^2 + 346243 x_2 - 1320915 x_2^2 + 2243649 x_3 + 2862044 x_3^2 - 3276616 x_1 x_2 + 648124 x_1 x_3 + 2755163 x_2 x_3 \quad (1)$$

kde  $Y$  je celková odezva,  $x_1$  teplota extrakce (°C),  $x_2$  doba extrakce (min) a  $x_3$  koncentrace roztoku NaCl (g/100 ml).

#### Závěr

Optimalizace stanovení těkavých látek ve vzorcích sladu metodou HS-SPME s následnou GC separací a MS detekcí ukázala, jak značný vliv mají podmínky extrakce a splitovací poměr na separaci a detekci analytů.

Vyšší teploty při extrakci napomáhají k uvolnění těkavých látek, to ovšem neplatí obecně. Při optimalizaci se ukázalo, že vyšší teplota zlepšuje odezvu v případě déle zadržovaných látek, zatímco teplota nižší zase v případě látek dříve eluovaných z kolony. Obdobně to platí pro dobu extrakce.



Obr. 3. Chromatogramy sladu pro extrakce s přidavkem NaCl (10 a 30 g/100 ml)

Tabulka I  
Experimentální matice CCD návrhu optimalizace podmínek SPME

Pokus	Teplota [°C]	Čas [min]	NaCl [g/100 ml]	Pokus	Teplota [°C]	Čas [min]	NaCl [g/100 ml]
1	40,0	15,0	10,0	11 (C)	60,0	30,0	20,0
2	40,0	45,0	30,0	12 (C)	60,0	30,0	20,0
3	80,0	15,0	30,0	13	27,3	30,0	20,0
4	80,0	45,0	10,0	14	92,7	30,0	20,0
5 (C)	60,0	30,0	20,0	15	60,0	5,5	20,0
6 (C)	60,0	30,0	20,0	16	60,0	54,5	20,0
7	40,0	15,0	30,0	17	60,0	30,0	3,7
8	40,0	45,0	10,0	18	60,0	30,0	36,3
9	80,0	15,0	10,0	19 (C)	60,0	30,0	20,0
10	80,0	45,0	30,0	20 (C)	60,0	30,0	20,0

Přídavek roztoku soli pro zvýšení množství extrahované látky se ukázal být přínosným. Optimalizací se dále potvrdilo, že přídavek soli má také značný vliv na odezvu. Jako optimální se ukázala koncentrace 35 g NaCl na 100 ml roztoku, jehož přídavek měl na intenzitu signálu pozitivní vliv.

Jako vhodný splitovací poměr byl zvolen poměr 1:6, při kterém odezva byla dostačující a při němž zároveň nehrozilo poškození citlivých částí detektoru.

#### LITERATURA

1. Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.: *Pivovarnictví, teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT Praha, Praha 2010.
2. Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M. (ed.): *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. KEY Publishing, Ostrava 2009.
3. Klimánková E., Holadová K., Hajšlová J., Čajka T., Poustka J., Koudela M.: *Food Chem.* 107, 464 (2008).
4. Ma Q. L., Hamid N., Bekhit A. E. D., Robertson J., Law T. F.: *Microchem. J.* 111, 16 (2013).
5. Peñalver A., Pcurull E., Borrull F., Marcé R. M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 18, 557 (1999).

# JEDNODUCHÝ ELEKTROCHEMICKÝ BIOSENZOR PRO KOMPLEXNÍ DETEKCI POŠKOZENÍ DNA CHEMICKÝMI KARCINOGENY

MARTA BLAŠKOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Univerzitní výzkumné centrum UNCE „Supramolekulární chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2  
vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

## Úvod

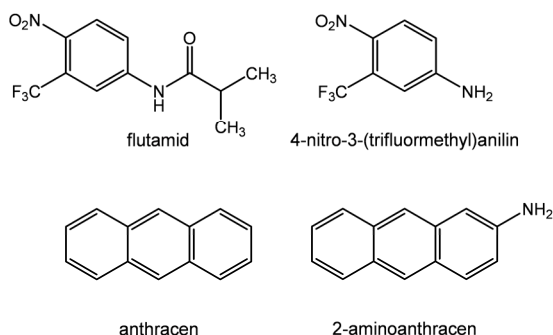
Tato práce se zabývá přípravou jednoduchého DNA biosenzoru<sup>1</sup> na bázi elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA a aplikací tohoto biosenzoru jako rychlého a levného nástroje<sup>2–5</sup> pro detekci poškození DNA způsobeného různými chemickými karcinogeny. Byl pozorován vliv čtyř látek na poškození DNA: flutamidu – protinádorového léčiva na léčbu rakoviny prostaty<sup>6</sup>, jeho metabolitu 4-nitro-3-(trifluormethyl)anilinu<sup>6</sup> (NTMA), vybraného zástupce polycyklických aromatických uhlovodíků anthracenu<sup>7</sup> a jeho aminoderivátu 2-aminoanthracenu<sup>8</sup> (obr. 1).

Pro optimalizaci přípravy biosenzoru byly použity tři elektrochemické techniky: cyklická voltametrie (CV), square-wave voltametrie (SWV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS). Pro detekci poškození DNA byly používány už pouze SWV a EIS kvůli vyšší citlivosti těchto technik<sup>9,10</sup>.

## Experimentální část

### Reagencie

Octanový pufr (AcB) o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup> a pH 4,8 byl připraven jako roztok 0,1 mol l<sup>-1</sup> octové kyseliny



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných sloučenin

(80%, čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a 0,1 mol l<sup>-1</sup> octanu sodného trihydrátu (čistota p.a., Lach-Ner, ČR). Fosforečnanový pufr (PB) o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup> a pH 7,0 byl připraven jako roztok hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (čistota 98,5 %, Lach-Ner, ČR) a dihydrogenfosforečnanu sodného monohydrátu (čistota > 98 %, Sigma-Aldrich, USA). Pro přípravu pufrů byla použita deionizovaná voda (produkovaná systémem Millipore Milli-Q Plus, Millipore, USA). Zásobní roztoky flutamidu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>; čistota p.a.), NTMA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>; čistota 98 %), anthracenu ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup>; čistota  $\geq 99,0$  %) a 2-aminoanthracenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>; čistota 96 %) (vše Sigma-Aldrich, USA) byly připraveny v PB a uchovávány ve tmě za laboratorní teploty. Redoxním indikátorem (Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>) byla ekvimolární směs hexakyno-železnatanu draselného trihydrátu a hexakyno-železitanu draselného (oba čistota 99 %, Lachema, ČR) o koncentraci 1·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> v PB. Zásobní roztok DNA o koncentraci 10 mg ml<sup>-1</sup> byl připraven v PB rozpuštěním nízkomolekulární DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich, USA) a skladován v mrazicím boxu při teplotě -4 °C.

### Aparatura

Techniky CV, SWV a EIS byly měřeny přístrojem  $\mu$ Autolab III/FRA2 (Eco Chemie, Nizozemsko), při měření CV a SWV byl použit software GPES (General Purpose Electrochemical System), verze 4.9, a při měření EIS byl použit software FRA (Frequency Response Analysis), verze 4.9. Přístroj byl řízen osobním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP Professional. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2007. Všechna elektrochemická měření probíhala v tříelektrodovém zapojení sestávajícím z argentchloridové referenční elektrody typu RAE 113 (3 mol l<sup>-1</sup> KCl), platinové pomocné elektrody typu PPE (obě Monokrystal, Turnov, ČR) a pracovní elektrody ze skelného uhlíku (GCE) typu 6.1204.110, s průměrem uhlíkového disku 2,0 mm (Metrohm, Švýcarsko). Pro akumulaci DNA na povrch elektrody byl použit Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR) se softwarem Polar Pro, verze 5.1.

### Pracovní postupy

CV byla měřena v 10 ml redoxního indikátoru Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>) v PB, zaznamenány byly tři skeny v potenciálovém rozmezí -400 až 800 mV při polarizační rychlosti 50 mV s<sup>-1</sup> a s potenciálovým krokem 5 mV. SWV byla měřena v 10 ml AcB s následujícími parametry: potenciálové rozmezí 0 až 1600 mV, potenciálová amplituda 40 mV, frekvence 200 Hz, polarizační rychlost 3000 mV s<sup>-1</sup>, potenciálový krok 15 mV. EIS byla měřena v 10 ml redoxního indikátoru Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>)



v PB při polarizačním potenciálu 208 mV, který odpovídá formálnímu redoxnímu potenciálu použitého indikátoru, a s potenciálovou amplitudou 10 mV. Rozsah měřených frekvencí byl 0,1 až 5000 Hz (měřeno 51 bodů).

DNA byla na povrch pracovní elektrody akumulována z roztoku vzniklého doplněním 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku DNA ( $\gamma = 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) v PB do 10 ml roztokem AcB nebo PB. Roztok byl během akumulace míchán a na elektrodu byl vkládán akumulační potenciál. Inkubace elektrody modifikované vrstvou DNA (DNA/GCE) probíhala v zásobních roztocích studovaných látek v PB po dobu 5 min. Roztoky byly během inkubace míchány. Po použití biosenzoru byla DNA z elektrody odstraňována mechanicky, otřením jejího povrchu o sametovou podložku potřebovanou suspenzí aluminu (velikost částic 1,1  $\mu\text{m}$ ) ve vodě. Příprava dalšího nového biosenzoru pak započala s takto předupravenou elektrodou.

## Výsledky a diskuse

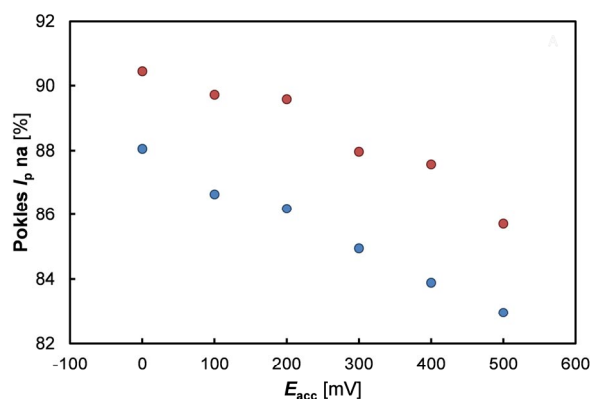
### Optimalizace přípravy a charakterizace DNA biosenzoru

Nejprve byl hledán vhodný způsob imobilizace DNA na povrch pracovní elektrody, aby byla příprava biosenzoru co nejjednodušší, časově nenáročná a probíhala s dobře opakovatelným a spolehlivým výsledkem. Prvním zkoumaným způsobem přípravy biosenzoru byla samovolná adsorpce DNA ze zásobního roztoku naneseného na povrch GCE<sup>11</sup>. 10  $\mu\text{l}$  roztoku DNA ( $\gamma = 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) v PB bylo shora nanášeno na povrch pracovní elektrody automatickou pipetou a necháno zaschnout na vzduchu. Schnutí probíhalo 1 h, 2 h a přes noc. Pokles výšky anodického ( $I_{p,a}$ ) a katodického ( $I_{p,k}$ ) píku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  a nárůst odporu přenosu náboje ( $R_{ct}$ ) mezi redoxním indikátorem  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  a pracovní elektrodou byly pro jednotlivé doby schnutí měřeny pomocí CV a EIS a byly porovnávány hodnoty naměřené na GCE a DNA/GCE, přičemž hodnoty naměřené na GCE byly brány jako 100 %. Výsledky jsou uvedeny v tab. I a je z nich patrné, že tento způsob imobilizace DNA vykazuje pouze malou změnu chování pracovní elektrody před a po modifikaci jejího povrchu vrstvou DNA (výraznější změny je možné pozorovat pouze při měřeních technikou EIS).

Jako další způsob imobilizace DNA na povrch elektrody byla testována potenciostatická akumulace<sup>1</sup>. Akumu-

lace byla prováděna z prostředí AcB i PB. 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku DNA ( $\gamma = 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) v PB bylo doplněno do 10 ml příslušným pufrem a na elektrodu byl vkládán akumulační potenciál ( $E_{acc}$ ) o hodnotách 0, 100, 200, 300, 400 nebo 500 mV, vždy po dobu 15 min. Naměřené poklesy hodnot  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  pro akumulaci DNA z PB jsou zobrazeny na obr. 2.

Po těchto měřeních byly zvoleny optimální pracovní podmínky. Jako vhodnější způsob imobilizace DNA na elektrodu byla vybrána potenciostatická akumulace z roztoku. Poklesy  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  byly mírně větší než při použití samovolné adsorpce DNA (obr. 2 a tab. I) a akumulací DNA z roztoku se rovněž podstatně zkrátil čas přípravy biosenzoru. Jako vhodnější prostředí pro akumulaci DNA se jeví PB, ve kterém naměřené hodnoty  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$  vykazují v závislosti na použitém  $E_{acc}$  (od 0 do 500 mV) monotónní sestupný trend (obr. 2) a ve kterém byl také pozorován menší rozptyl hodnot při měření technikou EIS (v závislosti na použitém  $E_{acc}$  byl pozorován monotónní nárůst hodnoty  $R_{ct}$  od 400 do 600 %). Jako optimální hodnota potenciálu akumulace DNA byla zvolena hodnota 500 mV, při které byl pokles  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$  největší (obr. 2), stejně tak jako nárůst  $R_{ct}$ .



Obr. 2. Závislost poklesu výšky píku ( $I_p$ ) redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  na hodnotě použitého potenciálu akumulace DNA ( $E_{acc}$ ); měřeno na DNA/GCE technikou CV pomocí redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) v PB; akumulace DNA byla prováděna 15 min z roztoku DNA ( $\gamma = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) v PB; pokles  $I_{p,a}$  (modré body) a  $I_{p,k}$  (červené body) redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  (hodnoty  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$  naměřené na GCE za stejných podmínek byly brány jako 100 %)

Tabulka I

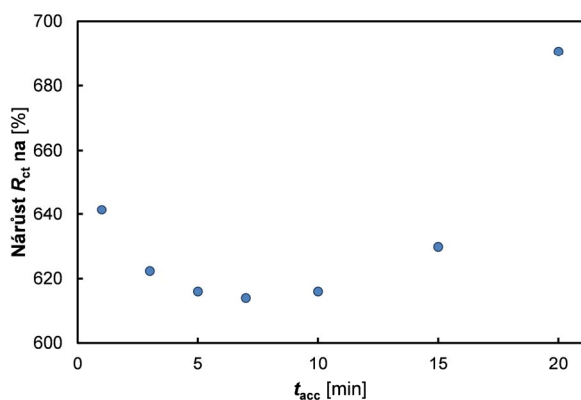
Porovnání výsledků samovolné adsorpce DNA; na povrch GCE nanášeno 10  $\mu\text{l}$  roztoku DNA ( $\gamma = 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) v PB a ponecháno zaschnout na vzduchu; měřeno technikami CV a EIS pomocí redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) v PB

Doba schnutí	Pokles $I_{p,a}$ na [%]	Pokles $I_{p,k}$ na [%]	Nárůst $R_{ct}$ na [%]
1 h	88	92	540
2 h	87	91	730
Přes noc	90	89	940



Při těchto podmínkách byl dále pozorován vliv doby akumulace DNA ( $t_{acc}$ ). DNA byla akumulována po dobu 1, 3, 5, 7, 10, 15 nebo 20 min a měření byla prováděna technikami CV a EIS (obr. 3) v prostředí redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  a technikou SWV v prostředí AcB (měřeny výšky píků guanosinu ( $I_{p,G}$ ) a adenosinu ( $I_{p,A}$ ) přítomných ve struktuře DNA na povrchu DNA/GCE). Při měřeních CV a EIS se jeví jako optimální čas akumulace DNA 10 min.  $I_{p,a}$  klesne na 83 %,  $I_{p,k}$  klesne na 85 % a  $R_{ct}$  vzroste na 616 % (obr. 3). Prodloužením doby akumulace na 15 min se získají hodnoty poklesu  $I_{p,a}$  na 83 %,  $I_{p,k}$  na 86 % (obr. 2) a nárůstu  $R_{ct}$  na 630 % (obr. 3). Toto zlepšení nárůstu  $R_{ct}$  je však tak malé, že nevyváží prodloužení celé procedury přípravy biosenzoru. Podobně i při měřeních technikou SWV nemá delší doba akumulace velký vliv na výsledné odezvy biosenzoru (v rozmezí studovaných časů akumulace DNA od 1 do 20 min se hodnoty  $I_{p,G}$  pohybovaly mezi 1,5 a 2  $\mu A$  a hodnoty  $I_{p,A}$  v rozmezí 4 až 5  $\mu A$ ). Jako optimální byl tedy zvolen čas akumulace 10 min pro všechny použité elektrochemické techniky.

Při zvolených optimálních parametrech  $E_{acc} = 500$  mV a  $t_{acc} = 10$  min byla testována opakovatelnost odezvy v rámci jednoho připraveného DNA biosenzoru (technikami CV a EIS) a v rámci sady připravených DNA biosenzorů (technikou SWV, kterou lze použít na jednom biosenzoru pouze jedenkrát, protože elektrochemicky zoxidované guanosinové a adenosinové jednotky přítomné ve struktuře imobilizované DNA již neposkytují při opakovaných měřeních voltametrické píky<sup>1</sup>). Pro všechny techniky bylo měření opakováno desetkrát. Při CV se dosáhlo relativní směrodatné odchylky 0,85 % pro  $I_{p,a}$  a 0,79 % pro  $I_{p,k}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$ . Při měření technikou EIS byla relativní směrodatná odchylka  $R_{ct}$  rovna 8,5 %. Při SWV se relativní směrodatná odchylka rovnala 3,8 % (pro



Obr. 3. Závislost nárůstu odporu přenosu náboje ( $R_{ct}$ ) mezi redoxním indikátorem  $Fe^{II}/Fe^{III}$  a pracovní elektrodou na hodnotě doby akumulace DNA ( $t_{acc}$ ); měřeno na DNA/GCE technikou EIS pomocí redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ ) v PB; akumulace DNA byla prováděna při potenciálu akumulace 500 mV z roztoku DNA ( $\gamma = 0,1$  mg  $ml^{-1}$ ) v PB (hodnoty  $R_{ct}$  naměřené na GCE za stejných podmínek byly brány jako 100 %)

$I_{p,G}$  při potenciálu 1,1 V) a 3,5 % (pro  $I_{p,A}$  při potenciálu 1,4 V). U všech použitých technik se relativní směrodatná odchylka pohybuje pod hodnotou 10 %, což svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření i opakovatelnosti přípravy biosenzoru.

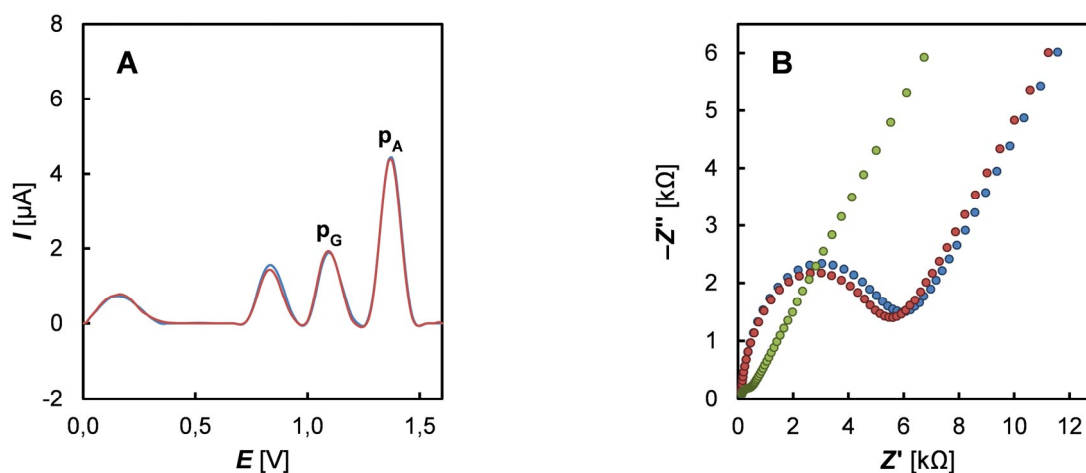
#### Zjišťování poškození DNA chemickými karcinogeny

SW voltamogramy (obr. 4A) byly naměřeny v AcB nejprve na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (obr. 4A, modrá křivka), a poté v AcB na nově připravené DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  flutamidu v PB (obr. 4A, červená křivka). Ze získaných záznamů je patrné, že při interakci flutamidu s DNA nedochází k pozorovatelnému poškození DNA, protože nedochází k poklesu hodnot  $I_{p,G}$  ani  $I_{p,A}$ . Měření technikou EIS (obr. 4B) se provádělo v roztoku redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  na nemodifikované elektrodě (obr. 4B, zelené body), na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (obr. 4B, modré body), a na stejné DNA/GCE, která byla následně 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  flutamidu v PB (obr. 4B, červené body). Při zkoumání vlivu interakce flutamidu s DNA technikou EIS došlo k malému, statisticky nevýznamnému snížení hodnoty  $R_{ct}$  na elektrodě modifikované vrstvou DNA po inkubaci v roztoku flutamidu, což může být způsobeno jistým druhem interakce DNA s flutamidem<sup>12</sup>, ale nikoliv degradací DNA, kterou nepotvrdila měření za použití SWV<sup>1</sup>.

Odborný postup, jaký byl proveden při výzkumu vzájemné interakce flutamidu s DNA, byl použit i pro výzkum poškozujících interakcí dalších tří vybraných látek – NTMA, anthracenu a 2-aminoanthracenu. V případě NTMA se ukázalo, že po pětiminutové inkubaci DNA biosenzoru v roztoku  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  NTMA v PB nedochází k poškození DNA, protože stejně jako v případě flutamidu nebyl při použití SWV pozorován výrazný pokles  $I_{p,G}$  ani  $I_{p,A}$ . Při měřeních technikou EIS rovněž nedošlo ke statisticky významné změně chování po inkubaci biosenzoru v nepřítomnosti a v přítomnosti NTMA. Můžeme tedy usuzovat, že mezi NTMA a DNA nedochází k poškozující interakci.

Rozdílné výsledky při detekci poškození DNA byly získány v případě anthracenu a 2-aminoanthracenu. Naměřené SW voltamogramy ukazují (po pětiminutové inkubaci DNA biosenzoru v roztoku  $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $l^{-1}$  anthracenu v PB) pokles  $I_{p,G}$  z 2,55 na 2,27  $\mu A$  (pokles o 11 %) a pokles  $I_{p,A}$  z 5,07 na 3,73  $\mu A$  (pokles o 26 %), což svědčí o poškození DNA. Měření technikou EIS indikovalo malý pokles  $R_{ct}$  z 6,32 na 5,85 k $\Omega$ , tedy o 7,4 % (zde uvedené hodnoty  $R_{ct}$  představují výsledky korigované na hodnotu  $R_{ct}$  změřenou na nemodifikované GCE). Z těchto výsledků lze usuzovat, že anthracen interkaluje do dvouvláknové struktury DNA<sup>12</sup>, což má za následek narušení její nativní konformace a tvorbu jednořetězcových zlomů, které odpadávají z povrchu elektrody.

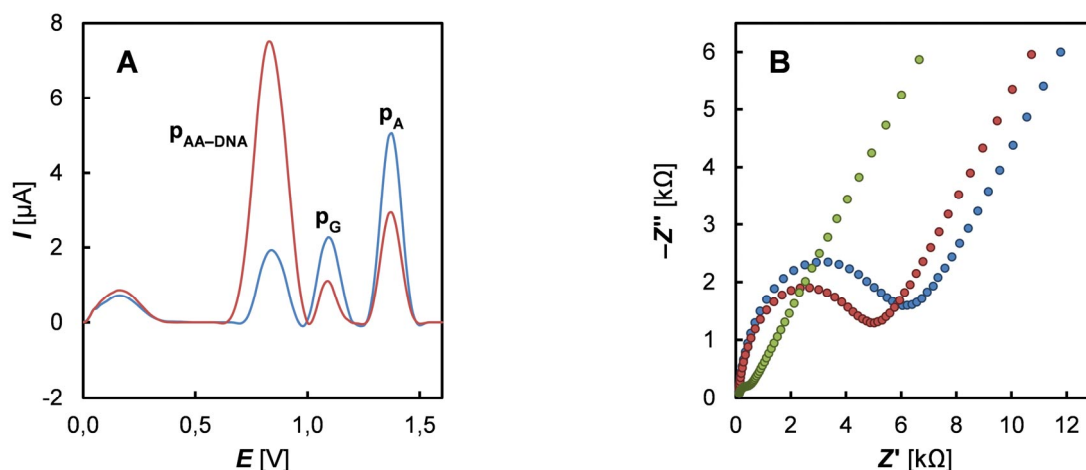
Na SW voltamogramech získaných při výzkumu vzájemné interakce 2-aminoanthracenu s DNA (obr. 5A) je viditelný pokles  $I_{p,G}$  z 2,36 na 0,883  $\mu A$ , tedy o 63 %. Hod-



Obr. 4. (A) SW voltamogramy získané v AcB na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (modrá křivka), a na nově připravené DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  flutamidu v PB (červená křivka); voltamogramy jsou korigovány na základní linii; píky  $p_G$  a  $p_A$  odpovídají oxidaci guanosinových a adenosinových jednotek přítomných ve struktuře imobilizované DNA. (B) Nyquistovy grafy získané v roztoku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) v PB na GCE (zelené body), na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (modré body), a na stejné DNA/GCE, která byla následně 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  flutamidu v PB (červené body)

nota  $I_{p,A}$  klesla z 5,13 na 2,28  $\mu\text{A}$ , tedy o 56 %. Tyto poklesy poukazují na poškození DNA. Na voltamogramu zaznamenaném po pětiminutové inkubaci DNA biosenzoru v roztoku  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-aminoanthracenu v PB (obr. 5A, červená křivka) je navíc patrný nový pík při potenciálu 0,8 V, který odpovídá oxidaci vzniklého interkalačního komplexu 2-aminoanthracenu–DNA. Je zřejmé, že interkalace 2-aminoanthracenu do dvouvláknové struktury DNA

způsobuje vznik stabilního komplexu, poněvadž tato interakce není narušena ani důkladným oplachem povrchu biosenzoru roztokem PB, který byl prováděn vždy bezprostředně po inkubaci. Měření elektrochemických impedančních spekter (obr. 5B) navíc ukázalo viditelný pokles hodnoty  $R_{ct}$  z 5,49 na 4,46  $\text{k}\Omega$  (pokles o 19 %; výsledky opět korigovány na hodnotu  $R_{ct}$  změřenou na nemodifikované GCE), který koresponduje s výsledky zjištěnými pomocí



Obr. 5 (A) SW voltamogramy získané v AcB na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (modrá křivka), a na nově připravené DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-aminoanthracenu v PB (červená křivka); voltamogramy jsou korigovány na základní linii; píky  $p_G$  a  $p_A$  odpovídají oxidaci guanosinových a adenosinových jednotek přítomných ve struktuře imobilizované DNA, píky  $p_{AA-DNA}$  odpovídá oxidaci interkalačního komplexu 2-aminoanthracenu–DNA. (B) Nyquistovy grafy získané v roztoku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) v PB na GCE (zelené body), na DNA/GCE, která byla 5 min inkubována v PB (modré body), a na stejné DNA/GCE, která byla následně 5 min inkubována v roztoku  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-aminoanthracenu v PB (červené body)

SWV. Tím bylo nezávisle potvrzeno, že 2-aminoanthracen interkaluje do molekuly DNA, a způsobuje tak tvorbu jednočetězcových zlomů. Tyto zlomy pak pravděpodobně odpadávají z povrchu elektrody, čímž se zmenšuje podíl odpudivých interakcí mezi záporně nabitou kostrou DNA a anionty  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  a dochází k poklesu měřeného  $R_{ct}$  (cit.<sup>9,10</sup>). Fakt, že zjištěné poškození DNA vlivem přímé interakce s 2-aminoanthracenem je větší než v případě anthracenu, může být způsoben o jeden koncentrační řád vyšší koncentrací 2-aminoanthracenu v inkubačním roztoku (dáno rozdílnou rozpustností těchto dvou látek v PB a cílem použít při studiu poškození DNA co nejvyšších koncentrací studovaných látek v inkubačních roztocích).

## Závěr

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací nového DNA biosenzoru tvořeného elektrodou ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií. Optimalizace přípravy biosenzoru byla sledována pomocí cyklické voltametrie (CV), elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a square-wave voltametrie (SWV). Pro měření CV a EIS byl použit redoxní indikátor  $\text{Fe}^{II}/\text{Fe}^{III}$  (ekvimolární směs  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ). Testován byl především způsob imobilizace DNA na povrch elektrody – vyzkoušena byla samovolná adsorpce DNA zaschnutím zásobního roztoku DNA na povrchu GCE a potenciostatická akumulace DNA na povrchu GCE z roztoku, která byla následně zvolena jako optimální přístup. Dále se hledalo vhodné prostředí, ze kterého DNA akumulovat, a optimální potenciál a doba akumulace. Optimálním prostředím byl zvolen  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnanový pufr o pH 7,0 (PB) a akumulace DNA se prováděla při potenciálu 500 mV po dobu 10 min.

Takto připravovaný biosenzor (DNA/GCE) byl následně použit při detekci poškození DNA způsobeného přímou interakcí s vybranými xenobiotickými organickými látkami. Toto poškození bylo měřeno pomocí SWV a EIS. Protinádorové léčivo flutamid a jeho metabolit 4-nitro-3-(trifluormethyl)anilin (NTMA) neprojevily schopnost poškodit DNA imobilizovanou na povrchu elektrody. U flutamidu ovšem můžeme uvažovat o jisté interakci s DNA, která ale v rámci této práce nebyla podrobněji zkoumána. Polutanty životního prostředí anthracen a 2-aminoanthracen způsobily poškození DNA, které se projevilo poklesy SWV píků guanosinových a adenosinových jednotek přítomných ve struktuře imobilizované DNA a snížením hodnoty odporu vůči přenosu náboje mezi redoxním indikáto-

rem  $\text{Fe}^{II}/\text{Fe}^{III}$  a pracovní elektrodou pozorovaným na spektrech naměřených technikou EIS. Tyto výsledky značí, že anthracen i 2-aminoanthracen interkalují do dvoušroubovice DNA, a tím pravděpodobně způsobují narušení její nativní konformace a vznik jednočetězcových zlomů, které z povrchu elektrody odpadávají.

Předkládaná studie ukazuje, že tento nový elektrochemický DNA biosenzor je možné použít pro snadnou, rychlou a citlivou detekci poškození DNA různými cizorodými látkami. Vzhledem k jeho vlastnostem se tak stává velmi užitečným analytickým nástrojem, např. pro plošný monitoring patogenů v životním prostředí či pro předběžné *in vitro* testy genotoxicity u nově připravených léčiv.

*Na tomto místě bychom rádi poděkovali za finanční podporu Grantové agentury České republiky (projekt GP13-23337P).*

## LITERATURA

- Hájková A., Berek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 27, publikováno elektronicky [DOI: 10.1002/elan.201400427] (2015).
- Vyskočil V., Blašková M., Hájková A., Horáková E., Krejčová Z., Stávková K., Wang J., v knize: *Sensing in Electroanalysis* (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vyřas K., ed.), sv. 7, str. 141. University Press Centre, Pardubice 2012.
- Vacek J., Havran L., Fojta M.: *Chem. Listy* 105, 15 (2011).
- Bartošík M.: *Chem. Listy* 108, 500 (2014).
- Paleček E., Ostatná V., Pečan Z.: *Chem. Listy* 108, 490 (2014).
- Pecková K., Průchová M., Moreira J. C., Berek J., Fischer J., Vyskočil V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 1811 (2011).
- German N., Armalis S.: *Chemija* 23, 86 (2012).
- Vyskočil V., Berek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 3059 (2011).
- Hlavata L., Benikova K., Vyskočil V., Labuda J.: *Electrochim. Acta* 71, 134 (2012).
- Hlavatá L., Vyskočil V., Beniková K., Borbélyová M., Labuda J.: *Cent. Eur. J. Chem.* 12, 604 (2014).
- Pang D.-W., Zhang M., Wang Z.-L., Qi Y.-P., Cheng J. K., Liu Z.-Y.: *J. Electroanal. Chem.* 403, 183 (1996).
- Gebala M., Stoica L., Neugebauer S., Schuhmann W.: *Electroanalysis* 21, 325 (2009).

## PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE VYSOCE ZESÍTĚNÝCH MONOLITICKÝCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍ PRO SEPARACE MALÝCH MOLEKUL

SIMONA JANKŮ, VERONIKA ŠKEŘÍKOVÁ,  
BARBORA HOZNAUEROVÁ a JIŘÍ URBAN

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,  
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10  
Pardubice  
simona.janku@student.upce.cz

### Úvod

Monolitické stacionární fáze jsou tvořeny jedním kusem porézního materiálu, který vyplňuje celý objem chromatografické kolony. Mezi jejich hlavní výhody patří snadná příprava a jednoduchá povrchová modifikace umožňující cílenou přípravu vhodných stacionárních fází pro konkrétní analytický problém<sup>1</sup>.

V posledních letech se pozornost zaměřila na přípravu polymerních monolitických stacionárních fází vhodných pro izokratické separace malých molekul<sup>2</sup>. Jedním z postupů, jak připravit monolitickou fázi vhodnou pro separace malých molekul, je post-polymerační modifikace pomocí tzv. vysokého zesílení povrchu poly(styren-*co*-vinylbenzyl chlorid-*co*-divinylbenzen) polymeru (hypercrosslinking)<sup>3</sup>. Protože divinylbenzen polymeruje rychleji než monofunkční styren a vinylbenzyl chlorid, je povrch monolitu na konci polymerace tvořen zejména polymerními řetězci styrenu a vinylbenzyl chloridu, které bobtnají v termodynamicky dobrém rozpouštědle, jako je například 1,2-dichlorethan. V přítomnosti katalyzátoru (např. FeCl<sub>3</sub>) a při vysoké teplotě můžeme tyto volné řetězce zafixovat

pomocí Friedelovy-Craftsovy alkylace, a vytvořit tak tenkou vrstvu malých pórů vhodnou pro rychlé a účinné separace malých molekul<sup>4-6</sup>.

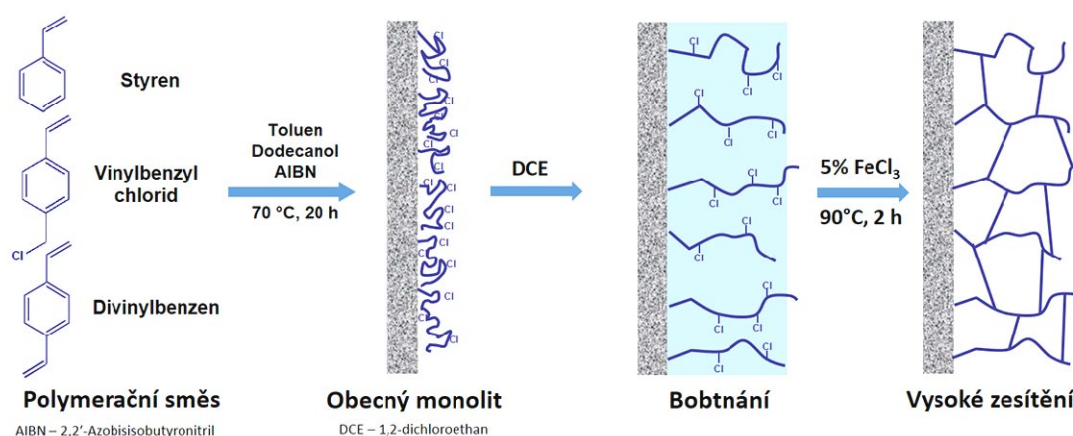
Vzhledem k jejich nízké polaritě jsou tyto monolitické stacionární fáze vhodné zejména pro separace málo polárních látek v systému s obrácenými fázemi. Na druhou stranu ne všechny reaktivní chlormethylové skupiny vinylbenzyl chloridu se účastní post-polymerační modifikace, a lze je proto s výhodou použít pro další modifikační krok.

Cílem této práce bylo změnit polaritu povrchu monolitické stacionární fáze pomocí teplotně iniciované polymerační reakce a připravit monolitickou stacionární fázi vhodnou pro separace polárních látek v systému kapalínové chromatografie hydrofilních interakcí.

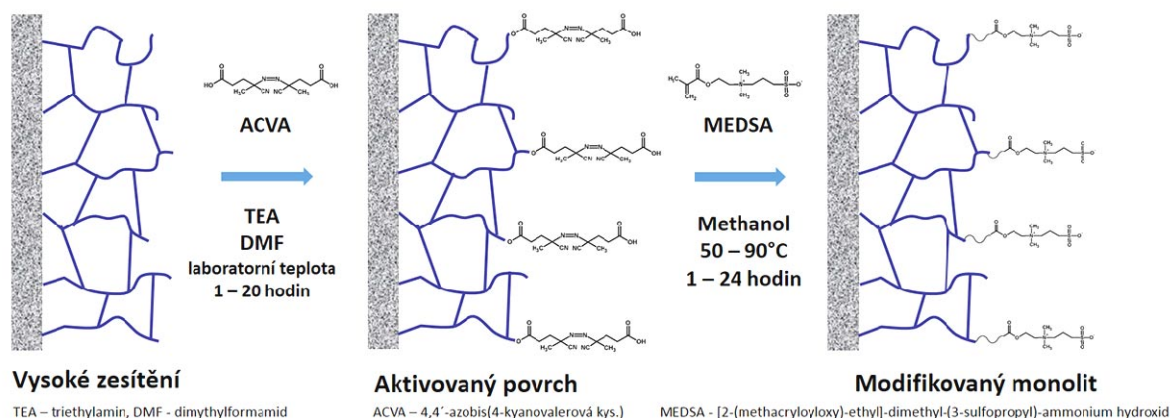
### Experimentální část

Křemenné kapiláry o vnitřním průměru 0,32 mm byly naplněny odvdzdušenou polymerační směsí obsahující 12 % (*m/m*) styrenu, 12 % (*m/m*) vinylbenzyl chloridu, 16 % (*m/m*) divinylbenzenu, 18 % (*m/m*) toluenu, 42 % (*m/m*) 1-dodekanolu a 1 % radikálového iniciátoru azobisisobutyronitrilu (*m/m*, vzhledem k celkovému obsahu monomerů). Oba konce kapiláry byly zaslepeny gumovými septy a radikálová polymerace při 60 °C po dobu 20 h vytvořila monolitickou stacionární fázi uvnitř kapiláry.

Pro přípravu vysoce zesítené (hypercrosslinkované) monolitické stacionární fáze byly kolony nejprve promyty 1,2-dichlorethanem a následně filtrovaným 5% roztokem FeCl<sub>3</sub> v 1,2-dichlorethanu (*m/m*). Vlastní alkylační reakce



Obr. 1. Příprava vysoce zesítené monolitické stacionární fáze



Obr. 2. Modifikace monolitické stacionární fáze vysokým zesíťením povrchu

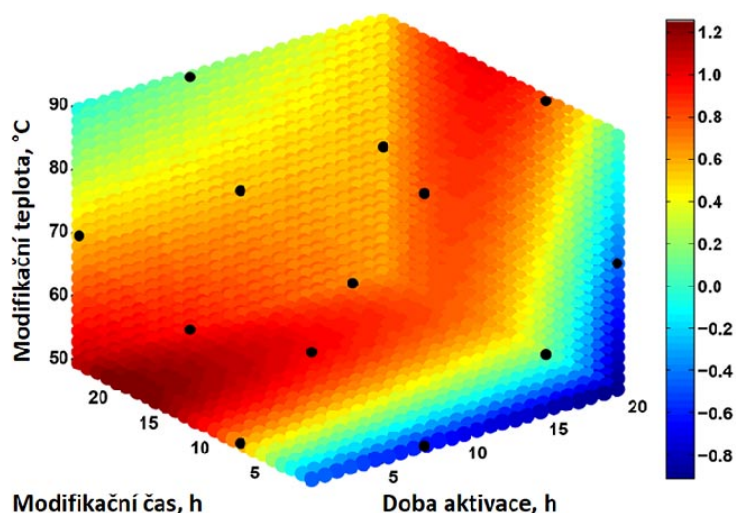
probíhala 2 h při 90 °C. Takto modifikované kolony byly promyty vodou a připraveny pro další povrchovou modifikaci (obr. 1).

