

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

„O CENU FIRMY MERCK 2012“

1. a 2. února 2012

Praha



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

JUBILEJNÍ 15. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENTSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE „O CENU FIRMY MERCK 2012“

Ve dnech 1. a 2. února 2012 úspěšně proběhl v reprezentačních prostorách firmy Merck ČR v Praze 4 již 15. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck 2012“ za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie. Tato již tradiční soutěž letos dobře zapadla do oslav 20. výročí působení firmy Merck na českém trhu. Odborná záštita proto letos připadla Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, tíha organizačního zajištění ležela na pracovnících firmy Merck ČR, kteří se tohoto úkolu zhostili vynikajícím způsobem. V letošním roce se této úspěšné akce pořádání ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické zúčastnilo rekordních 33 účastníků ze sedmi českých a dvou slovenských vysokých škol. Úroveň všech soutěžních prací byla velmi vysoká a všichni soutěžící důstojně reprezentovali svá pracoviště, která svou péčí o výchovu nastupující generace analytických chemiků výrazně přispívají k rozvoji analytické chemie v České i Slovenské republice. Proto bych zde rád poděkoval všem soutěžícím bez ohledu na jejich konečné umístění za vynikající výsledky i jejich znamenitou prezentaci.

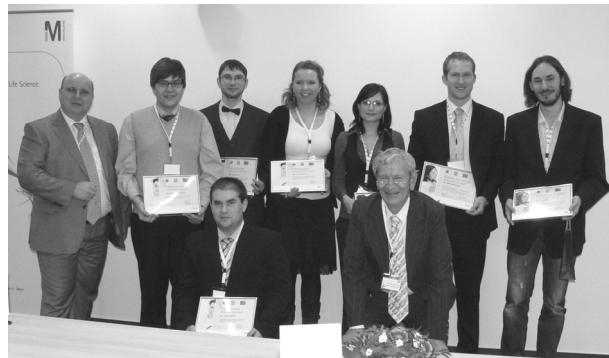
1. místo získal **Bc. Michal Stupák** z Ústavu chemie a analýzy potravin Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze za práci „*Stanovení organických kontaminantů plynovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS)*“.

2. místo získala **Bc. Sylvie Skaličková** z Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně za práci „*Izolace a stanovení laktoferinu z lidských slin*“.

3. místo získal **Bc. Jan Mika** z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za práci „*Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku v methanolickém roztoku*“.

Vzhledem k mimořádné kvalitě přednesených prací se porota rozhodla udělit zvláštní cenu poroty následujícím soutěžícím: **Bc. Jozefu Sochrovi** (Ústav analytickej chémie, STU Bratislava) za práci „*Voltampérometrické stanovenie vybraných antibiotík na báze penicilínov*“, **Bc. Evě Jílkové** (Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně) za práci „*Plně automatizovaná izolace zinkových proteinů vzájemných zinek z buněk Staphylococcus aureus pomocí paramagnetických částic s elektroforetickou detekcí izolovaných proteinů*“, **Bc. Janu Pavlíkovi** (Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci) za práci „*Stanovení kyseliny jasmonové v biologickém materiálu*“ a **Bc. Romanu Poláčkovi** (Ústav analytickej chémie, STU Bratislava) za práci „*Chemometria fluorescenčnej spektrometrie – určovanie pravosti brandy*“.

Všem oceněným srdečně blahopřejeme a všem účastníkům děkujeme za odvedenou práci i krásné prezentace.



Studenti ocenění v soutěži “ O cenu firmy Merck 2012“ Zleva Artur Stawiský, Roman Poláček, Jan Pavlík, Eva Jílková, Sylvie Skaličková, Michal Stupák, Jan Mika. V popředí Jozef Sochr a Jiří Barek

Lze konstatovat, že letošní soutěž byla pracovníky firmy Merck ČR zorganizována naprosto dokonale a proběhla ve vynikající přátelské i odborné atmosféře, k níž nepochybně patřil i večer v rázovité pražské restauraci Výtopna. Díky všem účastníkům patří pochopitelně i porotě, která měla opravdu těžký úkol vzhledem k vysoké kvalitě soutěžících a která pracovala ve složení doc. Ing. M. Adam, PhD., Ing. Z. Antalová, prof. RNDr. J. Barek, CSc., prof. Ing. V. Kanický, DrSc., prof. Ing. O. Mestek, CSc., Ing. D. Milde, PhD., RNDr. H. Pokorná a Ing. L. Švorc, PhD.

Srdečné poděkování autora těchto řádků patří panu Arturovi Stawiskému, řediteli Divize chemikálií a laboratorních produktů firmy Merck Česká republika za jeho podporu nejen letošního ročníku této soutěže, ale i řady ročníků minulých a celé řady dalších aktivit České společnosti chemické. Totéž platí o paní Ing. Lence Ungrmanové, která letos i v letech minulých podstatně přispěla k úspěšnému průběhu soutěže.

V neposlední řadě patří poděkování i Ing. R. Řápkové, výkonné redaktorce časopisu Chemické listy, za pečlivou přípravu sborníku a RNDr. V. Vyskočilovi, PhD. za vynikající organizačtorskou práci.

Na závěr nezbývá než sdělit, že 16. ročník této příjemné a užitečné soutěže bude zajišťován kolektivem vedeným prof. RNDr. Viktorem Kanickým, DrSc. na Masarykově univerzitě v Brně ve dnech 6. a 7. února 2013, a těšit se, že bude stejně zajímavý a příjemný jako ročník letošní.

Jiří Barek

MOŽNOSTI KVANTITATIVNÍHO STANOVENÍ ESTROGENŮ V POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VODÁCH TECHNIKOU HPLC-MS-MS

ELIŠKA ČECHOVÁ a ZDENĚK ŠIMEK

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Kamenice 126/3, 625 00 Brno
270599@mail.muni.cz

Úvod

Steroidy jsou látky přírodního i antropogenního původu a v životním prostředí působí jako endokrinní disruptory – interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázu, reprodukci, vývoj nebo chování organismů. Tyto látky jsou účinné i při koncentracích podstatně nižších, než při kterých se projevují toxické efekty, což koresponduje s extrémně nízkou koncentrací hormonů v krvi a s minimálními změnami, které postačují k regulaci orgánů^{1,2}.

Cílem této práce je optimalizace extrakční techniky – extrakce na tuhou fázi (SPE) následované metodou HPLC-MS-MS s derivatizací analytů dansylchloridem. Stanovovanými látkami jsou estron (E1), β -estradiol (E2), ethynylestradiol (EE2) a estriol (E3), které mají nejvyšší estrogenní potenciály. Metoda byla aplikována na reálné matrice – povrchové a odpadní vody různé čistoty z okolí Brna. V souvislosti s kvantitativním stanovením estrogenů byly studovány vlivy různých typů matrice na velikost signálu v MS – výstupem je zhodnocení matricových efektů a výtěžnosti.

Experimentální část

Chemikálie

Acetonitril pro HPLC (99,9%), mravenčí kyselina (98%), 17 β -estradiol (98%), 17 α -ethynylestradiol (98%), estron (99,3%), estriol (99,9%), dansylchlorid, hydrogenuhličitan sodný (vše Fluka, Sigma-Aldrich, Německo), methanol (99,9%), aceton (Labscan, Polsko), 17 β -estradiol -2,4,16,16-d₄, 98 atom% D (CDN Isotopes, Kanada). Zásobní roztoky všech použitých estrogenů připraveny a uchovávány v acetonitrilu.

Instrumentace

HPLC Agilent 1200 Series
MS-MS Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS, SPE extraktor J. T. Baker, Inc.

Derivatizace

Vzhledem k nízkým hladinám steroidních hormonů vyskytujících se v prostředí (toxické efekty lze pozorovat již při koncentracích ve vodě 1 ng l⁻¹ pro E2 a E1, 3 ng l⁻¹ pro E3 a méně než 0,1 ng l⁻¹ pro EE2) a v návaznosti na předchozí optimalizaci přímého stanovení estrogenů ve standardních roztocích³ metodou HPLC-MS-MS (ILD 2–4 ng ml⁻¹) bylo třeba zavést metodu, jejíž limity kvantifikace jsou výrazně pod environmentálně relevantními koncentracemi. Byla zvolena předkolonová derivatizace dansylchloridem^{4,5,6} – ke 20 μ l roztoku směsi estrogenů v acetonu bylo přidáno 50 μ l NaHCO₃ (pH 10,5, NaOH, c = 100 mmol l⁻¹). Směs byla 1 min míchána (Vortex) a následně bylo přidáno 20 μ l dansylchloridu (1 mg ml⁻¹, aceton). Poté byla směs opět 1 min míchána (Vortex), odpařena do sucha pod mírným proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsi methanol (MeOH):H₂O=60:40, v/v. Parametry LC-MS jsou shrnuty v tabulce I, MRM přechody pro jednotlivé estrogény, fragmentační napětí a kolizní energie jsou uvedeny v tabulce II.

SPE extrakce

Pro analýzu estrogenů v reálných vzorcích se ukázal jako nejvhodnější následující postup⁸: kondicionace SPE kolony (Oasis HLB, 60 μ m, 12 cm³, 500 mg) 7,5 ml methylerbutyletheru (MTBE), promytí 7,5 ml MeOH a 7,5 ml destilované vody, nanesení 250 ml vzorku (okyselený na pH 3, CH₃COOH), proplach 7,5 ml 40% MeOH ve vodě, reekvilibrace 7,5 ml vody, promytí 7,5 ml 10% MeOH/2% NH₄OH ve vodě. Eluce byla provedena 15 ml směsí MTBE:MeOH=90:10, v/v. Extrakt byl poté odpařen do sucha pod mírným proudem dusíku (teplota zahřívání do 35 °C). Následovala derivatizace podle výše uvedeného postupu.

Výsledky a diskuse

Chromatogram směsi standardů estrogenů o koncentraci c = 200 pg ml⁻¹ je uveden na obr. 1.

Optimalizovaná metoda byla aplikována na reálné vzorky vody různé čistoty (Brněnská přehrada, přítok a odtok z čistírny odpadních vod – ČOV Modřice). U těchto matric byly vyhodnoceny matricové efekty a výtěžnosti dle jednoho z doporučených postupů⁷. Pro tento účel byly provedeny následující tři série experimentů s každou matricí:

1. Příprava standardních roztoků derivatizovaných estrogenů (E1, E2, EE2, E3) spolu s interním standardem E2-D o koncentraci 30, 300, 600, 900, 1200 a 1500 pg ml⁻¹.

Tabulka I

Optimalizované parametry LC-MS-MS metody pro stanovení derivatizovaných steroidů E1, E2, EE2 a E3

Kolona	ACE 3 C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 μm)
Složení MF	A=HCOOH ve vodě (7 mmol l ⁻¹) B=acetonitril + HCOOH (7 mmol l ⁻¹)
Gradient MF	0–3,5 min: 60% B 3,5–17 min: 60–92% B 17–18 min: 92–60% B 18–25 min: 60% B
Průtok MF	0,3 ml min ⁻¹
Objem nástřiku	10 μl
Teplota kolony	25 °C
Rozpouštědlo vzorku	MeOH:H ₂ O=60:40, v/v
Iontový zdroj	ESI ⁺
Teplota zmlžovacího plynu	320 °C
Průtok sušícího plynu (dusík)	8 l min ⁻¹
Tlak plynu ve zmlžovači	0,34 MPa
Kapilární napětí	4500 V
ILD ^a , pg ml ⁻¹	E3: 1,2, E2: 2,7, EE2: 4,5, E1: 13,4

^a ILD vypočteny jako koncentrace analytu ve vzorku, která odpovídá trojnásobku poměru signálu k šumu

Tabulka II

MRM přechody, napětí fragmentoru a kolizní energie pro derivatizované estrogeny

Estrogen	Kvantifikační MRM přechod	Kvalifikační MRM přechod	Fragmentor [V]	Kolizní energie [V]
Dansyl-EE2	530→171	530→156	250	40
Dansyl-E2	506→171	506→156	250	42
Dansyl-E1	504→171	504→156	250	38
Dansyl-E3	522→171	522→156	250	42
Dansyl-E2-D	510→171	510→156	250	42

2. Zpracování vzorků vody výše uvedeným postupem SPE a následná derivatizace, obohacení matrice směsí estrogenů o koncentracích stejných jako v bodě 1 bylo provedeno po extrakci.

3. Jednotlivé vzorky vody byly obohaceny estrogeny před SPE extrakcí.

U každé série analýz zpracovaných vzorků byly analyzovány slepé pokusy. Matricový efekt (*ME*) byl poté vypočten jako poměr ploch *A* LC-MS chromatogramů série 2 a 1 (obohacení po extrakci/standardní roztoky), výtěžnost (*RE*) byla určena jako poměr ploch série 3 a 2 (obohacení před extrakcí/po extrakci). Celková účinnost metody (*PE*) zahrnující předchozí dva efekty je vyjádřena jako součin *ME* a *RE*:

$$ME (\%) = A_2/A_1 \cdot 100$$

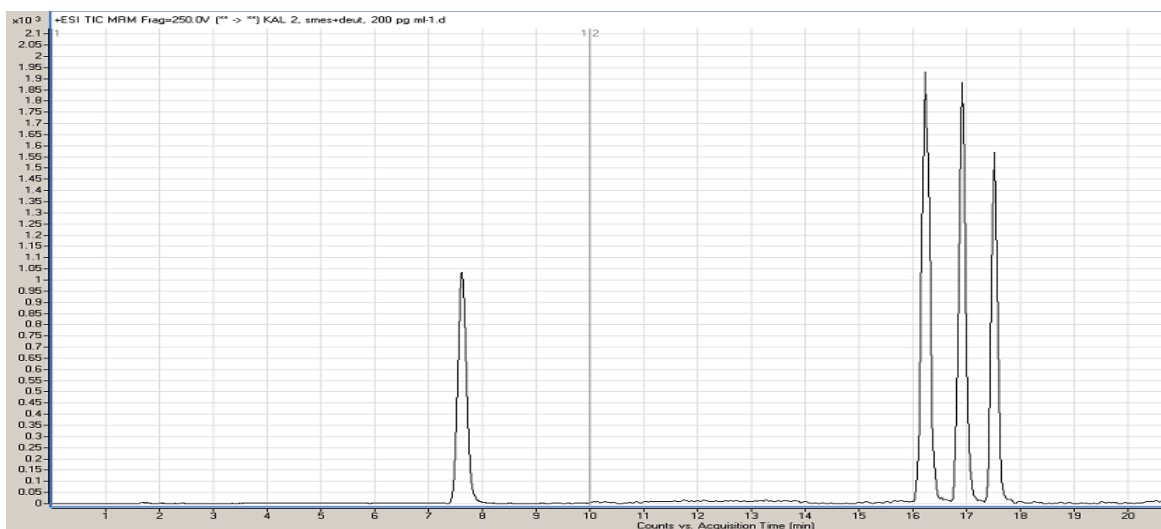
$$RE (\%) = A_3/A_2 \cdot 100$$

$$PE (\%) = ME \cdot RE / 100$$

Výsledky matricových efektů, výtěžností a celkové účinnosti metody jsou uvedeny v tabulkách IIIa, IIIb, IIIc.

Závěr

V této práci byla optimalizována metoda pro stanovení estrogenů v povrchových vodách. Srovnáním s publikovanými pracemi metoda poskytuje v čistých roztocích velmi dobré limity detekce i výtěžnosti. Vhodnost metody

Obr. 1. LC-MS chromatogram směsi estrogenů, $c = 200 \text{ µg ml}^{-1}$, podmínky měření v tabulce I

Tabulka IIIa

Vypočtené hodnoty *ME*, *RE* a *PE* (vše uvedeno v %) pro vzorek vody z Brněnské přehrady

c , pg ml^{-1}	E3			E2			E2-D			EE2			E1		
	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>
30	77	28	22	62	37	23	11	189	21	30	147	45	15	26	4
300	82	67	55	68	100	69	35	76	27	63	153	97	66	99	66
600	70	52	36	73	67	49	54	42	23	71	77	54	68	72	48
900	78	37	29	68	46	31	62	34	21	71	63	45	74	71	52
1200	62	38	24	57	58	33	53	41	21	62	66	41	62	85	53
1500	67	50	33	74	55	41	61	49	30	66	80	53	63	85	54

Tabulka IIIb

Vypočtené hodnoty *ME*, *RE* a *PE* (vše uvedeno v %) pro vzorek vody z odtoku z ČOV Modřice

c , pg ml^{-1}	E3			E2			E2-D			EE2			E1		
	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>
30	0	0	0	39	109	42	0	0	0	65	236	153	45	20	9
300	67	120	80	98	105	102	46	470	215	121	127	154	86	52	45
600	39	153	60	81	99	81	32	427	135	76	122	93	54	83	45
900	33	156	51	58	95	55	29	392	113	57	134	76	46	101	47
1200	31	148	46	40	125	50	35	308	107	52	118	61	47	94	44
1500	43	98	42	50	118	59	26	428	110	45	144	65	44	125	55

Tabulka IIIc

Vypočtené hodnoty *ME*, *RE* a *PE* (vše uvedeno v %) pro vzorek vody z přítoku do ČOV Modřice

<i>c</i> , pg ml ⁻¹	E3			E2			E2-D			EE2			E1		
	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>	<i>ME</i>	<i>RE</i>	<i>PE</i>
30	95	195	185	17	110	19	0	0	0	74	66	49	542	115	624
300	41	125	51	8	159	12	0	0	0	38	89	34	177	89	157
600	21	142	29	4	145	6	0	0	0	20	72	15	86	85	73
900	13	134	17	3	133	4	0	0	0	13	69	9	52	102	53
1200	8	164	14	1	202	2	0	0	0	10	70	7	37	108	40
1500	5	260	13	1	252	3	0	0	0	8	71	6	35	86	30

pro účely kvantifikace v reálných environmentálních maticích byla testována určením hodnot *ME* a *RE* dle doporučených postupů. Srovnáním hodnot *ME* a *RE* pro vody různé čistoty byl pozorovatelný výrazný efekt potlačení ionizace deuterovaného E2-D, odezva byla zcela potlačena ve vzorcích z přítoku do ČOV. Interní standardizace při kvantifikaci v tomto případě není použitelná.

Z uvedených výsledků vyplývá, že efekt matrice při stanovení estrogenních látek je velký a je nutno věnovat důkladnější pozornost odstranění interferentů. Použitá SPE metoda doporučená pro odstranění huminových kyselin a organických látek v tomto případě není dostatečná a bude nutno zařadit další čisticí krok (SPE, sorbent Florisil), a to i za cenu nižších výtěžností. Metoda eliminace matričních efektů ředěním matrice⁹ nebyla v případě vzorků z ČOV účinná.

LITERATURA

- Hohenblum P., Gans O., Moche W., Scharf S., Lorbeer G.: *Sci. Total Environ.* 333, 185 (2004).
- Koh Y. K. K., Chiu T. Y., Boobis A., Cartmell E., Lester J. N., Scrimshaw M. D., *J. Chromatogr., A* 1173, 81 (2007).
- Čechová E.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita, Brno 2009.
- Salvador A., Moretton C., Píram A., Faure R.: *J. Chromatogr., A* 1145, 102 (2007).
- Lien G. W., Chen Ch. Y., Wang G. S.: *J. Chromatogr., A* 1216, 956 (2009).
- Lien G. W., Chen Ch. Y., Wang G. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1973 (2007).
- Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Enz C. M.: *Anal. Chem.* 75, 3019 (2003).
- Oasis Sample Preparation, Waters Corporation, 2008.
- Jacquet R., Miège C., Bados P., Schiavone S., Coquery M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 279 (2012).

VOLTAMETRICKÁ A AMPÉROMETRICKÁ DETEKCE AMINO DERIVÁTŮ BIFENYLU A NAFTALENU NA SÍTOTISKOVÉ UHLÍKOVÉ ELEKTRODĚ

JAN DĚDÍK, MARCELA JANOVCOVÁ,
HANA DEJMKOVÁ, JIŘÍ BAREK a KAROLINA
PECKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektro-
chemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
dedija@gmail.com

Úvod

Tato práce je zaměřena na využití nemodifikovaných sítotiskových uhlíkových elektrod (screen-printed carbon electrode, SPCE) ve vsádkové voltametrii a jako ampérometrického detektoru pro stanovení směsi amino derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH). Pro separaci jednotlivých látek ve směsi byla využita technika vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC). Studovanými látkami jsou 1-aminonaftalen (1-AN), 2-aminonaftalen (2-AN), 2-aminobifenyl (2-AB), 4-aminobifenyl (4-AB). Dva z těchto derivátů, konkrétně 2-aminonaftalen a 4-aminobifenyl, jsou podle IARC zařazeny do skupiny 1 – látky karcinogenní pro člověka¹.

