

**16. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ
STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI
V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE**

„O CENU FIRMY MERCK 2013“

6. a 7. února 2013

Brno



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

16. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE „O CENU FIRMY MERCK 2013“

Ve dnech 6. a 7. února 2013 v moderních prostorách kampusu Masarykovy Univerzity v Brně v Bohunicích úspěšně proběhl v pořadí již 16. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck 2013“ 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 21 účastníků z pěti českých a jedné slovenské vysoké školy. Odborná zástita letos připadla kolegům z oddělení analytické chemie Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity pod vedením prof. RNDr. Viktora Kanického, DrSc. Jím vedený organizační tým (ve složení Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D., Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D., Mgr. Petr Tábořský, Ph.D. a Mgr. Tomáš Vaculovič, Ph.D.) zajistil perfektní zázemí a vytvořil dokonalou a příjemnou atmosféru během obou dní soutěže, za což jim patří zasloužené poděkování. Mimořádně vyrovnané soutěžní práce a vysoká kvalita a profesionalita jejich prezentací jsou dokladem rostoucí úrovně všech pracovišť připravující vysokoškolsky vzdělané odborníky v oblasti analytické chemie. Krajně nelehký úkol stál tudíž před porotou pracující ve složení doc. Ing. M. Adam, Ph.D., prof. RNDr. J. Berek, CSc., doc. Ing. K. Hroboňová, Ph.D., doc. Ing. P. Janoš, CSc., prof. Ing. V. Kanický, DrSc., doc. RNDr. P. Lubal, Ph.D., RNDr. H. Pokorná, RNDr. R. Zajíčková, Ph.D. a Mgr. J. Znaležiona, Ph.D., kterým rovněž patří dík.

1. místo získal **Bc. Milan Libánský** z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za práci *Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou*.

2. místo získal **Bc. Jakub Koltan** z Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za práci *Stanovení poměru enantiomerů L- a D-cysteinu pomocí nanočástic stříbra*.

O 3. místo se podělili **Kateřina Činčalová** z Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za práci *Studium vztahu konformace a antimikrobiální aktivity nového antimikrobiálního peptidu Lasioglossinu* a **Bc. Marek Pernica** z Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně za práci *Optické chemosenzory pro analýzu sloučenin obsahujících síru*.

Vzhledem k mimořádné kvalitě přednesených prací se porota rozhodla udělit zvláštní ceny poroty následujícím soutěžícím: **Bc. Andrea Spevak** z Ústavu analytické chemie Fakulty chemické a potravinářské technologie Slovenské technické univerzity v Bratislavě za práci *Využití polyméru s odtlačkom molekuly umbeliferonu pri analýze*



Ocenění ze soutěže o cenu firmy Merck 2013. Zleva: **Bc. Jakub Koltan** (2. místo), **Kateřina Činčalová** (3. místo), **Bc. Martin Šťastný** (zvláštní cena poroty), **Bc. Andrea Spevak** (zvláštní cena poroty), **Bc. Milan Libánský** (1. místo), **Bc. Marek Pernica** (3. místo)

rastlinných vzorek a **Bc. Martinu Šťastnému** z Fakulty životního prostředí Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem za práci *Sledování degradace organofosforečných pesticidů na reaktivních sorbentech pomocí chromatografických a spektrálních metod*.

Všem oceněným srdečně blahopřejeme a všem účastníkům děkujeme za odvedenou práci i krásné prezentace. Poděkování patří i Ing. R. Řápkové, výkonné redaktorce časopisu Chemické listy, a RNDr. V. Vyskočilovi, Ph.D. za pečlivou přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Chemické Listy věnovaného této soutěži a RNDr. H. Pokorné za pomoc při organizačním zajištění této soutěže. A v neposlední řadě považují za milou povinnost poděkovat panu Arturovi Stawiskému, řediteli divize Chemie a laboratorních produktů a paní Ing. L. Ungrmanové, prodejní manažerce divize Chemie a laboratorních produktů firmy Merck spol. s r.o.

Na závěr nezbyvá než sdělit, že 17. ročník této příjemné a užitečné soutěže bude zajišťován kolektivem vedeným prof. Ing. Karlem Venturou, CSc. na katedře analytické chemie Fakulty chemicko-technologické v Pardubicích ve dnech 5. a 6. února 2014 a těšit se, že bude stejně zajímavý a příjemný jako ročníky dosavadní.

Jiří Berek

SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V SEMENECH ŘEPKY OLEJKY

JIŘÍ BALÁN, MAGDA VOSMANSKÁ
a OTO MESTEK

Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5,
166 28 Praha 6
balanj@vscht.cz

Úvod

Rostliny přijímají selen kořenovým systémem z půdy a míra akumulace je závislá na jeho formě. Primárním zdrojem selenu v půdě je zvětrávání a vyluhování z podložních hornin, kde se nachází ve formě seleničitanů a selenidů ve spojení se sírovými minerály (arsenopyrit, chalkopyrit, atd.)¹. Nejvhodnější forma pro transport selenu do cytoplasmatické membrány a následně do buněčné stěny je selenan. Transport je realizován pomocí tzv. sulfátového transportéru, který není specifický, a proto nerozpozná selenan a síran. V buňce je přijatá forma selenu redukována na selenid, který je reaktivní a dále se inkorporuje do aminokyselin místo síry². Takto vzniklé selenoaminokyseliny jsou dále metabolizovány do selenoproteinů.

Při speciální analýze nízkomolekulárních sloučenin selenu je nutné uvolnit jednotlivé selenoaminokyseliny štěpením peptidových vazeb v proteinech. Často využívanou možností je enzymatická hydrolýza pomocí nespecifické proteasy XIV³. K separaci uvolněných selenoaminokyselin se využívají nejrůznější techniky kapalinové chromatografie, běžně se jedná o kapalinovou chromatografii s obrácenou fází (RP-HPLC). Protože selenoaminokyseliny ve vodném prostředí disociují, je nutné pracovat s přidavkem iontově-párového činidla (IP) v mobilní fázi, viz např.^{4,5}.

Spojením techniky kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (ICP-MS) jakožto prvkově selektivním detektorem tvoří účinný nástroj pro speciální analýzu selenu. Selen se detekuje linií izotopu ⁸⁰Se z důvodu jeho největšího zastoupení (49,61 %). Na linii tohoto izotopu se však vyskytují spektrální interference polyatomických iontů⁶ ⁴⁰Ar₂⁺, ³²S¹⁶O₃⁺, které je nutné odstranit zaváděním methanu do dynamické reakční cely (DRC). Při měření na tomto izotopu je zaručena maximální citlivost detekce^{7,8}.

Záměrem výzkumu bylo ověřit možnost, jak zvýšit obsah selenu v potravě. Česká republika patří mezi země s nízkými koncentracemi selenu v půdě a jednou z cest, jak zabránit deficitu selenu v lidském organismu, je zvýšení obsahu selenu v přirozené stravě. Běžnou plodinou pěstovanou v našich podmínkách je řepka olejka. Odtučněný řepkový šrot, který tvoří odpad při výrobě olejů, se dále

využívá jako krmivo pro jateční prasata. Pokud se podaří zvýšit obsah selenu v řepce, může se tak vepřové maso zdrojem selenu v lidské výživě.

Experimentální část

Analyzovaný vzorek řepky ozimé byl vypěstován na pokusném poli České zemědělské univerzity v Praze. V této práci byla analyzována odrůda NK Oktans, která byla ošetřena postřikem roztokem seleničitanu sodného v dávce 50 g/ha Se. Postřik byl proveden ve vegetační fázi dlouhivého růstu a během sklizně byla odebrána semena.

Extrakce tuku z mletého vzorku semen řepky byla provedena v Soxhletově extraktoru po dobu šesti hodin za použití petroletheru jakož to extrakčního činidla. Odtučněný vzorek byl sušen při 105 °C po dobu dvou hodin.

Celkový obsah selenu ve vzorku odtučněného řepkového šrotu byl stanoven po rozkladu v mikrovlnném mineralizátoru (Plazmatronika, Polsko) pomocí koncentrované HNO₃ (Suprapur, Merck). Stanovení bylo provedeno ve čtyřech opakováních

K separaci pomocí IP-RP-HPLC byla použita kolona PUROSPHERE STAR C-18 (Merck) a mobilní fáze měla následující složení: 2,5 mmol l⁻¹ 1-butansulfonát sodný,

Tabulka I
Parametry měření metodou ICP-MS

Parametr	Speciální analýza	Stanovení celkového obsahu
Průtok argonu zamlžovačem, l min ⁻¹	0,72–0,8 (optimalizováno vždy před měřením)	
Průtok plasmového plynu, l min ⁻¹	11	
Průtok pomocného plynu, l min ⁻¹	1	
Průtok plynu DRC, l min ⁻¹	0,6	
Příkon do plasmatu, W	1400	
RP _a	0	
RP _q	0,15	
Doba odečtu, ms	17	50
Počet měření na odečet	10	10
Počet odečtů na opakování	1800	1
Počet opakování	1	10

8 mmol l⁻¹ hydroxid tetramethylammonia, 4 mmol l⁻¹ kyselina malonová a 0,05% (v/v) methanol (vše Sigma). K roztoku mobilní fáze bylo přidáno germanium jako vnitřní standard a jeho výsledná koncentrace činila 100 µg l⁻¹. Výsledné pH této mobilní fáze bylo upraveno na požadovanou hodnotu přidávkou 1 mol l⁻¹ HCl (Suprapur, Merck).

Měření metodou ICP-MS byla provedena pomocí spektrometru PerkinElmer ELAN DRC-e. Parametry měření jsou uvedeny v tab. I.

Roztoky standardů specií selenu selenocystin, selenomethionon, Se-methylselenocystein, SeO₃²⁻ a SeO₄²⁻ (vše Sigma) jodid trimethylselenonia (syntetizován v laboratořích VŠCHT Praha) byly připraveny ředěním ze zásobních roztoků na výslednou koncentraci 50 µg l⁻¹ Se.

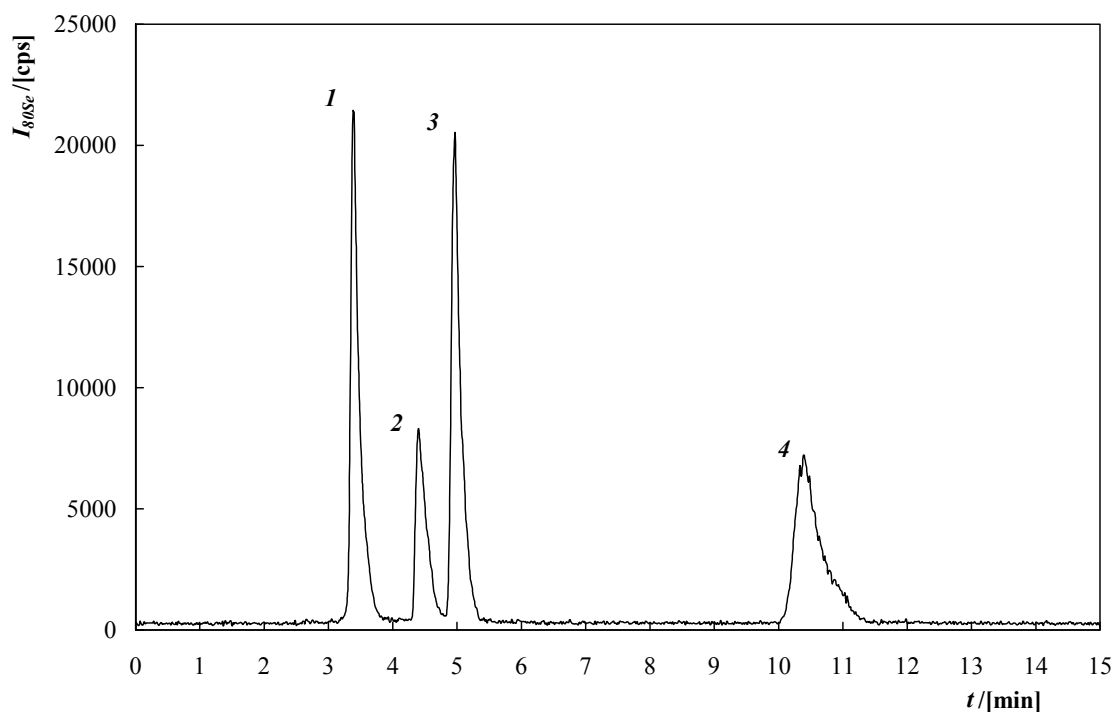
Extrakce specií selenu v odtučněném řepkovém šrotu byla provedena pomocí nespecifické proteasy XIV (Sigma) ve dvou extrakčních prostředích – ultračisté vodě a pufru Tris-HCl (20 mmol l⁻¹, pH 7,5). K navážce 0,5 g vzorku bylo přidáno 50 mg proteasy a 10 ml vody nebo pufru. Takto připravené suspenze byly třepány pomocí třepačky CAT S20 (Ingenieurbüro M. Zipperer, SRN) při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky odstředěny v centrifuzě (Sigma 3-16L, Sigma Laborzentrifugen GmbH, SRN) při 14 000 ot./min. Supernatant byl přefiltrován přes membránový filtr z nylonových vláken o velikosti pórů 45 µm.

Výsledky a diskuse

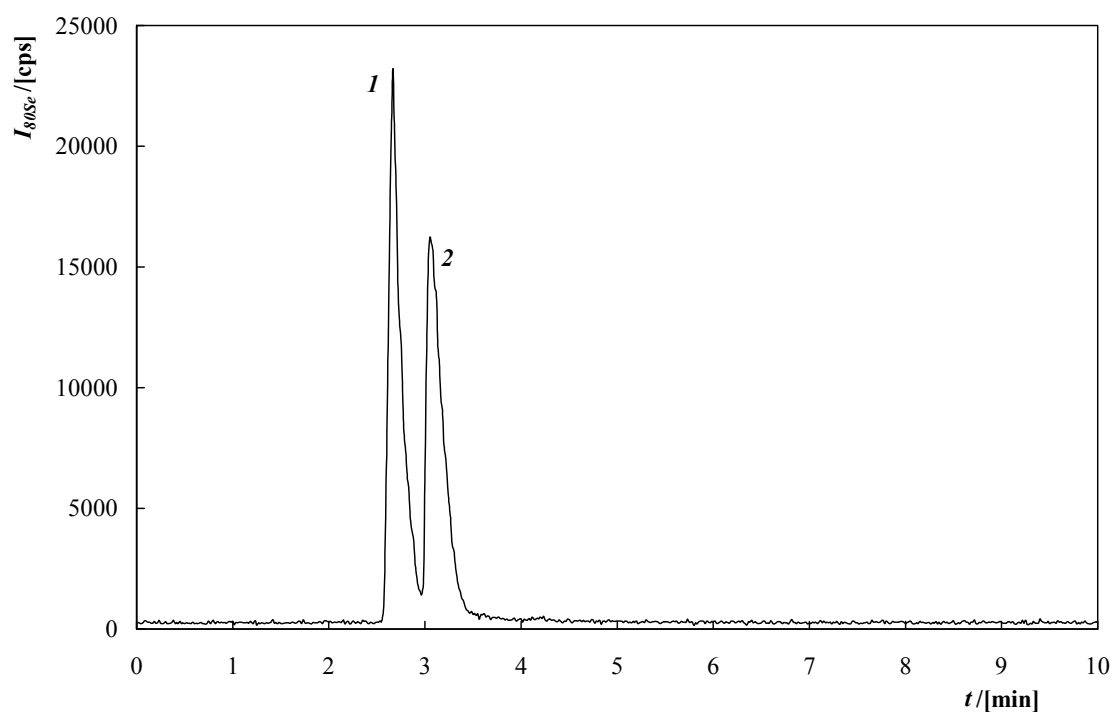
Optimalizace pH mobilní fáze byla provedena analýzou standardů organických i anorganických specií selenu. Pro separaci specií se jako optimální ukázala hodnota pH 3, ukázky chromatogramů jsou v obr. 1 a 2.

Linearita odezvy ICP-MS byla ověřena pro zástupce organických i anorganických specií Se-methylselenocystein a seleničitan. Linearita kalibrační závislosti plocha píku vs. koncentrace byla pomocí Mandelova testu prokázána v obou případech v rozsahu koncentrací minimálně 0–500 µg l⁻¹ Se

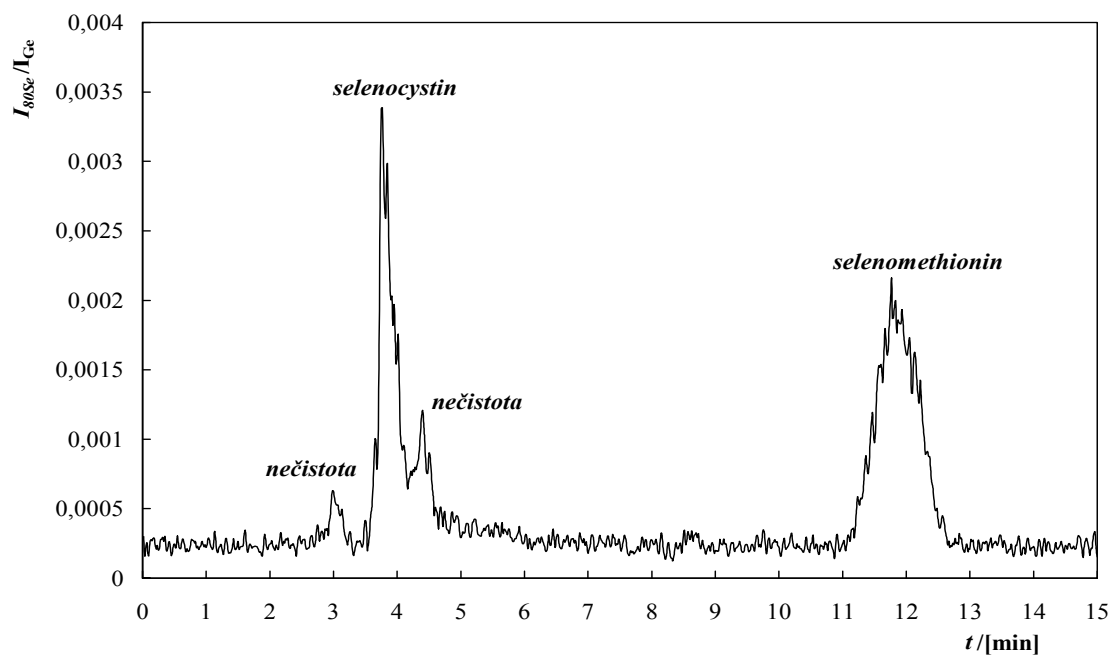
Obr. 3 obsahuje příklad chromatogramu extraktu odtučněného řepkového šrotu získaného z řepky po aplikaci roztoku seleničitanu. Porovnáním retenčních charakteristik specií obsažených v extraktu se standardy specií bylo zjištěno, že hlavními speciemi jsou selenocystin a selenomethionin. Ostatní píky odpovídají nečistotám, které, jak prokázaly slepé pokusy, pocházejí z použité proteasy. Dále byl analyzován extrakt ze vzorku řepky, která nebyla během růstu obohacena selenem. Extrakčním prostředím byla voda a chromatografický záznam je na obr. 4. V tomto případě nebylo možno identifikovat žádnou ze separovaných specií.



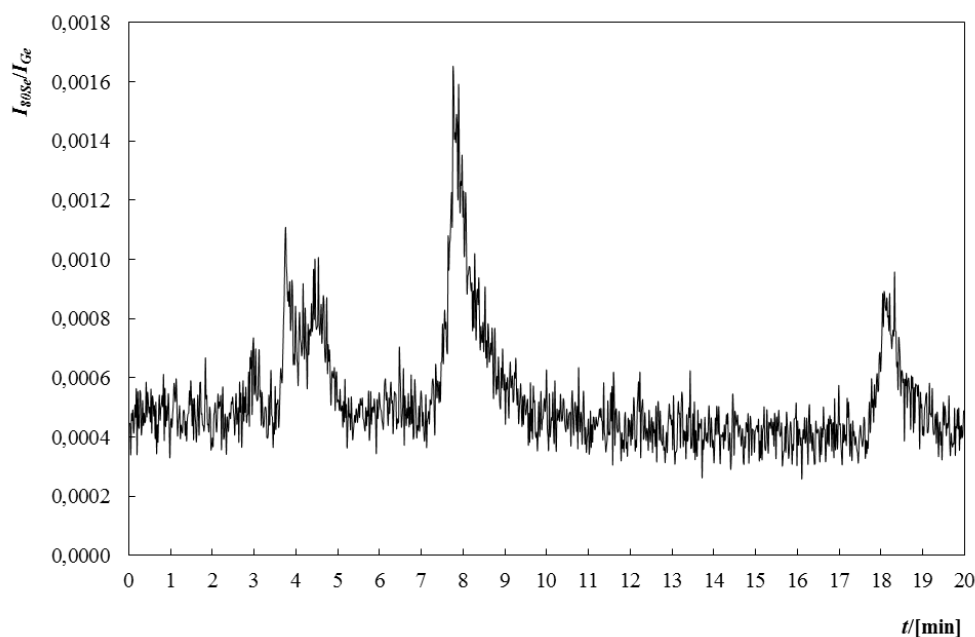
Obr. 1. Chromatogram standardů organoselenových specií při pH 3, 1 – selenocystin, 2 – jodid trimethylselenonia, 3 – Se-methylselenocystein, 4 – selenomethionin



Obr. 2. Chromatogram standardů anorganických specií selenu při pH 3; 1 – selenanový aniont, 2 – seleničitanový aniont



Obr. 3. Příklad chromatogramu specií v odtučněném řepkovém šrotu po enzymatické hydrolýze



Obr. 4. Chromatogram extraktu z neobohacené řepky

Kvantitativní vyhodnocení extrakce selenu z odtučněného řepkového šrotu bylo provedeno pro obě varianty extrakčního postupu. Porovnáním celkového obsahu selenu ve vzorku odtučněného řepkového šrotu ($0,371 \mu\text{g g}^{-1}$) s koncentrací v extraktech po enzymatické hydrolýze byla zjištěna účinnost extrakce, která v extrakčním prostředí ultračisté vody činila 47 % a v prostředí pufru Tris-HCl (20 mmol l^{-1} , pH 7,5) 45 %.

Závěr

Vzorek řepky olejky vypěstovaný na pokusném poli České zemědělské univerzity obsahoval v odtučněném řepkovém šrotu $0,371 \mu\text{g g}^{-1}$ selenu. Jako vhodná technika pro speciální analýzu selenu byla zvolena chromatografie s obrácenými fázemi (IP-RP-HPLC) v on-line spojení s ICP-MS. Optimální pH mobilní fáze bylo stanoveno na hodnotu 3,0. Nejvyšší účinnosti enzymatické hydrolýzy seleno-proteinů bylo dosaženo v prostředí ultračisté vody (47 %). V řepkovém šrotu byly zjištěny specíe: selenocystin a selenomethionin.

LITERATURA

1. Barceloux D. G.: Selenium, *Clin. Toxicol.* 37, 145 (1999).
2. Terry N., Zayed A. M., Souza M. P.: *Plant Mol. Biol.* 51, 401 (2000).
3. Pyrzyńska K.: *Food Chem.* 114, 1183 (2009).
4. Chan Q. L., Afton S. E., Caruso J. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 25, 186 (2010).
5. Montes-Bayon M., Molet M. J. D., Gonzales E. B., Sanz-Medel A.: *Talanta* 68, 1287 (2006).
6. May T. W., Wiedmeyer R. H.: *At. Spectrosc.* 19, 150 (1998).
7. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*, SNTL, Praha 1990.
8. Hymer C. B., Caruso J. A.: *J. Chromatogr., A* 1114, 1 (2006).

STANOVENÍ SIŘIČITANŮ VE VÍNĚ

MARIE BARTOŠKOVÁ, MARTA FARKOVÁ
a PŘEMYSL LUBAL

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice
356877@mail.muni.cz

Úvod

Oxid siřičitý a siřičitany jsou často používány při sušení ovoce, kde zabraňují hnědnutí plodů, ale také při výrobě vína či piva, dále bývají obsaženy i v pekařských a masných výrobcích. Jelikož mají antioxidační vlastnosti, využívají se jako konzervační látky k potlačení tvorby kvasinek, bakterií a plísní v kyselých potravinách, čímž se prodlužuje jejich trvanlivost. Dále jsou oxid siřičitý a siřičitany používány k inhibici růstu octových a mléčných bakterií a kvasinek při výrobě vína a jeho uchovávání. Přestože se výrobci vín snaží omezit používání siřičitanů a oxidu siřičitého na minimum, jejich úplná eliminace není v současnosti možná. Ve víně se vyskytují dvě formy siřičitanů, a to volné (SO_2 , SO_3^{2-} , HSO_3^- , H_2SO_3) a vázané (vázby na aldehydy, ketony a deriváty fenolu).

Množství oxidu siřičitého a jeho dalších specií, zejména siřičitanů je v potravinách regulováno normou, proto je potřeba kontrolovat jejich obsah v potravinách¹, jelikož např. nadměrné množství siřičitanů může způsobovat alergické reakce nebo bolesti hlavy u citlivých jedinců. Nejvyšší přípustné množství těchto látek v potravinách se vyjadřuje souhrnně v přepočtu na oxid siřičitý bez ohledu na jeho původ a funkci v potravinách¹.

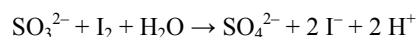
V České republice je podle současné legislativy povoleno užívat při zpracování potravin celkem 8 přídatných látek odvozených od oxidu siřičitého: oxid siřičitý SO_2 (E 220), siřičitan sodný Na_2SO_3 (E 221), hydrogensiřičitan sodný NaHSO_3 (E 222), disiřičitan sodný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (E 223), disiřičitan draselný $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (E 224), siřičitan vápenatý CaSO_3 (E 226), hydrogensiřičitan vápenatý $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$ (E 227) a hydrogensiřičitan draselný KHSO_3 (E 228)².

Nejběžnější metodou stanovení siřičitanů ve víně je jodometrická titrace, kterou se dají stanovit jak volné, tak

vázané siřičitany. Ke stanovení siřičitanů se využívají také rychlejší instrumentální metody^{1,3}, např. molekulová/atomová spektrometrie, metody elektroanalytické – např. coulometrie, amperometrie nebo separační, např. kapilární elektroforéza nebo izotachoforéza na čipu. Cílem této práce bylo vyvinout metodu na stanovení volných siřičitanů pomocí izotachoforézy a ověřit toto stanovení jodometrickou titrací⁴.

Experimentální část

Jodometrické stanovení siřičitanů ve víně je velmi často využívaná metoda, jejíž postup je popsán v ČSN 56 0216 a která umožňuje zjistit koncentraci jak volných, tak vázaných siřičitanů ve víně⁴. Při odměrném stanovení siřičitanů se k indikaci bodu ekvivalence nejčastěji využívá škrobu, siřičitany jsou schopny redukovat elementární jod na jodid²:



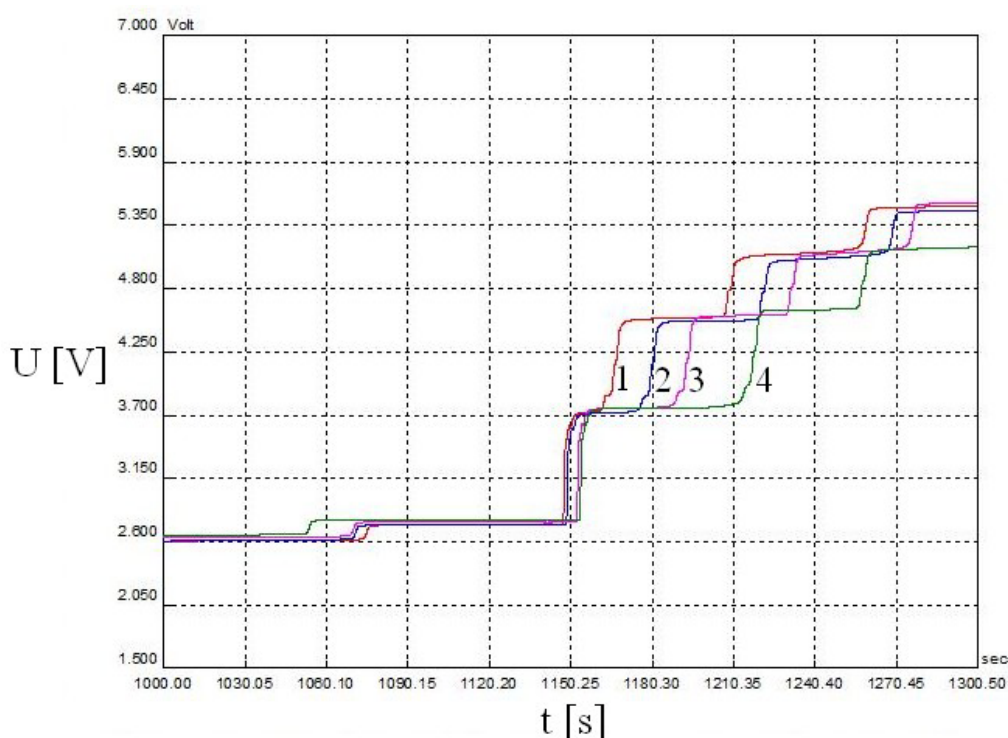
Postup stanovení je relativně zdlouhavý a vyžaduje pečlivost laboranta. Jodometrická titrace se musí u každého vzorku provést dvakrát, protože u vína je potřeba vždy provést korekci na interferenty, tj. látky oxidovatelné také jodem, přidavkem formaldehydu, kdy lze snadno vypočítat obsah jak volných, tak celkových siřičitanů ve vzorku vína³.

Izotachoforetické stanovení volných siřičitanů ve vzorcích bílého vína bylo provedeno pomocí elektroforetického analyzátoru EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko) s vodivostním detektorem. Kapilára použitá k analýze byla z FEP (Fluorinated Ethylene Propylene) a její rozměry byly: délka 90 mm, průměr analytické kapiláry 0,3 mm a průměr předseparační kapiláry 0,8 mm. K analýze byla vybrána čtyři bílá vína následujících značek – Vinné sklepy Valtice (Ryzlink rýnský – Makedonie 2011, Müller Thurgau – Maďarsko 2011) a Víno Mikulov (Ryzlink rýnský – ČR 2010, Müller Thurgau – Německo 2010). Vzorky vína byly naředěny pětkrát a proměřeny při podmínkách, které jsou uvedeny v tab. I. Pro vyhodnocení byla použita metoda přidavku standardu, kdy jako standard byl použit roztok siřičitanu sodného o koncentraci 1 g l⁻¹.

Tabulka I

Experimentální podmínky pro ITP analýzu siřičitanů

Vedoucí elektrolyt (LE)	10 mM roztok HCl, 20 mM roztok glycyglycinu, 0,1% roztok hydroxypropylmethyl-celulosity (pH 3,0)
Koncový elektrolyt (TE)	10 mM roztok kyselina vinné
Hnací proud	počáteční 80 μA , koncový 30 μA



Obr. 1. Ukázka analýzy vzorku vína Müller Thurgau (Vino Mikulov); ITP záznam vzorku: 1) bez přídavku, 2) s přídavkem 25 mg l⁻¹, 3) s přídavkem 50 mg l⁻¹, 4) s přídavkem 100 mg l⁻¹

Nejdříve bylo nutné optimalizovat experimentální podmínky pro ITP analýzu. Jako vhodné pH vedoucího elektrolytu bylo zvoleno pH 3,0, kdy kyselina siřičitá je již disociována do prvního stupně, avšak ne většina organických kyselin obsažených ve víně, které by mohly být potenciálními interferenty při analýze (viz tab. I). Příklad ITP analýzy za optimálních experimentálních podmínek je ukázán na obr. 1, kde je patrné, že hydrogensiřičitan migruje s RSH hodnotou kolem 0,37–0,40, která je nezávislá na původu vzorku, což ukazuje na robustnost metody. Byly též stanoveny další metrologické parametry ITP stanovení, jako je mez detekce (0,3 mg l⁻¹, tj. 3,7 μM), citlivost (0,5 s/mg l⁻¹, tj. 6,2 s/μM) a pracovní rozsah (0,3–240 mg l⁻¹, tj. 3,7–3000 μM). Nová metoda pak byla ověřena

analýzou reálných vzorků. Hodnoty obsahů volných siřičitanů stanovené v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v tab. II, kde jsou pro srovnání uvedeny též výsledky získané jodometrickou titrací jak pro obsah volných, tak i vázaných siřičitanů. Srovnání výsledků získaných oběma metodami ukazuje, že se výsledky významně neliší, metody poskytují srovnatelné výsledky.

Závěr

Kompletní analýza siřičitanů v bílém víně byla provedena pomocí dvou nezávislých metod. Podle normy by celkový obsah siřičitanů v bílém víně neměl přesáhnout

Tabulka II

Výsledky analýzy – obsah siřičitanů v jednotlivých vzorcích (mg l⁻¹)

Vzorek	Volné siřičitany		Celkové siřičitany
Ryzlink rýnský (Vinné sklepy Valtice)	72 ± 3 ^a	66 ± 9 ^b	406 ± 2 ^a
Müller Thurgau (Vinné sklepy Valtice)	66 ± 4 ^a	78 ± 10 ^b	456 ± 6 ^a
Ryzlink rýnský (Vino Mikulov)	94 ± 7 ^a	101 ± 32 ^b	430 ± 10 ^a
Müller Thurgau (Vino Mikulov)	116 ± 6 ^a	140 ± 26 ^b	696 ± 11 ^a

^aJodometrické stanovení, ^bITP analýza

hranici 210 mg l^{-1} (cit.⁴), avšak tato hranice byla překročena u všech čtyř vzorků. Vyšší obsah siřičitanů může velmi nepříznivě ovlivňovat celkovou kvalitu vína a je často důsledkem špatného výběru hroznů a jejich přehnaného ošetření před zpracováním. Dalším zdrojem siřičitanů mohou být také sudy, ve kterých se víno uchovává a které se před i po použití hojně vysířují.

Srovnání obou metod ukazuje, že izotachoforetické stanovení je výhodné zejména z hlediska nízké spotřeby vzorku a chemikálií, nevýhodou je naopak větší časová náročnost než v případě titračního stanovení, které je velmi jednoduché, avšak zdouhavé a náročné na spotřebu chemikálií, když se provádí stanovení celkového obsahu siřičitanů. U titračního stanovení jsou směrodatné odchylky výrazně nižší a také celkové vyhodnocení je jednodušší, chyby mohou vznikat při vizuálním stanovení bodu ekvivalence, protože barevný přechod je u každého vzorku jinak intenzivní.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu projektu ME09065 a EU (projekt CEITEC CZ.1.05/1.1.0/02.0068).

LITERATURA

1. Čmelík J.: *Disertační práce*. Masarykova univerzita, Brno 2010.
2. Klesch V., Hrnčířiková I., Mandelová L.: *Éčka v potravínách*, 1. vyd. Computer Press, Brno 2007.
3. Horáková M., Lischke P., Grünwald A.: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. SNTL, Praha 1989.
4. ČSN 56 0216: *Metody zkoušení révových vín, tokajských vín a vín sladových*. Praha 1964.

STANOVENÍ ADENOSINDIFOSFÁTU A ADENOSINTRIFOSFÁTU MIKROKAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ

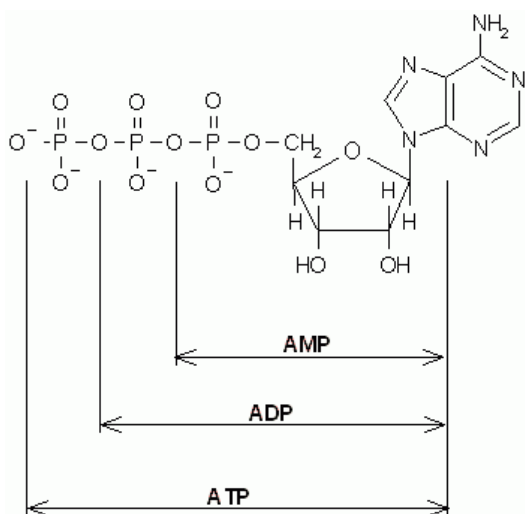
MARTINA ČERNÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
cerna-ma@seznam.cz

Úvod

Adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP) jsou nukleotidy (tj. fosforečné estery nukleosidů, anhydridy kyseliny fosforečné neboli adenosinfosfáty)¹. Jejich struktura je uvedena na obr. 1. Mají makroergické fosfátové vazby, které svým štěpením poskytují systému energii. Adenosin a jeho nukleotidy poskytují kromě energie i substráty pro různé biochemické procesy^{3,4}. Nukleotidy a příbuzné fosforylované metabolity jsou hlavní součástí nukleových kyselin, fungují také jako koenzymy v biochemických reakcích a jako prekurzory v RNA syntézách^{4,5,7,8}. Stanovování adenosinfosfátů v jídle a tkáních je velmi významné pro zjištění energetického stavu buňky^{6–8}.