Po promytí kolon triethylaminem (TEA) a *N,N*-dimethylformamidem (DMF) v poměru 1:3 byl povrch vysoce zesíťené monolitické stacionární fáze aktivován radikálovým iniciátorem pomocí směsi 4,4'-azobis(4-kyanovalerové) kyseliny, TEA a DMF (1:2:6). Po aktivaci povrchu byl monolit promyt 20% (*m/m*) roztokem zwitteriontového monomeru [2-(methakryloyloxy)-ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidu (MEDSA) v methanolu. Kapilára byla opět uzavřena a povrch mono-

litu byl modifikován teplotně iniciovanou polymerační reakcí (grafting). Schématický postup přípravy vysoce zesíťené stacionární fáze s polárním povrchem ukazuje obr. 2 (cit.<sup>7</sup>).

### Výsledky a diskuse

Povrch vysoce zesíťené monolitické stacionární fáze byl nejprve aktivován pomocí radikálového iniciátoru (4,4'-azobis(4-kyanovalerová) kyselina, ACVA) a následně modifikován zwitteriontovým monomerem ([2-(metha-



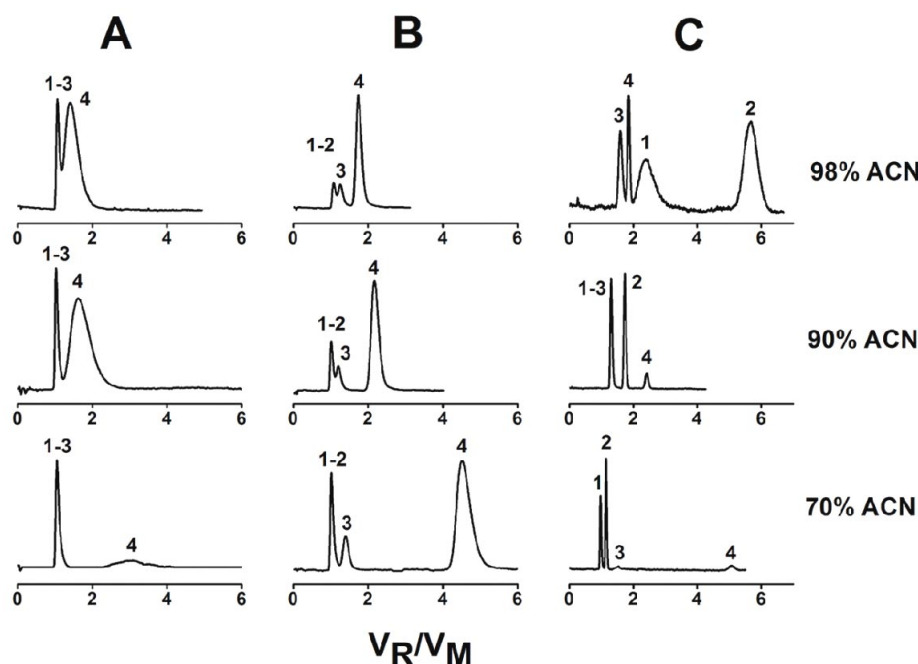
Obr. 3. Grafické znázornění optimalizovaného modelu popisující efekt modifikační reakce na výslednou retenci polárních látek. Černé body vyznačují jednotlivé monolitické kolony připravené pomocí matematického plánování



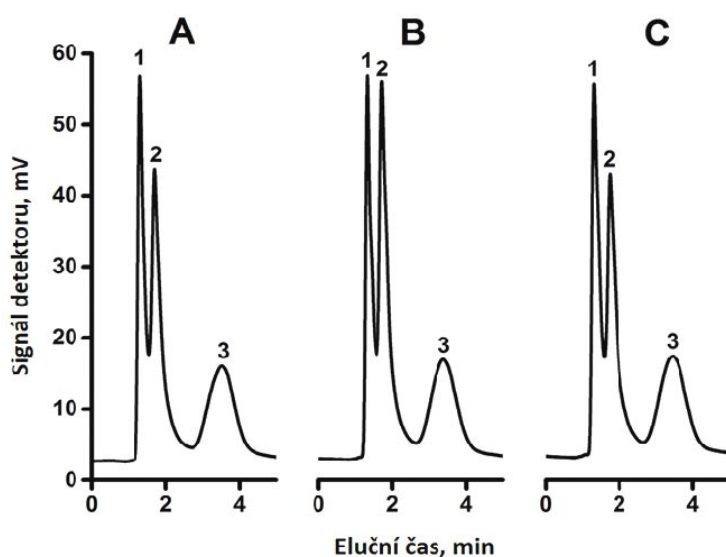
kryloyloxy)-ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidem, MEDSA). Celková účinnost modifikace byla optimalizována z hlediska doby aktivace radikálovým iniciátorem (1, 8 a 20 h), teplotou modifikačního polymeračního kroku (50, 70 a 90 °C) a dobou jeho trvání (1, 8 a 24 h). Všechny ostatní parametry zůstaly konstantní. Jako závislá proměnná byl použit retenční faktor thiomocoviny v 98% acetonitrilu jako mobilní fázi. Kvadratický model pro celkem 15 kolon byl optimalizován v osmi následných krocích, kdy v každém kroku došlo k odstranění faktoru, který byl nejméně statisticky významný.

Jak ukazuje optimalizovaný model (obr. 3), doba aktivace monolitické stacionární fáze radikálovým iniciátorem a teplota následné modifikační polymerace hrají velmi malou roli ve výsledné retenci polárních látek. Nejvýznamněji se na výsledné retenci podílí doba modifikační reakce. Delší reakční čas zvyšuje pokrytí vysoce zesítěné monolitické stacionární fáze zwitteriontovým monomerem, a tedy i výrazně zvyšuje retenci polárních látek v kapalinové chromatografii hydrofilních interakcí. Jako optimální z hlediska retence i časové náročnosti přípravy monolitické kapilární kolony byla vybrána kolona aktivovaná 8 h radikálovým iniciátorem, která byla poté modifikována zwitteriontovým monomerem po dobu 8 h při 70 °C.

Jedním z cílů této práce bylo studium vlivu změny polaroty povrchu monolitické stacionární fáze a následný efekt na separační vlastnosti připravených kapilárních kolon. Připravené monolitické stacionární fáze kombinují silně nepolární kostru monolitu (styren-*co*-vinylbenzyl chlorid-*co*-divinylbenzen polymer) s polární vrstvou zwitteriontového polymeru na povrchu. Takto připravené monolitické stacionární fáze poskytují duální charakter retence, což znamená, že jejich retenční mechanismus se mění v závislosti na složení mobilní fáze. V mobilních fázích s vyšším obsahem vody se látky dělí v systému obrácených fází, zatímco při velmi nízkých koncentracích vodné složky v mobilní fázi dochází k dělení látek na základě hydrofilních interakcí. Tento efekt ilustruje obr. 4, který srovnává separaci čtyř testovacích látek (uracil, thiomocovina, toluen a fenol) na původním monolitu (A), na vysoce zesítěné stacionární fázi (B) a na vysoce zesítěné stacionární fázi modifikované zwitteriontovým monomerem (C). Zatímco na nemonifikované stacionární fázi nedochází k žádnému rozdělení testovacích látek (obr. 4A), modifikace povrchu monolitu pomocí vysokého zesítění umožňuje rozdělit stanovované látky v systému obrácených fází (obr. 4B). Ke kompletní změně separačního procesu dochází až po následné modifikaci zwitteriontovým mono-



Obr. 4. Duální retenční mechanismus na připravených monolitických kapilárních kolonách. (A) Monolitická stacionární fáze připravená jednokrokovou polymerací, (B) vysoce zesítěná monolitická stacionární fáze, (C) monolitická kapilární kolona modifikovaná zwitteriontovým monomerem (obr. 1). Analyzované látky: (1) uracil, (2) thiomocovina, (3) fenol, (4) toluen.  $V_R/V_M$  – normalizovaný eluční objem látek



Obr. 5. **Stabilita připravených kolon.** Analýza č. 1 (A), 5 000 (B) a 10 000 (C) na vysoce zesítné monolitické stacionární fázi modifikované zwitteriontovým monomerem. Analyzované látky: (1) fenol, (2) toluen, (3) thiomocovina. Mobilní fáze: 98% acetonitril, průtok mobilní fáze  $10 \mu\text{l min}^{-1}$ , tlak 4,3 MPa, UV detekce při 214 nm, délka kolony 155 mm

merem (obr. 4C), kdy stacionární fáze poskytuje duální separační mechanismus kombinující systém s obrácenými fázemi v 70% acetonitrilu a separaci na základě hydrofilních interakcí v 98% acetonitrilu jako mobilní fázi.

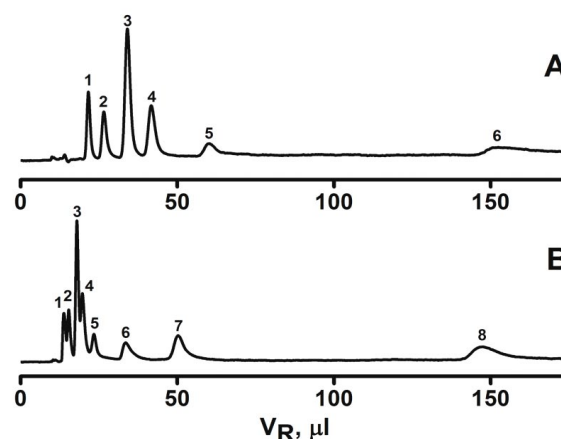
Důležitou charakteristikou při přípravě kolon s víceřadovou modifikací je stabilita povrchové modifikace. Proto jsme sledovali stabilitu modifikačního polymeračního kroku pomocí opakované analýzy tří testovacích látek (fenol, toluen, thiomocovina) v systému hydrofilních interakcí.

Jak ukazuje obr. 5, kapilární kolona neztratila separační schopnosti ani po 10 000 analýzách, což potvrzuje vysokou stabilitu připravených monolitických kapilárních kolon.

Optimalizovaná kolona byla také použita pro izokratickou separaci fenolických kyselin. Obr. 6 demonstruje vliv koncentrace pufru v mobilní fázi na jejich retenci. Snížení obsahu pufru vedlo podle očekávání ke zvýšení retence fenolických kyselin.

## Závěr

Hlavním cílem této práce bylo připravit a charakterizovat monolitické kapilární kolony vhodné pro izokratické separace malých polárních látek. Pomocí post-polymerační povrchové modifikace vysokého zesítní jsme připravili kolony vhodné pro separace malých molekul v systému obrácených fází. Povrch těchto monolitických stacionárních fází jsme dále modifikovali zwitteriontovým monomerem, čímž jsme změnili polaritu povrchu monolitu



Obr. 6. **Izokratická separace polárních látek na koloně modifikované zwitteriontovým monomerem.** Mobilní fáze:  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  vodný octan amonný okyselený kyselinou mravenčí a  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  octan amonný v acetonitrilu. Koncentrace pufrvaného acetonitrilu: 95 % (A) a 90 % (B), průtok mobilní fáze:  $8,1 \mu\text{l min}^{-1}$  (A) a  $7,3 \mu\text{l min}^{-1}$  (B), délka kolony 279 mm, UV detekce při 200 nm. Analyzované látky: (1) sinapová kyselina, (2) ferulová kyselina, (3) syringová kyselina, (4) vanilová kyselina, (5) *p*-hydroxybenzoová kyselina, (6) kávová kyselina, (7) protokatechová kyselina, (8) gallová kyselina.  $V_R$  – eluční objem jednotlivých látek

a připravili monolitické kapilární kolony vhodné pro separace polárních látek v systému hydrofilních interakcí. Modifikační reakce byla optimalizována pomocí matematické



ho plánování a byl vyvinut model popisující efekt jednotlivých modifikačních kroků na výslednou retenci polárních látek.

Optimalizovaná kolona byla použita pro izokratické separace polárních fenolických kyselin a vykazovala bezprecedentní stabilitu, zachovávající si separační vlastnosti i po více než 10 000 analýzách.

*Práce byla realizována díky finanční podpoře Grantové agentury České republiky (projekt P206/12/P049).*

#### LITERATURA

1. Urban J., Jandera P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2123 (2013).
2. Svec F.: *J. Chromatogr. A* 1128, 250 (2012).
3. Davankov V. A., Tsyurupa M. P.: *React. Polym.* 13, 27 (1990).
4. Urban J., Svec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 82, 1621 (2010).
5. Urban J., Svec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 1217, 8212 (2010).
6. Teisseyre T., Urban J., Halpern-Manners N., Chambers S., Bajaj V., Svec F., Pines A.: *Anal. Chem.* 83, 6004 (2011).
7. Škeříková V., Urban J.: *J. Sep. Sci.* 36, 2806 (2013).

## ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ KAPSAICINU POMOCÍ UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY

KATEŘINA KOLESÍKOVÁ a TOMÁŠ MIKYSEK

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,  
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10  
Pardubice  
tomas.mikysek@upce.cz

### Úvod

Pálivé papriky a chilli papričky, patřící do rodu *Capsicum*, patří mezi jedny z nejoblíbenějších chuťových přísad široce rozšířených v mnoha částech světa. Oblíbené jsou zvláště pro svou ostrou chuť, aroma a barvu. Palčivá chuť je způsobena skupinou alkaloidů zvaných kapsaicinoidy. Tyto rostlinné alkaloidy patří do skupiny fenylalkylamidových alkaloidů a jsou rozpustné v alkoholu a tucích. Ze všech 11 zástupců představují majoritní část kapsaicin a dihydrokapsaicin, které způsobují okolo 90 % pálivosti a jejich molekuly se liší pouze nasyceností v acylové skupině. Koncentrace kapsaicinoidů je rozdílná v závislosti na druhu a množství určité chilli papričky, pohybuje se v rozmezí 0,003–0,01 % (w/w) u sušených, méně pálivých papriček, 0,01–0,3 % u středně pálivých a od 0,3 až 1 % (w/w) u velmi ostrých papriček. Za nejpálivější kapsaicinoid je však považován právě kapsaicin<sup>1</sup>, který byl objeven v roce 1816, když se podařilo izolovat z papriky<sup>2</sup>. Kapsaicinoidy vyvolávají intenzivní dráždění při styku se sliznicemi, vážou se na tzv. nociceptory, kterými lidské tělo vnímá bolest<sup>3</sup>. Mají také řadu pozitivních účinků, podporují krevní cirkulaci, zvyšují rychlost metabolismu, podporují zažívání a pomáhají při léčení různých nemocí. Kapsaicinoidy vykazují vysoký antioxidační účinek<sup>4</sup>, působí protinádorově<sup>5</sup>, vyvolávají apoptózu u některých rakovinných buněk<sup>6</sup>, mají antibakteriální účinek<sup>7</sup>. Působí proti cholesterolu<sup>8</sup>, nadváze<sup>9</sup> a jsou to účinná analgetika<sup>10</sup>. Používají se také do pepřových sprejů sloužící k sebeobraně<sup>11</sup>. Protože se neustále zvyšuje poptávka po ostrých a pálivých jídlech a také roste zájem o účinky těchto paprik v medicíně a farmacii, je důležité zajistit citlivou, přesnou a jednoduchou techniku pro detekci kapsaicinu. K nejčastějším metodám patří vysoce účinná kapalinová chromatografie<sup>12</sup>, plynová chromatografie<sup>13</sup>, kapilární elektroforéza<sup>14</sup>, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie<sup>15</sup>, kolorimetrie<sup>16</sup>, spektrofotometrie<sup>17</sup> nebo chromatografie na tenké vrstvě s *in-situ* denzitometrií<sup>18</sup>. Z výše uvedených metod je nejrozšířenější plynová a vysoce účinná kapalinová chromatografie, které poskytují dostatečnou citlivost a vysoké rozlišení, nevýhodou je ale komplikovanost procedury, dlouhá doba odezvy a nákladnost přístroje, a také pracně derivatizační kroky nutné ke snížení nestálosti kapsaicinoidů<sup>1</sup>.

Vhodnou alternativou jsou elektrochemické metody vzhledem k jejich nízké ceně, dobré citlivosti a také přenositelnosti. Princip elektrochemického stanovení kapsaicinu je založen na jeho oxidaci. Vhodnými elektrodami pro jeho stanovení jsou uhlíkové pastové elektrody (CPEs – z angl. carbon paste electrode), a to pro jejich dostupnost, nízkou cenu, snadnou a rychlou přípravu pasty. Používány jsou hlavně pro voltametrická měření. Nevýhodou elektrochemického stanovení kapsaicinu je, že nedokáže rozlišit jednotlivé kapsaicinoidy.

### Experimentální část

Pro měření byla připravena sada základních elektrolytů (0,1M HClO<sub>4</sub>; 0,1M HCl; 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1M KCl). Ke studiu závislosti na pH byl připraven zásobní roztok Brittonova-Robinsonova pufru (B-R). Standardní roztoky analytu 1 mg ml<sup>-1</sup> (kapsaicin, dihydrokapsaicin a přírodní kapsaicin) byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství čisté látky v ethanolu a dále byly ředěny dle potřeby. Tyto roztoky bylo nutné uchovat v lednici při teplotě cca 5 °C.

Voltametrická měření byla prováděna na elektrochemickém analyzátoru PGSTAT128N (Metrohm-Autolab, Nizozemí) s laboratorním stojanem pro elektrody, voltametrickou nádobkou a magnetickou míchačkou s kontrolovanou rychlostí otáček (cca 300 ot min<sup>-1</sup>). Hodnoty pH analyzovaných roztoků byly měřeny na přenosném pH-metru (model „CPH 52“; Elteca, Turnov, ČR) s kombinovanou skleněnou pH-elektrodou (model „OP-0808P“; Radelkis, Budapest, HU).

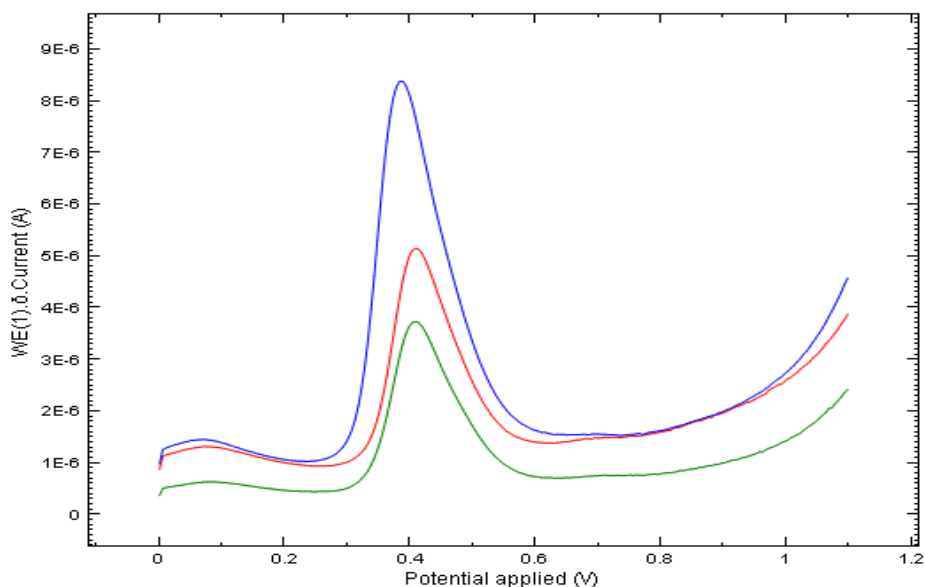
Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pasta – směs z uhlíkového prášku „CR-5“ (Maziva Týn, CZ) a viskózního parafinového oleje (Merck; CZ) o složení 0,35 g grafitu a 0,15 g pastové kapaliny (pasta typu „C/PO“). Uhlíková pasta byla připravena důkladnou homogenizací obou hlavních komponent dle zavedeného postupu a takto získaná směs byla naplněna do plastového pouzdra s otočným pístem vlastní konstrukce, s průměrem pracovního povrchu 2,5 mm. Před každou sérií měření byl povrch uhlíkové pasty obnoven mechanicky: otřením použité vrstvy filtračním papírem. Potřebný tří-elektrodový systém pro měření pak doplňovala pomocná elektroda z Pt-plíšku a srovnávací elektroda typu Ag/AgCl 3M KCl.

Voltametrická měření byla prováděna v režimu square-wave voltametrie s využitím zavedeného postupu, jenž zahrnoval kondicionační krok z míchání, dobu klidu a následný sken v anodické oblasti potenciálu. Není-li uvedeno jinak, experimenty probíhaly v základním elektrolytu daného složení (specifikováno níže, v souvislosti s příslušným experimentem) a typické přístrojové podmínky byly následující: potenciál kondicionace 0,2 V vs. ref.;

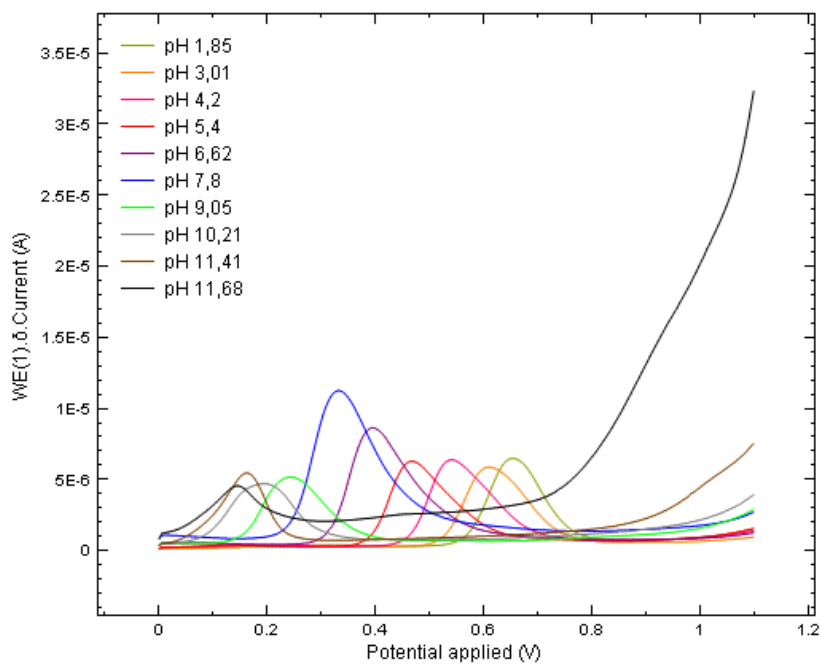
doba kondicionace 120 s; doba klidu 15 s; krokování polarizačního potenciálu 5 mV, amplituda pulzu 20 mV a SWV-frekvence 50 Hz.

Modelový vzorek č. 1 o koncentraci  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  byl připraven pipetováním 25  $\mu\text{l}$  standardního roztoku přírod-

ního kapsaicinu do 19,8 ml B-R pufru o pH 7,8. Modelový vzorek č. 2 byl připraven rozpuštěním 0,02 g sladké papriky v 5 ml methanolu, do kterého bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  standardu přírodního kapsaicinu.



Obr. 1. Vzorový voltamogram kapsaicin (červená), dihydrokapsaicin (modrá), přírodní kapsaicin (zelená), koncentrace  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , B-R pufr pH 7,8



Obr. 2. Voltamogramy přírodního kapsaicinu při různém pH B-R pufru

## Výsledky a diskuse

Úvodní experimenty zahrnovaly zkoumání základní elektrochemie čistého kapsaicinu, dihydrokapsaicinu a přírodního kapsaicinu (60 % kapsaicin, 40 % dihydrokapsaicin) spolu s výběrem základního elektrolytu (0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub>, HCl, KCl, B-R pufr) o vhodném pH za použití uhlíkové pastové elektrody (CPE). Jako nejvhodnější se jevil elektrolyt B-R pufru o pH 7,8, který poskytoval nejstabilnější a nejvyšší odezvu a tedy byl použit i pro další měření. Z obr. 1 je patrné, že k oxidaci všech tří zástupců kapsaicinoidů dochází při stejném potenciálu a nelze je tedy rozlišit. Ke srovnávacím měřením byly použity také další elektrody: pastová elektroda ze skelného uhlíku (GCPE), borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) a elektroda ze skelného uhlíku (GCE), které však poskytovaly méně stabilní odezvu.

Dalším krokem byla optimalizace pH. Jak je patrné z obr. 2, kapsaicin je elektroaktivní v celém rozsahu pH, přičemž s rostoucím pH dochází k posunu potenciálu píku směrem k méně pozitivním potenciálům. Jak bylo uvedeno výše, byl vybrán roztok B-R pufru o pH 7,8.

Mezi další kroky optimalizace patřilo ověření opakovatelnosti. Vzhledem k tomu, že se po každém měření snižovala hodnota signálu, bylo nutné zařadit kondicionační krok, u něhož byl optimalizován čas i potenciál. Neuspokojivějších výsledků bylo dosaženo při potenciálu 0,2 V, při míchání roztoku po dobu 120 s.

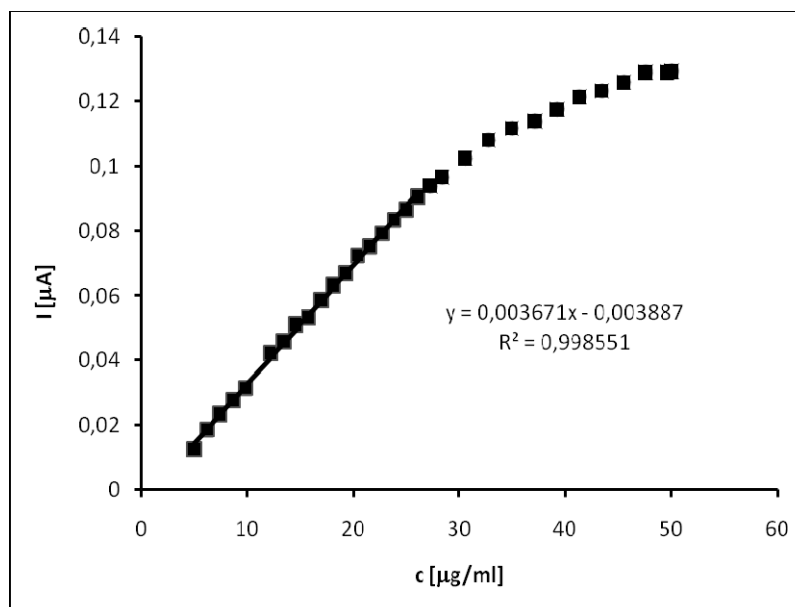
Následně byla proměřena kalibrační křivka. Z obr. 3 vyplývá, že závislost proudu na koncentraci je lineární v rozsahu od 5 μg ml<sup>-1</sup> do 26 μg ml<sup>-1</sup>.

Pro ověření správnosti měření byla navržená metoda otestována na modelových vzorcích. Naměřená hodnota koncentrace modelového vzorku č. 1 činila 37 μg ml<sup>-1</sup>, přičemž skutečná hodnota tohoto vzorku byla 50 μg ml<sup>-1</sup>. Rozdíl v nalezeném množství může být způsoben složením použitého standardu přírodního kapsaicinu, kde jednotlivé složky mohou vykazovat různé elektrochemické chování. U modelového vzorku č. 2 byl sledován vliv matrice, naměřená koncentrace byla 84 μg ml<sup>-1</sup> a skutečná hodnota byla 100 μg ml<sup>-1</sup>. Zde mohla hrát roli matrice a především vliv kyseliny askorbové, která se ukázala v předběžných měřeních jako významný interferent.

## Závěr

Z předložené práce vyplynulo, že voltametrické stanovení kapsaicinu je možné provést i s pomocí uhlíkové pastové elektrody. Jako nejvhodnější elektrolyt se ukázal B-R pufr o pH 7,8. Měření bylo zároveň nutné doplnit o kondicionační krok kvůli poklesu signálu při opakovaném měření. Stanovení kapsaicinu lze provádět pomocí přímé voltametrie za doporučených podmínek. Nevýhoda navrhované metody oproti např. chromatografickým metodám spočívá v tom, že nelze rozlišit jednotlivé kapsaicinoidy, jelikož dochází k jejich oxidaci při stejném potenciálu.

*Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0021 „Posílení excelentních týmů výzkumu a vývoje na Univerzitě Pardubice“.*



Obr. 3. Kalibrační křivka přírodního kapsaicinu, CPE, B-R pufr pH 7,8

## LITERATURA

1. Yardim Y., Senturk Z.: *Talanta* 112, 11 (2013).
2. Monsereenusorn Y. Y., Kongsamut S., Pezalla P. D.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 10, 321 (1982).
3. Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D.: *Nature* 389, 816 (1997).
4. Henderson D. E., Slickman A. M., Henderson S. K.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 2563 (1999).
5. Sanchez A. M., Sanchez M. G., Malagarie-Cazenave S., Olea N., Diaz-Laviada I.: *Apoptosis* 11, 89 (2006).
6. Mori A., Lehmann S., O'Kelly J., Kumagai T., Desmond J. C., Pervan M., McBride W. H., Kizaki M., Koeffler H. P.: *Cancer Res.* 66, 3222 (2006).
7. Sathyanarayana M. N.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 275 (2006).
8. Kempaiah R. K., Manjunatha H., Srinivasan K.: *Mol. Cell. Biochem.* 275, 7 (2005).
9. Westerterp-Plantenga M. S., Smeets A., Lejeune M. P.: *Int. J. Obes.* 29, 682 (2005).
10. Barbero G. F., Palma M., Barroso C. G.: *Anal. Chim. Acta* 578, 227 (2006).
11. Kachoosangi R. T., Wildgoose G.G., Compton R.G.: *The Analyst* 133, 888 (2008).
12. Choi S. H., Suh B. S., Kozukue E., Kozukue N., Levin C. E., Friedman M.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 9024 (2006).
13. Pena-Alvarez A., Ramirez-Maya E., Alvarado-Suarez L. A.: *J. Chromatogr. A* 1216, 2843 (2009).
14. Liu L., Chen X., Liu J., Deng X., Duan W., Tan S.: *Food Chem.* 119, 1228 (2010).
15. Laskaridou-Monnerville A.: *J. Chromatogr. A* 838, 293 (1999).
16. Gibbs H.A.A., O'Garro L.W.: *Hort Science* 39, 132 (2004).
17. Perucka I., Oleszek W.: *Food Chem.* 71, 287 (2000).
18. Monforte-Gonzalez M., Medina-Lara F.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30, 1697 (2007).

## CHARAKTERIZÁCIA VPLYVU ŽIHANIA NA VLASTNOSTI NANOŠTRUKTÚR Au NA SKLENENOM SUBSTRÁTE

PETER KONRÁD, ONDŘEJ KVÍTEK, VÁCLAV ŠVORČÍK

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie, Ústav inženýrství pevných látek, Technická 5, 166 28 Praha  
konradp@vscht.cz

### Úvod

Tenké vrstvy ušľachtilých kovov nachádzajú širšie uplatnenie v elektronike, optoelektronike, senzorike a v biologických aplikáciách<sup>1,2</sup>. Pokiaľ hrúbka týchto kovových vrstiev dosahuje nanometrových rozmerov dramaticky sa menia ich vlastnosti v porovnaní s objemovými materiálmi. Pre vysokoteplotné aplikácie je teplota topenia použitých materiálov dôležitým parametrom. U objemových ušľachtilých kovov je jej hodnota nad 950 °C, ak je však použitá iba tenká vrstva, môže sa teplota topenia znížiť aj o niekoľko stoviek °C. Dôvodom je väčší pomer atómov na povrchu k atómom v objeme materiálu. Väzbovo nevysýtené atómy na povrchu sú schopné difundovať povrchom pri nižšej teplote a tým dochádza pri tepelnom namáhaní k zmenám v povrchovej morfológii. Fázové prechody v tenkých kovových vrstvách môžu mať vplyv na ďalšie vlastnosti materiálu.

K výrazným zmenám dochádza tiež v optických vlastnostiach materiálu<sup>3</sup>. Napr. u tenkých vrstiev Au dochádza k zmene charakteru absorpčného spektra vo viditeľnej oblasti spektra. V UV-Vis spektrách je možné pozorovať pásy plazmónovej rezonancie (PR), ktoré naznačujú vznik časticovitej štruktúry na povrchu vrstvy. Tieto zmeny sa prejavujú aj vo sfarbení týchto vrstiev, ktoré môže byť od zeleného, cez modré až po fialové<sup>4</sup>.

Zlato je považované za dobrý vodič elektrického prúdu, avšak jeho tenké vrstvy môžu v závislosti na svojej štruktúre dosahovať vysokých hodnôt plošnej rezistencie, ktoré sú porovnateľné s nevodičmi. Príčinou je vznik nesúvislých vrstiev, ku ktorému dochádza pri krátkej dobe depozície alebo po tepelnom namáhaní<sup>5–8</sup>.

Táto práca sa zaoberá vplyvom tepelného namáhania na vlastnosti tenkých Au vrstiev deponovaných na sklenený substrát. Tepelné namáhanie prebiehalo v dvoch režimoch, (i) menila sa teplota namáhania a (ii) doba namáhania. Dôraz sa kládol na zmeny v elektrických, optických a morfológických vlastnostiach Au vrstiev.

### Experimentálna časť

K tvorbe tenkých vrstiev a kontaktov bol použitý Au terč (čistota 99,99 %, Safina a.s.). Ako sklenený substrát

bolo použité borosilikátové krycie sklo s plochou 15×15 mm<sup>2</sup> a hrúbkou 0,13–0,16 mm (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG).

Depozícia prebiehala na naprašovacom zariadení Balzers SCD 050 pri izbovej teplote (IT): pracovný plyn – Ar (čistota 99,995 %), tlak 5 Pa, vzdialenosť Au terča od substrátu 50 mm, napätie 360 V, prúd 20 mA.

Žihanie vzoriek prebiehalo v Petriho miskách, ktoré boli vložené do vyhriatej sušiarne Binder. Tepelné namáhanie naprašovaných Au vrstiev prebiehalo v dvoch režimoch. V prvom boli vzorky namáhané 60 min pri teplotách 150–300 °C. V druhom režime 15–180 min pri teplote 300 °C. Po žihaní boli vzorky ponechané voľne na vzduchu až do vychladnutia na izbovú teplotu.

Povrchová morfológia vzoriek bola študovaná AFM mikroskopom Digital Instruments CP II v poklepovom režime. Použitá bola P-dopovaná sonda RTESPA-CP s konštatou pružnosti 20–80 N m<sup>-1</sup>. Veľkosť snímanej plochy bola 1×1 μm<sup>2</sup>.

Na štúdium optických vlastností bol použitý spektrometer Lambda 25 (v režime na priechod, rozsah vlnových dĺžok 300–800 nm, rýchlosť snímania 240 nm min<sup>-1</sup>, krok 1 nm).

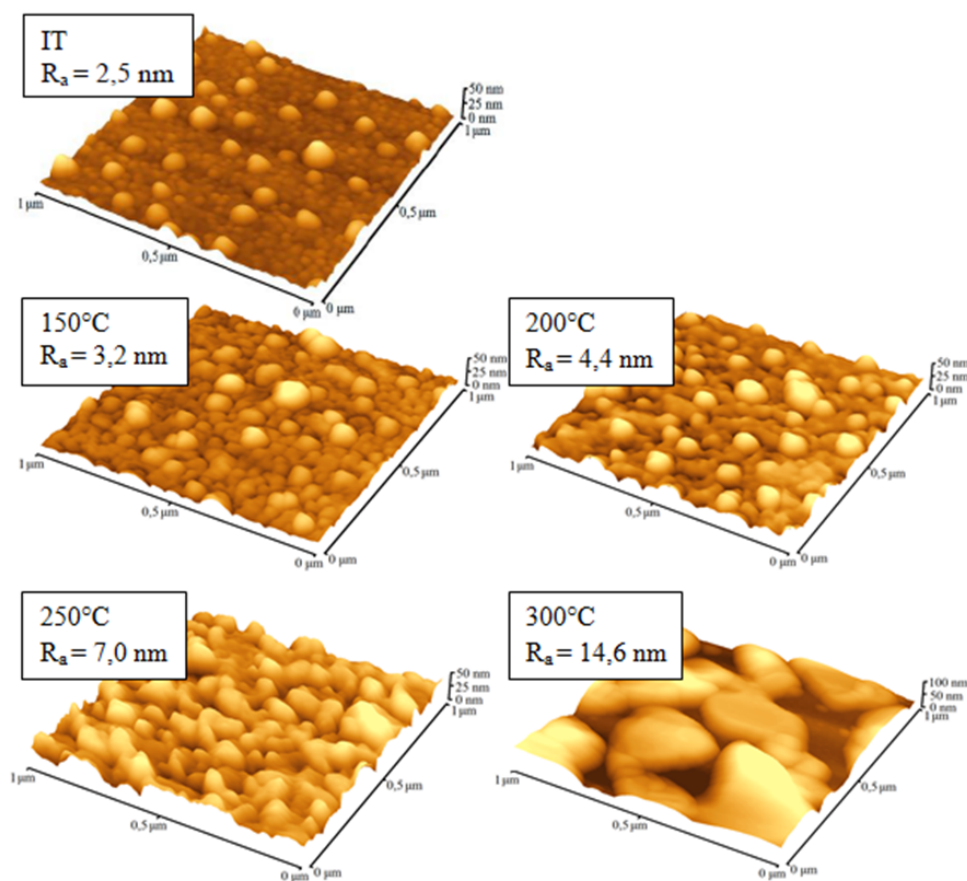
Plošná elektrická rezistencia bola meraná na vzorkách s naprašovanými Au kontaktmi, deponovanými cez metalickú masku (doba 130 s, napätie 340 V, prúd 40 mA). Pre vzorky s väčšími rezistenciami ako 50 MΩ bol použitý pikoampérmeter Keithley 487, pre vzorky s menšími rezistenciami multimeter Metex ME-32.

Difrakčná analýza bola vykonaná na automatickom práškovom difraktometri Panalytical X'Pert PRO (zdroj röntgenová lampa, λ<sub>Kα1</sub>=0,1540598 nm), difraktogramy boli snímané v rozsahu 2θ = 10–90°.

### Výsledky a diskusia

Na obr. 1 sú uvedené AFM snímky skla s Au deponovaným za izbovej teploty a vzoriek tepelne namáhaných. Z obr. 1 je zrejmé, ako sa dramaticky mení povrchová morfológia Au vrstiev po tepelnom namáhaní. Po depozícii vykazuje Au vrstva drsnosť R<sub>a</sub> = 2,5 nm. So stúpajúcou teplotou namáhania však jej hodnota narastá. Najvyššiu hodnotu dosahuje pri teplote 300 °C (R<sub>a</sub> = 14,6 nm). Žiháním vrstiev dochádza k preskupeniu atómov Au a k tvorbe termodynamicky stabilnejších útvarov pripomínajúcich „ostrovčeky“<sup>4,8</sup>. Ich veľkosť rastie spolu s drsnosťou vrstiev. Keďže pri teplote 300 °C dochádza k najväčším povrchovým zmenám, bola táto teplota zvolená pre ďalšie štúdium vplyvu doby žihania na vlastnosti vrstiev.

V práci bolo ďalej namerané, že s narastajúcou dobou žihania (0–180 min) pri teplote 300 °C, podobne ako



Obr. 1. AFM snímky skla s Au deponovaným 150 s za izbovej teploty (IT) a vzoriek tepelne namáhaných (60 min pri teplotách 150, 200, 250 a 300 °C).  $R_a$  je priemerná drsnosť

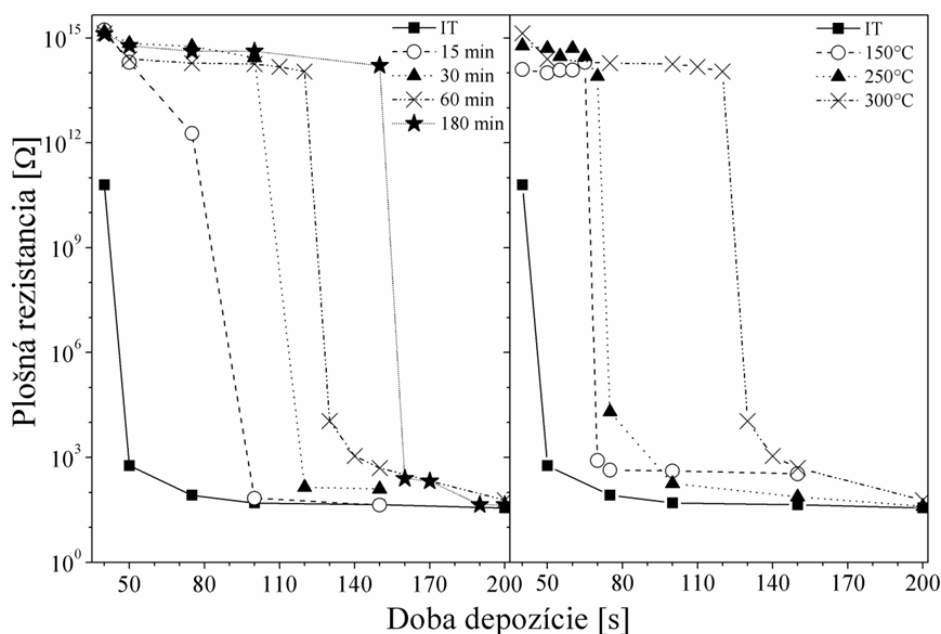
s narastajúcou teplotou v predchádzajúcom režime, rastie povrchová drsnosť vzoriek. Opäť dochádza k tvorbe ostrovčekovitej štruktúry. K najvýraznejším zmenám dochádza po 180 minútovom žíhaní, kedy vytvorené ostrovčeky dosahujú najväčšie veľkosti ( $R_a=19,4$  nm).