Tištěné uhlíkové elektrody mají podobu malých proužků. Jejich běžné rozměry nepřesahují několik desítek milimetrů na délku, do 15 mm na šířku a do 1 mm na výšku. Elektrody je možné připravit v laboratoři pomocí vlastního přístroje nebo jsou snadno komerčně dostupné od desítek společností. SPCE byly vyvinuty jako levná jednorázová zařízení, jež se po provedení jedné analýzy vyhodí. Tím je řešen problém „paměti“ objevující se u pevných elektrodových materiálů při opakovaném používání². Přestože jsou elektrody původně zamýšleny jako jednorázové, byla v několika studiích prokázána jejich způsobilost k opakovanému použití^{3,4}. Díky své velikosti se dají snadno využít v přenosných přístrojích pro *in situ* měření a malá plocha pracovní elektrody umožňuje nízkou spotřebu vzorku⁵. Jejich použitelnost byla ověřena jak ve vsádkových, tak v průtokových metodách.

Experimentální část

Byly použity tyto chemikálie: 2-aminobifenyl (97%, Sigma Aldrich), 4-aminobifenyl (97%, Sigma Aldrich), 1-aminonaftalen (98%, Sigma Aldrich), 2-aminonaftalen (95%, Sigma Aldrich), acetonitril (LiChrosolv[®] HPLC grade, Merck, Německo), dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema, Brno, Česká republika), kyselina fosforečná (85%, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), hexakvanoželeznatan draselný (Lachema, Brno, Česká

republika), deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Voltametrická měření se prováděla na přístroji Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend Plus, Praha) ovládaným programem Polar Pro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha), který pracoval v operačním systému Microsoft Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení na SPCE na plastovém podkladu (DropSens, Španělsko). Pracovní elektrodou byla tištěná uhlíková elektroda, geometrická plocha elektrody byla 12,6 mm². Jako referentní elektroda sloužila pseudoreferentní tištěná argentchloridová elektroda a jako pomocná elektroda se používala tištěná uhlíková elektroda.

Kapalinový chromatograf tvořily tyto součásti: gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrometrický UV/VIS detektor L-7400, řídicí jednotka D-7000 (vše Merck-Hitachi, Německo), potenciostat ADLC2 (Laboratorní přístroje, Česká republika), kolona LiChroCART[®] Purosphere STAR RP-18e, 125×4 mm, 5 μm (Merck, Německo). Přes řídicí jednotku byl chromatogram spojen s osobním počítačem a byl ovládán programem HSM (Merck-Hitachi, Německo) pracujícím v operačním systému MS Windows NT. Ultrazvuková lázeň kvůli odvzdušnění byla prováděna přístrojem PS 02000A (Powersonic, USA).

Každá použitá tištěná uhlíková elektroda byla před prvním měřením aktivována ponořením do roztoku 0,05M fosforečnanového pufru o pH 7,0. Na elektrodu byl vložen kladný potenciál +1,2 V po dobu 120 sekund.

Pro voltametrická měření byly připraveny zásobní roztoky studovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ rozpuštěním příslušného množství dané látky deionizovanou vodou do 100ml odměrných baněk. Při diferenční pulzní voltametrii byly na elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě 50 mV. Byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV s⁻¹. Při měření odezvy studované látky v závislosti na měnícím se pH byl do 10ml odměrné baňky napipetován 1 ml vzorku a baňka byla doplněna po rysku B-R pufrum o daném pH. Takto připravený vzorek byl přelit do voltametrické nádoby a probublával se 5 min dusíkem, aby byl zbaven kyslíku. Při proměřování kalibrační závislosti byly do 10ml odměrných baněk připravovány roztoky o daných koncentracích odpipetováním příslušného množství stanovované látky a odměrná baňka byla doplněna po rysku pufrum o daném pH. Tato měření byla provedena pětkrát pro každou hodnotu pH i pro každou koncentraci vzorku. Mez detekce byla určena jako nejnižší vyhodnotitelná koncentrace z DP voltamogramů získaných při měření kalibračních závislostí.

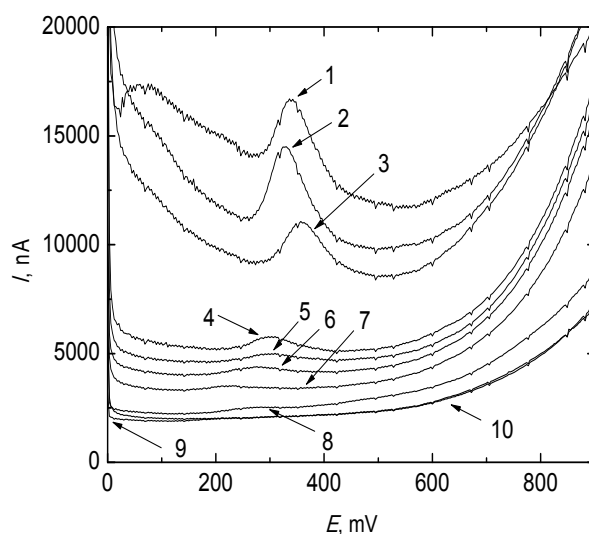
Z každé studované látky bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ odvážením přesného množství dané látky a rozpuštěním v acetonitrilu. Tyto roztoky byly používány při optimalizaci separace

a elektrochemické detekce. Roztoky o nižší koncentraci byly získány zředěním zásobních roztoků mobilní fáze. Analyty byly separovány na koloně LiChroCART® Purosphere STAR, která nebyla termostatována. Ke stanovení mrtvého času byl použit vodný roztok $K_4[Fe(CN)_6]$. Látky byly detegovány UV/VIS detektorem při vlnové délce 290 nm. Optimalizace separace byla prováděna se směsí všech studovaných látek, každá o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Mobilní fáze byly získány smísením příslušných objemových dílů acetonitrilu a vodného roztoku fosforečnanového pufru. Pufr byl připraven z 0,01M dihydrogenfosforečnanu sodného. Požadovaná hodnota pH fosforečnanového pufru byla upravována přidáním H_3PO_4 . Hodnota rychlosti průtoku mobilní fáze byla $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Obě složky mobilní fáze byly kvůli odvodu před každým použitím dány na 12 min do ultrazvukové lázně a 12 min probublány heliem. Při elektrochemické detekci byla detekční cela zapojena sériově za UV/VIS detektor. V ní byla vložena pracovní tištěná uhlíková elektroda s referentní tištěnou argenticchloridovou a pomocnou tištěnou uhlíkovou elektrodou. Detekční cela byla vyrobena z bloku silonu dle prototypu průtokové detekční cely firmy DropSens. Měření s elektrochemickou detekcí probíhala za optimalizovaných podmínek separace: mobilní fáze o složení acetonitril a 0,01M fosforečnanový pufr o pH 3,0 v poměru 40:60 (V/V). Vhodný potenciál detekce byl zjištěn z hydrodynamických voltamogramů směsi všech čtyř látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měření opakovatelnosti bylo prováděno ve FIA uspořádání, kdy byla přímo za autosampler napojena detekční cela s SPCE. Na elektrodu byl vložen potenciál $+0,9 \text{ V}$ a vzorky byly dávkovány do té doby, než elektroda přestala poskytovat odezvu nebo odezva viditelně poklesla. Měření bylo provedeno s mobilními fázemi o obsahu acetonitrilu od 20 % do 90 %, zbytek mobilní fáze byl 0,01M fosforečnanový pufr o pH 3,0. Elektroda byla vyměněna vždy po změně obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

Výsledky a diskuse

Pilotní voltametrická studie byla provedena s 4-AB. Měření jeho roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ při hodnotách pH Brittonova-Robinsonova pufru od 2,0 do 12,0 na SPCE byly získány DP voltamogramy ukazující vliv pH prostředí na velikost odezvy signálu a na potenciál oxidace aminoskupiny. S rostoucím pH docházelo k posunu píku k méně kladným potenciálům a i ke zvětšování odezvy 4-aminobifenyly. Největší odezvy bylo dosaženo v prostředí B-R pufru o pH 12,0. Voltamogramy kalibračních závislostí v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ jsou ukázány na obr. 1. Nejvyšší vyhodnotitelná koncentrace měla hodnotu $4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Kalibrační závislost byla přímo úměrná v celém sledovaném koncentračním rozsahu.

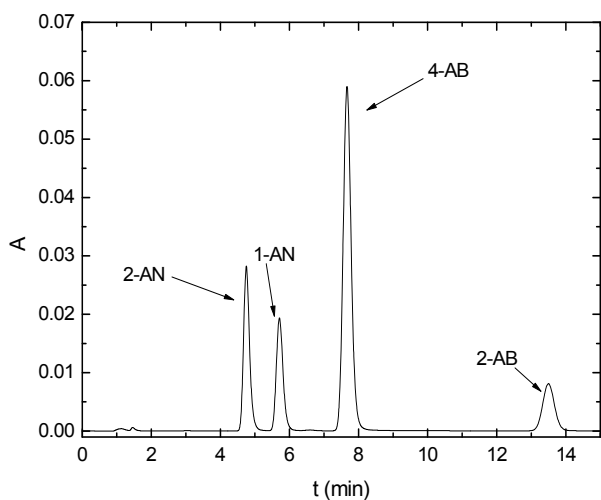
Pro analytické využití HPLC metody je důležité, aby separace proběhla v co nejkratším čase a látky ve směsi byly zároveň od sebe dostatečně odděleny. Největší vliv na dobu analýzy a rozlišení píků má složení mobilní fáze



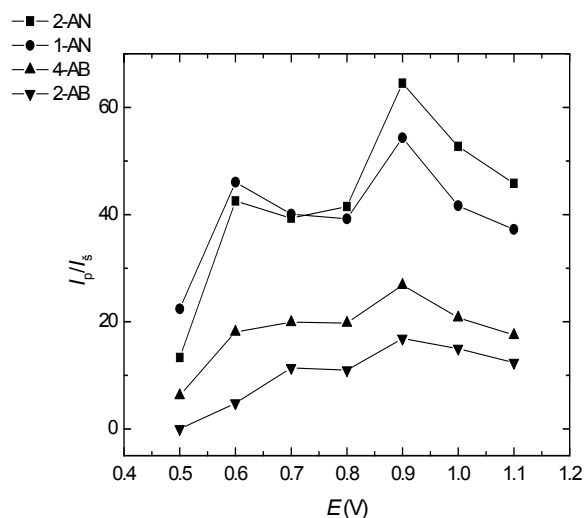
Obr. 1. DP voltamogramy 4-AB v rozmezí $1-80 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ na SPCE v prostředí B-R pufru pH 12,0. Koncentrace 4-AB: $80 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (1), $60 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (2), $40 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (3), $20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (4), $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (5), $8 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (6), $6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (7), $4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (8), $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (9), základní elektrolyt (10)

a pH vodné složky mobilní fáze. S využitím poznatků z diplomové práce Jaroslavy Zavázalové⁹ byly optimální podmínky separace hledány při 30%, 35% a 40% obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Zbytek mobilní fáze byl vždy tvořen 0,01M fosforečnanovým pufr. Byly zkoušeny hodnoty pH fosforečnanového pufru 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 a 5,0. Na kolonu bylo dávkováno $20 \text{ } \mu\text{l}$ vzorku. Koncentrace látek ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. V této fázi byl použit pouze spektrometrický detektor. Vlnová délka detekce byla nastavena na 290 nm. Nejvhodnějšími podmínkami pro separaci směsi studovaných aminonaftalenů a aminobifenyly se ukázala být mobilní fáze s 40% obsahem acetonitrilu a 60% obsahem 0,01M fosforečnanového pufru o pH 3,0. Analýza trvala méně než 15 min a všechny píky měly dostatečné rozlišení. Obr. 2 ukazuje chromatogram získaný za těchto podmínek. Při poměru acetonitril:fosforečnanový pufr 40:60 (V/V) se podařilo s dostatečným rozlišením mezi všemi píky dosáhnout doby analýzy pod 15 min. Jediné vhodné pH roztoku fosforečnanového pufru při tomto poměru složek mobilní fáze byla hodnota 3,0. Toto pH bylo používáno ve všech dalších experimentech, není-li uvedeno jinak. Při pH 2,0 a 5,0 docházelo ke koeluci dvou analytů, při pH 2,5 a 4,0 měly píky nedostatečné rozlišení. Při nižším obsahu acetonitrilu trvala měření delší dobu, docházelo ke koeluci některých píků nebo jejich nedostatečnému rozlišení.

V prvních měřeních při optimalizování podmínek elektrochemické detekce byla hledána taková hodnota potenciálu detekce, při které by proudová odezva všech analyzovaných látek byla co nejvyšší, a zároveň proud pozadí nebyl příliš vysoký. Důležitým parametrem je také



Obr. 2. Chromatogram směsi 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB. Mobilní fáze – acetonitril:fosforečnanový pufr (0,01M, pH 3,0) (40:60, V/V). Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, 5 μm , 125 \times 4 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1}



Obr. 3. Závislost podílu proudu píku a proudu šumu (I_p/I_s) 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na potenciálu detekce E_{det} . Mobilní fáze – acetonitril:fosforečnanový pufr (0,01M, pH 3,0) (40:60, V/V). Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, 5 μm , 125 \times 4 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , měřeno na SPCE

podíl velikosti píku a velikosti šumu, který rozhoduje o hodnotě meze stanovitelnosti a meze detekce. Na pracovní elektrodu byly postupně vkládány potenciály v rozmezí +0,5 V až +1,2 V. Proud pozadí narůstal se zvětšujícím se potenciálem. Při potenciálech detekce nad +0,9 V docházelo k prudkému vzrůstu proudu pozadí způsobenému postupnou oxidací povrchu elektrody. Nejvyšších hodnot dosáhl poměr velikosti píku a šumu při potenciálu +0,9 V, jak ukazuje obr. 3. Potenciál +0,9 V byl dále používán pro detekci analytů pomocí tištěné uhlíkové elektrody ve všech dalších experimentech.

Pro zjištění opakovatelnosti a potvrzení vícenásobného spolehlivého používání jedné elektrody byla provedena série měření odezvy 4-AB o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měření probíhala ve FIA uspořádání. Zároveň byl sledován vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na výkonnost elektrody a také závislost proudu pozadí na čase. Hodnoty opakovatelnosti měření vyjádřené relativní směrodatnou odchylkou, průměrných velikostí odezvy 4-AB a počtu po sobě jdoucích měření, ze kterých jsou tyto hodnoty získány, jsou shrnuty v tabulce I. Průměrná velikost odezvy je konstantní při obsahu acetonitrilu v mobilní fázi od 20 % do 70 %, s dalším zvýšením obsahu acetonitrilu jednoznačně klesá. To odpovídá snížené vodivosti těchto mobilních fází v důsledku vysokého obsahu organické složky. Výkyv velikosti odezvy při 30% obsahu acetonitrilu je nejspíš dán vadným kusem použité elektrody. Opakovatelnost měření lze u šesti elektrod z osmi pokládat za uspokojivou, protože hodnota relativní směrodatné odchylky je nižší než 5 %. Předpoklad, že životnost elektrody závisí na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi, se nespílnil. Počet měření provedených na jedné elektrodě nevykazoval žádnou závislost s rostoucím obsahem acetonitrilu a byl pro každou elektrodu jiný. Proud pozadí klesá během 1. minuty velmi výraz-

Tabulka I

Průměrné hodnoty odezvy (I_p), opakovatelnost měření (s_r) a počet měření v sérii pro různý obsah acetonitrilu v mobilní fázi při stanovení 4-AB ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na SPCE metodou FIA

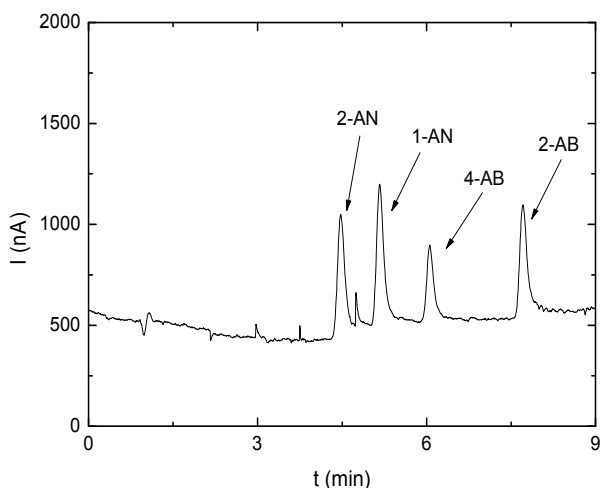
Parametr	Složení mobilní fáze (acetonitril:fosforečnanový pufr) %(V/V)							
	20:80	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	80:20	90:10
I_p [nA]	2095	1259	1921	2201	2029	1954	1209	940
s_r [%]	4,1	10,2	2,2	2,0	10,2	1,5	3,7	1,8
Počet měření	16	8	15	17	12	26	7	11

ně z přibližně 80 μA na 4 μA . V 5. minutě po vložení potenciálu na elektrodu je jeho hodnota okolo 1 μA . Pokles pokračuje až do ukončení měření, kdy má proud pozadí po 120 minutách hodnotu 230 nA. Obrázek není ukázán.

Zvyšováním podílu organické složky mobilní fáze se zvyšuje eluční síla mobilní fáze. Toho se dá využít při gradientové eluci, kdy se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze. Vyšší eluční síla mobilní fáze má za následek kratší dobu zadržování analytu ve stacionární fázi. Hlavní snahou bylo zkrátit eluční čas posledního analytu 2-AB. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při gradientovém programu, kdy byl počáteční poměr acetonitrilu a fosforečnanového pufru 40:60 (V/V) lineárně zvyšován od počátku do 4. minuty na poměr 60:40 (V/V) a tento poměr byl udržován až do konce analýzy. Za těchto podmínek byl 2-AB eluován v čase 7,7 min oproti 13,5 min při izokratické eluci. Chromatogram této separace je vidět na obr. 4.

Závěr

Diferenční pulzní voltametrií bylo studováno chování 4-AB v prostředí o různém pH. V prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 12,0 poskytla látka nejvyšší odezvu a nejsnadněji se oxidovala. Při měření kalibračních závislostí bylo dosaženo meze stanovitelnosti 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Kalibrační závislost je lineární v celém rozsahu měřených koncentrací od 4 do 80 $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obr. 4. Chromatogram gradientové eluce 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). Program gradientu: lineární gradient z poměru 40:60 (acetonitril:pufr) na 60:40 (acetonitril:pufr) od 0. do 4. minuty, izokratická eluce s 60:40 (acetonitril:pufr) od 4. minuty do konce analýzy. Mobilní fáze acetonitril:fosforečnanový pufr (0,01M, pH 3,0). Měřeno metodou HPLC-ED na SPCE, $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$. Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, 5 μm , 125 \times 4 mm, dávkováno 20 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1}

Při hledání vhodných podmínek pro separaci směsi aminonaftalenů a aminobifenyľů bylo při použití izokratické eluce dosaženo nejlepších výsledků s mobilní fází tvořenou z acetonitrilu a 0,01M fosforečnanového pufru pH 3,0 v objemovém poměru 40 % ku 60 %. Elektrochemický detektor dosahoval nejlepších výkonnostních parametrů, pokud byl na něj vložen potenciál +0,9 V. Vzhledem k velkému zadržování 2-AB na koloně byla pro urychlení jeho eluce vyzkoušena gradientová eluce. S gradientovým programem, kdy se obsah acetonitrilu v mobilní fázi lineárně zvyšoval od počátku analýzy až do 4. minuty z 40 % na 60 %, se podařilo zkrátit dobu analýzy z 13,5 min na 7,7 min.

Tato studie stále probíhá a jejími nejbližšími cíly je vyzkoušet ještě další gradientové programy pro zkrácení analýzy, zjistit kalibrační závislosti pro směs 1-AN, 2-AN, 2-AB a 4-AB a ověřit použitelnost této metody pro stanovení aminobifenyľů nebo aminonaftalenů v potravinářských barvivech nebo barvách na vlasy.