Adenosinové nukleotidy jsou díky přítomnosti několika fosfátových skupin velmi polární a mohou interferovat s chemickým stanovením³. Z tohoto důvodu nejsou zadržovány na koloně při klasické chromatografii s reverzními fázemi^{3,9}. Určení jejich koncentrace v buňkách poskytuje cenné informace pro pochopení buněčného energetického metabolismu, a proto je důležité nalézt vhodnou metodu k jejich stanovení³. Chemická podobnost, nestabilita, vysoká polarita, náboj a různá koncentrace v určitých situacích však analýzu těchto látek znesnadňuje⁴. Nejčastěji používanou separační technikou pro stanovení adenosinfosfátů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)⁷.



Obr. 1. Struktura ADP a ATP; převzato z cit.²

Původně se ADP a ATP stanovovaly na iontově výměnné koloně⁴. Postupně se k separaci nukleotidů začaly používat iontově potlačovací HPLC a iontově párová chromatografie³. Využit lze rovněž enzymovou analýzu, bioluminiscenci, ³¹P nukleární magnetickou rezonanci, vysokoúčinnou kapilární elektroforézu nebo plynovou chromatografii^{8,10}. Pro stanovení ATP je vhodná i luciferázová analýza¹⁰. ADP a ATP jsou aktivní v ultrafialové (UV) oblasti, a tudíž je lze stanovovat UV detekcí¹¹. Pro tuto detekci se v literatuře uvádí vlnová délka 254 nm (cit.^{8,10–12}). Další autoři stanovovali ADP a ATP při vlnové délce 257 nm nebo při 260 nm (cit.^{7,13–15}).

Jedna z neefektivnějších metod HPLC pro separaci nukleotidů je iontově párová chromatografie¹⁶. Má výhody jak iontově výměnné, tak reverzní chromatografie¹⁷. K analýze aniontů se do mobilní fáze přidávají iontově párová činidla nejčastěji na bázi tetrabutylamonium a triethylamonium, například tetrabutylamonium hydrogensulfát (TBAHS), tetrabutylamonium bromid, též také *N,N'*-dimethylhexylamin (DMHA) a netěkavý tetrabutylamonium hydroxid^{8,9,13}. Předpokládá se, že zadržení nukleotidů je způsobeno vznikem „iontového páru“ mezi pozitivně nabitými iontově párovými činidly a negativně nabitými nukleotidy^{3,9}. Hydrofóbní kolona pak neutrální iontový pár zadrží⁹. Separaci nukleotidů lze zlepšit přidáním různého množství organického modifikátoru do mobilní fáze, změnou pH či elučního gradientu⁸. Klíčové pro zadržení nukleotidů na koloně je vhodný výběr iontově párového činidla a jeho koncentrace^{3,4,9}.

K analýze nukleotidů je výhodné použít kolonu s malým průměrem, kde stačí málo rozpouštědel a iontově párových činidel při zachování velké separační síly^{3,18}. Miniaturizace kolon tak může vést ke zlepšení citlivosti měření a většímu počtu detegovaných sloučenin s nízkými limity detekce¹⁸. Pro miniaturizované metabolické analýzy bylo provedeno málo studií^{18,19}. Důvodem je, že se zabývá hlavně analýzami rostlin, mikrobu a tělních tekutin, kde jsou vzorky v relativně velkém objemu a není tedy vyžadována velká citlivost stanovení. Předpokládá se ale, že s růstem možností využití metabolomiky bude třeba analyzovat i látky o malém objemu dostatečně citlivou metodu.

Cílem předkládané práce bylo nalézt podmínky stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí mikrokapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Následně měla být proměřena kalibrační závislost směsi ADP a ATP o různých koncentracích. Dále měly být zjištěny limity detekce (LOD) a limity stanovení (LOQ) obou analytů. Nakonec se měly tyto limity porovnat s LOD a LOQ nalezenými v literatuře při použití stejných metod a velmi podobných experimentálních podmínek.

Experimentální část

Mikrokapalinová chromatografie s detektorem diodového pole byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 1200 series. Detektor diodového pole byl nastaven na snímání při vlnových délkách 210, 220, 254 a 260 nm. Jelikož zjištěná absorpční maximum bylo při 260 nm a měření při 254 nm poskytovalo velmi podobné výsledky, byly uvažovány pouze výsledky naměřené při vlnových délkách 254 a 260 nm. Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu bylo prováděno na koloně C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze obsahovala iontově párové činidlo tetrabutylamonium bisulfát (TBAS) a sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ TBAS a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Stanovení probíhalo při gradientové eluci, která je uvedena v tab. I. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl.

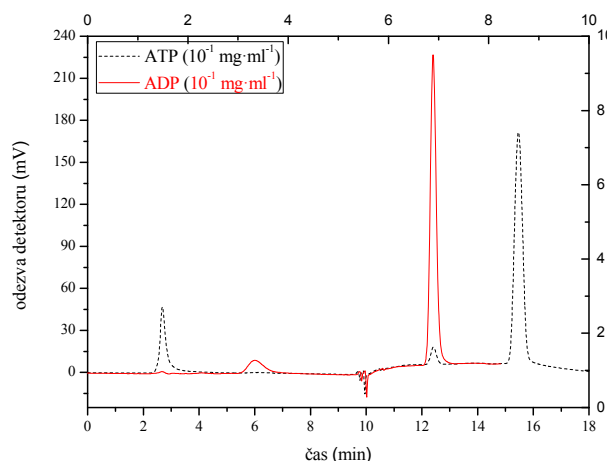
Nejprve byla provedena analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu při uvedených podmínkách. Chromatogram, který odpovídá daným analýzám, je znázorněn na obr. 2. Dále pak byly proměřeny kalibrační směsi o různých koncentracích (viz tab. II). Chromatogram, odpovídající separaci směsi ADP a ATP, je uveden na obr. 3.

Dále byly stanoveny limity detekce a stanovení obou analytů. Experimentálně byly limity získány určením koncentrací ADP a ATP, které odpovídaly trojnásobku šumu pro limit detekce a desetinásobku šumu pro limit stanovení. Limity detekce a stanovení pro oba analyty jsou uvedeny v tab. III. Buchholz a spol. uvádějí limity detekce u stanovení ADP a ATP metodou HPLC-UV o velikosti 0,63 mmol dm⁻³ (cit.¹¹). Další autoři stanovili limit detekce podobnou metodou pro ADP jako 0,1 mg l⁻¹ (tj.

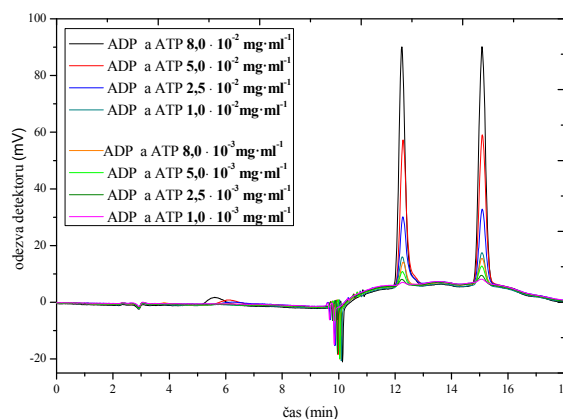
Tabulka I

Eluční gradient mobilní fáze v objemových procentech. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detekce detektorem diodového pole, který měřil při 210, 220, 254 a 260 nm.

Čas [min]	Množství fáze A [obj. %]
0	90
3,0	60
7,2	60
7,5	90
12,0	90



Obr. 2. Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole při 254 nm.



Obr. 3. Kalibrační závislost směsí adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu o různých koncentracích. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole při 254 nm.

0,23 μmol dm⁻³) a LOD pro ATP byl určen na hodnotu 0,11 mg l⁻¹ (tj. 0,22 μmol dm⁻³)⁷. Tito autoři také dosáhli limitu stanovení pro ADP o velikosti 0,32 mg l⁻¹ (tj. 0,75 μmol dm⁻³) a limitu stanovení pro ATP jako 0,29 mg l⁻¹ (0,57 μmol dm⁻³). Obdobných výsledků bylo dosaženo

Tabulka II
Koncentrace kalibračních směsí ADP a ATP

Koncentrace analytů ve směsi [mg ml ⁻¹]	c _{ADP} ve směsi [μmol dm ⁻³]	c _{ATP} ve směsi [μmol dm ⁻³]
8,0 · 10 ⁻²	187,4	157,8
5,0 · 10 ⁻²	117,1	98,6
2,5 · 10 ⁻²	58,6	49,3
1,0 · 10 ⁻²	23,4	19,7
8,0 · 10 ⁻³	18,7	15,8
5,0 · 10 ⁻³	11,7	9,9
2,5 · 10 ⁻³	5,9	4,9
1,0 · 10 ⁻³	2,3	2,0

Tabulka III

Limity detekce (LOD) a limity stanovení (LOQ) adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Stanovení probíhalo při gradientové eluci, která je uvedena v tab. I. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole měřil při 260 nm.

Analyt	Limity	c [mg ml ⁻¹]	c [μmol dm ⁻³]
ADP	LOD	6 · 10 ⁻⁴	1,4
	LOQ	3 · 10 ⁻³	7,0
ATP	LOD	1 · 10 ⁻³	2,0
	LOQ	5 · 10 ⁻³	9,9

i ve studii Coolena a spol., kteří zjistili LOD pro ADP jako 0,072 μmol dm⁻³ a LOD ATP jako 0,049 μmol dm⁻³ (cit.¹⁰). Stejný vědecký tým dosáhl limitu stanovení pro adenosindifosfát při hodnotě koncentrace o velikosti 0,239 μmol dm⁻³ a LOQ adenosintrifosfátu jako 0,162 μmol dm⁻³. Námi zjištěné limity detekce a stanovení jsou tedy nepatrně větší nebo srovnatelné s LOD a LOQ uváděné v literatuře.

Závěr

V rámci předkládané práce byly nalezeny podmínky stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí mikrokapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Analýza probíhala na koloně C₁₈. Oba analyty byly nejlépe separovány při použití iontově párového činidla

tetrabutylamonium bisulfátu v mobilní fázi. Ke stanovení bylo použito gradientové eluce a průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Nejlepších a srovnatelných výsledků bylo dosaženo u měření analytů při 254 nm a 260 nm. Pomocí optimalizovaných podmínek byly zjištěny limity detekce a limity stanovení obou analytů. Limit detekce pro ADP byl 1,4 μmol dm⁻³ a limit stanovení stejného analytu byl 7,0 μmol dm⁻³. Limit detekce ATP byl zjištěn při hodnotě 2,0 μmol dm⁻³ a jeho LOQ bylo 9,9 μmol dm⁻³. V předkládané práci byly naměřeny limity detekce a limity stanovení, které jsou nepatrně větší nebo srovnatelné s limity uváděnými v literatuře.

LITERATURA

- Košťtř J.: *Biochemie*. Avicenum, Praha 1974.
- http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/adenosinfosfaty.html. Staženo 31. 3. 2011.
- Qian T., Cai Z., Yang M. S.: *Anal. Biochem.* 325, 77 (2004).
- Cordell R. L., Hill S. J., Ortori C. A., Barrett D. A.: *J. Chromatogr., B* 871, 115 (2008).
- Klawitter J., Schmitz V., Klawitter J., Leibfritz D., Christians U.: *Anal. Biochem.* 365, 230 (2007).
- Pierro D., Tavazzi B., Perno C. F., Bartolini M., Balestra E., Calio R., Giardina B., Lazzarino G.: *Anal. Biochem.* 231, 407 (1995).
- Xue X., Wang F., Zhou J., Chen F., Li Y., Zhao J.: *J. Agr. Food. Chem.* 57, 4500 (2009).
- Huang D., Zhang Y., Chen X.: *J. Chromatogr., B* 784, 101 (2003).
- Fung E. N., Cai Z., Burnette T. C., Sinhababu A. K.: *J. Chromatogr., B* 754, 285 (2001).
- Coolen E. J., Arts I. C., Swennen E. L., Bast A., Cohen Stuart M. A., Dagnelie P. C.: *J. Chromatogr. B* 864, 43 (2008).
- Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors R.: *Biomol. Eng.* 19, 5 (2002).
- Viant M. R., Pincetich C. A., Hinton D. E., Tjeerdema R. S.: *Aquat. Toxicol.* 76, 329 (2006).
- Ferreira I. M., Mendes E., Gomes A. M., Faria M. A., Ferreira M. A.: *Food. Chem.* 74, 239 (2001).
- Bernocchi P., Ceconi C., Cargnoni A., Pedersini P., Curello S., Ferrari R.: *Anal. Biochem.* 222, 374 (1994).
- Kimura Y., Shibasaki S., Morisato K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Matsuo M., Amachi T., Ueda M., Ueda K.: *Anal. Biochem.* 326, 262 (2004).
- Tomiyama N., Ailor E., Lawrence S. M., Betenbaugh M. J., Lee Y. C.: *Anal. Biochem.* 293, 129 (2001).
- Kawamoto Y., Shinozuka K., Kunitomo M., Haginaka J.: *Anal. Biochem.* 262, 33 (1998).
- Edwards J. L., Edwards R. L., Reid K. R., Kennedy R. T.: *J. Chromatogr., A* 1172, 127 (2007).
- Ni Q., Reid K. R., Burant C. F., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 80, 3539 (2008).

NOVÁ ANALYTICKÁ STRATEGIE PRO SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ ESTERŮ 3-MCPD A GLYCIDOLU

SIMONA ČERNOHORSKÁ, JANA HAJŠLOVÁ
a ELIŠKA ČÍŽKOVÁ

Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice
simona.cernohorska@seznam.cz

Úvod

Estery 3-chlorpropan-1,2-diolu (3-MCPD) a estery glycidolu (GE) jsou endogenní procesní kontaminanty potravin. Nejvyšší hladiny byly nalezeny v rafinovaných rostlinných olejích¹. Nedávné studie ukázaly, že ke vzniku těchto sloučenin dochází během deodorace v procesu rafinace olejů za vysoké teploty (180 až 250 °C, cit.²).

Předpokládá se, že střevní lipasy hydrolyzují esterově vázaný 3-MCPD na volný 3-MCPD, který je znám jako potenciální karcinogen (třída 2B) vykazující mutagenní a nefrotoxické účinky a je legislativně regulován množstvím 20 µg kg⁻¹ v kyselých hydrolyzátech bílkovin^{3,4}.

Estery glycidolu vznikají v potravinách za obdobných podmínek jako estery 3-MCPD a existuje u nich předpoklad, že jsou *in vivo* 100% rozložitelné na volný glycidol, který byl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikován jako pravděpodobný karcinogen (třída 2A) vyvolávající široké spektrum genotoxických účinků^{5,6}. Vzhledem k tomu, že rafinované rostlinné tuky a oleje jsou velmi často používány v různých potravinářských výrobcích, je velký zájem na rozvoji přesné analytické metody pro stanovování těchto sloučenin¹.

Existují dva principy analytického stanovení esterů 3-MCPD a GE – metody přímé a nepřímé. Principem nepřímé metody je stanovení volného 3-MCPD, který byl uvolněn hydrolyzou z esterové vazby. Detekce se provádí plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS). Při této metodě může docházet k nadhodnocování výsledků vlivem konverze GE na 3-MCPD a ke ztrátě informací o struktuře původní molekuly. Metoda přímá je založena na stanovení jednotlivých analytů bez jakékoliv chemické reakce (nedochází ke konverzi GE na 3-MCPD) pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS). Hlavními nevýhodami těchto metod jsou zdlouhavé postupy přípravy vzorků, resp. silné matriční efekty, které mají vliv na citlivost a stabilitu systému¹.

Tabulka I

Přehled stanovovaných analytů

	Zkratka	Analyt
Monoestery 3-MCPD	1-M-2-MCPD	1-mytistoyl-3-MCPD
	1-P-3-MCPD	1-palmitoyl-3-MCPD
	1-ST-3-MCPD	1-stearoyl-3-MCPD
Diestery 3-MCPD	1,2-diP-3-MCPD	1,2-dipalmitoyl-3-MCPD
	1-P-2-L-3-MCPD	1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-MCPD
	1-P-2-O-3-MCPD	1-palmitoyl-2-oleoyl-3-MCPD
	1-P-2-St-3-MCPD	1-palmitoyl-2-steroyl-3-MCPD
	1,2-diL-3-MCPD	1,2-dilinoleoyl-3-MCPD
	1-O-2-L-3-MCPD	1-oleoyl-2-linoleoyl-3-MCPD
	1,2-diO-3-MCPD	1,2-dioleoyl-3-MCPD
	1-O-2-St-3-MCPD	1-oleoyl-2-steroyl-3-MCPD
	1,2-diS-3-MCPD	1,2-distearoyl-3-MCPD
Glycidol estery	G-La	glycidyl lauerát
	G-P	glycidyl palmitát
	G-Ln	glycidyl linolenát
	G-M	glycidyl myristeát
	G-O	glycidyl oleát
	G-L	glycidyl linoleát
	G-St	glycidyl stearát

V rámci této práce byla vyvinuta přímá metoda pro simultánní stanovení esterů 3-MCPD a GE. Metoda je založena na frakcionaci analytů od rostlinného oleje pomocí kolony preparativní kapalinové chromatografie (LC) v reverzní fázi, při které dojde k separaci analytů od interferující matrice. Jako analytická koncovka byla zvolena ultra-účinná kapalinová chromatografie (U-HPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem a analyzátozem typu orbitrap (orbitrapMS).

Experimentální část

Námi vyvinutá metoda umožňuje současné stanovení 3 monoesterů 3-MCPD, 9 diesterů 3-MCPD a 7 glycidol esterů. V tab. I je uveden přehled stanovovaných analytů.

Estery 3-MCPD a GE se z vyšetřovaných vzorků izolovali následovně: 50 ± 1 mg oleje bylo naváženo do 2ml vialky a rozpuštěno ve směsném roztoku izotopově značených vnitřních standardů (1,2-diP-3-MCPD-d₅ a G-P-¹³C₁₆ v ethylacetátu, *c* = 300 ng ml⁻¹), který kompenzuje ztráty analytů při přípravě vzorků. Separace analytů proběhla na kapalinovém chromatografu Agilent HP 1050 řady HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) s kolonou pro preparativní analýzu Ascentis® C8 (25 cm × 10 mm id, 5 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Jako mobilní fáze byly použity 100% methanol (A) a ethylacetát (B). Izokratická eluce byla provedena v následujících krocích: 0,0–20,0 min 100% A; 20,01–50,0 min 100% B; 50,0–70,0 min 100% A (kondicionace kolony) při rychlosti průtoku 6,5 ml min⁻¹; objem nástřiku byl 200 μl. Jímaná frakce 130 ml, která obsahuje cílové analyty, byla odpařena na rotační vakuové odparce (teplota vodní lázně 40 °C) a odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu a následně podroben U-HPLC-orbitrapMS analýze. Pracovní podmínky U-HPLC-orbitrapMS jsou shrnuty v tab. II. Gradientová eluce byla provedena v následujících krocích: 0,0–3,0 min 30–100% B; 3,0–9,0 min 100% B; 9,0–10 min 30% B

Tabulka II
Pracovní podmínky U-HPLC systému

Parametr	Hodnota
U-HPLC	Accela™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kolona	Kinetex® minibore C8 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm)
Teplota kolony	40 °C
Mobilní fáze	A: 10mM mravenčan amonný ve vodě B: 10mM mravenčan amonný v methanolu
Objem nástřiku	5 μl

Tabulka III
Parametry hmotnostní spektrometrie

Parametr	Hodnota
Ionizace	Elektrosprej
Polarita	Pozitivní
Napětí na kapiláře	4 kV
Napětí iontové optiky	+120 V
Teplota kapiláry	250 °C
Rozlišovací schopnost	50000 FWHM
Akviziční rychlost	2 spektra/s
Rozsah <i>m/z</i>	50–1000

(kondicionace kolony). Průtok gradientu byl následující: 0,0–3,0 min 0,3 až 0,4 ml min⁻¹, 3,0–9,0 min 0,4 až 0,6 ml min⁻¹, 9,0–10 min průtok klesl na 0,3 ml min⁻¹. Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo) s analyzátozem typu orbitrap. Parametry hmotnostního spektrometru jsou uvedeny v tab. III.

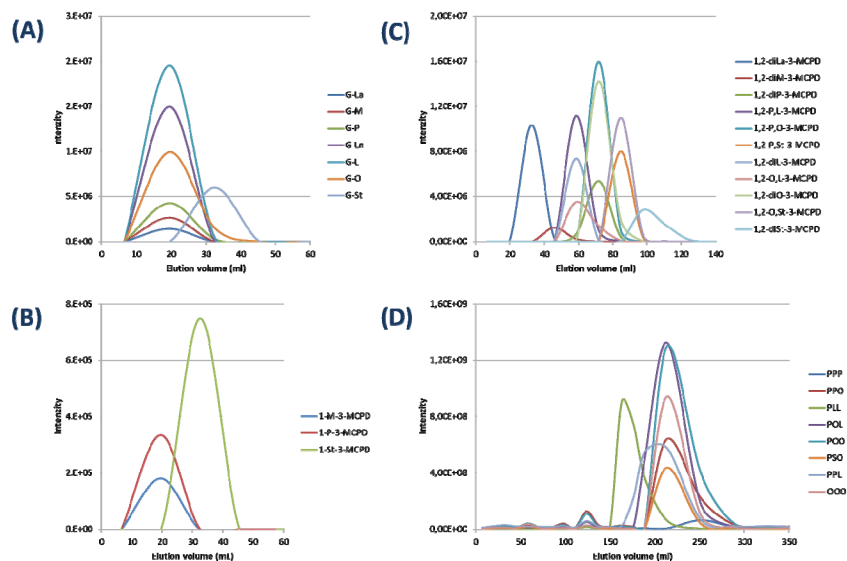
Výsledky a diskuse

Cílem této studie byl vývoj nové přímé metody pro simultánní stanovení esterů 3-MCPD a glycidol esterů pomocí preparativní LC kolony pracující v reverzní fázi s analytickou koncovkou U-HPLC-orbitrapMS.

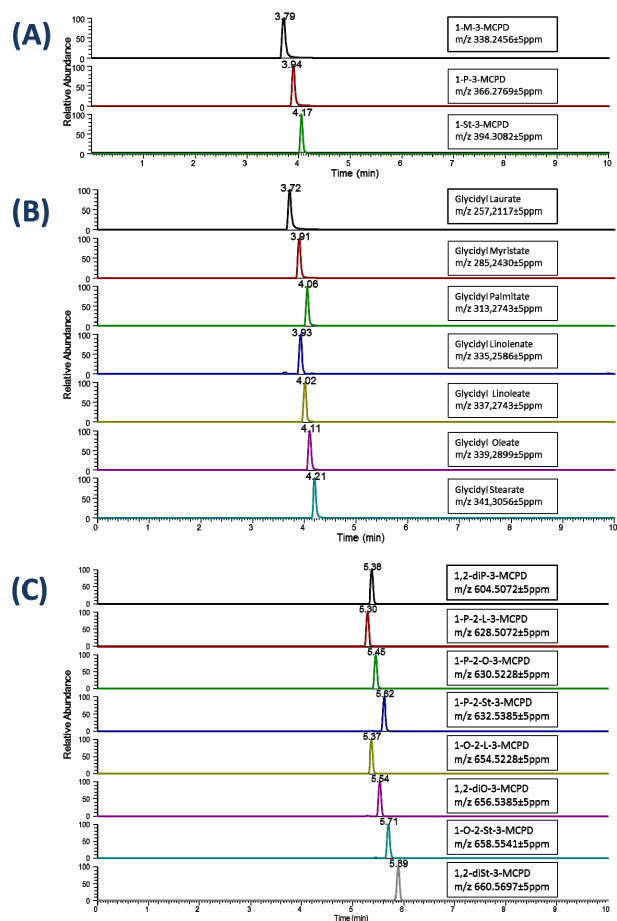
Na obr. 1 je zobrazen eluční profil separovaných analytů: (A) esterů glycidolu, (B) monoesterů 3-MCPD a (C) diesterů 3-MCPD od interferujících složek matrice reprezentovaných triacylglyceroly (D). Na obr. 2 je ukázka U-HPLC-MS chromatogramu palmového oleje s přidávanými analyty na hladinu *c* = 50 mg kg⁻¹. Identifikace analytů je založena na měření přesné hodnoty *m/z* a porovnání retenčních časů se standardy. Kvantifikace se provádí metodou izotopového zředování s použitím deuterovaného vnitřního standardu.

Závěr

Byla vyvinuta nová přímá metoda simultánního stanovení esterů 3-MCPD a glycidol esterů. Metoda je založena na odstranění převážné části rušivých složek matrice s využitím kolony preparativní LC v reverzní fázi s analytickou koncovkou U-HPLC-orbitrapMS. Potenciál nové metody byl ověřen na reálných vzorcích rafinovaných olejů – palmový, řepkový a slunečnicový. Metoda je v současné době použitelná pro stanovení esterů 3-MCPD a glycidol esterů ve vysoce kontaminovaných potravinách (palmový tuk a potraviny z něj vyrobené). Současné detekční limity neumožňují stanovení v širším spektru potravin s nižšími nálezy kontaminantů. Je potřeba se vývoji této metody nadále věnovat a dosáhnout snížení detekčních limitů.



Obr. 1. Eluční profil (a) glycidol esterů, (b) monoesterů 3-MCPD, (c) diesterů 3-MCPD a (d) triacylglycerolů (palmový olej, každý $c = 50 \text{ mg kg}^{-1}$)



Obr. 2. Ukázka U-HPLC-MS chromatogramů (a) monoesterů 3-MCPD, (b) glycidol esterů a (c) diesterů 3-MCPD (palmový olej, každý $c = 50 \text{ mg kg}^{-1}$)

LITERATURA

1. Hori K., Koriyama N., Omori H., Kuriyama M., Arishima T., Tsumura K.: *LWT-Food. Sci. Technol.* 48, 204 (2012).
2. ILSI EUROPE REPORT SERIES: 3-MCPD esters in food products. Summary report of a workshop held in February 2009, in Brussel, Belgium.
3. Seefelder W., Varga N., Studer A., Williamson G, Scanlan F. P., Stadler R. H.: *Food. Addit. Contam.* 25, 391 (2008).
4. Úřední věstník Evropské Unie: Nařízení komise 1881/2006/ES, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF> (staženo 01-03-2013).
5. Seefelder W., Scholz G., Schilter B.: *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 113, 319 (2011).
6. International Agency for Research on Cancer; Some Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 77, 469–482. Lyon, 2000.

STUDIUM VZTAHU KONFORMACE A ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY NOVÉHO ANTIMIKROBIÁLNÍHO PEPTIDU LASIOGLOSSINU

KATEŘINA ČINČALOVÁ^a, VÁCLAV ČEŘOVSKÝ^b, TOMÁŠ HRUBÝ^a a VLADIMÍR SETNIČKA^a

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6, Česká republika

katerinacincalova@seznam.cz

Úvod

Hlavním důvodem pro hledání nových antimikrobiálních látek je výskyt nových infekcí a zvyšující se rezistence bakterií vůči stávajícím antibiotikům. Rozvíjí se zájem o tzv. antimikrobiální peptidy, které by mohly podpořit léčbu současnými antibiotiky nebo je i v některých případech nahradit.

Biologická aktivita peptidů je odrazem příslušných konformací. Studium sekundární struktury může být provedeno například metodami elektronového (ECD) a vibračního cirkulárního dichroismu (VCD)^{1,2}. Tyto chiroptické metody vykazují oproti běžně používané absorpční spektroskopii, ať v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) nebo infračervené (IČ) oblasti, velkou citlivost k sekundární struktuře peptidů, kterou lze pomocí metod cirkulárního dichroismu dobře identifikovat na základě analýzy charakteristických spektrálních pásů v oblastech, ve kterých se projevují elektronové přechody amidové skupiny peptidové vazby v případě ECD, nebo v oblastech tzv. amidu I (C=O valenční vibrace peptidové vazby) či amidu II (spřažené C-N valenční a C-N-H deformační vibrace) v případě VCD. V oblasti amidu I však silně absorbuje voda, proto se měření provádí v těžké vodě a příslušná vibrace je pak označována jako amid I' (cit.²).

Cílem této práce je studium konformace tří antimikrobiálních peptidů ze skupiny lasioglossinů. V tab. I jsou uvedeny sekvence dvou z nich, značených LL-III a LL-III/5. V případě třetího peptidu označeného LL-8/43 však jeho sekvence nyní nemůže být zveřejněna vzhledem

k probíhajícímu patentovému řízení. Spektra ECD a VCD byla měřena v deuterovaných rozpouštědlech: v těžké vodě (D₂O), deuterovaném trifluorethanolu (TFE-d₃) a ve směsi TFE-d₃/D₂O (40/60, v/v). Trifluorethanol podle literatury³ má schopnost indukovat tvorbu α -struktur tak, jak se tomu děje v prostředí buněčné membrány bakterií, tedy místa biologického účinku těchto peptidů. Vzhledem k omezenému rozsahu příspěvku jsou dále prezentována pouze spektra peptidů měřená v D₂O a TFE-d₃. Ze získaných spekter bylo odhadnuto zastoupení jednotlivých sekundárních struktur těchto peptidů v závislosti na jejich sekvenci a použitém rozpouštědle. Diskutován je rovněž vztah nalezené sekundární struktury a antimikrobiální aktivity, která je jedním ze zásadních parametrů pro potenciální uplatnění těchto peptidů v klinické praxi.

Experimentální část

Lasioglossiny byly poprvé izolovány spolupracujícími laboratoři RNDr. Václava Čeřovského, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) z jedu včely *Lasioglossum laticeps*³. Poté byla touto skupinou provedena totální syntéza studovaných peptidů (tab. I a peptid LL-8/43), jejich přečištění pomocí RP-HPLC a ověření jejich identity metodou MALDI-TOF MS. Před vlastní spektrální analýzou byly tyto peptidy ve formě trifluoroacetátů převedeny na odpovídající hydrochloridy a to dvojnásobnou lyofilizací v prostředí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol l⁻¹.

Roztoky peptidů o koncentraci 50 g l⁻¹ byly měřeny metodami ECD a VCD doplněnými o příslušná měření nepolarizované absorpce (UV a IČ). Spektra ECD a VCD spektra byla měřena v D₂O, TFE-d₃ a ve směsi TFE-d₃/D₂O (40/60, v/v).

IČ absorpční a VCD spektra byla měřena na přístroji s Fourierovou transformací IFS-66/S vybaveném VCD modulem PMA 37 (oboje Bruker, Německo). Měření VCD bylo prováděno v kvetách typu A145 (Bruker, Německo) s okny z CaF₂ a teflonovou distanční folií tloušťky 23 μ m nebo 50 μ m. Spektra byla měřena s rozlišením 8 cm⁻¹.

Spektra ECD identických vzorků, které byly měřeny pomocí VCD, byla měřena na spektrometru J-815 (Jasco,

Tabulka I

Aminokyselinové sekvence studovaných lasioglossinů

Zkratka ^a	Sekvence peptidů
LL-III	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH ₂
LL-III/5	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-OH

^a Zkratky označující jednotlivé peptidy byly převzaty z cit.³

Tabulka II

Odhad zastoupení α -helikální konformace (%) v jednotlivých peptidech

Peptid	D ₂ O	D ₂ O/TFE	TFE-d ₃
LL-III	12	63	94
LL-III/5	10	35	18
LL-8/43	10	89	70

Tabulka III

Odhad zastoupení konformace typu PPII (%) v jednotlivých peptidech

Peptid	D ₂ O	D ₂ O/TFE	TFE-d ₃
LL-8	31	8	1
LL-8/8	35	37	37
LL-8/43	34	3	6

Japonsko) s rozlišením 2 nm, časovou konstantou 1 s a rychlostí záznamu 100 nm min⁻¹. Byly použity křemenné kvety o tloušťce 10 μ m. Odhad procentuálního zastoupení konformací v jednotlivých peptidech (tab. II a III) byl proveden na základě analýzy spekter ECD metodami neuronových sítí v programu CDNN 2.1 (Delphi).

Výsledky a diskuse

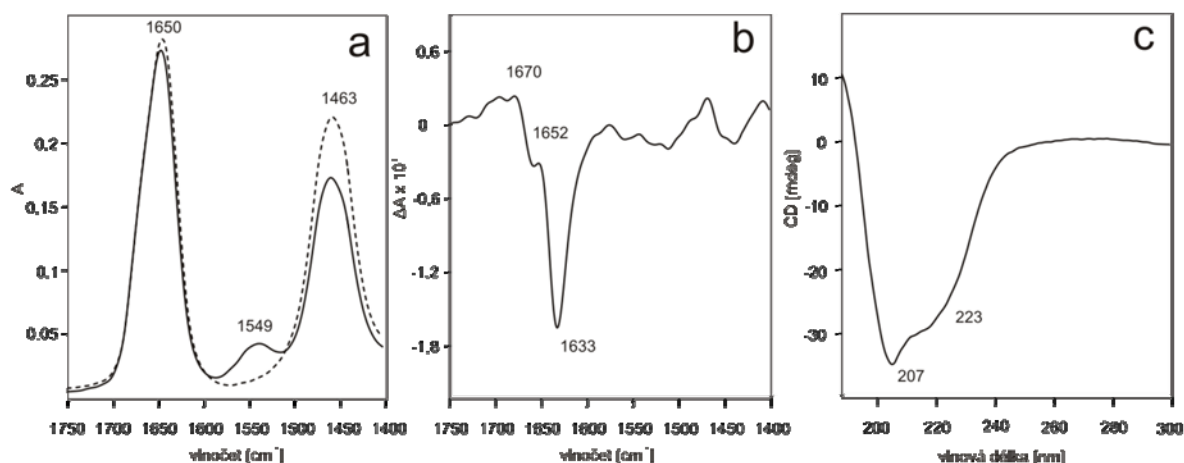
Peptid LL-III v D₂O

Absorpční IČ spektra lasioglossinu LL-III v D₂O (obr. 1a) byla měřena vždy před a po skončení měření spekter VCD. Poloha a intenzita pásu amidu I' u 1650 cm⁻¹ se s časem nemění. Dochází pouze ke snížení intenzity pásu amidu II u 1549 cm⁻¹ a k současnému zvýšení intenzity amidu II' u 1463 cm⁻¹, příčinou čehož je výměna vodíku za deuterium na dusíku peptidové vazby (H-D výměna). Ve spektru VCD v oblasti amidu I' (Obr. 1b) byl pozorován negativní couplet sestávající z kladného pásu u vlnočtu 1670 cm⁻¹ a záporného u 1633 cm⁻¹. Tento tvar spektra poukazuje na přítomnost konformace, která je označována jako polyprolin II (PPII)⁴. Ve spektru se dále nachází slabý negativní pás 1652 cm⁻¹, který je částí pozitivního coupletu charakteristického pro α -helikální konfor-

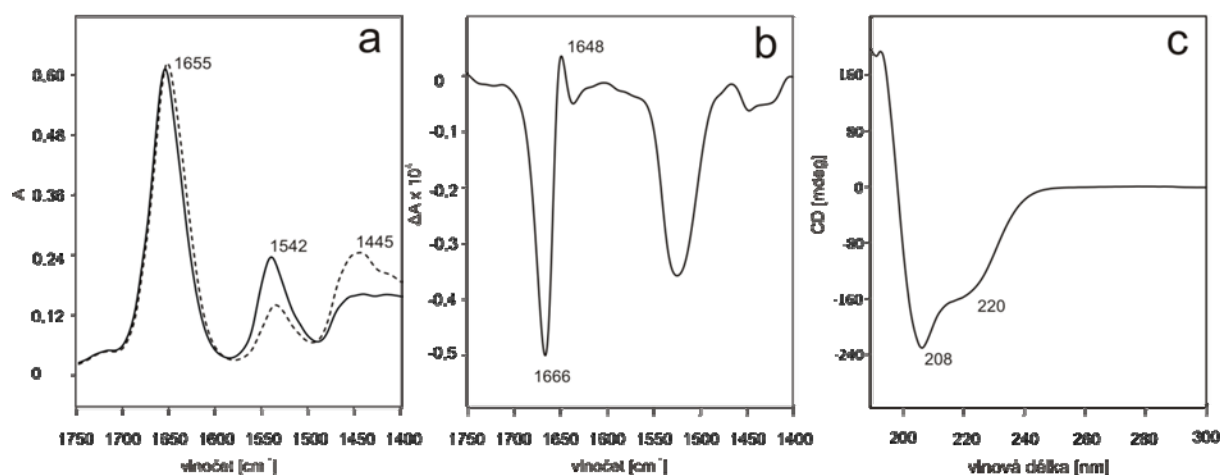
maci⁴. Spektrum VCD tedy vypovídá o současné přítomnosti jak α -helikální konformace, tak konformace typu PPII s tím, že konformace PPII je zastoupena ve větší míře. Ve spektru ECD byl pozorován kladný pozitivní pás 185 nm a dva negativní pásy s maximy 207 a 223 nm. Tento průběh je v souladu s VCD pozorováním a následná analýza spektra pomocí neuronových sítí poukazuje na vyšší zastoupení konformace PPII vůči α -helixu: 12 % α -helixu a 31 % konformace typu PPII.