Na obr. 2 je uvedená závislosť plošnej rezistancie na dobe depozície pre oba režimy namáhania. Z obr. 2 je zrejmé, že ako sa s narastajúcou teplotou alebo narastajúcou dobou žíhania postupne posúvajú perkolačné prahy závislosti plošnej rezistancie. Vďaka týmto výsledkom je možné usúdiť, aká dlhá musí byť doba alebo vysoká teplota žíhania, aby boli ešte vzniknuté ostrovčekovité štruktúry vodivo prepojené. Tento údaj môže byť dôležitý pre využitie týchto štruktúr v konkrétnych aplikáciách, v ktorých je nutné zachovať vodivosť vrstvy. Zatiaľ čo u nenamáhaných vzoriek sa perkolačný prah dosiahne ca 45 s depozície, u tepelne namáhaných vzoriek sa prah posúva na dobu depozície 125 s (300 °C a 60 min) alebo 155 s (300 °C a 180 min). Uvedená poloha perkolačného prahu po žíhaní (300 °C – 60 min) sa nezhoduje z doposiaľ publikovanými výsledkami<sup>4</sup>, v ktorých autori uvádzajú hodnotu ca 275 s depozície.

Už predtým bolo publikované, že pri depozícii „tenkých“ Au nanoštruktúr dochádza k tvorbe nanokryštálov, ktoré s narastajúcou dobou depozície splývajú do súvislých vodivých vrstiev<sup>8</sup>. Priamo po depozícii vznikajú kryštály, ktoré naberajú prevažne orientáciu [111], avšak je možné pozorovať pre nižšie doby depozície taktiež línie [200] a [220], ktoré vykazujú podobnú intenzitu. Po tepelnom namáhaní sa však intenzita píkov línie [111] niekoľko násobne zväčší oproti ostatným líniam u všetkých vzoriek. Pomery intenzít línii [200] a [111] vzoriek pred a po žíhaní sa nachádzajú v tab. I. Z týchto výsledkov sa dá usúdiť, že pri tepelnom namáhaní sa zvyšuje pomer kryštálov, ktoré majú orientáciu [111].

Je známe, že z absorpčných spektier tenkých vrstiev je možné odhadnúť, či nanoštruktúry majú časticovitý charakter. Túto skutočnosť v spektrách naznačuje prítomnosť pásov PR. Konkrétne pre Au sa pásy PR nachádzajú v spektrách približne na úrovni 500–650 nm. Ak sú však štruktúry na povrchu príliš veľké, k tvorbe pásov v spektrách nedochádza. Táto skutočnosť je v našom prípade dobre zrejmá na obr. 3, kde sú uvedené UV-Vis spektrá deponovaných vzoriek tepelne namáhaných. Z obr. 3 je





Obr. 2. Závislosť plošnej elektrickej rezistencie na dobe depozície: (i) vľavo pri teplote 300 °C a rôznych dobách namáhania, (ii) vpravo pri rôznych teplotách a dobe namáania 60 min (IT – vzorka po depozícii a bez tepelného namáhania)

#### Tabuľka I

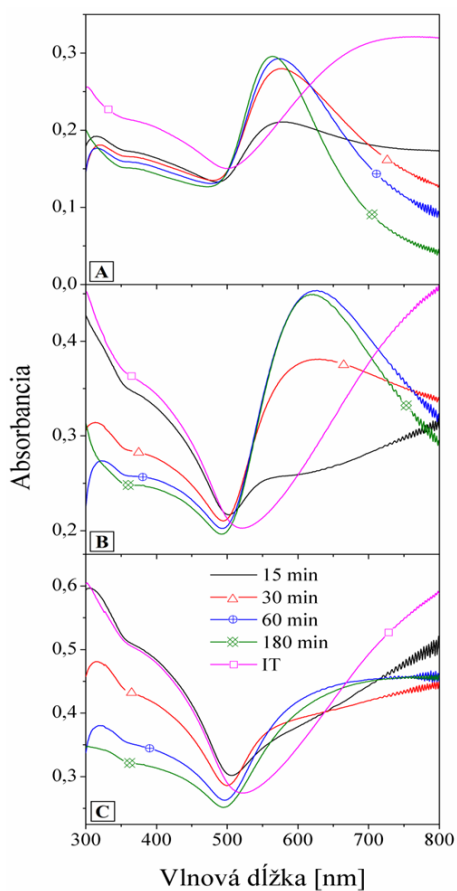
Pomery línii [200] a [111] z XRD meraní u vzoriek deponovaných 50–250 s bez a po následnom žíhaní (300 °C, 60 min)

Doba depozície [s]	Pomer [200]/[111]	
	bez žíhaní	po žíhaní
50	0,102	0,319
75	0,249	0,180
100	0,223	0,169
150	0,142	0,012
200	0,145	0,012
250	0,184	0,006

zrejme, že vzorka deponovaná 50 s vykazuje výrazný pás PR už po 15 min žíhaní, zatiaľ čo vzorka deponovaná 100 s až po 60 min. Skeny AFM (viď obr. 1) u týchto vzoriek dokazujú vznik nanoštruktúry rovnako ako absorpčné spektrá na obr. 3. U vzorky deponovanej 150 s sa pásy PR v spektre nevyskytujú ani po 180 min žíhaní. Dôvodom nie je absencia nanoštruktúr, ale ich veľkosť, ako bolo uvedené vyššie. Zo získaných výsledkov je možné usúdiť, že s narastajúcou dobou depozície (čiže hrúbkou vrstvy), dochádza po žíhaní k tvorbe čoraz väčších štruktúr, ktoré nie sú schopné vykazovať PR. Zároveň je možné povedať, že čím hrubšia je vrstva, tým dlhší čas žíhaní je potrebný na vznik nanoštruktúry.

#### Záver

Žíhaním tenkých Au vrstiev naprášených na sklenený substrát sa výrazne menia hlavne ich povrchové vlastnosti. V tejto práci bolo preukázané, že so zvyšujúcou sa dobou alebo teplotou žíhaní dochádza k zvyšovaniu drsnosti povrchu týchto vrstiev. Vznik nanoštruktúry pripomínajúcej „ostrovčeky“ po žíhaní je dobre badateľný zo skenov AFM. Je pozorovateľná závislosť veľkosti „ostrovčekov“ na teplote žíhaní. Rovnaký trend rastu častíc je možné nájsť aj pri zvyšovaní doby žíhaní. K tvorbe najväčších štruktúr dochádza pri teplote 300 °C. Pri tejto teplote dochádza zároveň aj k najvýraznejším posunom perkolačných prahov plošnej elektrickej rezistencie. Dôvodom je preskupenie Au do „ostrovčekov“, ktoré nie sú vodivo prepojené. S narastajúcou dobou žíhaní pri teplote 300 °C sú schopné pretvorenia na nesúvislé, tj. elektricky nevodivé vrstvy s čoraz väčšou hrúbkou. S narastajúcou hrúbkou vrstvy po žíhaní výrazne klesá pomer intenzít línii [200] a [111] u vzniknutých kryštalických nanoštruktúr. Z toho je možné vyvodiť, že novovzniknuté štruktúry majú prednostnú orientáciu [111]. Vznik nanoštruktúry je potvrdený aj UV-Vis absorpčnými spektrami, v ktorých sa nachádzajú pásy PR. U vzoriek deponovaných dlhšiu dobu pásy PR absentujú z dôvodu veľkosti vzniknutých štruktúr.



Obr. 3. UV-Vis spektrá vzoriek tepelne namáhaných pri teplote 300 °C a deponovaných A – 50 s, B – 100 s, C – 150 s (IT – vzorka po depozícii a bez tepelného namáhania)

*Tato práca vznikla za podpory GAČR projektu P108/12/G108.*

#### LITERATÚRA

1. Homola J., Yee S. S., Gauglitz G.: *Sens. Actuators, B* 54, 3 (1999).
2. Lal S., Grady N. K., Kundu J., Levin C. S., Lassiter J. B., Halas N. J.: *Chem. Soc. Rev.* 37, 898 (2008).
3. Lee D., Yim H., Lee S., Beom-Hoan O.: *Microelectron. Eng.* 98, 436 (2012).
4. Svorcik V., Kvitek O., Lyutakov O., Siegel J., Kolska Z.: *Appl. Phys., A* 102, 747 (2011).
5. Medlin R., Blahova O., Svorcik V.: *Chem. Listy* 104, S346 (2010).
6. Siegel J., Lyutakov O., Rybka V., Kolska Z., Svorcik V.: *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011).
7. Malinsky P., Slepicka P., Hnatowicz V., Svorcik V.: *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012).
8. Svorcik V., Siegel J., Sutta P., Mistrik J., Janicek P., Worsch P., Kolska Z.: *Appl. Phys., A* 102, 605 (2011).

## OPTIMALIZACE PODMÍNEK CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ AROMATICKÝCH AMINŮ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

MARKÉTA KREJČOVÁ, HANA DEJMKOVÁ  
a MIROSLAVA BURSOVÁ

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Univerzitní výzkumné centrum UNCE „Supramolekulární chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2*

*marketa.krejцова@natur.cuni.cz*

### Úvod

Tato práce byla zaměřena na vývoj metody pro stanovení směsi deseti aromatických aminů – anilinu (A), 2-aminoanthracenu (2-AA), 2-aminobifenyly (2-AB), 4-aminobifenyly (4-AB), 2-aminofluorenu (2-AF), 1-amino-naftalenu (1-AN), 2-aminonaftalenu (2-AN), 2-ethylanilinu (EA), 2-nitroanilinu (2-NA) a *o*-toluidinu (T) – pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) za použití amperometrické (ED) a spektrofotometrické (UV) detekce.

Aromatické aminy, především aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH) se řadí mezi karcinogenní a mutagení látky. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) patří ze studovaných analytů mezi prokazatelně karcinogenní pro člověka 4-AB, 2-AN a T (cit.<sup>1</sup>). Aromatické aminy se poměrně často vyskytují jak v pracovním, tak životním prostředí. Vzhledem k přítomnosti těchto látek např. v barvách na vlasy, potravinářských barvivech či palivech je člověk jejich vlivu přímo vystaven, a je tedy nutné monitorovat i jejich stopová množství. Nejčastěji se pro tento účel používají chromatografické metody, především plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí<sup>2</sup>.

K optimalizaci separačních podmínek byla v této práci použita metoda plánování experimentu (design of experiment, DOE), která umožňuje optimalizovat více parametrů současně, na rozdíl od nejčastěji využívané metody jedné proměnné v čase (one variable at time, OVAT). Použitím DOE výrazně klesne počet experimentů nutných k pokrytí celého uvažovaného rozsahu parametrů, a tedy i časová a finanční náročnost jejich provedení<sup>3</sup>.

### Experimentální část

Systém pro měření v režimu RP-HPLC se stával z degaseru DG 4014, gradientové pumpy Beta 10 (obojí Ecom, Česká republika), kolony LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 Purospher RP-18 (5  $\mu$ m) a předklonky LiChroCART<sup>®</sup> 4-4 Purospher RP-18 (obojí Merck, Německo). K detekci byl využit jak UV/VIS spektrofotometrický detektor Sapphire

600 (Ecom, Česká republika), tak amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika). Amperometrický detektor byl zapojen v třielektrodovém uspořádání typu „wall-jet“ s referentní argentchloridovou elektrodou (3 mol l<sup>-1</sup> KCl, ETP CZ R-008-05, Monokrystaly, Česká republika) a pomocnou platinovou elektrodou. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda (vnitřní průměr teflonového těla 3 mm), která byla připravena smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (velikost částic 0,4–12  $\mu$ m, Alfa Aesar, USA) se 100  $\mu$ l minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA). K prekoncentraci analytů byla využita metoda extrakce na tuhé fázi (SPE) s použitím extrakčních kolonek LiChrolut<sup>®</sup> EN 200 mg/3 ml (Merck, Německo). Extrakce byla prováděna ze 100 ml povrchové vody upravené na pH 9 a analyty byly následně eluovány 10 ml acetonitrilu.

Zásobní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup> byly připraveny rozpuštěním příslušného množství daných látek v 10 ml acetonitrilu. Zásobní roztok směsi analytů (o koncentraci 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) byl připraven smísením stejných objemů zásobních roztoků daných látek. Pro nástřik do kolony byl tento vzorek zředěn směsí methanolu s deionizovanou vodou (1:1, *V/V*). Acetátový pufr představoval směsný roztok octové kyseliny (p.a., 99%, Lach-Ner, Česká republika) a kyseliny trihydrogenfosforečné (p.a., 85%, Lach-Ner, Česká republika) každé o koncentraci 50 mmol l<sup>-1</sup>; pH pufru bylo denně upravováno na požadovanou hodnotu pomocí 100 mmol l<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Česká republika).

### Výsledky a diskuse

#### Optimalizace podmínek separace

Pro optimalizaci podmínek chromatografického stanovení směsi analytů byla použita metoda DOE, konkrétně Boxův-Behnkenův experimentální plán využívající tří úrovní hodnot optimalizovaných parametrů; tento experimentální plán byl vybrán především vzhledem k nízkému počtu významných parametrů<sup>3</sup>. V tomto případě byly jako významné zvoleny následující parametry: pH acetátového pufru, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi a jeho gradient; sledovanou odpovědí byla chromatografická odezвовá plocha (CRF). Pomocí CRF byly nalezeny takové hodnoty studovaných parametrů, aby rozlišení dvojic sousedních pík bylo dostatečné a zároveň doba analýzy nebyla příliš dlouhá. K tomuto účelu byla použita Deringerova funkce vhodnosti<sup>4</sup>. Po proměření série experimentů, vycházejících z Boxova-Behnkenova plánu, byly za použití ANOVA testů zjištěny experimentální podmínky, které ovšem nebyly plně vyhovující, a byly tedy doplněny modifikací gradientu, díky které došlo ke zlepšení

separace prvních píků. Výsledné optimální podmínky použité pro stanovení směsi aromatických aminů byly následující: pH acetátosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %; prvních 6 min byl podíl methanolu udržován na počáteční hodnotě, následně byla tato hodnota během 24 min zvýšena na 90 %.

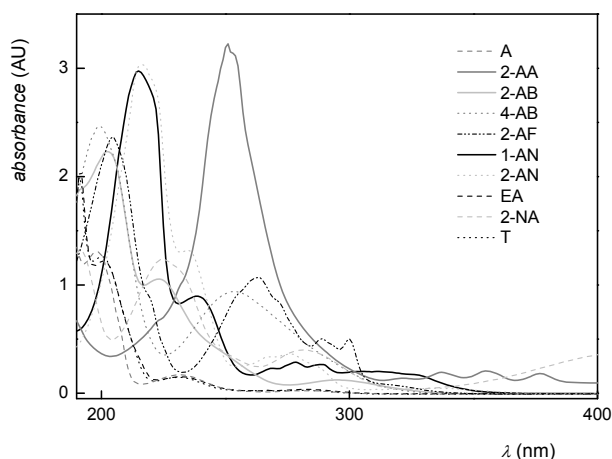
#### Optimalizace podmínek detekce

Vlnová délka vhodná pro dané stanovení byla určena proměřením spekter jednotlivých analytů proti acetonitrilu. Vlnové délky maxima absorpce daných látek se nepřekrývají (obr. 1), jako kompromisní hodnota byla zvolena vlnová délka 235 nm.

Z hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, které byly proměřeny v rozmezí potenciálů od +0,5 V do +1,5 V, byl určen jako optimální potenciál +1,4 V. Takto vysoká hodnota byla, i přes poměrně vysoký proud pozadí, zvolena, jelikož 2-nitroanilin nebylo možné při nižších potenciálech detegovat (obr. 2).

#### Kalibrační závislosti

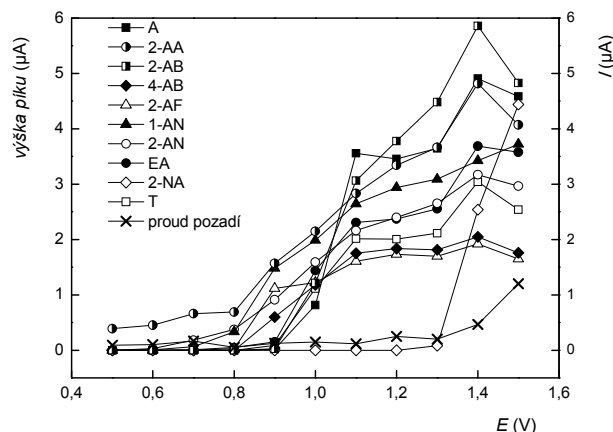
Kalibrační závislosti studovaných aromatických aminů byly proměřeny za optimálních pracovních podmínek jak ve směsi deionizované vody s methanolem (1:1, *V/V*), tak v říční vodě bez předchozí prekoncentrace a po prekoncentraci pomocí SPE. Kalibrační závislosti analytů ve všech maticích byly lineární v celém proměřovaném rozsahu koncentrací. V případě spektrofotometrické detekce ztěžoval vyhodnocení většiny píků poměrně výrazný drift základní linie; odezva prvních tří píků byla nízká v souvislosti s nízkým absorpčním koeficientem odpovídajících analytů (obr. 3). Co se týče detekce amperometrické, šum a drift základní linie ovlivnil měření až při stanovení nižších koncentrací (obr. 4). Drift základní linie je způsoben



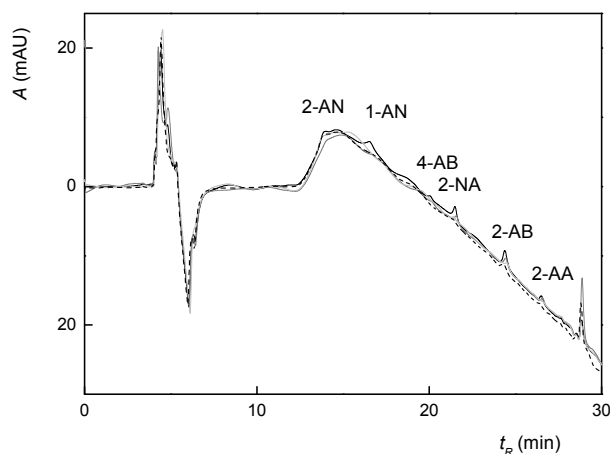
Obr. 1. UV/VIS spektra studovaných analytů. Roztoky látek o koncentraci  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanolu a acetátosfátového pufru (1:1, *V/V*) o pH 2,5

ben použitím gradientové eluce pro urychlení separace analytů, ale roli hraje i nízká vlnová délka spektrofotometrické detekce a vysoký pracovní potenciál detekce amperometrické.

V případě všech stanovení bylo dosaženo nízkých detekčních mezí, přičemž pomocí amperometrické detekce bylo dosaženo přibližně o řád nižších mezí detekce než při spektrofotometrickém stanovení, a to jak u stanovení směsi látek v deionizované vodě s methanolem (1:1, *V/V*), tak ve vodě říční. Detekční meze analytů zakonzentrovaných



Obr. 2. Hydrodynamické voltamogramy studovaných analytů. Pracovní uhlíková pastová elektroda v uspořádání wall-jet, kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ). Gradient (A: acetátosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0 – 6. min: 30 % B, 30. min: 90 % B, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$

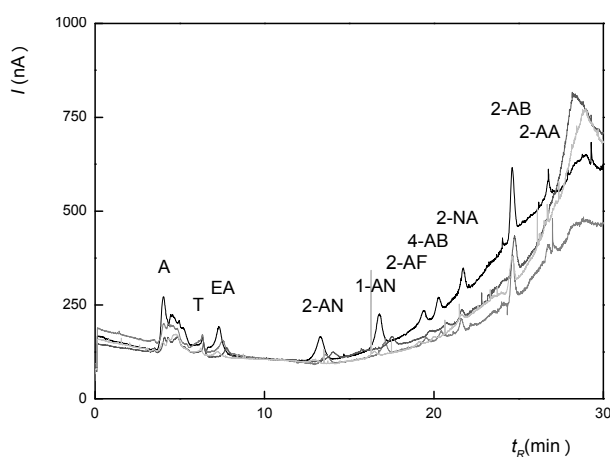


Obr. 3. Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25, 10, 7,5 a  $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ) v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ). Gradient (A: acetátosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0 – 6. min: 30 % B, 30. min: 90 % B, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{DET}} = 235 \text{ nm}$

Tabulka I

Meze detekce studovaných analytů v říční vodě při přímém HPLC stanovení, po prekoncentraci pomocí SPE a za použití GC/MS po prekoncentraci s kapalinovou mikroextrakcí

Analyt	Mez detekce [ng ml <sup>-1</sup> ]				
	HPLC – přímé stanovení		HPLC – po SPE		GC/MS
	UV	ED	UV	ED	
A	–	5,2	–	0,33	3,30
2-AA	19	6,2	3,3	0,37	0,27
2-AB	18	3,2	2,9	0,22	0,12
4-AB	37	9,7	7,2	0,80	1,80
2-AF	84	10,2	15,7	1,01	0,09
1-AN	39	5,3	6,1	0,43	0,12
2-AN	53	6,1	4,1	0,56	0,21
EA	635	4,5	–	0,42	0,48
2-NA	11	5,4	2,1	0,37	0,21
T	–	5,8	–	0,41	0,51



Obr. 4. Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25, 10, 7,5 a 5 ng ml<sup>-1</sup>) v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min: 90 % B, průtoková rychlost 0,5 ml min<sup>-1</sup>. E<sub>DET</sub> = 1,4 V

pomocí SPE odpovídají pro oba druhy detekce této prekoncentraci, a jsou tedy přibližně desetkrát nižší než odpovídající meze detekce bez použití SPE. Hodnoty detekčních mezí pro stanovení v říční vodě jsou uvedeny v tab. I. Pro srovnání získaných výsledků jsou uvedeny rovněž detekční meze získané metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) po kapalinové mikroextrakci<sup>5</sup>.

## Závěr

V této práci bylo prozkoumáno chromatografické chování deseti aromatických aminů v systému RP-HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí. Separční podmínky byly stanoveny metodou plánování experimentu, konkrétně za použití Boxova-Behnkenova experimentálního plánu. Použitím tohoto přístupu byl značně snížen počet nutných experimentů a byly získány vyhovující pracovní podmínky. Současně se ovšem projevila některá omezení tohoto přístupu, např. aplikace v mezích zvolených podmínek znemožňuje postihnout modifikaci gradientu zalomením, kterou bylo při tomto stanovení vhodné použít pro lepší rozdělení prvních tří píků. Výsledné pracovní podmínky tedy byly: pH acetátosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %; gradient mobilní fáze – prvních 6 min analýzy byl podíl methanolu udržován na počáteční hodnotě a během dalších 24 min byl zvýšen na 90 %; vlnová délka spektrofotometrického detektoru 235 nm; pracovní potenciál +1,4 V; průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

Pomocí RP-HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí byly proměřeny kalibrační závislosti jednotlivých analytů v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V) a říční vodě; stejně tak byly proměřeny i kalibrační závislosti těchto látek v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE.

Dosažené detekční meze ukazují převahu elektrochemické detekce nad detekcí spektrofotometrickou při chromatografickém stanovení aromatických aminů. Neméně zajímavé je ovšem i srovnání této metody s instrumentálně náročnou GC/MS, která sice překonává meze detekce zis-

kané přímým stanovením, ovšem při použití prekoncentrace pomocí SPE jsou výsledky dosažené elektrochemickou detekcí srovnatelné.

*Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou ČR (grant P206/12/G151).*

#### LITERATURA

1. International Agency for Research on Cancer: *Mono-graphs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*. www.iarc.fr (staženo 3.5.2013).
2. del Noyal Sánchez M., Pérez Sappó C., Pérez Pavón J. L., Moreno Cordero B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2007 (2012).
3. Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escaleira L. A.: *Talanta* 76, 965 (2008).
4. Hadjmohammadi M., Sharifi V.: *J. Chromatogr. B* 880, 34 (2012).
5. Bursová M., Krejčová M., Dejmková H., Čabala R.: *Nové možnosti optimalizace v analytické chemii*. Študentská vědecká konference Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě 2013, Bratislava, 24.4.2013.

## ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

ANETA LARYŠOVÁ a LENKA ENDLOVÁ

Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra chemie,  
30. dubna 22, 701 03 Ostrava  
Aneta.la@seznam.cz

### Úvod

Mák setý je plodina, která nachází své uplatnění zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Česká republika patří v celosvětovém měřítku k jeho nejvýznamnějším pěstitelům<sup>1,2</sup>. Hlavním využitím máku setého je jeho semeno, které je v ČR výhradně používáno v potravinářském průmyslu. Vedlejším produktem je makovina, která je bohatá na alkaloidy, jež jsou velmi významnými surovinami pro výrobu farmaceutik, avšak vzhledem ke svým biologickým účinkům jsou potenciální hrozbou pro vznik drogové závislosti<sup>3,4</sup>.

V rámci této práce jsou popsány metody kvalitativního a kvantitativního stanovení významných alkaloidů máku setého. K nejběžněji používaným metodám stanovení patří metody chromatografické, lišící se přípravou vzorků, především způsoby extrakce<sup>5–7</sup>. Tato práce byla zaměřena na modifikaci metody, jež pro přípravu vzorků využívala přímou extrakci extrakčním činidlem a byla doposud používána pro stanovení alkaloidů morfinu a kodeinu v makovině ve firmě Oseva PRO s.r.o. a Výzkumném ústavu olejnin Opava<sup>8</sup>. Nová metodika, využívající extrakci na pevnou fázi, měla za cíl především zrychlení a zjednodušení stanovení alkaloidů v makovině, a také rozšíření stanovení o další alkaloidy, např. thebain, papaverin a noskapiin.

### Experimentální část

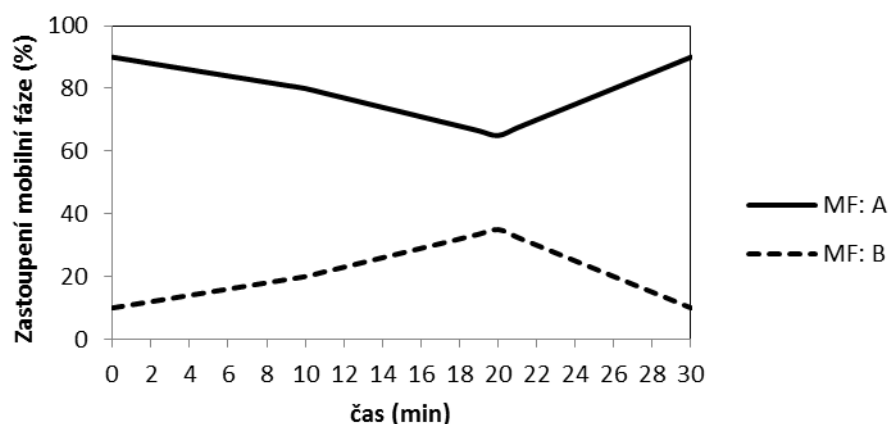
K experimentálním účelům bylo vybráno deset vzorků různých odrůd máku setého, lišících se koncentracemi alkaloidu morfinu v makovině. K analýze byla použita prázdná tobolka máku setého tzv. makovina, která byla pomleta na práškový vzorek pomocí mlýnku IKA TUBE-MILL Control po dobu 40 sekund při 22 000 rpm, a přeseta přes síto o velikosti ok 1 mm pro extrakci extrakčním činidlem a 0,5 mm pro extrakci na pevné fázi.

Přímá extrakce (PE) byla provedena smícháním 25 ml extrakční směsi ( $\text{NH}_3$  (25% vodný roztok, p.a.) :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (p.a.) :  $\text{CHCl}_3$  (p.a.), (1:9:15, vše Fisher Scientific, Pardubice, ČR)) s 500 mg vzorku v 50ml lékovce. Po uzavření se vzorek nechal stát do dalšího dne, kdy byl protřepán v třepačce typu TE III. (Chirana) při 240 kmitech za minu-

tu po dobu 8 hodin, následovalo stání vzorku do dalšího dne. Třetí den byl vzorek protřepán v třepačce za stejných podmínek 2 hodiny a poté bylo 5 ml extraktu přefiltrováno přes mlynářské síto pomocí filtračního zařízení do kalibrované kónické zkumavky. Obsah zkumavky byl převeden do 100ml odměrné baňky se zábrusem, odpařen po dobu 3 min ve vakuové rotační odparce typu RV 8 (IKA) a ponořen do horké vodní lázně typu HB 10 (IKA) o teplotě 70 °C. Odparek vzorku byl rozpuštěn v 5 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  (p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) v ultrazvukové lázni TESON 10 (Tesla) po dobu 5 min a zfiltrován přes membránový filtr – Nylon 66 Membranes, 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 47 mm (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Po filtraci byl 1 ml filtrátu odpipetován do vialky k chromatografické analýze za následujících separačních podmínek chromatografického systému Agilent 1200 (Agilent, USA) – kolona Discovery HS F5-5 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Supelco), teplota kolony 30 °C, průtok mobilní fáze 2 ml  $\text{min}^{-1}$ , mobilní fáze: ledová kyselina octová (99–100 %, ch.č.) : acetonitril (HPLC grade, vše Sigma-Aldrich, Praha, ČR) : ultračistá voda (2: 25: 73), vlnová délka 283 nm, nástřik 50  $\mu\text{l}$ , délka analýzy 23 min, max. tlak 350 bar, detektor UV/VIS. Připravená mobilní fáze byla zfiltrována přes membránový filtr – Nylon 66 Membranes, 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 47 mm. Analýza byla provedena paralelně.

Extrakci na pevnou fázi (SPE) předcházelo smíchání 50 mg vzorku s 5 ml 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (přípravena zředěním 99,8%, p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) v centrifugační zkumavce, která byla vložena na 30 min do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla). Poté se vzorek třepal 1 min v třepačce typu TE III. (Chirana) a odstředoval na multifunkční vysokootáčkové centrifuze typ K 2015 s dotykovým displejem (Unimed) po dobu 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt byl přečištěn na pevné fázi. Na zařízení SPE vakuum manifold s vakuovou rotační vývěvou – 12 pozicový systém (Labicom) byla umístěna kolonka CHROMABOND HR-XC (60 mg/3 ml), která se kondiciovala 3 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  (p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) a ekvilibrovala 3 ml ultračisté vody. Na kolonku byly nanášeny 3 ml extraktu a byly promyty 2 ml 0,1 M HCl (přípravena zředěním 35–36%, p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) a 2 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  (p.a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Eluce byla provedena 2krát 2 ml eluční směsí (5%  $\text{NH}_3$  v  $\text{CH}_3\text{OH}$ , vše Fisher Scientific, Pardubice, ČR) do 100ml odměrné baňky se zábrusem. Eluát byl po dobu 3 min ponořen v horké vodní lázni typu HB 10 (IKA) o teplotě 70 °C a odpařován pomocí vakuové rotační odparky typu RV 8 (IKA). Poté byl vzorek rozpuštěn ve 3 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a umístěn na 3 min do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla). Následně byl odpipetován 1 ml takto připraveného vzorku do vialky k provedení chromatografické analýzy za následujících podmínek chromatografického systému Agi-





Obr. 1. Gradient mobilních fází v průběhu chromatografické analýzy pro metodu SPE-HPLC

lent 1200 (Agilent, USA) – kolona Ascientis Express F5, (150 mm × 4,6 mm, 5 μm, Supelco), teplota kolony 40 °C, průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, mobilní fáze A: 5% acetonitril, mobilní fáze B: acetonitril (HPLC grade) : ledová kyselina octová (99–100 %, ch.č.) : triethylamin (GC ≥ 99,5%, vše Sigma-Aldrich, Praha, ČR) (97:2:1), vlnová délka 284 nm, nástřik 50 μl, délka analýzy 30 min, max. tlak 350 bar, detektor UV/VIS. Separace alkaloidů byla provedena pomocí gradientové eluce dle programu na obr. 1.

## Výsledky a diskuse

Byly připraveny kalibrační řady jednotlivých stanovených alkaloidů tak, aby obsahy alkaloidů v neznámých vzorcích spadaly do rozsahu kalibračních řad. Rovnice získaných koncentračních závislostí byly použity pro stanovení jednotlivých alkaloidů v neznámých vzorcích pomocí dvou metod, lišících se přípravou vzorků a chromatografickými podmínkami (PE HPLC, SPE-HPLC).

Identifikace jednotlivých alkaloidů v chromatogramech byla provedena porovnáním retenčních časů standardu s retenčními časy pík analyzovaných vzorků.

Metodou PE-HPLC byla analýza alkaloidů v makovině provedena paralelně a interpretované výsledky jsou průměrem těchto dvou stanovení. Píky výsledných chromatogramů byly identifikovány a byly vypočítány obsahy jednotlivých alkaloidů.

V chromatogramech získaných metodou PE-HPLC byly zaznamenány pouze dva z pěti stanovovaných alkaloidů – morfin a kodein (obr. 2, tab. II).

Metodou SPE-HPLC byly analyzovány totožné vzorky. Ve výsledných chromatogramech byla taktéž provedena identifikace pík a byly vypočítány obsahy jednotlivých alkaloidů.

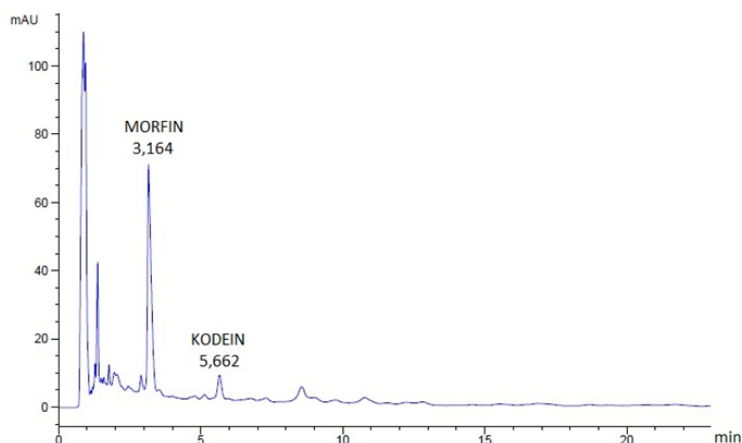
V chromatogramech získaných metodou SPE-HPLC bylo identifikováno všech pět alkaloidů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin (obr. 3, tab. III).

Naměřená data získaná analýzou vzorků oběma metodami byla srovnána z několika hledisek. Metody byly zhodnoceny z ekonomického hlediska, časové náročnosti

Tabulka I

Shrnutí dat, získaných proměřením kalibračních řad jednotlivých alkaloidů

Alkaloid	Metoda	Korelační koeficient	Rovnice přímky
Morfin	PE-HPLC	0,9997	$y = 0,1751x - 5,1331$
Kodein	PE-HPLC	0,9993	$y = 0,1860x - 3,5449$
Morfin	SPE-HPLC	0,9997	$y = 15,211x - 2,4029$
Kodein	SPE-HPLC	0,9995	$y = 10,853x + 1,2417$
Thebain	SPE-HPLC	0,9995	$y = 175,82x + 1,4766$
Papaverin	SPE-HPLC	0,9997	$y = 49,851x - 1,2950$
Noskapin	SPE-HPLC	0,9998	$y = 15,719x + 0,2686$



Obr. 2. Analýza neznámého vzorku metodou PE-HPLC

Tabulka II  
Obsahy alkaloidů stanovených metodou PE-HPLC

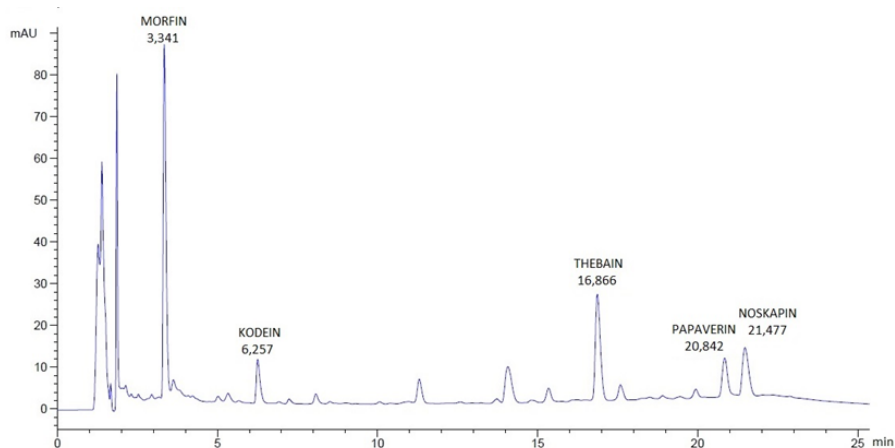
Laboratorní číslo	Obsah alkaloidů [%]	
	morfin	kodein
559	0,0375	—
3977	0,1191	0,0523
654	0,2184	0,0706
591	0,3028	0,0764
641	0,4313	0,1232
6087	0,4942	0,1152
6084	0,6564	0,1382
628	0,7351	0,1207
6089	0,9198	0,0992
551	1,4245	0,2119

či šetrnosti k životnímu prostředí. Srovnání stanovených obsahů se týkalo především alkaloidu morfinu, jakožto výhradního alkaloidu v máku setém, který je ukazatelem kvality makoviny<sup>2,9,10</sup>.

Z tab. IV je patrné, že metoda SPE-HPLC poskytuje výsledky porovnatelné, případně vyšší než metoda PE-HPLC. Nově modifikovaná metoda je výhodná z hlediska časového a z hlediska nižší spotřeby chemikálií, čímž je šetrná jak pro životní prostředí, tak i pro pracovní prostředí.

### Závěr

Tato práce byla zaměřena na vývoj nové metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení významných alkaloidů v makovině. Přímá extrakce alkaloidů z makoviny byla nahrazena extrakcí na pevnou fázi a kromě přípravy vzorků byly také modifikovány chromatografické podmínky.



Obr. 3. Analýza neznámého vzorku metodou SPE-HPLC

Tabulka III  
Obsahy alkaloidů ve vzorcích stanovených metodou SPE-HPLC

Laboratorní čísla	Obsahy alkaloidů [%]				
	morfin	kodein	thebain	papaverin	noskapin
559	0,0411	0,0076	–	–	–
3977	0,1582	0,0317	0,0014	–	–
654	0,2831	0,0994	0,0106	0,0223	0,0260
591	0,3875	0,0586	0,0028	0,0123	0,0394
641	0,4402	0,0780	0,0027	0,1019	0,0304
6087	0,5484	0,1690	0,0117	–	0,0259
6084	0,6623	0,1947	0,0111	–	0,0183
628	0,8281	0,1667	–	–	0,0148
6089	0,9460	0,1416	0,0635	0,0052	0,0176
551	1,4673	0,3463	0,0497	0,0028	0,0225

Tabulka IV  
Srovnání stanovených obsahů morfinu ve vzorcích analyzovaných metodou PE-HPLC a SPE-HPLC

Laboratorní číslo	Obsah morfinu [%]	
	PE-HPLC	SPE-HPLC
559	0,0375	0,0411
3977	0,1191	0,1582
654	0,2184	0,2831
591	0,3028	0,3875
641	0,4313	0,4402
6087	0,4942	0,5484
6084	0,6564	0,6623
628	0,7351	0,8281
6089	0,9198	0,9460
551	1,4245	1,4673

Uvedené výsledky prokázaly, že novou metodou SPE-HPLC lze stanovit porovnatelné, případně vyšší obsahy alkaloidu morfinu ve vzorcích makoviny. Metoda je časově méně náročná a vzhledem k nižší spotřebě organických rozpouštědel šetrnější jak pro životní prostředí, tak také pro pracovní prostředí laboratoře. Mimo jiné lze touto metodou stanovit kromě obsahu kodeinu a morfinu kvantitu dalších významných alkaloidů, jako je thebain, papaverin a noskapin, jež metodou PE-HPLC nebylo možné stanovit. V současné době je připravována validace metody SPE-HPLC, aby mohla být užívána ve firmě Oseva PRO s.r.o. jako rutinní, spolehlivá, přesná a rychlá metoda pro stanovení kvality makoviny při šlechtění máku setého.