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a KONTAKT (AMVIS) projekt ME10004), Univerzitou Karlovou v Praze (projekt SVV 2012-265201, projekt UNCE 2012/44 „Center for Supramolecular Chemistry“), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 90210) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151).

LITERATURA

1. IARC: *Some aromatic amines, organic dyes and related exposure / IARC Working group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Daniel J. (ed.). Lyon 2010.
2. Vasjari M., Merkoci A., Hart J. P., Alegret S.: *Microchim. Acta* 150, 233 (2005).
3. Bergamini M. F., Zaroni M. V. B.: *Electroanalysis* 18, 1457 (2006).
4. Bergamini M. F., Santos A. L., Stradiotto N. R., Zaroni M. V. B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 315 (2007).
5. Lucarelli F., Authier L., Bagni G., Marrazza G., Baussant T., Aas E., Mascini M.: *Anal. Lett.* 36, 1887 (2003).
6. Závazalová J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.

MOLEKULÁRNĚ DIAGNOSTICKÝ PŘÍSTUP K ONEMOCNĚNÍM INDUKOVANÝM OXIDATIVNÍM STRESEM

MICHAELA GAJDOŠOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ
a PETR KAČER

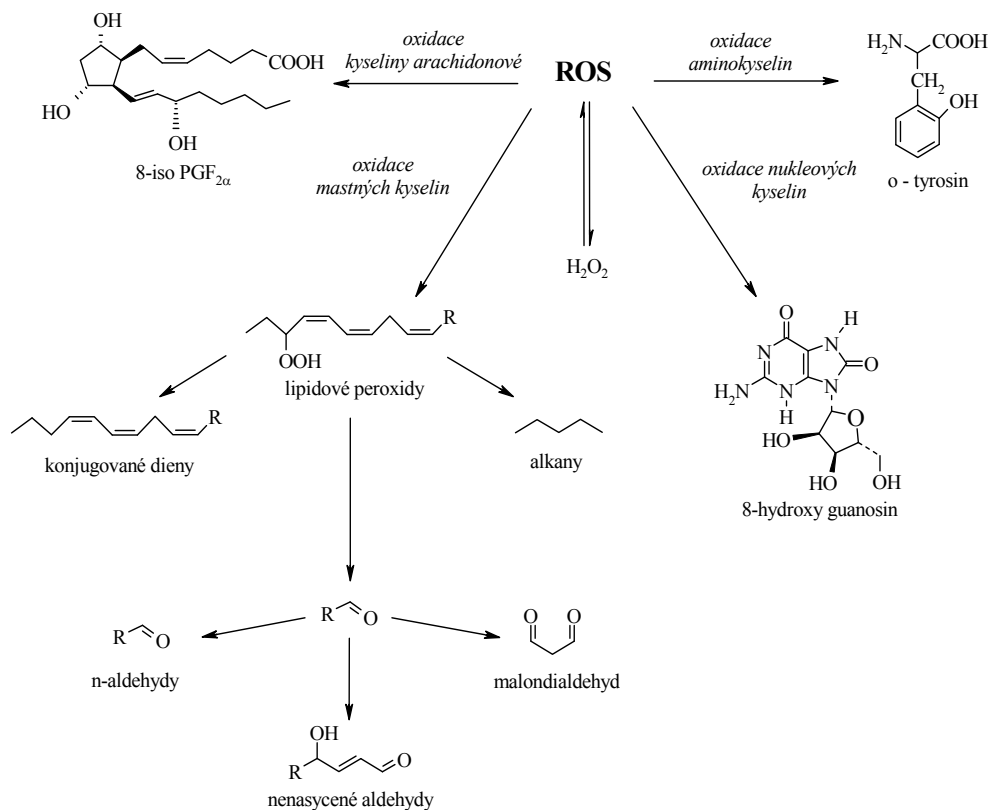
Ústav organické technologie, Fakulta chemické technologie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6

Michaela.Gajdosova@vscht.cz

Úvod

Oxidativní stres nelze sám o sobě označit za nemoc. Je to proces probíhající v každém živém organismu a účastní se jeho stárnutí (urychlený nezdravým životním stylem – např. kouření, stres) a podílí se na vzniku řady závažných onemocnění kardiovaskulárního systému (infarkt myokardu, arteroskleróza), neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova choroba), plicní onemocnění (chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), silikóza, azbestóza), poškození jater a ledvin, nádorová onemocnění, cukrovka 2. typu (poškození buněk pankreatu tvořících insulin) ad¹.

Oxidativní stres je vyvoláván přítomností škodlivých reaktivních kyslíkových částic (ROS = reactive oxygen species; řadí se mezi ně např. $\cdot\text{HO}^-$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$, O_2^- a látky, které nemají nepárový elektron a vznikají přeměnou z volných radikálů – peroxid vodíku a kyselina chloraná), které se v organismu vyskytují i ve fyziologické koncentraci, kdy se účastní mitochondriálního dýchání, signalizace v buňce a eliminace fagocytovaných organismů. V tomto případě jsou organismu prospěšné, a proti jejich patologickým projevům existuje řada antioxidačních ochranných mechanismů (inaktivující peroxidy, enzymy a proteiny), které zabraňují tvorbě většího množství ROS a jejich následným chemickým reakcím. Životnost ROS v organismu je omezena na velice krátký časový interval, což je příčinou absence citlivé a přesné analytické metody pro jejich stanovení *in vivo*². Nestabilita ROS vede k hledání stabilnějších specifických molekul tzv. biomarkerů (jsou produkovány organismem ve zvýšené koncentraci během patologických dějů), které by bylo možné detegovat v tělních tekutinách (moč, krev, kondenzát vydechaného vzduchu (KVV), mozkomíšni mok ad.) již v raných stádiích onemocnění indukovaných oxidativním stresem. ROS



Obr. 1. Biomarkery oxidativního stresu

reagují se základními stavebními jednotkami organismu – nukleovými kyselinami, bílkovinami a fosfolipidy – za vzniku biomarkerů oxidativního stresu (obr. 1).

Oxidací mastných kyselin za účasti ROS (jsou přítomny ve fosfolipidových membránách) dochází ke vzniku 8-iso Prostaglandinu $F_{2\alpha}$ (vzniká převážně z kyseliny arachidonové), konjugovaných dienů, alkanů, aldehydů (*n*-alifatické aldehydy, 4-hydroxynonenal, 4-hydroxyhexenal), nasycených a nenasycených ketonů ad. (oxidace ω -6 a ω -3 polynenasycených mastných kyselin). V organismu dochází i k oxidaci aminokyselin za vzniku *o*-tyrosinu, 3-chlortyrosinu a 3-nitrotyrosinu a nukleových kyselin za vzniku 8-hydroxyguanosinu (oxidace RNA), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (DNA) a 5-hydromethylracilu (DNA a RNA).

V řadě prací bylo popsáno stanovení biomarkerů oxidativního stresu v různých tělních tekutinách (krevní plazma, moč, mozkomíšni mok a KVV) s využitím rozdílných analytických metod jako je RIA (Radioimmunoassay)³, EIA (Enzyme Immunoassay)⁴⁻⁷, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)⁸, případně GC-MS^{9,10} nebo LC-MS¹¹. Biochemickými metodami lze stanovit řádově nižší koncentrace látek, než jakých je dnes dosahováno použitím hmotnostně-spektrometrických metod (GC-MS, LC-MS), nicméně meze detekce těchto instrumentálních metod se v průběhu posledního desetiletí dostaly na úroveň piko-, femto-, případně attomolů, což je plně postačující pro detekci většiny biologicky aktivních látek vyskytujících se v lidském organismu. Spojení kapalinové, případně plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem poskytuje oproti biochemickým metodám nejenom kvantitativní informaci, ale rovněž i informaci strukturní (kvalitativní), která je při využití MSⁿ technik vysoce specifická. Tím jsou vyloučeny falešně pozitivní či negativní výsledky, které se v důsledku „zkřížených reakcí“ vyskytují u imunochemických nebo enzymatických metod. V současné době pro stanovení všech výše uvedených biomarkerů oxidativního stresu neexistuje jedna metoda, ale je minimálně nutné každou skupinu látek stanovovat separátně (u některých metod je nutné stanovit každou látku samostatnou analýzou), což brání většímu rozšíření metabolického screeningu patologických procesů do diagnostické praxe.

Cílem práce bylo vyvinout vysoce selektivní a přesnou analytickou metodu na bázi kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií pro markery oxidativního stresu – 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso PG $F_{2\alpha}$), *n*-alifatické aldehydy (C6-C13), 4-hydroxynonenal (4-HNE), 4-hydroxyhexenal (4-HHE), malondialdehyd (MDA), *o*-tyrosin (*o*-Tyr), 3-nitrotyrosin (NO-Tyr), 3-chlortyrosin (Cl-Tyr), 8-hydroxyguanosin (8-OHG) a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHG) v tělních tekutinách (KVV, krevní plazma a moči), která by odstranila nedostatky stávajících analytických metod popsaných v literatuře. Nedílnou součástí práce byla validace vyvinuté metody a ověření její funkčnosti při monitorování patogeneze u osob s různými formami oxidativního stresu a kontrolní skupiny.

Experimentální část

Chemikálie

o-Tyrosin ($\geq 96\%$, Fluka, USA), 3-nitrotyrosin ($> 99\%$, Cayman Chemicals, USA), 3-chlortyrosin (97%, Aldrich, USA), 8-hydroxyguanosin ($> 98\%$, Cayman Chemicals, USA), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin ($> 98\%$, Cayman Chemicals, USA), 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\geq 99\%$, Cayman Chemical, USA), 4-hydroxynonenal (98%, Cayman Chemical, USA), 4-hydroxyhexenal (98%, Cayman Chemical, USA), [9, 9, 9 2H3] 4-hydroxynonenal ($\geq 99\%$ D, Cayman Chemical, USA), [6, 6, 6 2H3] 4-hydroxyhexenal ($\geq 99\%$ D, Cayman Chemical, USA), tyrosin- d_4 (98% D, Cambridge Isotope Laboratories, USA), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin- $^{15}N_5$ (99% ^{15}N , Cambridge Isotope Laboratories, USA), malondialdehyd (98 %, VŠCHT Praha, Česká republika), methylmalondialdehyd (97%, VŠCHT Praha, Česká republika), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC) ($\geq 99\%$, Fluka, Švýcarsko), kyselina boritá (p.a., Penta, Česká republika), *N,N'*-disukcinimidyl karbonát ($\geq 95\%$, Fluka, USA), 3-aminopyridin ($\geq 99\%$, Aldrich, USA), hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (p.a., Riedel de Haën, Německo), hexanal ($\geq 97\%$, Fluka), heptanal ($\geq 95\%$, Fluka), oktanal ($\geq 98\%$, Fluka), nonanal ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich), dekanal ($\geq 95\%$, Fluka), undekanal ($\geq 96\%$, Koscher), dodekanal ($\geq 92\%$, Sigma-Aldrich), tridekanal ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich), Girard's reagent T (99%, Sigma-Aldrich), acetonitril (LC-MS, Fluka, Švýcarsko), methanol (LC-MS, Fluka, Švýcarsko) a voda (LC-MS, Fluka, Švýcarsko).

Derivatizace látek s aminoskupinu

Biomarkery oxidativního stresu obsahující ve své struktuře amino skupinu (*o*-Tyr, NO-Tyr, Cl-Tyr, 8-OHG, 8-OHG) byly derivatizovány dle následujícího postupu: k 500 μ l roztoku (případně tělní tekutiny u klinických vzorků) obsahující vnitřní standardy (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin- $^{15}N_5$ a tyr- d_4) bylo přidáno 350 μ l borátového pufru (pH směsi 8,5–9) a 50 μ l roztoku derivatizačního činidla 3-aminopyridyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamátu (APDS) (roztok APDS v acetonitrilu o koncentraci 1 mg ml⁻¹, APDS činidlo bylo připraveno reakcí *N,N'*-dihydroxysukcinimidyl karbonátu (1,28 g, 5 mmol) s 3-aminopyridinem (470 mg, 5 mmol) v acetonitrilu (25 ml) při laboratorní teplotě, doba reakce 8 hodin). Derivatizovaný vzorek byl míchán 10 min při laboratorní teplotě a následně 10 min při teplotě 55 °C (rozložení nezreagovaného APDS činidla). Následně byl vzorek analyzován LC-ESI-MS metodou.

Derivatizace aldehydů a karboxylových kyselin

Derivatizace aldehydů (*n*-alifatické aldehydy – (C6-C13), MDA, 4-HNE a 4-HHE) a karboxylových kyselin (8-iso PG $F_{2\alpha}$) byly derivatizovány s využitím Girardova

činnidla T (GirT) v kyselém prostředí (1% octová kyselina) a v přítomnosti EDC činidla (derivatizace karboxylových kyselin). Derivatizační reakce probíhala při teplotě 60 °C po dobu dvou hodin. Po uplynutí reakční doby byla provedena LC-ESI-MS analýza.

LC-ESI-MS analýza

Analýza látek byla realizována na LC-MS systému skládajícím se z degaséru, kvartérní pumpy a autosampleru Accela (Thermo Fisher Scientific, USA) a hmotnostního spektrometru s analyzátozem typu trojitý kvadrupol – TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, USA) s elektrosprejovou ionizací (HESI).

K chromatografické separaci látek derivatizovaných APDS činidlem bylo použito mobilní fáze o isokratickém složení acetonitril:voda (70:30 v/v) s pH upraveným na hodnotu 5,4 (octanem amonným) se stacionární fází tvořenou porézním grafitem Hypercarb (Hypercarb Thermo, rozměry kolony – 2,1 × 100 mm, zrnitost stacionární fáze – 5 μm, Thermo Electron Corporation, USA). Průtok mobilní fáze činil 150 μl min⁻¹. Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Na kolonu byl nastřikován objem vzorku 10 μl. Při chromatografické separaci látek derivatizovaných GirT bylo použito isokratické eluce se složením mobilních fází methanol:voda s pH upraveným na hodnotou 9 (roztokem hydroxidu amonného) (40:60 – v/v) a identické kolony Hypercarb.

Při hmotnostně-spektrometrické analýze bylo použito pozitivní elektrosprejové ionizace (ESI⁺) pro látky derivatizované GirT a negativní elektrosprejové ionizace (ESI⁻) pro látky derivatizované APDS činidlem. Scanování látek (v obou případech) probíhalo v módu neutrální ztráty (NL) s kolizně indukovanou disociací (CID). Pro derivatizační činidlo APDS bylo použito rozsahu hmot 303–475 Da (Q1) a 181–353 Da (Q3) a pro derivatizační činidlo GirT bylo použito intervalů 150–350 Da (Q1) a 91–291 Da (Q3). Parametry hmotnostního spektrometru byly nastaveny na následující hodnoty: napětí na kapiláře 3000 V (ESI⁺)/–2500 V (ESI⁻), teplota na vstupní kapiláře 300 °C, teplota HESI výparníku 300 °C, sheat gas (dusík) tlak 0,31 MPa, pomocný plyn (dusík) 10 ArbU.

Klinická studie

Cílem klinické studie bylo stanovit koncentrační hladiny jednotlivých biomarkerů oxidativního stresu (8-iso

PGF_{2α}, *n*-alifatické aldehydy (C6-C13), MDA, 4-HNE, 4-HHE, 8-OHdG, 8-OHG, *o*-Tyr, Cl-Tyr a NO-Tyr) v biologických matricích (KVV, moč a krevní plazma) u osob, které byly dlouhodobě vystaveny působení dioxinů (20 osob). Koncentrace biomarkerů u jedinců vystavených dioxinům byly porovnávány s koncentracemi u kontrolní skupiny (20 osob). Průměrný věk nemocných byl (67 ± 1) let, v kontrolní skupině (55 ± 5) let, jednalo se o muže a nekuřáky.

Výsledky a diskuse

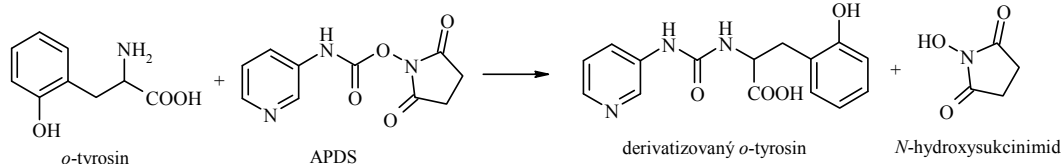
Stanovení biomarkerů oxidativního stresu s aminoskupinou

Biomarkery oxidativního stresu obsahují ve své struktuře aminoskupinu (*o*-Tyr, NO-Tyr, Cl-Tyr, 8-OHG, 8-OHdG) byly derivatizovány APDS činidlem podle reakce uvedené na obr. 2. Během vývoje derivatizační metody bylo zjištěno, že na průběh reakce má zásadní vliv hodnota pH, která se musí pohybovat v rozmezí hodnot 8–9 (upraveno borátovým pufrům), kdy daná reakce probíhá kvantitativně. V kyselé oblasti reakce neprobíhá. Při vyšších hodnotách pH (pH > 9) reakčního prostředí byl sledován rozklad derivatizačního činidla.

Podmínky LC-ESI-MS analýzy byly optimalizovány z hlediska (1) separace sledovaných látek (případně i dalších endogenně přítomných látek z komplexních matic a vedlejších produktů derivatizačního činidla) na LC koloně a (2) maximální odezvy MS detektoru (eliminace potlačení signálu detektoru, v případě koeluce solí, endogenních složek a vedlejších derivatizačních produktů, což by mělo za následek negativní ovlivnění ionizace).

Retenční časy pro chromatografickou kolonu byly následující: mrtvý čas kolony = 0,6 min, *R*_t = 4,4 min pro *o*-Tyr, *R*_t = 4,6 min pro NO-Tyr, *R*_t = 5,0 min pro Cl-Tyr, *R*_t = 7,2 min pro 8-OHG a *R*_t = 6,9 min pro 8-OHdG.

Hmotnostně-spektrometrická detekce biomarkerů byla realizována negativní elektrosprejovou ionizací (ESI⁻) nejprve s využitím vysoce selektivního SRM (selected reaction monitoring) módu, ale protože bylo pro všechny sledované látky zjištěno, že při kolizně-indukované disociaci dochází k odštěpení a ztrátě stejného neutrálního fragmentu (část derivatizačního činidla) s *m/z* = 122 Da, bylo použito módu neutrální ztráty.



Obr. 2. Schéma derivatizace *o*-tyrosinu APDS činidlem

Stanovení aldehydů a 8-iso PGF_{2α}

Aldehydy a 8-iso PGF_{2α} ve vzorku byly stanoveny LC-ESI-MS po derivatizaci GrdT (reakce aldehydu a činidla je zachycena na obr. 3). Pro kvantitativní průběh derivatizace je nutné reakci provádět v kyselém prostředí (1% octová kyselina). Při derivatizaci 8-iso PGF_{2α} musí být v reakční směsi navíc přítomno i EDC činidlo.

Úspěšná chromatografická separace látek (obr. 4) byla provedena na koloně Hypercarb a mobilní fázi o složení metanol a voda (pH 9 upraveno hydroxidem amonným). Podmínky při LC separaci byly optimalizovány z hlediska maximální odezvy MS detektoru. Hmotnostně-spektrická detekce biomarkerů byla realizována pozitivní elektrosprejovou ionizací (ESI⁺) v módu neutrální ztráty. Při kolizně indukované disociaci docházelo k odštěpení fragmentu o stejném *m/z* = 59 Da (obr. 5).

Validace metod

Pro jednotlivé biomarkery oxidativního stresu byla provedena validace metody. Při validaci byly stanoveny limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) a hodnoty přesnosti (vyjádřeno relativní směrodatnou odchylkou – RSD) a správnosti (vyjádřeno výtěžností). Validace byla provedena pro tři matrice – KVV, moč a krevní plasmu. Hodnoty validačních parametrů pro KVV jsou uvedeny v tab. I.