Peptid LL-III v TFE-d₃

Na obr. 2 jsou prezentována spektra peptidu LL-III v TFE-d₃. IČ pás v oblasti amidu I' u 1655 cm⁻¹ je oproti měření v D₂O (obr. 1a) posunut o 5 cm⁻¹ k vyšším vlnočtům, což obecně naznačuje vyšší zastoupení α -helikální konformace. Ve spektru VCD byl pozorován pozitivní couplet tvořený intenzivním záporným pásem 1666 cm⁻¹ a slabším kladným pásem 1648 cm⁻¹. Tento průběh je charakteristický pro peptidy s významným zastoupením α -helixu. Ve spektru ECD byly pozorovány dva negativní pásy s maximy 208 a 220 nm a následným výpočtem procentuálního zastoupení sekundárních struktur byl zjištěn obsah 94 % α -helixu a 1 % konformace typu PPII.



Obr. 1. Spektra peptidu LL-III měřená v D₂O; a) IČ absorpční spektra měřená před (—) a po (---) měření VCD, b) spektrum VCD, c) spektrum ECD



Obr. 2. Spektra peptidu LL-III měřená v TFE-d₃; a) IČ absorpční spektra měřená před (—) a po (---) měření VCD, b) spektrum VCD, c) spektrum ECD

Peptid LL-III/5 v D₂O

Negativní couplet v oblasti amidu I' ve spektru VCD (pozitivní pás 1672 cm⁻¹ a negativní 1636 cm⁻¹) a průběh spektra ECD peptidu LL-III/5 v D₂O poukazovaly na významné zastoupení konformace typu PPII. Analýza spektra ECD odhalila 10 % α -helixu a 35 % konformace typu PPII.

Peptid LL-III/5 v TFE-d₃

Ve spektru VCD byl zaznamenán pozitivní couplet (pásky 1652 a 1647 cm⁻¹) svým průběhem analogický tomu, jaký byl pozorován u peptidu LL-III v TFE-d₃. Tento průběh spektra naznačuje významné zastoupení

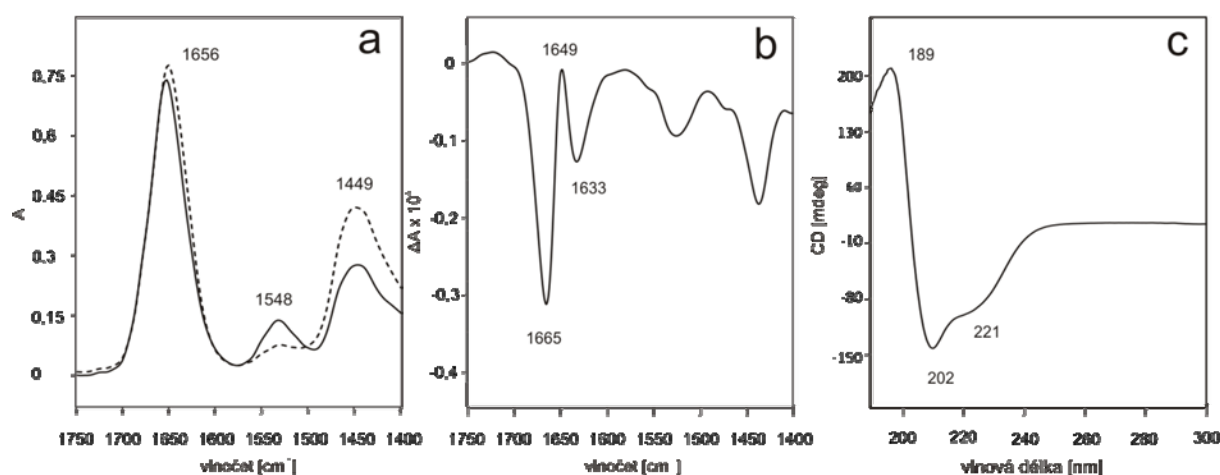
α -helikální konformace, což bylo také potvrzeno analýzou spektra ECD: 18 % α -helixu a 37 % konformace typu PPII.

Peptid LL-8/43 v D₂O

Tvar spekter VCD (negativní couplet, pásky 1665 a 1635 cm⁻¹) i ECD tohoto peptidu poukázal na významné zastoupení konformace typu PPII, v tomto případě 34 %. Obsah α -helikální struktury byl odhadnut na 10 %.

Peptid LL-8/43 v TFE-d₃

Ve spektru VCD tohoto peptidu (obr. 3b) v oblasti amidu I' byl pozorován signál tvaru nevyváženého písme-



Obr. 3. Spektra peptidu LL-8/43 měřená v TFE-d₃; a) IČ absorpční spektra měřená před (—) a po (---) měření VCD, b) spektrum VCD, c) spektrum ECD

Tabulka IV
Antimikrobiální a hemolytická aktivita studovaných peptidů

Peptid	Antimikrobiální aktivita MIC [μM]				Hemolytická aktivita ^a LC50 [μM]
	B.s.	S.a.	E.c.	P.a.	
LL-III	0,7	3,9	1,4	18,7	>220
LL-III/5	1,2	40	3,5	40	>200
LL-8/43	0,8	4	1,2	7,2	>200

^a Koncentrace peptidu způsobující zánik 50 % červených krvinek

na „W“ (W-shape)⁵. Tento signál je superpozicí pozitivního coupletu (záporný pás 1665 cm^{-1} a pás 1649 cm^{-1} , kdy oba poukazují na přítomnost α -helikální konformace) a signálu charakteristického pro konformaci PPII (pás 1633 cm^{-1}). Z průběhu obou spekter i analýzy ECD je zřejmé, že α -helikální konformace převažuje: 70 % α -helixu a 6 % konformace PPII.

Souhrnné výsledky zastoupení vybraných sekundárních struktur v jednotlivých peptidech v závislosti na rozpouštědle jsou uvedeny v tab. II a III, a to i pro případ použití směsného rozpouštědla TFE- d_3 / D_2O (40/60, v/v). Výsledky zjištěné antimikrobiální aktivity (proti bakteriím *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* a *P. aeruginosa*) a hemolytické aktivity jsou uvedeny v tab. IV.

Závěr

Bylo potvrzeno, že spektroskopie VCD a ECD je velmi citlivá na sekundární strukturu peptidů a je schopna podat podrobné informace i o konformaci antimikrobiálních peptidů.

U peptidu označovaného jako LL-III bylo zjištěno, že procentuální zastoupení α -helikální konformace roste se zvyšujícím se obsahem TFE- d_3 . U peptidů LL-III/5 a LL-8/43 bylo nalezeno největší zastoupení α -helixu ve směsném rozpouštědle. Obecně nejmenší podíl α -helixu byl zaznamenán v přítomnosti D_2O . Podle relativního procentuálního zastoupení α -helixu v TFE- d_3 a směsi TFE- d_3 / D_2O bylo potvrzeno, že TFE- d_3 má výrazný vliv na formování a stabilizaci této struktury.

Z výsledků plyne, že studované peptidy je díky relativně vysokému zastoupení α -helikální konformace (při měření v TFE- d_3 a TFE- d_3 / D_2O) možno použít pro další testování jako nové potenciální šablony antimikrobiálních léčiv. Největší potenciál tvořit α -helikální konformaci za

současné vysoké antimikrobiální a nízké hemolytické aktivity vykázaly peptidy LL-III a LL-8/43. Schopnost antimikrobiálních peptidů vytvářet α -helikální konformaci v přítomnosti bakteriální membrány je jedním z předpokladů pro jejich antimikrobiální účinek. Z tab. IV je zřejmé, že díky nejnižší minimální inhibiční koncentraci (MIC) peptidu LL-8/43 bude další pozornost ve vývoji nových prostředků antimikrobiální léčby zaměřena právě na tento peptid.

Tato studie byla realizována za podpory grantů P208/11/0105 (Grantová agentura České republiky), A2_FCHI_2012_045 a 6046137307 (MŠMT ČR). Autoři velmi děkují Ing. Michalu Tatarkovičovi (VŠCHT, Praha) za pomoc při vyhodnocování zastoupení sekundárních struktur.

LITERATURA

- Keiderling T. A., v knize: *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Berova N., Nakanishi K., Woody R. W., ed.), Peptide and Protein Conformational Studies with Vibrational Circular Dichroism and Related Spectroscopies. Wiley-VCH, New York 2000.
- Setnička V., Urbanová M., v knize: *Moderní přístupy k farmaceutické analýze* (Dohnal J., Jampilek J., Král V., Řezáčová A., ed.), kap. 4.6, str. 160. Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Brno 2010.
- Čeřovský V., Buděšinský M., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Slaninová J., Borovičková L., Fučík V., Bednářová L., Votruba I., Straka J.: *ChemBioChem* 10, 2089 (2009).
- Keiderling T. A., v knize: *Circular dichroism. Principles and Applications*. (Berova N., Nakanishi K., Woody R. W., ed.). Wiley-VCH, New York 2000.
- Yoder G., Pančoška P., Keiderling T. A.: *Biochemistry* 36, 15123 (1997).

STANOVENÍ SYNTETICKÝCH BARVIV E 122 (AZORUBIN) A E 124 (PONCEAU 4R) V NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH METODOU IONTOVĚ INTERAKČNÍ CHROMATOGRAFIE A DIFERENČNÍ PULZNÍ POLAROGRAFIE

MAREK DOŠEK, DANA TRÍSKOVÁ a JITKA FIKAROVÁ

Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Králova Výšina 3132/7, 400 01 Ústí nad Labem
marek.dosek@seznam.cz

Úvod

Azorubin (E122) a Ponceau 4R (E124) jsou v současné době nejčastěji používaná červená barviva, přidávaná do nealkoholických nápojů a potravin. Slouží ke zlepšení vzhledu a navrácení barvy, kterou potravina ztratila během zpracování. Například neobarvená šunka není růžová ale nahnědlá.

Vliv barviv na zdraví člověka není ještě zcela prozkoumán, nicméně negativní dopady a chronické účinky na zdraví člověka lze považovat v řadě případů za prokázané. U azorubinu je často diskutován negativní vliv na pozornost a hyperaktivitu dětí, což bývá uvedeno i na obalech nápojů, které azorubin obsahují. Barvivo Ponceau 4R (E124) je podezřelý z kancerogenity. Jeho používání je zakázáno v USA a ve Velké Británii, nicméně v ČR je používání Ponceau 4R stále povoleno. Jeho zastoupení v nápojích je však menší¹.

V této práci byly ke stanovení uvedených syntetických barviv v nealkoholických nápojích použity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a diferenční pulzní polarografie (DPP).

Obě syntetická barviva patří do skupiny sulfonovaných azobarviv, jejichž chromatografické stanovení může činit potíže. Zmíněné sloučeniny vykazují nízkou retenci na běžných nepolárních stacionárních fázích kvůli přítomnosti sulfoskupiny plně disociované prakticky v celém dostupném rozmezí pH. Pro zlepšení retence a separace ionizovaných látek na nepolárních stacionárních fázích se nejčastěji využívá přísady iontově párových (či iontově interakčních) činidel, např. tetrabutylamonných solí². Mechanismy retence sulfonovaných sloučenin v reverzním chromatografickém systému byly podrobně studovány a diskutovány zejména v pracích Jandery a spol.³ V této práci byly optimalizovány podmínky pro stanovení barviv Azorubin a Ponceau 4R na koloně plněné běžnou stacionární fází s oktadecylovou funkční skupinou (C_{18}). Kromě složení mobilní fáze (obsahu methanolu, obsahu hydrogensíranu tetrabutylamonného) má na účinnost separace významný vliv i teplota kolony – tento vliv je v iontově interakční kapalinové chromatografii dosud využíván poměrně zřídka.

Pro stanovení některých typů syntetických barviv v nápojích lze s výhodou použít i metody DPP^{4,5}. Stanove-

ní bylo prováděno v octanovém pufru jako základním elektrolytu s minimální předběžnou úpravou vzorku.

Obě metody byly aplikovány na řadu vzorků nealkoholických nápojů z běžné obchodní sítě. Byly porovnány základní validační (výkonnostní) charakteristiky obou metod a testována shoda výsledků dosažených oběma metodami.

Experimentální část

Chemikálie

Barviva Azorubin (E122) a Ponceau 4R (E124) byla získána od Serva, Heidelberg, Německo. Zásobní roztoky barviv o koncentraci 1 g l^{-1} byly získány rozpuštěním příslušného množství barviva v deionizované vodě a kalibrační roztoky byly připraveny zředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou těsně před měřením.

Zařízení

Chromatografický systém Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, USA) se skládal z čerpadla LPG-3400SD, kolonového termostatu TCC-3000SD, detektoru DAD-3000 a smyčkového dávkovače Rheodyne 8125 s dávkovací smyčkou 20 μl . Separace probíhala na koloně Hibar 125 \times 4 mm, stacionární fáze Purospher STAR, RP 18, 5 μm , endcapped (Merck). Mobilní fáze se sestávala z 80 % methanolu (Merck), 5 % deionizované vody a 15 % 0,2 mmol l^{-1} roztoku hydrogensíranu tetrabutylamonného, který byl získán z preparátu pro iontově párovou chromatografii LichroPur (Merck) rozpuštěním v deionizované vodě. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min^{-1} , měření probíhala při teplotě 15 $^{\circ}\text{C}$ (pokud není uvedeno jinak). Všechny roztoky byly připravovány rozpuštěním v deionizované vodě, která byla získávána pomocí zařízení Demi Ultra 20 (Goro, Praha), pracujícího na principu reverzní osmózy a iontové výměny na směsném měničích iontů.

K polarografickým měřením byl použit analyzátor 797 VA Computrace s multifunkční rtuťovou elektrodou v pracovním modu HMDE (visící rtuťová kapková elektroda), referentní elektroda byla argentochloridová a pomocná elektroda platinová. Jako základní elektrolyt byl použit roztok octanu amonného o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$. Ten byl získán rozpuštěním příslušného množství octanu amonného (Lachema, Neratovice) v deionizované vodě. Měření byla prováděna metodou diferenční pulzní polarografie (DPP).

Tabulka I

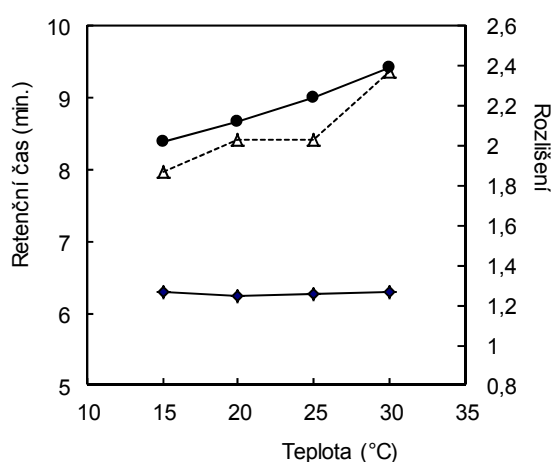
Základní charakteristiky metody stanovení vybraných barviv metodou HPLC

Charakteristika	Azorubin (E122)	Ponceau 4R (E124)
Mez detekce ^a , mg l ⁻¹	0,021	0,079
Mez stanovitelnosti ^b , mg l ⁻¹	0,071	0,264
Linearita, mg l ⁻¹	do 15 (r=0,998)	do 15 (r=0,999)
Opakovatelnost ^c (rel. směrodatná odchylka, %)	1,43	5,24

^a Trojnásobek směrodatné odchylky⁶, ^b desetinásobek směrodatné odchylky⁶, ^c pro koncentrace barviv 0,5 mg l⁻¹, n=7

Výsledky a diskuse

V předchozí práci² bylo prokázáno, že je možné separovat jednodušší směsi sulfonovaných azobarviv na koloně Purospher s reverzní stacionární fází po přidavku síranu tetrabutylamonného do mobilní fáze. Retenci lze účinně ovlivňovat zejména změnou obsahu methanolu a síranu tetrabutylamonného v mobilní fázi, chromatografické píky ovšem bývají poměrně široké se sklonem k chvostování a celková doba analýzy je dosti dlouhá. V této práci jsme prokázali, že retenci a separaci lze dosti účinně ovlivňovat též změnou teploty kolony. Na obr. 1 je vidět, že retence barviva E124 se snižuje se snižující se teplotou, zatímco retence barviva E122 se s teplotou mění poměrně málo. Díky tomu lze zvolit podmínky, za kterých dojde k dostatečné separaci obou látek při zachování poměrně krátké doby analýzy; je nutno též přihlídnout k požadavku na dostatečnou separaci píků stanovovaných látek od různých druhů injekčních píků, které se při analýze reálných vzorků nápojů objevují v hojně míře. Pro analýzy reálných vzorků byla zvolena teplota kolony 15 °C.



Obr. 1. Závislost retenčního času a rozlišení na teplotě kolony;

◆ E122, ● E124, Δ rozlišení

Za zvolených (optimalizovaných) podmínek byly změřeny nejdůležitější výkonnostní charakteristiky metody – viz tab. I.

Metoda DPP umožňuje (alespoň v některých případech) odlišit syntetická barviva od přírodních⁵ a stanovit vybraná aditiva E122 a E124 s dostatečnou přesností a citlivostí. Jako základní elektrolyty jsou doporučovány přibližně neutrální pufrů⁵. Zjistili jsme, že poněkud lepších výsledků z hlediska citlivosti a tvaru píků je možno dosáhnout při použití octanu amonného místo fosforečnanových pufrů doporučovaných v literatuře^{4,5}. Za daných podmínek poskytují obě barviva dobře měřitelné píky v rozmezí potenciálů asi –200 až –900 mV, přičemž barvivo E122 poskytuje za jinak srovnatelných podmínek pik užší a vyšší, zatímco pik barviva E124 je poměrně plochý a široký. K vyhodnocení byla použita metoda standardního přidavku. Nebyly pozorovány žádné rušivé vlivy dalších složek vyskytujících se v nealkoholických nápojích.

Závěr

Obě metody umožňují stanovení syntetických aditiv E122 a E124 v nealkoholických nápojích, sirupech a podobných materiálech. Pro obě metody byly určeny základní výkonnostní charakteristiky. Při HPLC analýzách některých nápojů se objevují poměrně výrazné nástřikové píky s tendencí ke chvostování, které zhoršují detekci sledovaných barviv a v ojedinělých případech znemožňují stanovení. Jejich velikost a tvar souvisí patrně s obsahem cukrů nebo umělých sladidel, případně dalších aditiv. V současné době probíhá porovnání obou metod při analýze širšího spektra vzorků nápojů vyskytujících se v běžné obchodní síti.

Samostatné odborné práce studentů FŽP UJEP jsou podporovány v rámci projektu Modernizace výuky technických a přírodovědných oborů na UJEP se zaměřením na problematiku ochrany životního prostředí (ENVIMOD), který je podporován MŠMT v rámci programu OPVK, č. projektu CZ.1.07/2.2.00/28.0205.

LITERATURA

1. Šlampová A., Smělá D., Vondráčková A., Jančáková I., Kubáň V: Chem. Listy 95, 163 (2001).
2. Janoš P., Hejda S., Agapovová E., Fikarová J.: Chem. Listy 105, 943 (2011).
3. Jandera P., Churáček J., Taraba B.: J. Chromatogr. 262, 121 (1983).
4. Combeau S., Chatelut M., Vittori O.: Talanta 56, 115 (2002).
5. Chanlon S., Joly-Pottuz L., Chatelut M., Vittori O., Cretier J.L. : J. Food Composit. Anal. 18, 503 (2005).
6. EURACHEM: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. LGC, Teddington 1998. České vydání: Suchánek M. (ed.): *Vhodnost analytických metod pro daný účel. Kvalimetrie 9*. EURACHEM-ČR, Praha 1999 .

STUDIUM KŮŽE POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE

ADÉLA JENIŠTOVÁ a PAVEL MATĚJKA

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice
adelka.jenistova@seznam.cz

Úvod

Lidská kůže je největším orgánem lidského těla. Tvorbí přirozenou bariéru mezi naším tělem a vnějším prostředím, čímž chrání náš organismus před účinky různých patogenů. Povrch kůže je schopen vstřebávat a zadržovat vodu a v ní rozpuštěné látky, dýchací plyny i látky rozpuštěné v tucích^{1,2}. Strukturu kůže můžeme rozdělit do tří vrstev. Jsou jimi pokožka (lat. *epidermis*), škára (lat. *dermis*) a podkoží (lat. *subcutis*). Pokožka je tvořena převážně buňkami korneocytů (95 %), které vznikly odumřením keratinocytů. Během tohoto procesu, nazývaného kornifikace, dochází k nahrazení buněčné membrány keratinocytů ceramidy, což jsou látky lipidové povahy. Jejich struktura je složena z mastné kyseliny a sfingosinu^{3,4}. Další kožní vrstvou je škára, která je k pokožce připojena bazální membránou tvořenou převážně kolagenem IV a glykoproteiny. Zaujímá především funkci ochrannou. Poslední vrstvou představuje podkoží s izolační a mechanickou funkcí².

Poslední dobou přibývá počet lidí s kožními nemocemi. Mezi nejběžnější z nich patří akné, bradavice, lupenka nebo ekzémy. Kůži postiženou některou formou ekzému je nutno pořádně a pravidelně promašťovat. K tomuto účelu se používají buď mast'ové základy obohacené pouze o vitamíny, nebo masti s účinnou látkou např. na bázi kortikoidů².

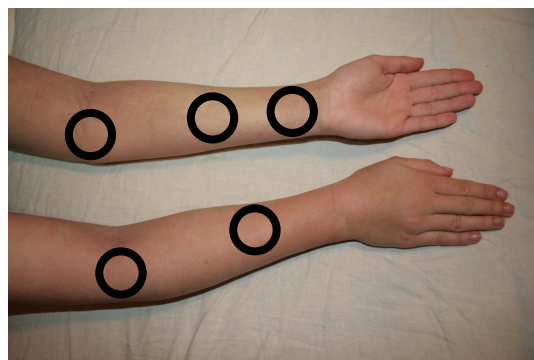
V této práci byl jako mast'ový základ použit krém Dermisoft firmy Aromaterapie Karel Hadek®. Jeho přibližné procentuální složení bylo osobně sděleno výrobcem. Krém obsahuje vedle vody (75 %) také různé nosné a vyživující látky (cetearyl alkohol 6 %, glycerol 3 %, včelí vosky 3 %, lecitin 2 %, panthenol 2 %, rostlinné éterické oleje 7 %). Cílem této práce bylo naměřit a vyhodnotit spektra atopického ekzému neošetřené a ošetřené kůže mast'ovým základem a dvěma ochrannými mastmi, interpretovat rozdíly mezi spektry, sledovat změny ekzému v delším časovém období a identifikovat látky základové masti vstřebané do kůže.

Experimentální část

Měření spekter kůže a mast'ového základu Dermisoft

Ke studiu ošetřené i neošetřené kůže bylo vybráno celkem pět míst z oblasti předloktí, a to jak na levé, tak na pravé ruce (obr. 1). Výběr těchto míst spočíval především v jednoduché manipulaci a přístupu k měřicímu ATR krystalu (ATR – zeslabený totální odraz). Pro měření byl použit infračervený spektrometr Nicolet FT-IR 6700 s jednodrazovým ATR nástavcem. Zdrojem záření byla globarová tyčinka, dělič paprsků byl na bázi KBr a byl použit DTGS (deuteriumtriglycinsulfátový) detektor. Spektra byla pořízena s rozlišením 4 cm^{-1} s akumulací 128 skenů. Dané místo kůže bylo přiloženo na předem očištěný ZnSe krystal a následně bylo započato měření, při němž se dbalo na stabilní přítlak a rovněž na fixovanou oblast snímání daného místa ruky. Data suché kůže byla získána opakovaně v rozmezí 6 týdnů od září do října 2012. Obdobně se přistupovalo i ke zkoumání částí rukou ošetřených mast'ovým základem. Na dané místo byl vždy nanesen tenký film základové masti a vzorek byl změřen stejným způsobem jako při měření neošetřené kůže. Všechna místa na levé i pravé ruce byla měřena v 30minutových intervalech od okamžiku aplikace po dobu 2 hodin. Byly tak získány vždy série 5 spekter pro jednotlivé oblasti rukou. Experiment byl opakován pro každou ruku dvakrát v průběhu září 2012.

Při získávání dat kůže ošetřené ochrannými mastmi byly nejprve připraveny vzorky 2 ochranných mastí. Masti se od základové liší přidáním geranievého a levandulového oleje v určitém poměru vůči mast'ovému základu. Mast 1 byla vytvořena smícháním 2 ml základové masti Dermisoft s 1 kapkou geranievého oleje a 1 kapkou levan-



Obr. 1. Fotografie rukou s vyznačením míst, na kterých byla spektra naměřena

dulového oleje. Vzorek byl v podobě tenkého filmu nanesen na označené místo ruky. Spektra byla opět měřena v 30minutových intervalech od okamžiku nanesení po dobu 2 hodin. Měření byla prováděna dvakrát v průběhu září 2012. Mast 2 byla vytvořena smícháním 50 ml masťového základu Dermisoft se 6 kapkami geraniového a 6 kapkami levandulového oleje. Z vytvořeného vzorku masti byl aplikován tenký film na postižené místo ruky. Opět byla spektra měřena po 30 minutách od času nanesení po dobu 2 hodin na všech vyznačených místech levé i pravé ruky. Experimenty byly prováděny dvakrát (v září a v říjnu 2012).

K měření spekter základové masti byl použit spektrometr Nicolet FT-IR 6700 s jednoodrazovým ATR nástavcem. Byla získána spektra s rozlišením 4 cm^{-1} a akumulaci 128 skenů. Vzorek masti byl nanesen kopistí jako velmi tenký film na krystal a měřen opakovaně po dobu 2 hodin, během nichž bylo sledováno vysychání masti.

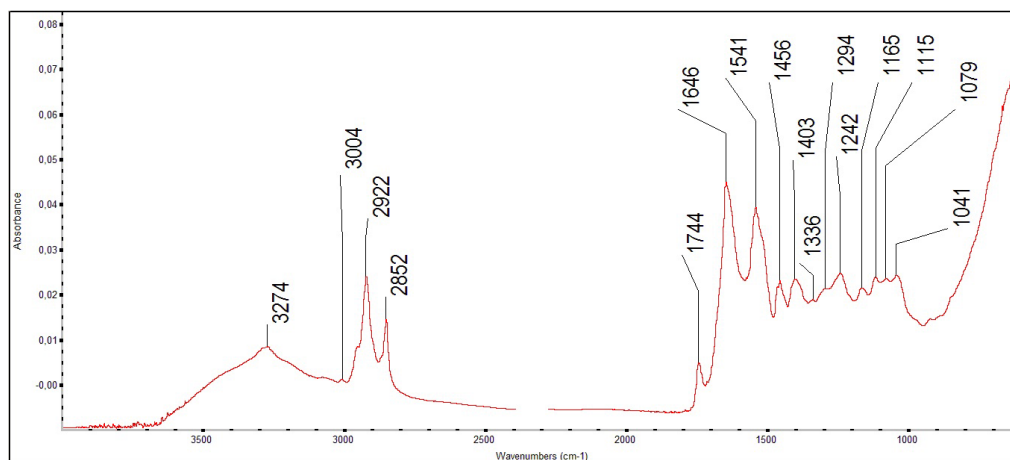
Spektra byla zpracovávána a vyhodnocována v programech Omnic 8.0 a TQ Analyst 8.0. Testovány byly předúpravy sady spekter pomocí multiplikační korekce rozptylu dat (dále MSC) a korekce SNV (standard normal variate), což jsou metody, které mohou kompenzovat vliv variability přítlaku kůže na měřicí krystal. Byla počítána průměrná spektra a záznamy směrodatných odchylek, spektra byla klasifikována metodou diskriminační analýzy (DA).

Výsledky a diskuse

Naměřená data neošetřené kůže, sesbíraná v průběhu 6 týdnů, byla zprůměrována a k charakteristickým pásům výsledného spektra byly přiřazeny předpokládané látky obsažené v pokožce (obr. 2). Ve spektru se velmi zřetelně projeví pásy od amidových skupin (1646 a 1541 cm^{-1}). Důvodem je vysoký obsah keratinu ve svrchní části pokožky. Také pásy valenčních vibrací -OH vazeb (široká

oblast $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) jsou ve spektru dobře patrné, a to především díky obsahu vody v pokožce (ovšem pás deformační vibrace H-O-H je překryt pásy amid I a II amidových skupin), ale také kvůli obsahu aromatických hydroxylsloučeniny (viz níže) a ceramidů. Výskyt aromatických hydroxylsloučenin může být důsledkem obsahu polymerů kožních pigmentů melaninu (eumelaninu a feomelaninu)². Dalšími funkčními skupinami jsou CH_3 - a $-\text{CH}_2$ - skupiny (charakteristické pásy 2922 , 2852 , a 1456 cm^{-1}), čili součásti alifatických skeletů keratinu či ceramidů. V neposlední řadě se ve spektru vyskytují i pásy nenasycených esterů, jež jsou obsaženy v lipidové vrstvě (např. pásy 1744 , 1242 a 1165 cm^{-1}).

Dalším úkolem bylo vyhodnotit dosud naměřená spektra suché i ošetřené kůže v programu TQ Analyst (Thermo Nicolet) metodou DA (jako nejhodnější se ukázala přeúprava dat algoritmem MSC). Byly vytvořeny 4 klasifikační třídy podle ošetření pokožky (suchá kůže, kůže po aplikaci masťového základu, kůže po aplikaci masti 1 a kůže po aplikaci masti 2) nezávisle na datu a oblasti měření. Z výsledné kalibrace bylo patrné, že se spektra suché kůže statisticky významně liší od spekter pokožky po aplikaci některé z mastí. Chyby v přiřazení tříd jednotlivých ošetřených kůží se mezi sebou pohybovaly mezi 20–30 %. Dále bylo ze všech získaných spekter pokožky po nanesení masťového základu v programu Omnic vypočítáno průměrné spektrum a záznam směrodatné odchylky. Stejný postup byl použit při generování průměrného spektra kůže ošetřené mastí 1 i mastí 2. Porovnáním zprůměrovaných spekter byly patrné změny intenzit většiny pásů oproti suché kůži. U všech tří použitých mastí byl patrný nárůst intenzity -OH skupin (okolo 3300 cm^{-1}). Tento efekt byl dán především vysokým obsahem vody v masťovém základu. V oblasti okolo 1400 cm^{-1} se objevilo několik pásů a také vzrostla výška pásu při 1041 cm^{-1} , patrně díky obsahu cetearyl alkoholu, panthenolu a glycerolu. Společný rys všech mastí se objevil také v oblasti valenčních vibrací alifatických skupin



Obr. 2. Průměrné spektrum neošetřené kůže s označením charakteristických pásů

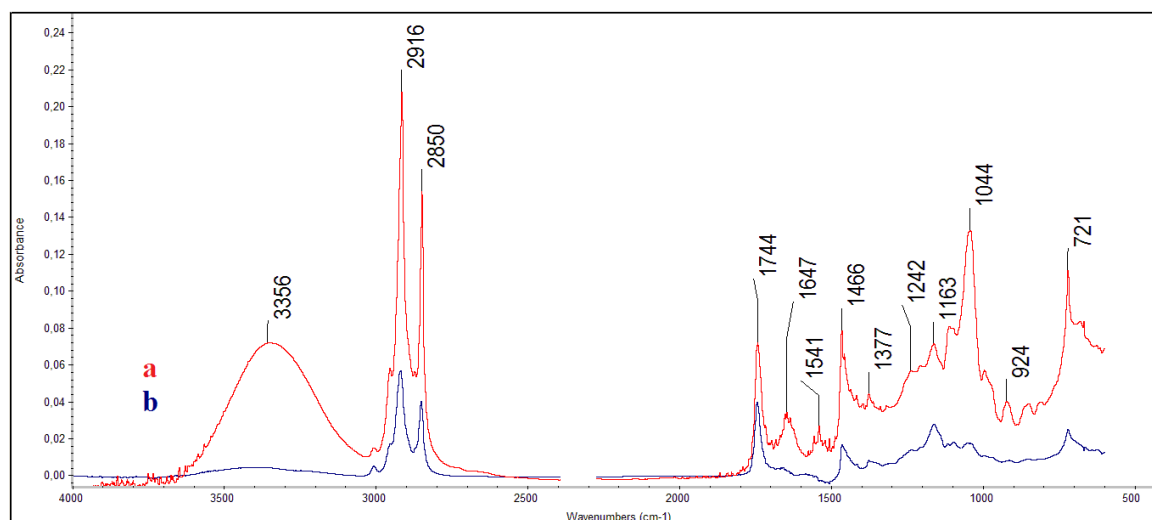
(3000–2800 cm^{-1}), což bylo dáno obsahem již výše zmíněných látek. Velmi nápadný byl i nárůst intenzity pásů charakteristických pro estery – R-CO-O-R' (1744 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} a 1165 cm^{-1}). Lze jej vysvětlit především přítomností včelích vosků. Důležitý efekt byl pozorován při srovnání jednotlivých spekter ošetřených kůží. Kůže pošetřená pouze masťovým základem měla ve všech pásech nejvyšší intenzity. Nejmenší rozdíly byly v oblastech nasycených alifatických skupin a esterů (1744 cm^{-1}). Naopak největší změny patřily do oblasti -OH vibrací a vibrací amidových skupin a pásů nenasycených esterů při 1242 cm^{-1} a 1165 cm^{-1} . Vysvětlením může být fakt, že po přidání geraniového a levandulového oleje do základové masti došlo k mnohem lepšímu promaštění pokožky, a tím i k větší hydrataci a prostupu látek s obsahem amidových skupin (panthenol). Byly patrné i mírné odchylky ve spektrech kůže ošetřené mastí 1 a mastí 2. Celkově se tyto dvě masti liší jen v poměru přidávaných olejů ku masťovému základu, což se projevilo změnou celkových intenzit v celém rozsahu spektra. Viditelné byly ale i drobné chemické rozdíly. Zarážející může být, že intenzita pásů amidových skupin byla u masti 1 vyšší, než u masti 2. Navíc intenzita pásů amidových skupin po ošetření mastí 2 byla skoro srovnatelná s neošetřenou kůží v daných pásech. Pokožka se tak v prvním případě nepromastila natolik dobře, aby byla schopna propustit všechny amidové sloučeniny přítomné v masti.

Při sledování změn atopického ekzému v průběhu 6 týdnů experimentu byla všechna naměřená spektra neošetřené kůže rozdělena do 4 tříd podle data pořízení a následně byla v programu TQ Analyst (Thermo Nicolet) zpracována metodou DA (jako nevhodnější se ukázala přeúprava dat algoritmem MSC). Výsledná kalibrace ukázala, že největší rozdíly v pokožce byly ve druhém období měření (tj. od 10. 9. 2012 do 12. 9. 2012), kdy nedošlo

k chybné klasifikaci ani jediného spektra. Následně byla spektra jednotlivých tříd zprůměrována v programu Omnic a porovnána. Průměrné spektrum kůže z druhého období měření mělo v celém intervalu spektra nejvyšší intenzity. Je tedy patrné, že se v tomto období ekzém skutečně choval jinak, respektive, že byl jeho stav pozorovatelně lepší než v ostatních obdobích – větší intenzita v oblasti α,β -nenasycených esterů poukazuje na lepší promaštění kůže a zvýšená intenzita v oblasti kolem 3300 cm^{-1} dokazuje dokonalejší hydrataci pokožky. Malé zlepšení nemoci bylo ukázáno i u spekter první a čtvrté třídy (tj. 3. 9. 2012 – 6. 9. 2012 a 12. 10. 2012), které jsou v oblasti „otisku palce“ téměř totožné. Nejhorší stav odpovídal spektru třetí třídy, tj. 21. 9. 2012 – 24. 9. 2012. Výsledky jsou v souladu se subjektivními pocity – menší bolestivost kůže v druhém období.

Posledním bodem studia byla identifikace látek masťového základu vstřebaných pokožkou. Aby bylo možné co nejspolehlivěji popsat probíhající děje na pokožce, byla sledována spektra vysychání základové masti v průběhu 2 hodin. Ve spektru byly i po 2 h vysoké intenzity -OH skupin pocházející z vody a -OH sloučenin obsažených v masti (cetearyl alkohol, glycerol, panthenol). Rovněž se zde vyskytly pásy aromatických a nenasycených látek (retinyl palmitát, β -karoten, včelí vosky, éterické rostlinné oleje) a amidových sloučenin (panthenol, allantoin). Patrný byl i příspěvek od nasycených alifatických skupin patřící výše zmíněných organickým sloučeninám, a příspěvek α,β -nenasycených esterů náležící především včelím voskům.

K identifikaci vstřebaných látek pokožkou bylo nejprve potřeba vypočítat rozdílové spektrum mezi průměrným spektrem kůže ošetřené masťovým základem a průměrným spektrem suché kůže. Odečtový faktor byl nastaven tak, aby došlo k co největší eliminaci amidových pásů.



Obr. 3. Rozdíl průměrného spektra kůže ošetřené základovou mastí a průměrného spektra suché kůže (b) ve srovnání se spektrem masťového základu po 2 hodinách vysychání (a)

Výsledné spektrum bylo porovnáno se spektrem základové masti po 2 hodinách vysychání a byly určeny možné látky, které se v různé míře vstřebaly do pokožky (obr. 3). Charakteristický pás vody okolo 3300 cm^{-1} vykazoval téměř nulovou intenzitu, z čehož plyne, že došlo k jejímu prostupu pokožkou. Díky existenci bazální membrány, složené částečně z glykoproteinů, se téměř zcela vstřebaly látky rozpuštěné ve vodě (glycerol, cetearyl alkohol, panthenol, allantoinin), a tím se dostaly z pokožky do nižších vrstev kožní tkáně. Rovněž se velmi dobře vstřebaly i látky obsahující dvojně C=C vazby, mezi něž patří β -karoten, retinyl palmitát a různé rostlinné éterické oleje. Naopak včelí vosky, jejichž hlavními složkami jsou estery a alifatické uhlovodíkové skelety, zůstaly na povrchu pokožky a vytvořily tak ochrannou lipidovou vrstvu.