#### LITERATURA

1. Baranyk P. a kol.: *Olejníny*. Profi Press, Praha 2010.
2. Bechyně M., Kadlec T., Vašák J. a kol.: *Mák*. Semafor, Praha 2001.
3. Vašák J. a kol.: *Mák*. Powerprint, Praha 2010.
4. Moravcová J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Interní studijní pomůcka. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha 2006.
5. Yoshimatsu K., Kiuchi F., Shimomura K., Makino Y.: *Pharm. Soc. Japan* 53, 11 (2005).
6. Petruczynik A.: *Centr. Europ. J. Chem.* 3, 10 (2012).
7. Stranska I., Skalicky M., Novak J., Matyasova E., Hejnak V.: *Ind. Crops Prod.* 41 (2013).
8. Interní metodika Oseva PRO: *Stanovení obsahu alkaloidů v máku setém (Papaver somniferum) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie*. Pořadové číslo 6.
9. Doležalová J., Zukalová H., Cihlár P., Vašák J.: Sborník z konference „*Prosperující olejníny*“, 9. - 10. 12. 2010.
10. Zukalová H., Cihlár P., Pšenička P., Vašák J.: Sdružení Český mák informuje, 7. Makový občasník. Sborník odborných seminářů Mák v roce 2008, ČZU v Praze (2008).

## ANALÝZA POVRCHŮ POLYMERŮ AKTIVOVANÝCH PLAZMATEM A NÁSLEDNĚ ROUBOVANÝCH VICINÁLNÍMI SLOUČENINAMI

SIMONA LUPÍNKOVÁ<sup>a</sup>, KAREL VÝBORNÝ<sup>b</sup>,  
MONIKA BENKOCKÁ<sup>a</sup>, NIKOLA SLEPIČKOVÁ  
KASÁLKOVÁ<sup>b</sup>, VÁCLAV ŠVORČÍK<sup>b</sup>, ZDEŇKA  
KOLSKÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, Ústecké materiálové centrum a katedra fyziky, České Mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem, <sup>b</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie, Ústav inženýrství pevných látek, Technická 5, 166 28 Praha  
zdenka.kolska@ujep.cz

### Úvod

Polymery jsou známy jako materiály s řadou excelentních vlastností (nízká hustota, pružnost, mechanická odolnost, chemická odolnost, aj.), díky nimž nacházejí uplatnění v mnoha oblastech průmyslu, medicíny, ale i běžného života<sup>1,2</sup>. Avšak vlastnosti, které jsou pro některé aplikace výhodné, mohou naopak limitovat použití polymerů jinde. Povrchové vlastnosti, jako např. povrchová chemie, polarita, povrchový náboj, drsnost i morfologie zásadním způsobem ovlivňují použití polymerů zejména v oblasti tkáňového inženýrství, kde jsou tyto vlastnosti důležité při procesu adheze, proliferace a diferenciaci buněk na povrchu<sup>1,2</sup>.

Proto se neustále vyvíjejí nové metody modifikace povrchů polymerů tak, aby byly zlepšovány povrchové vlastnosti pro konkrétní aplikace. Mezi používané metody patří úprava plazmatem, laserem, roubování nových funkčních skupin, či roubování kovových nanočástic na povrch, které zlepšují cytocompatibilitu povrchu<sup>3</sup>.

V této práci byly studovány povrchové vlastnosti nemodifikované polymerní folie polytetrafluorethylenu (teflonu) a změny povrchových vlastností po modifikaci plazmatem a následném naroubování vybraných vicinálních sloučenin. Folie byly nejprve vystaveny působení plazmatu a poté byly roubovány sloučeninami s různými funkčními skupinami (–OH, –SH, –NH<sub>2</sub>). Povrchové prvkové složení bylo studováno rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií, povrchová chemie a polarita elektrokinetickou analýzou a smáčivost povrchu stanovením statického kontaktního úhlu goniometricky, drsnost a morfologie povrchů byly stanoveny mikroskopií atomárních sil.

### Experimentální část

#### Materiál

Pro testování byla použita polymerní folie polytetrafluorethylenu (PTFE, tloušťka 50  $\mu\text{m}$ , hustota 2,20  $\text{g cm}^{-3}$  od firmy Goodfellow Ltd., UK). Pro roubování byly použity vicinální sloučeniny: (i) 2-aminoethanol (OH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) a (ii) 2-aminoethanthiol (cysteamin, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) od firmy Sigma-Aldrich spol. s r.o., ČR.

#### Působení plazmatu

Vzorky byly povrchově aktivovány plazmatem<sup>4</sup> pomocí DC Ar plazmatu v přístroji Balzers SCD 050 za následujících podmínek: pokojová teplota, čistota plynu 99,997 %, průtok 0,3  $\text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ , tlak 8 Pa, vzdálenost elektrod 50 mm, jejich plocha 48  $\text{cm}^2$ , objem komory ca 1000  $\text{cm}^3$ , objem plazmatu 240  $\text{cm}^3$ , výkon výboje 8,3 W, doba expozice 120 s.

#### Chemické roubování

Okamžitě po expozici v plazmatu byly vzorky vloženy do vodného roztoku (2 hm.%) 2-aminoethanolu nebo 2-aminoethanthiolu po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky omyty vodou a sušeny po dobu 48 hodin v Petryho miskách<sup>5</sup>.

#### Použité analytické metody

Povrchové vlastnosti všech vzorků (před modifikací, po působení plazmatu po dobu 120 s, po leptání ve vodě i po následném naroubování testovaných vicinálních sloučenin) byly stanoveny několika metodami: (i) elektrokinetickou analýzou, (ii) rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií, (iii) goniometricky a (iv) mikroskopií atomárních sil.

Elektrokinetická analýza (stanovení zeta potenciálu) vzorků bylo provedeno na přístroji SurPASS (Anton Paar, Rakousko). Vzorky byly měřeny v cele s nastavitelnou štěrbinou určené pro planární vzorky (adjustable gap cell), v elektrolytu 0,001  $\text{mol dm}^{-3}$  za pokojové teploty, atmosférického tlaku a při konstantním pH 6,5. Pro každé měření byl použit pár vzorků o stejném povrchu, vzorky byly připevněny na držáky vzorků (rozměr vzorku 2×1 cm, štěrbinu nastavena na ca 100  $\mu\text{m}$ ). Každý vzorek byl proměřen 4× s relativní odchylkou měření 5 %. Pro stanovení zeta potenciálu byly použity dvě metody, proudový potenciál a proud (streaming potential, streaming current), a pro výpočet zeta potenciálu byly použity rovnice Helmholtzova-Smoluchowskiho (HS) a Fairbrotherova-Mastinsova (FM)<sup>6</sup>.

Povrchová koncentrace jednotlivých prvků u vzorků byla stanovena rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Pro měření fotoelektronových spekter byl použit spektrometr Omicron Nanotechnology ESCAProbeP (chyba stanovení 10 %). Vzorek měl rozměr  $2 \times 3 \text{ mm}^2$ . Zdroj X-paprsků byl použit 1486,7 eV s krokem 0,05 eV. Spektra byla měřena na 5 rozdílných pozicích vzorků při úhlu  $0^\circ$  s ohledem na osu detektoru (kolmo na vzorek). Spektra byla vyhodnocena programem<sup>7</sup> CasaXPS. Koncentrace prvků jsou udány v at. %.

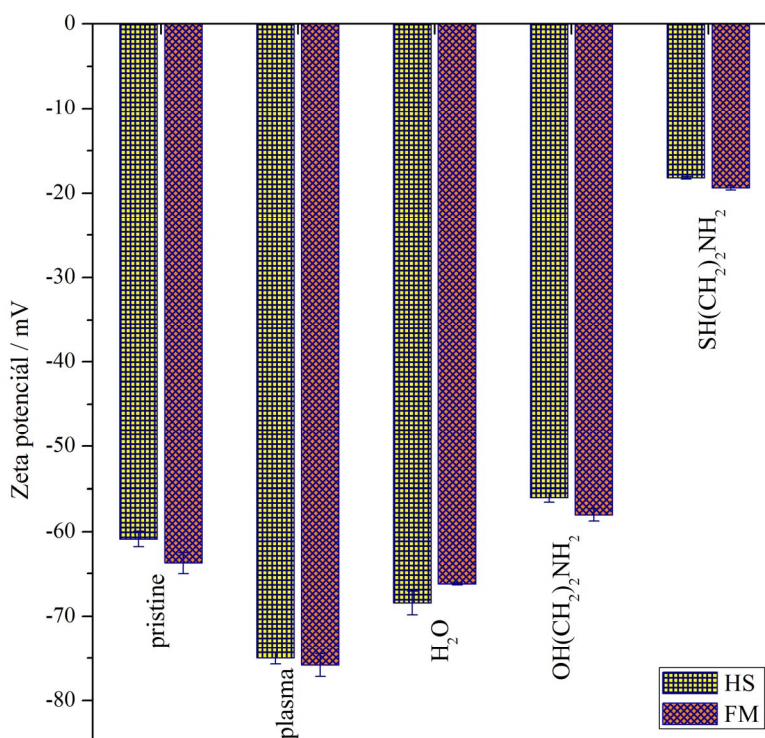
Povrchová smáčivost byla určena pomocí stanovení statického kontaktního úhlu jednotlivých vzorků. Kontaktní úhel kapky destilované vody byl stanoven goniometricky za laboratorní teploty na 10 pozicích dvou vzorků o stejném povrchu s použitím Surface Energy Evolution System (SEES, Masarykova Univerzita, Brno, ČR). Kapka o objemu  $8,0 \pm 0,2 \mu\text{l}$  byla nanášena automatickou pipetou (Transferpette Electronic Brand, Německo) a byly pořizovány jejich obrázky a následně vyhodnoceny.

Povrchová drsnost a morfologie všech vzorků byla studována mikroskopií atomárních sil (AFM) na přístroji VEECO CP II setup (tapping mode). Byla použita Si sonda RTESPA-CP s konstantou pružnosti  $20\text{--}80 \text{ N m}^{-1}$ . Stanovení bylo prováděno na plochách vzorků  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  nebo  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  a bylo provedeno 5 scanů vzorků<sup>8</sup>.

## Výsledky a diskuse

Již dříve bylo prokázáno<sup>5</sup>, že při interakci thiolů s povrchově aktivovanými polymery plazmatem dochází k jejich chemickému navázání (roubování) na povrch. Všechny analýzy byly provedeny na vzorcích PTFE (nemodifikovaný, modifikovaný plazmatem po dobu 120 s, následně leptaný vodou a následně roubovaný výše uvedenými vicinálními sloučeninami).

Hodnoty zeta potenciálu získané pro jednotlivé vzorky jsou prezentovány na obr. 1, z něhož je patrné, že všechny kroky modifikace vedou ke změnám povrchové chemie a povrchového náboje. Po působení plazmatu (obr. 1, plasma) jsou původní polymerní řetězce rozštěpeny a na povrchu vznikají reaktivní místa (volné radikály, dvojné vazby a polární kyslíkaté skupiny)<sup>7,9–11</sup>. Díky tomu dochází ke změnám chemického složení a polaritu povrchu, což se projeví i změnou zeta potenciálu v porovnání s původním nemodifikovaným vzorkem (obr. 1, pristine). Následným leptáním ve vodě dochází k částečnému rozpuštění degradačních produktů<sup>7</sup> a hodnoty zeta potenciálu (obr. 1, H<sub>2</sub>O) se posouvají k hodnotám podobným původnímu povrchu (pristine). Následné roubování vicinálních sloučenin má, podle očekávání, významný vliv na změnu chemického složení povrchu. Sloučeniny obsahující aminoskupinu způsobují, že povrch získává „pozitivnější“ náboj vlivem přítomnosti  $-\text{NH}_2$  skupin a tím vzrůstají hod-



Obr. 1. Hodnoty zeta potenciálu stanoveného na povrchu PTFE nemodifikovaného (pristine), modifikovaného plazmatem po dobu 120 s (plasma), leptaného vodou (H<sub>2</sub>O) a roubovaného v roztocích OH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> a SH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

Tabulka I

Koncentrace atomů C, O, F, S a N stanovených metodou XPS při úhlu  $0^\circ$  na povrchu PTFE nemodifikovaného (pristine), modifikovaného plazmatem po dobu 120 s (plasma), leptaného vodou ( $H_2O$ ), roubovaného  $OH(CH_2)_2NH_2$  a  $SH(CH_2)_2NH_2$

Vzorek	C(1s)	O(1s)	F(1s)	S(2p)	N(1s)
Pristine	30,4	–	69,6	–	–
Plasma	35,9	5,9	58,2	–	–
$H_2O$	36,8	6,0	57,2	–	–
$OH(CH_2)_2NH_2$	36,5	4,1	56,9	–	2,5
$SH(CH_2)_2NH_2$	41,3	7,1	44,7	3,1	3,8

noty zeta potenciálu. Významnější nárůst je patrný u roubování povrchu cysteaminem ( $SH(CH_2)_2NH_2$ ). Zde dochází, v porovnání s 2-aminoethanolem, k významně preferenčnímu roubování cysteaminu, který je vázán přes  $-SH$  skupinu k povrchu polymeru s volnou  $-NH_2$  skupinou „nad povrchem“.

Výše uvedené výsledky dokazují úspěšné naroubování vicinálních sloučenin na plazmatem modifikovaný (aktivovaný) povrch PTFE. Tyto závěry byly následně potvrzeny i stanovením přítomnosti jednotlivých prvků, které obsahují roubované vicinální sloučeniny (N a S) na povrchu aktivovaných vzorků pomocí XPS. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tab. I. Změny v povrchové chemii studovaných vzorků jsou patrné po všech krocích modifikace. Po působení plazmatu narůstá přítomnost kyslíku ve formě kyslíkatých polárních skupin<sup>7</sup>. Jak je dále patrné z tab. I, roubování sloučenin obsahujících aminoskupiny je prokázáno přítomností dusíku, chemické navázání sloučeniny s thiolovou skupinou potvrzuje přítomnost síry na povrchu polymeru. XPS stanovení jasně prokazují roubování všech studovaných sloučenin na povrch plazmatem aktivovaného PTFE.

Na cytokompatibilitu povrchu materiálů mají vliv nejen chemické složení povrchu vzorku a povrchový náboj, ale také smáčivost povrchu, jeho drsnost a morfologie. Hodnoty smáčivosti povrchu byly stanoveny goniometricky (měřením statického kontaktního úhlu). Tyto hodnoty

jsou pro jednotlivé vzorky PTFE shrnuty v tab. II, kde jsou také uvedeny hodnoty povrchové drsnosti získané metodou AFM.

Z tab. II je zřejmé, že nemodifikovaný PTFE je hydrofobní materiál (kontaktní úhel  $125^\circ$ ). Smáčivost povrchu se výrazně mění po jednotlivých krocích modifikace. Po působení plazmatu vznikají na povrchu polární kyslíkaté skupiny<sup>7</sup>, což významně zvyšuje smáčivost povrchu. Stárnutí polymeru vede naopak ke snížení smáčivosti povrchu v důsledku reorientace polárních kyslíkatých skupin z povrchu do objemové fáze<sup>9</sup>. Následným leptáním ve vodě dochází k částečnému rozpuštění degradačních produktů (nízkomolekulární oxidované polymerní segmenty)<sup>7</sup> a hodnoty kontaktních úhlů se mění směrem k hodnotám nemodifikovaného povrchu (leptán je „čerstvý“ vzorek). Po roubování jednotlivých sloučenin se také mírně mění smáčivost povrchu.

Z tab. II je také patrné, jak jednotlivé kroky modifikace mění drsnost povrchu. Zatímco působení plazmatu drsnost povrchu snižuje, neboť dochází k ablaci zejména amorfního podílu polymerního povrchu<sup>7</sup>. Následné roubování vicinálními sloučeninami drsnost povrchu vzorků naopak zvyšuje (zejména po naroubování 2-aminoethanolu).

V současné době jsou na našich pracovištích studovány další polymerní folie (vysokohustotní polyetylen, HDPE a poly L-mléčná kyselina, PLLA a další vicinální

Tabulka II

Hodnoty kontaktních úhlů stanovených goniometricky a povrchových drsností studovaných AFM povrchu PTFE nemodifikovaného (pristine), modifikovaného plazmatem po dobu 120 s (plasma) měřeného ihned po působení plazmatu („čerstvý“) a měřeného 14 dní po působení plazmatu („zestárlý“), leptaného vodou ( $H_2O$ ), roubovaného  $OH(CH_2)_2NH_2$  a  $SH(CH_2)_2NH_2$

Vzorek	Kontaktní úhel $\theta [^\circ]$	Drsnost $R_a [nm]$
Pristine	$125,0 \pm 2,6$	13,8
Plasma („čerstvý“)	$65,5 \pm 10,7$	9,7
Plasma („zestárlý“)	$92,3,6 \pm 3,5$	9,7
$H_2O$	$79,4 \pm 4,8$	10,0
$OH(CH_2)_2NH_2$	$86,4 \pm 8,6$	20,0
$SH(CH_2)_2NH_2$	$90,3 \pm 3,6$	11,6

sloučeniny (2-merkptoethanol, (SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH) a fosforylethanolamin, (PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)) s cílem sledovat vliv na cytocompatibilitu takto modifikovaných polymerů.

## Závěr

Použité analytické metody prokázaly změny povrchových vlastností PTFE po jednotlivých krocích modifikace a rovněž úspěšné naroubování testovaných vicinálních sloučenin na povrch polymeru modifikovaného plazmatem. Působení plazmatu způsobí štěpení polymerních řetězců, ablaci povrchu a vznik polárních kyslíkatých skupin na povrchu. To se projeví změnou chemického složení, povrchového náboje, povrchové drsnosti a zvýšením smáčivosti povrchu. Následné roubování vicinálních sloučenin je rovněž provázeno změnou smáčivosti povrchu, změnou povrchové chemie a náboje, což bylo prokázáno elektrokinetickou analýzou, metodou XPS i goniometricky. U cysteaminu byla navíc prokázána výrazná preference vazeb, kdy cysteamin se váže preferenčně přes -SH skupinu k plazmatem aktivovanému povrchu polymeru. „Nad povrchem“ polymeru byla prokázána „volná“ -NH<sub>2</sub> skupina, která způsobuje kladný náboj na povrchu. Toto preferenční vázání může mít zásadní vliv na cytocompatibilitu povrchu polymeru, neboť je známo, že buňky, které mají na svém povrchu „mírný“ záporný náboj, lépe adherují ke kladnému povrchu.

*Práce byla realizována díky finanční podpoře projektů GAČR 13-06609S a interní grantové agentury Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem v ČR (SGA projekt č. 5322215000101).*

## LITERATURA

1. Reisinger B., Fahrner M., Frischauf I., Yakunin S., Švorčík V., Fiedorowicz H., Bartnik A., Romanin C., Heitz J.: *Appl. Phys. A* 100, 511 (2010).
2. Siegel J., Řezníčková A., Chaloupka A., Slepíčka P., Švorčík V.: *Radiat. Eff. Defects Solids* 163, 779 (2008).
3. Goddard J. M., Hotchkiss J. H.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 698 (2007).
4. Švorčík V., Řezníčková A., Sajdl P., Kolská Z., Makajová Z., Slepíčka P.: *J. Mater. Sci.* 46, 7917 (2011).
5. Řezníčková A., Kolská Z., Siegel J., Švorčík V.: *J. Mater. Sci.* 47, 6297 (2012).
6. Kolská Z., Řezníčková A., Švorčík V.: *e-Polymers* 83, 1 (2012).
7. Řezníčková A., Kolská Z., Hnatowicz V., Stopka P., Švorčík V.: *Nucl. Instrum. Methods, B* 269, 83 (2011).
8. Slepíčka P., Kolská Z., Náhlík J., Hnatowicz V., Švorčík V.: *Surf. Interface Anal.* 41, 741 (2009).
9. Švorčík V., Kotál V., Slepíčka P., Bláhová O., Špírková M., Sajdl P.: *Nucl. Instrum. Methods, B* 244, 365 (2006).
10. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: *Chem. Listy* 106, 875 (2012).
11. Řezníčková A., Novotná Z., Kolská Z., Ulbrich P., Švorčík V.: *Chem. Listy* 108, 865 (2014).

## ANALÝZA POVRCHU POLYMÉROV OČKOVANÝCH CYSTEAMÍNOM PRE TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO

MICHAELA NAGYOVÁ<sup>a</sup>, ALENA  
ŘEZŇÍKOVÁ<sup>a</sup>, ZDEŇKA KOLSKÁ<sup>b</sup>,  
NIKOLA SLEPIČKOVÁ KASÁLKOVÁ<sup>a</sup>,  
PETR SLEPIČKA<sup>a</sup>, VÁCLAV ŠVORČÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav inženýrství pevných látek, Technická 5, 166 28 Praha, <sup>b</sup> Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, Ústecké materiálové centrum a katedra fyziky, České Mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem  
nagyoam@vscht.cz

### Úvod

Nízka cena, vhodné chemické a fyzikálne vlastnosti (napr. nízka hustota, pevnosť, odolnosť proti korózii, tepelné a elektrické vlastnosti) sú dôvodom čoraz častejšieho použitia polymérnych materiálov v rozličných oblastiach priemyslu (napr. automobilový, chemický, potravinársky), v elektronike či biotechnológiách. Biomateriály na báze polymérov zohrávajú významnú úlohu v napr. stomatológii, rekonštrukčnej medicíne a tkanivovom inžinierstve. V tejto súvislosti je dôležitým parametrom hydrofobita alebo hydrofilita povrchu. Nemodifikované polyméry sú väčšinou prirodzene hydrofóbne alebo neutrálne nabité. Vzhľadom k ich nízkej zmačavosti sú ťažko použiteľné pre kolonizáciu buniek. Jednou z možností, ako tento problém odstrániť bez ovplyvnenia objemových vlastností, je úprava povrchu<sup>1–4</sup>.

K fyzikálnym metódam modifikácie povrchu patrí napr. modifikácia plazmou, plameňom, UV-žiarením, pokovovanie a naprašovanie<sup>5,6</sup>. Mokrú chemickú techniku využívajú predovšetkým kyselinu chrómovú, dusičnú alebo manganistan draselný. K týmto technikám patrí aj očkovanie, ktorého podstatou je chemické naviazanie dvoch alebo viacerých odlišných materiálov, ktoré sa nedajú inak spojiť. Jedná sa hlavne o naviazanie polárnych skupín na nepolárny polymérny reťazec<sup>7,8</sup>.

V tejto práci bola kombinovaná modifikácia (aktivácia) povrchu polymérnych substrátov pomocou plazmy s následným očkovaním cysteamínom. Využitie rozličných analytických metód (charakterizácie zmien v povrchovej morfológii, analýza obsahu jednotlivých prvkov) poskytli dôležité informácie o úspešnosti očkovania cysteamínom a vplyve jednotlivých typov modifikácie na vlastnosti povrchu polymérov. Takto upravené povrchy sa javia ako perspektívna cesta k získaniu materiálov s vyhovujúcimi vlastnosťami aj pre tkanivové inžinierstvo, tj. pre pestovanie buniek.

### Experimentálna časť

K štúdiu boli použité nasledujúce polymérne substráty dodávané vo forme fólii: polyethyléntereftalát (PET, hrúbka fólie 23  $\mu\text{m}$ , hustota 1,30  $\text{g cm}^{-3}$ , Goodfellow Ltd., UK), kyselina polymliečna (PLLA, 50  $\mu\text{m}$ , 1,25  $\text{g cm}^{-3}$ , Goodfellow Ltd., UK), polytetrafluoroethylén (PTFE, 25  $\mu\text{m}$ , 2,20  $\text{g cm}^{-3}$ , Goodfellow Ltd., UK) a vysokohustotný polyethylén (HDPE, 40  $\mu\text{m}$ , 0,96  $\text{g cm}^{-3}$ , Granitol Ltd., CZ). Cysteamín (95 %) bol dodaný firmou Sigma-Aldrich, USA.

Vzorky boli najprv plazmaticky modifikované diódovým naprašovacím zariadením SPUTTER COATER 050 v režime leptanie pri izbovej teplote a pri nasledujúcich podmienkach: čistota pracovného plynu 99,997 %, rýchlosť prietoku 0,3  $\text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ , vzdialenosť medzi elektródami 50 mm a ich plocha 48  $\text{cm}^2$ , objem komory 240  $\text{cm}^3$ , výkon 8,3 W, doby modifikácie 120, 240 a 480 s. Následne boli vzorky vložené do 2% vodného roztoku cysteamínu na 24 h, prepláchnuté metanolom a osušené inertným plynom ( $\text{N}_2$ ).

Zloženie modifikovaných polymérov bolo študované na základe XPS spektier povrchových vrstiev na spektrometri Omicron Nanotechnology ESCAProbeP. Zdroj žiarenia bol monochromatický (1486,7 eV), exponovaná a analyzovaná oblasť mala rozmery 2×3  $\text{mm}^2$ . Spektrá boli merané krokovo s krokom väzbovej energie 0,05 eV. Chyba merania bola  $\pm 10\%$ . „Chémia“ povrchu bola študovaná meraním zeta potenciálu, ktorý bol stanovený pomocou elektrokinetického analyzátoru SurrPass (Anton Paar, Rakúsko) v „adjustable gap cell“, v roztoku elektrolytu KCl (0,001  $\text{mol dm}^{-3}$ ) pri teplote 25 °C, pH 6,0–6,3. Šírka štrbiny bola nastavená na 100  $\mu\text{m}$ . Každá vzorka bola premeraná 4× s relatívnou chybou  $\pm 10\%$ .

Zmačavosť povrchu pôvodných a modifikovaných vzoriek bola študovaná goniometricky. Merania prebiehali na prístroji Surface Energy Evaluation System (SEES, Masarykova univerzita, CZ). Kvapky destilovanej vody o objeme 8,0  $\pm$  0,2  $\mu\text{l}$  boli nanášané automatickou pipetou (Transferpette Electronic Brand, Nemecko). Chyba merania bola  $\pm 5\%$ .

Mikroskopia atomárnych síl (AFM) poskytla informácie o zmenách v povrchovej morfológii a drsnosti povrchu. Meranie bolo vykonané pomocou komerčného prístroja Digital Instruments CP II v poklepovom režime.

Adhézia a proliferácia hladkých svalových buniek (VSMC) na pôvodných a modifikovaných substrátoch bola študovaná metódou *in vitro*. Miera vplyvu modifikácie plazmou a očkovanie cysteamínom na interakcie bunka-substrát bola zisťovaná využitím fluorescenčnej mikroskopie. Skúmala sa morfológia, šírenie, homogenita v distribúcii, adhézia (24 hodín od nasadenia buniek)

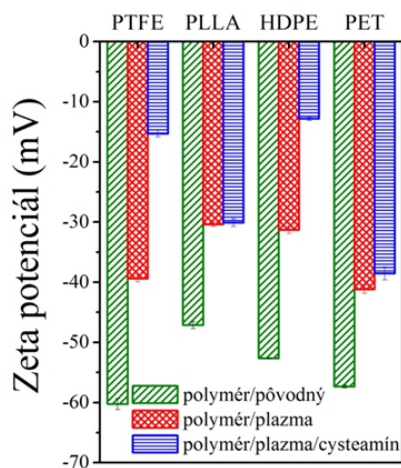


a proliferácia (3. a 6. deň od nasadenia) buniek hladkého svalstva (VSMC).

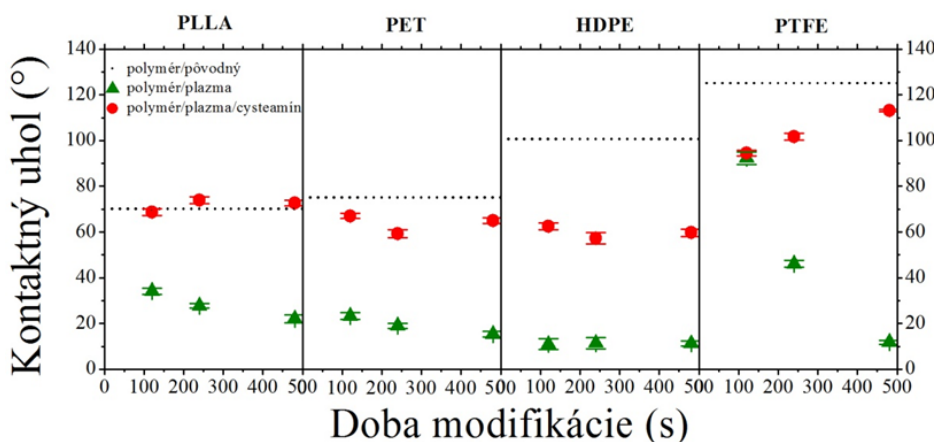
## Výsledky a diskusia

Pre túto prácu boli zvolené polárne (PLLA, PET) a nepolárne (HDPE, PTFE) polyméry, ktoré boli modifikované pomocou Ar výboja a následne očkované cysteamínom. Analytickými metódami boli študované povrchové vlastnosti polymérov, preferovaný spôsob naviazania cysteamínu a jeho vplyv na zmenu adhézie a proliferácie VSMC.

Elektrokinetický potenciál závisí na chemickom zložení povrchu, jeho polarite, morfológii a drsnosti<sup>11</sup>. Výsledky z merania zeta potenciálu sú znázornené na obr. 1. Je patrné, že namáhanie plazmou vedie k výraznému ná-



Obr. 1. Zeta potenciál polymérov: pôvodných, modifikovaných plazmou 120 s, modifikovaných 120 s a následne očkovaných cysteamínom



Obr. 2. Závislosť kontaktného uhla na dobe a type modifikácie

rastu zeta potenciálu, pretože sa mení náboj na povrchu, polarita a zloženie zapríčinené štiepením väzieb (C-H, C-C, C-O), vznikom nových reaktívnych miest a skupín na povrchu polyméru (podrobnejšie preberané pri XPS analýze). Po 120 s plazmatickej modifikácii a následnom očkovaní cysteamínom zeta potenciál badateľne narastie v prípade nepolárneho PTFE a HDPE, čo môže značiť, že cysteamín sa na povrch polyméru naviaže cez -SH skupinu a -NH<sub>2</sub> „trčí“ hore (-NH<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Naproti tomu u polárnych polymérov PET a PLLA sa zeta potenciál prakticky nemení, takže cysteamín sa pravdepodobne viaže bez výraznejšej preferencie.

Zmeny v zmáčavosti povrchu po modifikácii plazmou a po modifikácii a následnom očkovaní znázorňuje obr. 2. Modifikácia plazmou vedie k zníženiu kontaktného uhla, pričom najvýraznejšiu závislosť na dobe modifikácie vykazuje PTFE. Nárast zmáčavosti je zapríčinený tvorbou polárnych oxidických skupín vykazujúcich zvýšenú hydrofilitu<sup>10</sup>. Očkovanie cysteamínom má za následok nárast uhla zmáčavosti u všetkých polymérov. Len v prípade PLLA dosiahne hodnotu zrovnateľnú s hodnotou pôvodného polyméru.

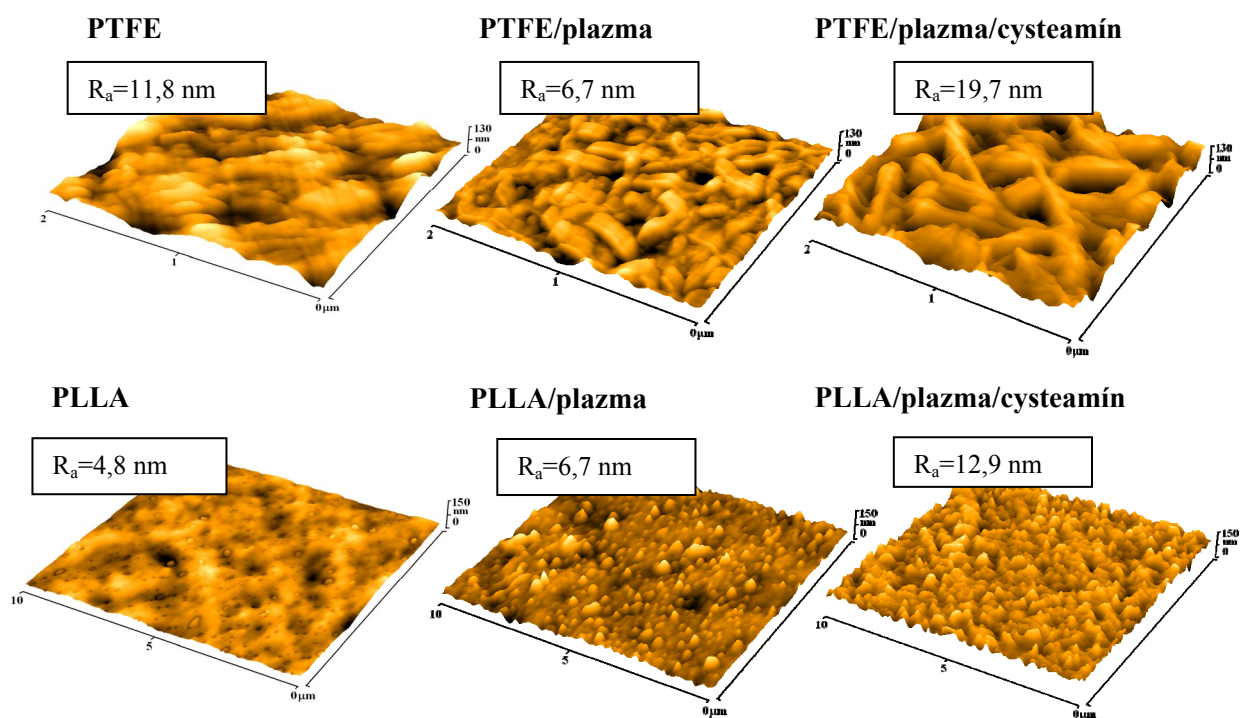
XPS analýzou, ktorej výsledky sú uvedené v tab. I, sa zistilo, že 120 s plazmatická modifikácia vedie k zvýšeniu koncentrácie kyslíka u PET, PTFE a HDPE, ktorá spôsobuje už spomínaný nárast zeta potenciálu (vznik -C=O, -COOH, -COO-, -OH skupín)<sup>12</sup>. Obsah kyslíka u PLLA sa v rámci presnosti merania nemení. Najvyššia koncentrácia síry (6,0 at.%) a dusíka (6,3 at.%) po očkovaní cysteamínom bola stanovená u PTFE. Naopak najnižšiu vykazujú polárne polyméry (PET, PLLA). Zrovnateľné hodnoty indikujú naviazanie cysteamínu bez preferencie, čo znamená, že počet väzieb polymér-NH<sub>2</sub> a polymér-SH sú v pomere 1:1. Tento predpoklad potvrdzujú aj výsledky zeta potenciálu (viz obr. 1).

V súvislosti s využitím polymérnych substrátov v tkanivovom inžinierstve je dôležitá adhézia a proliferácia buniek, ktorú ovplyvňuje polarita, chemické zloženie, vodivosť, drsnosť a morfológia povrchu<sup>13</sup>. Preto bola študo-

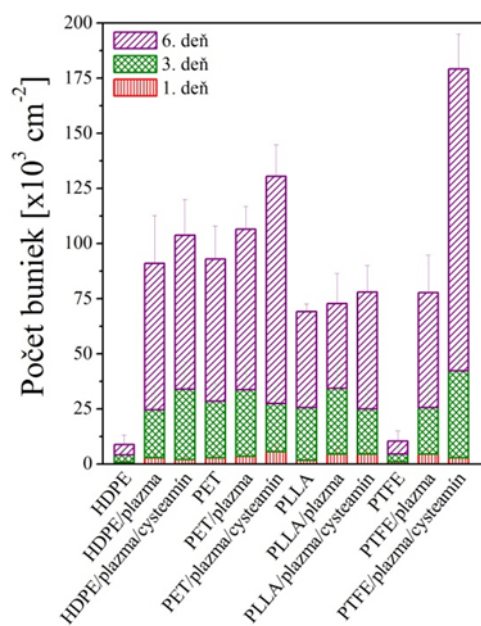
Tabuľka I

Koncentrácia prvkov získaná metódou XPS pre študované polyméry: (i) pôvodné, (ii) modifikované v plazme a (iii) modifikované v plazme a následne očkované cysteamínom

Substrát	Koncentrácia prvkov [%]				
	C (1s)	O (1s)	S (2p)	F (1s)	N (1s)
PET/pôvodný	72,5	27,5	–	–	–
PET/plazma 120 s	67,0	33,0	–	–	–
PET/plazma 120 s/cysteamín	72,2	21,2	2,7	–	3,9
PLLA pôvodný	66,9	33,1	–	–	–
PLLA/plazma 120 s	61,7	32,9	–	–	–
PLLA/plazma 120 s/cysteamín	73,4	21,9	1,8	–	2,9
PTFE/pôvodný	33,2	–	–	66,8	–
PTFE/plazma 120 s	44,5	8,8	–	46,7	–
PTFE/plazma 120 s/cysteamín	51,6	10,1	6,0	26,0	6,3
HDPE pôvodný	100	–	–	–	–
HDPE/plazma 120 s	79,6	20,4	–	–	–
HDPE/plazma 120 s/cysteamín	77,9	15,1	3,0	–	4,0



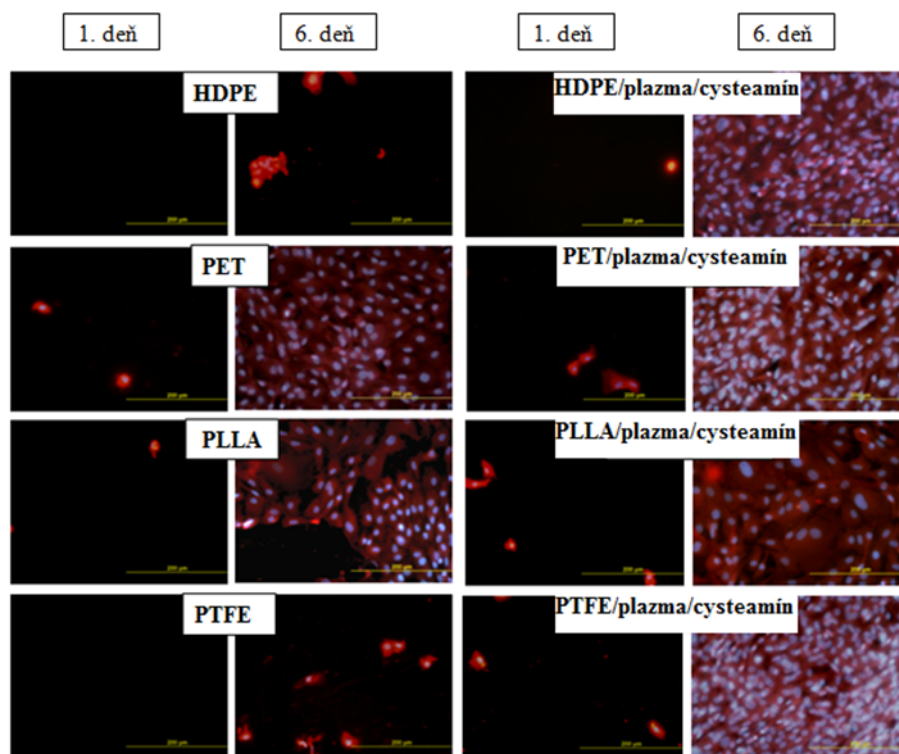
Obr. 3. AFM skeny polymérov: pôvodných, modifikovaných plazmou 120 s a modifikovaných plazmou 120 s a následne očkovaných cysteamínom



Obr. 4. Počet adherentných a proliferovaných buniek na polyméroch – pôvodných, modifikovaných plazmou 120 s, modifikovaných plazmou 120 s a následne očkovaných cysteamínom

vaná aj povrchová morfológia a drsnosť pripravených vzoriek. Povrchy PTFE a PLLA, u ktorých dochádza k najvýraznejším zmenám v drsnosti a morfológii, prezentujú AFM skeny na obr. 3. Po 120s modifikácii dochádza k zmene morfológie povrchu, dochádza k vytváraniu lamelárnych (PTFE, HDPE) alebo globulárnych štruktúr (PET, PLLA). Tieto štruktúry sú ešte viac „podporované“ očkovaním cysteamínom. Vysoká ablačná rýchlosť u PTFE býva pripisovaná prítomnosti vysoko reaktívnych fluórových radikálov vzniknutých v priebehu modifikácie v plazme<sup>14</sup>.