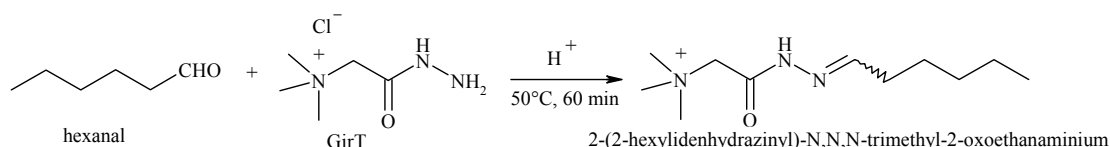
Klinická studie

Cílem klinické studie bylo sledovat koncentrace biomarkerů oxidativního stresu (8-iso PGF_{2α}, 8-OHdG, 8-OHG, *o*-Tyr, Cl-Tyr, NO-Tyr, *n*-alifatických aldehydů (C6 – C13), MDA, 4-HNE a 4-HHE) v KVV, moči a krevní plazmě. Hladiny uvedených biomarkerů byly porovnávány u skupiny osob, které byly během života dlouhodobě

Tabulka I

Validace metod pro matici kondenzátu vydechovaného vzduchu

Analyt	LOD [pg ml ⁻¹]	LOQ [pg ml ⁻¹]	Přesnost – RSD [%]	Výtěžnost [%]
MDA	12	15	9,7	90,5
4-HHE	14	17	8,6	89,3
4-HNE	16	22	9,4	88,8
Hexanal	11	14	10,5	90,0
Heptanal	14	18	12,5	89,2
Oktanal	10	21	13,6	87,3
Nonanal	16	22	14,4	88,2
Dekanal	18	22	14,8	87,6
Undekanal	19	25	15,1	86,1
Dodekanal	20	26	15,2	84,4
Tridekanal	18	24	14,9	85,3
8-iso PGF _{2α}	4	5	8,4	93,4
<i>o</i> -Tyr	6	7	7,6	92,4
Cl-Tyr	7	8	7,1	93,0
NO-Tyr	5	6	6,5	94,6
8-OHG	4	5	6,6	94,5
8-OHdG	5	6	6,3	94,3



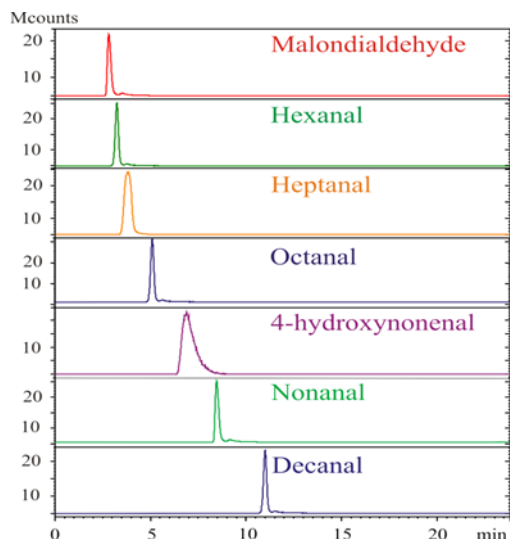
Obr. 3. Schéma derivatizace hexanalů Girardovým činidlem T

vystavovány působení dioxinů ($n = 20$, muži, nekuřáci) a zdravých osob ($n = 20$, muži, nekuřáci). Vzorby byly odebrány mezi 8. a 12. hodinou dopolední (potlačení vlivu cyrkadiálních rytmů mezi jednotlivými osobami). Hladiny většiny sledovaných biomarkerů v KVV u osob vystave-

ných působení dioxinů jsou významně zvýšeny oproti koncentracím u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků (tab. II). V moči a krevní plazmě nebyly pro všechny biomarkery stanoveny statisticky významné rozdíly.

Závěr

Předkládaná práce si kladla za cíl vyvinout komplexní metodu pro stanovení řady rozdílných biomarkerů oxidativního stresu (multimarkerový screening), které vznikají působením ROS na základní stavební jednotky organismu – nukleové kyseliny (8-hydroxyguanosin, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin), bílkoviny (*o*-tyrosin, 3-nitrotyrosin, 3-chlorotyrosin) a fosfolipidy (8-iso Prostaglandin F_{2a} , alifatické *n*-aldehydy (C6-C13), malondialdehyd, 4-hydroxy-nonenal a 4-hydroxyhexenal). Pro stanovení těchto látek byly vyvinuty dvě analytické metody skládající se z úpravy vzorku derivatizací (pro biomarkery nukleových kyselin a bílkovin bylo použito APDS činidlo a pro biomarkery fosfolipidů Girardovo činidlo T) a následnou vysoce specifickou a přesnou metodou na bázi kapalinové chromatografie spojenou s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Dané metody lze charakterizovat vysokou přesností a správností. Metody umožňují stanovit v krátkém časovém horizontu (v porovnání s metodami popsány v literatuře) řadu biomarkerů i v komplexních tělních matricích jakými jsou kondenzát vydechaného vzduchu, moč a krevní plasma. Funkčnost metody byla testována na sérii klinických vzorků.

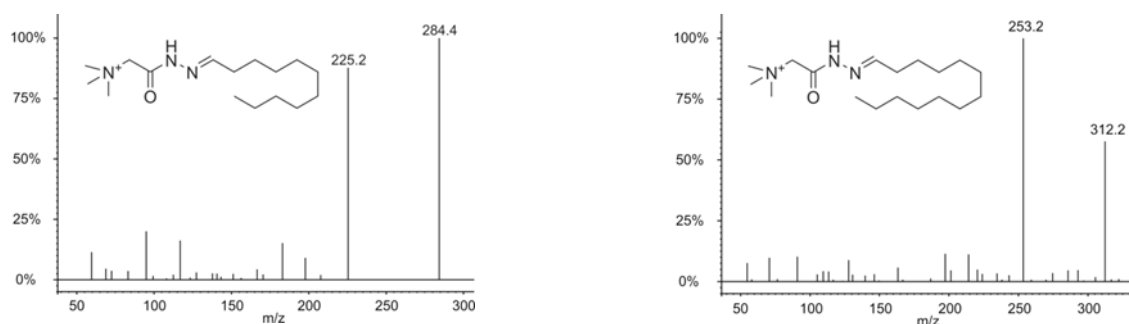


Obr. 4. LC-MS chromatogram aldehydů derivatizačních GirT

Tabulka II

Výsledky klinické studie pro biomarkery oxidativního stresu v kondenzát vydechaného vzduchu

Sledovaný biomarker	Oxidativní stres		Kontrolní skupina	
	průměr	95% interval spolehlivosti	průměr	95% interval spolehlivosti
8-OHdG, pg ml ⁻¹	159,4	120,1; 198,7	136,7	119,9; 153,5
8-OHG, pg ml ⁻¹	163,7	138,6; 188,9	86,2	78,1; 94,3
8-iso PGF _{2a} , pg ml ⁻¹	123,6	103,5; 143,7	61,8	56,5; 67,1
<i>o</i> -Tyr, pg ml ⁻¹	184,5	157,2; 211,8	165,0	144,6; 185,4
NO-Tyr, pg ml ⁻¹	193,8	154,5; 233,0	119,3	112,6; 126,1
Cl-Tyr, pg ml ⁻¹	137,6	116,9; 157,4	96,5	84,1; 108,9
MDA, ng ml ⁻¹	72,3	65,2; 76,5	45,7	36,3; 56,8
4-HHE, ng ml ⁻¹	277,4	249,5; 293,3	224,6	198,3; 228,9
4-HNE, ng ml ⁻¹	233,1	209,0; 258,2	165,7	136,3; 196,1
Hexanal, ng ml ⁻¹	7,7	4,0; 9,0	7,0	3,6; 8,5
Heptanal, ng ml ⁻¹	8,4	4,9; 10,0	5,4	1,9; 6,7
Oktanal, ng ml ⁻¹	7,5	3,7; 8,7	6,1	3,0; 7,9
Nonanal, ng ml ⁻¹	7,1	2,9; 9,9	3,3	0,2; 6,3
Dekanal, ng ml ⁻¹	6,4	1,6; 7,7	3,6	0,3; 4,9
Undekanal, ng ml ⁻¹	0,03	0,006; 0,044	0,009	0,001; 0,021
Dodekanal, ng ml ⁻¹	0,20	0,03; 0,27	0,027	0,012; 0,037



Obr. 5. Kolizní spektrum aldehydů (C11 a C13) derivatizovaných GirT činidlem

LITERATURA

1. Tesař V., Zima T.: *Remedia* 9, 308 (1999).
2. Zwert L. L., Meermann J. H. N., Commandeur N. M., Vermeulen N. P. E.: *Free Radical Biol. Med.* 26, 202 (1999).
3. Reynolds H. Y.: *Lung* 178, 271 (2000).
4. Holz O., Kips J., Magnussen H.: *Eur. Respir. J.* 16, 355 (2000).
5. Carpenter C. T., Price P. V., Christman B. W.: *Chest* 114, 1653 (1998).
6. Montuschi P., Corradi M., Ciabattoni G., Nightingale J., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 216 (1999).
7. Montuschi P., Collins J. V., Ciabattoni G., Lazzeri N., Corradi M., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1175 (2000).
8. Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 301 (2002).
9. Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghio L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: *Thorax* 58, 505 (2003).
10. Biernacki W. A., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Thorax* 58, 294 (2003).
11. Syslova K., Kacer P., Kuzma M., Pankracova A., Fenclova Z., Vlckova S., Lebedova J., Pelclova D.: *J. Breath Res.* 4, 017104/1 (2010).
12. Syslova K., Kacer P., Kuzma M., Klusackova P., Fenclova Z., Lebedova J., Pelclova D.: *J. Chromatogr., B* 867, 1 (2008).

WHITEOVA MULTIREFLEXNÍ KYVETA A JEJÍ UŽITÍ V MIKROVLNNÉ OBLASTI

FILIP GRELICH, JAN KOUCKÝ
a ŠTĚPÁN URBAN

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, Ústav analytické chemie, Laboratoř molekulové spektroskopie vysokého rozlišení, Technická 5, 166 28 Praha 6
grelichf@vscht.cz*

Úvod

V druhé polovině minulého století probíhal na Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie J. Heyrovského ČSAV výzkum vysoce rozlišených infračervených spekter molekul. V rámci tohoto výzkumu byl budován unikátní disperzní spektrometr vysokého rozlišení, k jehož příslušenství měla patřit i multireflexní kyveta Whiteova typu. V průběhu jeho vývoje se však prosadily spektrometry s Fourierovou transformací, které předčily disperzní spektrometry svoji rychlostí, přesností i rozlišením. Vyvíjený spektrometr se proto nikdy kompletně nedokončil a roura, která měla být základem Whiteovy kyvety, byla zapomenuta na dešti na dvoře Ústavu fyzikální chemie J. H. AV ČR, který se stal nástupcem ústavu ČSAV. Před několika lety byla tato více jak půl tunová nerezová roura převezena na VŠCHT se záměrem dokončit Whiteovu kyvetu a použít ji pro měření vysoce rozlišených mikrovlnných spekter plynných molekul. Podle původních plánů byla na zakázku vyrobena soustava zrcadel, která prodlužují optickou dráhu. Sesazení komponent Whiteovy kyvety, nastavení zrcadel pro maximální citlivost měření a testování celého systému na skutečném vzorku je předmětem této práce.

Experimentální část

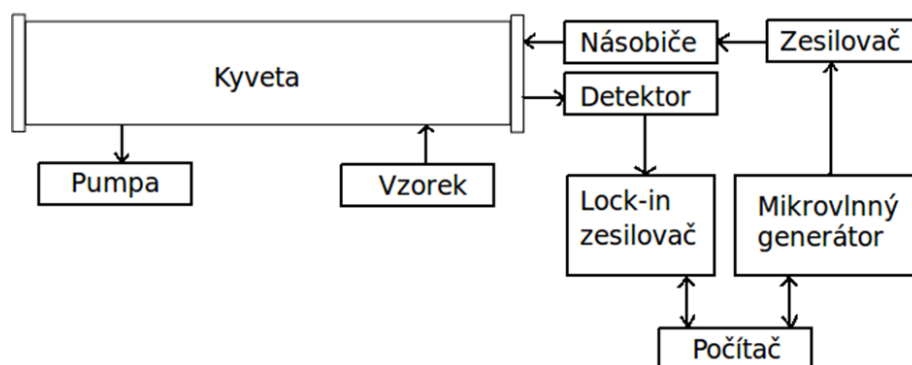
V rámci experimentální práce byly určeny optimální polohy zrcadel pro optické dráhy o délkách 12, 24, 36 a 48 metrů. Následně byly naměřeny frekvence rotačního přechodu molekuly oxidu uhelnatého ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ pro izotopologie $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ a $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$.

Mikrovlnný spektrometr s multireflexní kyvetou^{1,2}

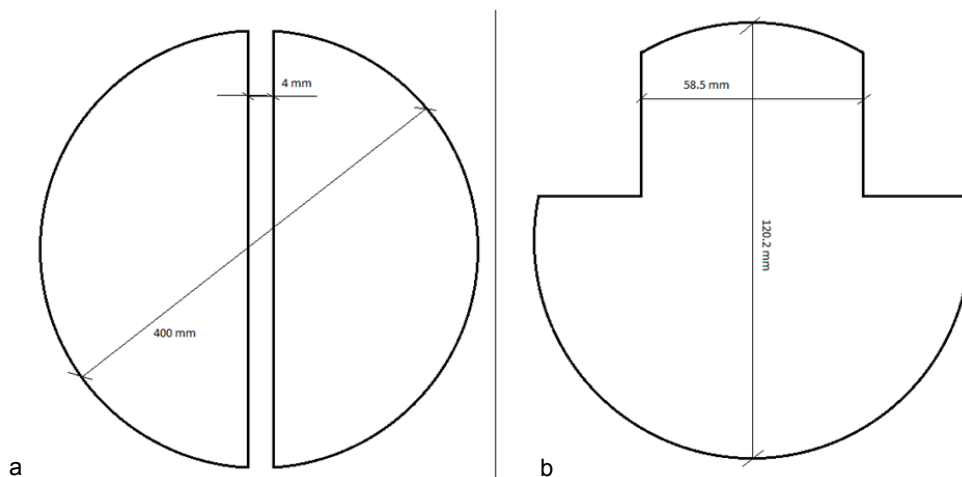
V experimentu bylo použito uspořádání spektrometru (obr. 1), které se skládalo z mikrovlnného zdroje Agilent Technologies E8257D, který je schopen generovat spojité mikrovlnné záření o frekvencích od 250 kHz do 50 GHz, polovodičového zesilovače SP285-20-30 od společnosti Spacek Labs a z násobičů³ frekvencí WR 2.8×3 (tripler), WR 8×2B (doubler) a D55v2 (doubler) od společnosti Virginia Diodes, které byly použity k požadovanému znásobení frekvence z generátoru (12×). Signál byl detegován na detektoru WR 2.8 ZBD + protection, také od firmy Virginia Diodes. Dále byl použit fázově citlivý „lock-in“ zesilovač Signal Recovery 7265 DSP. Celý systém byl ovládán pomocí počítačem řízeného programu, který byl vytvořen v prostředí LabVIEW (National Instruments).

Absorpční spektra izotopologů oxidu uhelnatého byla měřena v dříve zmíněné nerezové kyvetě. Tato kyveta je dlouhá 3,598 m, má vnitřní průměr 40,8 cm a hmotnost přes půl tuny. Mikrovlnné záření bylo fokusováno dvěma teflonovými čočkami s ohniskovými vzdálenostmi 5 resp. 20 cm. Vstupní a výstupní okénka byla také teflonová s vnitřním průměrem 4,1 cm.

V kyvetě jsou umístěna sférická konkávní pozlacená zrcadla s poloměrem zakřivení 2995 mm vyrobená v roce 2011 ve Vývojových optických dílnách AV ČR v Turnově (obr. 2). Jsou od sebe umístěna ve vzdálenosti, která je



Obr. 1. Blokové schéma spektrometru



Obr. 2. (a) Náčres zrcadel Z1 a Z2 a (b) náčres zrcadla Z3

shodná s jejich poloměry zakřivení (obr. 3). K naklápění zrcadel Z1 a Z2 slouží mikrometrický šroub.

Pro evakuaci kyvety byla použita turbomolekulární pumpa TMH 261 od společnosti Pfeiffer vacuum, schopná dosáhnout tlaku $5 \cdot 10^{-10}$ mbar ($5 \cdot 10^{-8}$ Pa). Aby nedošlo k poškození pumpy, je nutné nejprve vytvořit předvakuum. V předkládané práci k tomu posloužila rotační pumpa TRIVAC D 16 B od společnosti Leybold vakuum.

Tlak byl měřen teplotně-vodivostním tlakoměrem TTR 91 S od společnosti Leybold vakuum a kapacitním tlakoměrem CDG045 od společnosti Inficon.

Před samotným měřením byla zrcadla předběžně seřizena vně kyvety (v geometrickém uspořádání respektujícím rozměry kyvety) pomocí laserového ukazovátka. Po usazení zpět do kyvety byla opětovně seřizena. Takto se podařilo docílit optické dráhy až 36 metrů. Při delších optických drahách už byla intenzita dopadajícího záření na stínítko příliš malá.

K aparatuře byla připojena rotační a turbomolekulární pumpa. Po odčerpání vzduchu z kyvety se seřídila pozice zdroje a detektoru tak, aby byl detegován maximální signál.

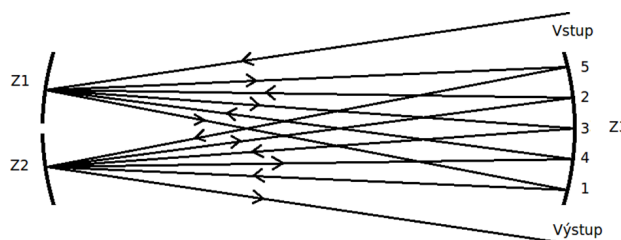
Jako vzorek byl použit oxid uhelnatý od společnosti Linde Gas o čistotě 99,9 % s přirozeným zastoupením izotopologů.

Frekvence rotačních přechodů izotopologů oxidu uhelnatého byly převzaty z internetové databáze NASA Jet Propulsion Laboratory⁴ (JPL).

Výsledky a diskuse

Nejdříve byla na základě intenzity prošlého signálu stanovena optimální poloha zrcadel pro optické dráhy 12, 24, 36 a 48 metrů.