Závěr

Vyhodnocením průměrného spektra suché kůže byly k charakteristickým vibračním pásům přiřazeny předpokládané látky obsažené v pokožce. Dále byly popsány rozdíly v průměrných spektrech suché i různě ošetřené kůže. Z analýzy vyplynulo, že se suchá kůže statisticky liší od ošetřených. Byly nalezeny i rozdíly ve spektrech jed-

notlivých kůží po aplikaci základové a dvou ochranných mastí. Dalším bodem bylo zkoumání změn ekzému během šesti týdnů. Výsledky experimentu ukazují, že se stav nemoci postupem času skutečně mění a že není vyloučené i kratší časové období, kdy dojde k zřetelnému zlepšení. Poslední částí práce bylo přiřazení látek obsažených v mast'ovém základu k jednotlivým charakteristickým pásům naměřeného spektra a sledování interakce těchto látek s pokožkou. Závěrem byly určeny látky, které penetrovaly pokožkou a rovněž ty, které zůstaly na povrchu kůže.

LITERATURA

1. <http://jirben2.chytrak.cz/>, staženo dne 12. 9. 2012.
2. James W. D, Berger T. G, Elston D. M.: *Andrew's diseases of the skin clinical dermatology*. 10. vyd. Saunders, Philadelphia 2006.
3. Ovaere P., Lippens S., Vandernabeele P., Declercq W.: *Trends Biochem. Sci.* 34, 453 (2009).
4. Haftek M., Callejon S., Sandjeu Y., Padois K., Falson F., Pirot F., Portes P., Demarne F., Jannin V.: *Exp. Dermatol.* 20, 617 (2011).

STANOVENÍ POMĚRU ENANTIOMERŮ L- A D-CYSTEINU POMOCÍ NANOČÁSTIC STŘÍBRA

JAKUB KOKTAN^a, PAVEL ŘEZANKA^a, PAVEL MATĚJKA^b a VLADIMÍR KRÁL^a

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav fyzikální chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
koktanj@vscht.cz

Úvod

Stanovení enantiomerní čistoty látek je v současné době často řešenou problematikou v analytické chemii vzhledem k mimořádnému významu chirálních látek především z hlediska biologického a medicinského. Nejčastěji aplikovanými metodami pro určení zastoupení optických izomerů jsou separační techniky chromatografické event. elektromigrační^{1,2}. Zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie je široce využívanou a spolehlivou analytickou metodou v této oblasti³. Nicméně aplikace chirálních separací má řadu nevýhod a je spojena s několika problémy. Chirální stacionární fáze jsou nákladné, v průběhu separačního procesu může docházet k racemizaci, často je detektor málo citlivý a dalším nedostatkem může být časová náročnost analýz.

Alternativu k separačním metodám tvoří metody spektrální, které využívají optické aktivity enantiomerů. Jedná se zejména o jevy optické rotace a cirkulárního dichroismu (v ultrafialové – UV a viditelné – Vis oblasti se jedná o elektronový cirkulární dichroismus – ECD, v infračervené oblasti o vibrační cirkulární dichroismus – VCD)⁴. Tyto metody jsou výhodné zejména tím, že není potřeba použít chirální selektor.

Pro sledování enantiomerního přebytku spektroskopii ECD je nezbytně nutné, aby analyt v UV/Vis oblasti absorboval záření a příslušná chromoforní funkční skupina byla v blízkosti chirálního centra. Nanočástice stříbra obecně nejsou chirální, a proto, i když mají absorpční pás ve viditelné i ultrafialové oblasti záření, neposkytují ECD signál. Cystein, jedna z kódovaných aminokyselin, je sice chirální, ale neobsahuje žádné vhodné chromoforní skupiny (absorbuje záření až ve vakuové UV oblasti) a tudíž rovněž v běžném ECD nemá diferenčně-absorpční pásy. Nicméně pokud je na povrchu nanočástic navázána chirální molekula cysteinu dochází ke vzniku indukované chiralitě a v ECD spektrech jsou signály⁵. Pro sledování enantiomerního zastoupení forem cysteinu v přítomnosti nanočástic již byla použita absorpční spektroskopie^{6,7} a fluorescence⁸. Obě tyto metody jsou ale na rozdíl od ECD citlivé na přítomnost achirálních látek v systému.

Tato práce se zabývá sledováním změn v ECD spek-

trech nanočástic stříbra modifikovaných D- a L-cysteinem. Na základě proměřených spekter byla prokázána závislost na poměru enantiomerů ve vzorku a statistickými metodami byl navržen postup pro určení enantiomerní čistoty.

Experimentální část

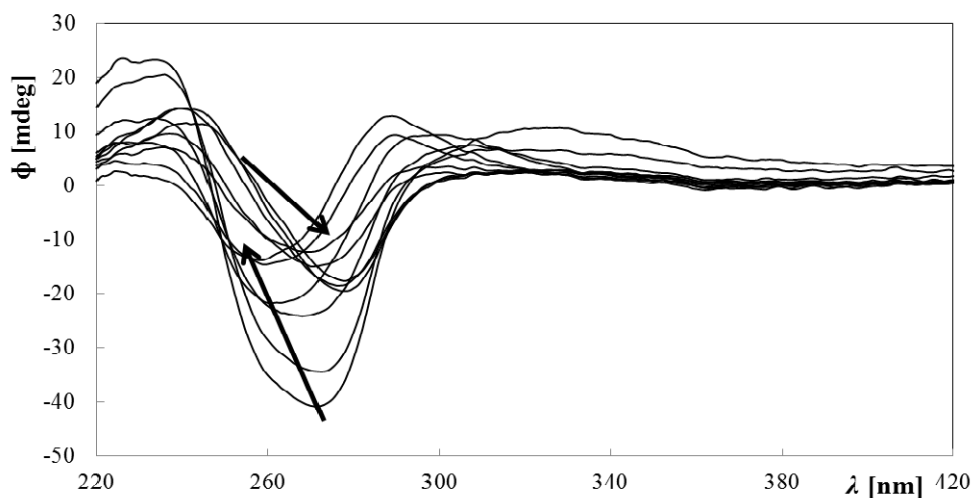
Nanočástice stříbra byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného citronanem sodným. Podrobný postup a charakterizace jsou uvedeny v literatuře⁹. Stručně, bylo přidáno 9,32 mg dusičnanu rozpuštěného v 1 ml vody a 1 ml 1% roztoku citronanu sodného do 50 ml vroucí vody. Reakční směs byla 15 min vařena. Získaný základní koloidní roztok byl charakterizován transmisní elektronovou mikroskopii (JEM-3010, JEOL, Japonsko) a UV/vis absorpční spektrometrií (Varian Cary 400 SCAN, Cary Instruments, USA). Střední průměr nanočástic byl asi 45 nm a naměřené absorpční maximum povrchové plazmonové rezonance bylo při cca 415 nm.

Pro měření závislosti cirkulárního dichroismu na enantiomerním složení byla připravena řada roztoků, ve kterých byla konstantní celková koncentrace cysteinu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} , ale poměr D- a L-izomeru byl měněn v rozmezí od 100 % D : 0 % L, až do 80 % D : 20 % L vždy s rozdílem 2 % ve složení mezi „sousedními“ vzorky. Roztoky byly získány zředěním základního roztoku nanočástic stříbra 250 μ l do 2 ml a přidáním cysteinu. Připravené koloidy byly důkladně promíchány a měření bylo provedeno 24 h poté. Každý roztok byl připraven dvakrát a spektra byla průměrována. ECD spektra byla naměřena na spektrometru Jasco J-815 (Japonsko) v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Rozsah vlnových délek byl nastaven na 220–600 nm s krokem 1 nm a rychlostí záznamu 100 nm min^{-1} .

Získaná data byla statisticky zpracována analýzou hlavních komponent (PCA) a metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) v programu The Unscrambler (Camo, Norsko).

Výsledky a diskuse

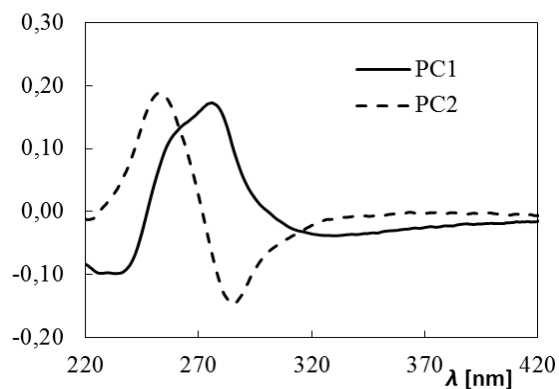
Měřený systém měl v ECD spektrech patrně tři absorpční pásy. Pozitivní couplet okolo 250 nm a široký pozitivní pás nad 290 nm. Vývoj spektra s rostoucím poměrem L-cysteinu je na nejvýraznějším, negativním pásu vyznačen šipkou (obr. 1). Z pohledu absolutní hodnoty elipticity postupně dochází ke snížení absolutní intenzity maxima až do poměru forem D:L = 90:10. Následuje mírný nárůst intenzity s výraznějším posunem celého coupletu k delším vlnovým délkám. Spektra se tedy nelišila pouze v intenzitě jednotlivých pásů, ale i jejich polohou. Proto



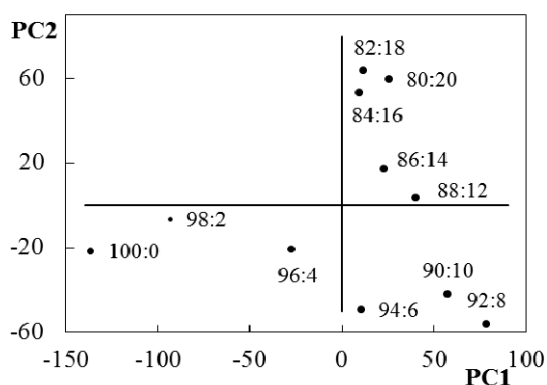
Obr. 1. Průměry měřených ECD spekter systémů směsí D- a L-forem cysteinu

byly při interpretaci výsledků využity metody vícerozměrné analýzy.

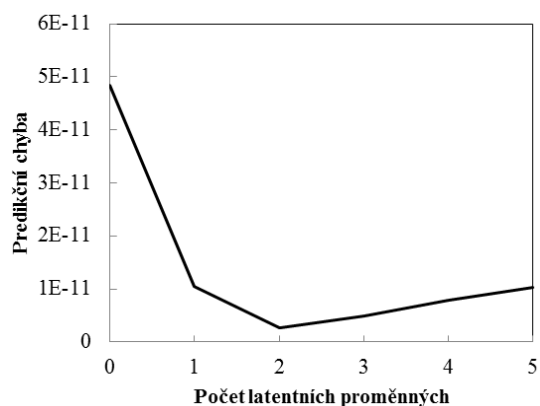
Získaná data byla zpracována pomocí PCA, ze které vyplynulo, že variabilita systému je z 99 % popsána pomocí 2 hlavních komponent. První hlavní komponenta (PC1) popisuje variabilitu z 67 % a druhá hlavní komponenta (PC2) z dalších 32 %. Z grafu komponentního skóre (obr. 2) je patrné, že v rozmezí poměru enantiomerů D:L od 100:0 až po 92:8 se mění hlavně PC1, zatímco od poměru 90:10 až k 80:20 je změna popsána spíše PC2. To by se dalo interpretovat dvěma mechanismy interakcí, které se uplatňují různou měrou v závislosti na složení systému. Srovnáme-li graf komponentního skóre a spektrální graf komponentních zátěží (obr. 3), lze vyčíst, ve kterých spektrálních oblastech se vyskytují pásy mající největší vliv na hlavní komponenty. S rostoucí PC1, roste i pozitivní pás



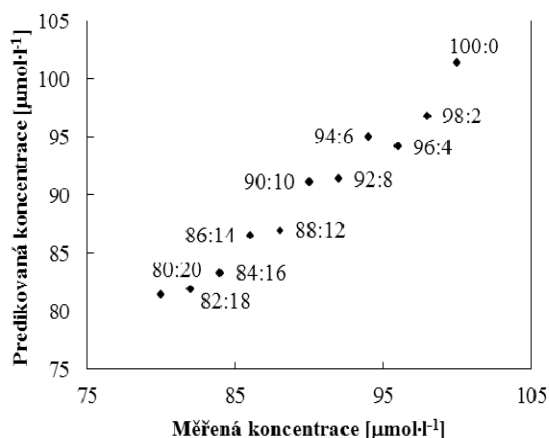
Obr. 3. Spektrální graf komponentních zátěží



Obr. 2. Graf komponentního skóre



Obr. 4. Predikční chyba v závislosti na počtu latentních proměnných v modelu



Obr. 5. Kalibrační graf

Tabulka I
Parametry kalibračního a validačního grafu

Parametr	Kalibrace	Validace
Směrnice	0,970	0,984
Úsek	$2,688 \cdot 10^{-6}$	$1,552 \cdot 10^{-6}$
Korelační koeficient	0,985	0,968

s maximem u 270 nm a nárůst hodnoty PC2 se projevuje růstem pozitivního coupletu v oblasti pod 320 nm.

Kalibrace modelu byla dále provedena metodou PLS. Optimální hodnota predikční chyby (minimum na křivce) je pro tento systém v případě zahrnutí dvou proměnných (obr. 4). Při započítání dalších hlavních komponent chyba modelu narůstala a z tohoto důvodu lze předpokládat, že další latentní proměnné obsahují spíše informaci o šumu v datech.

Výsledkem PLS byl kalibrační (obr. 5) a validační graf dvouvariátního modelu. Parametry získané pro kalibraci i validaci jsou shrnuty v tab. I.

Závěr

Systém obsahující nanočástice stříbra s průměrem 45 nm připravené redukcí dusičnanu stříbrného a cysteinu o různém zastoupení enantiomerních forem byl studován ECD spektroskopií. Byla pozorována indukovaná chiralita nanočástic stříbra, jejíž spektrální projevy jsou citlivé na změnu v enantiomerní čistotě cysteinu navázaného na povrch nanočástic. Měřením ECD signálů uvedeného systému je tudíž možné stanovit enantiomerní přebytek cysteinu v relativně nízkých koncentracích ($1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹). Pro systém byl navržen multivariátní kalibrační model, který je schopen s dobrými parametry predikovat poměrné zastoupení enantiomerů cysteinu D:L od 100:0 do 80:20.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR P206/12/P026.

LITERATURA

- Kirschner D. L., Green T. K.: J. Sep. Sc. 32, 2305 (2009).
- Schmid M. G.: J. Chromatogr., A 1267, 10 (2012).
- Tang M., Zhang J., Zhuang S., Liu W.: TrAC, Trends Anal. Chem. 39, 180 (2012).
- Leung D., Kang S. O., Anslyn E. V: Chem. Soc. Rev. 41, 448 (2012).
- Noguez C., Garzón I. L.: Chem. Soc. Rev. 38, 757 (2009).
- Lim I.-I. S., Mott D., Engelhard M. H., Pan Y., Kamodia S., Luo J., Njoki P. N., Zhou S., Wang L., Zhong C. J.: Anal. Chem. 81, 689 (2009).
- Zhang M., Ye B.: Anal. Chem. 83, 1504 (2011).
- Song L., Wang S., Kotov N. A., Xia Y.: Anal. Chem. 84, 7330 (2012).
- Řezanka P., Záruba K., Král V.: Colloids Surf., A 374, 77 (2011).

VÝVOJ UPLC-ELSD METODY PRO STANOVENÍ POLYSACHARIDU INULINU

ALEŠ KRMEĽA, VERONIKA KRŤKOVÁ
a VĚRA SCHULZOVÁ

Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
krmelaa@vscht.cz

Úvod

Inulin je fruktooligosaharid sloužící jako zásobní látka rostlin čeledi hvězdnicovitých a zvonkovitých. Je tvořen fruktosovým řetězcem zakončeným jednou molekulou glukosy. Jedna molekula polysacharidu inulinu se může skládat až ze sto fruktosových jednotek, nejčastěji však obsahuje dvacet až třicet jednotek¹. Jde o jemný bílý prášek sladké chuti. Lidské tělo nedokáže polysacharid inulin využít, protože není štěpitelný amylasou. V současné době se užívá jako prebiotikum, jelikož je štěpitelný bakteriálními enzymy střevní mikroflóry a je tedy pro mikroflóru dobrým zdrojem energie². Často se polysacharid inulin přidává do potravin pro diabetiky jako náhražka cukru, protože nezvyšuje hladinu cukru v krvi³. Mezi jeho nejbohatší komerční zdroje patří především čekanka a topinambur. Dále se polysacharid inulin nachází v jamech nebo artyčoku, velké množství však najdeme i v cibuli a česneku⁴.

Předkládaná práce se zabývá vývojem metody pro stanovení polysacharidu inulinu. Za účelem monitorování

obsahu polysacharidu inulinu v potravinách byla optimalizována analytická metoda užívající ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s evaporative light scattering detektorem (UPLC-ELSD). Metoda je vyvíjena a testována za pomoci vzorku polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu, poskytnutého v rámci projektu Biorafinace. Součástí vývoje analytické metody je i studium stability polysacharidu inulinu při kyselé hydrolyze.

ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) je detektor pracující na bázi měření rozptylu světla. Hlavní výhodou detektoru je, že jde o detektor univerzální, má vysokou citlivost a umožňuje užití gradientové eluce. Mezi jeho další přednosti patří schopnost detekce látek neobsahující chromofor ani fluorofor, je tedy vhodný i pro sacharidy a oligosacharidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Analyzovaná látka je nejprve unášena mobilní fází do nebulizéru, kde je zmlžena pomocí inertního plynu. Dále pokračuje do evaporační komůrky, kde se mobilní fáze odpaří a odvede do odpadu. Vzniklé kapičky méně těkavého solutu vstupují do optické komůrky, jsou vystaveny proudu světla ze zdroje a dochází k rozptylu. Fotodetektor zaznamenává odezvu, která je přímo úměrná hmotě solutu^{5,6}.

Experimentální část

Separace analytů se provádí pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie (UPLC). Alikvotní podíl vzorku je separován na koloně Acquity BEH AMIDE a detegován

Tabulka I

Pracovní podmínky kapalinové chromatografie

Přístroj	ACQUITY UPLC™, Waters				
Kolona	ACQUITY, BEH AMIDE (50 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters				
Mobilní fáze	A: MeCN : voda s 0,2% triethylaminem* (80 : 20, v/v) B: MeCN : voda s 0,2% triethylaminem* (30 : 70, v/v)				
Gradientová eluce analytů	Čas [min]	Průtok [ml min ⁻¹]	A [%]	B [%]	Curve
	initial	0,2	100	0	initial
	5	0,2	40	60	6
	5,01	0,2	100	0	6
	10	0,2	100	0	1
Doba analýzy 1 vzorku	15 min				
Objem nástřiku	2 μl				
Teplota kolony	35 °C				
Teplota autosampleru	10 °C				

* Triethylamin byl přidán z důvodu zlepšení separace fruktosy a glukosy

Tabulka II
Pracovní podmínky ELSD

ELSD, Waters	Hodnota
Gain	500
Gas	40 Psi
Teplota driftovací trubice	12 °C

pomocí evaporative light scattering detektoru (ELSD). Podmínky kapalinové chromatografie jsou shrnuty v tab. I a pracovní podmínky pro ELSD v tab. II.

Pomocí techniky UPLC–ELSD byla ověřena čistota polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu a provedena identifikace mono- a disacharidů polysacharidu inulinu, kdy k roztoku polysacharidu inulinu (izolovaného z topinamburu) o koncentraci 10 mg ml⁻¹ v 50% acetonitrilu byla přidána směs standardů mono- a disacharidů (fruktosy, glukosy a sacharosy) na hladině 0,1 mg ml⁻¹ 50% acetonitrilu. Ukázka identifikace za využití UPLC-ELSD je na obr. 1.

Pro identifikaci oligosacharidů polysacharidu inulinu byla využita ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií pomocí analyzátoru typu Orbitrap (UPLC-Orbitrap MS). Ionizace byla provedena pomocí elektrospreje v negativním módu. Byly aplikovány optimalizované podmínky kapalinové chromatografie pro ELSD. Pomocí UPLC-Orbitrap MS techniky byly identifikovány prozatím oligosacharidy polysacharidu inulinu s maximálním počtem 6 jednotek monosacharidu fruktosy v řetězci, který je zakončen glukosou. Separace a identifikace oligosacharidů pomocí UPLC-Orbitrap

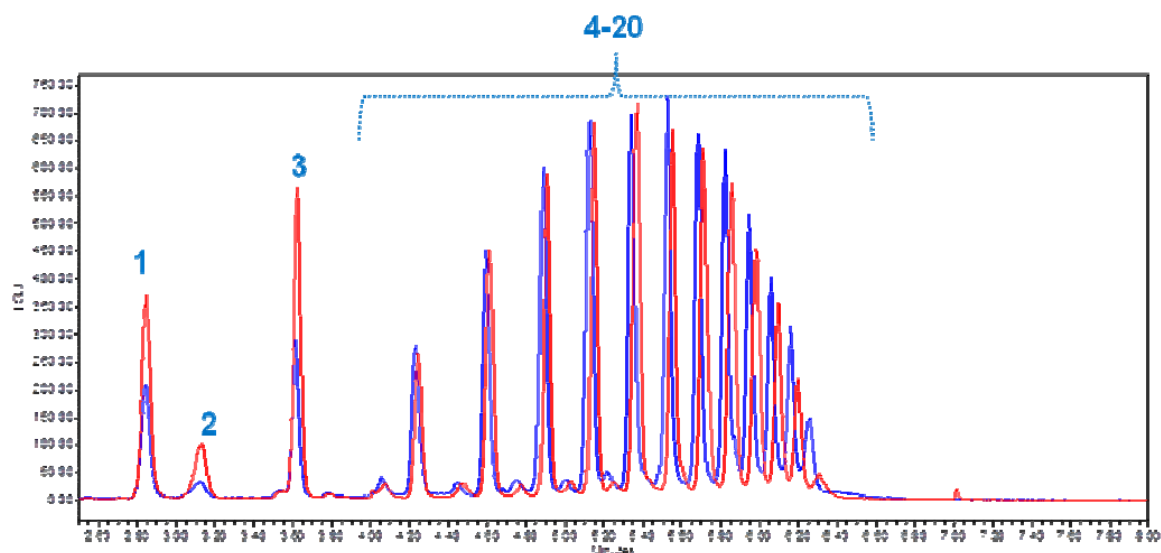
MS je ukázána na obr. 2.

Za účelem zjištění celkového obsahu mono- a disacharidů ve vzorku polysacharidu inulinu a prozkoumání jeho stability byla provedena kyselá hydrolyza (KH) pomocí 0,06 M a 6 M HCl. Při použití 0,06 M HCl dochází k částečnému (kaskádovitému) rozštěpení výše rozvětvených oligosacharidů polysacharidu inulinu (obsahující 6 a více jednotek fruktosy v řetězci) na oligosacharidy s menšími řetězci a částečně jsou přítomné oligosacharidy dále štěpeny na monosacharid fruktosu (nárůst po KH o 5 %) a disacharid sacharosu (nárůst po KH o 0,1 %), v malé míře na monosacharid glukosu. Ukázka chromatogramu vzorku po KH je znázorněn na obr. 3.

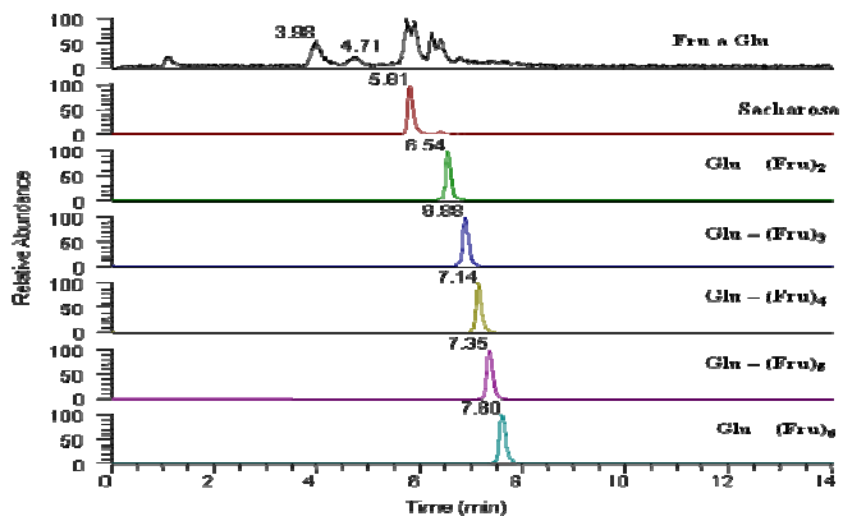
Naopak při kyselené hydrolyze polysacharidu inulinu 6 M HCl dochází k úplnému rozštěpení oligosacharidů na monosacharidy fruktosu (nárůst po KH o 96,5 %) a glukosu (nárůst po KH o 2,3 %). Po přepočtu a srovnání obsahu jednotlivých mono-, di- a oligosacharidů polysacharidu inulinu před a po KH bylo zjištěno, že ve vzorku polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu jsou přítomny oligosacharidy s delšími řetězci, které využitá technika UPLC-ELSD za daných podmínek není schopná detegovat.

Závěr

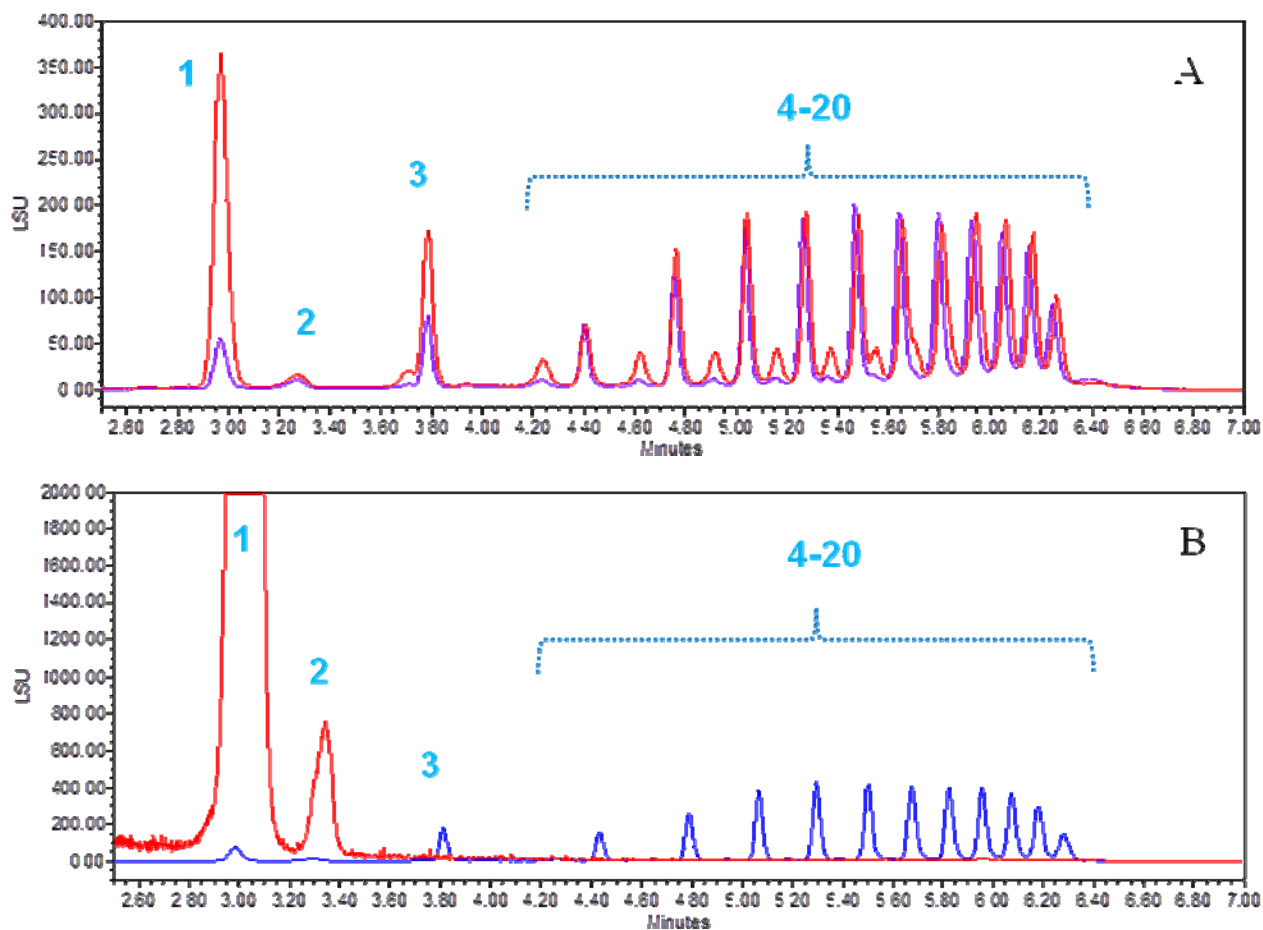
Analytická metoda UPLC-ELSD byla využita k vývoji metody pro stanovení polysacharidu inulinu. Výzkum byl prováděn na vzorku polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu, poskytnutého v rámci projektu Biorafinace. Pomocí ELSD byla úspěšně provedena identifikace mono- a disacharidů (fruktosy, glukosy, sacharosy) poly-



Obr. 1. Ukázka chromatogramu – identifikace mono- a disacharidů (1 – fruktosa, 2 – glukosa, 3 – sacharosa) a oligosacharidů (4–20) polysacharidu inulinu izolovaného z topinamburu, koncentrace 10 mg ml⁻¹ v 50% acetonitrilu



Obr. 2. Ukázky chromatogramů separace oligosacharidů polysacharidu inulinu (izolován z topinamburu) o koncentraci 10 mg ml^{-1} pomocí UPLC-Orbitrap MS



Obr. 3. Ukázka chromatogramu vzorku polysacharidu inulinu před (modře) a po kyselé hydrolyze (červeně) při použití (A) 0,06 M a (B) 6 M HCl; (1 – fruktosa, 2 – glukosa, 3 – sacharosa)

sacharidu inulinu. S využitím UPLC-Orbitrap MS byla uskutečněna identifikace některých oligosacharidů polysacharidu inulinu. Stabilita polysacharidu inulinu byla testována pomocí kyselý hydrolyzy o různé síle kyseliny chlorovodíkové (0,06 M a 6 M HCl).

Na základě dosavadních poznatků budou dále zkoumány možnosti identifikace oligosacharidů polysacharidu inulinu. V budoucím směřování projektu bude dále navržen vhodný způsob kvantifikace polysacharidu inulinu a provedena validace analytické metody.

Autoři děkují Technologické agentuře ČR za finanční podporu v rámci projektu č. TE01020080.

LITERATURA

1. Gonzales-Tomás L., Coll-Marqués J., Costell E.: Food Hydrocolloid. 22, 1372 (2008).
2. de Souza Oliveira R. P., Perego P., de Oliveira M. N., Converti A.: J. Food Eng. 107, 36 (2011).
3. Meyer D., Bayarri S., Tárrega A., Costell E.: Food Hydrocolloid. 25, 1881 (2011).
4. Judprasong K., Tanjor S., Puwastien P., Sungpuag P.: J. Food Compos. Anal. 24, 642 (2011).
5. Liu X., Ai N., Zhang H., Lu M., Ji D., Yu F., Ji J.: Carbohydr. Res. 353, 111 (2012).
6. Yang Z., Hu J., Zhao M.: Carbohydr. Polym. 83, 1997 (2011).

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ TRICLOSANU POMOCÍ SYSTÉMU MĚRNÝCH CEL S INTEGROVANOU UHLÍKOVOU ELEKTRODOU

MILAN LIBÁNSKÝ, JIŘÍ ZIMA, JIŘÍ BAREK
a HANA DEJMKOVÁ

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
milan.libansky@natur.cuni.cz

Úvod

Tato práce je zaměřena na konstrukci systému elektrodových měrných cel s integrovanými kompozitními pracovními elektrodami na bázi uhlíkových filmů a následnou aplikaci pro stanovení triclosanu (TCS) (obr. 1), jakožto environmentálního polutantu. U tohoto systému cel je kladen důraz na nízkou cenu analýzy a co největší mobilitu využitelnou při terénních měřeních.

Triclosan je polychlorovaný difenylether s elektrochemicky oxidovatelnou hydroxylovou skupinou. TCS je používán jako antibakteriální, antifungicidní a biocidní činidlo přidávané do mýdel, zubních past, deodorantů a v neposlední řadě i do spotřebitelských výrobků (ponožky, hračky, ložní prádlo)¹. V roce 2008 americká EPA stanovila maximální povolené koncentrace a limity pro použití TCS². Maximální legislativou povolená hranice v České republice pro TCS v kosmetických výrobcích je 0,3 % (cit.³).

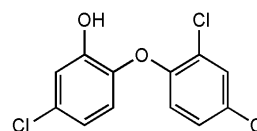
Do přírody se tato látka dostává nejčastěji v odpadních vodách domácností, přičemž následně dochází k rozkladu mikroorganismy za vzniku chlorfenolů a dioxinů^{4,5}. Některé další studie uvádějí, že TCS může ve vodě reagovat s chlorem za vzniku karcinogenních látek,

jako je 2,4-dichlorfenol, chlorfenol, chloroform a řady dalších⁶.

Hydrofobní TCS se u lidí akumuluje především v tukových tkáních, mateřském mléce, krevním séru a vylučuje se močí. V lidském těle je triclosan biodegradován a následně vzniklé sloučeniny mohou na organismus působit karcinogenně, cytotoxicky a také jako endokrinní disruptory⁷. V současném výzkumu je sledováno především působení této látky na vodní organismy a celkový vodní ekosystém, kde byla prokázána větší toxicita a míra působení než u suchozemských organismů.

Ke stanovení triclosanu v laboratorních podmínkách byly vyvinuty různé metody. Mezi nejčastěji používané patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS)^{8,9}, následují spektrální metody¹⁰ a voltametrické metody^{11,12}.

Při elektrochemických stanoveních TCS a všeobecně v environmentální analýze se využívá mnoho druhů pracovních elektrod. Pracovní elektrody mají podobu kovu, vodivého materiálu na bázi uhlíku či směsi jiných materiálů s vhodným pojivem. U těchto elektrod je vyžadováno, aby jejich obnovitelnost povrchu byla co nejsnazší, popřípadě aby elektroda byla na jedno použití. U uhlíkových elektrod tuto podmínku splňuje uhlíková pastová elektroda (směs uhlíku a pastovací kapaliny), kde je nový povrch získán otřením vytlačené části pasty^{13,14}. Dnes je ale již



Obr. 1. Strukturální vzorec triclosanu

Tabulka I

Přehled kombinací materiálů testovaných pro přípravu uhlíkových kompozitních filmových pracovních elektrod

Typ uhlíku w (90 %, 80 %)	Polymer (pojivo) w (10 %, 20 %)	Rozpouštědlo V (0,5 ml)
grafit / skelný	polystyren	dichlorethan / toluen
grafit / skelný	parafin	rozpuštění teplem (100 °C)
grafit / skelný	PMMA	ethylacetát
grafit / skelný	polykarbonát	toluen / aceton / dichlorethan
grafit	polyuretan	aceton / cyklohexan
grafit	chloroprenový kaučuk	aceton / ethylacetát / cyklohexan / toluen / benzin
grafit / skelný	epoxidová pryskyřice	aceton (1 ml)
grafit / skelný	polyvinylchlorid	tetrahydrofuran (1 ml)

běžný i druhý přístup, využívaný zejména u sitotiskových elektrod, kdy uhlíkový inkoust je přímo natištěn na keramické či plastové destičce a díky nízké ceně takovéto elektrodové sady je možné pro každé stanovení použít sadu novou^{15,16}.

Nedávno navržené uhlíkové filmové elektrody spojují vlastnosti předešlých dvou elektrod. Tyto elektrody jsou tvořené uhlíkovým filmem naneseným na běžnou pevnou elektrodu, která zde funguje pouze jako vodič. Obnovení povrchu je prováděno setřením starého a nanesením nového uhlíkového filmu¹⁷.

Kompozitní uhlíkové elektrody představují rovněž směs uhlíku, pojiva a v některých typech kompozitů je přidáváno i těkavé rozpouštědlo. Pojivem není kapalina, ale pevná nevodivá látka (nejčastěji polymer). Po rozpuštění polymeru, smíchání s uhlíkem a odpaření rozpouštědla se získá tuhá elektroda^{18,19}.

Experimentální část

Voltametrická měření hexakynoželeznanu draselného byla prováděna na přístroji Eco-Tribo polarograf (3M KCl, Eco-Trend Plus, Česká republika) ovládaným programem Polar Pro v. 5.1. Voltametrická měření triclosanu byla prováděna na přenosném miniaturizovaném potenciostatu PalmSens (PalmSens, Nizozemí).