Z obr. 4 je evidentné, že namáhanie plazmou a tiež očkovanie cysteamínom vedie k nárastu počtu adherentných buniek v porovnaní s pôvodnými substrátmi<sup>9,15</sup>, ktorý môže súvisieť s tvorbou nových funkčných skupín (viz XPS-zvyšujúca sa koncentrácia O po namáhaní plazmou, naviazane S a N po očkovaní cysteamínom) a tiež zmenou drsnosti (viz obr. 3). Najvyšší počet proliferovaných buniek je pozorovaný u PTFE očkovaného cysteamínom (3. deň 42 262 a 6. deň 179 105 buniek/cm<sup>2</sup>), najnižší u pôvodného HDPE a PTFE. Rozdiely proliferovaných buniek v prípade PLLA modifikovaného plazmou a modifikovaného plazmou a následne očkovaného cysteamínom v porovnaní s pôvodným nie sú až tak výrazné. Príčinou môže byť to, že u PLLA ako u jediného polyméru nedochádza k zmene koncentrácie kyslíka po plazmatickej modifikácii, a tiež malé množstvo naviazaného cysteamínu.



Obr. 5. Adhézia a proliferácia buniek na substrátoch pôvodných a plazmaticky modifikovaných po dobu 120 sekúnd s následným očkovaním cysteamínom

Fotografie adherovaných (1. deň od nasadenia) a proliferovaných (6. deň od kultivácie) buniek na pôvodných a očkovaných polyméroch sú na obr. 5. Z neho je zrejmé, že polyméry očkované cysteamínom zlepšujú adhéziu a proliferáciu buniek. Na očkovaných substrátoch bunky zaujímajú svoj typický tvar a nezhlukujú sa, pričom bunky na pôvodných substrátoch sú malé a niektoré z nich nie sú adekvátne rozšírené.

## Záver

Využitím rozličných analytických metód boli získané informácie o vplyve vybraných postupov modifikácie na vlastnosti polymérnych substrátov a ich cytocompatibilitu. Základným poznatkom bolo úspešné očkovanie cysteamínom na všetky polymérne substráty, ktoré sa vopred plazmaticky aktivovali. Ten sa na povrch polymérov viaže buď pomocou -SH väzieb (PTFE, HDPE), alebo sa viaže bez výraznej preferencie (PET, PLLA). Modifikácia plazmou a očkovanie cysteamínom vedie k zmenám v povrchovej morfológii a drsnosti, pričom najvýraznejšiu závislosť vykazuje PTFE. Taktiež sa mení polarita (zmáčavosť) povrchu, ktorá sa po modifikácii plazmou zvyšuje (zníženie kontaktného uhla) a po očkovaní cysteamínom sa znižuje (zvýšenie kontaktného uhla). Obe typy modifikácie zlepšujú adhéziu a proliferáciu buniek. Takto modifikované polyméry by mohli byť využité napríklad v aplikáciách pre tkanivové inžinierstvo.

*Táto práca vznikla za podpory grantov GA ČR P108/12/1168 a 14-18149P.*

## LITERATÚRA

1. Lock E. H., Walton S. G., Fernsler R. F.: *Plasma Process. Polym.* 6, 234 (2009).
2. Slepíčka P., Trostová S., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Sajdl P., Švorčík V.: *Plasma Process. Polym.* 9, 197 (2012).
3. Alves P., Pinto S., de Sousa H. C., Gil M. H.: *J. Appl. Polym. Sci.* 122, 2302 (2011).
4. Svorcik V., Kotal V., Siegel J., Sajdl P., Mackova A., Hnatowicz V.: *Polym. Degrad. Stabil.* 92, 1645 (2007).
5. Abbasi F., Mirzadeh H., Katbab A. A.: *Polym. Int.* 50, 1279 (2001).
6. Švorčík V., Hubáček T., Slepíčka P., Siegel J., Kolská Z., Blahová O., Macková A., Hnatowicz V.: *Carbon* 47, 1770 (2009).
7. Barish J. A., Goddard J. M.: *J. Appl. Polym. Sci.* 120, 2863 (2011).
8. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: *Chem. Listy* 106, 875 (2012).
9. Slepíčka P., Slepíčková Kasálková N., Stránska E., Bačáková L., Švorčík V.: *eXPRESS Polym. Lett.* 7, 535 (2013).
10. Reznickova A., Kolska Z., Hnatowicz V., Stopka P., Svorcik V.: *Nucl. Instrum. Meth. B* 269, 83 (2011).
11. Zimmermann R., Bickert O., Gauglitz G., Werner C.: *Chem. Phys. Chem.* 4, 187 (2003).
12. Reznickova A., Kolska Z., Hnatowicz V., Svorcik V.: *J. Nanop. Res.* 13, 2929 (2011).
13. Gunnewiek M. K., Benetti E. M., Di Luca A., van Blitterswijk C. A., Moroni L., Vancso G. J.: *Langmuir* 29, 13843 (2013).
14. Wilson D. J., Williams R. L., Pond R. C.: *Surf. Interface Anal.* 31, 819 (2001).
15. Bacakova L., Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V.: *Biotechnol. Adv.* 29, 739 (2011).

## STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLICKÝCH LÁTEK A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA MORAVSKÝCH VÍN

ZUZANA NEORALOVÁ a BLANKA ŠVECOVÁ

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,  
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10  
Pardubice  
Blanka.Svecova@upce.cz

### Úvod

Víno je oblíbený alkoholický nápoj, který vzniká alkoholovým kvašením šťávy z hroznů vinné révy (*Vitis vinifera*). Pozitivní vliv vína na lidský organismus je v popředí zájmu jak vědců, tak samotných výrobců vína již několik let a na toto téma je také vydáváno mnoho laických i odborných publikací. Příznivé účinky vína se přisuzují zejména polyfenolickým látkám, jako jsou např. polyfenolické kyseliny, flavonoidy nebo stilbeny, z nichž je nejznámější resveratrol, přírodní fytoalexin, který se již dostal i do obecného povědomí konzumentů vína. Obsah polyfenolických látek je vyšší u červeného vína než u bílého<sup>1</sup>.

Při výzkumu polyfenolických látek jsou zkoumány a diskutovány především antioxidační účinky, tzn. schopnosti eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Tyto látky dále příznivě ovlivňují procesy regulace krevního tlaku a hladiny glukosy v krvi. Kromě prokázaných antioxidačních účinků vykazují i protizánětlivé a antimikrobiální účinky. Fenolické látky se vyskytují především v rostlinné říši, a proto jsou také nejčastěji sledovány v rostlinách či potravinách rostlinného původu<sup>2</sup>.

Pro analytické stanovení fenolických látek bývá velice často používána technika HPLC s různými typy detekce. Mezi ty citlivější lze zařadit elektrochemickou, multi-kanálovou coulometrickou detekci. Tento způsob detekce látek je velmi citlivý a selektivní, využívá se série 4–16 průtočných coulometrických cel, ve kterých dochází k elektrochemické přeměně analytu. Na každou celu je vložen jiný, ale konstantní potenciál a každá látka se oxiduje (nebo redukuje) při jiném potenciálu, ten je pak nazýván tzv. dominantním potenciálem. CoulArray detektor, používaný v této práci, je coulometrický multielektroodový detektor, který se používá pro detekci elektroaktivních látek<sup>3</sup>.

V posledních několika letech se velmi rozšířilo stanovení antioxidační aktivity. K tomuto účelu slouží několik metod, které jsou založeny na spektrofotometrickém měření poklesu či nárůstu absorbance např. po reakci s roztokem radikálu<sup>4–6</sup>.

V této práci byla stanovena antioxidační aktivita vzorků vín metodami ABTS, DPPH, FRAP a také byl stanoven celkový obsah fenolických látek pomocí činidla dle Folin-Ciocalteua.

### Experimentální část

#### Standards a chemikálie

Standards polyfenolických látek pro chromatografickou analýzu byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Jednalo se o fenolické kyseliny galovou ( $\geq 99\%$ ), protokatechuovou ( $\geq 97\%$ ), vanilovou ( $\geq 97\%$ ), kávovou ( $\geq 98\%$ ), syringovou ( $\geq 95\%$ ), *p*-kumarovou ( $\geq 98\%$ ) a ferulovou ( $\geq 99\%$ ). Další analyzované látky byly katechin ( $\geq 98\%$ ) a epikatechin ( $\geq 98\%$ ), vanilin ( $\geq 97\%$ ), piceid ( $\geq 95\%$ ) a resveratrol ( $\geq 99\%$ ). Ze standardů byl připraven směsný zásobní roztok o koncentraci  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pro každou látku a z toho byly ředěním připravovány pracovní roztoky pro vlastní měření. Redestilovaná voda byla připravena na přístroji Ultraclear na Univerzitě Pardubice, acetonitril (HPLC gradient grade) byl získán od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR), další používané chemikálie pro chromatografickou analýzu byly octan amonný ( $\geq 99\%$ ) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko) a kyselina octová (99,8%) od firmy Penta (Chrudim, ČR).

Standards a chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity byly následující: ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina), syntetický radikál DPPH (2,2-difeny-1-pikrylhydrazil), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-striazin), činidlo dle Folin-Ciocalteua, vše od Sigma-Aldrich (Praha, ČR), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tertarmethylchroman-2-karboxylová kyselina) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko), chlorid železitý, peroxodisíran draselný, oba od Sigma-Aldrich (Praha, ČR), methanol a ethanol (Penta Chrudim, ČR), uhličitán sodný a kyselina chlorovodíková od firmy J. T. Baker (Deventer, Nizozemí).

#### Vzorky a jejich úprava před analýzou

Vzorky moravských vín byly získány od soukromého vinaře z oblasti Morava (podoblast Mikulovská) a jednalo se o vzorky 8 červených a 2 bílých vín následujících odrůd: Zweigeltrebe, Modrý Portugal, Svatovavřínecké, Frankovka, Rulandské modré, Neronet, Ryzlink rýnský a Veltlínské zelené. Bylo analyzováno i červené víno prodávané od letošního roku (2013) v lékárnách pod názvem Bona Dea. Vzorky bílých vín byly analyzovány neředěné, vzorky červených vín byly ředěny redestilovanou vodou v poměru 1:2. Roztoky standardů i zředěných vzorků byly před analýzou zfiltrány přes stříkačkový filtr PTFE s velikostí pórů  $0,22 \mu\text{m}$ .

#### Podmínky chromatografické analýzy

Chromatografické stanovení vybraných polyfenolických látek bylo provedeno na kapalinovém chromatografu

vybaveném elektrochemickým detektorem CoulArray s osmi elektrochemickými celami (ESA, Chelmsford, MA, USA). Separace látek byla provedena na koloně Chromolith Performance (RP-18e, 100 × 4,6 mm) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Mobilní fáze sestávala z 10 mM octanu amonného okyseleného kyselinou octovou na pH ~ 3 (MF A) a složky MF B, která představovala 20 % MF A a 80 % acetonitrilu. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 1 ml min<sup>-1</sup>, byla použita gradientová eluce (0–10 min: 0 % MF B, 20 min: 15 % MF B, 35 min 30 % MF B), a teplota termostatu kolony byla 40 °C. Látky byly detegovány při potenciálech 100–800 mV s krokem po 100 mV. Dávkovaný objem vzorku byl 10 µl.

#### Postupy stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno jako stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteu činidla a metodami ABTS, DPPH a FRAP. Konkrétní postupy jednotlivých stanovení byly převzaty z literatury a dle potřeby upraveny.

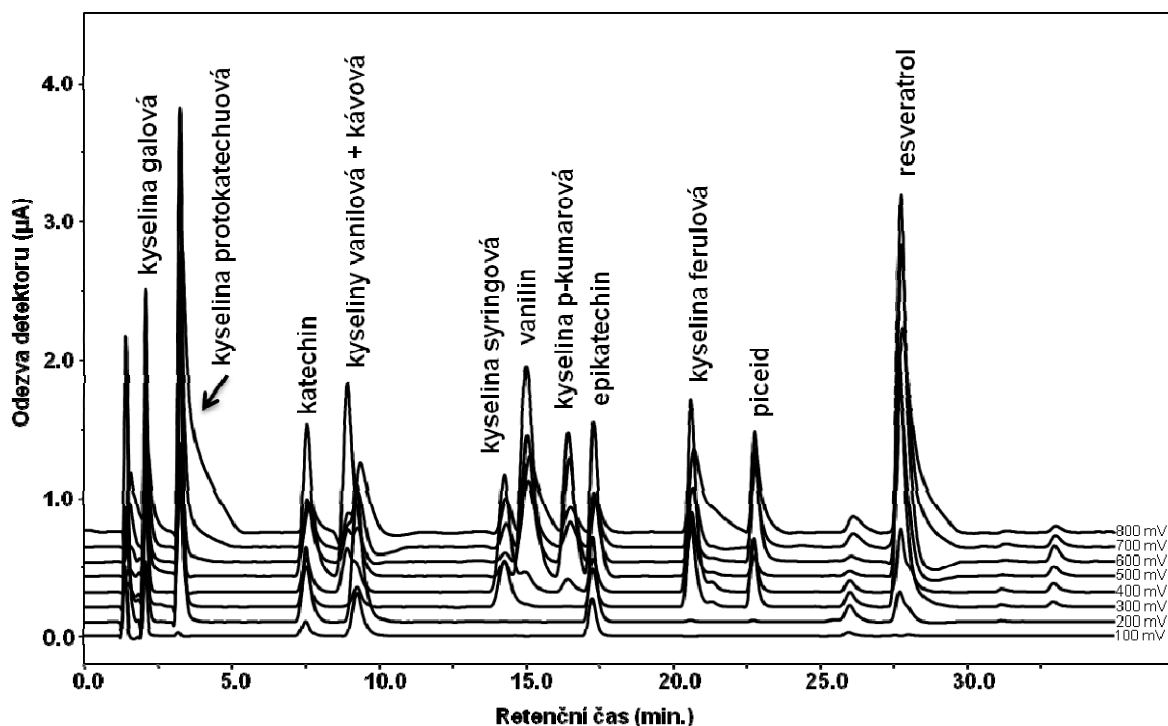
Stanovení celkového obsahu fenolických látek bylo provedeno pro vzorky i kalibrační řadu standardu Troloxu takto: 1 ml příslušně ředěného roztoku vzorku (nebo kalibračního roztoku) se smísil s 1 ml 95% ethanolu, 5 ml destilované vody, 0,5 ml činidla dle Folin-Ciocalteu a po

5 min stání se přidal 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Připravené roztoky se ponechaly reagovat v temnu po dobu 60 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby se proměřila absorbance při 765 nm.

Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS bylo provedeno pomocí roztoku radikál kationtu ABTS<sup>•+</sup>, který byl připraven reakcí diamonné soli ABTS s K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. K 5 ml tohoto roztoku bylo přidáno 500 µl vzorku ředěného vína (červené 100×, bílé 10×) a důkladně promícháno. Reakční směs se ponechala bez přístupu světla 30 min reagovat a poté byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm.

Stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH radikálem probíhalo po smísení 5 ml methanolickeho roztoku DPPH radikálu a 500 µl vzorku ředěného vína (červené 100×, bílé 10×). Reakční směs se ponechala 10 min reagovat v temnu. Poté byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 517 nm.

Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP bylo provedeno pomocí směsi roztoků FeCl<sub>3</sub> : TPTZ : octanový pufr (v poměru 1:1:10). K 5 ml této reakční směsi bylo přidáno 500 µl příslušně ředěného vzorku (červené víno 50×, bílé víno 10×) a po 30 min byl proměřen nárůst absorbance při vlnové délce 593 nm.



Obr. 1. Chromatogram směsi standardních látek; Podmínky analýzy: Kolona Chromolith Performance (RP-18e, 100 × 4,6 mm); mobilní fáze (A) 10 mM octan amonný okyselený kyselinou octovou na pH ~ 3, (B) 20 % (A) + 80 % acetonitrilu; průtok 1 ml min<sup>-1</sup>, gradientová eluce: 0–10 min: 0 % MF B, 20 min: 15 % MF B, 35 min: 30 % MF B, teplota 40 °C, detekce při potenciálech: 100–800 mV (krok 100 mV), dávkovaný objem vzorku 10 µl

## Výsledky a diskuse

Na počátku této práce byly optimalizovány podmínky chromatografické analýzy. Pro separaci látek byla vybrána monolitická kolona Chromolith s chemicky vázanou fází C18 a mobilní fáze byla zvolena podle předchozích zkušeností z našeho pracoviště a údajů v literatuře. Hodnota pH

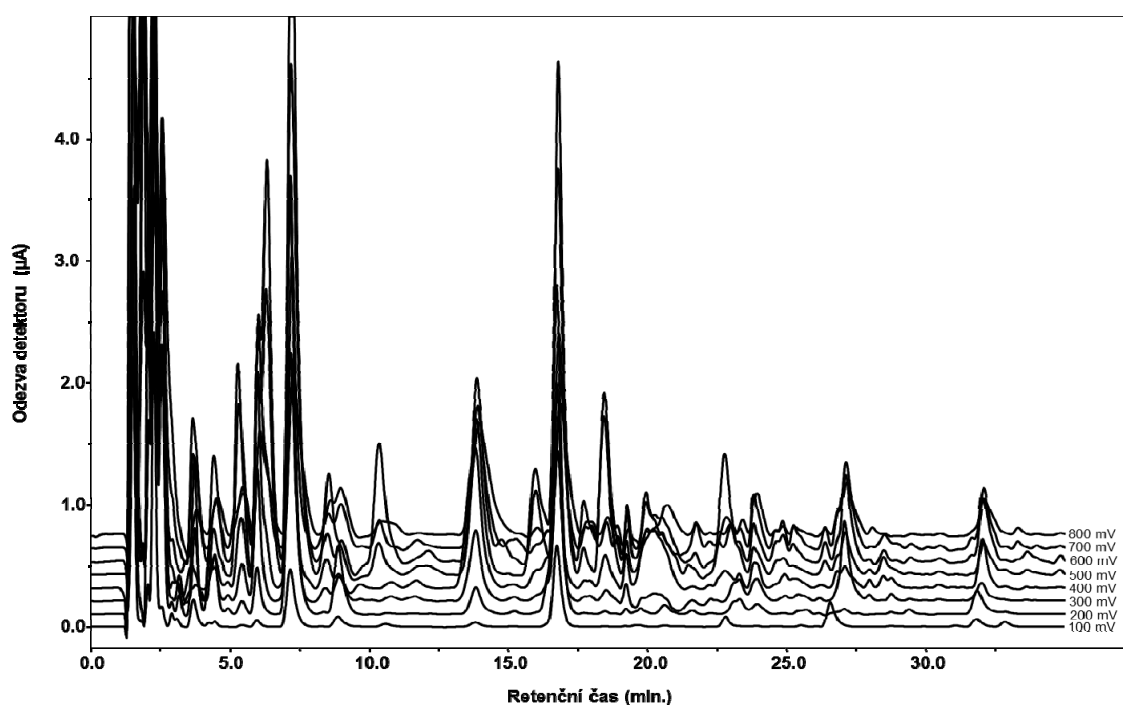
mobilní fáze byla upravována na požadovanou hodnotu pomocí koncentrované kyseliny octové, která byla doporučena výrobcem kolony Chromolith.

K optimalizaci chromatografických podmínek byly použity pracovní roztoky standardních látek o koncentraci  $3 \text{ mg l}^{-1}$  (kyselina protokatechuová  $6 \text{ mg l}^{-1}$ ). Chromatogram standardních látek při optimálních podmínkách je zobrazen na obr. 1.

Tabulka I

Meze detekce a stanovitelnosti standardních látek

Fenolické látky	Potenciál dominantního kanálu [mV]	Mez detekce [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Mez stanovitelnosti [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
Kyselina galová	200	4,7	15,6
Kyselina protokatechuová	300	5,8	19,2
Katechin	500	3,8	12,6
Kyselina syringová	400	9,9	32,9
Vanilin	500	6,5	21,7
Kyselina <i>p</i> -kumarová	500	7,2	23,9
Epikatechin	500	8,0	26,7
Kyselina ferulová	400	2,6	8,7
Piceid	600	8,3	27,8
Resveratrol	600	1,8	6,0



Obr 2. Ukázkový chromatogram červeného vína (Frankovka 2011); Podmínky analýzy: Kolona Chromolith Performance (RP-18e,  $100 \times 4,6 \text{ mm}$ ); mobilní fáze (A) 10 mM octan amonný okyselený kyselinou octovou na  $\text{pH} \sim 3$ , (B) 20 % (A) + 80 % acetonitrilu; průtok  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , gradientová eluce: 0–10 min: 0 % MF B, 20 min: 15 % MF B, 35 min 30 % MF B, teplota  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , detekce při potenciálech: 100–800 mV (krok 100 mV), dávkovaný objem vzorku  $10 \mu\text{l}$



Tabulka II

Antioxidační aktivita vzorků vína vyjádřená jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) v jednotkách mmol Troloxu na 1 litr vzorku

VZOREK	TEAC [mmol l <sup>-1</sup> ]			
	Celkový obsah fenol. látek	ABTS	DPPH	FRAP
ZWEIGELTREBE 2012 Svoboda	43,035 ± 0,293	12,954 ± 0,385	5,435 ± 0,311	7,919 ± 0,105
MODRÝ PORTUGAL 2012 Svoboda	43,864 ± 0,293	15,185 ± 0,338	7,567 ± 0,151	8,023 ± 0,126
MODRÝ PORTUGAL 2012 Strachotín	59,411 ± 0,586	18,877 ± 0,259	8,249 ± 0,151	10,546 ± 0,210
SVATOVAVŘINECKÉ 2012 Strachotín	45,315 ± 0,586	14,170 ± 0,338	6,629 ± 0,261	8,053 ± 0,084
FRANKOVKA 2012 Strachotín	49,461 ± 1,173	16,606 ± 0,361	7,305 ± 0,348	9,552 ± 0,021
RULANDSKÉ MODRÉ 2012 Strachotín	72,471 ± 0,879	21,518 ± 0,351	10,562 ± 0,261	13,010 ± 0,210
NERONET 2012 Strachotín	72,678 ± 0,586	22,739 ± 0,060	10,193 ± 0,261	12,401 ± 0,021
FRANKOVKA 2011 Strachotín	53,400 ± 0,293	17,496 ± 0,179	7,182 ± 0,174	10,502 ± 0,105
BONA DEA 2011 Resvinia	50,290 ± 0,586	20,625 ± 0,419	9,087 ± 0,087	10,131 ± 0,168
RYZLINK RÝNSKÝ 2012 Svoboda	5,236 ± 0,528	2,454 ± 0,057	0,531 ± 0,126	2,071 ± 0,097
VELTLÍNSKÉ ZELENÉ 2012 Svoboda	5,174 ± 0,147	1,901 ± 0,078	0,843 ± 0,137	1,958 ± 0,172

Během optimalizace se nepodařilo rozdělit kyseliny vanilovou a kávovou. Ostatní látky byly separovány v čase do 30 min. Pro deset rozdělených látek byly vyhodnoceny tzv. dominantní kanály a stanoveny meze detekce a stanovitelnosti (byly vyhodnoceny obvyklým způsobem jako trojnásobek resp. desetinásobek šumu základní linie). Získané hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Pro všech deset látek byly připraveny a proměřeny kalibrační závislosti v rozsahu: 1,5–15 mg l<sup>-1</sup> pro kyselinu galovou; 1–10 mg l<sup>-1</sup> pro kyselinu protokatechuovou; 0,5 až 5 mg l<sup>-1</sup> pro kyseliny syringovou, *p*-kumarovou a ferulovou; 0,5–15 mg l<sup>-1</sup> pro katechin a epikatechin; 0,5–5 mg l<sup>-1</sup> pro vanilin a piceid a 0,1–3 mg l<sup>-1</sup> pro resveratrol. Kalibrační závislosti obsahovaly minimálně 5 bodů a korelační koeficienty lineárních regresí R<sup>2</sup> byly ≥ 0,9946.

V další části práce byly optimální podmínky separace aplikovány na analýzu reálných vzorků. Jednalo se o 9 vzorků červeného a 2 vzorky bílého vína. Ukázkový chromatogram červeného vína je na obr. 2.

Ve vzorcích bylo nalezeno 8 látek ze zkoumaných standardů a z toho 6 bylo kvantifikováno: kyselina galová, protokatechuová a *p*-kumarová. Dále byl stanoven katechin, epikatechin a resveratrol. Obsahy těchto látek se pohybovaly v jednotkách až desítkách mg l<sup>-1</sup>. Nejhojněji zastoupenou látkou byla kyselina galová, jejíž obsah v červených vínech se pohyboval od 10,2 mg l<sup>-1</sup> do 39,8 mg l<sup>-1</sup>. Obsah kyseliny protokatechuové byl v rozmezí 2 až 4,5 mg l<sup>-1</sup>, kyselina *p*-kumarová byla průměrně zastoupena okolo 3 mg l<sup>-1</sup>. Výjimkou byla vína Frankovka 2011 a Modrý Portugal 2012, která obsahovala cca 10 mg l<sup>-1</sup>. Pro víno Bona Dea byla kyselina *p*-kumarová nejhojněji zastoupenou látkou ze stanovených, obsahovalo téměř 21 mg l<sup>-1</sup>. Obsah katechinu se ve vzorcích pohyboval v širokém rozmezí od 2,5 mg l<sup>-1</sup> (víno Frankovka 2012) až do 78 mg l<sup>-1</sup> (víno Rulandské modré

2012). Obsah epikatechinu byl průměrně cca 30 mg l<sup>-1</sup>, nejvíce ho bylo nalezeno v Rulandském modrém 2012, a to téměř 49 mg l<sup>-1</sup>. Obsah resveratrolu byl nejmenší ze stanovených látek jak v červených, tak v bílých vínech.

V analyzovaných červených vínech se jeho obsah pohyboval v rozmezí od 0,25 mg l<sup>-1</sup> ve víně Zweigeltrebe 2012 do 2,58 mg l<sup>-1</sup> ve víně Frankovka 2011. V bílých vínech bylo stanoveno pouze 45 a 48 µg resveratrolu v 1 litru. Podobně jako obsah resveratrolu byl v bílých vínech výrazně nižší obsah všech ostatních stanovovaných látek. Obsah sledovaných látek se ve dvou analyzovaných vzorcích bílých vín pohyboval mezi 1 a 3 mg l<sup>-1</sup>.

Výsledky stanovení antioxidační aktivity čtyřmi metodami jsou shrnuty v tab. II. Všechny výsledky jsou pro lepší porovnatelnost vztaženy k ekvivalentnímu množství Troloxu. Směrodatné odchylky výsledků jsou vždy vypočítány ze tří měření. Podobně jako u chromatografické analýzy je na první pohled patrný rozdíl mezi červenými a bílými víny. Výsledky ze stanovení antioxidační aktivity korespondují s výsledky získanými chromatografickou analýzou. Vína s vyššími obsahy sledovaných antioxidantů vykazovala také vyšší antioxidační aktivitu. Nejvyšší hodnoty TEAC byly získány při stanovení metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem (červená vína: 43–72 mmol Troloxu/1 litr vzorku, bílá vína cca 5 mmol l<sup>-1</sup>). Je tomu tak proto, že činidlo dle Folin-Ciocalteua reaguje s největší skupinou antioxidantů, kdežto ostatní metody jen s některými.

## Závěr

V této práci bylo analyzováno 11 vzorků moravských vín za účelem stanovení vybraných polyfenolických látek v nich obsažených a dále také určení jejich antioxidační



aktivity. Chromatografická analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu vybaveného elektrochemickým detektorem CoulArray. Z hledaných 12 fenolických látek se ve vzorcích podařilo kvantifikovat 6 látek, a to kyselinu galovou, protokatechuovou a *p*-kumarovou, dále katechin, epikatechin a resveratrol. Antioxidační aktivita vzorků vín byla stanovena metodami ABTS, DPPH, FRAP a také jako celkový obsah fenolických látek pomocí činidla dle Folin-Ciocalteu. Výsledky analýz prokázaly vyšší obsah polyfenolických látek v červených vínech než v bílých.

## LITERATURA

1. La Torre G. L., Saitta M., Vilasi F., Pellicano T, Dugo G.: *Food Chem.* 94, 640 (2006).
2. Rastija V., Srečnik G., Šarić M. M.: *Food Chem.* 115, 54 (2009).
3. Beňová B.: *Disertační práce*, Univerzita Pardubice (2008).
4. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174 (2004).
5. Kwak E. J., Lee J. Y., Choi I. S.: *J. Food Sci.* 77, 752 (2012).
6. Rebelo M. J., Rego R., Ferreira M., Oliveira M. C.: *Food Chem.* 141, 566 (2013).

## ANALÝZA VOLNÝCH A VÁZANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK VE SLADOVNICKÉM JEČMĚNI

HANA NOŽIČKOVÁ, ADÉLA JIRÁSKOVÁ  
a LENKA ČESLOVÁ

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,  
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10  
Pardubice  
lenka.ceslova@upce.cz

### Úvod

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin a jejich obsah v obilovinách závisí na velkém množství faktorů jako je typ obiloviny, část zrna, klimatické podmínky, postup pěstování, odrůda, zpracování, uskladnění a další. V ječmeni se fenolické látky vyskytují především v obalových částech obilky.

Fenolické látky ječmene jsou obsaženy v zrnu jednak volně a jednak vázané v buněčných stěnách s proteiny a polysacharidy. Při výrobě sladu dochází enzymovou činností k jejich uvolňování a to hlavně v průběhu klíčení ječmene<sup>1</sup>. Zastoupení a složení fenolických látek v sladovém šrotu je odlišné podle kvality zpracovávaného sladu. Na počátku varního procesu se ze sladového šrotu uvolňují pouze rozpustné fenolické látky. Látky, které během sladování zůstaly ve vázané formě, nelze při rmutování uvolnit. Obsah rozpustných fenolických látek ve sladu je tak nezanedbatelným faktorem pro kvalitu piva, protože 70–80 % těchto látek v pivu pochází ze sladu<sup>2</sup>. Zbýlých 20–30 % pak připadá na chmelové fenolické látky, které však nepodléhají takovému oxidačním změnám jako sladové, protože přichází do procesu výroby piva později<sup>1</sup>. Fenolické látky působí jako antioxidanty, čímž zabráňují oxidačním změnám piva a tedy jeho senzoričkému stárnutí. Tento proces může probíhat třemi mechanismy: 1) zachycení kyslíkových volných radikálů, 2) inhibice lipoxygenas, katalyzujících oxidaci mastných kyselin, 3) tvorba komplexů s kovovými ionty, které fungují jako katalyzátory oxidačních reakcí (železo, měď). Kromě antioxidačního účinku jsou fenolickým látkám připisovány účinky antitumogenní, antikarcinogenní, antimikrobiální, protizánětlivé, dále regulují krevní tlak a hladinu glukosy v krvi<sup>2</sup>.

Rozpustné fenolické látky lze z ječmene extrahovat do vodně-organických rozpouštědel. Jedná se především o volné, nekonjugované fenolické látky a o rozpustné konjugované látky se sacharidy s esterovou nebo etherovou vazbou<sup>3</sup>. Nerozpustné vázané fenolické látky je nutné nejprve z etherové nebo esterové vazby uvolnit kyselou nebo zásaditou hydrolýzou, v uvedeném pořadí<sup>4</sup>.

Pro analýzu fenolických látek v rostlinných matricích se nejvíce využívají, kromě řady spektroskopických metod, separační metody jak v kapalné, tak plynné fázi. Vel-

mi často je pro separaci a kvantifikaci využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) převážně s elektrochemickou, spektrofotometrickou (UV/VIS) či hmotnostně spektrometrickou detekcí. Oproti plynové chromatografii má výhodu v přímé analýze látek bez předchozí derivatizace<sup>5</sup>.

Cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro extrakci a chromatografickou analýzu rozpustných volných a nerozpustných vázaných fenolických látek v různých odrůdách sladovnického ječmene a ve sladu z ječmene připraveného.

### Experimentální část

Extrakt byly analyzovány pomocí HPLC s UV/VIS detekcí při dvou vlnových délkách 280 a 330 nm. Kapalinový chromatograf byl sestaven z čerpadla LC-20AD XR, degaseru DGU-20A5, UV/VIS detektoru SPD-20A (vše Shimadzu, Japonsko) a termostatu kolon LCO 102 (Ecom, Praha). K separaci byla použita kolona Ascentis Express C18 (250 × 4,6 mm) plněná povrchově porézními částicemi o velikosti 5 μm (Sigma-Aldrich, UK). Pro separaci byla použita mobilní fáze methanol (A) a voda (B) s přísadkou 0,3 % (v/v) kyseliny mravenčí do obou složek. Programované složení mobilní fáze bylo následující: 0 min – 20 % A, 10 min – 31 % A, 13 min – 31 % A, 20 min – 40 % A, 30 min – 80 % A, poté následuje návrat na původní podmínky a ustálení kolony. Po celou dobu byl udržován konstantní průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, teplota kolony 30 °C a nástřik 20 μl.

Optimalizace separace, zjištění účinnosti extrakce a kvantitativní analýza fenolických látek volných a vázaných ve sladovnickém ječmeni byla provedena s použitím standardů 22 fenolických látek: apigenin, myricetin, quercetin, rutin, taxifolin, vanilin, epikatechin, kaempferol, katechin, kyseliny ferulová, galová, gentisová, kávová, 4-hydroxybenzoová, chlorogenová, syringová, vanilová, sinapová, *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, a 3,4-dihydroxybenzoová (vše Sigma-Aldrich, UK).

Pro extrakci fenolických látek byl použit rozemletý sladovnický ječmen, který byl zbavený tuků extrakcí hexanem. Volné fenolické látky byly extrahovány pomocí různých organických rozpouštědel a jejich vodných roztoků (aceton, methanol). Pro jejich extrakci byl zvolen jako nejlepší 70% (v/v) aceton. Dále byla provedena kyselá hydrolýza pomocí HCl (Lachema, Neratovice) a alkalická hydrolýza pomocí NaOH (Lachema, Neratovice) k uvolnění vázaných fenolických kyselin z etherové (HCl) nebo esterové (NaOH) vazby pomocí modifikovaného postupu dle Chandrasekara<sup>4</sup>. Po hydrolýze byly fenolické kyseliny extrahovány do diethyletheru nebo do směsi diethylether:ethylacetát (1:1). Po extrakci bylo rozpouštědlo

odpařeno, odparek rozpuštěn ve 20% (v/v) okyseleném methanolu (počáteční podmínky gradientu) a po filtraci byl nadávkován do HPLC. Dle Nardini byla při alkalické hydrolyze přidána kyselina askorbová a EDTA, kdy nedocházelo k degradaci fenolických kyselin (především kyseliny galové a kávové)<sup>6,7</sup>.

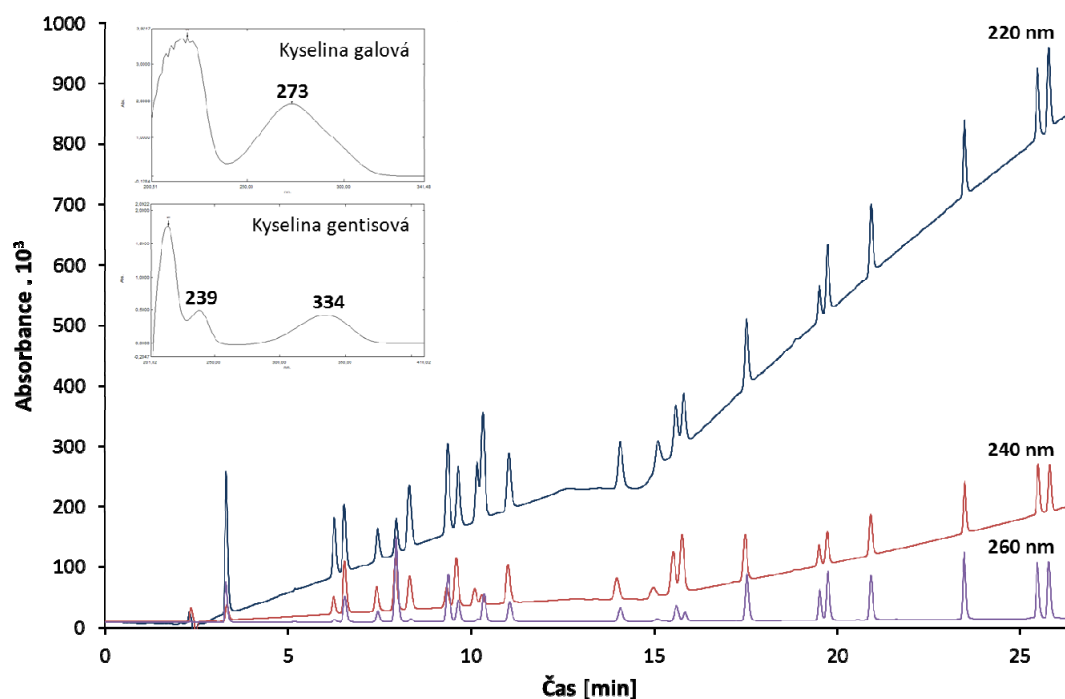
## Výsledky a diskuse

V první fázi práce musela být provedena optimalizace separace dvaceti dvou fenolických látek, které by dle literatury měly být v obilovinách zastoupeny nejvíce<sup>3–5</sup>. K optimalizaci bylo vybráno celkem šest kolon s různou chemicky vázanou stacionární fází (C18, C8, fenyl-hexyl, pentafluorfenyl) plněné povrchově porézními částicemi od různých výrobců. U každé kolony byly měřeny retenční charakteristiky jednotlivých fenolických látek při dvou

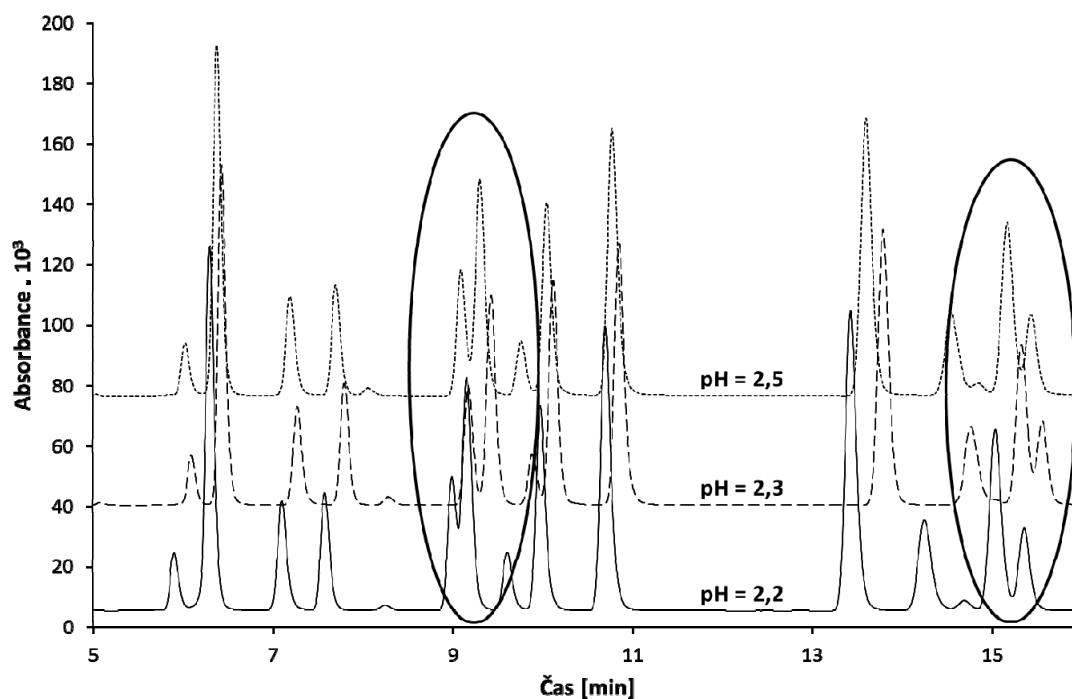
Tabulka I

Retenční časy jednotlivých standardů pro optimalizovaný gradient

Standard	$t_R$ [min]	Standard	$t_R$ [min]
Kyselina galová	3,24	Kyselina <i>p</i> -kumarová	13,65
Katechin	6,03	Taxifolin	14,57
Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová	6,38	Kyselina ferulová	15,22
Kyselina chlorogenová	7,22	Kyselina sinapová	15,50
Kyselina 4-hydroxybenzoová	7,72	Kyselina <i>m</i> -kumarová	17,23
Kyselina gentisová	8,24	Rutin	19,30
Kyselina vanilová	9,12	Kyselina <i>o</i> -kumarová	19,54
Kyselina kávová	9,33	Myricetin	20,72
Epikatechin	9,80	Quercetin	23,33
Kyselina syringová	10,08	Kaempferol	25,36
Vanilin	10,80	Apigenin	25,68



Obr. 1. Chromatogramy zaznamenané při různých vlnových délkách



Obr. 2. Vliv pH na separaci fenolických látek

koncentracích izokratické separace a při dvou lineárních gradientech s rozdílnou strmostí. Pomocí optimalizačního software (LC Simulator, ACD/Labs, Kanada) byl spočítán optimální gradient pro separaci všech fenolických látek v co nejkratší době. Tento gradient byl vyzkoušen v praxi a mírně upraven, aby rozlišení pro všechny kritické páry bylo minimálně  $R=1$ . Minimálně jednotkové rozlišení bylo dosaženo pro všechny látky s využitím kolony Ascentis Express (250 × 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  částice). Gradient je uvedený v experimentální části, retenční časy jednotlivých látek jsou uvedeny v tab. I.