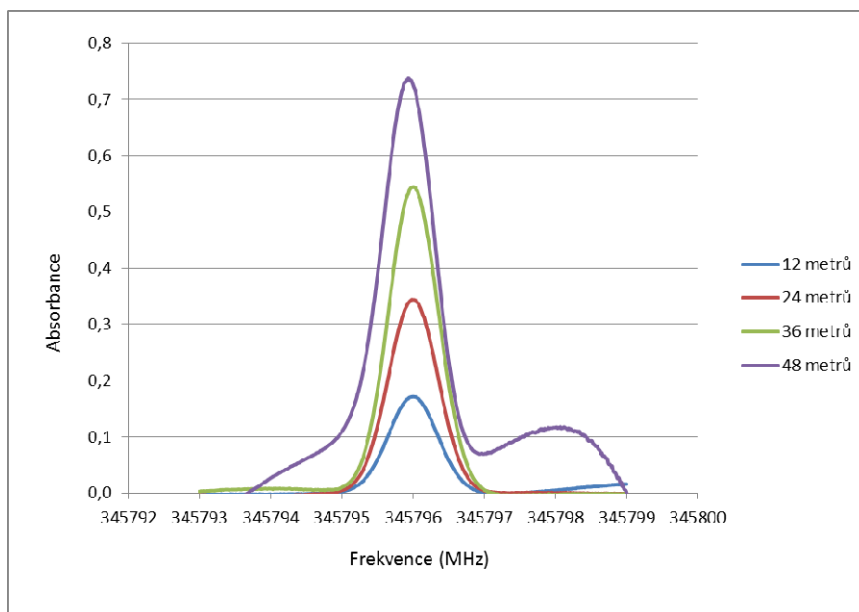
Poté byl proměřen rotační přechod ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ izotopologu $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ (frekvence přechodu podle JPL je



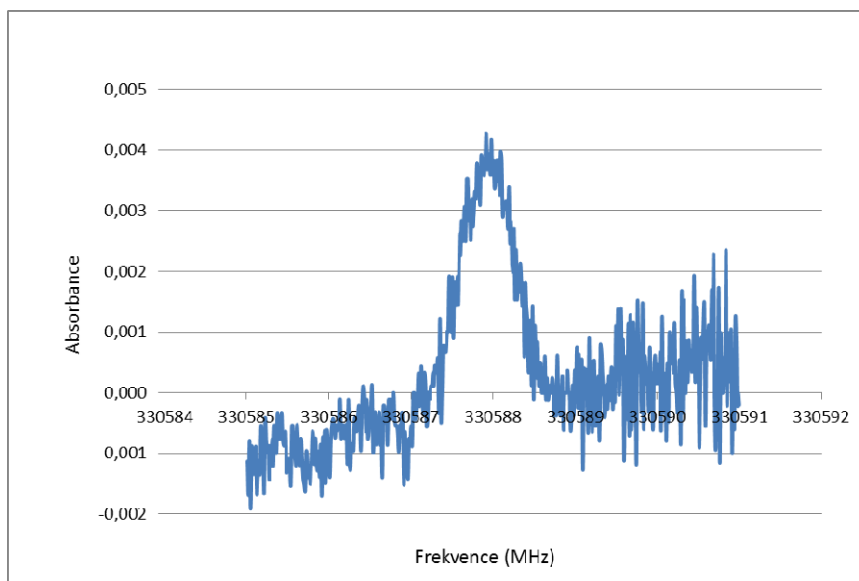
Obr. 3. Umístění zrcadel v kyvetě a ukázka dráhy paprsků pro délku optické dráhy 36 m

345795,9899 MHz) v závislosti absorpance na frekvenci pro různé polohy zrcadel (a tedy i pro různé délky optických drah). Spektra se pro každou optickou dráhu měřila $10 \times$ a následně se zprůměrovala (obr. 4). Při měření byla použita amplitudová modulace. Z těchto naměřených dat vyplývá, že absorpance roste lineárně s délkou optické dráhy, což je v souladu s Lambertovým-Beerovým zákonem⁵. Dále je z grafu patrné, že při optické dráze 48 metrů byla poloha maxima výsledného signálu mírně posunuta k nižším frekvencím, patrně v důsledku překryvu se zdánlivou absorpací, která je způsobena ohybovými a interferenčními jevy. Vlnová délka paprsku je okolo 1 mm, proto je nutno přistupovat k tomuto systému z pohledu kvazioptiky a ne obyčejné optiky⁶. Tato zdánlivá absorpance se na obr. 4 projevuje jako rameno u nižších frekvencí od maxima pásu (další zdánlivá absorpance způsobená destruktivní interferencí je vidět i u vyšších frekvencí). Další testy byly prováděny s efektivní optickou dráhou 36 metrů, protože optická dráha 48 metrů by potřebovala numerické korekce.

Následně byla měřena absorpance v závislosti na frekvenci rotačního přechodu ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ izotopologu $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ (frekvence přechodu podle JPL je 330587,9601 MHz) pro délku optické dráhy 36 metrů. Zastoupení izoto-



Obr. 4. Závislost absorpce na frekvenci pro různé délky optické dráhy ($p = 5 \mu\text{bar} = 0,5 \text{ Pa}$) pro izotopolog $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$



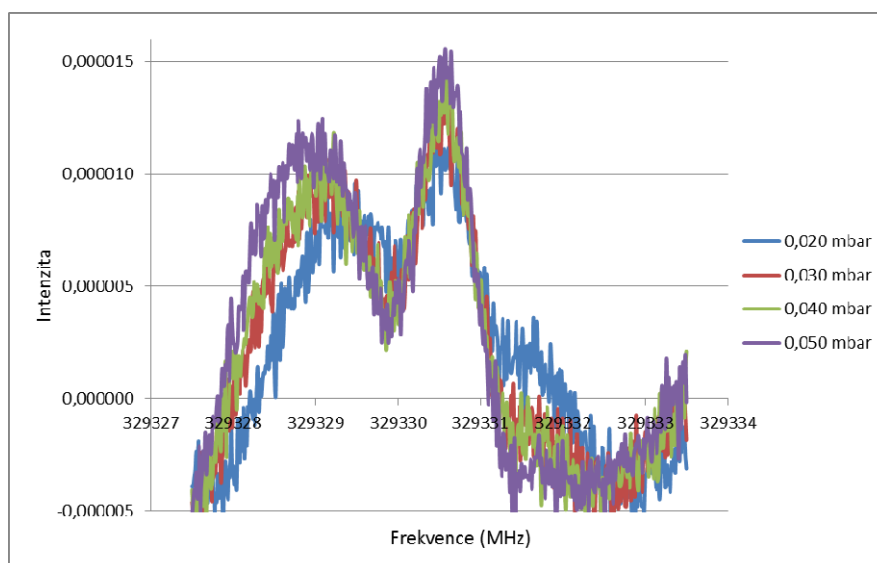
Obr. 5. Rotační přechod ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ izotopologu $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ jako závislost absorpce na frekvenci při délce optické dráhy 36 metrů ($p = 5 \mu\text{bar} = 0,5 \text{ Pa}$)

pologu $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ by za stejného tlaku mělo být přibližně 90× menší⁷ než u izotopologu $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$. Tudiž i naměřená absorpce by měla být snížena ve stejném poměru (obr. 5).

Z obr. 5 je patrná interference, ke které dochází v kyvetě. U nižších frekvencí od maxima pásu dochází ke konstruktivní interferenci, kvůli které je výstupní signál

silnější než signál pozadí. Transmittance pak vychází větší než 1 a absorpce je kvůli tomu záporná. U vyšších frekvencí od maxima pásu je naopak vidět vliv destruktivní interference, při které dochází k opačnému jevu.

Změřit závislost absorpce na frekvenci pro izotopolog $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ (frekvence přechodu podle JPL je 329330,5453



Obr. 6. Rotační přechod ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ izotopologu $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ při délce optické dráhy 36 metrů pro různé tlaky

MHz) se nepodařilo ani při vyšších tlacích (jeho zastoupení je v porovnání s izotopologem $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ $500\times$ menší⁷). Podařilo se ale změřeni jejího rotačního přechodu ($J' \leftarrow J''$) $3 \leftarrow 2$ ve frekvenční modulaci (obr. 6).

Z grafu je patrné, že i ve frekvenční modulaci je výsledný signál závislý na tlaku. Ne už ale lineárně jako v případě amplitudové modulace. Tak jako v předchozích grafech je i zde patrný vliv interference.

Závěr

V průběhu této práce byla úspěšně sestavena aparatura využívající Whiteovu multireflexní kyvetu pro měření vysoce rozlišených spekter v mikrovlnné oblasti. Funkčnost sestavení byla otestována na izotopolozích molekul oxidu uhelnatého. Dosažená citlivost měření je při použití optické dráhy 36 metrů přibližně $5\text{--}10\times$ lepší než při pouhém jednorůchodovém nastavení měření.

V budoucnu je v plánu zlepšit celý systém pomocí dvojice torických zrcadel. Ta by měla nahradit používané čočky a tím výrazně zmenšit ztrátu signálu.

Celý měřicí systém bude sloužit k měření plynů o nízkých koncentracích nebo k měření „zakázaných“ rotačních přechodů, které jsou většinou jen velmi obtížně měřitelné.

Dalším problémem, kterým se v budoucnu budeme zabývat, je ošetření systému zrcadel tak, aby se dala měřit mikrovlnná spektra radikálů, kde se z důvodu jejich vysoké reaktivity předpokládá interakce s pozlaceným povrchem zrcadel a tudíž jejich poškození.

Tato práce byla finančně podpořena granty GA ČR (P206/10/2182) a grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (LC06071). Dále bych chtěl poděkovat Rostislavu Sovičkovi a Patriku Kaniovi.

LITERATURA

1. White J.: J. Opt. Soc. Am. 32, 285 (1942).
2. Armerding W., Walter J., Comes F.: Fresenius' J. Anal. Chem. 340, 661 (1991).
3. Stříteská L. N., Šimečková M., Kania P., Musil P., Kolesníková L., Koubek J., Urban Š.: J. Mol. Struct. 919, 89 (2009).
4. NASA Jet Propulsion Laboratory. <http://spec.jpl.nasa.gov/ftp/pub/catalog/catform.html> (staženo 14.11.2011).
5. Hollas J. M.: *Modern spectroscopy*. Wiley, Chichester 2004.
6. Goldsmith P.: *Quasioptical systems*. Wiley-IEEE Press, Piscataway 1998.
7. Brown J., Carrington A.: *Rotational Spectroscopy of Diatomic Molecules*. Cambridge University Press, New York 2003.

STANOVENÍ GENOTOXICKÉHO 2-AMINOFUOREN-9-ONU POMOCÍ POLAROGRAFICKÝCH A VOLTAMETRICKÝCH METOD

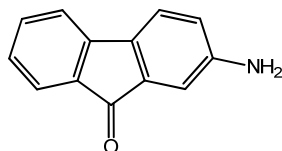
ANDREA HÁJKOVÁ, VLASTIMIL VYSKOČIL
a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
andy.rea@seznam.cz

Úvod

Studovanou látkou je genotoxický 2-aminofluoren-9-on (2-AFN) (obr. 1), který patří mezi deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), jejichž analýza je předmětem moderní environmentální analytické chemie. PAH s navázanou oxo-skupinou nebo amino-skupinou jsou dobře známé nebezpečné látky vyskytující se ve znečištěné povrchové vodě, atmosféře i půdě¹. Primárním zdrojem oxoderivátů PAH (OPAH) jsou spalovací procesy^{1,2}. Vznikají také jako produkty reakcí PAH s ozonem v atmosféře² a jako rozkladné produkty PAH v bakteriálních procesech³. Aminoderiváty PAH (APAH) jsou látky používané především v průmyslu při výrobě barviv nebo jako mezi-produkty při výrobě průmyslových chemikálií (pesticidy, léky). Jsou také hlavními metabolity nitroderivátů PAH (NPAH) v živých organismech⁴. Obecně jsou APAH nebezpečné látky mající mutagenní a karcinogenní potenciál⁵.

2-AFN je jedním z aminoderivátů fluoren-9-onu, které se vyskytují v životním prostředí. Hmotnostní spektrometrií byl 2-AFN dokázán v silně znečištěné vodě získané jako odpad při výrobě technických plynů v plynárnách, a jeho přítomnost se tak stala i vysokou ekologickou zátěží pro podzemní vody⁶. 2-AFN je rovněž produktem spalovacích procesů a byl detegován i ve výfukových plynech⁷. I když bylo v minulosti použito několik analytických technik pro identifikaci 2-AFN (cit.⁶⁻⁹), citlivá analytická metoda pro jeho stanovení, především pak v environmentálních vzorcích, nebyla dosud popsána. Vzhledem k tomu, že 2-AFN obsahuje ve své struktuře jak oxo-skupinu, kterou lze elektrochemicky snadno redukovat, tak i amino-skupinu, kterou lze elektrochemicky snadno oxidovat, je možné pro stanovení jeho stopových množ-



Obr. 1. Strukturální vzorec 2-aminofluoren-9-onu (2-AFN)

ství použít moderní polarografické a voltametrické techniky^{5,10,11}.

Cílem této práce bylo vyvinout citlivé elektrochemické metody stanovení genotoxického 2-AFN. Za tímto účelem byly použity následující techniky: DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) na klasické kapající rtuťové elektrodě (DME)¹², DC voltametrie (DCV), diferenční pulsní voltametrie (DPV) a adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdSDPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE)¹² a DCV a DPV na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Dosažené meze stanovitelnosti (L_Q) 2-AFN byly porovnány s parametry UV-Vis spektrofotometrického stanovení a praktická aplikovatelnost nově vyvinutých polarografických a voltametrických metod stanovení 2-AFN byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody.

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztok 2-AFN (98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven navážením 0,0489 g 2-AFN a rozpuštěním v methanolu (99,9%, čistota p.a., Merck, SRN) v 250 ml odměrné baňce. Vzniklý zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty. Brittonovy-Robinsonovy pufrů (BR pufrů) o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu trihydrogenboritou (p.a., Lachema, Brno, ČR), trihydrogenfosforečnou (85%, p.a., Lach-Ner) a octovou (80%, p.a., Lach-Ner), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol l}^{-1}$. Acetátový pufr o pH 4,0 byl připraven smísením $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ octové kyseliny a $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu sodného. Dalšími použitými chemikáliemi byly kyselina chlorovodíková (36%, p.a., Lachema) a chlorid draselný (p.a., Lachema) a deionizovaná voda (produkovaná systémem Millipore Milli-Q Plus, Millipore, USA).

Aparatura

Při polarografických a voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 5.1 (oboje Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referenční elektroda použita argentochloridová elektroda typu RAE 113 (Monokrystaly, Turnov; $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$) a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda. Pro polarografické techniky byla použita jako pracovní elektroda DME

(řízená doba kapky byla 1,0 s, doba kapky při použití výše rezervoáru 81 cm byla 3,4 s, průtoková rychlost rtuť kapilárou byla $2,22 \text{ mg s}^{-1}$, povrch rtuťové kapky při době kapky 1,0 s byl $1,45 \text{ mm}^2$), dále pak pro voltametrické techniky byly použity pracovní elektrody HMDE typu UM μ E (Polaro-Sensors; doba otevření ventilu byla 450 ms, průtoková rychlost rtuť kapilárou byla $5,92 \text{ mg s}^{-1}$, povrch rtuťové kapky byl $1,42 \text{ mm}^2$) a m-AgSAE (Eco-Trend Plus, Praha, ČR; průměr amalgámového disku byl 0,52 mm, geometrická plocha byla $0,21 \text{ mm}^2$). Příprava m-AgSAE k měření byla prováděna podle doporučeného postupu¹¹ a zahrnovala amalgamací, elektrochemickou aktivaci a elektrochemickou regeneraci, při které byla před začátkem každého měření na pracovní elektrodu skokově vkládána dvojice regeneračních potenciálů ($E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$). Pro techniky DCTP a DPP byla použita rychlost polarizace 4 mV s^{-1} . Pro techniky DCV, DPV a AdSDPV byla použita rychlost polarizace 20 mV s^{-1} . Při pulsních technikách DPP, DPV a AdSDPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms) a modulační amplitudě -50 mV .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji HP 8453 Diode Array Spectrophotometer s ovládacím programem UV-Visible ChemStation verze 9.01 (oboje Hewlett-Packard, Nizozemí) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm (Hellma, SRN). Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou typu 924 005 (oboje Jenway, Velká Británie).

Pracovní postupy

Pro měření polarografického a voltametrického chování 2-AFN v závislosti na pH byl do 10 ml odměrné baňky odpipetován 1,0 ml methanolickeho zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a doplněn BR pufrům o příslušném pH. Roztoky 2-AFN o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Před prvním polarografickým/voltametrickým měřením byl vzorek v polarografické nádobce probubláván dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) po dobu 5 min, před každým opakovaným měřením byl znovu probubláván alespoň po dobu 30 s. Výška vlny při DCTP byla měřena jako vzdálenost přímky vzniklé prodloužením lineární části polarogramu před nástupem vlny a přímky reprezentující dosaženou úroveň limitního proudu. Výška píku při DPP, DPV a AdSDPV byla měřena od spojnice minim po jeho stranách. Výška píku při DCV byla měřena jako vzdálenost přímky vzniklé prodloužením lineární části voltamogramu před píkem a maxima píku.

Při měření UV-Vis absorpčních spekter 2-AFN byly připraveny v prvním případě vzorky o požadovaných koncentracích zředěním zásobního roztoku 2-AFN methanolem a v druhém případě byly připraveny vzorky stejným způsobem jako pro polarografické/voltametrické měření. Křivky byly měřeny v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty a opakována třikrát (polarografická/voltametrická měření na DME a HMDE a UV-Vis spektrofotometrická měření) či pětkrát (voltametrická měření na m-AgSAE). K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů Origin Pro verze 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Konfidenční a predikční pásy u kalibračních přímek byly sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (cit.¹³). Mez stanovitelnosti (L_Q) byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti opakovaných měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky (10σ) vydělený směrnici kalibrační přímky¹⁴.

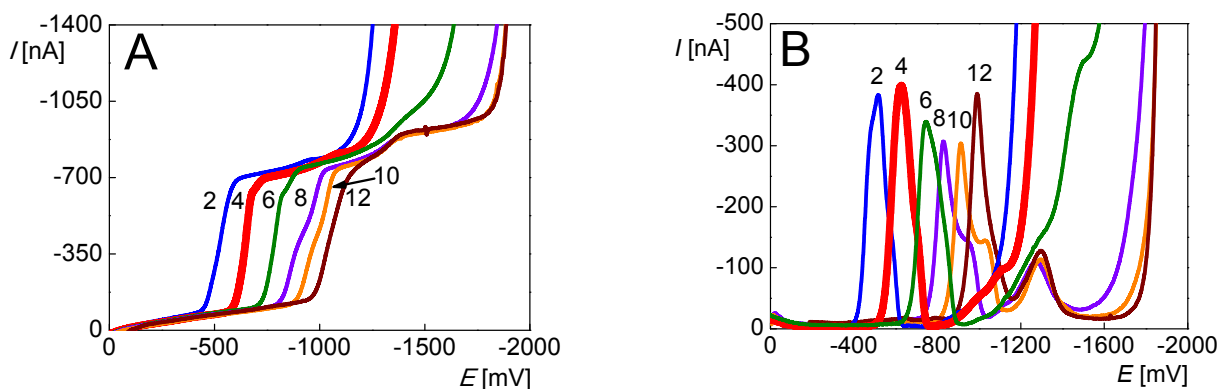
Modelové vzorky pitné a říční vody

Pitná voda byla odebrána z vodovodní sítě v budově Chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Říční voda byla odebrána z Labe v Nymburce u Sportovního centra, 1500 m proti proudu od vodní elektrárny v Nymburce. Modelové vzorky pitné či říční vody byly připraveny přidáním potřebného množství zásobního roztoku 2-AFN k dané matici. Z takto připravených vzorků bylo odebráno 9,0 ml a v 10 ml odměrné baňce doplněno $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ acetátovým pufrům o pH 4,0 (acetátový pufr byl použit na místo BR pufru o pH 4,0 pro zjednodušení).

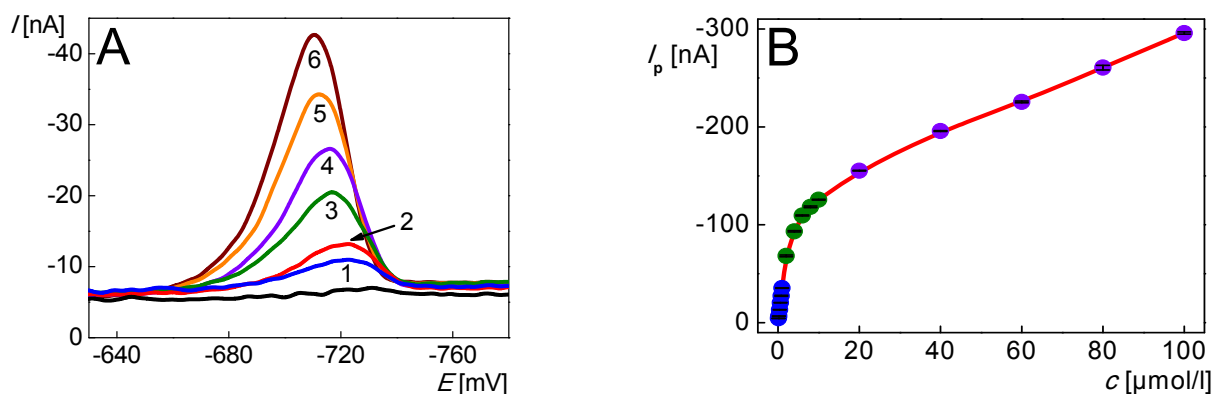
Výsledky a diskuse

Vliv pH na elektrochemické chování 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) byl sledován v prostředí methanol-BR pufru (1:9) v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 13,0. Na polarografických odezvách měřených metodou DCTP je možné pozorovat jednu dobře vyvinutou vlnu, která se v rozmezí pH BR pufru 7,0–13,0 znatelně štěpí na vlny dvě (obr. 2A). Metodou DPP lze pozorovat jeden dobře vyvinutý pík a jeden menší druhý pík. Na rozdíl od DCTP na DME je však toto rozštěpení pozorovatelné prakticky v celém rozmezí měřených pH. Potenciály obou píků se s rostoucím pH posunují k negativnějším hodnotám potenciálu. Druhý pík je více zřetelný a tím i lépe vyhodnotitelný v zásaditém prostředí.