Voltametrická měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Jako referenční elektroda byla použita elektroda argentschloridová (ECO-Trend, Česká republika) a pomocnou elektrodou byl platinový drátek. Pracovními elektrodami byly zkonstruované uhlíkové kompozitní filmové elektrody.

Pro výrobu elektrod byly použity dva druhy uhlíku: grafitový prášek CR-2 (Grafit Týn, Česká republika) a skelný uhlík 0,4–12 mikronů (Alfa Aesar, USA). Jako pojivo byly testovány polymery: polystyren (obalový materiál), polymethylmethakrylát (PMMA), polykarbonát (obalový materiál), polyuretan (Chemoprén), chloroprenový kaučuk (Alkaprén 50), epoxidová pryskyřice (Epoxy 512), polyvinylchlorid (obalový materiál) a rovněž parafin. K rozpuštění polymerů byla použita vhodná rozpouštědla čistoty p.a. (viz tab. I).

Zásobní roztok triclosanu ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, USA) o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} byl připraven rozpouštěním příslušného množství dané látky v methanolu (p.a., Merck, Německo). Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smísením dvou základních roztoků. Prvním roztokem byl vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Penta, Česká republika) o koncentraci 0,2 mol dm^{-3} a druhým roztokem

byl směsný roztok kyseliny fosforečné (p.a., 85%, Lachema, Česká republika), kyseliny borité (p.a., Lachema, Česká republika) a kyseliny octové (p.a., 99%, Lachner, Česká republika), každé o koncentraci 0,04 mol dm^{-3} . Jako poslední byl připraven roztok hexakynoželeznanu draselného (p.a., Lachema, Česká republika) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} ve vodném roztoku chloridu draselného (p.a., Lachema, Česká republika) o koncentraci 1 mol dm^{-3} .

Při měření cyklických voltamogramů hexakynoželeznanu draselného byla zvolena rychlost polarizace 100 mV s^{-1} . Při měření diferenčních pulzních voltamogramů (DPV) TCS byly na elektrodu vkládány pulzy o amplitudě 50 mV a šířce 0,1 s, při rychlosti polarizace 20 mV s^{-1} .

Výsledky a diskuse

Optimalizace složení filmové elektrody

Inkoust pro výrobu integrované uhlíkové kompozitní pracovní elektrody byl složen ze tří základních složek, které výrazně ovlivňují vlastnosti vzniklé elektrody. První složkou byl uhlík, fungující jako vodivý člen. Druhou složkou byl polymer, jakožto nevodivé pojivo a třetí složkou bylo těkavé rozpouštědlo zajišťující rozpouštění polymeru.

U vytvořených kompozitních filmových elektrod byla zkoumána: přilnavost k různým materiálům (sklo, polypropylen, teflon, hliníková folie), tvorba prasklin po zaschnutí, doba zasychání elektrodové směsi a elektrický odpor pevné elektrody.

Vzniklé pevné elektrody, kde byl použit grafit, prokázaly po zaschnutí přilnavost ke všem materiálům. Elektrody ze skelného uhlíku neprokázaly přilnavost pouze ke skleněnému povrchu. Problémy s tvorbou prasklin nebyly pozorovány.

Z dalších měření byly některé kombinace materiálů vyloučeny kvůli obtížné přípravě inkoustu či manipulaci s ním – to se týká inkoustů, kde byl použit jako pojivo parafin, epoxid, polyvinylchlorid (dlouhá doba zasychání) a chloropren (špatná rozpustnost chloroprenu). Elektrodový materiál na bázi polyuretanu byl vyloučen vzhledem k vysokému elektrickému odporu.

Zkoumání elektrochemických vlastností pracovní elektrody

Nevyřazené elektrodové směsi byly následně integrovány ve formě kompozitního filmu do měrné polypropyle-

Tabulka II

Rozsah potenciálových oken pracovních elektrod

Typ elektrody	pH 2	pH 7	pH 12
Grafit + polystyren	– 1000 až 1200 mV	– 1000 až 1100 mV	– 800 až 1000 mV
Grafit + polykarbonát	– 1000 až 1100 mV	– 1000 až 1000 mV	– 800 až 1000 mV

nové cely. V těchto celách byly zkoumány elektrochemické vlastnosti, konkrétně opakovatelnost měření, reverzibilita elektrochemické reakce v systému $K_4[Fe(CN)_6]$ v KCl a rozsah potenciálového okna v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru o pH = 2, 7 a 10. Během měření cyklických voltamogramů bylo zjištěno, že směsi, kde byl použit skelný uhlík v kombinaci s libovolným pojivem a grafit s PMMA, neprokazují dostatečnou míru opakovatelnosti výsledků a nízkou reverzibilitu probíhající reakce. Z tohoto důvodu byly tyto kombinace materiálů z dalších měření rovněž vyloučeny. Proměřené rozsahy šířky potenciálového okna zbylých elektrodoých směsí jsou uvedeny v tab. II.

Optimalizace pH prostředí

Vliv pH na chování triclosanu při DPV na integrovaných uhlíkových kompozitních elektrodách v systému měrných cel byl sledován v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 až 12 s methanolem v poměru 90:10 (V/V). Koncentrace zásobního roztoku TCS byla $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Naměřené voltamogramy na jednotlivých elektrodách jsou zobrazené na obr. 2.

Jak bylo zjištěno, TCS poskytuje při všech měřených hodnotách pH dobře vyvinutý pík, jehož poloha se na obou elektrodách se zvyšujícím pH prostředí posouvá směrem k nižším hodnotám potenciálu. V oblasti, kde je triclosan disociován, tedy při pH vyšším než 8, se potenciál píků nemění. Z hlediska výšky píků se chování obou elektrod liší. U polystyrenové elektrody je v oblasti kyselých a neutrálních pH výška píků konstantní; v zásaditém prostředí dochází poté k poklesu výšky píků. U polykarbonátové elektrody se s rostoucí hodnotou pH hodnota proudu píků lineárně zvyšuje až do hodnoty pH 7, kde dochází ke zlomu a následnému klesání. Velikost proudu pozadí

a šumu je konstantní. Po spojení předešlých zjištění bylo jako optimální prostředí pro měření zvoleno pH 7.

Vliv methanolu na pracovní elektrodu

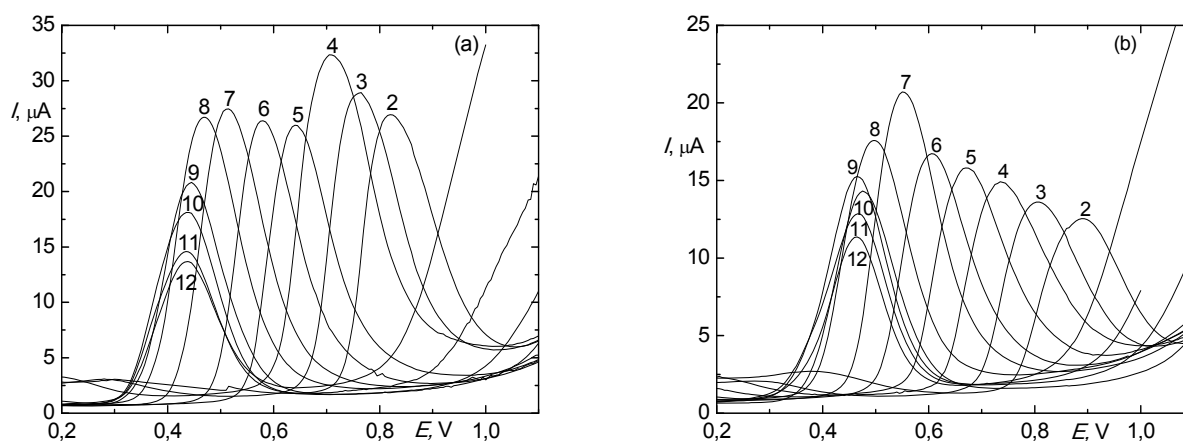
Vliv obsahu methanolu na testované pracovní elektrody byl zkoumán v roztoku TCS o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Obsah methanolu v roztoku se měnil v rozmezí 1 až 50 %. Naměřené voltamogramy získané na obou typech elektrod jsou zobrazeny na obr. 3a,b.

Z výsledků měření je patrné, že až do 20% obsahu methanolu v roztoku o pH 7 lze získat měřitelnou odezvu v podobě vyhodnotitelného signálu. Při vyšším obsahu dochází pravděpodobně k poškození elektrody. Při nižších obsazích methanolu poskytuje nejvyšší odezvu 10% roztok. Pro další měření byl proto zvolen optimální poměr pufru o pH 7 a methanolu 9:1 (V/V).

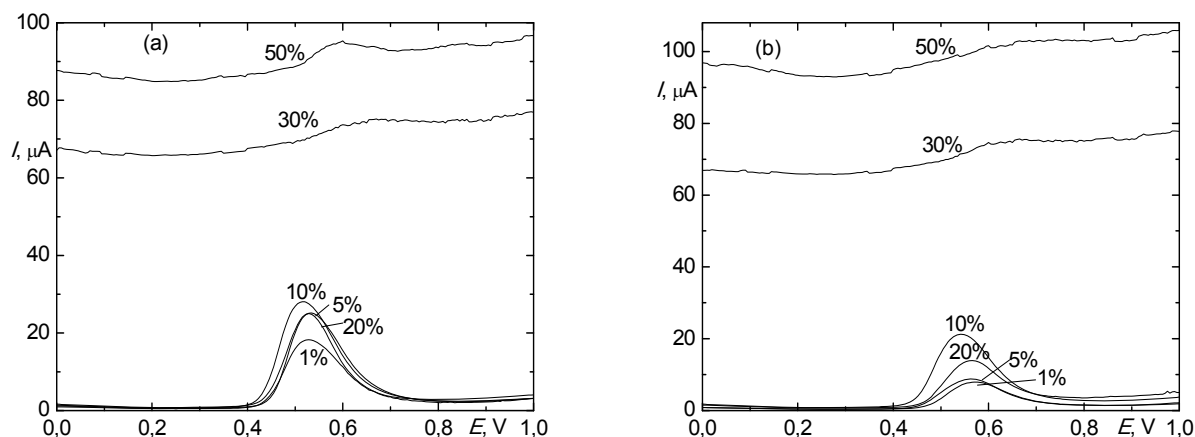
Ověření možnosti akumulace triclosanu

Bylo zkoumáno, jak intenzivní je interakce mezi pracovní elektrodou a roztokem triclosanu a zda tento efekt umožňuje přípravu vzorků do měrné cely před samotným měřením či zda je možnost zvýšit citlivost stanovení pomocí akumulacího kroku.

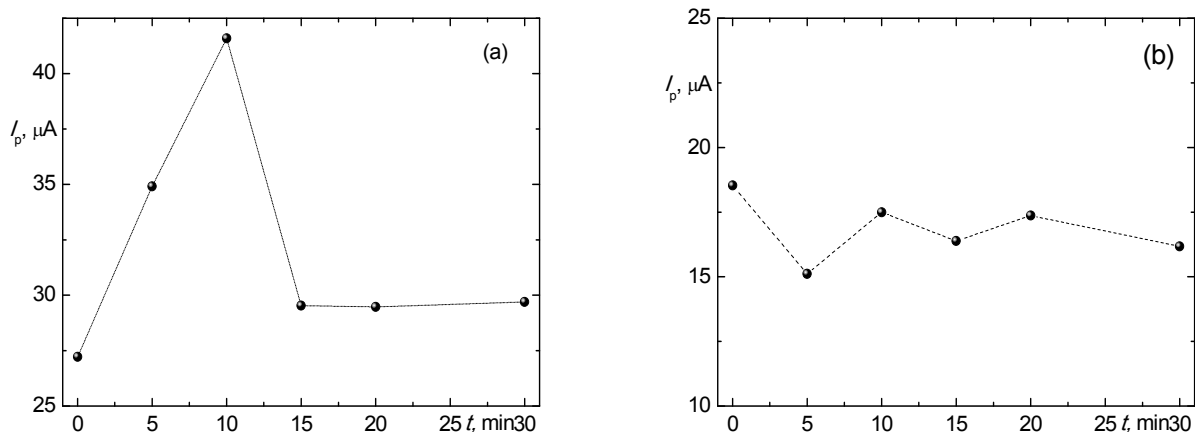
Měření byla prováděna v celách v nemíchaném roztoku triclosanu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} ve zvoleném prostředí o pH 7 při poměru pufru a methanolu 9:1 (V/V). Odezva proudu píku na době akumulace byla měřena v čase 5, 10, 15, 20 a 30 minut (obr. 4). U elektrody na bázi polystyrenu s časem akumulace rostl kontinuálně i proud píku, až do 10 min. Poté došlo k poklesu a proud s časem zůstal neměnný. Tento fakt ukazoval na možnost využití akumulace ke zvýšení citlivosti, ovšem při proměňování koncentrační závislosti bylo zjištěno, že hodnoty



Obr. 2. DP voltamogramy $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} TCS. Měřeno v prostředí BR pufru s methanolem v poměru 90:10 (V/V) o pH odpovídajícímu číslu křivky. (a) filmová elektroda na bázi polystyrenu, (b) filmová elektroda na bázi polykarbonátu



Obr. 3. DP voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ TCS. Měřeno na (a) filmové elektrodě na bázi polystyrenu, (b) filmové elektrodě na bázi polykarbonátu v prostředí BR pufru pH 7 s methanolem, jehož obsah je uveden u jednotlivých křivek



Obr. 4. Graf závislosti proudu píku $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ TCS na době akumulace. Měřeno metodou DPV na (a) elektrodě na bázi polystyrenu, (b) elektrodě na bázi polykarbonátu v prostředí BR pufru o pH 7 s methanolem v poměru 9:1 (V/V)

proudu při akumulaci nejsou lineární funkcí koncentrace TCS. Z tohoto důvodu nebyl pro další měření akumulací krok zařazen. U elektrody na bázi polykarbonátu byly hodnoty proudu píku na době akumulace nezávislé. Hodnoty výšky píku oscilovaly v rozmezí $\pm 1,5 \mu\text{A}$.

Koncentrační závislosti

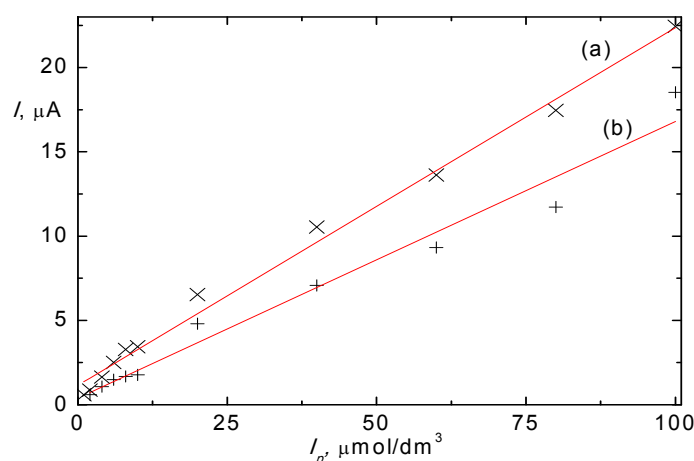
Koncentrační závislosti triclosanu byly proměřeny v rozsahu $1 \cdot 10^{-4}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (polystyren) a $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (polykarbonát) v prostředí BR pufru

o pH 7 s methanolem v poměru 9:1 (V/V). Na obr. 5 jsou uvedeny kalibrační přímky v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních přímek pro stanovení triclosanu pomocí diferenční pulzní voltametrie jsou uvedeny v tab. III. Závislost je v měřeném rozsahu lineární. Opakovatelnost měření byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou $\text{RSD} = 5,8 \%$ (polystyrenová elektroda) a $\text{RSD} = 2,4 \%$ (polykarbonátová elektroda) pro 5 opakovaných měření v nejnižší měřené koncentrační hladině (tab. III).

Tabulka III

Vybrané parametry koncentračních závislostí triclosanu měřené pomocí DPV na pracovních elektrodách s různým typem pojiva v prostředí BR pufr 7 – methanol (9:1, *V/V*)

Typ elektrody	c [mol dm ⁻³]	Směrnice A dm ³ mol ⁻¹	Úsek A · 10 ⁻⁶	R^2	LOD [mol dm ⁻³]	LOQ [mol dm ⁻³]
polystyren	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$	0,21	1,16	0,9927	$0,49 \cdot 10^{-6}$	$1,64 \cdot 10^{-6}$
polykarbonát	$1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$	0,16	0,39	0,9731	$0,25 \cdot 10^{-6}$	$0,85 \cdot 10^{-6}$



Obr. 5. Kalibrační závislost proudu DPV píku na koncentraci roztoku triclosanu v prostředí BR pufru o pH 7 s methanolem v poměru 9:1 (*V/V*). (a) polystyrenová elektroda, (b) polykarbonátová elektroda

Závěr

V této práci byla zkonstruována polypropylenová měrná cela s dvěma typy integrovaných kompozitních elektrod na bázi uhlíkových filmů. Na obou těchto elektrodách bylo prostudováno voltametrické chování systému hexakynoželezitan/hexakynoželeznatan a environmentálního polutantu triclosanu, rozsah potenciálového okna, pH závislosti, vliv obsahu methanolu v roztoku na opakovatelnost výsledků, možnost akumulace na elektrodě a kalibrační závislosti za optimálních podmínek s určením mezí detekce a stanovitelnosti.

Při porovnání naměřených mezí detekce a stanovitelnosti na obou elektrodách s měřeními prováděnými na uhlíkové pastové elektrodě²⁰ bylo zjištěno, že získané hodnoty jsou srovnatelné. V případě stanovení TCS mohou nově zkonstruované elektrody konkurovat konvenčním uhlíkovým pastovým elektrodám.

Dále je možné říci, že integrace elektrod do malé polypropylenové cely poskytuje z hlediska analytické chemie potenciál pro široké komerční použití. Vyvinutá cela, která je primárně zaměřena na terénní měření, poskytuje spolehlivé výsledky prokazující její vhodnost pro tento záměr. Při spojení systému obsahujícího několik desítek

měrných cel zapojených v sérii s přenosným potenciostatem získáváme mobilní měrné zařízení malých rozměrů, které při monitorovacích měřeních nebude zatěžovat životní prostředí, bude vyžadovat malé množství vzorku pro analýzu a zároveň náklady na jednu analýzu se dostanou na téměř zanedbatelnou cenu ve srovnání s komerčně používanými laboratorními přístroji.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857) a Technologickou agenturou ČR (projekt TA01020565).

LITERATURA

1. Dann A. B., Hontela A.: *J. Appl. Toxicol.* 31, 285 (2011).
2. U. S. Environmental Protection Agency, Triclosan - Occupational and Residential Exposure Assessment, Washington, DC, 2008. http://oehha.ca.gov/prop65/public_meetings/052909coms/triclosan/ciba9.pdf, staženo 20.6.2013.
3. Ministerstvo zdravotnictví ČR, 26/2001 Sb. (prosinec 2012) <http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/>

- ZAKONY/2001/026001/Sb_026001_.php, staženo 20.6.2013.
- Singer H., Muller S., Tixier C., Pillonel L.: *Environ. Sci. Technol.* **36**, 4998 (2002).
 - Lee D. G., Zhao F., Rezenom Y. H., Russell D. H., Chu K.-H.: *Water Res.* **46**, 4226 (2012).
 - Rule K. L., Ebbett V. R., Vikesland P. J.: *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3176 (2005).
 - Bedoux G., Roig B., Thomas O., Dupont V., Le Bot B.: *Environ. Sci. Poll. Res.* **19**, 1044 (2012).
 - Shen J. Y., Chang M. S., Yang S.-H., Wu G. J.: *J. Sep. Sci.* **35**, 2544 (2012).
 - Ou X., Hu Y., Zhu B.: *Huanjing Huaxue* **31**, 909 (2012) cf. *Chem. Abstr*157:336841.
 - Du L., Li M., Jin Y.: *Pharmazie* **66**, 740 (2011).
 - Fotouhi L., Shahbaazi H. R., Fatehi A., Heravi M. M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **5**, 1390 (2010).
 - Safavi A., Maleki N., Shahbaazi H. R.: *Anal. Chim. Acta* **494**, 225 (2003).
 - Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**, 311 (2001).
 - Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 204 (2009).
 - Renedo O. D., Alonso-Lomillo M. A., Martínez M. J. A.: *Talanta* **73**, 202 (2007).
 - Falciola L., Pifferi V., Mascheroni E.: *Electroanalysis* **24**, 767 (2012).
 - Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: *Electroanalysis* **18**, 1126 (2006).
 - Navratil T., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem* **39**, 131 (2009).
 - Navratil T.: *Curr. Org. Chem.* **15**, 2996 (2011).
 - Malá P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012.

SEPARÁCIA ENANTIOMÉROV NEDERIVATIZOVANÝCH AMINOKYSELÍN METÓDOU HPLC

JAKUB MORAVČÍK a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
moravcikjakub@gmail.com

Úvod

Aminokyseliny predstavujú veľmi dôležitú skupinu látok, ktoré sú prítomné v živých organizmoch. Tieto zlúčeniny majú významné postavenie v metabolizme a zároveň plnia funkciu základných stavebných zložiek peptidov a proteínov. Bielkoviny pozostávajú z α -aminokyselín, ktoré sú rovnako ako ďalšie biologicky aktívne látky tvorené chirálnymi molekulami¹. Keďže chiralitu možno považovať za základnú vlastnosť živej hmoty, stereoselektívne pôsobenie opticky aktívnych zlúčenín sa v podstatnej miere študuje už viac ako polstoročie. Najväčší význam odlišného správania sa enantiomérov sa pozoruje u liečiv. Štúdium chiralít sa v súčasnosti dostáva do veľkej pozornosti aj v priemysle agrochemikálií a pri stanovení enantiomérového zastúpenia jednotlivých

zložiek potravín². V tejto problematike zohrávajú dôležitú úlohu chromatografické a elektromigračné metódy. Okrem ich využitia pri chirálnych separáciách sa často aplikujú pri skúmaní interakcií optických izomérov s inými chirálnymi alebo nechirálnymi molekulami. Tieto metódy sa tiež uplatňujú pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze opticky aktívnych látok v rôznych matriciach³.

Predkladaná práca sa zaoberá separáciou enantiomérov nederivatizovaných aminokyselín. Enantioseparácie boli realizované metódou chirálnej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s využitím chirálnych stacionárnych fáz (CSF) na báze derivátov cyklofruktánu (izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 a *R*-naftyletylkarbamát cyklofruktánu 6).

Experimentálna časť

Separácie enantiomérov aminokyselín boli realizované kvapalinovým chromatografom pozostávajúcim z vysokotlakového čerpadla Delta Chrom SDS 15S, dávkovacieho ventilu Rheodyne (objem slučky 20 μ l), chromatografickej kolóny IP-CF6 (250 \times 4,6 mm I.D., 5 μ m), chirálnym selektorom bol izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 a kolóny RN-CF6 (250 \times 4,6 mm I.D., 5 μ m), chirálnym

Tabuľka I

Hodnoty retenčných faktorov a rozlišovacích faktorov vybraných racemických zmesí nederivatizovaných aminokyselín použitím IP-CF6 CSF pre rôzne zloženia mobilnej fázy. Chromatografické podmienky: stacionárna fáza IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín, detekcia UV (λ_{\max} = 210 nm), prietok mobilnej fázy 0,8 ml min⁻¹, dávkovaný objem 20 μ l, teplota kolóny 23 °C

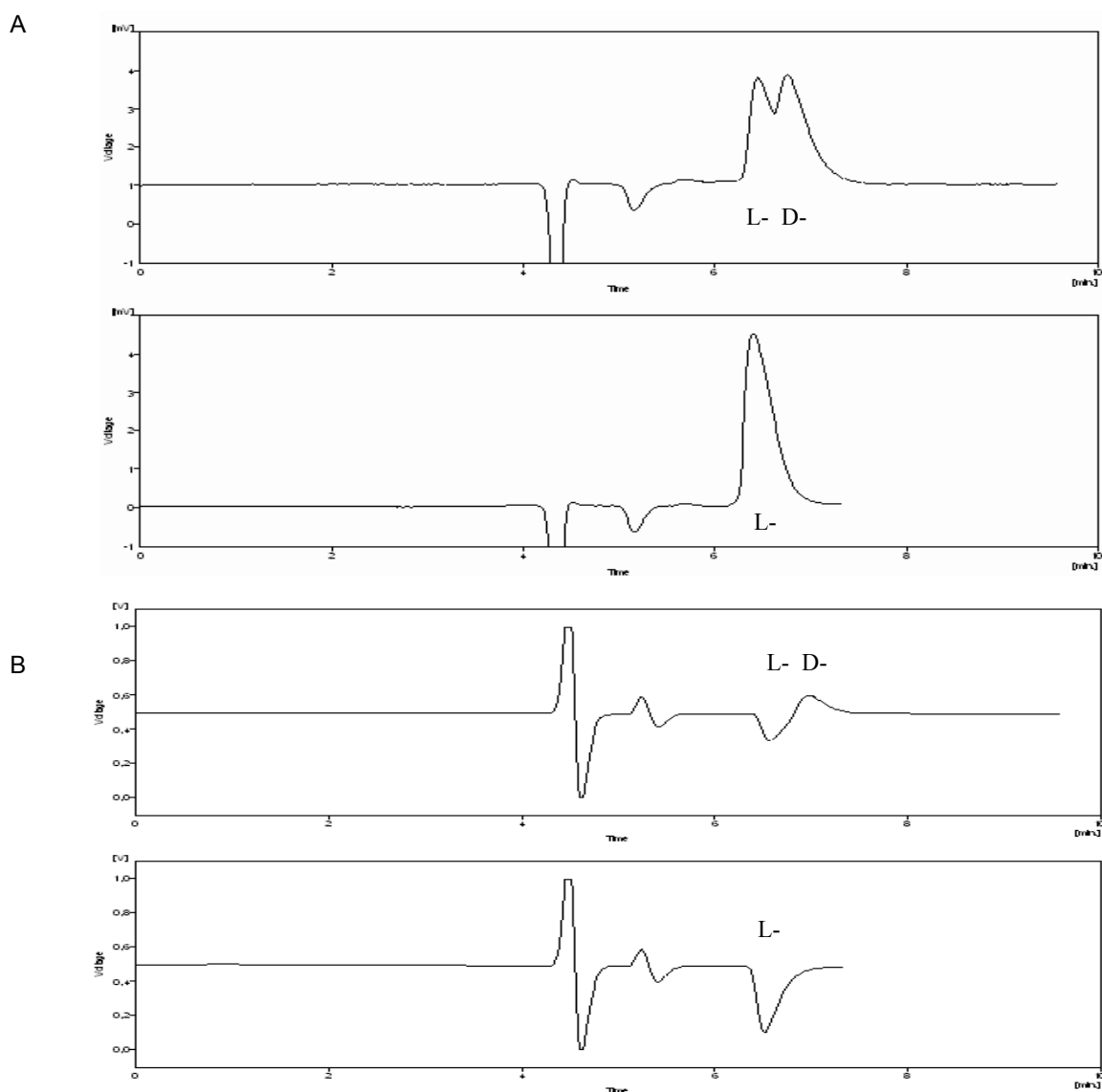
Látka	MEOH/MeCN/HAc/TEA (v/v/v/v)											
	50/50/0,3/0,2			65/35/0,3/0,2			75/25/0,3/0,2			85/15/0,3/0,2		
	k ₁	k ₂	R _{ij}	k ₁	k ₂	R _{ij}	k ₁	k ₂	R _{ij}	k ₁	k ₂	R _{ij}
D,L-Phe	0,91	1,03	0,49	0,48	0,54	0,39	0,27	0,35	0,36	0,25	0,32	0,35
D,L-Met	0,87	0,98	0,58	0,69	0,77	0,49	0,48	0,56	0,46	0,43	0,50	0,41
D,L-Trp	0,88	0,98	0,56	0,47	0,52	0,42	0,25	0,31	0,30	0,23	0,29	0,30
D,L-AABA	–	–	–	0,46	0,52	0,67	0,50	0,56	0,54	0,43	0,48	0,54
D,L-Nle	–	–	–	–	–	–	0,36	0,42	0,86	0,35	0,41	0,70
D,L-Leu	0,24	0,37	0,69	0,48	0,55	0,74	0,32	0,41	1,13	0,28	0,34	1,22
D,L-Ala	0,47	–	–	0,78	0,84	0,72	0,80	0,87	0,68	0,73	–	–
D,L-Val	–	–	–	–	–	–	0,32	0,36	0,54	0,29	–	–
t _M (min)	4,09			4,11			4,66			4,50		

Význam jednotlivých skratiek: D,L – Phe = D,L-fenylalanín; D,L – Met = D,L-metionín; D,L – Trp = D,L-tryptofán; D,L – AABA = kyselina D,L-aminomaslová; D,L – Nle = D,L-norleucín; D,L – Leu = D,L-leucín; D,L – Ala = D,L-alanín; D,L – Val = D,L-valín

Tabuľka II

Hodnoty retenčných faktorov a rozlíšenia vybraných racemických zmesí analytov pri rôznych teplotách kolóny. Chromatografické podmienky: stacionárna fáza IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v), detekcia UV ($\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$), prietok mobilnej fázy $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, teplota kolóny $5\text{--}40 \text{ }^\circ\text{C}$

Látka t ($^\circ\text{C}$)	D,L-AABA			D,L-Phe		
	k_1	k_2	R_{ij}	k_1	k_2	R_{ij}
5	0,82	0,88	1,02	0,45	0,54	1,21
10	0,80	0,86	0,77	0,80	0,86	0,77
20	0,66	0,71	0,70	0,39	0,44	0,57
30	0,57	0,61	0,63	0,35	0,38	0,60
40	0,54	0,57	0,57	0,33	0,35	0,46



Obr. 1. Chromatografický záznam separácie racemátu a L-formy metionínu získaný pomocou spektrofotometrického (A) a polarimetrického (B) detektora; Chromatografické podmienky: stacionárna fáza IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (85/15/0,3/0,2, v/v/v/v), detekcia UV ($\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$), polarimetrická, prietok mobilnej fázy $0,8 \text{ ml min}^{-1}$; dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, teplota kolóny $0 \text{ }^\circ\text{C}$

selektorom bol *R*-naftyletylkarbamát cyklofruktánu 6, a termostatu kolón Incos LCT 5100. Na detekciu eluovaných látok sa použil spektrofotometrický detektor (Knauer) (chromatogramy boli zaznamenané pri vlnovej dĺžke $\lambda_{\max} = 210$ nm) a polarimetrický detektor (Chiralyser IBZ Messtechnik) v on-line zapojení, čo umožnilo sledovať a kontrolovať poradie enantiomérov. Separácie boli uskutočnené v polárno-organickom móde, pričom mobilnou fázou bola zmes metanolu a acetonitrilu s prídavkom kyseliny octovej a trietylamínu v rôznom pomere.

Výsledky

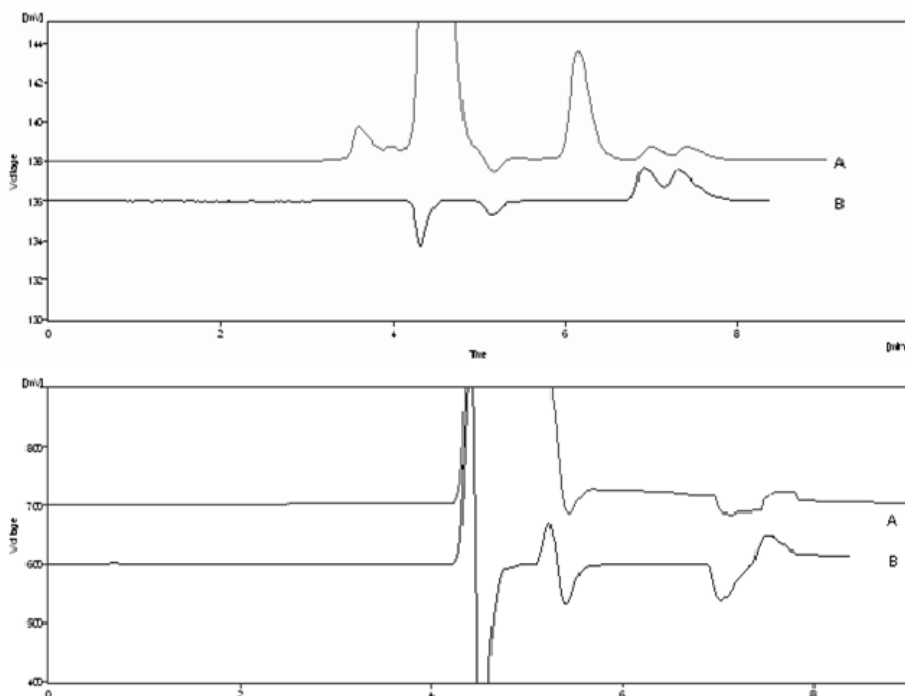
Na enantioseparácie jednotlivých látok nevlplyva iba typ použitej chromatografickej kolóny, ale aj zloženie mobilnej fázy. Jedným z experimentálnych cieľov bolo testovanie rôznych koncentrácií metanolu (obj.% v eluente. Najúčinnnejšia separácia študovanej skupiny analytov sa dosiahla použitím CSF s chirálnym selektorom na báze izopropylkarbamátu cyklofruktánu 6 (IP-CF6) a mobilnej fázy zloženia metanol /acetonitril/kyselina octová/trietylamín (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v). Hodnoty rozlišovacieho faktora pri tomto zložení eluentu boli v intervale 0,30–1,13. Najvyššie hodnoty rozlišovacieho faktora boli síce dosiahnuté pri mobilnej fáze metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (50/50/0,3/0,2, v/v/v/v), avšak použitím eluentu tohto zloženia sa separovali

enantioméry iba niektorých aminokyselín. Tabuľka I sumarizuje výsledky získané testovaním jednotlivých mobilných fáz.

Ďalším dôležitým parametrom, ktorý vplyva na retenciu a separáciu optických izomérov je teplota kolóny. Štúdium vplyvu teploty bolo uskutočnené v rozsahu od 5 °C do 40 °C. V tabuľke II sú uvedené hodnoty retenčných a rozlišovacích faktorov vybraných analytov (racemáty kyseliny aminomaslovej a fenylalanínu) pri rôznych teplotách kolóny. Z uvedených výsledkov vyplýva, že s rastúcou teplotou kolóny klesala retencia separovaných enantiomérov. Najvyššie hodnoty rozlíšenia sa dosiahli pri teplote 5 °C.

Významným faktorom pri chirálnych separáciách je elučné poradie enantiomérov, ktoré sa určilo porovnaním elučných charakteristík enantiomérnych foriem v racemáte a L-formy študovaných aminokyselín. Pri všetkých látkach eluoval z kolóny ako prvý v poradí L-enantiomér (nižšia hodnota retenčného faktora). Chromatografické záznamy separácie racemátu a L-formy metionínu získané pomocou spektrofotometrického a polarimetrického detektora sú znázornené na obr. 1.

Vhodné podmienky pre chirálnu HPLC separáciu aminokyselín (stacionárna fáza IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v) sa použili na analýzu D,L-metionínu v reálnej vzorke výživového doplnku. Na obr. 2 sú znázornené chromatografické záznamy vzorky a D,L-metionínu. Na základe porov-



Obr. 2. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov metionínu v reálnej vzorke (A) a D,L-metionínu (B); Chromatografické podmienky: stacionárna fáza IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v), detekcia UV ($\lambda_{\max} = 210$ nm) a polarimetrická, prietok mobilnej fázy $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$, teplota kolóny $0 \text{ }^\circ\text{C}$

vania elučných charakteristík sa vo vzorke dá predpokladať prítomnosť racemátu metionínu, ktorá je deklarovaná aj výrobcom. Hmotnostná koncentrácia L- a D-enantiomérovej formy metionínu bola 4,1 µg v 1 g prípravku (RSD ≤ 5 %, $n = 3$). Medza detekcie a medza stanoviteľnosti metódy so spektrofotometrickou detekciou boli pre metionín 0,5 a 1,5 µg ml⁻¹. Kalibračná čiara (závislosť plochy píku od koncentrácie metionínu) bola lineárna v rozsahu koncentrácií 1,5–10 µg ml⁻¹.

Záver

Na štúdium enantioseparácií nederivatizovaných aminokyselín sa použila metóda chirálnej HPLC s využitím cyklofruktánového chirálneho selektora (IP-CF6) v polárno-organickom separačnom móde. Najvhodnejšou mobilnou fázou bola zmes metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v). Na kontinuálne sledo-

vane elučného poradia enantiomérov sa využila spektrofotometrická a polarimetrická detekcia v on-line zapojení. Vhodné podmienky pre chirálne HPLC separácie študovaných aminokyselín boli aplikované na separáciu enantiomérov racemickej zmesi D,L-metionínu v reálnej vzorke.

Autori ďakujú za podporu grantu č. 1/0164/11 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Škárka B., Ferenčík M.: *Biochémiá*, 3. vydanie, Alfa, Bratislava 1992.
2. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
3. Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Péter A.: *J. Pharmaceut. Biomed.* 69, 28 (2012).