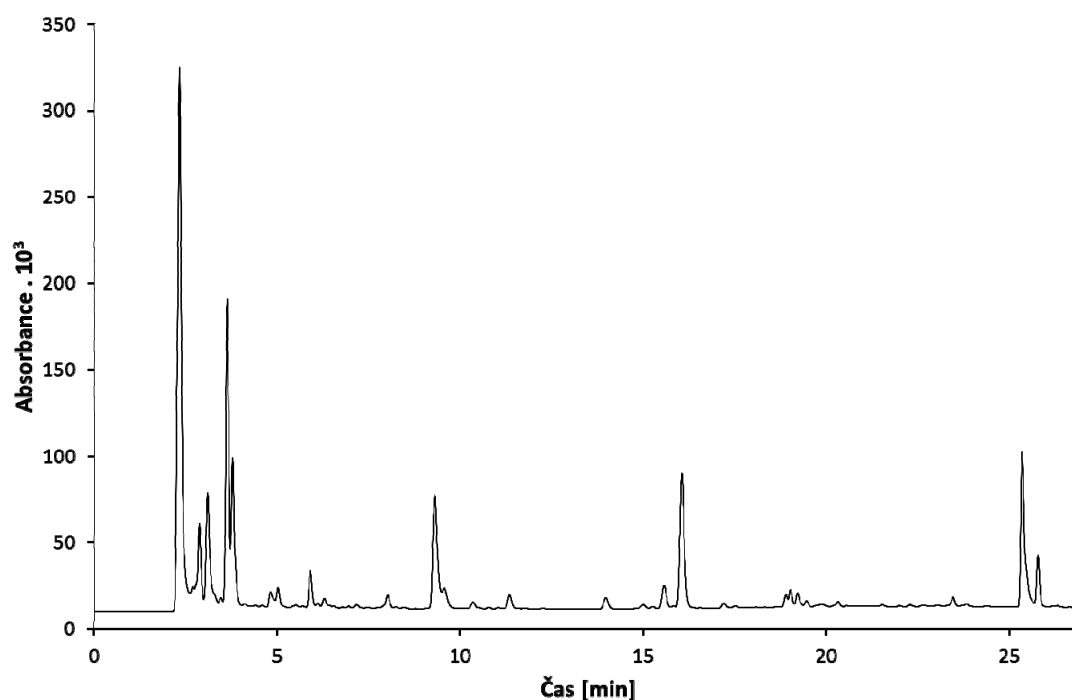
Vzhledem k velmi rozdílné absorpci UV/VIS záření u jednotlivých látek byly pro detekci všech látek zvoleny dvě vlnové délky (280 nm a 330 nm), při kterých absorpce většiny látek byla v okolí absorpčního maxima. U kratších vlnových délek, kde je intenzita absorpce těchto látek také vysoká, však již dochází k absorpci organické složky mobilní fáze (methanol) a tudíž ke driftu nulové linie. Tento drift nulové linie by bez korekce pozadí komplikovalo kvantitativní analýzu (obr. 1).

Vzhledem k disociaci fenolických kyselin je jejich separace velmi ovlivněna změnou pH (obr. 2). Proto bylo do obou složek přidáváno 0,3 % (v/v) HCOOH, kdy by měla být potlačena disociace kyselin. Vzhledem k nestabilní hodnotě pH vody bylo nutné kontrolovat přísadku HCOOH a upravit pH této složky mobilní fáze na hodnotu 2,5. Při tomto pH bylo rozlišení jednotkové pro všechny kritické páry (obr. 2).

Dále byla optimalizována extrakce jak volných, tak vázaných fenolických látek. Pro extrakci volných rozpustných fenolických látek byla vybrána dvě organická rozpouštědla a jejich vodné roztoky (70, 80 a 100% (v/v) methanol a aceton). Pro extrakci byl vybrán 70% (v/v) aceton, kde byla pozorována nejmenší ztráta fenolických látek. Pro analýzu nerozpustných vázaných fenolických látek byla nutná alkalická hydrolyza třepáním 4 h s NaOH k porušení esterových vazeb. Alkalická hydrolyza byla provedena v přítomnosti EDTA a askorbové kyseliny, kdy nedochází k degradaci fenolických kyselin, hlavně kyseliny galové a kávové<sup>6,7</sup>.

Pro porušení etherové vazby byla dále provedena kyselá hydrolyza vařením 45 min s HCl. Po hydrolyze (kyselá nebo alkalická) následovala extrakce do směsi diethylether:ethylacetát (1:1), do které fenolické látky přecházejí lépe než do samotného diethyletheru. Ukázka chromatografické separace vázaných fenolických látek po kyselé hydrolyze ječmene je uvedena na obr. 3.

V neposlední řadě byly proměřeny kalibrační roztoky jednotlivých fenolických látek a sestrojena kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  až 50  $\text{mg l}^{-1}$ . Na základě retenčních charakteristik a kalibračních závislostí byly identifikovány fenolické látky obsažené v různých odrůdách ječmene a sladu a stanoven jejich obsah.



Obr. 3. Chromatografická separace vázaných fenolických látek po kyselé hydrolyze

### Závěr

Byla optimalizována extrakce volných a vázaných fenolických látek z ječmene a ze sladu. Jako nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci volných fenolických látek byl vybrán 70% (v/v) aceton. Analýza vázaných fenolických látek byla provedena po zásadité a kyselé hydrolyze následované extrakcí směsí diethylether:ethylacetát (1:1). Extrakty volných a vázaných fenolických látek byly analyzovány optimalizovanou metodou kapalinové chromatografie. Pro identifikované fenolické látky byl zjištěn jejich obsah na základě kalibračních závislostí sestavených pro jednotlivé standardy. Obsah volných a vázaných fenolických látek byl stanoven pro různé druhy ječmene z různých lokalit a sladů z nich připravených.

### LITERATURA

1. Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.: *Pivovarství - Teorie a praxe výroby piva*, str. 863. VŠCHT, Praha 2010.
2. Mikyška A., Hartman I., Hašková D.: *Kvasný průmysl* 57, 182 (2011).
3. Nack M., Shahidi F.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523 (2006).
4. Chandrasekara A., Shahidi F.: *J. Funct. Food* 3, 144 (2011).
5. Nack M., Shahidi F.: *J. Chromatogr. A* 1054, 95 (2004).
6. Nardini M., Cirillo E., Natella F., Mencarelli D., Comisso A., Scaccini C.: *Food Chem.* 79, 119 (2002).
7. Nardini M., Ghiselli A.: *Food Chem.* 84, 137 (2004).

## METODY CHIROPTICKÉ SPEKTROSKOPIE – NÁSTROJ V DIAGNOSTICE DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ?

LUCIE PIECKOVÁ<sup>a</sup>, MICHAL TATARKOVIČ<sup>a</sup>,  
TEREZA VOSTRACKÁ<sup>a</sup>, ZDENĚK FIŠAR<sup>b</sup>,  
ROMAN JIRÁK<sup>b</sup>, JIŘÍ RABOCH<sup>b</sup> a VLADIMÍR  
SETNÍČKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

<sup>b</sup> Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita  
Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze,  
Ke Karlovu 11, 121 08 Praha 2  
lucie.p@gmail.com

### Úvod

Degenerativní onemocnění jsou celosvětově významným problémem nejen zdravotním, ale i sociálně-ekonomickým. Stárnutí populace má za následek zvyšující se počet nemocných s kognitivními poruchami a s tím spojené rostoucí náklady na zdravotní péči. Jednou z chorob, za jejichž hlavní rizikový faktor je pokládán věk, je Alzheimerova nemoc (AN). Tímto progresivním neurodegenerativním onemocněním je celosvětově postiženo více než 35 milionů lidí a jedná se o nejčastější formu demence u populace starší 65 let (cit.<sup>1</sup>). Nicméně AN nemusí být nutně důsledkem stárnutí, druhým nejvýraznějším rizikovým faktorem AN je rodinná zátěž<sup>2</sup>.

Charakteristickým neuropatologickým znakem AN je zvýšená přítomnost amyloidních plaků, tvořených proteinem A $\beta$ , a neurofibrilárních klubek hyperfosforylovaného proteinu tau ve specifických oblastech mozku. Hromadění abnormálních proteinů a tvorba nerozpustných struktur zasahují do metabolismu mozku a normální funkce neuronů<sup>3</sup>. Významným rysem je také chronický zánět, za který jsou odpovědné mozkové mikroglie. Zda jsou zmíněné patologie příčinou onemocnění, výsledkem působení nemoci nebo ochrannou odpovědí organismu, není dosud známo<sup>4</sup>.

Diagnostika AN je založena na posouzení rodinné i osobní anamnézy a výsledcích neurologických a psychologických testů. Ty bývají doplněny o výsledky zobrazovacích metod, nejčastěji magnetické rezonance (MRI) při použití tzv. volumetrických metod, stanovujících objem hipokampů, nebo počítačové tomografie (CT) mozku a dalších podpůrných laboratorních vyšetření<sup>4</sup>. Jedná se o tzv. diferenciální diagnózu, která stanoví AN pouze s určitým stupněm pravděpodobnosti. Definitivní diagnózu AN lze určit až po rozboru mozkové tkáně. Mozková biopsie se však díky značné invazivitě v praxi neprovádí<sup>5</sup>.

Přesná diagnostika AN, která by byla schopna rozpoznat prodromy i raná stadia nemoci, je obtížná. Počáteční příznaky jsou společné více onemocněním a metody citlivé na specifickou patologii AN nejsou k běžné klinické dia-

gnostice dostupné (např. zjišťování depozit mozkového A $\beta$  pomocí pozitronové emisní tomografie při využití substance PiB). Některá podpůrná laboratorní vyšetření jsou navíc značně invazivní a pacienti jsou často odmítána (lumbální punkce)<sup>4</sup>.

Jelikož se nemoc vyznačuje hromaděním proteinů s abnormální konformací, jeví se být vhodným nástrojem pro diagnostiku Alzheimerovy choroby zkoumání krevních vzorků chiroptickými metodami, které jsou inherentně citlivé na prostorovou strukturu chirálních biomolekul, včetně proteinů, vyskytujících se v krevních vzorcích.

Možnosti diagnostiky AN pomocí chiroptických metod byly zkoumány v této práci. Aplikovány byly spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a Ramanovy optické aktivity (ROA) ve spojení s Ramanovou a infračervenou (IČ) absorpční spektroskopií. Ke spektroskopickým analýzám byly využity vzorky krevní plazmy pacientů s AN a zdravých jedinců. Aby bylo možno sledovat spektrální rozdíly mezi jednotlivými skupinami, byla získaná spektrální data podrobena vyhodnocení vícerozměrnými statistickými metodami.

### Experimentální část

V práci bylo analyzováno 25 vzorků krevní plazmy zdravých kontrolních jedinců a 28 vzorků nemocných Alzheimerovou chorobou, konkrétně 5 vzorků pacientů s mírnou, 13 se střední a 10 s těžkou formou této nemoci.

Krevní vzorky byly odebrány na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN v Praze, kde rovněž byly zpracovány a získaná krevní plazma byla ihned zmrazena při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Do Laboratoře medicínské diagnostiky na Ústavu analytické chemie VŠCHT byla transportována v termoboxu za teploty suchého ledu a v laboratoři uchovávána v hlubokomrazicím boxu Lab 11/EL19L (Elcold, Dánsko) při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Před měřeními byly vzorky krevní plazmy pozvolna rozmrazeny při laboratorní teplotě a dle metodiky publikované dříve<sup>6,7</sup> zfiltrovány přes filtr s póry  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  (Millipore, Německo) na odstředivce KR 22i (Jouan, Francie) při přetížení  $13\,000\text{ G}$  po dobu 10 min. Spektroskopií ECD byla měřena spektra vzorků  $4\times$  ředěných sterilním fosfátovým pufrům. U ostatních metod byla snímána spektra neředěných vzorků krevní plazmy.

Spektra ECD byla měřena na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Byla použita rozebíratelná křemenná květa o tloušťce měřené vrstvy  $0,01\text{ mm}$  (Hellma, Německo).

IČ spektra byla měřena při rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$  na spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR) na ZnSe krystalu za laboratorní teploty.

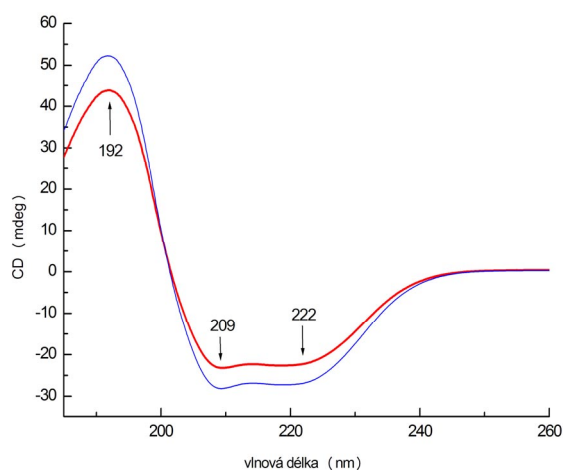
Ramanova a ROA spektra byla měřena současně na spektrometru ChiralRaman-2X (Biotools, USA), který je vybaven laserem Opus (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Byla použita křemenná kyveta o rozměrech 4×4 mm (Biotools, USA). Ke vzorkům byl přidáván jodid sodný jako fluorescenční zhašedlo. Pro redukci fluorescenčního pozadí bylo na vzorek po dobu 12 hodin svíceno laserem při výkonu 280 mW. Následovalo vlastní měření Ramanových a ROA spekter při výkonu laseru 250 mW s celkovou dobou expozice 24 hodin. U získaných spekter proběhla korekce základní linie prostřednictvím filtrace využívající Fourierovu transformaci. Spektrum bylo vyhlazeno až do míry odstranění veškerého signálu kromě pozadí a odečteno od původního spektra<sup>7,8</sup>.

Lineární diskriminační analýza (LDA) byla provedena pro kombinaci všech čtyř použitých spektrálních metod. Statistickému vyhodnocení tedy bylo podrobena celkem 22 vzorků krevní plazmy rozdělených do kategorií dle klinické diagnózy. Vyhodnocovány byly především spektrální oblasti významné pro sekundární strukturu proteinů.

## Výsledky a diskuse

### Spektroskopie ECD

Spektroskopii ECD a IČ spektroskopii byly měřeny vzorky 28 pacientů s AN v různých stádiích nemoci a 25 kontrolních jedinců. V získaných spektrech ECD (obr. 1) lze pozorovat dva negativní pásy s maximy ~ 209 a ~ 222 nm a pozitivní pás s polohou maxima ~ 192 nm. Jedná se o spektrální oblasti, kde se projevují  $n-\pi^*$  (210 až 230 nm) a  $\pi-\pi^*$  (185–200 nm) přechody peptidové vazby. Spektra ECD zde tedy reflektují sekundární strukturu peptidů a bílkovin, v tomto případě konkrétně  $\alpha$ -helikální konformaci<sup>9,10</sup>.



Více než polovinu celkové koncentrace plazmatických proteinů představuje albumin, který vykazuje vysoké zastoupení  $\alpha$ -helikální konformace<sup>6</sup>. Dominantní pásy ve spektrech ECD jsou tedy velmi ovlivněny přítomností právě tohoto proteinu.

Při porovnání spekter vzorků zdravých jedinců a pacientů trpících AN je na první pohled patrný rozdíl v intenzitě pásů charakteristických pro  $\alpha$ -helix. S progresí choroby tak zřejmě klesá v krevní plazmě koncentrace proteinů, které se vyskytují v dané konformaci.

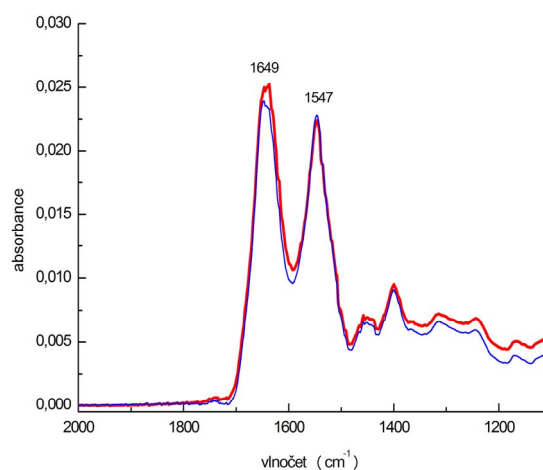
### IČ spektroskopie

V IČ spektrech (obr. 1) vzorků krevní plazmy pacientů a kontrolních jedinců se nalézají výrazné pásy s maximy 1649 a 1547  $\text{cm}^{-1}$  (tzv. amid I, resp. amid II)<sup>9</sup>. Spektra odpovídající vzorkům krevní plazmy pacientů s AN zde vykazují odlišnou intenzitu oproti spektrům vzorků kontrolních jedinců. Zároveň dochází ke změně v poměru intenzit jednotlivých pásů, především amidu I ku amidu II.

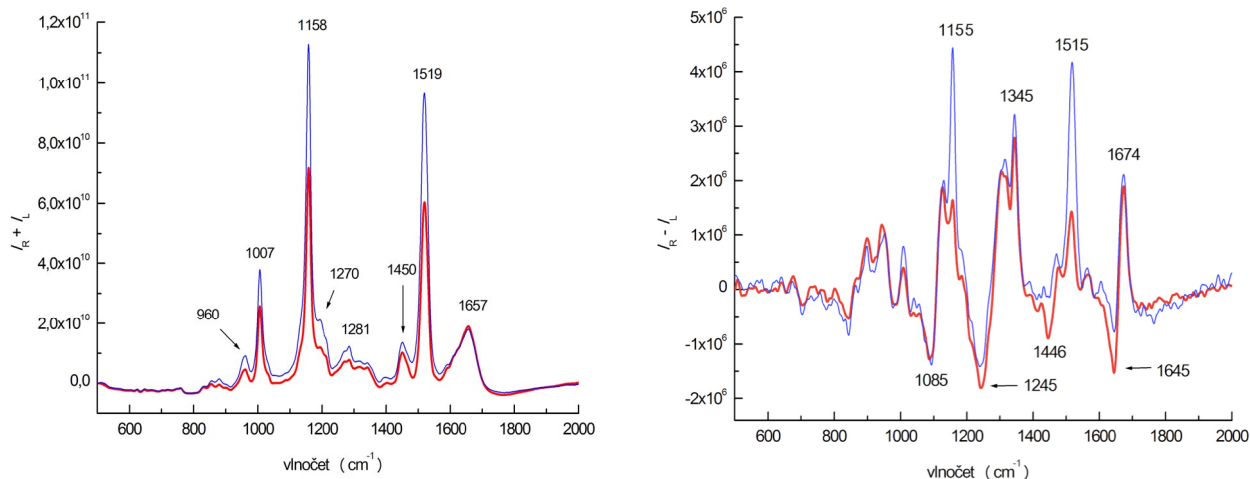
### Ramanova spektroskopie

Ramanova a ROA spektra byla měřena současně pro celkem 22 vzorků, z nichž 15 patřilo pacientům s AN a 7 kontrolním jedincům. Ramanovým spektrům (obr. 2) dominují tři pásy (1519, 1158, 1007  $\text{cm}^{-1}$ ), které odpovídají karotenoidům vyskytujícím se v lidské krevní plazmě, přičemž pás 1519  $\text{cm}^{-1}$  představuje především valenční vibrace C=C a pás 1158  $\text{cm}^{-1}$  zejména valenční vibrace C-C hlavního řetězce<sup>6,11</sup>.

Přítomnost proteinů dokládají méně intenzivní pásy 1657  $\text{cm}^{-1}$  (amid I) a 1281  $\text{cm}^{-1}$  s raménkem 1270  $\text{cm}^{-1}$  (amid III).<sup>6</sup> Průměrné spektrum vzorků pacientů s AN má ve sledovaných oblastech odlišnou intenzitu oproti průměrnému spektru patřících vzorkům kontrolních jedinců.



Obr. 1. Průměrná spektra ECD (vlevo) a IČ (vpravo) pro pacienty s AN (—) a kontroly (—)



Obr. 2. Průměrná Ramanova spektra (vlevo) a spektra ROA (vpravo) pro pacienty s AN (—) a kontroly (—)

### Spektroskopie ROA

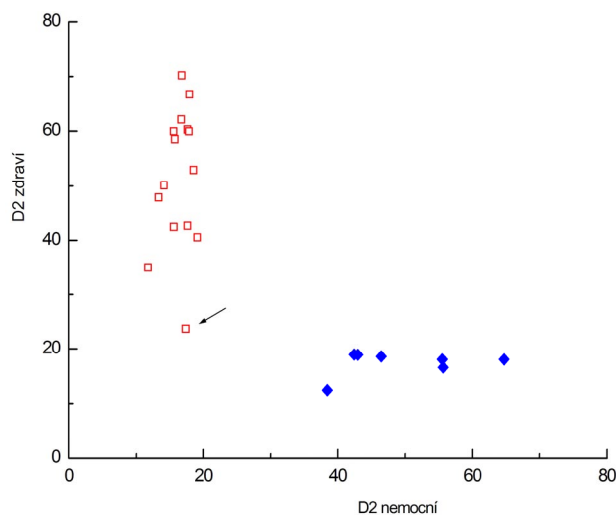
V průměrných spektrech ROA (obr. 2) se nachází v oblasti amidu I pásy typické pro  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu, konkrétně couplet negativního pásu  $1645\text{ cm}^{-1}$  a pozitivního  $1674\text{ cm}^{-1}$ . Přítomnost stejné konformace dokládá také pás  $1345\text{ cm}^{-1}$  spadající do oblasti tzv. rozšířeného amidu III (cit. <sup>12</sup>). Záporný pás  $1245\text{ cm}^{-1}$  odpovídá příspěvku proteinů se zvýšeným obsahem konformace  $\beta$ -skládaného listu <sup>13</sup>.

Průměrná spektra vzorků krevní plazmy nemocných jedinců se liší od průměrného spektra vzorků kontrol nejen v celkové intenzitě, ale také v poměru intenzit některých pásů. Zvýšení intenzity je patrné u negativních pásů  $1245$ ,  $1446$  a  $1645\text{ cm}^{-1}$ . Spektra ROA tedy umožňují dobře pozorovat rozdíly související se změnou sekundární struktury proteinů, které jsou přítomné v krevní plazmě.

### Lineární diskriminační analýza (LDA)

Z grafického znázornění LDA pro dvě základní kategorie – pacient s AN a kontrolní jedinec (obr. 3) – je patrné, že došlo k velmi dobrému rozdělení obou zkoumaných skupin. Z kategorie pacientů se výrazně oddělil vzorek pacienta s AN v počáteční fázi, který dosáhl v diagnostickém testu kognitivních funkcí MMSE (Mini-Mental State Examination Test) skóre 27 bodů z 30 možných. Menší podskupiny tvořené vzorky krevní plazmy pacientů tak zřejmě mohou reflektovat míru závažnosti onemocnění.

Konfúzní matice (tab. I) ukazuje 100% správnost zařazení vzorků do definovaných skupin, nicméně křížová validace metody přináší správnost 64 %. Tato skutečnost může být způsobena v tuto chvíli malým počtem zkoumaných vzorků a také nevyváženým počtem vzorků v obou kategoriích, kdy vzorků krevní plazmy pacientů s AN je přibližně 2× více.



Obr. 3. Grafické znázornění LDA ze spektrálních dat vzorků krevní plazmy pacientů s AN (□) a kontrol (◆) pomocí druhé mocniny Mahalanobisových vzdáleností. Šipkou označen vzorek pacienta v počáteční fázi AN s dosaženým skóre 27 bodů v MMSE testu

### Závěr

V této práci bylo analyzováno celkem 53 vzorků krevní plazmy od pacientů v různých stádiích Alzheimerovy choroby a zdravých, kontrolních jedinců. Metody chiroptické spektroskopie, elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita, byly doplněny o nepolarizované varianty, tedy měření infračervených absorpčních a Ramanových spekter.



## Tabulka I

Konfúzní matice LDA vzorků krevní plazmy pacientů s AN a kontrol (vlevo) a konfúzní matice křížové validace metody (vpravo)

z/do	Pacient	Kontrola	Celkem	Správně	Pacient	Kontrola	Celkem	Správně
Pacient	15	0	15	100 %	10	5	15	67 %
Kontrola	0	7	7	100 %	3	4	7	57 %
Celkem	15	7	22	100 %	13	9	22	64 %

Při porovnání spekter patřících vzorkům pacientů a zdravých jedinců byly patrné změny v intenzitě zejména v oblastech, které odrážejí sekundární strukturu proteinů. Vybraná spektrální data byla dále zpracována metodou lineární diskriminační analýzy.

Statisticky vyhodnoceno bylo 22 vzorků, z toho 7 kontrolních, 4 patřící nemocným v mírném, 5 ve středně těžkém a 6 v těžkém stádiu choroby. V grafickém znázornění výstupu LDA bylo dosaženo jednoznačného oddělení jednotlivých skupin se 100% správností přiřazení vzorků v konfúzní matici vzhledem ke klinické diagnóze.

Úspěšnost křížové validace byla 64 % a byla zřejmě ovlivněna malým a především nevyváženým počtem prozatím zkoumaných vzorků. I přesto dosažené výsledky indikují možný potenciál metod chiroptické spektroskopie pro minimálně invazivní diagnostiku Alzheimerovy choroby.

*Metodika spektrální analýzy krevních vzorků a vyhodnocení dat vícerozměrnými statistickými metodami byla vyvinuta za podpory grantu NT13259 (MZ ČR). Práce byla též realizována za podpory prostředků na specifický vysokoškolský výzkum 20/2013 – A1\_FCHI\_2013\_003 a A2\_FCHI\_2013\_003 (MŠMT ČR), projektu PRVOUK-P26/LF1/4 (UK Praha), projektu CZ.2.16/3.1.00/221973.1.00/22197 (Operační program pro Prahu – Konkurenceschopnost) a projektu NPU I (LO) MSMT – 34870/2013 (Národní program udržitelnosti).*

## LITERATURA

1. Querfurth H. W., LaFerla F. M.: *N. Engl. J. Med.* 362, 329 (2010).
2. Tanzi R. E.: *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2, (2012).
3. Tiiman A., Palumaa P., Tõugu V.: *Neurochem. Int.* 62, 367 (2013).
4. Jiráček R., v knize: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie* (Fišar Z. a kol., ed.), kap. 10, druhé vydání. Grada, Praha 2009.
5. Kučerová H., *Neuropsychologie v neurologii*. Grada, Praha 2006.
6. Tatarkovič M., Fišar Z., Raboch J., Jiráček R., Setnička V.: *Chirality* 24, 951 (2012).
7. Synytsya A., Judexová M., Hrubý T., Tatarkovič M., Miškovičová M., Petruželka L., Setnička V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5441 (2013).
8. Člupek M., Matějka P., Volka K.: *J. Raman Spectrosc.* 38, 1174 (2007).
9. Berova N., Polavarapu P. L., Nakanishi K., Woody R. W., *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*. Wiley, 2012.
10. Setnička V., Urbanová M., v knize: *Moderní přístupy k farmaceutické analýze* (Dohnal J. a kol., ed.). Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity, Brno 2010.
11. Withnall R., Chowdhry B. Z., Silver J., Edwards H. G. M., de Oliveira L. F. C.: *Spectrochim. Acta, Part A* 59, 2207 (2003).
12. Kopecký V., Baumruk V.: *Chem. Listy* 105, 162 (2011).
13. Weymuth T., Reiher M.: *J. Phys. Chem. B* 117, 11943 (2013).

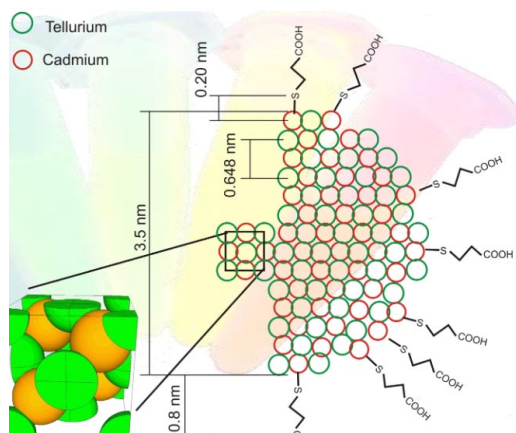
## ANALYTICKÉ VYUŽITÍ NANOČÁSTIC NA BÁZI KVANTOVÝCH TEČEK

LENKA ŘEZÁČOVÁ a PŘEMYSL LUBAL

*Středoevropský technologický institut (CEITEC) & Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
lenickarez@seznam.cz*

## Úvod

Současné nanotechnologické metody umožňují sestavování a charakterizaci různých objektů a struktur v nanometrové velikosti. Nanoobjekty jsou hojně studovány jak v oblasti chemie, tak v oblasti fyziky a biologie<sup>1</sup>. Koloidní polovodičové částice na bázi kvantových teček (anglicky quantum dots, QD) o velikosti 1–10 nm jsou nejčastěji málo rozpustné kadmennaté sloučeniny CdX (X = S, Se, Te), jejichž rozpustnost je zvýšena pokrytím povrchu kyselinou merkaptopropionovou (MPA), glutathionem, cysteinem<sup>2–7</sup> (obr. 1), kde ionizace jejich funkčních skupin zajišťuje jejich rozpustnost<sup>2–7</sup>. Mohou být připraveny buď ve formě koloidních roztoků, nebo mohou „růst“ na pevném podkladu. Jejich výjimečných fyzikálně-chemických a zejména optických vlastností lze využít pro návrh nových analytických metod pro detekci a stanovení iontů, biologicky významných molekul a mnoho dalších analytů<sup>1–5</sup>. Nanočástice na bázi kvantových teček vykazují široké excitační a úzké emisní spektrum, ve kterém poloha maxima závisí na druhu, morfologii a velikosti částic<sup>2–7</sup>, a lze proto pomocí tohoto parametru „ladit“ maximum luminiscenčního emisního pásu. Cílem této práce byla optimalizace syntézy CdTe nanočástic na bázi kvantových teček, jejich charakterizace a jejich potenciální využití pro stanovení iontů kovů pomocí luminiscenční spektroskopie.



Obr. 1. Struktura a velikost QD-CdTe nanočástic (převzato se svolením z cit.<sup>6</sup>)

## Experimentální část

## Syntéza kvantových teček

Pro přípravu nanočástic na bázi CdTe-QD pokrytých MPA byla zvolena jednokroková syntéza při teplotě 95 °C (cit.<sup>7</sup>). Charakterizace připravených nanočástic (měření jejich velikosti a zeta potenciálu) byla prováděna na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velká Británie)<sup>8</sup>.

## Luminiscenční měření

Měření bylo provedeno na spektrofluorimetru AvaSpec 2048 v rozmezí vlnových délek 350–1100 nm (Avantes, Nizozemí), když pro excitaci byl použit fialový laser o vlnové délce 405 nm a výkonu 200 mW. Optická vlákna byla použita k propojení jednotlivých součástí přístroje (laser–kyvetový prostor–detektor).

## Výsledky a diskuse

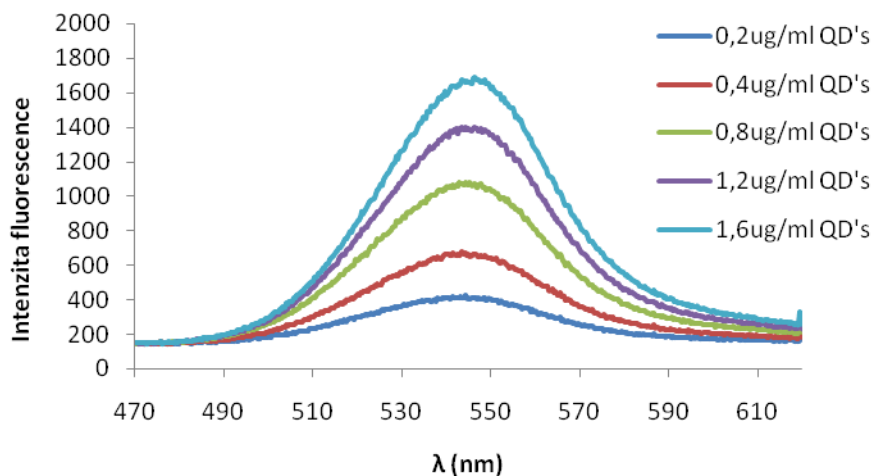
## Syntéza a charakterizace kvantových teček

Podle návodu uvedeného v literatuře<sup>7</sup> byly syntetizovány tři vzorky nanočástic, kdy syntéza byla prováděna po dobu 3, 3,5 a 4 hodin. Nebyl pozorován žádný významný rozdíl ve fyzikálně-chemických vlastnostech připravených preparátů. Zbarvení roztoku nanočástic (pH ~ 6,5) bylo vždy zářivě oranžové, po ozáření laserem jejich roztok emitoval jasně zelené záření (maximum emisního pásu kolem 544 nm, obr. 2).

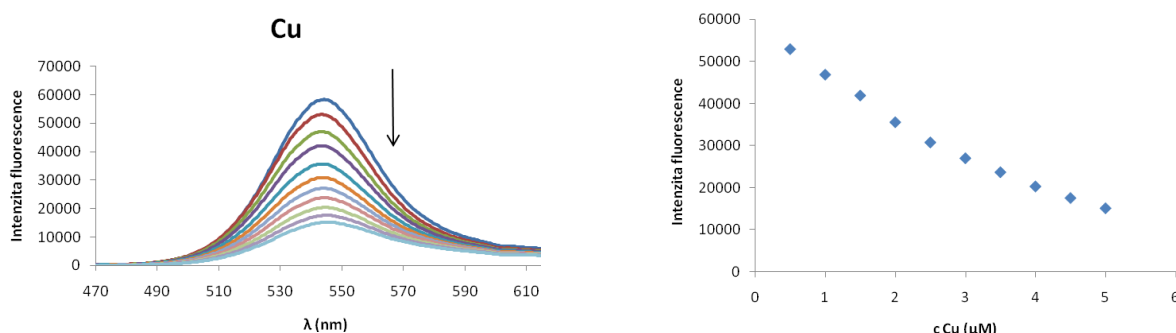
Měření velikosti nanočástic pomocí rozptylu laserového záření o vlnové délce 633 nm ukázalo, že částice mají průměr kolem 5 nm (výpočet z maxima emisního pásu 544 nm poskytl 3,2 nm), kdežto měření zeta potenciálu poskytlo hodnotu kolem –40 mV. Snížování pH roztoku připravených CdTe-QD nanočástic zvyšuje zeta potenciál a velikost nanočástic (> 10 nm), protože dochází k protonaci karboxylových funkčních skupin na jejich povrchu. Hodnota zeta potenciálu se blíží se k nule při pH < 3 v důsledku úplné neutralizace záporně nabitých karboxylových skupin protony, což pak vede ke shlukování nanočástic do větších celků (nárůst velikosti částic až 1500 nm při pH < 3) a srážení nanočástic z roztoku.

Luminiscenční studium interakce QD s Cu<sup>2+</sup> a Pb<sup>2+</sup> ionty

Dále bylo zjištěno, že nedochází k samozhášení v roztocích CdTe-QD nanočástic v rozmezí koncentrací 0–1,6 µg ml<sup>-1</sup> připravených ředěním jejich zásobního roztoku



Obr. 2. Spektra roztoku CdTe-QD nanočástic o různé koncentraci

Obr. 3. Změna luminiscenčního spektra roztoku CdTe-QD nanočástic po přidávku roztoku  $\text{CuCl}_2$  (vlevo) a závislost intenzity jejich luminiscence ( $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$ ) na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  (vpravo)

(koncentrace je  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $\text{pH} \sim 6,5$ ) (obr. 2). Naopak tento efekt byl pozorován až při vyšších koncentracích, proto další experimenty s CdTe-QD nanočásticemi byly prováděny s roztoky o koncentraci  $1,6 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $\text{pH} \sim 6,5$ ), ke kterému byl přidáván zásobní roztok  $\text{CuCl}_2$  ( $c = 1 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Po přidávku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů se tvar luminiscenčního spektra roztoku CdTe-QD nanočástic nemění (obr. 3 vlevo), pouze klesá jeho intenzita (obr. 3 vpravo). Vliv zhašení roztoku QD-nanočástic v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů lze kvantitativně popsat funkční závislostí

$$\frac{I_0 - I}{I} = K_{\text{SV}} [\text{M}]$$

kde  $I_0$  a  $I$  jsou intenzity luminiscence v nepřítomnosti a v přítomnosti iontu kovu,  $K_{\text{SV}}$  je Stern-Volmerova konstanta popisující statický charakter zhašení<sup>5</sup>. Ze závislosti uvedené na obr. 3 vlevo byla vypočtena citlivost  $K_{\text{SV}} \sim 3200$  a odhadnuta mez detekce (LOD)  $0,64 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

$\text{Pb}^{2+}$  ionty po přidávku k roztoku QD nanočástic vykazují analogický efekt zhašení jako  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Mez detekce je srovnatelná s hodnotou pro  $\text{Cu}^{2+}$  ionty, ačkoliv Stern-Volmerova konstanta  $K_{\text{SV}}$  je o řád vyšší (tab. I), takže stanovení většího  $\text{Pb}^{2+}$  iontu je citlivější než menšího  $\text{Cu}^{2+}$  iontu.

Odlíšný efekt vykazoval  $\text{Cd}^{2+}$  ion, který po přidávku do roztoku zvyšoval luminiscenci CdTe-QD nanočástic. Podobné chování bylo pozorováno pro  $\text{Cd}^{2+}$  ionty

## Tabulka I

Vypočtené analytické parametry pro stanovení iontů těžkých kovů

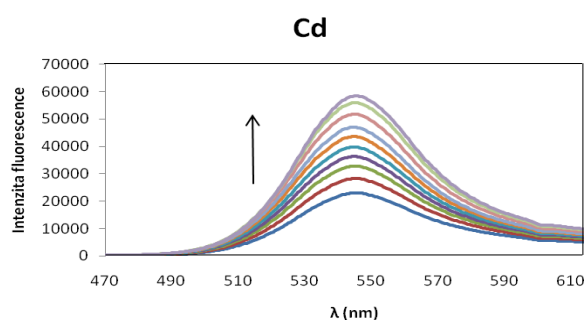
Ion kovu	$K_{SV}$ [ $l \text{ mol}^{-1}$ ]	LOD [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
$\text{Cu}^{2+}$	$3,2 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^{-7}$
$\text{Pb}^{2+}$	$2,2 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^{-7}$

i v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů, které luminiscenci nanočástic zhasí (obr. 4). Toho lze pak využít i pro stanovení  $\text{Cd}^{2+}$  iontů v přítomnosti jiných iontů.