Voltametrické chování 2-AFN bylo sledováno metodou DCV a DPV (obr. 2B) na HMDE, pomocí nichž lze pozorovat v celém rozsahu pH jeden dobře vyvinutý pík, jehož potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám a v alkalickém prostředí se objevuje druhý pík při negativnějším potenciálech než první pík. Pomocí technik DCV a DPV na m-AgSAE lze v obou případech pozorovat jeden dobře vyvinutý voltametrický pík, který dosahuje v celém rozmezí hodnot pH přibližně stejné výšky a jehož potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám až do pH BR pufru 9,0. V alkalickém prostředí (pH BR pufru 9,0–13,0) se potenciál píku již neposouvá, a na pH prostředí je tedy potenciál píku nezávislý.



Obr. 2. (A) DCT polarogramy 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené na DME v prostředí methanol–BR pufr (1:9) a (B) DP voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené na HMDE v prostředí methanol–BR pufr (1:9). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru



Obr. 3. (A) DC voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7}$ (1) až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (6)) na HMDE v prostředí methanol–BR pufr o pH 4,0 (1:9). (B) Kalibrační závislost 2-AFN metodou DCV na HMDE v prostředí methanol–BR pufr o pH 4,0 (1:9) v celém měřeném koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (●), $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (●) a $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (●)

Jako optimální prostředí pro měření koncentračních závislostí všemi metodami bylo vybráno prostředí methanol–BR pufr o pH 4,0 (1:9). Polarografické vlny i polarografické/voltametrické píky při tomto pH byly nejlépe vyvinuté a píky nejvíce symetrické. Obecně bylo proměřeno koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; u DCTP na DME byly získány vyhodnotitelné polarografické vlny pouze v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Metodou DPP na DME (rozmezí $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), metodou DCV (obr. 3) i DPV na HMDE (obě rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) lze pozorovat nelineární chování koncentrační závislosti 2-AFN. Nelineární kalibrační závislosti byly proloženy polynomem druhého stupně. Metodami DCV (obr. 3) i DPV na HMDE (obě v rozmezí $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) je absolutní hodnota úseku regresní lineární rovnice mnohem vyšší než 0 nA. Regeneračními po-

tenciály ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1200 \text{ mV}$) vloženými na m-AgSAE v optimálním prostředí methanol–BR pufr o pH 4,0 (1:9) bylo dosaženo opakovatelnosti (relativní směrodatná odchylka pro $n = 20$) stanovení (při koncentraci 2-AFN $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) 0,5 % pro DCV a 0,9 % pro DPV. Parametry získaných kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. I.

Ve snaze dosáhnout nižší meze stanovitelnosti (L_Q) než metodou DPV na HMDE ($L_Q \approx 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) bylo voltametrické chování 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) sledováno metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátový pufr o pH 4,0. Při době akumulace (t_{acc}) 60 s byl potenciál akumulace (E_{acc}) postupně měněn od +200 mV po stovkách mV až po hodnotu rovnou potenciálu píky (obr. 4A) a při optimální hodnotě E_{acc} byl měřen vliv t_{acc} na velikost voltametrické odezvy 2-AFN (obr. 4B). Optimální pod-

Tabulka I

Parametry kalibračních přímků polarografického, voltametrického a UV-Vis spektrofotometrického stanovení 2-AFN

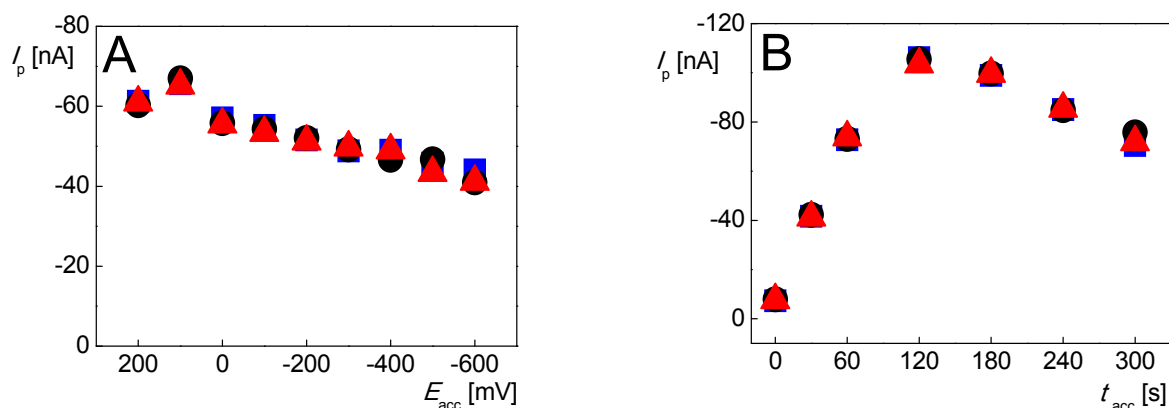
Metoda / elektroda prostředí	Koncentrační rozmezí [mol l ⁻¹]	Směrnice [mA l mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	L _Q ^a [mol l ⁻¹]
<i>Deionizovaná voda</i>					
DCTP / DME	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	-5,6	-19 ^c	0,9986	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	1 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-5,3	-0,85 ^c	0,9970	5 · 10 ⁻⁷
DPP / DME	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	— ^b	— ^b	— ^b	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-19	4,9 ^c	0,9987	—
	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-14	-0,43 ^c	0,9985	1 · 10 ⁻⁷
DCV / HMDE	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	-1,7	-120	0,9976	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-34	-0,29 ^c	0,9951	2 · 10 ⁻⁷
DPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	-2,1	-170	0,9966	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-47	0,72 ^c	0,9966	1 · 10 ⁻⁷
AdSDPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁸ –1 · 10 ⁻⁷	-900	-0,90 ^c	0,9977	—
acet. pufr pH 4,0	2 · 10 ⁻⁹ –1 · 10 ⁻⁸	-840	-0,43 ^c	0,9910	4 · 10 ⁻⁹
DCV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	-0,52	-4,8	0,9995	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,71	0,095 ^c	0,9983	—
	2 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,4	0,097	0,9977	2 · 10 ⁻⁷
DPV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁵ –1 · 10 ⁻⁴	-0,44	-4,9	0,9987	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,76	-0,29 ^c	0,9979	—
	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,1	-0,041 ^c	0,9939	1 · 10 ⁻⁷
UV-Vis	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	40 ^d	20 ^e	0,9998	—
methanol–BR pufr pH 4,0 (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	51 ^d	3,2 ^{c,e}	0,9807	1 · 10 ⁻⁷
UV-Vis	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	48 ^d	4,1 ^{c,e}	0,9963	—
methanol	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	55 ^d	5,2 ^e	0,9995	1 · 10 ⁻⁷
<i>Pitná voda</i>					
DPP / DME	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-24	2,3 ^c	0,9999	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-21	-1,2 ^c	0,9935	1 · 10 ⁻⁷
DCV / HMDE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-36	-1,7 ^c	0,9968	1 · 10 ⁻⁷
DPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-49	1,7 ^c	0,9946	8 · 10 ⁻⁸
AdSDPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁸ –1 · 10 ⁻⁷	-640	-4,0 ^c	0,9894	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	2 · 10 ⁻⁹ –1 · 10 ⁻⁸	-630	-0,25 ^c	0,9903	4 · 10 ⁻⁹

^a Mez stanovitelnosti (10σ; α = 0,05), ^b závislost není lineární, ^c úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti α = 0,05, ^d rozměr směrnice je mA l mol⁻¹, ^e rozměr úseku je mA

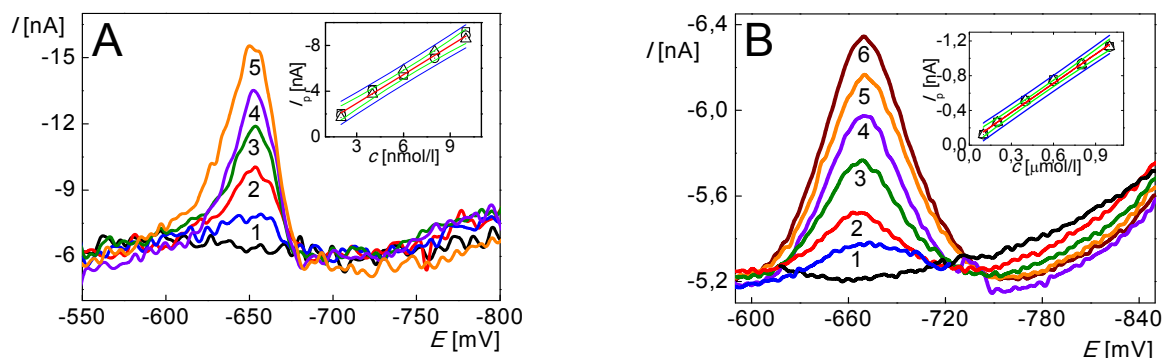
Tabulka I
pokračování

Metoda / elektroda prostředí	Koncentrační rozmezí [mol l ⁻¹]	Směrnice [mA l mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	L _Q ^a [mol l ⁻¹]
DCV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,78	-1,6	0,9966	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,5	-0,071	0,9988	2 · 10 ⁻⁷
DPV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,73	-1,6	0,9962	—
acet. pufr pH 4,0–pitná voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,3	-0,004	0,9981	2 · 10 ⁻⁷
<i>Říční voda</i>					
DPP / DME	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-23	-0,64 ^c	0,9999	—
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-20	-1,1 ^c	0,9948	1 · 10 ⁻⁷
DCV / HMDE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-24	0,84 ^c	0,9952	2 · 10 ⁻⁷
DPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	— ^b	— ^b	— ^b	—
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-35	-2,1 ^c	0,9969	2 · 10 ⁻⁷
AdSDPV / HMDE	2 · 10 ⁻⁸ –1 · 10 ⁻⁷	-143	-1,9 ^c	0,9850	2 · 10 ⁻⁸
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)					
DCV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,62	-2,2	0,9961	—
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,4	-0,14	0,9982	4 · 10 ⁻⁷
DPV / m-AgSAE	2 · 10 ⁻⁶ –1 · 10 ⁻⁵	-0,59	-1,9	0,9975	—
acet. pufr pH 4,0–říční voda (1:9)	1 · 10 ⁻⁷ –1 · 10 ⁻⁶	-1,4	-0,001	0,9979	2 · 10 ⁻⁷

^a Mez stanovitelnosti (10σ; α = 0,05), ^b závislost není lineární, ^c úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti α = 0,05, ^d rozměr směrnice je mA l mol⁻¹, ^e rozměr úseku je mA



Obr. 4. (A) Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) na potenciálu akumulace při době akumulace $t_{\text{acc}} = 60 \text{ s}$. (B) Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) na době akumulace při potenciálu akumulace $E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$. A i B měřeno v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 metodou AdSDPV na HMDE



Obr. 5. (A) AdSDP voltamogramy 2-AFN ($c = 2 \cdot 10^{-9}$ (1) až $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ (5)) na HMDE v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 při optimálních podmínkách $E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$. (B) DP voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7}$ (1) až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (6)) na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr o pH 4,0 (1:9) s regeneračními potenciály $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1200 \text{ mV}$

mínky pro adsorpci 2-AFN na povrch HMDE byly $E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$, při nichž byly měřeny koncentrační závislosti (tab. I) v rozmezí $2 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 5A pro rozmezí $2 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$).

Spektrofotometrické stanovení 2-AFN v UV-Vis oblasti bylo provedeno za účelem srovnání s polarografickým a voltametrickým stanovením 2-AFN (tab. I). 2-AFN byl měřen v methanolu (absorpční maximum je při vlnové délce 257 nm) a v prostředí methanol-BR pufr o pH 4,0 (1:9) (absorpční maximum je při vlnové délce 272 nm).

Stanovení 2-AFN v modelových vzorcích pitné a říční vody byla provedena metodami DPP na DME, DCV a DPV na HMDE a DCV a DPV na m-AgSAE v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Pro koncentrace nižší než $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ byla využita metoda AdSDPV na HMDE ($E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$). Parametry všech kalibračních přímk jsou uvedeny v tab. I.

Závěr

Optimální podmínky pro polarografické a voltametrické stanovení genotoxického 2-AFN byly nalezeny ve vodně-methanolicím prostředí pufrvaném BR pufrům. Pomocí metod DPP na DME, DPV na HMDE a DPV na m-AgSAE bylo dosaženo mezi stanovitelnosti (L_Q) až $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN. UV-Vis spektrofotometrickým stanovením 2-AFN bylo dosaženo srovnatelných L_Q jako při použití nově vyvinutých pulsních polarografických a voltametrických metod, proto lze tyto elektrochemické metody využít rovněž jakožto alternativní analytické metody k UV-Vis spektrofotometrickému stanovení.

Pomocí adsorpce 2-AFN na povrch HMDE bylo možné snížit hodnotu L_Q až o dva řády ($L_Q \approx 4 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$), a tím značným způsobem zvýšit citlivost klasické DPV metody na HMDE. Použitelnost nově vyvinutých polarografických a voltametrických metod byla úspěšně ověřena při stanovení 2-AFN v modelových vzorcích pitné a říční vody.

V současné době se zabýváme dalším snížením dosažených L_Q za použití prekoncentrace analytu pomocí extrakce na tuhou fázi, při níž se počítá s dosažením faktoru prekoncentrace až 1000, se kterým by bylo možné dosáhnout L_Q až na pikomolárních úrovních. Při tomto vývoji vysoce citlivých metod stanovení 2-AFN se také počítá s využitím nově zkonstruované miniaturizované m-AgSAE umožňující stanovení látky v objemu vzorku 100 μl .

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM0021620857), Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151), Technologickou agenturou České republiky (projekt TA01020565) a Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44).

LITERATURA

- Bandowe B. A. M., Shukurov N., Kersten M., Wilcke W.: *Environ. Pollut.* **158**, 2888 (2010).
- Tsapakis M., Stephanou E. G.: *Environ. Sci. Technol.* **41**, 8011 (2007).
- Sepic E., Bricelj M., Leskovsek H.: *J. Appl. Microbiol.* **83**, 561 (1997).
- Cizek K., Barek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: *Electroanalysis* **19**, 1295 (2007).
- Vyskočil V., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* **15**, 3059 (2011).
- Edler B., Zwiener C., Frimmel F. H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **359**, 288 (1997).
- Dorie L. D., Bagley S. T., Leddy D. G., Johnson J. H.: *Environ. Sci. Technol.* **21**, 757 (1987).
- Ankley G. T., Mekenyan O. G., Kosian P. A., Makynen E. A., Mount D. R., Monson P. D., Call D. J.: *SAR QSAR Environ. Res.* **5**, 177 (1996).
- Kosian P. A., Makynen E. A., Monson P. D., Mount D. R., Spacie A., Mekenyan O. G., Ankley G. T.: *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1021 (1998).

10. Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
11. Vyskočil V., Navrátil T., Polášková P., Barek J.: *Electroanalysis* 22, 2034 (2010).
12. Hájková A., Vyskočil V., Daňhel A., Wang J., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 1775 (2011).
13. Matthias O.: *Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
14. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, Toronto 2000.

ANALÝZA VÝZNAMNÝCH BIOAKTIVNÍCH LÁTEK V RAKYTNÍKU TECHNIKOU HPLC-COULARRAY

KATEŘINA HÁJKOVÁ a BLANKA BEŇOVÁ

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

Úvod

Rakytník je velice bohatý na biologicky aktivní látky, které mají významné léčivé účinky. Nacházejí se ve všech částech rostliny. Především se jedná o vitaminy, kumariny, flavonoidy, alkaloidy, oleje, třísloviny, minerální látky¹ aj. Nedávno byla zjištěna přítomnost alkaloidu hippopheinu, z kterého vzniká amin serotonin ze skupiny endorfinů. Tyto látky mají pozitivní vliv na centrální nervovou soustavu a také omezují patologický růst tkání². Hlavním cílem práce je optimalizace metody pro stanovení vybraných fenolických látek a vitamínu C v sušeném rakytníku a několika výrobcích z něj.

Dnes se ke stanovení fenolických látek často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s coulometrickou detekcí. Jedná se o velice citlivou metodu. V této práci byla detekce provedena CoulArray detektorem. Při analýze nejprve dochází k separaci jednotlivých složek směsi. Detekce je založena na základě jejich rozdílné elektrochemické aktivity (oxidace nebo redukce) za použití řady coulometrických cel, na kterých jsou nastaveny různé konstantní potenciály. Umožňuje proto charakterizaci látek na základě poměru odezvy signálu velkého počtu kanálů³.

Experimentální část

Standardy, chemikálie a vzorky

Standardy fenolických látek: kyseliny galová, protokatechuová, vanilová, *p*-kumarová a vanilin byly získány od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Kyseliny ferulová, chlorogenová, *o*-kumarová, kávová a askorbová, epikatechin, resveratrol, kvercetin, rutin, kaempferol a katechin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ostatní používané chemikálie byly: hydrogenfosforečnan amonný (Lachema, Neratovice, ČR), mravenčí kyselina a methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR), acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Redestilovaná voda byla připravena pomocí přístroje Ultraclear na Univerzitě Pardubice.

Celkem bylo v této práci analyzováno jedenáct vzorků. Jednalo se o vzorky bez přidaných příměsí: sušený rakytník a 100% rakytníková šťáva (vzorek 4 a 11). Dalšími vzorky byly následující výrobky z rakytníku: rakytník –

ovocná pomazánka, rakytník v medu, rakytník – gel (vzorek 1, 3 a 6) a rakytník – olej (vzorek 7). Tyto vzorky byly nakoupeny u firmy Rakytník Cvrček se sídlem Lhota pod Libčany. Dále byly analyzovány výrobky pořízené na pardubických farmářských trzích: bonbony (vzorek 5), rakytníkové kapky (vzorek 9), dva druhy rakytníkových sirupů (vzorek 8 a 10). V lékárně v Pardubicích byl koupen poslední vzorek – rakytníkový čaj (vzorek 2) od firmy Mediate Libchavy.

Všechny vzorky kromě čaje byly zavřené uchovávány v lednici. Sirupy, 100% šťáva a kapky byly před analýzou pouze vhodně naředěny. U ostatních vzorků byla provedena extrakce 50% vodným roztokem methanolu a následně ultrazvukem po dobu 30 min. Příprava vzorků před analýzou rovněž zahrnovala filtraci všech roztoků a připravených extraktů přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Vlastní analýza

Stanovení fenolických látek bylo provedeno na kapalinovém chromatografu s elektrochemickým CoulArray detektorem, který byl složen z následujících součástí:

- CoulArray detektor s osmi elektrochemickými celami,
- chromatografické pumpy,
- termostat pro kolonu, směšovač, tlumič pulzů a šesti-cestný dávkovací ventil,
 - vše od ESA, Chelmsford, MA, USA,
- odplyňovač Vacuum Degasser DG 3014, ECOM, Praha, ČR,
- kolona Gemini 3u C18 110A (150 \times 300 mm, velikost částic 3 μm),
 - Phenomenex, USA.

K optimalizaci chromatografických podmínek byly použity pracovní roztoky standardních látek o koncentraci 2 mg l^{-1} , které byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 100 mg l^{-1} . Byla použita dvousložková mobilní fáze. Nejprve byla připravena mobilní fáze A rozpouštěním příslušné navážky hydrogenfosforečnanu amonného v 1 litru redestilované vody. Hodnota pH mobilní fáze byla upravována na požadovanou hodnotu koncentrovanou mravenčí kyselinou.

Mobilní fázi B byl 50% roztok vzniklý smísením mobilní fáze A a acetonitrilu v poměru 1:1. Takto připravené mobilní fáze byly vždy filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,4 ml min^{-1} , byla použita gradientová eluce, dávkovaný objem vzorku byl 10 μl a teplota kolony 35 $^{\circ}\text{C}$. Látky byly detegovány při potenciálech 200–900 mV s krokem po 100 mV.