STANOVENÍ KONSTANT STABILITY KOMPLEXŮ β -CYKLODEXTRINU A ENANTIOMERŮ TRÖGEROVY BÁZE

HELENA RYŠAVÁ, PAVEL ŘEZANKA
a VLADIMÍR KRÁL

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

Úvod

Cyklický oligosacharid složený ze sedmi α -D-glukopyranosových jednotek se nazývá β -cyklohextrin (β -CD) a je vhodným hostitelem pro vznik pevných inkluzních komplexů s řadou sloučenin, především organických látek lipofilního charakteru^{1,2}. Mezi příhodné hosty patří například Trögerova báze (TB), název dle IUPAC (\pm)-2,8-dimethyl-6*H*,12*H*-5,11-methanodibenzo[*b*,*f*][1,5] diazocin, či její deriváty, které představují velký potenciál v supramolekulární chemii^{3,4}, neboť jsou díky tvorbě rigidních chirálních struktur schopny specificky interagovat s řadou analytů. Nejčastější poměr hostitel:host je 1:1 (cit.¹). Sílu interakce hosta s hostitelem ve vzniklém komplexu lze číselně vyjádřit konstantou stability. Tuto konstantu lze určit mnoha analytickými technikami⁵⁻⁷.

Předkládaná práce prezentuje stanovení podmíněných konstant stability komplexů β -cyklohextrinu s enantiomery Trögerovy báze ve vodném prostředí při různém pH pomocí kapilární elektroforézy (CE), nukleární magnetické rezonance (NMR), elektronové spektroskopie cirkulárního dichroismu (ECD) a molekulové absorpční spektroskopie v ultrafialové oblasti (UV).

Experimentální část

Analýza vzorku 1 mmol l⁻¹ TB kapilární elektroforézou byla prováděna na přístroji Agilent G1600A (Agilent Technologie, Švýcarsko) vybaveným zařízením Agilent interface 35900E, zaznamenávaná vlnová délka byla 207 nm, napětí vložené na kapiláru při elektroforéze bylo 20 kV. Použitá křemenná kapilára měla vnitřní průměr 75 μ m a efektivní délku 50 cm. Analýza vzorku TB byla provedena za použití elektrolytů o pH 2,5 (20 mmol l⁻¹ fosfátový pufr) v koncentračním rozsahu $c(\beta$ -CD) = 0, 3, 6, 9, 12 a 15 mmol l⁻¹. Měření byla dvakrát opakována.

NMR analýza byla prováděna na NMR spektrometru Mercury Plus 300 (Varian, USA). Vzorky obou enantiomerů TB, (\pm)-TB, o koncentracích 1 mmol l⁻¹ byly titrovány roztokem 14 mmol l⁻¹ β -CD o pH 2,5, 7, 11 (20 mmol l⁻¹ deuterovaný fosfátový pufr) a bez úpravy pH. Koncentrace (\pm)-TB v titračním činidle byla rovna koncentraci (\pm)-TB

v titrovaných roztocích, aby nedocházelo k ředění systému během titrace. Objemy celkem deseti titračních přídavek byly zvoleny tak, že rozmezí ekvivalentů β -CD ku (\pm)-TB bylo 0 až 6,7. Měření byla jednou opakována. UV spektroskopická měření byla prováděna na přístroji CARY 50 (Varian, USA), ECD spektroskopická měření byla prováděna na přístroji pro měření cirkulárního dichroismu J-810 (Jasco, Japonsko) na Ústavu fyziky a měřicí techniky VŠCHT Praha. Měření byla prováděna v kvetě s délkou kvetového prostoru 1 cm v rozsahu 220 až 420 nm s krokem 1 nm. Analyty (\pm)-TB o koncentracích 0,5 mmol l⁻¹ byly titrovány roztokem 14 mmol l⁻¹ β -CD o pH 2,5 (mmol l⁻¹ fosfátový pufr) a bez úpravy pH, koncentrace (\pm)-TB v titračním činidle byla rovna koncentraci (\pm)-TB v titrovaných roztocích, aby nedocházelo k ředění systému během titrace. Bylo provedeno deset titračních přídavek v rozmezí 0 až 9,3 ekvivalentů β -CD ku (\pm)-TB. Měření byla prováděna jednou.

Za předpokladu vzniku komplexu TB s β -CD v poměru 1:1 může být k vypočtení podmíněné konstanty stability komplexu využito změn elektroforetických mobilit, které jsou způsobeny přídatkem CD do elektrolytu při provádění kapilární elektroforézy, dále změn chemických posunů sledovaných při NMR, změn absorpčních sledovaných při UV spektroskopii či změn elipticit sledovaných při ECD spektroskopii. Poslední tři jmenované změny jsou způsobeny přídatkem β -CD do analytu během titrace.

Metody pro výpočet podmíněných konstant stability pro komplexy β -CD a enantiomerů TB jsou popsány v literatuře^{7,8}.

Podmíněná konstanta stability je popsána rovnicí (1):

$$K = [C] / [G] \times [H] \quad (1)$$

kde K představuje podmíněnou konstantu stability komplexu, $[C]$ je koncentrace komplexu, $[G]$ a $[H]$ jsou koncentrace volné TB, resp. volného β -CD.

Vliv přídatku CD v analytu při měření pomocí NMR, UV a ECD spektroskopie je popsán rovnicí (2):

$$x_{\text{teor}} = \frac{x_0}{c_G} (c_G - [C]) + x_c \frac{[C]}{c_G} \quad (2)$$

kde x_{teor} představuje teoretickou hodnotu sledované veličiny (chemický posun (NMR), absorpance (UV) nebo elipticita (ECD)), x_0 je hodnota sledované veličiny bez přídatku β -CD, c_G je celková koncentrace TB, x_c je hodnota sledované veličiny pro komplex TB s β -CD, $[C]$ je koncentrace komplexu TB s β -CD.

Využitím rovnic pro látkové bilance a dosazením $[C]$ z rovnice (1) do rovnice (2) lze získat x_{teor} pro každý krok titrace. Závisle proměnné K , x_c a jejich nejistoty byly spočítány nelineární regresí programem Statgraphics Plus. Nezávisle proměnné byly x_{teor} a x_{exp} (experimentálně zjiště-

né hodnoty sledované veličiny pro každý krok titrace).

Vliv přítomnosti CD v elektrolytu při měření kapilární elektroforézou lze popsat s využitím rovnováhy 1:1, rovnice pro hmotnostní bilanci a převedením všech mobilit na elektroforetickou mobilitu volné TB ($\mu_{ep,f}$). K odhadnutí podmíněné konstanty stability (K) a mobility plně vázaného komplexu ($\mu_{ep,C}$) byly použity hodnoty získané při analýzách s konstantní koncentrací TB (v tomto případě 1 mmol l^{-1}) a měnící se koncentrací CD (v tomto případě $3\text{--}15 \text{ mmol l}^{-1}$). K tomuto byla využita linearizovaná rovnice (3):

$$\frac{1}{\mu_{ep}^L - \mu_{ep,f}} = \frac{1}{(\mu_{ep,C} - \mu_{ep,f})K[H]} + \frac{1}{\mu_{ep,C} - \mu_{ep,f}} \quad (3)$$

kde μ_{ep}^L představuje experimentálně získanou hodnotu elektroforetické mobility TB za přítomnosti CD v elektrolytu, $\mu_{ep,f}$ a $\mu_{ep,C}$ je elektroforetická mobilita volné TB, resp. plně vázané TB v komplexu. Elektroforetickou mobilitu TB s nulovou koncentrací CD $\mu_{ep,f}$ a v přítomnosti určité koncentrace CD, μ_{ep}^L , lze získat z elektroferogramů.

Jelikož byl CD v roztoku v nadbytku, lze předpokládat platnost rovnice (4):

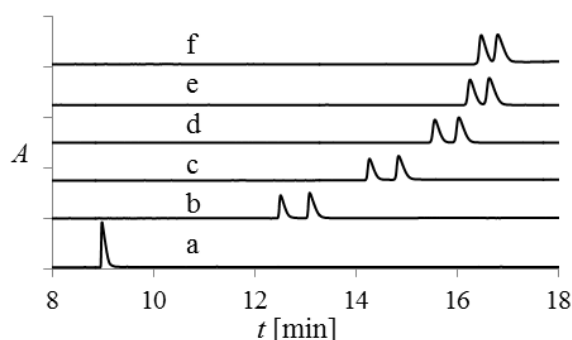
$$[H] = c_H - [C] \cong c_H \quad (4)$$

kde c_H je celková koncentrace CD v roztoku (volného i vázaného).

Rovnice 3 byla použita pro výpočet podmíněných konstant stability programem Microsoft Excel.

Výsledky a diskuse

Elektroferogramy analýz kapilární elektroforézou jsou uvedeny na obr. 1. Stanovení podmíněných konstant stability komplexu β -CD a obou enantiomerů TB pomocí kapilární elektroforézy proběhlo na základě analýz při pH 2,5. V neutrálním či zásaditém prostředí nedochází k protonaci TB nutné pro úspěšnou enantioseparaci. Minimální koncentrace selektoru (3 mmol l^{-1}) byla zvolena tak, aby byla získána dostatečná separace pro odečet elektroforetických dat. Maximální koncentrace (15 mmol l^{-1}) byla omezena rozpustností β -CD. Pro výpočet podmíněných konstant stabilit byly získané elektroforetické mobility vztaheny k elektroosmotickému toku příslušného systému. Jako marker elektroosmotického toku byl zvolen dimethylsulfoxid (DMSO). Elektroforetické mobility získané v analýzách byly vztaheny rovněž k elektroforetickým mobilitám jednotlivých enantiomerů TB v systému bez přítomnosti selektoru. Stanovení podmíněných konstant stability komplexu β -CD a obou enantiomerů TB pomocí NMR proběhlo na základě analýz při pH 2,5, 7 a 11 a bez úpravy pH. Obsah β -CD vzrůstal v průběhu titrace od 0 do 6,7 ekvivalentů (\pm)-TB. Výřez NMR spektra je na obr. 2. Ukázka UV spekter titrací enantiomeru ($-$)-TB

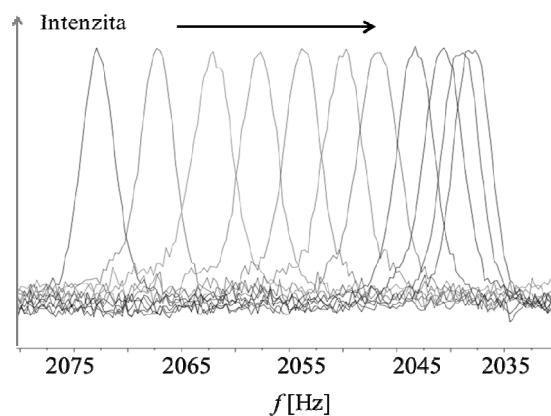


Obr. 1. **Elektroferogram** – závislost absorbance na čase při vlnové délce 207 nm při separaci 1 mmol l^{-1} roztoku analytu TB kapilární elektroforézou. Koncentrace β -CD v elektrolytu byla a: 0 mmol l^{-1} , b: 3 mmol l^{-1} , c: 6 mmol l^{-1} , d: 9 mmol l^{-1} , e: 12 mmol l^{-1} , f: 15 mmol l^{-1} , vše ve fosfátovém pufru ($c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 2,5). Použitá křemenná kapilára měla vnitřní průměr $75 \mu\text{m}$ a efektivní délku 50 cm. Napětí vkládané na kapiláru bylo 20 kV

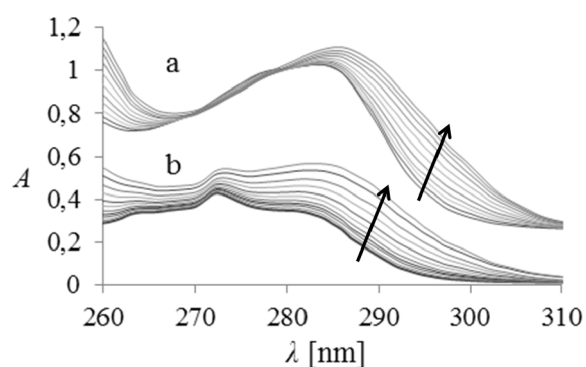
β -cyklodextrinem je na obr. 3, ukázka ECD spekter titrací obou enantiomerů TB β -cyklodextrinem je na obr. 4. Stanovení podmíněných konstant stability komplexu β -CD a obou enantiomerů TB pomocí UV a ECD spektroskopie proběhlo na základě analýz při pH 2,5 a bez úpravy pH. Obsah β -CD vzrůstal v průběhu titrace od 0 do 9,3 ekvivalentů (\pm)-TB.

Vypočítané podmíněné konstanty stability pro komplexy β -CD s enantiomery TB jsou uvedeny v tabulce I.

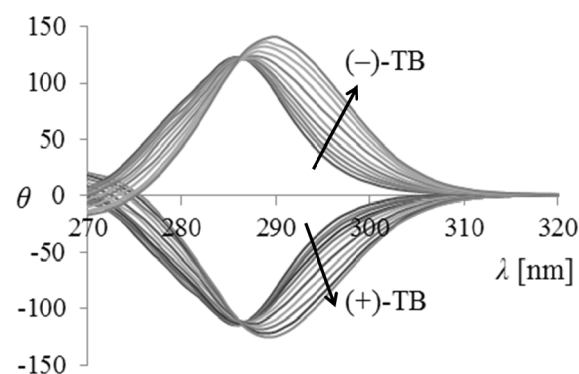
Výsledky podmíněných konstant stability získané různými metodami při stejném pH byly podrobeny statistickým testům hypotézy o rovnosti středních hodnot.



Obr. 2. **Výřez NMR spektra** – směr posunu sledovaného NMR signálu při titraci 1 mmol l^{-1} ($-$)-TB β -cyklodextrinem bez úpravy pH. Obsah β -cyklodextrinu po titračních krocích byl postupně 0,3, 0,5, 0,8, 1,1, 1,5, 2,1, 3,0, 4,2, 5,3 a 6,7 ekvivalentů ($-$)-TB



Obr. 3. UV spektra – závislost absorbance na vlnové délce při titraci $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ roztoku (-)-TB titračním činidlem o koncentraci 14 mmol l^{-1} β -cyklodextrinu a $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (-)-TB. Prostředí titrace byla následující: a: DMSO/voda bez úpravy pH, b: 20 mmol l^{-1} fosfátový pufr o pH 2,5. Obsah β -cyklodextrinu po titračních krocích byl postupně 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,1, 1,8, 2,7, 4,2, 6,5 a 9,3 ekvivalentů (-)-TB



Obr. 4. ECD spektra – závislost elipticity na vlnové délce při titraci $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ roztoků (\pm)-TB titračním činidlem o koncentraci 14 mmol l^{-1} β -cyklodextrinu a $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (\pm)-TB v roztoku DMSO a vody. Obsah β -cyklodextrinu po titračních krocích byl postupně 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,1, 1,8, 2,7, 4,2, 6,5 a 9,3 ekvivalentů (\pm)-TB

Tabulka I

Podmíněné konstanty stability (\pm)-TB s β -CD ($K_{(\pm)\text{-TB}}$) spolu s 95% intervalem spolehlivosti získané zvolenými analytickými metodami za různých podmínek

Podmínky		CE	NMR	UV	ECD
pH 2,5	$K(+)$ -TB	369 ± 13	176 ± 31	424 ± 54	395 ± 104
	$K(-)$ -TB	480 ± 17	204 ± 21	534 ± 135	844 ± 89
bez úpravy pH	$K(+)$ -TB	–	1051 ± 170	843 ± 184	1185 ± 171
	$K(-)$ -TB	–	1501 ± 170	860 ± 173	1457 ± 182
pH 7	$K(+)$ -TB	–	1069 ± 93	–	–
	$K(-)$ -TB	–	1268 ± 130	–	–
pH 11	$K(+)$ -TB	–	1331 ± 239	–	–
	$K(-)$ -TB	–	1891 ± 415	–	–

Na hladině významnosti 5 % lze za stejné označit podmíněné konstanty stability komplexu β -CD s (+)-TB zjištěné pomocí kapilární elektroforézy a ECD spektroskopii, na stejné hladině významnosti jsou mezi sebou srovnatelné výsledky zjištěné pomocí UV a ECD spektroskopie, rovněž pro komplex β -CD s (+)-TB. Ovšem bez úpravy pH jsou výsledky získané pomocí UV a ECD spektroskopie odlišné, a to jak od sebe navzájem, tak od výsledků získaných pomocí NMR nebo CE. V neutrálním a zásaditém prostředí jsou podmíněné konstanty stability stanovené pomocí NMR zhruba osminásobné než podmíněné konstanty stability při pH 2,5. Na hladině významnosti 5 % lze za stejné označit hodnoty podmíněných konstant stability komplexu β -CD s (+)-TB při pH 7 a bez úpravy pH rovněž získané pomocí NMR. Výsledky získané všemi

metodami shodně určují, že stabilita komplexu β -CD s (-)-TB je vyšší než stabilita komplexu β -CD s (+)-TB.

Jedním z důvodů, proč metody neposkytují shodné výsledky, je pravděpodobně závislost podmíněných konstant stability na teplotě. Navíc kapilární elektroforézou a spektroskopickými metodami byly zaznamenávány změny odezvy celého sledovaného systému, zatímco pomocí NMR byly zaznamenávány pouze změny chemického okolí sledovaného signálu jádra vodíku. Zjištěné hodnoty podmíněných konstant stability se pohybují v řádech 10^2 až 10^3 , což odpovídá hodnotám podmíněných konstant stability komplexů β -cyklodextrinu s jinými analyticky významnými látkami⁷.

Závěr

Pomocí kapilární elektroforézy, nukleární magnetické rezonance, elektronové spektroskopie cirkulárního dichroismu a molekulové absorpční spektroskopie v ultrafialové oblasti byly stanoveny podmíněné konstanty stability komplexů β -cyklodextrinu s enantiomery Trögerovy báze ve vodném prostředí při různém pH. Stabilita komplexu β -CD s (-)-TB je vyšší než stabilita komplexu β -CD s (+)-TB, jak ukazují výsledky získané pomocí všech zmíněných metod. Dále bylo zjištěno, že v neutrálním a bazickém prostředí, ve kterém není Trögerova báze protonovaná, jsou podmíněné konstanty stability studovaného komplexu téměř o řád vyšší než při pH 2,5, při kterém je Trögerova báze protonovaná.

Pro optimalizaci využití jednotlivých metod ke spolehlivému stanovení konstant stability bude potřeba minimalizovat nejistoty konstant stability. Budoucí práce se proto bude zabývat především opakovanými měřeními a studiem závislosti hodnot podmíněných konstant stability na dalších podmínkách příslušných analytických metod.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/0453).

LITERATURA

1. Rekharsky M. V., Inoue Y.: *Chem. Rev.* 98, 1875 (1998).
2. Singh M., Sharma R., Banerjee U. C.: *Biotechnol. Adv.* 20, 341 (2002).
3. Dolenský B., Parchaňský V., Matějka P., Havlík M., Bouř P., Král V.: *J. Mol. Struct.* 996, 69 (2011).
4. Valík M., Strongin R. M., Král V.: *Supramol. Chem.* 17, 347 (2005).
5. Ehala S., Dybal J., Makrlík E., Kašička V.: *J. Chromatogr., A* 1216, 3660 (2009).
6. Jiang C., Armstrong D. W.: *Electrophoresis* 31, 17 (2010).
7. Parker K. M., Stalcup A. M.: *J. Chromatogr., A* 1204, 171 (2008).
8. Hirose K.: *J. Inclusion Phenom.* 39, 193 (2001).

VYUŽITÍ SPEKTROSKOPIE ECD KE SLEDOVÁNÍ KONKURENČNÍ VAZBY LÉČIVO-BILIRUBIN NA SÉROVÝ ALBUMIN: ROLE SEKUNDÁRNÍCH VAZEBNÝCH MÍST

JAROSLAV SCHWARZ a IRYNA GONCHAROVA

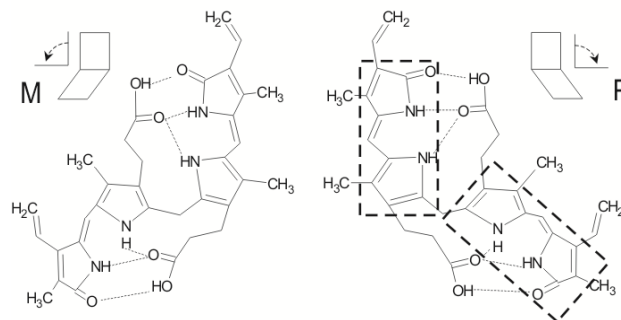
Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Jaroslav.Schwarz@vscht.cz

Úvod

Bilirubin (BR) je produktem metabolismu červeného krevního barviva hemu. V důsledku intramolekulárních vodíkových vazeb (obr. 1) je BR ve vodě nerozpustný, je však rozpustný v lipidech. Je tak schopen pronikat do buněčných membrán a porušovat metabolické procesy v buňce. Volný BR působí jako buněčný jed na jádra hlavových nervů, mozeček a sluchové dráhy¹. V organismu savců je jeho toxicita eliminována navázáním na sérový albumin. Vazba BR na albumin může být ovlivněna léky, což způsobuje problémy při léčení novorozenců a pacientů s nemocí jater. Těto problematice byla věnována řada analytických studií, v nichž byla míra schopnosti vytlačení BR léčivem posuzována například na základě nepřímé detekce koncentrace uvolňovaného BR (peroxidační metoda)².

Spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) je analytická metoda, jež se v současné době běžně používá ke zjišťování konformací chirálních molekul, určování enantiomerního přebytku, ale i sledování interakcí ligand-matrice a určení vazebných konstant. Základem této metody je odlišná schopnost enantiomerů pohlcovat vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření³. BR v roztoku existuje ve formě dvou, M- a P-, konformerů (obr. 1). Každý z těchto konformerů poskytuje opačný signál ECD, v roztocích bez přítomnosti vhodného chirálního komplexotvorného činidla však dochází k rychlé racemizaci a racemát signál ECD neposkytuje⁴. Naváže-li se BR na chirální matici, tedy na matici, která selektivně váže pouze jeden z enantiomerů, bude v přebytku a poskytuje signál ECD. V našem případě v roli matrice vystupuje lidský sérový albumin (human serum albumin, HSA), který je schopen vázat BR pouze v P-konformaci⁵. Díky této jeho vlastnosti je možné sledovat množství navázaného BR, jež odpovídá intenzitě ECD signálu.

Cílem této práce je s využitím metody ECD, která vykazuje vysokou citlivost přímo k množství vázaného BR, charakterizovat schopnost pěti vybraných léčiv (sulfoxazol, dicloxacilin, ceftriaxon⁶, gossypol a kyselina fusidová) konkurovat vazbě BR na albumin. V práci byly na základě spektrálních pozorování určeny vytěšňovací aktivity vzhledem ke studovaným léčivům. S využitím postupu blokování vazebných míst ve struktuře albu-



Obr. 1. Struktura M- a P-konformerů bilirubinu

minu byla prokázána důležitá role sekundárních vazebných míst při vazbě BR na albumin. Získané výsledky byly ověřeny pomocí ditaurátu bilirubinu, ve vodě rozpustném analogu přírodního BR.

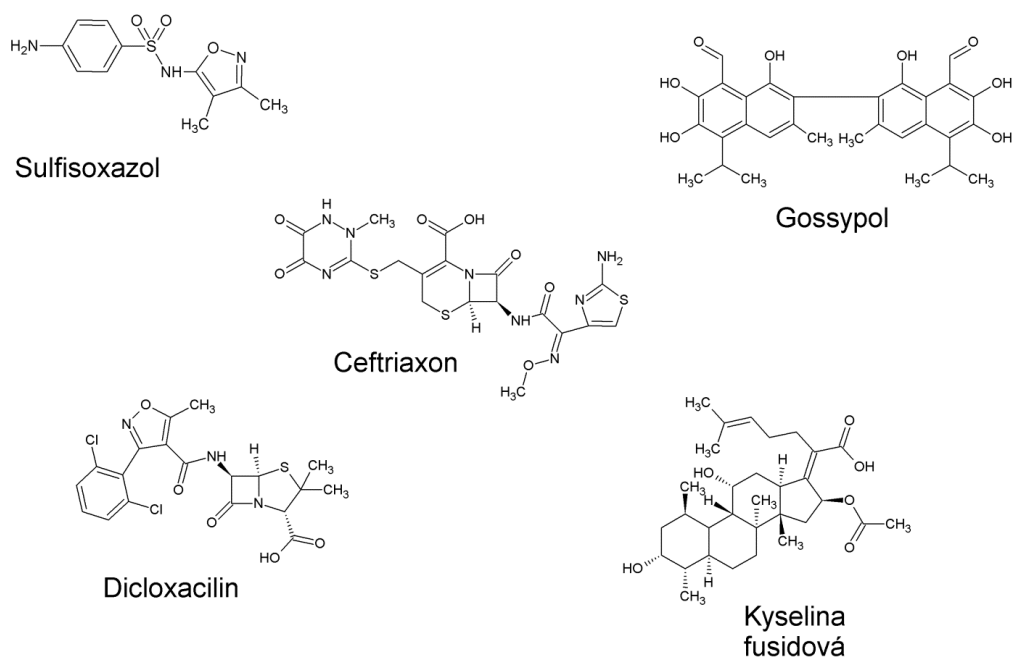
Experimentální část

V této práci byly využity následující látky: bilirubin IX α , disodná sůl bilirubinu ditaurátu (oba Frontier), sulfoxazol, sodná sůl dicloxacillinu (oba Fluka), lidský sérový albumin, disodná sůl ceftriaxonu, gossypol, sodná sůl kyseliny fusidové, ibuprofen (všechny Sigma), fosfátový pufr (pH 7,40), NaOH (1 mol l⁻¹), dvakrát destilovaná voda. Struktury použitých léčiv jsou znázorněny na obr. 2.

ECD spektra byla měřena spektrometrem pro měření cirkulárního dichroismu Jasco J-810 s rychlostí záznamu 100 nm min⁻¹ v rozsahu vlnových délek 350–550 nm (oblast absorbance BR). Byly používány křemenné kvety o tloušťce 1 cm a 0,5 cm. Celý systém byl během měření proplachován dusíkem.

Základní roztok BR o koncentraci 3·10⁻³ mol l⁻¹ byl připraven tak, že odvážené množství BR bylo převedeno na disodnou sůl přidáním odměřeného množství NaOH v molárním poměru 2:1 a doplněno vodou na požadovanou koncentraci. Roztok bilirubinu ditaurátu byl připraven ve stejné koncentraci jako roztok BR rozpuštěním přímo ve vodě. Základní roztoky byly připravovány vždy čerstvé a spotřebovány do čtyř hodin.

Roztoky léčiv o koncentraci 1,5·10⁻² mol l⁻¹ byly připraveny ze sodných solí krystalických látek. Základní roztok lidského sérového albuminu o koncentraci 1,5·10⁻⁴ mol l⁻¹ byl připraven rozpuštěním odváženého množství ve vodě. Roztoky léčiv a lidského sérového albuminu byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C.

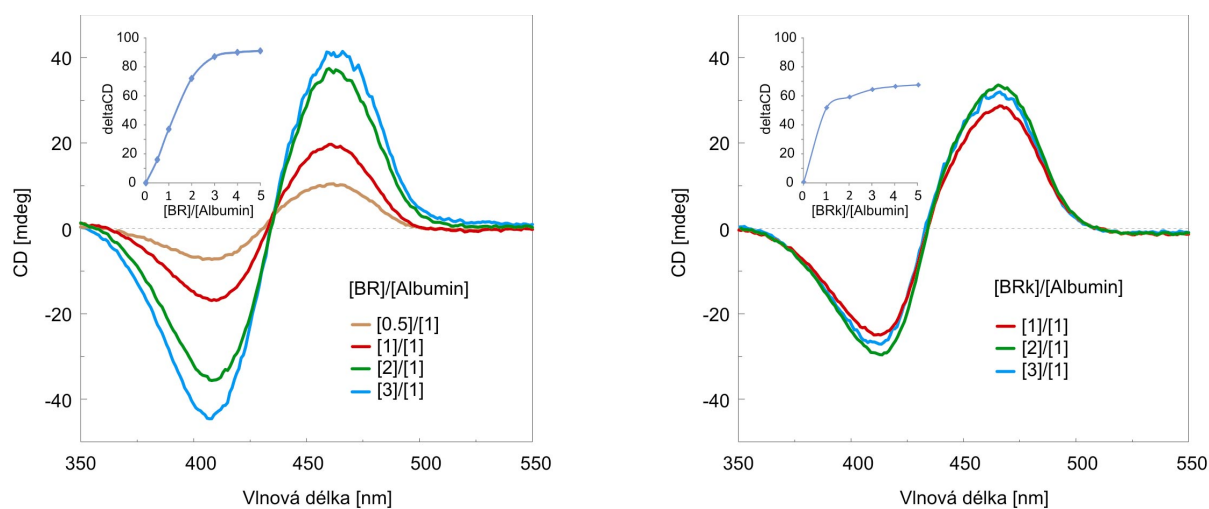


Obr. 2. Struktury studovaných léčiv

Pracovní roztok ($c(\text{HSA}) = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) byl připraven pipetováním vypočteného množství základních roztoků BR a HSA a doplněním fosfátovým pufrům pH 7,40 na požadovanou koncentraci. Poté byly přidány základní roztoky léčiv podle požadovaného poměru. Všechna měření se prováděla za pokojové teploty.

Výsledky a diskuse

BR má při vazbě na HSA možnost navázat se do některého ze třech vazebných míst: primárního ($K_a = 0,9 \cdot 10^8$) a dvou sekundárních ($K_a \sim 10^5$). Všechna tato místa selektivně vážou BR ve formě P-konformeru. To se projevuje signálem ECD, jenž má tvar pozitivního coupletu se záporným maximem na 415 nm a kladným maximem na 462 nm (obr. 3). BR se přednostně váže do primárního



Obr. 3. ECD spektra titrace HSA bilirubinem (BR) a bilirubinem ditaurátem (BRk), deltaCD je rozdíl intenzit kladného a záporného maxima

Tabulka I

Relativní vytěšňovací aktivity léčiv v systému [HSA]/[BR] = 1/1

Poměr [léčivo]/[BR]	5	10	20	40
Ceftriaxon	0,96 ± 0,03	–	0,95 ± 0,04	0,86 ± 0,05
Dicloxacillin	0,91 ± 0,03	–	0,88 ± 0,04	0,75 ± 0,04
Sulfisoxazol	0,77 ± 0,04	–	0,77 ± 0,04	0,79 ± 0,03
Kyselina fusidová	1,14 ± 0,06	1,21 ± 0,04	1,04 ± 0,06	0,70 ± 0,05
Gossypol	0,79 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,05 ± 0,02	–

vazebného místa, ale při větších koncentracích je schopen se vázat také do sekundárních míst. Při titraci HSA barvivem BR lze pozorovat nárůst signálu ECD až do poměru [BR]/[HSA] = 3/1.

Konkurence léčivo-BR při vazbě na HSA byla zkoumána v systémech s fixovaným poměrem [BR]/[HSA] = 1/1, kde BR byl navázán jen v primárním vazebném místě. Do systémů bylo přidáváno v určitém poměru léčivo a sledovala se změna signálu ECD v důsledku vytlačení BR léčivem. Změny vytěšňovací aktivity, popisovány jako poměr intenzity signálu po přidání léčiva k signálu původně vázaného BR, jsou pro studovaná léčiva uvedeny v tabulce I. Uvedené hodnoty jsou opatřeny směrodatnou odchylkou ($n=3$).

V případě, že v systému dochází k jednoduché konkurenci mezi léčivem a BR, lze očekávat pozvolný pokles vytěšňovací aktivity s rostoucí koncentrací přidaného léčiva. V prvním systému, kde na HSA byl vázán BR, byly změny mnohem menší, než se očekávaly. Překvapivě u kyseliny fusidové byl pozorován nejprve nárůst signálu ECD, pokles nastal až při poměru [léčivo]/[BR] = 40. Pro gossypol naopak docházelo okamžitě k poklesu signálu ECD, již při poměru [léčivo]/[BR] = 20 došlo k poklesu na 5 % původní hodnoty.

Pozorovanou změnu signálu ECD je možné vysvětlit tím, že BR vytlačení léčivem je schopen se navázat do některého ze sekundárních vazebných míst v molekule HSA. Do těchto míst se váže ve stejné konformaci jako do svého primárního místa, a tak signál ECD vykazuje menší změnu. Znamená to, že albumin poskytuje větší kapacitu pro navázání BR, než se dosud myslelo, a tím zároveň eliminuje negativní efekt vyvolaný danou konkurencí. Experimentálně lze navázání BR do sekundárních míst

zabránit jejich blokací jiným ligandem (blokátorem). Jako blokátor jednoho ze sekundárních míst byl použit ibuprofen, který se selektivně váže do sekundárního místa ve struktuře albuminu a má vazebnou konstantu řádově větší ($K_a=6 \cdot 10^6$) než je vazebná konstanta BR na sekundární místa ($K_a \sim 10^5$).

Naše hypotéza o vazbě BR vytěšněného z primárního vazebného místa do sekundárních míst byla potvrzena měřeními. Při titraci léčivem roztoku HSA–BR v systému s blokátorem skutečně docházelo k výraznějšímu poklesu ECD signálu BR než při obdobné titraci bez přítomnosti blokátoru v roztoku. Blokátor neumožňoval znovunavázání barviva vytlačěného z primárního vazebného místa. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny v tab. II. Z údajů v tabulkách je patrné, že nejvíce BR vytlačuje gossypol, naopak nejméně sulfisoxazol. Pro sulfisoxazol docházelo též k nejmenšímu snížení signálu ECD v systému s blokátorem (pro [léčivo]/[BR] = 40). To může být způsobeno tím, že se zde uplatňuje mechanismus spolunavázání BR a sulfisoxazolu.

Derivátem nekonjugovaného BR, který je dobře rozpustný ve vodě a netvoří samoasociaty, je bilirubin ditaurát (BRk). Tento konjugovaný BRk má podobné optické vlastnosti jako nekonjugovaný BR a používá se jako standard při jeho stanovení. Jak se ukázalo, BRk je schopen vazby pouze do primárního vazebného místa (obr. 3). Tato jeho schopnost je velmi výhodná, protože vytlačení BRk vytvoří v roztoku racemát a nenaváže se již do žádného jiného vazebného místa. Vytěšňovací aktivity léčiv byly zkoumány v systému, kde [HSA]/[BRk] = 1/1. Získané výsledky byly shrnuty v tab. III.

U všech léčiv docházelo s jejich přidavkem k poklesu signálu ECD v systému s konjugovaným barvivem. Nejvý-

Tabulka II

Relativní vytěšňovací aktivity léčiv v systému [HSA]/[BR]/[blokátor] = 1/1/1

Poměr [léčivo]/[BR]	5	10	20	40
Ceftriaxon	0,81 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,61 ± 0,02
Dicloxacillin	0,77 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,19 ± 0,03
Sulfisoxazol	0,87 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,75 ± 0,03	0,66 ± 0,04
Kyselina fusidová	1 ± 0,03	0,93 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,31 ± 0,04
Gossypol	0,74 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,02 ± 0,01	–

Tabulka III

Relativní vytěšňovací aktivity léčiv v systému [HSA]/[BRk] = 1/1

Poměr [léčivo]/[BRk]	5	10	20	40
Ceftriaxon	0,47 ± 0,02	–	0,16 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Dicloxacillin	0,76 ± 0,03	–	0,49 ± 0,03	0,32 ± 0,03
Sulfisoxazol	0,68 ± 0,02	–	0,43 ± 0,03	0,28 ± 0,02
Kyselina fusidová	0,57 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,24 ± 0,04
Gossypol	0,28 ± 0,03	–	–	–

raznější rozdíly oproti předešlým měřením (bez a s blokátorem) byly zjištěny u gossypolu a ceftriaxonu. Gossypol je podle všech měření největším konkurentem BR (i konjugovaného) ze všech studovaných léčiv. Ceftriaxon se ukázal být jedním z největších konkurentů pouze konjugovaného BRk. Je tedy možné, že ceftriaxon pouze ovlivňuje podobu vazby BR na HSA, kdežto konjugovaný BRk, který je větší, z vazby úplně vytlačí.

Závěr

Pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu ve viditelné oblasti byly určeny vytěšňovací aktivity pro pět léčiv. Vytěšňovací aktivity se s přidáním léčiv snižovaly, což odpovídá většímu vytlačení BR. Výrazný rozdíl a nelinearita při vytlačení BR za různých koncentrací léčiv ukazují na komplexní mechanismus místo předpokládané jednoduché konkurence léčivo-BR při vazbě na HSA. S využitím postupu selektivního blokování vazebných míst ve struktuře HSA byla prokázána důležitá role sekundárních vazebných míst a jejich účast v regulaci koncentrace toxického nekonjugovaného BR. Získané výsledky byly ověřeny pomocí ditaurátu bilirubinu, ve vodě rozpustném analogu přírodního BR.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky, grant č. P206-11-0836.