## Závěr

V práci byla úspěšně ověřena syntéza CdTe-QD nanočástic pokrytých MPA podle postupu publikovaném v literatuře a produkty byly charakterizovány z fyzikálně-chemického hlediska. Pomocí luminiscenční spektroskopie bylo prokázáno, že přítomnost některých iontů kovů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) zhasí luminiscenci nanočástic v roztoku a tohoto efektu lze využít k jejich citlivému stanovení, kdy mez detekce této metody je srovnatelná s hodnotami uváděnými pro jiné analytické metody (např. potenciometrii s iontově selektivními elektrodami, diferenční pulsní polarografií, molekulovou absorpční spektroskopií) nebo i lepší.

*Tato práce je podporována granty (GA ČR 13-08336S) a EU (CEITEC CZ.1.05/1.1.0/02.0068). Autoři děkují Dr. Ivoně Voráčové (Ústav analytické chemie, AV ČR) za svolení k převzetí obr. 1.*



Obr. 4. Změna luminiscenčního spektra roztoku CdTe-QD nanočástic po přidavku roztoku  $\text{CdCl}_2$  v rozmezí koncentrací  $0,5\text{--}5 \mu\text{mol l}^{-1}$  v přítomnosti  $\text{CuCl}_2$  ( $c = 5 \mu\text{mol l}^{-1}$ )

## LITERATURA

1. Hlaváček A., Skládal P.: Chem. Listy 105, 611 (2011).
2. Zhang H., Wang D., Yang B.: J. Am. Chem. Soc. 128, 10171 (2006).
3. Zhang L., Xu Ch., Li B.: Microchim. Acta 166, 61 (2009).
4. Murphy C. J.: Anal. Chem. 74, 520A (2002).
5. Ali E. M., Zheng Y., Yu H., Ying J. Y.: Anal. Chem. 79, 9452 (2007).
6. Hezinová V.: Dizertační práce, VUT, Brno 2011.
7. Duan J. L., Song L. X., Zhan J. H.: Nano Res. 2, 61 (2009).
8. <http://www.malvern.com/Assets/MRK1839.pdf> (staženo 8.1.2014).

## ELEKTROCHEMICKÝ VÝZKUM SUPRAMOLEKULÁRNÍCH INTERAKCÍ DNA S GENOTOXICKÝM 2-NITROFLUORENEM

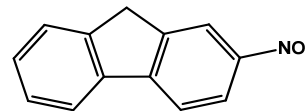
KLÁRA STÁVKOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, Univerzitní výzkumné centrum UNCE „Supramolekulární chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2  
vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

### Úvod

Genotoxický 2-nitrofluoren (2-NF) (obr. 1) je považován za modelového zástupce nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a za marker jejich výskytu<sup>1</sup>. Do ovzduší se uvolňuje nedokonalým spalováním organických látek, především výfukovými plyny z diesellových i benzinových motorů. 2-NF setrvává adsorbovaný na tuhé prachové částičky ve vzduchu, a šíří se tak na velké vzdálenosti<sup>2</sup>. Do organismu vstupuje vdechováním prachu či konzumací kontaminované potravy. Potrava může být kontaminována i sekundárně při své úpravě (grilování, sušení, pražení, uzení a pečení)<sup>3</sup>. Ačkoliv je 2-NF chemicky stabilní látkou, v organismu podléhá intenzivnímu metabolismu. Prvním krokem metabolismu je redukce střešní mikroflórou na 2-aminofluoren. 2-Aminofluoren dále v játrech podléhá acetylaci a vzniká 2-acetylaminofluoren. 2-Aminofluoren a 2-acetylaminofluoren mohou být v játrech hydroxylovány a tyto hydroxylované formy, jež vykazují mutagenní účinky, jsou poté díky své polaritě vylučovány z těla. Nehydroxylované formy mohou interagovat s DNA za vzniku DNA aduktů<sup>4</sup>. Ty představují poruchy, které se mohou po svém vzniku dlouhodobě zakonzervovat jako mutace a mohou časem přispívat k maligní transformaci buněk a nekontrolovanému buněčnému dělení<sup>5</sup>.

Při elektrochemickém výzkumu interakcí 2-nitrofluorenu, jehož voltametrické chování bylo podrobně studováno např. v publikacích<sup>6–10</sup>, a jeho biologických metabolitů<sup>11–15</sup> s DNA byly prozatím použity DNA biosenzory s převodníky na bázi rtuti (visící rtuťová kapková elektroda<sup>16</sup> (HMDE)) a uhlíku (sítotisková uhlíková elektroda<sup>17</sup> (SPCE), uhlíková filmová elektroda<sup>18</sup>). K detekci poškození DNA byly použity elektrochemické techniky square-wave voltametrie (SWV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a cyklická voltametrie (CV). Ve všech případech byly pozorovány změny voltametrických signálů dokazující poškození DNA zkoumanými xenobiotiky. Pomocí SPCE (cit.<sup>17</sup>) byly zjištěny dva druhy poškození DNA. První bylo způsobeno přímou interkalací 2-NF do struktury DNA a druhé radikály s krátkou dobou života, které vznikají při elektrochemické redukci přítomné nitroskupi-



Obr. 1. Strukturální vzorec 2-nitrofluorenu

ny. Při použití voltametrie na HMDE (cit.<sup>16</sup>) byly získány obdobné výsledky jako na SPCE a byl rovněž navržen mechanismus supramolekulární interakce 2-NF s DNA.

Tato práce je zaměřena na elektrochemickou detekci poškození DNA způsobeného genotoxickým 2-nitrofluorenem. Pro tento účel byl vyvinut jednoduchý DNA biosenzor založený na převodníku ze skelného uhlíku a nízkomolekulární DNA izolované z lososích spermií.

### Experimentální část

#### Reagencie

Zásobní roztok 2-NF (98 %, Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$  byl připraven v ethanolu (99,8 %, Lach-Ner, ČR) a uchovávan ve tmě za laboratorní teploty. Fosfátový pufr (PB) o koncentraci 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  byl připraven jako roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (98,5 %, Lach-Ner, ČR) a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (> 98 %, Sigma-Aldrich, USA), pH roztoku bylo 6,7. Redoxním indikátorem ( $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ) byla ekvimolární směs  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (oba 99 %, Lachema, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$  v PB. Zásobní roztoky DNA o koncentracích 10 mg  $\text{ml}^{-1}$  a 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  byly připraveny v PB rozpuštěním nízkomolekulární DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich, USA) a skladovány v mrazicím boxu při teplotě  $-4$  °C. Při přípravě roztoků byla používána deionizovaná voda (produkovaná systémem Millipore Milli-Q Plus, Millipore, USA).

#### Aparatura

Cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) byly měřeny na přístroji MicroAutolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko). Pro měření CV byl použit software GPES (General Purpose Electrochemical System), verze 4.9, a pro měření EIS byl použit software FRA (Frequency Response Analysis), verze 4.9. Měření probíhala ve tříelektrodovém zapojení sestávajícím se z pracovní elektrody ze skelného uhlíku (GCE) (průměr disku 3,0 mm, Metrohm, Švýcarsko), argentchloridové referenční elektrody (typ RAE 113, 3 mol  $\text{l}^{-1}$  KCl, Monokrystaly, ČR) a z platinové pomocné elektrody

(typ PPE, Monokrystaly, ČR). Pro akumulaci DNA na povrch pracovní elektrody byl použit Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR) se softwarem Polar Pro, verze 5.1.

### Pracovní postupy

Optimalizace přípravy DNA biosenzoru byla provedena za použití technik CV (polarizační rychlost  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , potenciálový krok  $5 \text{ mV}$ , potenciálové rozmezí  $0$  až  $500 \text{ mV}$ ) a EIS (polarizační potenciál  $225 \text{ mV}$ , potenciálová amplituda  $10 \text{ mV}$ , frekvenční rozsah  $0,1$ – $5000 \text{ Hz}$  – měřeno 51 bodů). Bylo pracováno s nepřímou detekcí za použití redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  v PB. K obnově a aktivaci povrchu pracovní elektrody bylo třeba elektrodu oleštit o utěrku z mikrovlákna (utěrka na čištění brýlí) a postupně na ni v prostředí PB vkládat vždy po dobu  $1 \text{ min}$  potenciály  $1,7 \text{ V}$  a  $-0,5 \text{ V}$ . Potenciostatická akumulace DNA na GCE byla prováděna z roztoku DNA v PB za optimálního potenciálu a času akumulace, čímž byl připraven vlastní DNA biosenzor (DNA/GCE).

Při vyšetřování poškození DNA přímou interakcí s 2-NF byla nejprve použita technika EIS. Na aktivované elektrodě byla za optimálních podmínek naakumulována DNA a v prostředí  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  bylo změřeno EIS spektrum. Následovala inkubace DNA biosenzoru v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB po dobu  $5 \text{ min}$ , důkladné opláchnutí biosenzoru v PB a opět změření EIS spektra v prostředí  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ .

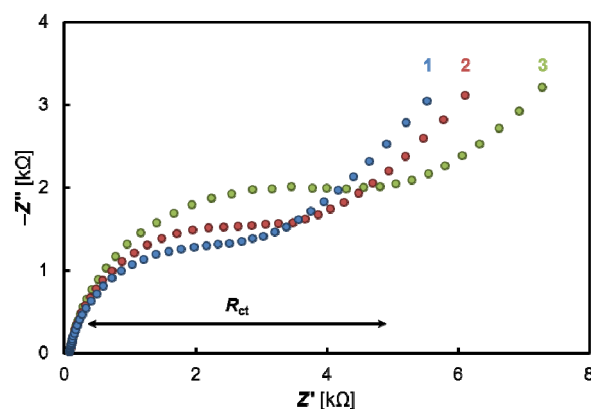
Pro výzkum elektrochemického chování 2-NF na nemodifikované GCE a na DNA/GCE byla použita CV. Proměřovaný potenciálový rozsah byl  $500$  až  $-1400 \text{ mV}$ . V roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB byly změřeny voltamogramy na nemodifikované elektrodě a DNA biosenzoru připraveném za optimálních podmínek. Dále byl v PB změřen voltamogram na DNA biosenzoru před a po jeho inkubaci po dobu  $5 \text{ min}$  v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB. Před vlastním měřením byl vždy roztok probublán dusíkem po dobu  $5 \text{ min}$ , aby se zabránilo rušivému vlivu rozpuštěného vzdušného kyslíku. Stejný postup byl zopakován s roztokem  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v PB.

### Výsledky a diskuse

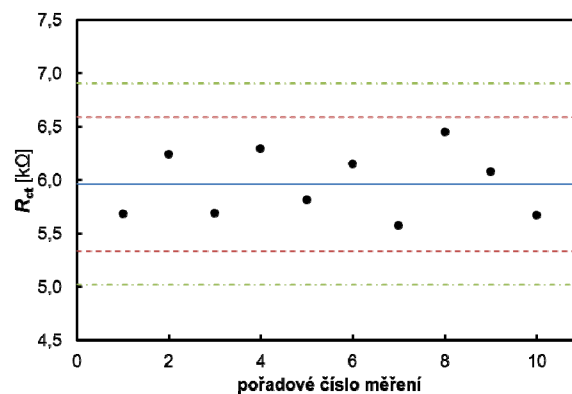
Při optimalizaci přípravy biosenzoru byly zkoumány různé koncentrace použité DNA ( $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  a  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a hledán optimální potenciál akumulace (proměřován byl rozsah potenciálů od  $0$  do  $700 \text{ mV}$ ; vliv potenciálu akumulace na výslednou odezvu biosenzoru je ukázán na obr. 2) a čas akumulace (časy voleny od  $0,5$  do  $5 \text{ min}$ ). Jako optimální byly zvoleny hodnoty koncentrace DNA  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , potenciálu akumulace  $500 \text{ mV}$  a času akumulace  $2 \text{ min}$ , při nichž bylo dosaženo rychlého a opakovatelného pokrytí povrchu elektrody kompaktní vrstvou DNA (opakovatelnost přípravy biosenzoru je vyhodnocena v regulačním diagramu na obr. 3).

Při měření technikou EIS nedošlo k významné změně chování biosenzoru před a po inkubaci v roztoku 2-NF (obr. 4). Z toho můžeme usuzovat, že mezi DNA a 2-NF nedochází k poškozující interakci, v důsledku které by docházelo ke zlomům ve struktuře DNA a následnému odpadávaní fragmentů poškozené DNA z povrchu elektrody.

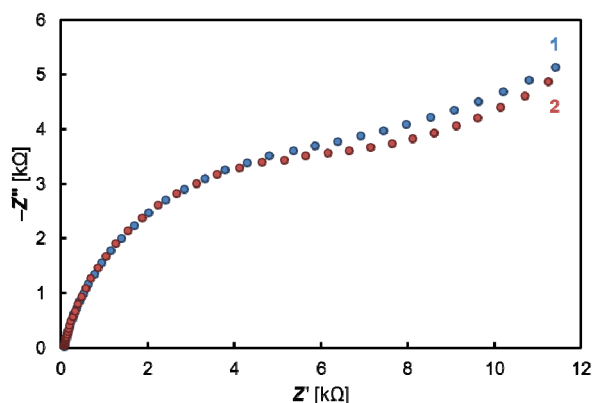
Pomocí CV byla zjištěna interkalace 2-NF do DNA. Při měření na nemodifikované elektrodě v prostředí roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB poskytuje 2-NF dobře vyvinutý pík odpovídající redukci přítomné nitroskupiny (obr. 5A, křivka 1). Při měření na DNA biosenzoru se tento pík zmenšuje a posouvá se do negativně-



Obr. 2. Nyquistův graf získaný v roztoku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  v PB na DNA biosenzoru. Akumulace DNA při  $100 \text{ mV}$  ( $R_{\text{ct}} = 2,6 \text{ k}\Omega$ ) (1), akumulace DNA při  $300 \text{ mV}$  ( $R_{\text{ct}} = 3,2 \text{ k}\Omega$ ) (2), akumulace DNA při  $500 \text{ mV}$  ( $R_{\text{ct}} = 4,4 \text{ k}\Omega$ ) (3). Měřeno při koncentraci DNA  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  a času akumulace  $5 \text{ min}$

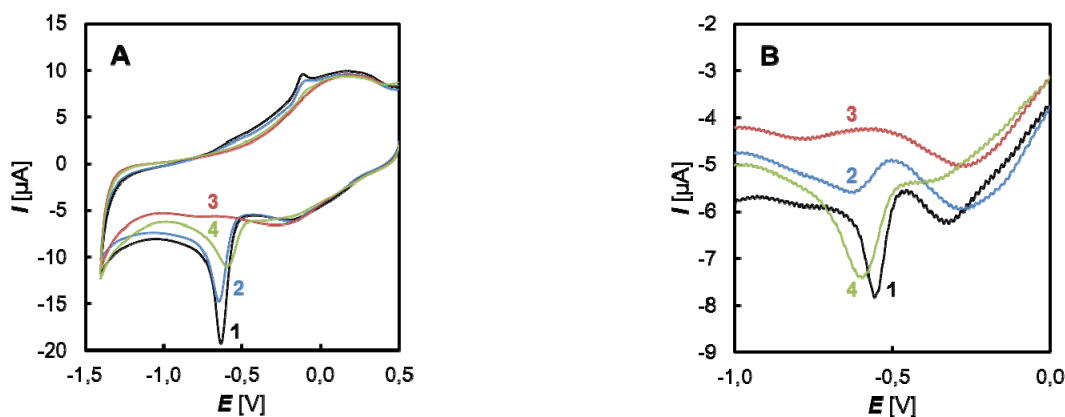


Obr. 3. Opakovatelnost přípravy DNA biosenzoru vyjádřená pomocí hodnot odporu přenosu náboje ( $R_{\text{ct}}$ ). Optimální podmínky akumulace DNA: koncentrace DNA  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , potenciál akumulace  $500 \text{ mV}$ , čas akumulace  $2 \text{ min}$ . V regulačním diagramu je znázorněna průměrná hodnota (modrá plná čára) a varovné (průměr  $\pm 2\sigma$ ; červená čárkovaná čára) a regulační meze (průměr  $\pm 3\sigma$ ; zelená čerchovaná čára)



Obr. 4. Nyquistův graf získaný v roztoku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  v PB na DNA biosenzoru před (1) a po pětiminutové inkubaci (2) v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB

ších potenciálů (obr. 5A, křivka 2). DNA naakumulovaná na elektrodě znesnadňuje přístup 2-NF k elektrodě, a tím i jeho redukci. DNA biosenzor inkubovaný 5 min v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB a následně přenesený do PB poskytuje pík 2-NF posunutý k pozitivnějším potenciálům (obr. 5A, křivka 4). 2-NF se interkaloval do struktury DNA za vzniku komplexu, který se redukuje snadněji než volný 2-NF; toto chování je typické pro DNA interkalátory<sup>17</sup>. Obdobný experiment byl proveden i v čistě vodném prostředí, tedy bez přítomnosti ethanolu v inkubačním roztoku 2-NF; ethanol by mohl ve zvýšeném množství (50 %) denaturovat nativní DNA. Za tímto účelem musela být snížena koncentrace 2-NF, který je ve vodě omezeně rozpustný, na hodnotu  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ .



Obr. 5. Cyklické voltamogramy změřené v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB (A) a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v PB (B) na GCE (1) a DNA/GCE (2) a cyklické voltamogramy změřené v PB před (3) a po pětiminutové inkubaci (4) DNA/GCE v roztoku  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v 50% ethanolu v PB (A) a v roztoku  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  2-NF v PB (B)

I při tomto experimentu byly získány podobné výsledky (obr. 5B).

## Závěr

V předložené práci byl vypracován postup přípravy jednoduchého DNA biosenzoru sestávajícího se z elektrody ze skelného uhlíku (GCE) o průměru disku 3 mm a z povrchově navázané DNA izolované z lososích spermií. Takto připravený DNA biosenzor byl použit ke zkoumání genotoxicity 2-nitrofluorenu (2-NF) *in vitro*. Již dříve bylo potvrzeno, že 2-NF a látky s ním příbuzné mají na DNA škodlivý vliv a způsobují její poškození. S tímto ve shodě bylo pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) ukázáno, že vlivem interakce s 2-NF nedochází v DNA ke vzniku zlomů, ale že se 2-NF do DNA začleňuje interkalací, což bylo ukázáno pomocí cyklické voltametrie (CV).

Nově vyvíjené elektrody a metody, které se používají při konstrukci a měření pomocí DNA biosenzorů, dávají příslib snadného a rychlého způsobu zkoumání potenciální nebezpečnosti různých xenobiotických látek pro DNA.

*Na tomto místě bychom rádi poděkovali za finanční podporu Grantové agentuře České republiky (projekt GP13-23337P).*

## LITERATURA

1. Vyskočil V., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 3059 (2011).
2. Möller L., Lax I., Torndal U.-B., Eriksson L. C.: *Risk Anal.* 13, 291 (1993).
3. Möller L., Lax I., Eriksson L. C.: *Environ. Health Perspect.* 101, 309 (1993).



4. Möller L.: Environ. Health Perspect. 102, 139 (1994).
5. Cui X. S., Eriksson L. C., Möller L.: Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 442, 9 (1999).
6. Vyskočil V., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 173 (2009).
7. Vyskočil V., Navrátil T., Polášková P., Barek J.: Electroanalysis 22, 2034 (2010).
8. Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčová Z., Škvorová L., Tvrđíková J., Barek J.: Electroanalysis 23, 129 (2011).
9. Prchal V., Vyskočil V., Daňhel A., Barek J., Wang J.: Chem. Listy 105, 217 (2011).
10. Yosypchuk O., Karásek J., Vyskočil V., Barek J., Pecuková K.: Sci. World J. 2012, 231986 (2012).
11. Vyskočil V., Barek J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 74, 1675 (2009).
12. Hájková A., Vyskočil V., Daňhel A., Wang J., Barek J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 76, 1775 (2011).
13. Hájková A., Vyskočil V., Barek J.: Chem. Listy 106, s21 (2012).
14. Hájková A., Hraníček J., Barek J., Vyskočil V.: Electroanalysis 25, 295 (2013).
15. Hájková A., Vyskočil V., Barek J.: Chem. Listy 107, 234 (2013).
16. Krejčová Z.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
17. Vyskočil V., Labuda J., Barek J.: Anal. Bioanal. Chem. 397, 233 (2010).
18. Vyskočil V., Barek J.: Procedia Chem. 6, 52 (2012).



## RYCHLÉ METODY PRO SLEDOVÁNÍ ORGANOHALOGENOVANÝCH KONTAMINANTŮ V MATEŘSKÉM MLÉČE A KREVNÍ PLASMĚ

KATEŘINA URBANCOVÁ, DARINA LANKOVÁ,  
JANA PULKRABOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

*Ústav chemie analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
urbancova.k@gmail.com*

### Úvod

Moderní život je charakteristický tím, že trávíme hodně času v uzavřených prostorech. V domácím/pracovním prostředí může být člověk exponován řadě antropogenních látek, jako jsou např. bromované retardéry hoření (BFR) a perfluoralkylované sloučeniny (PFAS), které se mohou uvolňovat z výrobků/produktů, které těmito chemikáliemi byly záměrně ošetřeny. PFAS tvoří pestrou skupinu fluorovaných organických sloučenin a pro jejich jedinečné vlastnosti (lipofilní uhlíkatý řetězec a hydrofilní funkční skupina) se používají pro různé průmyslové a spotřebitelské aplikace (povrchově aktivní látky, pěnové hasicí přístroje, maziva, materiály pro balení potravin apod.). BFR slouží také k ochraně materiálů proti jejich vznícení a zpomalení šíření případného požáru. Nejčastěji je těmito látkami ošetřen nábytek, textil a elektronika. Expozice lidského organismu PFAS a BFR může být přímá (potrava, voda a vdechnutí prachu) nebo nepřímá (kontakt s ošetřeným materiálem). PFAS jsou následně v organismu silně vázány na bílkoviny v krvi, vyskytují se ale také v mateřském mléce, které následně představuje významný zdroj expozice pro novorozence a kojence. Naopak BFR se kumulují v tukových tkáních včetně lipofilní složky mateřského mléka. Vzhledem k tomu, že obě skupiny látek jsou bioakumulativní a některé z nich jsou také toxické, klade se stále větší důraz na vývoj citlivých (multi-)analytických metod pro jejich stanovení a následně jejich sledování v životním prostředí a biologických maticích.

V posledních letech byla publikována řada článků, které se zabývají analytickými metodami pro stanovení BFR a PFAS v biologických maticích (mateřské mléko, krevní sérum), většinou se ale soustředí pouze na jednu skupinu kontaminantů. Nicméně počet analytických metod umožňující jejich simultánní stanovení, které vede především ke zkrácení celkové doby analýzy a menším nárokům na množství vzorku, je velmi omezený.

Obecně mezi nejčastější izolační postupy PFAS z mateřského mléka a krevního séra patří metoda SPE (extrakce tuhou fází) s použitými sorbenty, jako je např. modifikovaný silikagel ( $C_{18}$ ), Oasis WAX (Mixed-mode Weak Anion eXchange sorbent) a Oasis HBL (Hydrophilic-Lipophilic Balanced reverse-phase sorbent), která často

kombinuje izolační i přečišťovací krok, dále technika LLE (extrakce kapalina-kapalina s použitím polárních rozpouštědel, např. methanol) nebo iontopárová extrakce za použití iontové párového činidla – tetrabutylamonia (TBA) a následně extrakce do methyl *tert*-butyl etheru (MTBE). Následný přečišťovací krok je nejčastěji vedle zmiňované kolonkové SPE realizován i v disperzním uspořádání (d-SPE). d-SPE je výhodnější z toho důvodu, že sorbent (např. EnviCarb) je přidán přímo do extraktu, takže je tento postup časově méně náročný a jednodušší. Díky rozvoji ionizačních technik hmotnostních spektrometrií je v současnosti pro stanovení PFAS první volbou analýzy ultra účinná kapalinová chromatografie s tandemovou MS (UHPLC-MS/MS), která umožňuje stanovení různých skupin PFAS v ultrastopových koncentracích. K separaci jsou nejčastěji používány kolony s reverzní fází  $C_{18}$  a  $C_8$  a mobilní fáze MeOH/H<sub>2</sub>O nebo MeCN/H<sub>2</sub>O často s přídavkem octanu amonného (1,0–20 mM) pro zlepšení citlivosti analýzy.

Úprava vzorku před extrakcí je u všech metod pro stanovení BFR velmi jednoduchá. Spočívá v homogenizaci vzorku (protřepání) nebo jeho lyofilizaci (vymražení). Následná extrakce je opět realizována metodou LLE (cit.) nebo PLE (extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku). Extrakční činidla jsou na rozdíl od stanovení PFAS méně polární (dichlormethan, hexan, *n*-heptan apod.), protože, jak bylo uvedeno výše, BFR jsou ve srovnání s PFAS méně polární. Přečišťovací krok je realizován stejně jako u PFAS pomocí SPE ( $C_{18}$ , oxid křemičitý, oxid hlinitý a florisil). Identifikace a kvantifikace BFR může být realizována pomocí GC-MS (především polybromované difenylethery, PBDE) i LC-MS (např. isomery HBCD, TBBPA, hydroxy-deriváty PBDE, OH-PBDE).

Cílem prezentované studie bylo vyvinout a validovat analytickou metodu pro simultánní stanovení vybraných PFAS a BFR v krevním séru pupečnickové krve. V případě mateřského mléka byla modifikována (snížení množství vzorku potřebného pro analýzu) a následně verifikována již vyvinutá analytická metoda pro stanovení obou skupin látek. Nakonec byly oba postupy aplikovány pro analýzu reálných vzorků mateřského mléka a krevního séra.

### Experimentální část

Sledované analyty ze skupiny PFAS jsou uvedeny v tab. I a analyty ze skupiny BFR v tab. II.

#### Analýzované vzorky

Z důvodu nedostatečného množství mateřského mléka bylo pro validaci metody použito plnotučné kravské mléko (3,5 % tuku). Pro validaci metody pro stanovení BFR a PFAS v krevním séru bylo ze stejných důvodů použito

Tabulka I  
Sledované analyty ze skupiny PFAS

Skupina	Název sloučeniny	Zkratka	Počet uhlíků	
PFCA	Perfluor- <i>n</i> -butanová kyselina	PFBA	4	
	Perfluor- <i>n</i> -pentanová kyselina	PFPeA	5	
	Perfluor- <i>n</i> -hexanová kyselina	PFHxA	6	
	Perfluor- <i>n</i> -heptanová kyselina	PFHpA	7	
	Perfluor- <i>n</i> -oktanová kyselina	PFOA	8	
	Perfluor- <i>n</i> -nonanová kyselina	PFNA	9	
	Perfluor- <i>n</i> -dekanová kyselina	PFDA	10	
	Perfluor- <i>n</i> -undekanová kyselina	PFUdA	11	
	Perfluor- <i>n</i> -dodekanová kyselina	PFDoA	12	
	Perfluor- <i>n</i> -tridekanová kyselina	PFTTrDA	13	
	Perfluor- <i>n</i> -tetradekanová kyselina	PFTeDA	14	
	PFSA	Perfluor-1-butansulfonová kyselina	PFBS	4
		Perfluor-1-hexansulfonová kyselina	PFHxS	6
Lineární perfluor-1-oktansulfonová kyselina		L-PFOS	8	
Větvená perfluor-1-oktansulfonová kyselina		Br-PFOS	8	
Perfluor-1-dekansulfonová kyselina		PFDS	10	
FOSA	Perfluor-1-oktansulfonamid	PFOSA	8	
	<i>N</i> -methylperfluor-1-oktansulfonamid	N-EtFOSA	9	
	<i>N</i> -ethylperfluor-1-oktansulfonamid	N-MeFOSA	10	

Tabulka II  
Sledované analyty ze skupiny BFR

Skupina	Název sloučeniny	Zkratka	Počet uhlíků
OH-PBDE	6-hydroxy-2,2',4,4'-tetrabromdifenyloether	6-OH-BDE-47	12
	2'-hydroxy-2,3',4,5'-tetrabromdifenyloether	2'-OH-BDE-68	12
	4'-hydroxy-2,2',4,5'-tetrabromdifenyloether	4'-OH-BDE-49	12
	6'-hydroxy-2,2',4,4',5-pentabromdifenyloether	6'-OH-BDE-99	12
Bromované fenoly	2,4-dibromfenol	2,4-DBP	12
	2,4,6-tribromfenol	2,4,6-TBP	12
	Pentabromfenol	PBP	12
Isomery HBCD	Alfa-hexabromcyklododekan	$\alpha$ -HBCD	12
	Beta-hexabromcyklododekan	$\beta$ -HBCD	12
	Gama-hexabromcyklododekan	$\gamma$ -HBCD	12
	Tetrabrombisfenol A	TBBPA	15

komerčně dostupné lidské krevní sérum (Sigma-Aldrich, USA).

Na výskyt celkem 19 PFAS a 11 BFR včetně jejich hydroxylovaných derivátů (OH-PBDE) bylo analyzováno 137 párů vzorků mateřského mléka a krevního séra pupečnickové krve zaslaných ze Slovenské zdravotnické univerzity v Bratislavě.

Analytická metoda

Mateřské mléko: Do 50ml kyvety bylo odměřeno 5 ml mléka, dále bylo přidáno 0,12 ml kyseliny mravenčí (p.a. 85%, Penta, Česká republika) a 5 ml acetonitrilu (HPLC gradient, CHROMASOLV<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, USA) a kyveta byla 1 min intenzivně protřepávána. Následně bylo přidáno 0,5 g NaCl (p.a. 100%, Lach-Ner, s.r.o., Čes-

ká republika) a 2 g  $\text{MgSO}_4$  (bezvodý, p.a. 98%, Sigma-Aldrich, USA). Kyveta byla opět 1 min intenzivně protřepávána a dále 5 min odstředěna ve stolní centrifuze (Rotina 35 R, Hettich, Německo) při 10 000 otáčkách při 20 °C. 4 ml z horní vrstvy extraktu bylo přečištěno d-SPE s použitím 0,04 g  $\text{C}_{18}$  (Bondesil, 40  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, USA) a 0,60 g  $\text{MgSO}_4$ . Extrakt byl opět 1 min intenzivně třepán a následně odstředěn. 2,5 ml extraktu bylo odpařeno na rotační vakuové odparce (Multivapor P-12, Büchi, Švýcarsko) a odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml MeOH (HPLC gradient, LiChrosolv®, Merck, Německo), přefiltrován přes mikrofiltry (nylon, 0,22  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich) a převeden do vialky pro analytickou koncovku.

**Krevní sérum:** Do 15 ml kyvety bylo k 0,5 ml vzorku přidáno 5 ml MeCN, 0,05 ml 85% HCOOH a 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ . Vzorek byl 1 min intenzivně třepán a následně odstředěn (5 min, 10 000 rpm). Z kyvety bylo odebráno 4,5 ml extraktu, které bylo odpařeno na vakuové odparce. Získaný odparek byl rozpuštěn v 0,2 ml MeOH, přefiltrován přes mikrofiltry a převeden do vialky pro analytickou koncovku. Schéma obou extrakčních metod je uvedeno na obr. 1. Pro identifikaci a kvantifikaci všech sledovaných analytů byl použit kapalinový chromatograf Acquity UPLC™ s analytickou kolonou Acquity UPLC HSS T3 (100 mm  $\times$  2,1 mm; 1,8  $\mu\text{m}$ , Waters, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól Xevo TQ-S (Waters, USA) a iontovým zdrojem ZSpray™ (elektrosprej v negativním módu, Waters, USA). Pro gradientovou eluci byly použity mobilní fáze (A) 5 mM octan amonný (Sigma-Aldrich, USA) ve vodě a (B) MeOH s dobou analýzy jednoho vzorku 13 min (cit.<sup>7</sup>).

## Validace analytických metod

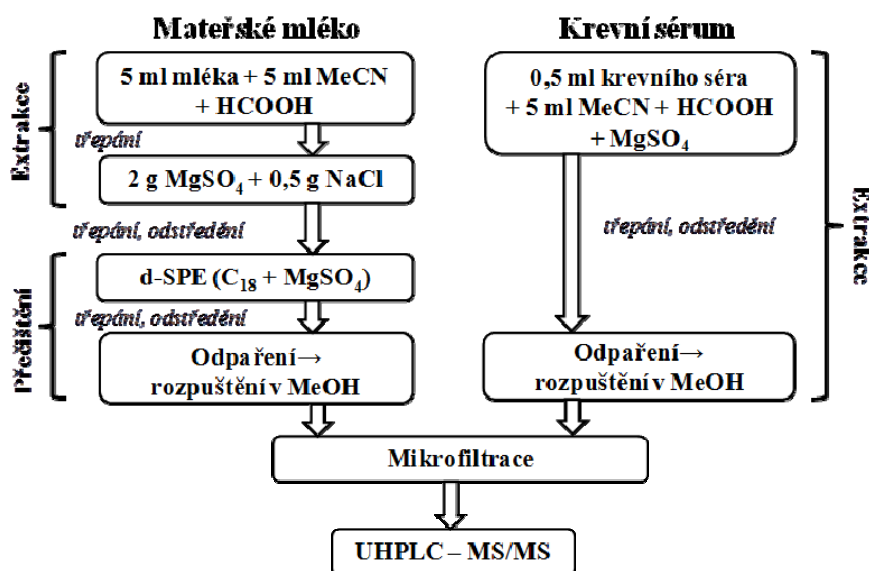
Vzhledem k tomu, že pro analýzu bylo dostupné pouze malé množství odebraných vzorků mateřského mléka (5 ml), bylo nutné původní metodu pro 15 ml mléka miniaturizovat při zachování požadovaných LOQ. Validace metody pro mateřské mléko byla realizována v šesti opakováních. Vzorky kravského mléka byly uměle kontaminovány na koncentračních hladinách 0,06  $\text{ng ml}^{-1}$  pro PFAS a 0,6  $\text{ng ml}^{-1}$  pro BFR.

Pro validaci metody pro krevní sérum byl použit uměle kontaminovaný vzorek lidského krevního séra. Pro analyty ze skupiny PFAS byl vzorek uměle kontaminován jen  $^{13}\text{C}$ -PFAS analogy, protože nebylo k dispozici krevní sérum, které by neobsahovalo cílové analyty z této skupiny látek. Validace metody byla realizována v šesti paralelních stanoveních na koncentračních hladinách 0,05  $\text{ng ml}^{-1}$  a 0,5  $\text{ng ml}^{-1}$  pro  $^{13}\text{C}$ -PFAS a 0,25  $\text{ng ml}^{-1}$  a 2,5  $\text{ng ml}^{-1}$  pro BFR.

Ke kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu s přidavkem isotopově značených PFAS, isomerů HBCD a TBBPA.

## Výsledky a diskuse

Výtěžnosti metody pro stanovení BRF a PFAS v mateřském mléce se pro všechny cílové látky pohybovaly v rozmezí od 82 do 117 % s opakovatelností (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka z šesti opakování) do 19 % a LOQ 0,01–0,02  $\text{ng ml}^{-1}$  pro PFAS a 0,01–0,1  $\text{ng ml}^{-1}$  pro BFR.



Obr. 1. Schéma analytických metod

Metoda pro krevní sérum byla validována na dvou koncentračních hladinách (0,05 a 0,5 ng ml<sup>-1</sup> PFAS, 0,25 a 2,5 ng ml<sup>-1</sup> BFR) v šesti opakováních na vzorku zkušebního krevního séra. Ke vzorku byla přidána směs <sup>13</sup>C-PFAS. Výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 70–126 % s opakovatelností do 19 % a LOQ 0,02–0,25 ng ml<sup>-1</sup> pro PFAS a 0,05–0,25 ng ml<sup>-1</sup> pro BFR.

Mezi nejčastěji detegované PFAS v obou testovaných matricích patřila PFOA a PFOS (> 90 % vzorků). Ve srovnání s krevním sérem byly jejich koncentrace (0,09 až 19,1 ng ml<sup>-1</sup>) přibližně o řád vyšší než v mateřském mléce (0,005–1,14 ng ml<sup>-1</sup>). Takové nálezy se dají vysvětlit tím, že PFAS se primárně vážou na bílkoviny v krevním séru a jejich přestup do mateřského mléka není tak významný.

V krevním séru byly zjištěny i PFHxA, PFNA, PFDA a PDUdA a PFHxS. Kontaminanty ze skupiny BFR se ve většině vzorků vyskytovaly pod LOQ, pouze v několika vzorcích mateřského mléka byl detegován TBBPA (koncentrace 0,05 ng g<sup>-1</sup>) a jednotlivé isomery HBCD (koncentrace 1,22–8,06 ng ml<sup>-1</sup>). Srovnáním výsledků se světovými nálezy dvou nejčastěji detegovaných PFAS, PFOA a PFOS, byl sledován trend snižování koncentrací. Tyto výsledky se shodují se závěry získanými z literatury, které dokazují, že koncentrace těchto kontaminantů během let klesají, a to i v rámci různých lokalit (Asie, Amerika nebo Evropa). Je to důsledek toho, že americká společnost 3M, významný výrobce PFAS mezi květnem 2000 a koncem roku 2002, postupně zastavila výrobu PFOS, PFOA, PFHxS a dalších sloučenin, které se na tyto látky mohou rozkládat. Od roku 2009 je navíc PFOS uveden ve Stockholmské úmluvě<sup>2</sup>, která se také zasazuje o snižování výskytu těchto kontaminantů v životním prostředí.

Přesto je ale stále nutné tyto kontaminanty v biogenních matricích sledovat, protože se jedná o bioakumulativní látky a některé z nich jsou také toxické.

## Závěr

V rámci studie byly validovány analytické metody pro simultánní analýzu širokého spektra organohalogenovaných kontaminantů (19 PFAS a 11 BFR) v mateřském mléce a krevním séru. Výtěžnosti obou metod byly pro PFAS v rozmezí 79–126 % a pro BFR 70–114 % s opakovatelností do 19 % a s limity kvantifikace 0,01 až 0,1 ng ml<sup>-1</sup> pro mateřské mléko a 0,02–0,25 ng ml<sup>-1</sup> pro krevní sérum. Těmito metodami bylo vyšetřeno 137 párů vzorků mateřského mléka a krevního séra, kdy mezi nejčastěji detegované látky patřily PFOS a PFOA. Stanovené koncentrace v námi vyšetřovaných vzorcích byly v porovnání s podobnými světovými studiemi srovnatelné.

*Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 20/ 2013).*

## LITERATURA

1. Kukulenyik Z., Reich J. A., Tully J. S., Needham L. L., Calafat A.: *M. Environ. Sci. Technol.* 38, 3698 (2004).
2. Fujii Y., Yan J., Harada K. H., Hitomi T., Yang H., Wang P., Koizumi A.: *Chemosphere* 86, 315 (2011).
3. Kim, S., Lee K. T., Kang Ch. S., Tao L., Kannan K., Kim K., Kim Ch., Lee J. S., Park P. S., Yoo Y. S., Ha J. Y. Shin Y., Lee J.: *Environ. Pollut.* 159, 169 (2011).
4. Ylinen M., Hanhijärvi H., Peura P.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 713 (1985).
5. Thomsen, C., Stigum H., Froshaug M., Broadwell S. L., Becher G., Eggesbo M.: *Environ. Int.* 36, 68 (2010).
6. Eljarrat, E., Guerra P., Martínez E., Farré M., Alvarez J. G., López-Teijó M., Barceló D.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 1940 (2009).
7. Lanková D., Lacina O., Pulkrabová J., Hajšlová J.: *Talanta* 117, 318 (2013).
8. Liu J., Li J., Zhao Y., Zhang L., Wu Y.: *Environ. Int.* 36, 433 (2010).

## BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ ELEKTRODY: VLIV KONCENTRACE BORU NA STANOVENÍ 2-AMINOBIFENYLU

JANA VOSÁHLOVÁ, JAROSLAVA ZAVÁZALOVÁ a KAROLINA SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Univerzitní výzkumné centrum UNCE „Supramolekulární chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
kpeckova@natur.cuni.cz

### Úvod

Borem dopované diamantové (BDD) elektrody patří od devadesátých let k populárním elektrodovým materiálům na bázi uhlíku. Mají široké využití především v environmentálních analýzách díky své malé náchylnosti k pasivaci elektrodového povrchu a širokému potenciálovému oknu, obzvláště v anodické oblasti<sup>1,2</sup>. BDD filmy se obvykle připravují v komerčních reaktorech metodou chemické depozice par (CVD – „chemical vapor deposition“) při použití žhavených vláken („hot filament“ – HF CVD) nebo mikrovlnného ohřevu („microwave plasma“ – MP CVD) jako zdroje energie. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu (zdroj uhlíku) a vodíku. Dopace borem se provádí přidáním diboranu či trimethylboru do směsi par pro depozici diamantu. Jeho obsah se udává jako poměr B/C v plynné fázi. Používají se koncentrace 500 ppm až 15 000 ppm, které vedou ke konečné koncentraci boru ve filmu  $1 \cdot 10^{18} \text{ cm}^{-3}$  až  $1 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ , přičemž koncentrace  $1 \cdot 10^{20} \text{ cm}^{-3}$  odpovídá jednomu atomu boru na tisíc atomů uhlíku<sup>3</sup>. Přibližně při této koncentraci dochází ke změně vodivosti BDD filmů, která vykazuje při nižších koncentracích polovodičový a při vyšších koncentracích kovový charakter<sup>4</sup>. V poslední době se objevilo několik prací studujících vliv koncentrace boru na fyzikální a elektrochemické charakteristiky BDD filmů<sup>5–8</sup>, odolnost vůči elektrochemické korozi<sup>7</sup>, odolnost povrchu vůči pasivaci<sup>9</sup>, účinnost elektrokatalytické anodické oxidace organických polutantů<sup>10</sup> a analytické parametry stanovení vybraných anorganických iontů<sup>11</sup>. Pro tyto účely byly připraveny BDD filmy s koncentrací boru v rozmezí cca  $10^{17} \text{ cm}^{-3}$  až  $10^{22} \text{ cm}^{-3}$ .

Cílem této práce byla charakteristika BDD filmů s koncentrací boru 500–8000 ppm vybranými spektrálními a elektrochemickými metodami a určení vlivu koncentrace boru na velikost potenciálového okna vybraných vodných roztoků základních elektrolytů a na voltametrické stanovení 2-aminobifenyly.

### Experimentální část

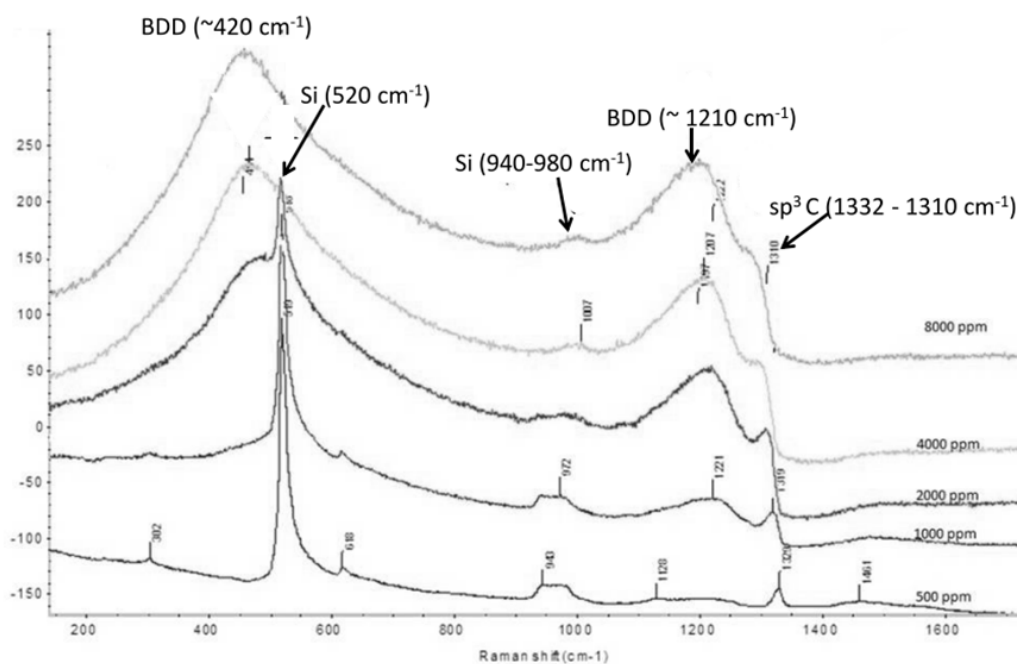
Bylo použito pět borem dopovaných diamantových filmových elektrod s B/C poměrem 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 4000 ppm a 8000 ppm. Tyto elektrody byly připraveny na Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky v Oddělení funkčních materiálů. Jako substrát pro chemickou depozici par s pomocí mikrovlnného ohřevu (System Seki ASTeX 5010, Woburn, MA, USA) byl použit p-křemík (ON Semiconductor, Rožnov pod Radhoštěm, ČR) s rezistivitou  $0,005 \Omega \text{ cm}^{-1}$  a tloušťkou 300  $\mu\text{m}$ . Takto připravené BDD destičky byly umístěny do teflonového elektrodového těla s velikostí otvoru ve šroubovacím nástavci 7,1 mm<sup>2</sup>. Pro elektrochemická měření byl použit přístroj Eco-Tribo Polarograph se softwarem PolarPro (verze 5.1, Polaro-Sensors, Praha, ČR) a tříelektrodové zapojení s referentní argentchloridovou elektrodou ( $3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ ) a pomocnou platinovou elektrodou (obě Elektrochemické detektory, Turnov, ČR). Pro diferenční pulsní voltometrii (DPV) byla použita výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms a rychlost  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . Před každou sérií měření byly elektrody aktivovány v  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  kyseliny sírové s vloženým potenciálem +2,4 V po dobu 5 min.

Pro spektrální charakterizaci povrchu diamantového filmu byla použita Ramanova spektroskopie (DXR Raman microscope (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) s mikroskopem Olympus, excitační vlnová délka 532 nm), mikroskopie atomárních sil (NT-MDT NTEGRA Prima AFM s křemíkovým ohebným nosníkem HA-NC, rezonanční frekvence 270 kHz) a skenovací elektronová mikroskopie (FEGSEM; mikroskop Quanta 200 FEG, FEI, ČR). Hodnoty pH byly měřeny digitálním pH metrem (pH Meter 3510, Jenway, UK) se skleněnou kombinovanou elektrodou.

Všechny použité chemikálie pro přípravu základních elektrolytů byly čistoty p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR). Dále byl použit 2-aminobifenyly (čistota  $\leq 95\%$ , Sigma-Aldrich, USA),  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$  (čistota  $\leq 99\%$ , Lach-Ner, Neratovice, ČR) a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  (čistota  $\leq 98\%$ , Sigma-Aldrich, USA).

### Výsledky a diskuse

Nejprve byla provedena spektrální charakterizace studovaných filmů pomocí Ramanovy spektroskopie, spektroskopie atomárních sil (AFM) a skenovací elektronové spektroskopie (SEM). Obě zobrazovací metody prokázaly nanokrystalickou strukturu filmů s velikostí krystalů 100–300 nm pro filmy s obsahem boru 500–4000 ppm. Pro film s obsahem boru 8000 ppm byla zaznamenána větší nejednotnost velikosti a současně menší krystaly.



Obr. 1. Ramanova spektra BDD filmů s koncentrací boru 500–8000 ppm, excitační vlnová délka 532 nm

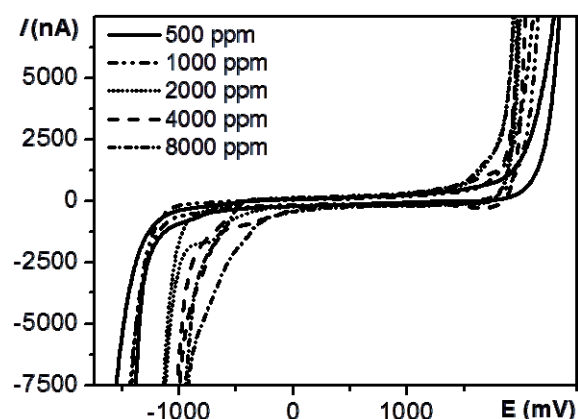
Tloušťka filmu je 1  $\mu\text{m}$  (určeno pomocí AFM). Ramanova spektra (obr. 1) vykazují nepřítomnost  $\text{sp}^2$  nečistot při  $1533\text{ cm}^{-1}$  a naopak s rostoucí koncentrací boru nárůst signálu při  $\sim 1332\text{ cm}^{-1}$  odpovídající  $\text{sp}^3$  uhlíku s typickým tvarem pro Fanovy resonance poukazující na přítomnost delokalizovaných stavů pocházejících z B-C vazeb. Dále jsou zřejmé typické signály křemíku ( $520\text{ cm}^{-1}$  a  $\sim 940$  až  $980\text{ cm}^{-1}$ ), které odpovídají fononové linii křemíku prvního a druhého řádu a pocházejí ze substrátu. Původ širokých pásů u  $\sim 420\text{ cm}^{-1}$  a  $\sim 1220\text{ cm}^{-1}$  je nejasný<sup>3</sup>.

Elektrochemická charakterizace byla provedena pomocí redoxních markerů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  a pro oba bylo zjištěno quasi-reversibilní chování: při aplikaci anodické aktivace BDD filmů při potenciálu  $+2,4\text{ V}$  v  $0,5\text{ mol l}^{-1}$  kyselině sírové se zvětšila proudová odezva katodického ( $I_K$ ) a anodického píku ( $I_A$ ), zmenšil se rozdíl potenciálů píků ( $\Delta E_p$ ) na hodnoty  $69\text{ mV}$  až  $150\text{ mV}$  a poměr velikosti píků  $I_A/I_K$  se přiblížil hodnotě  $1,0$ . Obsah boru v diamantovém filmu nemá významný vliv na velikost jejich proudové odezvy a  $\Delta E_p$ .

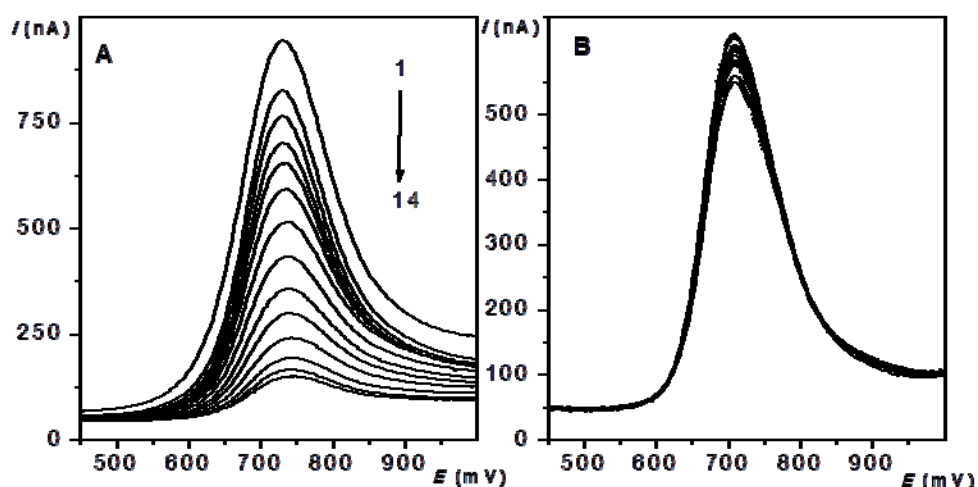
Cyklická voltametrie byla dále použita pro zjištění vlivu koncentrace boru v BDD elektrodách na velikost potenciálového okna pro několik běžných základních elektrolytů:  $1\text{ mol l}^{-1}$  KCl, borátový pufr pH 9,0; fosfátový pufr pH 7,0; octanový pufr pH 4,0;  $0,1\text{ mol l}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  a  $1 \cdot 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . U všech vybraných základních elektrolytů bylo pozorováno celkové zúžení potenciálového okna o cca  $800\text{ mV}$  s rostoucí koncentrací boru. Výrazněji se okno zužuje z katodické strany. Na anodické straně

není zúžení potenciálového okna tak průkazné, nicméně rozdíl krajního anodického potenciálu pro elektrodu s nejvyšší a nejnižší koncentrací byl zaznamenán na všech studovaných BDD filmech v rozmezí přibližně  $150\text{ mV}$  až  $250\text{ mV}$ . Na obr. 2 jsou tyto trendy zřejmé z cyklických voltamogramů  $0,1\text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chloristé.

Dále byl metodou diferenční pulzní voltametrie sledován vliv koncentrace boru na stanovení 2-aminobifenyly v Brittonově-Robinsonově pufru o pH 7,0. Jelikož oxidač-



Obr. 2. Cyklické voltamogramy  $0,1\text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chloristé pro všechny studované diamantové filmy s různým obsahem boru. Rychlost polarizace  $100\text{ mV s}^{-1}$



Obr. 3. DP voltamogramy 2-aminobifenylu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0 (A) bez čištění elektrodového povrchu mezi 14 jednotlivými skeny a (B) s čištěním při potenciálu +2,4 V a mícháním roztoku po dobu 30 s

Tabulka I

Parametry kalibrační závislosti pro stanovení 2-aminobifenylu metodou DPV na BDD elektrodách v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$

Poměr B/C [ppm]	Směrnice [mA l mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Limit detekce [mmol l <sup>-1</sup> ]
500	$7,7 \pm 0,3$	$20,3 \pm 5,9$	0,992	0,716
1000	$7,5 \pm 0,5$	$12,5 \pm 9,9$	0,978	0,475
2000	$11,1 \pm 0,2$	$13,0 \pm 6,1$	0,998	0,799
4000	$14,9 \pm 1,8$	$40,8 \pm 41$	0,959	0,477
8000	$18,0 \pm 0,1$	$8,5 \pm 1,8$	0,999	0,208

ní produkty 2-aminobifenylu výrazně pasivují elektrodový povrch (obr. 3A), byl optimalizován postup čištění elektrodového povrchu. Jako optimální byla vybrána kombinace elektrochemického a mechanického čištění: na obr. 3B jsou vyobrazeny DP voltamogramy pro čištění elektrodového povrchu pomocí vloženého kladného potenciálu +2,4 V a míchání roztoku po dobu 30 s přímo v měřeném roztoku. S takto zvoleným čištěním se proudová odezva 2-aminobifenylu výrazně neměníla, směrodatná odchylka výšky píku pro všechny studované BDD filmy byla menší než 4 %.

S tímto aktivačním programem byla změřena kalibrační závislost 2-aminobifenylu v rozsahu koncentrací  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  pro všechny studované BDD filmy. Parametry a detekční limity jsou uvedeny v tab. I. Je zřejmé, že s rostoucí koncentrací boru v BDD filmu se zvyšuje směrnice kalibrační závislosti, tj. proudová odezva 2-aminobifenylu, a snižuje se mez detekce a dále se zlepšuje opakovatelnost výšky píku 2-AB.

## Závěr

Byla provedena základní spektrální a elektrochemická charakterizace BDD filmů s obsahem boru 500–8000 ppm. Z analytického hlediska se jeví významná závislost šířky potenciálového okna na koncentraci boru a její vliv na velikost píku 2-aminobifenylu při DP voltametii, kdy mez detekce ( $L_D$ ) leží pro všechny filmy v koncentračním řádu  $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  a s rostoucí koncentrací boru v BDD filmu klesá, rozdíl mezi elektrodou s obsahem boru 500 ppm ( $L_D = 7,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ) a 8000 ppm ( $L_D = 2,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ) je zhruba trojnásobný. Se zvyšující se koncentrací boru v BDD filmu se zlepšuje opakovatelnost výšky píku 2-AB. Koncentrace boru v BDD filmech se tudíž jeví jako důležitý parametr při voltametrických stanoveních organických sloučenin s ohledem na jejich reakční mechanismus, oxidační či redukční potenciál a typ elektroanalytické metody.

*Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 684213) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151). JZ děkuje za podporu PřF UK v Praze v rámci projektů STARS a SVV. Děkujeme Ing. Václavu Petrákovi z FZÚ AVČR za přípravu BDD elektrod a RNDr. Ivaně Šloufové, Ph.D. za pomoc s jejich spektrální charakterizací.*

## LITERATURA

1. Fujishima A., Einaga Y., Rao T. N., Tryk D. A.: *Diamond Electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam 2005.
2. Peckova K., Musilova J., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
3. Zivcova Z. V., Frank O., Petrak V., Tarabkova H., Vacik J., Nesladek M., Kavan L.: *Electrochim. Acta* 87, 518 (2013).
4. Holt K. B., Bard A. J., Show Y., Swain G. M.: *J. Phys. Chem. B* 108, 15117 (2004).
5. Becker D., Juttner K.: *Electrochim. Acta* 49, 29 (2003).
6. Watanabe T., Shimizu T. K., Tateyama Y., Kim Y., Kawai M., Einaga Y.: *Diam. Relat. Mat.* 19, 772 (2010).
7. Wei J. J., Li C. M., Gao X. H., Hei L. F., Lvun F. X.: *Appl. Surf. Sci.* 258, 6909 (2012).
8. Trouillon R., O'Hare D., Einaga Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 5422 (2011).
9. Feng Y. J., Lv J. W., Liu J. F., Gao N., Peng H. Y., Chen Y. Q.: *Appl. Surf. Sci.* 257, 3433 (2011).
10. Matsushima J. T., Silva W. M., Azevedo A. F., Baldan M. R., Ferreira N. G.: *Appl. Surf. Sci.* 256, 757 (2009).
11. May P. W., Ludlow W. J., Hannaway M., Heard P. J., Smith J. A., Rosser K. N.: *Diam. Relat. Mat.* 17, 105 (2008).



# ANALÝZA MYKOTOXINŮ, PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ A PESTICIDŮ V HERBÁLNÍCH ČAJÍCH; APLIKACE U-HPLC-HRMS/MS METODY, ZHODNOCENÍ RIZIKA

ALENA ZACHARIÁŠOVÁ, ZBYNĚK DŽUMAN,  
MILENA ZACHARIÁŠOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
alena.zachariasova@vscht.cz

## Úvod

Používání doplňků stravy rostlinného původu se v posledních letech stává běžnou součástí našeho života, bohužel však pozitivní vliv biologicky aktivních látek může být negativně ovlivněn přítomností potenciálně toxických látek, jako např. mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů, a reziduí pesticidů. Zdravotní nezávadnost doplňků stravy, jakožto i relevance zdravotních tvrzení uváděných na obalech přípravků, jsou předmětem hodnocení expertních panelů Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA). Maximální hladiny kontaminujících látek v potravinách jsou určeny evropskými nařízeními. Evropská databáze pesticidů uvádí maximální limity reziduí v dané potravině (MLR). Tato databáze dále obsahuje i výčet účinných látek schválených v Evropě a odkazy na právní předpisy<sup>1</sup>. Maximální množství mykotoxinů v potravinách jsou upravována nařízením komise (ES) č. 1881/2006 (cit.<sup>2</sup>). Výskyt fusariových toxinů v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice upravuje nařízení komise (ES) č. 1126/2007 (cit.<sup>3</sup>). Nařízení komise (ES) č. 165/2010 udává obsah aflatoxinů v potravinách<sup>4</sup>. Co se týká ochratoxinu A, ten je ošetřen v nařízeních komise (ES) č. 105/2010 a č. 594/2012 (cit.<sup>5,6</sup>). Pro komplexní posouzení možných zdravotních rizik souvisejících s přítomností různých typů kontaminantů není v současné době dostatečné množství informací a tak otázka výsledného efektu 'koktejlu' toxických látek a složek s pozitivními účinky na organismus zůstává otevřená.

Cílem této studie bylo zmapování kontaminace komerčně dostupných bylinných čajů na českém trhu multi-detekční analytickou metodou pro stanovení širokého spektra produktů sekundárního metabolismu toxinogenních plísní, pyrrolizidinových alkaloidů a reziduí pesticidů s využitím moderní analytické strategie reprezentované ultra-účinnou kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-HR/MS/MS).

Získané výsledky budou poskytnuty EFSA v reakci na oficiální výzvu „*Call for continuous collection of chemical contaminants occurrence data in food and feed*“, o shromažďování údajů o výskytu vybraných kontaminujících látek v potravinách a krmivech<sup>7</sup>.

## Experimentální část

Pro simultánní analýzu mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a pesticidů byla využita optimalizovaná extrakční metoda založená na přístupu QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). 1 g homogenního vzorku byl navážen do 50 ml kyvety. Modifikace klasického přístupu QuEChERS (cit.<sup>8</sup>) spočívala v delším smočení matrice vzorku okyselenou vodou, delší době extrakce a finálním přečištění extraktu s využitím sorbentu C18. K navážce vzorku bylo přidáno 10 ml 1% HCOOH ve vodě pro smočení matrice. Po 30 min bylo přidáno 10 ml acetonitrilu a vzorek byl třepán na třepače po dobu 30 min (240 rpm). Do kyvety byly následně přidány soli MgSO<sub>4</sub> (4 g) a NaCl (1 g) a vzorek byl intenzivně třepán po dobu 3 min. Následovala centrifugace po dobu 5 min při 10 000 rpm. Po centrifugaci byly z horní acetonitrilové vrstvy odebrány 2 ml extraktu do malé kyvety s předváženými 300 mg MgSO<sub>4</sub> a 100 mg sorbentu Bondesil (modifikovaná C18). Poté následovala centrifugace 2 min při 5000 rpm. Takto připravený vzorek byl převeden do vialky a připraven k analýze. Pro kvantitativní stanovení sledovaných analytů byla využita moderní metoda U-HPLC-HR/MS/MS. Tento nový typ hmotnostně-spektrometrické instrumentace s hybridním uspořádáním analyzátorů umožňuje identifikaci a kvantifikaci cílových analytů i na velmi nízkých hladinách. Charakteristiky kapalinové chromatografie, použitý gradient mobilní fáze a hmotnostně-spektrometrické podmínky měření jsou shrnuty v tab. I až III. Celkem bylo analyzováno 389 analytů, tj. 55 mykotoxinů, 11 pyrrolizidinových alkaloidů a 323 pesticidů.

## Výsledky a diskuse

Pomocí výše popsané multi-detekční metody bylo analyzováno celkem 23 vzorků bylinných čajů zakoupených na českém trhu. V analyzovaných vzorcích bylo stanovováno celkem 389 analytů, z toho 55 mykotoxinů, 11 pyrrolizidinových alkaloidů a 323 pesticidů.

### Mykotoxiny

Ze všech analyzovaných vzorků jich bylo pouze 6 prostých mykotoxinové kontaminace (26 %). Zbylých 74 % vzorků byly pozitivní na přítomnost alespoň jednoho mykotoxinu. Mezi detegovanými mykotoxiny byly alternariol, (detegován u 5 vzorků), alternariol-methylether (detegován u 3 vzorků), dále mykofenolová kyselina (9 pozitivních vzorků), diacetoxyscirpenol (2 pozitivní vzorky), ergotamin (1 pozitivní vzorek), enniatin B

Tabulka I  
Parametry U-HPLC

Parametr	Hodnota	
Systém	UltiMate® 3000 RSLC Dionex	
Kolona	Accucore aQ (150 × 2,1 mm, 2.6 µm) (Thermo Fisher Scientific, USA)	
Teplota kolony	25 °C	
Průtok mobilní fáze	0,4 ml min <sup>-1</sup>	
Objem nástřiku	2 µl	
Mobilní fáze	pozitivní mód	A: H <sub>2</sub> O:MeOH (98:2); 5 mM mravenčan amonný; 0,1% HCOOH B: MeOH:H <sub>2</sub> O (98:2); 5 mM mravenčan amonný; 0,1% HCOOH
	negativní mód	C: H <sub>2</sub> O:MeOH (98:2); 5 mM octan amonný D: MeOH:H <sub>2</sub> O (98:2); 5 mM octan amonný
Délka metody	16 min	
Gradient mobilní fáze	viz tab. II	

Tabulka II  
Gradient mobilní fáze (stejný pro pozitivní i negativní mód)

t [min]	A/C [%]	B/D [%]
0	100	0
4	80	20
5,5	60	40
10,5	0	100
12,9	0	100
13,0	100	0
16,0	100	0

Tabulka III  
Hmotnostně-spektrometrické podmínky analýzy

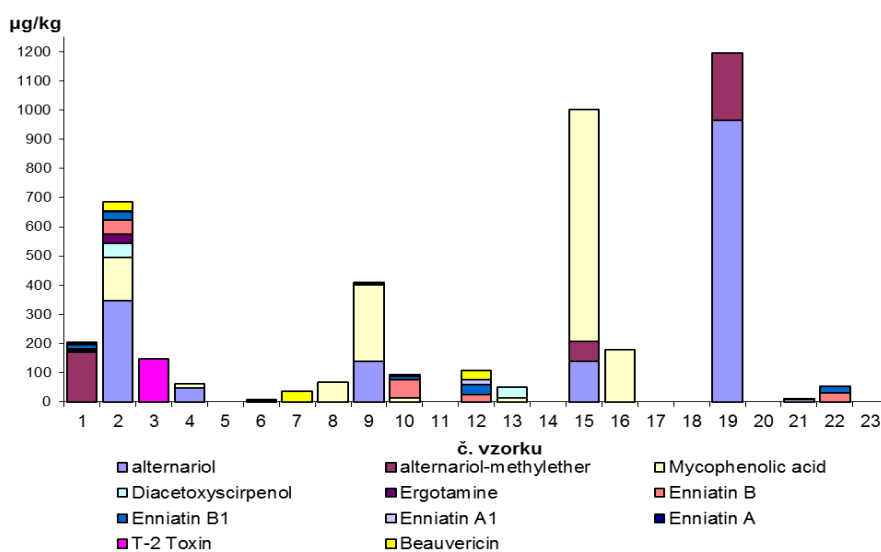
<i>Hmotnostní spektrometr</i>	<i>Q-Exactive Thermo Fisher Scientific</i>
Ionizace	ESI +/-
Nosný/pomocný plyn (N <sub>2</sub> )	32/7 arb.j.
Teplota kapiláry	300 °C
Vypařovací teplota	220 °C
Napětí na elektrospreji	3,3 kV
S-lens hodnota	60
<i>Podmínky akvizčního módu full MS</i>	
Rozlišení	70 000 FWHM (High); 1,5 Hz
Hmotnostní rozsah <i>m/z</i>	80–1200
<i>Podmínky akvizčního módu ddMS2</i>	
Rozlišení	17 500 FWHM (Medium); 12 Hz
Hmotnostní rozsah <i>m/z</i>	50 - <i>m/z</i> fragmentovaného analytu

(detegován u 6 vzorků), enniatin B1 (5 pozitivních vzorků), enniatin A1 (6 pozitivních vzorků), enniatin A (4 pozitivní vzorky), T-2 toxin (1 pozitivní vzorek) a beauvericin (4 pozitivní vzorky). Nejčastěji detegovaným mykotoxinem byla mykofenolová kyselina, a to v rozmezí od 6 do 796 µg kg<sup>-1</sup>.

Na obr. 1 je uveden přehled celkové mykotoxinové kontaminace všech analyzovaných vzorků. Nejvíce kontaminovaným vzorkem byl z tohoto pohledu vzorek č. 19 (1196 µg kg<sup>-1</sup>), vzorek 15 (1003 µg kg<sup>-1</sup>) a vzorek č. 2 (689 µg kg<sup>-1</sup>), ten obsahoval zároveň i nejvyšší počet detegovaných mykotoxinů (8) z 56 analyzovaných (14 %).

### Pesticidy

Z celkového počtu 23 vzorků pouze u třech nebyly nalezeny žádné pesticidy. Z 323 sledovaných pesticidů jich bylo identifikováno a kvantifikováno celkem 16 (5 %). Jednalo se o bentazone, který byl detegován u dvou vzorků, dále pak MCPA (detegován u 2 vzorků), matazachlor (detegován u 1 vzorku), dále metalaxyl (2 pozitivní vzorky), azoxystrobin (2 pozitivní vzorky), fenpyroximate (2 pozitivní vzorky), carbendazim (6 pozitivních vzorků), imamethabenz-methyl (1 pozitivní vzorek), propamocarb (1 pozitivní vzorek), propiconazole (3 pozitivní vzorky), piperonyl butoxide (detegován u 12 vzorků), propargite

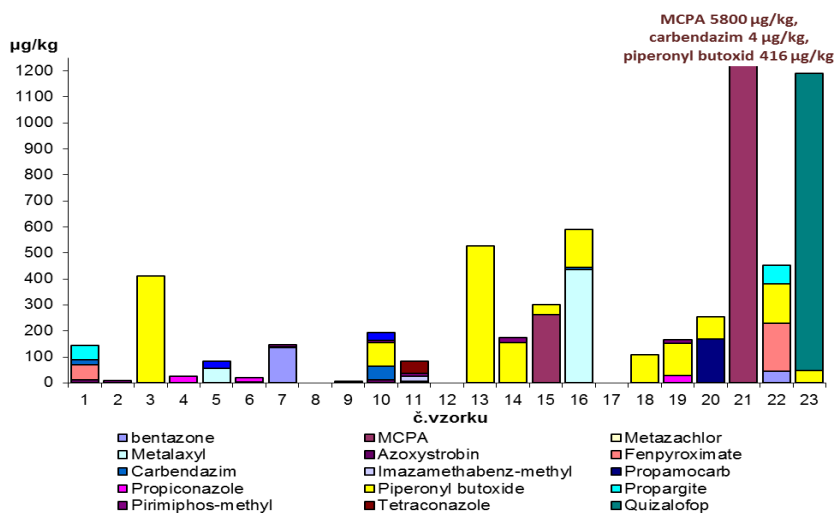
Obr. 1. Koncentrace mykotoxinů v analyzovaných vzorcích [µg kg<sup>-1</sup>]

(2 pozitivní vzorky), pirimiphos-methyl (7 pozitivních vzorků), tetraconazole (1 pozitivní vzorek), quizalofop (1 pozitivní vzorek) a chlorpyrifos, který byl detegován u 2 vzorků. Nejčastěji se vyskytujícím pesticidem byl piperonyl butoxide, ten se vyskytoval v 52 % všech analyzovaných vzorků, a to v rozmezí od 39 do 526 µg kg<sup>-1</sup>.

Z obr. 2, který shrnuje celkovou kontaminaci reziduí pesticidů, je patrné, že nejvyšší koncentrace byla zjištěna u vzorku č. 21 a to celkově 6220 µg kg<sup>-1</sup>. Nejvyšší podíl na kontaminaci měl pesticid MCPA, 5800 µg kg<sup>-1</sup>. Pro tento

herbicid legislativa udává maximální reziduální limit (MRL). Ten byl v tomto případě překročen 58×.

Legislativa pro jednotlivé pesticidy dále udává tzv. akceptovatelné denní příjmy (ADI), což je množství rezidua pesticidu, které lze denně přijmout z potravin, aniž by to negativně ovlivnilo zdraví konzumenta. Z pohledu ADI a kontaminace analyzovaných vzorků je jediným významným nálezem pesticid MCPA ve vzorku č. 21. Zjištěná koncentrace MCPA (5800 µg kg<sup>-1</sup>) byla přepočítána na výrobcem doporučenou denní dávku bylinného čaje a bylo

Obr. 2. Koncentrace pesticidů v analyzovaných vzorcích [µg kg<sup>-1</sup>]

vyjádřeno množství MCPA, které může konzument prostřednictvím tohoto výrobku potenciálně denně přijmout. Při požití maximální doporučené denní dávky, kterou udává výrobce pro vzorek č. 21, by byl ADI tohoto herbicidu vyčerpán z 62 %. Toto zjištění je znepokojující především proto, že je tento pesticid označen za potenciálně karcinogenní a je pravděpodobné, že konzument kontaminovaného vzorku může přijmout za den tento pesticid i z dalších zdrojů.

### Pyrrrolizidinové alkaloidy

Jak uvádí obr. 2, kontaminaci PA vykazovaly pouze 3 vzorky. Z 11 sledovaných bylo kvantifikováno 6 pyrrrolizidinových alkaloidů. Vzorek s nejvyšším počtem vyskytujících se PA byl vzorek č. 2. Ten obsahoval 6 různých PA, a to retrosine, retrosine-*N*-oxide, senecionine, seneciphylline, seneciphylline-*N*-oxide, senecionine-*N*-oxide. Celková kontaminace PA u tohoto vzorku dosáhla 700 mg kg<sup>-1</sup>. Tento bylinný čaj je určen na podporu léčby jater, což z důvodu hepatotoxicity pyrrrolizidinových alkaloidů může představovat pro konzumenta potenciální zdravotní riziko. Pro pyrrrolizidinové alkaloidy dosud nebyly stanoveny limity upravující jejich koncentrace v potravinách. V současné době existuje pouze vědecké stanovisko evropského úřadu pro bezpečnost potravin, které poslouží jako podklad pro tvorbu legislativních limitů<sup>9</sup>.

### Závěr

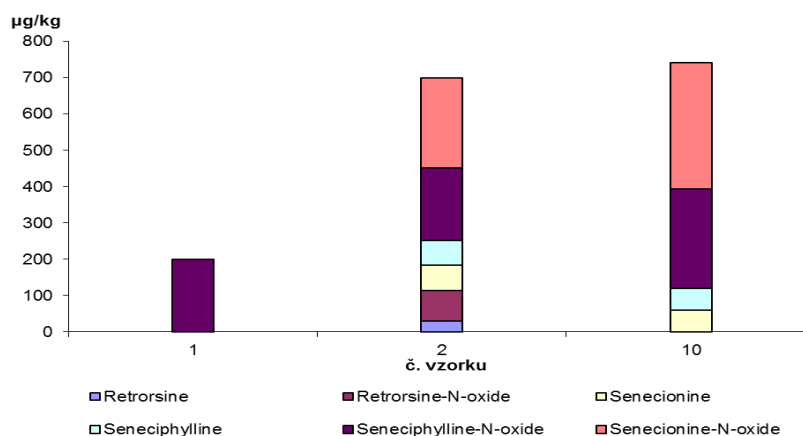
V rámci této studie bylo analyzováno 23 bylinných čajů zakoupených na českém trhu s využitím multi-detekční metody pro stanovení 389 analytů, z toho 55 mykotoxinů, 11 pyrrrolizidinových alkaloidů a 323 pesticidů. Celkem bylo kontaminováno alespoň jednou z uvedených skupin kontaminantů 96 % analyzovaných

vzorků. Mykotoxinová kontaminace byla zjištěna u 17 vzorků. Pesticidy byly detegovány u 20 vzorků a pyrrrolizidinové alkaloidy u 3 vzorků. Z celkového počtu 389 stanovovaných analytů bylo kvantifikováno 33 analytů (8,5 %), 11 mykotoxinů, 6 pyrrrolizidinových alkaloidů a 16 pesticidů. Ve 13 vzorcích bylo dokonce detegováno překročení MRL alespoň jedním z detegovaných pesticidů. Z pohledu limitů TDI a ADI je výrazným problémem kontaminace vzorku čaje č. 21 potenciálně karcinogenním herbicidem MCPA, který byl detegován na hladině 5800 µg kg<sup>-1</sup>. Při procentuálním vyjádření příjmu ADI to představuje 62%, což je vzhledem k možnému příjmu z potravin, které jsou v potravním koši zastoupeny významněji, značným problémem. Používání doplňků stravy rostlinného původu v posledních letech stále stoupá, bohužel však pozitivní účinek na lidský organismus může být značně ovlivněn přítomností kontaminujících látek. Pro velkou většinu z nich dosud nebyly stanoveny legislativní limity. Z důvodu ochrany zdraví konzumentů je nutné vyvíjet dostatečně citlivé analytické metody a sledovat kontaminace těchto přípravků.

*Studie byla provedena za podpory (i) Pražského vysokoškolského analytického centra pro ochranu zdraví, bezpečnosti potravin a ochranu životního prostředí, Operační program Praha – Konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/22197) a (ii) Národního programu udržitelnosti (NPU I (LO) MSMT – 34870/2013).*

### LITERATURA

1. EU Pesticides Database. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm) (accessed Jan 05, 2014).
2. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úřední věstník Evropské unie L 364/5.



Obr. 3. Koncentrace PA v pozitivních vzorcích [µg kg<sup>-1</sup>]

3. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice. Úřední věstník Evropské unie L 255/14.
4. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 165/2010 ze dne 26. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o aflatoxiny. Úřední věstník Evropské unie L 50/8.
5. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A. Úřední věstník Evropské unie L 35/7.
6. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách. Úřední věstník Evropské unie L 176/43.
7. Call for continuous collection of chemical contaminants occurrence data in food and feed. European Food Safety Authority (EFSA). <http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/datex101217.htm> (accessed Jan 05, 2014).
8. Zachariasova M., Lacina O., Malachova A., Kostelanska M., Poustka J., Godula M., Hajslova J.: *Anal. Chim. Acta* 662, 51 (2010).
9. SCIENTIFIC OPINION Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile. *EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR)*. European Food Safety Authority (EFSA).

---

## CONTENTS

<i>K. Adámková, D. Kremr, A. Čížková, M. Adam, K. Ventura</i>	Analýza aromaprofilu u vzorků ječného a pšeničného sladu	s207
<i>M. Blašková, V. Vyskočil</i>	Jednoduchý elektrochemický biosenzor pro komplexní detekci poškození DNA chemickými karcinogeny	s211
<i>S. Janků, V. Škeříková, B. Hoznauerová, J. Urban</i>	Příprava a charakterizace vysoce zesíťných monolitických stacionárních fází pro separace malých molekul	s216
<i>K. Kolesíková, T. Mikysek</i>	Elektrochemické stanovení kapsaicinu pomocí uhlíkové pastové elektrody	s221
<i>P. Konrád, O. Kvítek, V. Švorčík</i>	Charakterizácia vplyvu žihania na vlastnosti nanoštruktúr au na sklenenom substráte	s225
<i>M. Krejčová, H. Dejmková, M. Bursová</i>	Optimalizace podmínek chromatografického stanovení aromatických aminů s elektrochemickou detekcí	s229
<i>A. Laryšová, L. Endlová</i>	Analýza alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie	s233
<i>S. Lupínková, K. Výborný, M. Benkocká, N. Slepíčková Kasálková, V. Švorčík, Z. Kolská</i>	Analýza povrchů polymerů aktivovaných plazmatem a následně roubovaných vicinálními sloučeninami	s237
<i>M. Nagyová, A. Řezníčková, Z. Kolská, N. Slepíčková Ka- sálková, P. Slepíčka, V. Švorčík</i>	Analýza povrchu polymérov očkovaných cysteamínem pre tkanivové inžinierstvo	s241
<i>Z. Neoralová, B. Švecová</i>	Stanovení obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivita moravských vín	s246
<i>H. Nožičková, A. Jirásková, L. Česlová</i>	Analýza volných a vázaných fenolických látek ve sladovnickém ječmeni	s251
<i>L. Piecková, M. Tatarkovič, T. Vostracká, Z. Fišar, R. Jirák, J. Raboch, V. Setnička</i>	Metody chiroptické spektroskopie – nástroj v diagnostice degenerativních onemocnění?	s255
<i>L. Řezáčová, P. Lubal</i>	Analytické využití nanočástic na bázi kvantových teček	s259
<i>K. Stávková, V. Vyskočil</i>	Elektrochemický výzkum supramolekulárních interakcí dna s genotoxickým 2-nitrofluorenem	s262
<i>K. Urbancová, D. Lanková, J. Pulkrabová, J. Hajšlová</i>	Rychlé metody pro sledování organohalogenovaných kontaminantů v mateřském mléce a krevní plasmě	s266
<i>J. Vosáhllová, J. Zavázalová, K. Schwarzová-Pecková</i>	Borem dopované diamantové elektrody: vliv koncentrace boru na stanovení 2-aminobifenyly	s270
<i>A. Zachariášová, Z. Džuman, M. Zachariášová, J. Hajšlová</i>	Analýza mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a pesticidů v herbálních čajích; aplikace U-HPLC-HRMS/MS metody, zhodnocení rizika	s274

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 108(S), čís./no. Symposia • LISTY CHEMICKÉ roč./vol. 138, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 124 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze), ISSN 1803-2389 (CD verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: P. Chuchvalec • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, P. Holý, J. Horák, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Podešva, P. Rauch; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, K. Melzoch, T. Míšek, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • Redakce čísla Symposia (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2014 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 177 Kč, roční plné předplatné 2014 (12 čísel) 1793 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 897 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 268 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2014 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 18.12.2014.**