Askorbová kyselina byla stanovena odděleně, jelikož nebyla detegována zjištěnou metodou pro ostatní fenolické

Tabulka I
Meze detekce a stanovitelnosti standardních látek

Fenolické látky	Mez detekce [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Mez stanovitelnosti [$\mu\text{g l}^{-1}$]
Gallová kyselina	4,4	14,8
Protokatechuová kyselina	1,5	4,9
Chlorogenová kyselina	18,1	60,6
Vanilová kyselina	5,0	16,6
Katechin	7,9	26,2
Kávová kyselina	17,7	59,0
Vanilin	15,9	53,1
<i>p</i> -Kumarová kyselina	2,3	7,6
Epikatechin	3,4	11,3
Ferulová kyselina	4,1	13,9
<i>o</i> -Kumarová kyselina	2,9	9,8
Rutin	17,7	59,0
Resveratrol	14,5	48,4
Kvercetin	5,4	18,1
Kaempferol	101,1	337,2
Askorbová kyselina	33,7	112,4

látky. Extrakce byla provedena pouze v ultrazvuku po dobu 30 min přidavkem 5 ml studené vody. Přístrojové vybavení bylo shodné, pouze byla vyměněna kolona za Kromasil 5u C18 100 A (250 × 460 mm, velikost částic 5 μm), Phenomenex, USA. Z literatury bylo převzato složení mobilní fáze A (50 ml acetonitrilu + 950 ml 0,1% trifluoroctové kyseliny) a mobilní fáze B (100% acetonitril)⁴. Jako nejlepší průtok mobilní fáze bylo zjištěno 0,3 ml min⁻¹, byla použita gradientová eluce, dávkovaný objem vzorku byl 10 μl a teplota kolony 25 °C. Potenciály byly nastaveny v rozmezí 50–450 mV s krokem po 50 mV.

Výsledky a diskuse

Cílem této práce bylo nalezení vhodné metody ke stanovení obsahu vybraných fenolických látek ve vzorcích rakytníku a výrobků z něj. Nejprve byla optimalizována metoda pro analýzu fenolických látek bez kyseliny askorbové. Jako mobilní fáze A byl vybrán 10 mmol l⁻¹ roztok hydrogenfosforečnanu amonného a vhodná hodnota pH byla stanovena 3,5. Dalším krokem byla optimalizace gradientu mobilní fáze. Jako nejvhodnější byla nakonec zvolena gradientová eluce o následujícím průběhu: 0–20 min: 0 % MF B, 20–30 min: 4 % MF B, 30–40 min: 8 % MF B, 40–60 min: 11 % MF B, 60–85 min: 15 % MF B, 85–100 min: 54 % MF B, 100–110 min: 80 % MF B, po 110 min: 100 % MF B, kdy došlo k rozdělení všech látek. Pro sepa-

Tabulka II
Obsah fenolických sloučenin v rakytníku a jeho výrobcích^a

Fenolické látky [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Vzorek 7
Gallová kyselina	-	59,0	-	104	-	-	-
Protokatechuová kyselina	0,980	34,8	0,540	79,8	-	0,720	2,88
Chlorogenová kyselina	1,22	45,4	-	26,6	-	-	1,41
Vanilová kyselina	1,54	42,7	0,518	113	-	4,02	-
Katechin	1,72	77,8	-	236	-	-	-
Kávová kyselina	4,92	62,2	-	96,4	-	-	-
Vanilin	0,480	5,20	0,188	25,4	2,04	9,66	1,61
<i>p</i> -Kumarová kyselina	0,300	3,56	0,640	18,2	-	0,900	2,10
Epikatechin	-	-	-	30,6	-	-	3,18
Nerulová kyselina	0,540	8,54	0,874	41,0	-	-	2,58
<i>o</i> -Kumarová kyselina	0,520	3,84	0,760	23,6	0,275	-	-
Rutin	14,2	68,6	3,26	159	1,18	2,64	7,32
Resveratrol	0,460	4,94	-	-	0,235	-	3,35
Kvercetin	0,660	12,6	0,354	51,4	-	-	4,98
Kaempferol	-	7,00	0,312	10,2	-	-	-

^a (-) Látka nebyla ve vzorku nalezena

Tabulka II
Pokračování

Fenolické látky [mg l ⁻¹]	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11
Gallová kyselina	12,1	1,94	3,24	2,80
Protokatechuová kyselina	47,3	–	–	2,74
Chlorogenová kyselina	–	–	–	–
Vanilová kyselina	2,85	2,81	1,04	2,58
Katechin	2,50	–	2,20	–
Kávová kyselina	3,87	–	4,84	–
Vanilin	4,85	0,210	0,518	–
<i>p</i> -Kumarová kyselina	0,880	0,240	–	0,340
Epikatechin	1,44	–	–	–
Ferulová kyselina	5,79	14,1	0,440	2,50
<i>o</i> -Kumarová kyselina	8,13	9,75	0,260	1,02
Rutin	40,5	6,58	5,16	5,72
Resveratrol	0,680	–	–	–
Kvercetin	0,740	0,320	–	0,252
Kaempferol	1,35	–	–	–

^a (–) Látka nebyla ve vzorku nalezena

raci askorbové kyseliny byl použit gradient: 0–12 min: 0 % MF B, 12–40 min: 50 % MF B a po 40 min: 100 % MF B. Od 12 min byl změněn průtok z 0,3 ml min⁻¹ na 0,4 ml min⁻¹. Pro standardní látky byly také vyhodnoceny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Tyto hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Porovnáním retenčních časů standardů s časy vzorků bylo v rakytníku a výrobcích z něj identifikováno celkem 14 fenolických látek. Na základě kalibračních závislostí byl zjištěn obsah sledovaných látek. Následující tab. II shrnuje dosažené výsledky.

Navíc byla stanovována kyselina askorbová. Její přítomnost nebyla zjištěna ve vzorcích 1, 2, 3, 7 a 9. V tab. III jsou zaznamenány pouze pozitivní výsledky.

Závěr

V této práci byl k analýze významných bioaktivních fenolických látek používán kapalinový chromatograf vyba-

vený CoulArray detektorem. Po praktické stránce bylo ověřeno, že spojení kapalinové chromatografie s coulometrickou detekcí je metoda selektivní a velice citlivá. Meze detekce analyzovaných látek se pohybovaly řádově v jednotkách, maximálně desítkách µg l⁻¹. Výjimku představuje pouze kampferol a askorbová kyselina. Jejich meze stanovitelnosti se pohybují v řádech stovek µg l⁻¹.

Optimalizovaná metoda byla použita pro stanovení obsahu vybraných látek ve vzorcích rakytníku a výrobků z něj připravených. Bylo zjištěno, že největší množství látek je obsaženo v sušeném rakytníku, koncentrace látek se pohybuje v rozmezí 10,2–236 µg g⁻¹. Jeho dalším zpracováním se jejich koncentrace snižuje. Pouze u rakytníkového čaje bylo detegováno větší množství fenolických látek, ale to bylo pravděpodobně způsobeno přidavkem jiných druhů rostlin například růže šípkové (plod), yzopu lékařského (nať), ostružiníku planého (list). Pouze rutin byl zjištěn ve všech vzorcích. Jeho největší koncentrace byla neměřena u sušeného rakytníku 159 µg g⁻¹, dále pak u rakytníkového čaje 68,6 µg g⁻¹. Celkově nejméně bohatý

Tabulka III
Obsah kyseliny askorbové v rakytníku a jeho výrobcích

Fenolické látky	Vzorek 4 [mg g ⁻¹]	Vzorek 5 [mg g ⁻¹]	Vzorek 6 [mg g ⁻¹]	Vzorek 8 [mg l ⁻¹]	Vzorek 10 [mg l ⁻¹]	Vzorek 11 [mg l ⁻¹]
Askorbová kyselina	384	0,060	0,004	120	60,0	44,0

na přítomnost fenolických látek byl vzorek bonbonu. Byly v něm detegovány pouze 4 látky: vanilin, rutin, *o*-kumarová kyselina a resveratrol. Askorbová kyselina byla v největší koncentraci v sušeném rakytníku (384 mg g^{-1}) a sirupu č. 1 (120 mg l^{-1}).

LITERATURA

1. Valíček P., Havelka E. V.: *Rakytník řešetlákový rostlina budoucnosti*. Start, Benešov 2008.
2. Jablonský J., Bajer J.: *Rostliny pro posílení organismu a zdraví*. Grada Publishing, Praha 2007.
3. Beňová B.: *Disertační práce*. Univerzita Pardubice 2008.
4. Gazdik Z., Zitka O., Petřlova J. Adam V., Zehnalek J., Horna A., Reznicek V., Beklova M., Kizek R.: *Sensors* 8, 7097 (2008).

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ KARCINOGENNÍHO 4-NITROBIFENYLU

EVA HORÁKOVÁ, VLASTIMIL VYSKOČIL
a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
Evinka.horakova@seznam.cz

Úvod

Studovaná látka 4-nitrobifenyl (4-NBP) patří do skupiny nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH), které jsou vysoce nebezpečné mutagenní látky. V silně znečištěné atmosféře vznikají NPAH reakcemi polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) s oxidy dusíku, které jsou v atmosféře přítomny. Za specifické toxické účinky NPAH zřejmě odpovídají reaktivní nitro anion radikály, které vznikají metabolickými přeměnami a které snadno reagují s buněčnými nukleofily, zejména proteiny a nukleovými kyselinami. Tyto reakce mohou vysvětlit mutagenní a karcinogenní účinky řady aromatických nitrosloúčenin bez ohledu na vlastnosti vznikajících aminoderivátů PAH, které zpravidla rovněž vykazují silné genotoxické účinky¹. NPAH byly nalezeny v ovzduší, výfukových plynech, sazích, emisích spaloven, v sedimentech, cigaretovém kouři¹. Mononitro- a vnitro-PAH vykazují několikanásobně větší mutagenitu či karcinogenitu než jejich matečné PAH, takže jejich sledování je v popředí moderní environmentální analytické chemie².

Mezi akutní účinky působení 4-NBP patří podráždění očí a dýchací soustavy, bolest hlavy, zvracení, průjmý a únava^{3,4}. Přímé karcinogenní účinky 4-NBP na člověka nebyly prokázány. 4-NBP byl používán k výrobě 4-aminobifenylu (4-ABP), který vyvolává rakovinu močového měchýře a má kumulativní účinky. Při pokusech na zvířatech byl u psů vlivem 4-NBP pozorován vznik rakoviny močového měchýře³⁻⁷. Studovaná látka je téměř z 80 % metabolicky přeměňována na 4-ABP a dalším metabolitem s vysokým podílem zastoupení je 4-hydroxylaminobifenyl⁸.

Díky přítomnosti nitroskupiny na aromatickém jádře lze 4-NBP redukovat a stanovit jej polarografickými a voltametrickými metodami.

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování 4-nitrobifenylu (4-NBP) a nalezením optimálních podmínek pro jeho stanovení pomocí DC voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Vzhledem k toxicitě rtuti a snaze o snížení její spotřeby či její úplné nahrazení⁹ je použití amalgamové elektrody vhodnější než použití rtuťových elektrod.

Dalším cílem této práce bylo dosažení co nejnižší meze stanovitelnosti (LOD) a ověření použitelnosti vyvinutých metod pro stanovení 4-NBP v modelových vzorcích pitné a říční vody.

Experimentální část

Reagencie

Studovaná látka: zásobní roztok 4-NBP (99%, Merck) v methanolu (Merck, p.a.) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹. Roztoky o nižších molárních koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem.

Další použité chemikálie: kyselina boritá (Chemapol, p.a.), kyselina fosforečná (85%, Chemapol, p.a.), octová kyselina (99,8%, Lach-Ner, p.a.), hydroxid sodný (Lach-Ner, p.a.), tetraboritan sodný (Chemapol, p.a.), dihydrát octanu sodného (Chemapol, p.a.), tetrabutylamonium jodid (Lach-Ner, p.a.), kyselina chlorovodíková (35%, Penta), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Chemapol, p.a.), dodecylhydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Chemapol, p.a.). Brittonův-Robinsonův pufr (BR pufr) o příslušném pH byl připraven smísením kyselé složky (H₃BO₃, CH₃COOH a H₃PO₄ o koncentraci 0,04 mol dm⁻³) a zásadité složky (NaOH o koncentraci 0,20 mol dm⁻³).

Všechny roztoky byly skladovány ve tmě ve skleněných nádobách za laboratorní teploty.

Aparatura

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies) se softwarem UV-Visible ChemStation, ver. 9.01, v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Software pracoval v operačním systému Windows 98 SE (Microsoft Corporation).

Měření pH bylo prováděno laboratorním pH metrem Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, nakalibrovaným standardními vodnými kalibračními roztoky o pH 7,00 a 4,00 (obojí Radiometer, Copenhagen, Dánsko).

Pro všechna voltametrická stanovení byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (vše Polaro-Sensors, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows 98. Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referenční elektroda byla použita nasycená argentschloridová elektroda, jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda. Jako pracovní elektroda byla použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda (m-AgSAE).

Povrch m-AgSAE byl během měření obnovován těmito procesy:

Amalgamace: Elektroda byla přibližně na 15 s ponořena do kapalné rtuťi a pomalu vyndána, čímž se obnovil meniskus elektrody. Amalgamace byla prováděna po sedmi dnech nebo po dlouhodobém přerušení práce. Při každé amalgamací může vzniknout jinak velký meniskus, což může způsobit problémy v reprodukovatelnosti stanovení.

Elektrochemická aktivace: Elektrochemická aktivace byla prováděna v roztoku KCl ($c = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$) vložení napětí -2200 mV po dobu 300 s. Roztok nebyl v průběhu této operace probubláván dusíkem. Během aktivace dochází k elektrochemickému čištění elektrody – odstranění oxidů a adsorbovaných látek z povrchu elektrody. Aktivace byla prováděna po amalgamací, při pasivovaném povrchu elektrody a při přerušení práce na dobu delší než jedna hodina.

Regenerace: Regenerace byla provedena vždy v měřeném roztoku před začátkem měření. Při této operaci se skokově střídá kladnější konstantní potenciál $E_{\text{reg},1}$ a zápornější konstantní potenciál $E_{\text{reg},2}$. Tyto potenciály byly vkládány v intervalu 0,1 s po dobu 30 s. Hodnoty potenciálů $E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ odpovídající krajům potenciálového okna (při absolutní velikosti registrovaného proudu $I = 1 \text{ } \mu\text{A}$) byly nalezeny experimentálně. Hodnota $E_{\text{reg},1}$ odpovídá hodnotě kladnějšího kraje potenciálového okna snížené o 100 mV, $E_{\text{reg},2}$ odpovídá hodnotě zápornějšího kraje potenciálového okna zvýšené o 100 mV.

Pracovní postupy

Z hlediska stálosti měřeného roztoku byla snaha pracovat ve směsi methanol-pufř (3:7). Při voltametrických stanoveních proto bylo odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku 4-NBP v methanolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$)

do 10ml odměrné baňky, přidán methanol do celkového objemu 3 ml, a následně doplněno pufřem o daném pH. Připravený roztok byl promíchán a převeden do voltametrické měřicí nádoby. Roztok byl zbaven kyslíku probubláváním dusíkem po dobu 5 min. Poté byly zaznamenány voltametrické křivky, každá křivka byla změřena pětkrát. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty.

Rychlost nárůstu potenciálu pro metodu DCV, DPV i AdSDPV byla 20 mV s^{-1} . Při DPV a AdSDPV byla šířka pulzu 100 ms a modulační amplituda -50 mV .

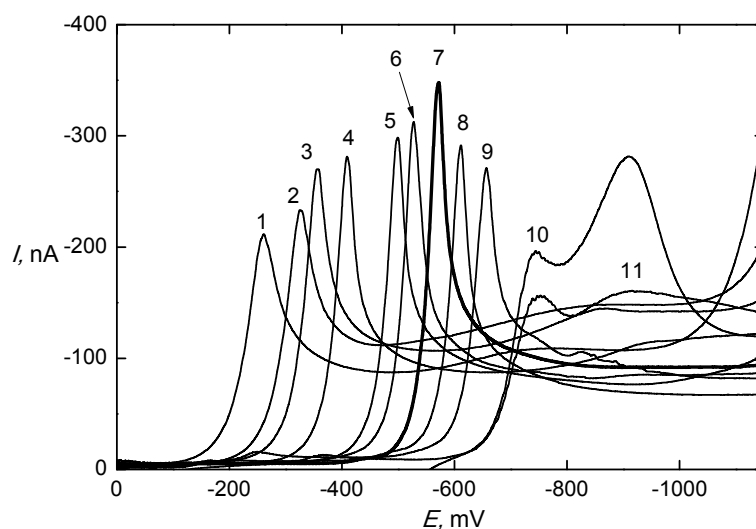
Výška píku při DCV byla měřena od přímky vzniklé prodloužením lineární části voltamogramu před nástupem píku. Výška píku při DPV a AdSDPV byla měřena od spojnice minim po jeho stranách.

K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů byly použity programy Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Konfidenční a predikční pásy ($\alpha = 0,05$)¹⁰ u kalibračních přímek byly vyhodnoceny a sestrojeny programem Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, USA).

Mez stanovitelnosti (LOD) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinasobku směrodatné odchylky deseti stanovení 4-NBP o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky¹¹.

Výsledky a diskuse

Vzhledem k malé rozpustnosti 4-NBP ve vodě bylo nutné pracovat ve smíšeném prostředí voda-methanol. Měření byla proto provedena pro poměry objemů methanolu (objem samotného methanolu a zásobního roztoku



Obr. 1. Voltamogramy 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) naměřené metodou DCV s elektrochemickou regenerací na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufř (3:7) o pH* 2,4 (1); 3,4 (2); 4,4 (3); 5,4 (4); 6,4 (5); 7,5 (6); 8,4 (7); 9,0 (10,1); 10,1 (9); 11,1 (10); 12,0 (11). $E_{\text{reg},1}$, $E_{\text{reg},2}$ dle krajů potenciálového okna

4-NBP) a BR pufru: 1:9, 2:8, 3:8 a 5:5 (1:1), při koncentraci 4-NBP $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} .

Výsledkem spektrofotometrického i voltametrického sledování stálosti měřených roztoků o různém poměru BR pufru a methanolu bylo zjištění, že na stabilitu a velikost odezvy má vliv obsahu methanolu v základním elektrolytu. Jako nejvhodnější objemový poměr methanolu a BR pufru byl zvolen poměr 3:7.

Vliv pH na elektrochemické chování 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) byl sledován metodami DCV a DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0 a poměru methanolu k BR pufru 3:7. DC voltamogramy 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) naměřené při různém výsledném pH* (pH roztoku vzniklého smísením methanolu a BR pufru o daném pH) jsou zobrazeny na obr. 1.

Pro metodu DCV byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku E_p 4-NBP na pH* roztoku v rozmezí 2,4–12,0 vypočten vztah:

$$E_p [\text{mV}] = -49,79 \text{ pH}^* - 139,81 \quad (R^2 = 0,9942)$$

Pro metodu DPV byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku E_p 4-NBP na pH* roztoku v rozmezí 2,4–12,0 vypočten vztah:

$$E_p [\text{mV}] = -48,66 \text{ pH}^* - 104,65 \quad (R^2 = 0,9974)$$

Jako optimální pro další měření byl pro metodu DCV i DPV zvolen roztok, k jehož přípravě byl použit BR pufr o pH 8.

Na základě výsledků porovnání měření s elektrochemickou regenerací a bez regenerace lze konstatovat, že k měření 4-NBP metodou DCV v prostředí methanol-BR pufr o pH 8,0 (3:7) není bezpodmínečně nutné použití elektrochemické regenerace.

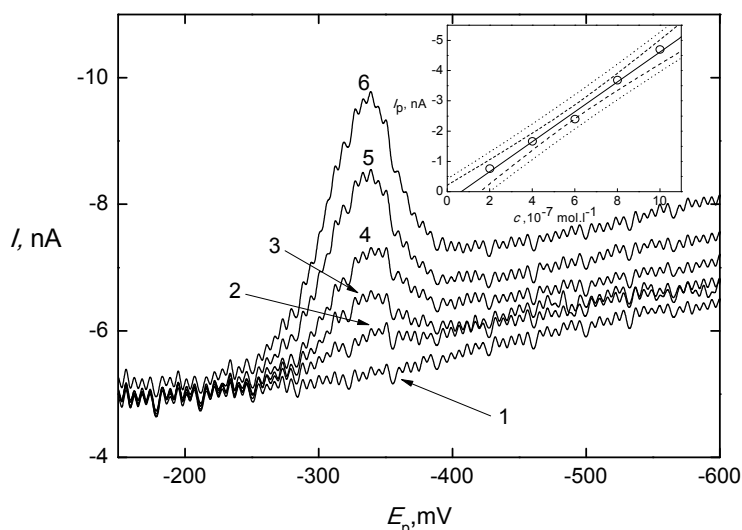
K měření 4-NBP metodou DPV v prostředí methanol-BR pufr o pH 8 (3:7) je vhodné aplikovat regeneraci

$E_{\text{reg},1} = -900$ mV, $E_{\text{reg},2} = -300$ mV; tyto regenerační potenciály byly zvoleny jako optimální po několika pokusech, při nichž byly regenerační potenciály voleny na krajích píku a krajích okna a použity jejich různé kombinace.