LITERATURA

1. Vítek L., Sedláčková L., Branny P., Ruml T.: Chem. Listy 97, 24 (2003).
2. Brodersen R.: J. Clin. Invest. 54, 1353 (1974).
3. Nakanishi K., Berova N., Woody R.: *Circular dichroism: principles and applications*. J. Wiley-VCH, New York 2000.
4. Goncharova I., Urbanová M.: Anal. Bioanal. Chem. 392, 1355 (2008).
5. Peters T.: *All about Albumin*. Academic press, San Diego 1995.
6. Wadsworth S. J., Suh B.: Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1571 (1988).

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 4-NITROFENOLU NA VELKOPLOŠNÉ UHLÍKOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

HANA ŠMEJKALOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Univerzitní výzkumné centrum „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 testováním nového typu pracovní elektrody – velkoplošné uhlíkové filmové elektrody (ls-CFE), na které byl voltametricky stanovován 4-nitrofenol (4-NP) v katodické i anodické oblasti za pomoci technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). 4-NP byl vybrán jako modelový zástupce genotoxických aromatických nitroslooučenin rozpustných ve vodě. Velký specifický povrch pracovní elektrody byl zvolen za účelem eliminace dříve pozorovaného problému s reprodukovatelností nanášení uhlíkového filmu na elektrody s malým průřezem¹ (řádově desetiny mm²).

4-NP (obr. 1) je uměle člověkem produkována látka, která se v přírodě přirozeně nevyskytuje. Hlavním zdrojem 4-NP jsou průmyslové výroby, při nichž je 4-NP primárním produktem nebo prekurzorem (např. při výrobě léků, fungicidů či barviv), a také zpracovatelské závody (např. kožedělné)². 4-NP je klasifikován jako nebezpečný, je zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití. Má kumulativní účinky. Po požití vyvolává mimo jiné nevolnost, zvracení, bolest hlavy, pokles krevního tlaku a obrnou dýchacích svalů může přivodit i smrt².

4-NP vystupuje v mnoha analytických studiích jako strukturně jednoduchá modelová látka, jejíž výzkum pak následně slouží jako podklad pro sledování a popis systémů strukturně složitějších (např. makromolekulárních či supramolekulárních), a proto již v minulosti byl stanovován různými analytickými metodami spektrometrickými, separačními i elektrochemickými^{3–8}. Při voltametrickém stanovení 4-NP bylo také využito chemicky modifikova-

ných elektrod (např. modifikace skelného uhlíku sodným montmorillonitem a antrachinonem⁹ nebo modifikace skelného uhlíku lithnou solí tetrakynoethyleny a poly-L-lysinem¹⁰). V posledních letech byl 4-NP také stanovován na různých typech stříbrných amalgámových elektrod^{11–17}.

Cílem práce bylo vyvinout – za pomoci ls-CFE jako pracovní elektrody – časově a finančně nenáročnou elektroanalytickou metodu pro stanovení 4-NP, které by sloužily jako alternativní metody k běžně používaným spektrometrickými či separačním analytickým metodám, a ověřit jejich aplikovatelnost na modelových vzorcích pitné a říční vody.

Experimentální část

Reagencie

Studovanou látkou byl 4-nitrofenol (4-NP; 98 %, Sigma-Aldrich, SRN). Zásobní roztok 4-NP (100 ml o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) byl připraven rozpuštěním 0,01391 g této látky v deionizované vodě (Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Zásobní roztok byl uchováván ve skleněné nádobě v temnu za laboratorní teploty.

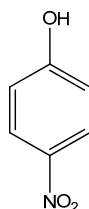
Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky byly připraveny smícháním roztoku kyseliny trihydrogenborité, kyseliny trihydrogenfosforečné (85 %) a octové kyseliny (80 %) (všechny o koncentraci 0,04 mol l⁻¹) s roztokem 0,2 mol l⁻¹ hydroxidu sodného (všechny tyto chemikálie byly čistoty p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Pro přípravu BR pufrů byla používána deionizovaná voda.

Ostatní použité materiály: obalový pěnový polystyren, mikromletý přírodní grafit CR 2 (99,5 %, zrnitost 3,5 až 5,5 μm, Graphite Týn, Týn nad Vltavou, ČR), 1,2-dichlorethan (Sigma-Aldrich, SRN).

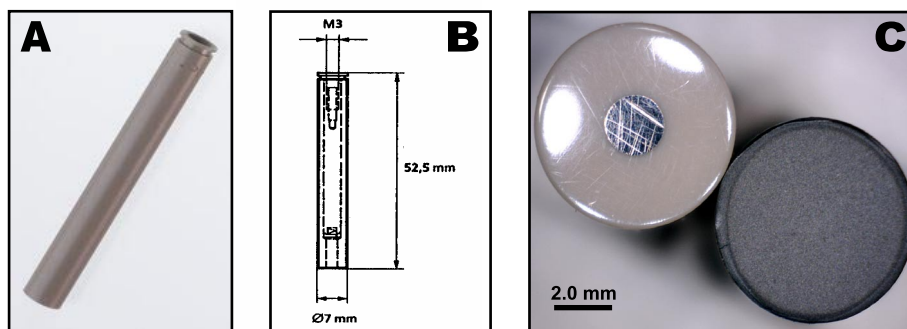
Aparatura

Pro měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro 5.1 (obojí Polaro-Sensors, Praha, ČR), který pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Všechna měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda typu RAE 113 (3 mol l⁻¹ KCl), jako pomocná elektroda byla použita platínová drátková elektroda typu PPE (obojí Monokrystaly, Turnov, ČR). Pracovní elektrodou byla platínová pevná elektroda¹⁸ typu 6.1204.120 (Metrohm, Švýcarsko) pokrytá vrstvou uhlíkového filmu (ls-CFE) (obr. 2).

Rychlost nárůstu potenciálu byla pro obě techniky (DCV i DPV) 20 mV s⁻¹. Při měření technikou DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulzy o modulační ampli-



Obr. 1. Strukturní vzorec 4-nitrofenolu



Obr. 2. Podkladová platinová pevná elektroda; fotografie elektrody poskytovaná výrobcem¹⁸ (A) a technický náčrt elektrody (B) a fotografie podkladové elektrody před a po nanesení uhlíkového filmu (C)

tudě -50 mV (pro katodickou oblast potenciálů) a 50 mV (pro anodickou oblast potenciálů) a šířce 100 ms.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005).

Pracovní elektroda

Ke studiu chování 4-NP ve vodných roztocích byla použita ls-CFE tvořená uhlíkovým filmem pokrývajícím povrch podkladové platinové pevné elektrody (obr. 2). Rozměr platinového disku elektrody byl $2,0 \pm 0,1$ mm a celkový průměr aktivní plochy byl $7,0$ mm (průřez $38,5$ mm²). Tělo podkladové elektrody bylo zhotoveno z polyetheretherketonu (PEEK).

Uhlíkový inkoust byl připraven smícháním $0,09$ g uhlíku CR 2 a $0,01$ g polystyrenu s $0,5$ ml 1,2-dichloroethanu. Toto složení uhlíkového filmu bylo přejato z práce¹⁹, bylo testováno na možné modifikace (použití jiného rozpouštědla či typu uhlíku)²⁰ a bylo opětovně zvoleno za nevhodnější. Uhlíkový inkoust byl homogenizován mícháním pomocí třepačky Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) po dobu 2 min. Pomocí automatické pipety (Biohit, Finsko) byla na podkladovou elektrodu nanášena vrstva inkoustu o objemu 10 μ l. Po 2 min, kdy došlo k úplnému vytékání rozpouštědla, se na povrchu podkladové elektrody vytvořil film a takto vzniklou ls-CFE bylo možné použít. Došlo-li během měření k pasivaci filmu nebo jeho mechanickému poškození, byl tento film odstraněn otřením o filtrační papír a nanášen film nový. Pro výrazně lepší opakovatelnost voltametrických odezev stanovovaného analytu v katodické oblasti byla před každou sadou měření třikrát proměřena oblast potenciálů 0 až -400 mV jako elektrochemická předúprava ls-CFE. Pracovní elektroda byla také před každým měřením, při kterém docházelo k výměně měřeného roztoku, opláchnuta v deionizované vodě a ponechána oschnout. Při měření vzorků v anodické oblasti potenciálového okna byl film po každém měření obnovován.

Pracovní postupy

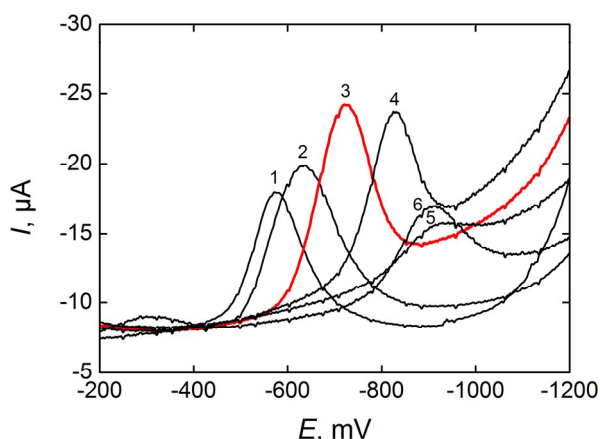
Roztoky pro měření pH závislosti a opakovatelnosti stanovení 4-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) byly připravovány v $10,0$ ml odměrné baňce. Pomocí automatické pipety byl odpipetován $1,0$ ml zásobního roztoku 4-NP o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a baňka byla doplněna po rysku BR pufrům o požadovaném pH. Roztoky pro měření koncentračních závislostí byly připravovány obdobným způsobem v $10,0$ ml odměrných baňkách (doplňovány BR pufrům o optimální hodnotě pH), ve kterých byla postupně zvyšována koncentrace 4-NP.

Modelové vzorky pitné vody byly připraveny přidáním odpovídajícího množství zásobního roztoku 4-NP do pitné vody (vodovodní řád v budově Chemického ústavu, PŘF UK Praha). Odebraných $9,0$ ml pitné vody s přídavkem 4-NP bylo doplněno do $10,0$ ml BR pufrům o optimální hodnotě pH (faktor zředění $0,9$). Stejný postup byl uplatněn při přípravě modelových vzorků říční vody (říční voda byla odebrána z Vltavy na lokalitě Výtoň, Praha).

Připravené vzorky byly převedeny do voltametrických nádobky a následně (pouze v případě měření v katodické oblasti potenciálů) zbaveny kyslíku probuláním dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) po dobu 2 min. Poté byl proveden záznam voltamogramu. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty a opakována nejméně pětkrát. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla počítána jako koncentrace studované látky odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (10σ ; pro počet měření $n = 10$) stanovení sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky²¹.

Výsledky a diskuse

Nejprve byl sledován vliv pH na voltametrické chování 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru. Pufrů byly připraveny v rozmezí hodnot pH $2,0$ až $13,0$. Koncentrace 4-NP v měřených roztocích byla vždy $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹.



Obr. 3. DP voltamogramy 4-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5) a 13,0 (6); voltamogram reprezentující optimální prostředí pro DPV stanovení 4-NP je znázorněn červenou barvou

V celém měřeném rozsahu pH látka poskytovala jeden voltametričtý pík (v katodické i anodické oblasti potenciálů). Jako optimální prostředí, ve kterých 4-NP poskytoval nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný DCV či DPV pík, byla zvolena pro katodickou oblast potenciálů prostředí BR pufru o pH 6,0 (pro techniku DCV) a 7,0 (pro techniku DPV) a pro anodickou oblast potenciálů prostředí BR pufru o pH 3,0 (pro techniku DCV) a 7,0 (pro techniku DPV). Ukázka výběru optimálního prostředí pro techniku DPV je

znázorněna na obr. 3.

Dále byla sledována opakovatelnost katodického stanovení 4-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na ls-CFE pro dvacet po sobě následujících měření v optimálním prostředí. Získané relativní směrodatné odchylky (s_r) činily 2,2 % (DCV) a 0,4 % (DPV). Při opakovaných měřeních 4-NP v anodické oblasti potenciálů docházelo k pasivaci elektrody, a tím i k poklesu výšky píků. Proto byla opakovatelnost stanovení 4-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřena na deseti nově nanášených filmech a hodnoty s_r byly 3,6 % (DCV) a 3,7 % (DPV).

Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny v koncentračním rozmezí 1 až $100 \mu\text{mol l}^{-1}$, pro které jsou parametry kalibračních přímek a meze stanovitelnosti (L_Q) shrnuty v tab. I (pro katodickou oblast potenciálů) a v tab. II (pro anodickou oblast potenciálů). Ukázka kalibrační závislosti naměřené technikou DPV v anodické oblasti potenciálů v rozmezí koncentrací analytu 1 až $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ je znázorněna na obr. 4.

Využitelnost nově vyvinutých metodik voltametričtého stanovení 4-NP na ls-CFE byla testována na modelových vzorcích pitné a říční vody. Měřené roztoky byly připraveny z 9,0 ml pitné nebo říční vody s přidávkem příslušného množství zásobního roztoku 4-NP a 1,0 ml BR pufru o optimálním pH. Při měření v katodické oblasti potenciálů bylo možné stanovit 4-NP v modelových vzorcích ve stejném koncentračním rozmezí jako v ideální matrici – deionizované vodě, tedy přibližně od 1 do $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ (tab. I). Rovněž dosažené L_Q se liší jen nepatrně. Ze získaných hodnot směrnice je však patrné, že citlivost stanovení je v pitné a říční vodě nižší, což je možné

Tabulka I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NP v prostředí BR pufru (deionizovaná voda jako ideální matrice) a v modelových vzorcích pitné a říční vody (o složení voda – BR pufr (9:1)) pomocí katodické voltametrie na ls-CFE; směrodatné odchylky hodnot směrnice a úseků jsou vypočteny pro $n = 5$

Technika (matrice; pH BR pufru)	c [mol l^{-1}]	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [μA]	R^a	L_Q^b [mol l^{-1}]
DCV (deionizovaná voda; 6,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-141,5 \pm 1,2$	$0,74 \pm 0,08$	-1,000	—
	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-123,7 \pm 2,8$	$-0,03 \pm 0,02$	-0,999	$2,3 \cdot 10^{-6}$
DCV (pitná voda; 6,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-127,9 \pm 2,9$	$0,34 \pm 0,17$	-0,999	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-105,7 \pm 3,0$	$-0,10 \pm 0,02$	-0,998	$1,0 \cdot 10^{-6}$
DCV (říční voda; 6,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-14,2 \pm 0,6$	$-0,03 \pm 0,03$	-0,992	—
	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-28,9 \pm 1,2$	$0,20 \pm 0,06$	-0,996	$1,9 \cdot 10^{-6}$
DPV (deionizovaná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-90,0 \pm 1,0$	$-0,10 \pm 0,06$	-0,999	—
	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-107,3 \pm 4,5$	$0,16 \pm 0,03$	-0,997	$1,8 \cdot 10^{-6}$
DPV (pitná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-63,4 \pm 2,5$	$-0,07 \pm 0,15$	-0,996	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-62,9 \pm 2,2$	$-0,03 \pm 0,01$	-0,997	$1,3 \cdot 10^{-6}$
DPV (říční voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-82,7 \pm 1,9$	$-0,24 \pm 0,12$	-0,999	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-81,8 \pm 2,3$	$-0,06 \pm 0,01$	-0,998	$1,0 \cdot 10^{-6}$

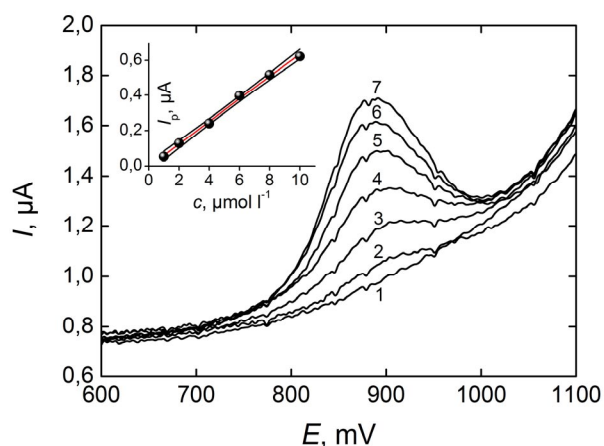
^a Korelační koeficient, ^b mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$)

Tabulka II

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 4-NP v prostředí BR pufru (deionizovaná voda jako ideální matrice) a v modelových vzorcích pitné a říční vody (o složení voda – BR pufr (9:1)) pomocí anodické voltametrie na ls-CFE; směrodatné odchylky hodnot směrnic a úseků jsou vypočteny pro $n = 5$

Technika (matrice; pH BR pufru)	c [mol l ⁻¹]	Směrnice [mA l mol ⁻¹]	Úsek [μA]	R^a	L_Q^b [mol l ⁻¹]
DCV (deionizovaná voda; 3,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$84,8 \pm 2,9$	$1,63 \pm 0,18$	0,994	—
	$(6-10) \cdot 10^{-6}$	$242,5 \pm 8,9$	$-0,23 \pm 0,07$	0,997	$1,5 \cdot 10^{-6}$
DCV (pitná voda; 3,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	— ^{c,d}	— ^{c,d}	— ^{c,d}	—
	$(4-10) \cdot 10^{-6}$	$88,8 \pm 4,4$	$0,82 \pm 0,03$	0,993	$1,6 \cdot 10^{-6}$
DCV (říční voda; 3,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$80,6 \pm 2,5$	$1,00 \pm 0,15$	0,995	—
	$(6-10) \cdot 10^{-6}$	$111,5 \pm 1,2$	$0,67 \pm 0,01$	1,000	$1,7 \cdot 10^{-6}$
DPV (deionizovaná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$51,9 \pm 1,5$	$0,19 \pm 0,09$	0,998	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$64,1 \pm 1,8$	$-0,01 \pm 0,01$	0,998	$4,6 \cdot 10^{-7}$
DPV (pitná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$44,7 \pm 1,9$	$0,30 \pm 0,12$	0,995	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$64,1 \pm 1,4$	$-0,10 \pm 0,08$	0,999	$4,6 \cdot 10^{-7}$
DPV (říční voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	— ^{c,e}	— ^{c,e}	— ^{c,e}	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$71,5 \pm 0,9$	$-0,01 \pm 0,06$	0,999	$6,0 \cdot 10^{-7}$

^a Korelační koeficient, ^b mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^c koncentrační závislost s nelineárním průběhem vyjádřená formální polynomičkovou rovnicí, ^d I_p [μA] = $(-290 \pm 110)c^2$ [mmol² l⁻²] + $(102 \pm 12)c$ [mmol l⁻¹] + $(1,04 \pm 0,27)$ ($R = 0,998$), ^e I_p [μA] = $(-245 \pm 49)c^2$ [mmol² l⁻²] + $(75,1 \pm 5,5)c$ [mmol l⁻¹] + $(-0,03 \pm 0,12)$ ($R = 0,999$)



Obr. 4. DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrace 4-NP (mol l⁻¹): 0 (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2), $2 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $6 \cdot 10^{-6}$ (5), $8 \cdot 10^{-6}$ (6) a $10 \cdot 10^{-6}$; příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($n = 5$)

vysvětlit maticovým efektem. Ten se pak více projevuje u metody DCV, zatímco u metody DPV není tak patrný. To by nasvědčovalo přítomnosti povrchově aktivních látek v pitné a říční vodě, které mohou ovlivňovat adsorpci analytu na povrch ls-CFE; adsorpci bývá více ovlivněna právě technika DCV.

Při anodické oxidaci 4-NP byly některé kalibrační závislosti změřené v modelových vzorcích vod nelineární, avšak bylo možné s vysokým korelačním koeficientem proložit polynodem druhého stupně (tab. II). Pokud bylo možné proložit oba měřené koncentrační řady (tedy 10^{-6} mol l⁻¹ a 10^{-5} mol l⁻¹) dvěma přímkami, lišily se vzájemně jejich směrnice, přičemž vyšší směrnice byla vždy získána u nižšího koncentračního řádu. Toto chování rovněž vypovídá o možném vlivu adsorpce analytu na povrch pracovní elektrody. Dosažené L_Q i zde odpovídají hodnotám získaným při stanovení 4-NP v matrici deionizované vody.

Závěr

V předložené práci byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 4-nitrofenolu (4-NP) pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE). Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny za těchto podmínek v koncentračním rozmezí 1 až 100 μmol l⁻¹ a nově vyvinuté metody byly úspěšně aplikovány při stanovení 4-NP v modelových vzorcích pitné a říční vody. Přestože meze stanovitelnosti (L_Q) těchto metod zdaleka nedosahují hodnot L_Q získaných pomocí citlivějších voltametrických metod, např. adsorpční rozpouštěcí voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě⁴ ($L_Q \approx 0,28$ nmol l⁻¹), pro stopo-

vou analýzu v mikromolárním měřítku se jeví ls-CFE jako využitelný elektrochemický senzor aplikovatelný i na jednoduché reálné vzorky.

Při použití elektrody v anodické oblasti se uplatňuje jedna z předností ls-CFE, a to snadná obnovitelnost elektrodového povrchu mechanickým otřením a nanesením nového uhlíkového filmu. V současné době je v navazujícím výzkumu zkoumána možnost snížení hodnot L_Q prekoncentrací 4-NP pomocí předřazené extrakce na tuhou fázi.

Na tomto místě bychom rádi poděkovali za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM0021620857) a Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

LITERATURA

1. Radová J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2010.
2. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp50.pdf>, staženo 18. dubna 2011.
3. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad20.pdf>, staženo 18. dubna 2011.
4. Barek J., Ebertová H., Mejstřík V., Zima J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 1761 (1994).
5. Fischer J., Barek J., Wang J.: *Electroanalysis* 18, 195 (2006).
6. Prchal V., Vyskočil V., Daňhel A., Barek J., Wang J.: *Chem. Listy* 105, 217 (2011).
7. Musilová J., Barek J., Pecková K.: *Electroanalysis* 23, 1236 (2011).
8. Vyskočil V., Daňhel A., Fischer J., Novotný V., Deýlová D., Musilová-Karaová J., Maixnerová L., Pecková K., Barek J.: *Chem. Listy* 104, 1181 (2010).
9. Hu S. S., Xu C. L., Wang G. P., Cui D. F.: *Talanta* 54, 115 (2001).
10. de Cássia Silva Luz R., Damos F. S., de Oliviera A. B., Beck J., Kubota L. T.: *Talanta* 64, 935 (2004).
11. Fischer J., Vaňourková L., Daňhel A., Vyskočil V., Čížek K., Barek J., Pecková K., Yosypchuk B., Navrátil T.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 226 (2007).
12. Daňhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 21, 303 (2009).
13. Niaz A., Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Sirajuddin, Bhangar M. I.: *Electroanalysis* 21, 1786 (2009).
14. Daňhel A., Mansfeldová V., Janda P., Vyskočil V., Barek J.: *Analyst* 136, 3656 (2011).
15. Daňhel A., Yosypchuk B., Vyskočil V., Zima J., Barek J.: *J. Electroanal. Chem.* 656, 218 (2011).
16. Deýlová D., Yosypchuk B., Vyskočil V., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 1548 (2011).
17. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: *Electroanalysis* 24, 2230 (2012).
18. <http://www.metrohm.com/com/Produkte2/Electrodes/VASolidStateWorking.html?prdtName=61204120&prdtLang=en-US&prdtType=Accessory>, staženo 29. dubna 2011.
19. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: *Electroanalysis* 18, 1126 (2006).
20. Vyskočil V., Barek J.: *Procedia Chem.* 6, 52 (2012).
21. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.

VYUŽITIE POLYMÉRU S ODTLAČKOM MOLEKULY UMBELIFERÓNU PRI ANALÝZE RASTLINNÝCH VZORIEK

ANDREA SPEVAK a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

*Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
anga.spevak@gmail.com*

Úvod

HPLC patrí medzi účinné metódy analýzy mnohložkových zmesí. Napriek tomu sa často musia použiť zložité postupy na úpravu a čistenie vzorky pred stanovením analytov vo vzorkách so zložitou maticou. Na tento účel sa v súčasnej dobe vo veľkej miere používajú extrakčné techniky ako je extrakcia tuhou fázou (SPE). Používané SPE sorbenty sú mnohokrát málo selektívne pre sledované analyty a to môže spôsobovať problémy pri ich využití na analýzu zložitých vzoriek. V poslednom desaťročí sa objavili inovácie v prístupoch k spracovaniu vzoriek, pred samotným stanovením analytu, z hľadiska selektívnej a špecifickej sorpcie analytu. Extrakcia tuhou fázou v spojení s využitím polymérov s odtlačkami molekúl (MIP) predstavuje jeden z perspektívnych smerov v oblasti vývoja nových sorpčných materiálov. Polyméry s odtlačkami molekúl sú syntetické materiály s umelo vytvorenými interakčnými miestami schopnými prednostne viazať sledovaný analyt v prítomnosti iných zlúčenín. Pri príprave sa zvyčajne vytvárajú komplexy medzi molekulami analytu (templátu) a monomérom pomocou kovalentných alebo nekovalentných väzieb¹.

Kumaríny patria do skupiny aromatických látok vyskytujúcich sa vo voľnej forme alebo glykozidicky viazané v zlúčeninách. Získavajú sa extrakciou z rastlinných zdrojov pomocou organických rozpúšťadiel. V odbornej literatúre je popísaných viac ako 150 rastlinných druhov z 30 čeľadí rastlín, ktoré obsahujú kumaríny. Vzhľadom na substitučné možnosti molekuly kumarínu je známy veľký počet derivátov kumarínu, syntetických alebo prírodných, a takáto štruktúrna rôznorodosť je dôvodom mnohých biologických vlastností: zabraňujú zrážaniu krvi, tlmia kŕče, podporujú srdcovú činnosť, ovplyvňujú vstrebávanie vápnika, odpudzujú hmyz a iné. Jedným z najčastejších sa vyskytujúcich prírodných derivátov kumarínu je umbeliferón (7-hydroxykumarín). Vyznačuje sa schopnosťou absorbovať ultrafialové žiarenie zo slnka^{2,3}.

Cieľom práce bola príprava a testovanie sorpčných vlastností polymérov s odtlačkami molekúl pripravených pre templát umbeliferón a ich použitie, ako sorbentu pri extrakcii tuhou fázou, na analýzu rastlinných vzoriek. Sledoval sa vplyv porogénu a rozpúšťadla analytu na sorpčnú kapacitu polyméru. Pomocou štruktúrne podobných zlúčenín sa prešetrila selektivita polyméru s odtlačkom molekuly.

Experimentálna časť

HPLC separácie a testovanie polymérov s odtlačkami molekúl boli uskutočnené pomocou kvapalinového chromatografu (Agilent technologies, seria 1100), ktorý obsahoval vysokotlakové čerpadlo, dávkovací ventil Rheodyne s objemom slučky 20 μ l a detektor s diódovým poľom. Na separáciu kumarínov sa použila chromatografická kolóna Separon SGX C18 (150 \times 4,6 mm I.D., 5 μ m) a mobilná fáza acetonitril/0,3% kyselina octová (25/75, v/v) pri prietoku 0,5 ml min^{-1} . Na detekciu sa použil detektor diódového poľa v rozsahu vlnových dĺžok 190–400 nm.

Na prípravu MIP a NIP sa do sklenej skúmavky sa navážilo 0,10 g umbeliferónu, 0,25 g kyseliny metakrylovej, pridalo sa 2,34 g etylénglykoldimetakrylátu a 7,5 ml porogénu (etanol (MIP1, NIP1), acetonitril (MIP2, NIP2), chloroform (MIP3, NIP3) s prídavkom 30 mg azobisisobutyronitrilu. Zmes sa nechala polymerizovať na vodnom kúpeli pri teplote 60 °C 24 hodín. Výsledný produkt sa vysušil vákuom pri teplote 60 °C a preosial cez sito (40 μ m). Templát bol odstránený z polyméru Soxhletovou extrakciou zmesou metanol/kyselina octová (9/1 v/v, 100 ml, 24 hodín). NIP sa pripravili rovnakým postupom ako MIP, ale bez prídania umbeliferónu tj. templátu, do polymerizačnej zmesi.

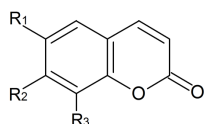
Na prípravu HPLC kolóny sa 0,30 g NIP alebo MIP zmiešalo s metanolom a suspenziou sa naplnila trubica kolóny a následne sa premývala metanolom (prietok 0,2 ml min^{-1}). Naplnená kolóna sa zapojila do systému s vysokotlakovým čerpadlom a spektrofotometrickým detektorom. Pred meraním sa premyla rozpúšťadlom, v ktorom bol pripravený roztok analytu (metanol/voda 1/1 v/v, metanol, acetonitril/voda 1/1 v/v, acetonitril). Na kolónu sa dávkoval roztok umbeliferónu s koncentráciou 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Eluát z kolóny sa monitoroval spektrofotometrickým detektorom pri vlnovej dĺžke 323 nm pre roztoky umbeliferónu. Po dosiahnutí prieniku sa analyt vymýval z kolóny premývaním so zmesou metanol/kyselina octová (9/1, v/v).

Na prípravu SPE kolónky sa do plastovej trubice kolóny pre SPE sa umiestnilo 0,10 g MIP resp. NIP. Kolónka sa kondicionovala premytím s 3 ml metanolu, 5 ml vody a následne sa aplikoval roztok referenčných látok alebo vzorky (2 ml). Kolónka sa premyla vodou (2 ml) a sušila vákuom (10 min). Analyt sa eluoval 3 ml roztoku metanol/kyselina octová (9/1, v/v).

Na prípravu vzorky sa k 1,0 g rozdrvenej sušenej rastlinnej vzorky pridalo 8 ml vody, následne sa zmes miešala pri laboratórnej teplote po dobu 60 min. Zmes sa prefiltrovala a filtrát sa dávkoval priamo do chromatografickej kolóny alebo sa použil na MIP-SPE extrakciu.

Výsledky a diskusia

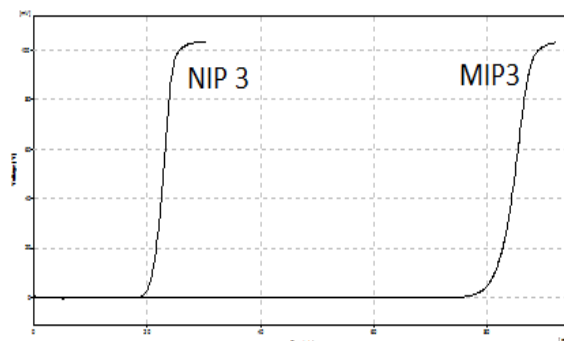
Polymér s odtlačkom molekuly pre templát umbeliferón (obr. 1) bol pripravený nekovalentným spôsobom použitím porogénov s rôznou polaritou (acetonitril, etanol, chloroform). Sorpčná kapacita pripraveného polyméru sa zisťovala metódou prienikovej krivky a zodpovedala množstvu umbeliferónu, ktorý sa naviazal na polymér (bez prieniku). Rovnakým postupom sa testovali MIP aj NIP sorbenty. Prienikové krivky pre MIP a NIP boli merané pre umbeliferón rozpustený v rozpúšťadlách metanol, acetonitril, metanol/voda (1/1, v/v), acetonitril/voda (1/1, v/v). Typický tvar prienikovej krivky možno vidieť na obr. 2. V prípade MIP3 a NIP3 prienik nastal pri 76 min resp. pri 18 min, čo zodpovedalo 401 a 132 μg umbeliferónu naviazanému na 100 mg pripraveného polyméru. Hodnoty sorpčnej kapacity, zistené pre roztoky templátu v rôznych rozpúšťadlách sú uvedené v tab. I. Je zrejmé, že



$R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$	umbeliferón
$R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}$	dafnetín
$R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$	kumarín

Obr. 1. Štruktúra kumarínu a jeho niektorých derivátov

porogén, v ktorom je polymér pripravený, má vplyv na tvorbu komplexu templát-monomér. Hodnota sorpčnej kapacity pripraveného polyméru v etanole ako porogéne (MIP1, NIP1) je veľmi nízka a z toho dôvodu etanol ako porogén nie je vhodný pre tento typ polyméru. Vyššia hodnota sorpčnej kapacity polyméru (MIP2, NIP2) sa dosiahla, keď sa ako porogén použil acetonitril. Najvyššia hodnota sorpčnej kapacity sa dosiahla, keď sa použil nepolárny porogén chloroform. Zdá sa, že polárnejší porogén (etanol) podporuje interakcie monomér-porogén a templát-porogén, čím minimalizuje interakcie medzi monomérom a templátom. Hodnota sorpčnej kapacity polyméru, pripraveného v chloroforme naznačuje, že tento typ porogénu pravdepodobne optimalizuje nepolárne interakcie medzi monomérom a templátom⁴.



Obr. 2. Prienikové krivky na stanovenie sorpčnej kapacity MIP a NIP

Tabuľka I

Sorpčná kapacita a špecifická sorpčná kapacita pripravených polymérov

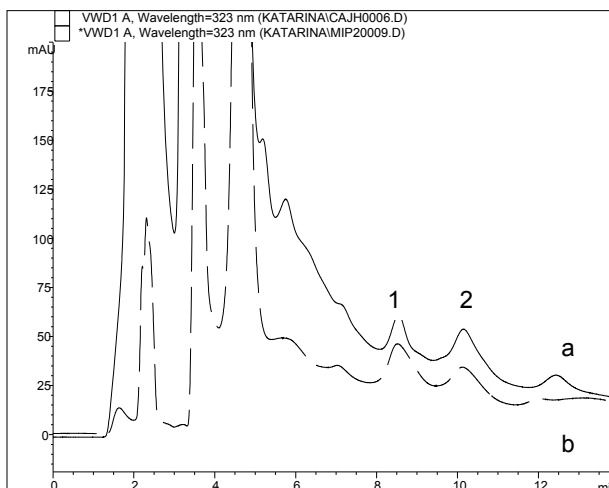
(Porogén) Rozpúšťadlo analytu	Sorpčná kapacita (μg umbeliferónu/100 mg polyméru)		Špecifická sorpčná kapacita
	MIP	NIP	MIP-NIP
<i>I (etanol)</i>			
metanol	$0,43 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,03$
metanol/voda (1/1, v/v)	–	–	–
acetonitril	$0,23 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$
acetonitril/voda (1/1, v/v)	–	–	–
<i>II (acetonitril)</i>			
metanol	$4,1 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
metanol/voda (1/1, v/v)	170 ± 15	96 ± 7	74 ± 16
acetonitril	32 ± 2	29 ± 1	3 ± 2
acetonitril/voda (1/1, v/v)	36 ± 3	28 ± 2	6 ± 2
<i>III (chloroform)</i>			
metanol	$8,3 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,5$
metanol/voda (1/1, v/v)	401 ± 32	132 ± 8	269 ± 33
acetonitril	119 ± 10	38 ± 3	81 ± 9
acetonitril/voda (1/1, v/v)	178 ± 14	43 ± 3	135 ± 14

^a $n = 3$

V práci sa sledoval aj vplyv rozpúšťadla umbeliferónu použitého pri určení sorpčnej kapacity polyméru. Výsledky uvedené v tab. I naznačujú, že rozpúšťadlo analytu použité pri zisťovaní sorpčnej kapacity má vplyv na sorpciu umbeliferónu na polymér.

Povaha rozpúšťadla pre tento krok pravdepodobne ovplyvňovala napučíavanie polyméru, čo spôsobilo zmeny v dutinách a taktiež mohla ovplyvniť solvatačný proces. Z hodnôt špecifickej sorpčnej kapacity (tab. I) vidno, že najvyššia hodnota špecifickej kapacity sa dosiahla vtedy, ak sa na zistenie kapacity polymérov použil roztok umbeliferónu v rozpúšťadle metanol/voda (1/1, v/v). Hodnota špecifickej sorpčnej kapacity MIP pripraveného v chloroforme ako porogéne bola 269 μg umbeliferónu/100 mg polyméru. Vzhľadom na to, že najvyššie hodnoty sa dosiahli pre zmes metanol/voda (1/1, v/v), experiment pre reálne vzorky bol uskutočnený v tejto zmesi.

Na zistenie selektivity polyméru pripraveného v chloroforme ako porogéne (MIP3) sa použil umbeliferón a jemu štruktúrne podobné látky dafnetín a kumarín (obr. 1). Selektivita MIP sa vyhodnocovala na základe prítomnosti pásov v UV spektre pri vlnovej dĺžke 323 nm pre umbeliferón a dafnetín a pri 280 nm pre kumarín, ktoré zodpovedali ich absorpčným maximám. Z nameraných UV spektier (interval 210–400 nm) vyplynulo, že polymér pripravený pre umbeliferón bol selektívny pre molekulu templátu a pre štruktúrne podobnú látku dafnetín (v spektre prítomné pásy pri vlnovej dĺžke 323 nm), kým selektivita pre nederivatizovanú molekulu kumarínu bola veľmi nízka (v spektre neprítomný pás pri vlnovej dĺžke 280 nm). Výsledky naznačujú, že MIP pripravený pre templát umbeliferónu je skupinovo selektívny aj pre ďalšie štruktúrne podobné kumaríny.



Obr. 3. HPLC chromatografické záznamy extraktu harmančeka pravého bez použitia (a) a s použitím (b) MIP-SPE. 1 – umbeliferón, 2 – herniarín

Na kvantitatívne vyhodnotenie koncentrácie umbeliferónu v extrakte rastlinnej vzorky sa použila metóda kalibračnej čiary. Kalibračná závislosť mala lineárny priebeh v rozsahu koncentrácií od 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Dosiahnutá medza detekcie pre umbeliferón (UV, 323 nm) bola 0,10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a medza stanovenia (UV, 323 nm) bola 0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Pripravený polymér s odtlačkom molekuly sa testoval ako sorbent pre off-line SPE kumarínov z vodného extraktu harmančeka pravého. Vhodným premývacím činidlom bola voda a na elúciu sa použila zmes metanol/kyselina octová (9/1, v/v). MIP-SPE extrakty sa analyzovali HPLC metódou so spektrofotometrickou detekciou. Výťažnosť extrakčného kroku na polyméri bola zistená porovnaním výsledkov stanovenia umbeliferónu získaných pre vzorky s použitím a bez použitia MIP-SPE. Hodnota výťažnosti pre testovanú rastlinnú vzorku bola viac ako 77 % (RSD < 15 %). Zistená hodnota hmotnostnej koncentrácie umbeliferónu vo vzorke harmančeka pravého bola 58,1 \pm 6,9 $\mu\text{g g}^{-1}$. Chromatografické záznamy vodných extraktov bez použitia a s použitím MIP-SPE dokumentuje obr. 3. Je zrejme, že interferujúce zložky boli odstránené a deriváty kumarínu sa selektívne extrahovali. V prípade testovanej vzorky harmančeka bola v extrakte zistená prítomnosť umbeliferónu a herniarínu.

Záver

V práci sa testoval skupinovo selektívny polymér s odtlačkom molekuly pre stanovenie kumarínov v extrakte rastlinnej vzorky. Polymér bol pripravený nekovalentným spôsobom. Študoval sa vplyv porogénu a rozpúšťadla vzorky na sorpčnú kapacitu polyméru. Polymér pripravený v chloroforme bol schopný zachytiť 269 μg umbeliferónu/100 mg polyméru, čo je dostatočná kapacita na analýzu rastlinných vzoriek. Off-line MIP-SPE extrakcia je vhodná metóda na prečistenie a selektívnu sorpciu kumarínu z rastlinných vzoriek.

Práca vznikla za podpory grantu č. 1/0164/11 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Sádecká J., Polonský J.: Chem. Listy 99, 222 (2005).
2. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin 2*. Tábor OSSIS, 307-308 (2009).
3. Hoult J.R.S., Paya M.: *General Pharmacology* 27, 713 (1996).
4. Haupt K., Dzgoev A., Mosbach K.: *Anal. Chem.* 70, 628 (1998).

SLEDOVÁNÍ DEGRADACE ORGANOFOSFOREČNÝCH PESTICIDŮ NA REAKTIVNÍCH SORBENTECH POMOCÍ CHROMATOGRAFICKÝCH A SPEKTRÁLNÍCH METOD

MARTIN ŠŤASTNÝ^a, ONDŘEJ PELANT^a
a JAKUB EDERER^{a,b}

^a *Fakulta životního prostředí, Univerzita J. E. Purkyně, Králova výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem,* ^b *Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova Praha, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha*
clatters.martin@seznam.cz

Úvod

Insekticidy ze skupiny organofosforečných látek tvoří rozsáhlou skupinu organických sloučenin fosforu a v řadě zemí patří mezi nejčastěji používané pesticidy. Výrazný vstup pesticidů do životního prostředí je patrný již od počátku jejich využívání. Významným mezníkem v používání pesticidů pro ošetření zemědělských plodin se stala 30. léta 20. století, kdy došlo k rozmachu využívání organických sloučenin s pesticidními účinky. V období po druhé světové válce pak došlo k intenzifikaci výroby a masovému používání pesticidů v zemědělství. Postupně byly identifikovány i negativní vlivy organofosforečných pesticidů na lidské zdraví spočívající v inhibici účinku enzymu acetylcholinesterasy. V poslední době se zvyšují požadavky na vývoj technologií pro účinnou a řízenou likvidaci přebytků těchto látek. S výhodou jsou využívány materiály na bázi nanokrystalických oxidů kovů (Ti, Zn, Fe, Ce aj.), které vykazují vysokou účinnost a rychlost degradace organofosforečných látek za běžných podmínek. Oxidy s vysokým specifickým měrným povrchem, pro něž se používá název „reaktivní adsorbenty“, jsou připravovány metodami homogenní hydrolýzy, případně metodami hydrotermální syntézy za zvýšené teploty a tlaku. Předpokládá se, že převládajícím degradačním mechanismem je nukleofilní substituce S_N2 na centrálním atomu fosforu¹, nicméně mechanismus degradace je stále předmětem výzkumu a existence jiných, byť minoritních mechanismů je více než pravděpodobná.

Mechanismy degradace pesticidů lze studovat pomocí nejrůznějších instrumentálních technik^{2–6}, jako jsou např. kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí (HPLC-UV, HPLC-DAD) nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS), metodami GC-MS či metodami spektrometrickými (infračervená spektrometrie, Ramanova spektrometrie nebo UV/VIS spektrofotometrie). Kromě stanovení vlastních pesticidů je samozřejmě žádoucí identifikovat a kvantifikovat potenciální degradační produkty, které mohou vykazovat řádově vyšší toxicitu pro vyšší organismy.

Pro měření kinetiky degradace pesticidů a sledování přechodných a konečných produktů byly použity metody

molekulové spektroskopie (IČ, UV/VIS) a dále separační techniky GC-MS, LC-MS, systém HPLC-UV a HPLC-DAD. V této práci jsou uvedeny dílčí výsledky studia degradace vybraných organofosforečných pesticidů a dále vybrané výkonnostní charakteristiky použitých analytických metod.

Experimentální část

Přístrojové vybavení

Pro sledování a identifikaci organofosforečných pesticidů byly použity dva systémy vysokoúčinné kapalinové chromatografie:

HPLC systém od společnosti Merck/Hitachi High-Technol. Corp. (Tokio, Japonsko). Kapalinový chromatograf se skládal z vysokotlakého čerpadla LaChrom L-7100 (Merck/Hitachi, Hitachi High-Technol. Corp., Tokio, Japonsko), smyčkového dávkovače Rheodyne 7125 se smyčkou 20 μ l, vakuového odplynovacího zařízení a UV detektoru LaChrom L-7400 (Merck/Hitachi) pracujícího při vlnové délce 230 nm. Měření bylo prováděno na koloně Luna (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 150 \times 4,6 mm, se stacionární fází PFP, 5 μ m, při průtoku mobilní fáze 1 ml min⁻¹. Mobilní fázi tvořilo 80 % methanolu a 20 % vody.

HPLC systém DIONEX UltiMate 3000 s kolonou Hibar 125 \times 4 mm plněnou stacionární fází Purospher STAR, RP 18, 5 μ m, endcapped (Merck). Teplota kolony během analýzy byla 30 °C. Mobilní fáze obsahovala 85 % methanolu a 15 % vodného roztoku kyseliny octové (1%), průtok byl 1 ml min⁻¹. Detektor DAD pracující při vlnové délce 296 nm.

Pro identifikaci reakčních produktů byl použit plynový chromatograf Varian GC 3800 s hmotnostně spektrometrickou detekcí (iontová past Varian 4000), separace probíhala na kapilární koloně VF-5 (20 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m). Pro stanovení nízkomolekulárních organických kyselin, případně anorganických aniontů byl použit iontově chromatografický systém DIONEX ICS-1000.

Měření spekter jednotlivých pesticidů v UV/VIS oblasti bylo prováděno pomocí spektrofotometru Varian Cary 50CONC UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER. Vyhodnocení a sběr naměřených dat bylo prováděno počítačovým softwarem Cary WinUV Scan SW (Varian, Austrálie).

Experimentální data byla zpracována a vyhodnocována v programu Excel od společnosti Microsoft (USA) a GrapherTM 8 od společnosti Golden Software (USA).

Roztoky a chemikálie

Tabulka I

Přehled použitých pesticidů a jejich degradačních produktů

Pesticid	Molekulová hmotnost [g.mol ⁻¹]	Vzorec	Výrobce
Fenthion	278,33	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Bgm., Shlosser, Str. 6A, 86 199 Augsburg, Germany
Malathion	330,35	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Bgm., Shlosser, Str. 6A, 86 199 Augsburg, Germany
Parathion-methyl	291,26	C ₈ H ₁₀ NO ₃ PS	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Bgm., Shlosser, Str. 6A, 86 199 Augsburg, Germany
Chlorpyrifos	350,59	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 8
Fenchlorphos	321,55	C ₈ H ₈ Cl ₃ O ₃ PS	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 8
Prothiophos	345,25	C ₁₁ H ₁₃ Cl ₂ O ₂ PS ₂	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 8
Dichlofenthion	315,15	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ O ₃ PS	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 8
4-nitrofenol	139,11	O ₂ NC ₆ H ₄ OH	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 9
2,4-dichlorfenol	163	Cl ₂ C ₆ H ₃ OH	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 10
2,4,5 - trichlorfenol	197,45	Cl ₃ C ₆ H ₂ OH	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 11
3,5,6-trichloro-2-pyridinol	198,43	C ₅ H ₂ Cl ₃ NO	Sigma-Aldrich spol. s r.o., Sokolovská 100/94, CZ-186 00 PRAHA 12

Další chemikálie a rozpouštědla:

- methanol, HPLC-grade (J. T. Baker, Netherlands),
- deionizovaná voda ze zařízení Demi Ultra 20 (Goro, Praha) využívající reverzní osmózy a směsného měniče iontů k čištění vody.

Výsledky

Byly měřeny retenční a detekční charakteristiky vybraných látek; výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách II a III.

Tabulka II

Retenční charakteristiky zkoumaných organofosforečných pesticidů a jejich degradačních produktů ve výše uvedených chromatografických systémech

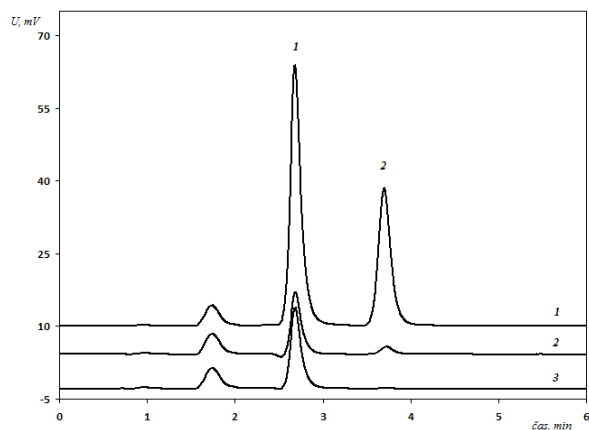
	Pesticid	Chromatografický systém	t _R [min]	Opakovatelnost (směrodatná odchylka, min)	Opakovatelnost (rel. směrodatná odchylka, %)
pesticidy	Fenthion	a)	2,867	0,007	0,25
	Malathion	a)	1,873	0,004	0,19
	Parathion-methyl	a)	3,720	0,06	1,658
	Chlorpyrifos	b)	7,200	0,004	0,05
	Fenchlorphos	a)	5,010	0,005	0,1
	Prothiophos	a)	7,283	0,029	0,407
	Dichlofenthion	a)	5,100	0,004	0,07
degradační produkty	4-nitrofenol	a)	2,680	0,034	1,242
	2,4-dichlorfenol	a)	2,720	0,03	0,405
	2,4,5 - trichlorfenol	a)	3,850	0,009	0,492
	3,5,6-trichloro-2-pyridinol	b)	3,160	0,024	1,312

Tabulka III

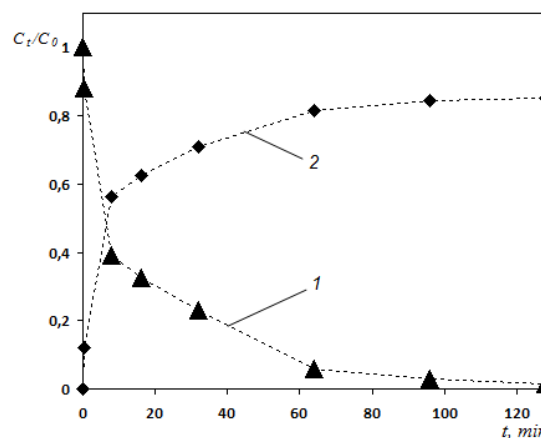
Parametry kvantifikace pro stanovení vybraných pesticidů a degradačních produktů

	Parametry	LOD ^a [mg·dm ⁻³]	LOQ ^b [mg·dm ⁻³]	DL ^c [mg·dm ⁻³]
pesticidy	Fenthion	5,676	18,920	6,238
	Malathion	5,028	16,760	5,586
	Parathion-methyl	3,351	11,170	3,813
	Chlorpyrifos	4,545	15,150	5,190
	Fenchlorphos	4,560	15,200	5,215
	Prothiophos	3,246	10,820	3,589
	Dichlofenthion	1,362	4,540	1,536
degradační produkty	4-nitrofenol	3,933	13,110	4,460
	2,4-dichlorfenol	4,095	13,650	4,491
	2,4,5 - trichlorfenol	3,099	10,330	3,509
	3,5,6-trichloro-2-pyridinol	4,125	13,750	4,565

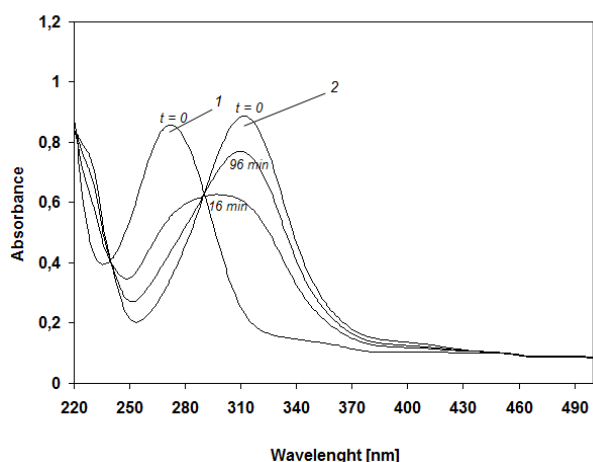
^a Trojnásobek směrodatné odchylky⁷, ^b desetinásobek směrodatné odchylky⁷, ^c pro kvantil normálního rozdělení $k_{\beta} = 1,645$ (5 %)



Obr. 1. Chromatografické sledování rozkladu pesticidu parathion-methylu (2) za vzniku jeho degradačního produktu 4-nitrofenolu (1). 1 – roztok parathion-methylu a 4-nitrofenolu o výchozí koncentraci 500 mg dm⁻³ na počátku pokusu, 2 – reakční směs po 16 min reakce za přítomnosti oxidu ceričitého, 3 – reakční směs po 96 min reakce za přítomnosti oxidu ceričitého. Chromatografická separace provedena na koloně Luna PFP s mobilní fází 80/20 (v/v) metanol/voda, průtok 1 ml min⁻¹



Obr. 2. Sledování rozkladu organofosforečných pesticidů pomocí HPLC – příklad kinetické závislosti. 1 – parathion-methyl; 2 – 4-nitrofenol



Obr. 3. Sledování rozkladu organofosforečných pesticidů pomocí UV/VIS absorpční spektrometrie. 1 – parathion – methyl; 2 – 4-nitrofenol

Závěr

Pro stanovení organofosforečných pesticidů a hlavních degradačních produktů je možno použít metod HPLC s UV/VIS detekcí. Toto stanovení je dostatečně rychlé, robustní a citlivé. Vhodné je současně zaznamenávat UV/VIS spektra, která poskytují dodatečnou informaci o identitě látek i o stupni přeměny. Pro potvrzení identity neznámých reakčních produktů lze s výhodou využít GC-MS, zatímco aplikace LC-MS neznamenal žádný významnější přínos pro studium mechanismu degradace pesticidů. Vzhledem k tomu, že některé modelové látky ze skupiny organofosforečných sloučenin mohou být degradovány až na jednoduché organické kyseliny, případně anorganické anionty (např. fosforečnany), byly vyvinuty a validovány metody stanovení těchto látek iontovou chromatografií.

Samostatné odborné práce studentů FŽP UJEP jsou podporovány v rámci projektu Modernizace výuky technických a přírodovědných oborů na UJEP se zaměřením na problematiku ochrany životního prostředí (ENVIMOD), který je podporován MŠMT v rámci programu OPVK, č. projektu CZ.1.07/2.2.00/28.0205.

LITERATURA

1. Janoš P., Kuráň P., Kormunda M., Štengl V., Matys Grygar T., Došek M., Šťastný M., Ederer J., Pilařová V., Vrtoch L.: Preparation of cerium dioxide from carbonate precursor and its utilization for fast degradation of organophosphate pesticide parathion methyl, připraveno k publikaci (2013).
2. Dong M. W.: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Wiley, New York 2006.
3. Hermann E: *Chromatography Fundamentals and Applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods - Part B: Applications*. Elsevier, New York 1983
4. Khuhawar M. Y., Channar A. H., Lanjwani S. N., Mahar K. P.: *J. Chem. Soc. Pak.* 18, 306 (1996).
5. Sharma D., Nagpal A. et al.: *Talanta*. 82, 1077 (2010).
6. Baig S. A., Akhtera N. A., Ashfaq M., Asi M. R.: *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 6, 513 (2009).
7. Suchánek M.: *Vhodnost analytických metod pro daný účel. Kvalimetrie 9*. EURACHEM-ČR, Praha 1999.

CHARAKTERIZACE ČESNEKU POMOCÍ HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÝCH METOD

PETR VODRÁŽKA, JANA HAJŠLOVÁ
a VOJTĚCH HRBEK

*Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice
petvodr@seznam.cz*

Úvod

Český česnek je v dnešní době velice žádanou komoditou. Je tedy snahou producentů zvýšit a zkvalitnit pěstování česneku na území České republiky. Tato studie je prováděna v rámci projektu „Bezpečná a kvalitní zelenina r. *Allium* se zaměřením na česnek z domácích zdrojů“ (NAZV QJ1210158). Tento projekt se zabývá charakterizací odrůd česneku, zvýšením jeho kvality a nalezením vhodné české odrůdy, která by měla co nejvyšší obsah zdraví prospěšných látek, a zároveň byla rezistentní vůči nepříznivým podmínkám při jeho pěstování. Nejvýznamnějšími zdraví prospěšnými látkami česneku jsou sirmé aminokyseliny *S*-alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidy (ASCO). Jedná se především o alliin a methiin¹. Tyto látky tvoří charakteristické aroma česneku. Proto by měla námi vybraná odrůda česneku obsahovat co nejvíce těchto látek. Použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí umožňuje analyzovat tyto sirmé aminokyseliny bez nutnosti jakékoliv úpravy (derivatizace, čištění) oproti konvenčním analytickým postupům (LC-UV). Dobré vlastnosti při analýze aminokyselin vykazuje nový typ analytické kolony HILIC. Česnek obsahuje mimo jiné i enzym alliinasu, který při porušení buněk česneku degraduje sirmé aminokyseliny česneku na další biologicky aktivní látky². Při analýze sirmých aminokyselin je nutné aktivitu tohoto enzymu inhibovat.

Česnek obsahuje i řadu dalších biologicky aktivních látek, např. vitamíny, steroidní glykosidy, prostaglandiny a látky s antivirotickými účinky³. Množství těchto látek závisí na druhu česneku a na pěstebních podmínkách. Komplexní analýzou česneku by tedy bylo možné odlišit vzorky česneků různého druhu a původu. K tomu se využívá tzv. metabolomického přístupu, jehož cílem je globální analýza nízkomolekulárních sloučenin⁴. Metabolomické profily se získávají proměněním extraktu pomocí vysoko-rozlišovacích hmotnostních detektorů (HR-MS), které analyzují široký hmotnostní rozsah v krátkém čase s vysokou přesností hmoty. Mezi tyto detektory patří např. analyzátor typu Orbitrap a analyzátor doby letu TOF^{4,5}.

Experimentální část

V této studii bylo využito několik postupů pro charakterizaci česneku. Jednak byla využita technika kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s HR-MS typu Orbitrap pro stanovení ASCO. A dále byl využit nový inovativní postup s využitím iontového zdroje přímé analýzy v reálném čase (DART) ve spojení s HR-MS typu Orbitrap. Také byly vzorky česneku vyšetřeny pomocí techniky LC ve spojení s HR-MS typu TOF a byl zkoumán i potenciál techniky přímého nástřiku extraktu do hmotnostního analyzátoru/detektoru.

Celkem bylo analyzováno 31 vzorků různých druhů česneku, které dodal Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Příprava vzorku je jednoduchá. Přibližně 20 g nepoškozených oloupaných stroužků česneku se vloží do laboratorního mixéru. Ke vzorku se odměří 60 ml inhybitoru allinas *O*-(karboxymethyl)hydroxylaminhemihydrochlorid (OCMHA; 1,1 g l⁻¹, rozpouštědlo MeOH/H₂O 1:1, pro účel metabolomiky byl jako rozpouštědlo použit čistý methanol) a 2 ml vnitřního standardu norleucinu (5 g l⁻¹, rozpouštědlo MeOH/H₂O 1:1). Vzorek se 1 minutu homogenizuje, přičemž současně dochází k extrakci. Vzniklá suspenze se odstředí (5 min, 10 000 rpm) a přefiltruje se přes mikrofiltr (0,25 μm). Pro stanovení sirmých aminokyselin se vzorek ředí 1:9 a 1:39 (MeOH/H₂O 1:1).

Jednou z metod k charakterizaci česneku je analýza sirmých aminokyselin. K analýze byl použit přístroj Exactive LC-MS s analyzátozem typu Orbitrap od firmy Thermo Scientific s ionizací elektrosprejem (ESI). Aminokyseliny byly separovány kolonou HILIC (3 × 10 mm, 3 μm) s mobilní fází acetonitril a voda s 50mM mravenčanem amonným a 0,2 % kyseliny mravenčí. Analyzováno bylo pět sirmých aminokyselin: alliin, methiin, ethiin, propiin, buthiin. Jako vnitřní standard byl použit norleucin.

Analýza metabolomických profilů jednotlivých druhů česneku se prováděla metodou DART na již zmíněném přístroji Exactive (Thermo) s iontovým zdrojem DART-SVP od firmy IonSense.

Pro účel komplexního vyšetření vzorku byla vyvinuta profilovací metoda využívající separační krok pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jde o analýzu s využitím MS detektoru typu SYNAPT[®] G2 HMDS QTOF s ionizací elektrosprejem, kterému předchází separace pomocí kapalinové chromatografie. Byla použita kolona HILIC (2,1 × 150 mm, 3 μm) a mobilní fáze acetonitril a voda s 0,2M mravenčanem amonným a 0,5 % kyseliny mravenčí.

Další metodou metabolomického profilování je přímý nástřik (DI) do HR-MS QTOF s ionizací elektrosprejem. Jde o přístroj SYNAPT[®] G2 HMDS QTOF od firmy Waters. Jako mobilní fáze byl použitý roztok vody

a MeOH (1:1). Analýza proběhla v pozitivním i negativním módu.

Díky odlišnému způsobu ionizace od techniky DART-MS, technika DI-ESI-MS poskytuje unikátní informace o vzorku a doplňuje tak informace získané z DART-MS a LC-MS a společně tak tvoří komplexní vyšetření vzorku (příprava extraktů je ve všech případech stejná).

Výsledky a diskuse

Analýza sirných aminokyselin pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí se osvědčila. Z pěti zkoumaných aminokyselin byly v česneku detegovány tři (alliin, methiin, propiin). Ethiin a buthiin byly pod mezí stanovitelnosti, která odpovídá koncentraci $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ vzorku. Tato metoda vykazuje také dobrou opakovatelnost (tab. I).

Výsledky analýzy ukázaly, že obsah sirných aminokyselin je různý v jednotlivých odrůdách. Díky tomu můžeme ve spolupráci s Výzkumným ústavem rostlinné výroby vybrat odrůdu, která bude mít obsah těchto látek vysoký. Do budoucna se analýza sirných aminokyselin zdá být jako vhodná metoda ke zjištění kvality česneku, způsobu jeho pěstování a původu.

Komplexní analýzou metabolomu česneku pomocí metody DART-MS byly získány metabolické profily jednotlivých druhů, tzv. fingerprinty. Porovnáním profilů jsme zjistili, že se liší jak obsahem píků/látek, tak i jejich intenzitou. To je vidět na příkladu dvou spekter různých

odrůd česneku (obr. 1). Díky vysoké rozlišovací schopnosti je na základě přesné hmoty možné některé látky identifikovat.

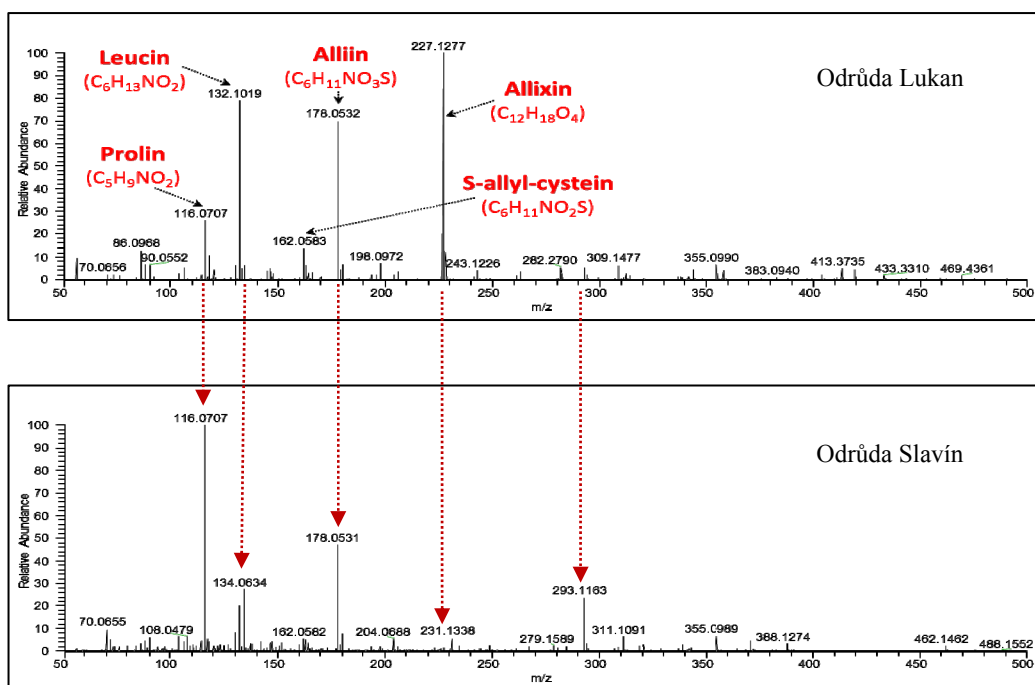
Analýza metabolických profilů česneku pomocí techniky přímého nástřiku do hmotnostního analyzátoru typu TOF (DI-ESI-MS) je srovnatelná s metodou DART. Analyzátor TOF využívá ionizaci elektrosprejem, což je technika velmi měkká. Spektra proto obsahují převážně mateřské ionty. Na obr. 2 je příklad dvou spekter různých odrůd česneku.

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního analyzátoru typu TOF je dobrým analytickým nástrojem pro identifikaci látek přítomných v extraktu z česneku. Rozdíl mezi předchozími metodami je hlavně ve výstupních datech. Chromatografický záznam obsahuje plnou spektrální informaci, tudíž pro každý chromatografický pík je možno získat příslušné hmotnostní spektrum. Vzorky byly vyšetřeny jak v pozitivním, tak i v negativním

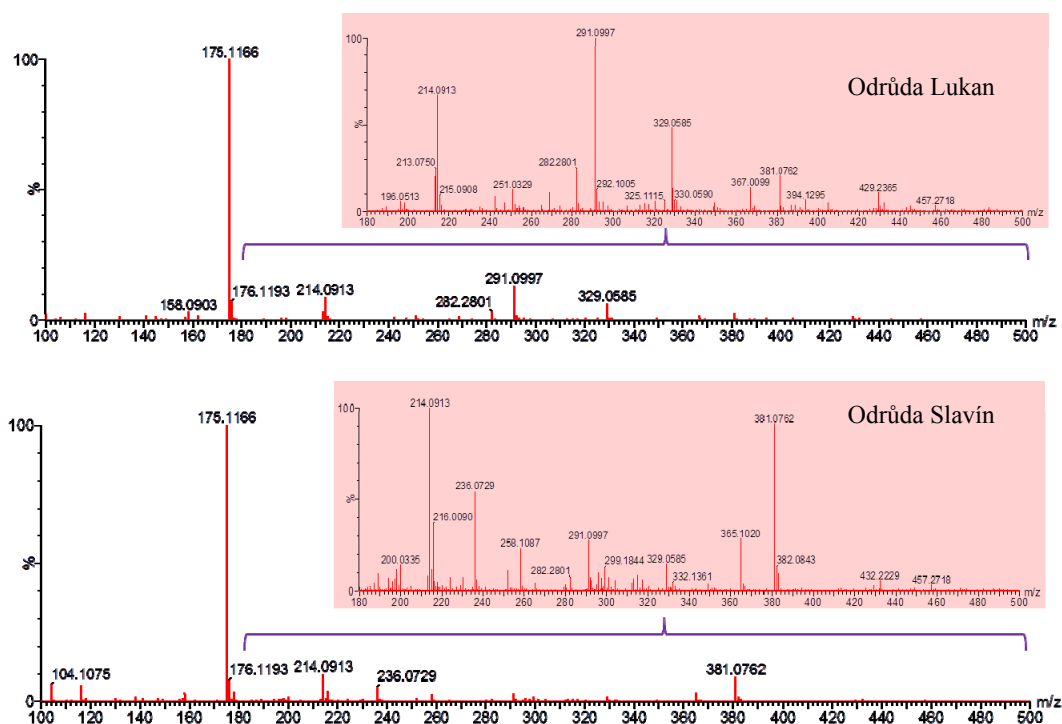
Tabulka I

Opakovatelnost stanovení sirných aminokyselin v česneku

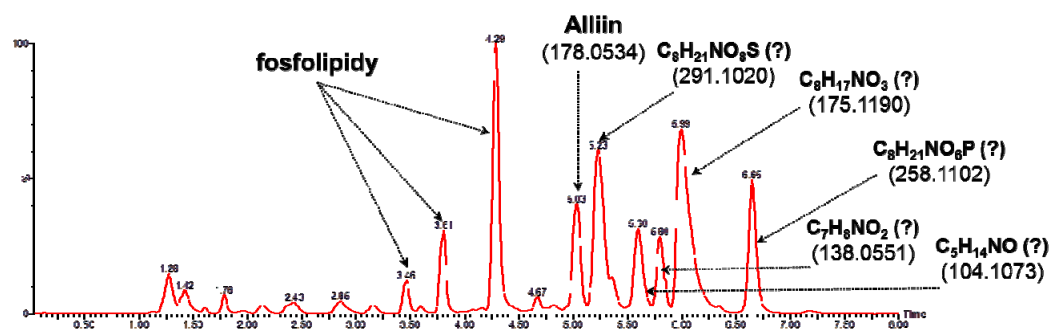
Opakovatelnost extrakce			
	Alliin	Propiin	Methiin
RSD %	11,00	7,60	6,40
Opakovatelnost nástřiku			
	Alliin	Propiin	Methiin
RSD %	4,00	4,00	4,00



Obr. 1. Příklad (DART-MS) hmotnostních spekter dvou odrůd česneku Lukan a Slavín



Obr. 2. Příklad (DI-ESI-MS) hmotnostních spekter dvou odrůd česneku Lukan a Slavín



Obr. 3. Příklad chromatogramu odrůdy Slavín

módu ionozace. Identifikace analytů je prováděna na základě velmi přesné hmoty (m/z) a znalosti získaného elementárního složení. Ke zpracování naměřených dat se používá program MassLynx (Waters). Příklad chromatogramu extraktu česneku je uveden na obr. 3.

Závěr

Byla vyvinuta LC-MS metoda pro stanovení sirmých aminokyselin (ASCO) v česneku (alliin, methiin a propiin). Byly získány charakteristické metabolické fin-

gerprinty (třemi různými MS technikami), na základě kterých je možno jednotlivé vzorky česneku charakterizovat podle odrůdy (případně dle původu, pěstebních podmínek, skladování). S využitím vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie je možná identifikace vybraných látek na základě měření přesné hmoty, znalosti elementárního složení, MS/MS spektra a informací z literatury, event. on-line databázi.

DART-MS, LC-MS a DI-ESI-MS techniky jsou účinným nástrojem pro charakterizaci česneku, hodnocení kvality česneku a stanovení autenticity. Potenciál těchto technik, zejména ve spojení se zpracováním naměřených

dat pomocí statistických analýz, by mohl být využit k případnému odhalení falšování, tedy např. vydávání odrůdy česneku původem z jiné země než ČR za odrůdu pocházejících z ČR. Tento potenciál bude předmětem následujících experimentů, které možnost odhalení falšování potvrdí či vyvrátí.

LITERATURA

1. Ovesna J. et al: *Sci. Hortic.* 129, 541 (2011).
2. Horníčková J. et al: *Czech J. Food Sci.* 29, 373 (2011).
3. Gorinstein S. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 4418 (2008).
4. Møller J. K. S., Catharino R. R.: *Analyst* 130, 890 (2005).
5. Hajslova J., Cajka T.: *Trend. Anal. Chem.* 30, 204 (2011).

OBSAH PŘÍSPĚVKŮ

<i>J. Balán, M. Vosmanská, O. Mestek</i>	Speciační analýza selenu v semenech řepky olejky	s215
<i>M. Bartošková, M. Farková, P. Lubal</i>	Stanovení sířičitanů ve víně	s219
<i>M. Černá</i>	Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu mikrokapalinovou chromatografií	s222
<i>S. Černohorská, J. Hajšlová, E. Čížková</i>	Nová analytická strategie pro simultánní stanovení esterů 3-MCPD a glycidolu	s225
<i>K. Činčalová, V. Čeřovský, T. Hrubý, V. Setnička</i>	Studium vztahu konformace a antimikrobiální aktivity nového antimikrobiálního peptidu lasioglossinu	s229
<i>M. Došek, D. Trísková, J. Fikarová</i>	Stanovení syntetických barviv E 122 (azorubin) a E 124 (Ponceau 4R) v nealkoholických nápojích metodou iontové interakční chromatografie a diferenční pulzní polarografie	s233
<i>A. Jenišťová, P. Matějka</i>	Studium kůže pomocí infračervené spektrometrie	s236
<i>J. Koktan, P. Řezanka, P. Matějka, V. Král</i>	Stanovení poměru enantiomerů L- a D-cysteinu pomocí nanočástic stříbra	s240
<i>A. Krmela, V. Krtková, V. Schulzová</i>	Vývoj UPLC-ELSD metody pro stanovení polysacharidu inulinu	s243
<i>M. Libánský, J. Zima, J. Berek, H. Dejmková</i>	Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou	s247
<i>J. Moravčík, K. Hroboňová</i>	Separácia enantiomérov nederivatizovaných aminokyselín metódou HPLC	s253
<i>H. Ryšavá, P. Řezanka, V. Král</i>	Stanovení konstant stability komplexů β-cyklodextrinu a enantiomerů Trögerovy báze	s257
<i>J. Schwarz, I. Goncharova</i>	Využití spektroskopie ECD ke sledování konkurenční vazby léčivo-bilirubin na sérový albumin: role sekundárních vazebných míst	s261
<i>H. Šmejkalová, V. Vyskočil</i>	Voltametrické stanovení 4-nitrofenolu na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě	s265
<i>A. Spevak, K. Hroboňová</i>	Využitie polyméru s odtlačkom molekuly umbeliferónu pri analýze rastlinných vzoriek	s270
<i>M. Šťastný, O. Pelant, J. Ederer</i>	Sledování degradace organofosforečných pesticidů na reaktivních sorbentech pomocí chromatografických a spektrálních metod	s273
<i>P. Vodrážka, J. Hajšlová, V. Hrbek</i>	Charakterizace česneku pomocí hmotnostně spektrometrických metod	s277

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Balán J. s215
Barek J. s247
Bartošková M. s219

Černá M. s222
Černohorská S. s225
Čeřovský V. s229
Činčalová K. s229
Čížková E. s225

Dejmková H. s247
Došek M. s233

Ederer J. s273

Farková M. s219
Fikarová J. s233

Goncharova I. s261

Hajšlová J. s225, s277
Hrbek V. s277
Hroboňová K. s253, s270
Hrubý T. s229

Jeništová A. s236

Koktan J. s240
Král V. s240, s257
Krmela A. s243
Krtková V. s243

Libánský M. s247
Lubal P. s219

Matějka P. s236, s240
Mestek O. s215
Moravčík J. s253

Pelant O. s273

Ryšavá H. s257

Řezanka P. s240, s257

Setnička V. s229
Schulzová V. s243
Schwarz J. s261
Spevak A. s270

Šmejkalová H. s261
Šťastný M. s273

Třísková D. s233

Vodrážka P. s277
Vosmanská M. s215
Vyskočil V. s261

Zima J. s247

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 107(S), čís./no. Symposia • LISTY CHEMICKÉ roč./vol. 137, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 123 • 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. Bělohlav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, 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), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, 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: Rodomax s.r.o., Rezekká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují • Redakce čísla Symposia (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2013 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 177 Kč, roční plně předplatné 2013 (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 2013 (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. Drašar • Dáno do tisku 26.8.2013.