Přestože z předchozích měření vyplynulo, že optimální pro měření je BR pufr o pH 8 a methanol (7:3), při měření koncentrační závislosti se ukázalo, že při snížení koncentrace 4-NBP na $1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} a níže není možné voltamogramy vyhodnotit. Tento problém byl vyřešen použitím acetátového pufru, který byl vybrán po sérii měření, ve kterých byly měřeny voltamogramy těchto základních elektrolytů: roztok tetraboritanu sodného (pH 9,2), fosfátový pufr (pH 7,0), BR pufr (pH 8,0), acetátový pufr (pH 4,8), borátový pufr (pH 8,0) a tetrabutylamonium jodid (pH 8,0). Pouze u acetátového pufru byla linie základního elektrolytu bez nečistot a bez píků, které by byly blízko hodnotě E_p 4-NBP. Acetátový pufr měl i vhodnou šířku potenciálového okna.

Pro nově vybraný základní elektrolyt byla ověřena opakovatelnost měření, z výsledků vyplynulo, že pro měření v prostředí methanol-acetátový pufr o pH 4,8 (3:7) metodou DCV není nutné použít regeneraci a pro měření metodou DPV je vhodné použít regeneraci s $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1300$ mV.

Na základě výše uvedených skutečností bylo jako optimální zvoleno prostředí methanol-acetátový pufr o pH 4,8 (3:7). Pro měření metodou DCV nebyla použita regenerace a při měření metodou DPV byly použity regenerační potenciály $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1300$ mV. Závislosti proudu píku (I_p) 4-NBP na koncentraci byly proměřeny metodami DCV (bez regenerace) a DPV (s regenerací, $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1300$ mV) na m-



Obr. 2. Voltamogramy naměřené metodou DCV bez regenerace na m-AgSAE v prostředí methanol-acetátový pufr o pH 4,8 (3:7). C (4-NBP): 0 (1); $2 \cdot 10^{-7}$ (2); $4 \cdot 10^{-7}$ (3); $6 \cdot 10^{-7}$ (4); $8 \cdot 10^{-7}$ (5); $10 \cdot 10^{-7}$ (6) mol l^{-1} . Vložena závislost proudu píků 4-NBP I_p na koncentraci 4-NBP v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} . — konfidenční pás; predikční pás

AgSAE v prostředí methanol-acetátový pufr o pH 4,8 (3:7) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} , $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} a $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} . Na obr. 2 jsou zaznamenány voltamogramy 4-NBP naměřené metodou DCV bez regenerace na m-AgSAE v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} .

Závislost výšky píku na koncentraci má pro obě metody lineární charakter. Parametry kalibračních přímk a meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. I.

Metodou DCV bylo pro 4-NBP bylo dosaženo meze stanovitelnosti $c = 2 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , RSD výšky píku 10 měření při $c(4\text{-NBP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} byla 2,7 %. Metodou DPV bylo pro 4 NBP bylo dosaženo meze stanovitelnosti $c = 2 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , RSD výšky píku 10 měření při $c(4\text{-NBP}) = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , byla 5,1 %.

Ke snížení limitu detekce 4-NBP dosaženého metodou DPV na m-AgSAE byla prověřena možnost využití AdSDPV. Na základě výsledků optimalizace měření byla použita při každém měření regenerace ($E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ dle krajů potenciálového okna). Měření byla provedena ve směsném prostředí methanol-pufr v objemovém poměru 1:9. Dále bylo měřeno v objemovém poměru methanol-pufr 1:249, a to za účelem snížení obsahu methanolu, který může snižovat adsorpci 4-NBP na povrch elektrody.

Vliv pH na voltametrické chování 4-NBP ($c = 4 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1}) byl studován v prostředí BR pufru o pH 2,0 a pH 13,0, acetátového pufru o pH 4,8 a fosfátového pufru o pH 7,0. Hodnota potenciálu akumulace (E_{acc}) byla volena jako potenciál píku (E_p) a dále jako $E_p - 100$ mV, $E_p - 200$ mV a $E_p - 300$ mV, doba akumulace (t_{acc}) byla 60 s.

Pouze v prostředí methanol-BR pufr (pH 2,0) v poměru 1:9, při $E_{\text{acc}} = -400$ mV a $t_{\text{acc}} = 300$ s se projevil efekt

akumulace 4-NBP na m-AgSAE. Došlo ke zvětšení signálu přibližně 1,5krát vůči výšce píku při $t_{\text{acc}} = 0$ s. Míra akumulace 4-NBP na m-AgSAE při měření technikou AdSDPV za výše uvedených podmínek však nebyla dostatečná k tomu, aby bylo možné její další využití ke snížení meze stanovitelnosti.

Vyvinuté metody byly využity ke stanovení 4-NBP v modelových vzorcích vody. Koncentrační závislost byla proměřena metodami DCV a DPV na m-AgSAE v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} . Pitná ani říční voda (Vltava, Praha) nebyla před vlastním měřením nijak upravována. Modelové roztoky o koncentracích 4-NBP c_V (koncentrace v pitné vodě), c_{RV} (koncentrace v říční vodě): 0; $1 \cdot 10^{-7}$; $2 \cdot 10^{-7}$; $4 \cdot 10^{-7}$; $6 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-7}$ a $10 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} byly připraveny ze zásobního roztoku 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) v methanolu a z pitné nebo říční vody. Z modelových roztoků 4-NBP ve vodě bylo odpipetováno 9 ml do odměrné baňky a doplněno do 10 ml acetátovým pufrem o pH 4,8. Každá křivka byla změřena třikrát.

Koncentrační závislosti 4-NBP v pitné vodě a říční vodě byly proměřeny metodami DCV (bez regenerace) a DPV (s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1300$ mV) na m-AgSAE v prostředí acetátového pufru v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} .

Metodou DCV bylo pro 4-NBP v pitné vodě dosaženo meze stanovitelnosti $c_V = 2 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , RSD výšky píku 10 měření při $c_V = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} byla 4,0 %. Metodou DPV bylo pro 4-NBP v pitné dosaženo meze stanovitelnosti $c_V = 2 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} a RSD 10 měření výšky píku při $c_V = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} 3,9 %.

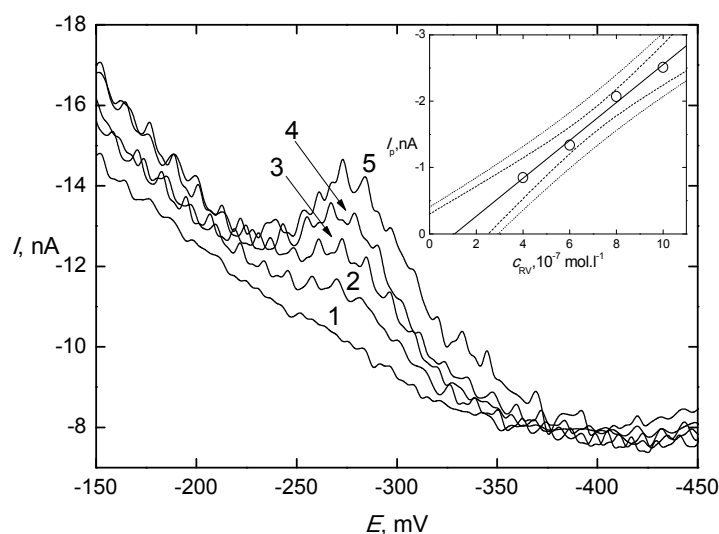
Metodou DCV bylo pro 4-NBP v říční vodě dosaženo meze stanovitelnosti $c_{RV} = 2 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} , RSD výšky píku

Tabulka I

Parametry kalibračních přímk stanovení 4-NBP na m-AgSAE a příslušné meze stanovitelnosti (LOD)

Metoda	Prostředí	Koncentrace [mol l^{-1}]	Směrnice [nA mol $^{-1}$ l]	Úsek [nA]	R^2	LOD ^a [mol l^{-1}]
DCV	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-4,5 \cdot 10^6$	37,4	0,9945	–
	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-2,7 \cdot 10^6$	–0,22	0,9736	–
	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-5,0 \cdot 10^6$	0,33	0,9893	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-6,1 \cdot 10^6$	64,5	0,9794	–
	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-3,6 \cdot 10^6$	0,02	0,9970	–
	acetátový pufr pH 4,8 – MeOH (7:3)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-5,1 \cdot 10^6$	0,99	0,9606	$2 \cdot 10^{-7}$
DCV	pitná voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-6,0 \cdot 10^6$	0,13	0,9983	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	pitná voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-6,2 \cdot 10^6$	–0,48	0,9990	$2 \cdot 10^{-7}$
DCV	říční voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-3,2 \cdot 10^6$	0,25	0,9943	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	říční voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-2,9 \cdot 10^6$	0,31	0,9866	$4 \cdot 10^{-7}$

a – 10σ ; $\alpha = 0,05$



Obr. 3. Voltamogramy 4-NBP v říční vodě naměřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací v prostředí modelový vzorek- acetátový pufr o pH 4,8 (9:1). $c_{RV}(4-NBP)$: 0 (1); $4 \cdot 10^{-7}$ (2); $6 \cdot 10^{-7}$ (3); $8 \cdot 10^{-7}$ (4); $10 \cdot 10^{-7}$ (5) mol l^{-1} . $E_{reg,1} = 0$ mV, $E_{reg,2} = -1300$ mV. Vložena závislost proudu píků I_p 4-NBP na koncentraci 4-NBP v říční vodě v rozmezí $(4-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} . $E_{reg,1} = 0$ mV, $E_{reg,2} = -1300$ mV; — konfidenční pás; predikční pás

10 měření při $c_{RV} = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} byla 4,6 %. Metodou DPV bylo pro 4-NBP bylo dosaženo meze stanovitelnosti $c_{RV} = 4 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} a RSD 10 měření výšky píku při $c_{RV} = 5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} 5,9 %.

Na obr. 3 jsou zaznamenány voltamogramy 4-NBP v říční vodě naměřené metodou DPV s regenerací ($E_{reg,1} = 0$ mV, $E_{reg,2} = -1300$ mV) na m-AgSAE. Parametry kalibračních přímků jsou uvedeny v tab. I.

Závěr

Při stanovení 4-NBP metodami DCV a DPV na m-AgSAE bylo zjištěno, že látka poskytuje v závislosti na pH jeden až dva píky. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Jako nejvhodnější bylo zvoleno prostředí methanol-acetátový pufr o pH 4,8 v poměru 3:7. Pro toto optimální prostředí byly u obou metod nalezeny meze stanovitelnosti 4-NBP.

Ke stanovení 4-NBP technikou AdSDPV na m-AgSAE nebyly nalezeny vhodné podmínky.

Byly ověřeny možnosti stanovení 4-NBP v pitné a říční vodě metodami DCV a DPV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} a nalezeny meze stanovitelnosti.

Za daných podmínek je možné 4-NBP na m-AgSAE stanovit dostatečně přesně a citlivě. V rámci dalšího výzkumu bude pomocí cyklické voltametrie studován mechanismus redukce 4-NBP na m-AgSAE.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM0021620857), Grantovou agenturou České republiky

(projekt P206/12/G151), Technologickou agenturou České republiky (projekt TA01020565) a Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44).

LITERATURA

1. Moreira J. C., Barek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
2. Zielinska B., Samy S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 883 (2006).
3. URL: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/nitrobip.html>, staženo 15.4.2010.
4. 4-nitrobiphenyl Awareness Training, URL: <http://www.einstein.yu.edu/ehs/osa%20regulated/4-Nitrobiphenyl.pdf>, staženo 15.4.2010.
5. Anonymous: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Human, Vol. 4: Some Aromatic Amines, Hydrazine and Related Substances, N-Nitroso Compounds and Miscellaneous Alkylating Agents, 113. IARC, Lyon 1974.
6. Deichmann W. B., Macdonald W. M., Coplan M. M.: *Ind. Med. Surg.* 27, 634 (1958).
7. Maixnerová L., Pecková K., Barek J., Klímová H.: *Chem. Listy* 104, 191 (2010).
8. Ning S., Xiaobai X.: *Carcinogenesis* 6, 1233 (1997).
9. URL: http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2004_2009/documents/pr/585/585664/585664cs.pdf, staženo 1.5.2010.
10. Matthias O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, 2. vydání, str. 194. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
11. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. The McGraw-Hill Companies, Toronto 2000.

NOVÉ PLATINOVÉ KOMPLEXY S CYTOSTATICKOU AKTIVITOU: ANALYTICKÁ A MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE

MICHAELA HRDÁ, PETR KAČER, KAMILA SYSLOVÁ a JITKA HOLAKOVSKÁ

Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Fakulta chemické technologie, Ústav organické technologie, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice
 Michaela.Hrda@vscht.cz

Úvod

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších a nejčastějších příčin úmrtí v současné lidské populaci. Vznik nádorového onemocnění má komplexní příčiny. Některé z nich mají genetickou podstatu, jiné faktory jsou dány životním stylem a lze je ovlivnit, a tím zvyšovat či snižovat riziko vzniku nádoru. Jako součást komplexní terapie rakovinného bujení se podávají cytostaticky působící látky, které zastavují růst a množení buněk. Významná skupina těchto látek je tvořena platinovými komplexy. První platinové cytostatikum, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (Cisplatin), bylo pro léčbu nádorových onemocnění schváleno v roce 1968 (cit.^{1,2}), ale z důvodu výskytu závažných nežádoucích účinků byla postupně vyvíjena další platinová analoga až po současně vyvíjenou čtvrtou generaci, jejichž výhodou je především možnost orálního podání, a s tím spojená jednoduchá aplikace léčiva a menší zátěž pro pacienta.

Cílem předkládané práce je příprava originálních platinových komplexů s 1*R*,2*R*-diamincyklohexanovým (DACH) ligandem, analogů v dnešní době klinicky používané Oxaliplatin. Snahou je připravit taková analoga, která by vykazovala identickou, případně vyšší cytostatickou aktivitu a zároveň nižší nežádoucí účinky dané především jejich malou rozpustností ve vodě a tím způsobenou špatnou resorbovatelností. Navržená analoga Oxaliplatin byla syntetizována a biologicky testována a to difluoro-[(1*R*,2*R*)-1,2-cyklohexandiamin]platnatý komplex (DACHPtF₂), di(methansulfonato)-[(1*R*,2*R*)-1,2-cyklohexandiamin]platnatý komplex (DACHPtDM) a di(*p*-toluensulfonato)-[(1*R*,2*R*)-1,2-cyklohexandiamin]platnatý komplex (DACHPtDTs) a analoga amindichlorido(2-methylpyridin)platnatého komplexu, Picoptatin (PicoPt) a to amindifluorido(2-methylpyridin)platnatý komplex (PicoPtF₂), amindibromido(2-methylpyridin)platnatý komplex (PicoPtBr₂) a amindijodido(2-methylpyridin)platnatý komplex (PicoPtI₂), jakožto patentově nechráněných prekurzorů pro přípravu nových cytostatik, které by mohly být vhodné pro další aplikaci ve farmaceutickém průmyslu.

Experimentální část

Chemikálie

Cis-{(1*R*,2*R*)-1,2-cyklohexandiamin-κ*N*,κ*N'*} dichloridoplatnatý komplex (VÚAB Pharma, min. 99 %), amindichlorido(2-methylpyridin)platnatý komplex (VÚAB Pharma, min. 99 %), methansulfonát stříbrný (Aldrich, min. 99 %), *p*-toluensulfonát stříbrný (Aldrich, min. 99 %), fluorid stříbrný (Aldrich, min. 99 %), dusičnan stříbrný (Lachema Brno, p. a.), bromid draselný (Lachema Brno, p. a.), jodid draselný (Lachema Brno, p. a.), aceton (Penta, p. a.), acetonitril (Merck, ≥ 99,9 %), octan amonný (Sigma Aldrich, 99,9 %), methanol pro HPLC (Sigma Aldrich, 99,9 %), demineralizovaná voda (VŠCHT Praha, < 0,1 μS cm⁻¹).

Příprava DACHPtF₂, DACHPtDM, DACHPtDTs, PicoPtF₂ – jedнокrokové syntézy

Do Erlenmayerovy baňky s teflonovým magnetickým míchadlem byl předložen DACHPtCl₂ (pro přípravu DACHPtF₂, DACHPtDM a DACHPtDTs) nebo PicoPt (pro přípravu PicoPtF₂). Po přidavku dostatečného množství demineralizované vody (rozpustnost DACHPtCl₂ = 0,3 g l⁻¹, rozpustnost PicoPt = 1 g l⁻¹) byla takto vzniklá suspenze míchána a zahřívána na olejové lázni při teplotě 65 °C. K suspenzi byly poté postupně dávkovány dva ekvivalenty roztoku AgF ve vodě (pro přípravu DACHPtF₂ a PicoPtF₂), roztoku CH₃SO₃Ag ve vodě (pro přípravu DACHPtDM) nebo roztoku CH₃C₆H₄SO₃Ag ve vodě (pro přípravu DACHPtDTs). Reakce probíhala bez přístupu světla (aparatura byla obalena alobalem) a baňka byla uzavřena silikonovým septem s injekční jehlou. Směs byla poté míchána do druhého dne (> 16 hodin). Druhý den byla směs umístěna po dobu min. 4 hodin (*T* = 4 °C) do ledničky. V průběhu reakce bylo možné pozorovat vznik bílého zákalu AgCl. Následně byla směs přefiltrována přes filtrační aparaturu (ø pórů = 0,22 μm) a filtrát byl vysušen na rotační vakuové odparce (RVO) (*T*_{lázne} = 65 °C) a vysušen po dobu min. 3 hodin na vakuové lince.

Příprava PicoPtBr₂ a PicoPtI₂ – dvoukrokové syntézy

Do Erlenmayerovy baňky s teflonovým magnetickým míchadlem byl předložen DACHPtCl₂ (pro přípravu DACHPtBr₂) nebo PicoPt (pro přípravu PicoPtBr₂ a PicoPtI₂). Po přidavku dostatečného množství demineralizované vody (rozpustnost DACHPtCl₂ = 0,3 g l⁻¹, rozpustnost PicoPt = 1 g l⁻¹) byla takto vzniklá suspenze míchána a zahřívána na olejové lázni při teplotě 65 °C. K suspenzi byly poté postupně dávkovány dva ekvivalenty roztoku AgNO₃ ve vodě. Reakce probíhala bez přístupu světla

(aparatura byla obalena alobalem) a baňka byla uzavřena silikonovým septem s injekční jehlou. Směs byla poté míchána do druhého dne (> 16 hodin). Druhý den byla směs umístěna po dobu min. 4 hodin ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) do ledničky. Následně byla směs přefiltrována přes filtrační aparaturu (ϕ pórů = 0,22 μm).

Při laboratorní teplotě byly do filtrátu postupně dávkovány dva ekvivalenty roztoku KBr ve vodě (pro přípravu PicoPtBr₂) nebo roztoku KI ve vodě (pro přípravu PicoPtI₂). Reakce probíhala bez přístupu světla (aparatura byla obalena alobalem) a baňka byla uzavřena silikonovým septem s injekční jehlou. Směs byla poté míchána do druhého dne (> 16 hodin). Druhý den byla směs umístěna po dobu min. 4 hodin ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) do ledničky. Následně byla směs přefiltrována přes filtrační aparaturu (ϕ pórů = 0,22 μm) a filtrát byl vysušen na RVO ($T_{\text{lázně}} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) a vysušen po dobu min. 3 hodin na vakuové lince.

Analytická charakterizace kvality připravených platinových komplexů

HPLC/UV a HPLC-HRMS

Kinetika degradace látek byla monitorována na systému Dionex Ultimate 3000 (Dionex, USA) skládajícím se z degaséru, kvartérní pumpy, autosampleru, termostatu kolon a DAD detektoru. Separace látek byla realizována isokratickou elucí (mobilní fáze A – voda, mobilní fáze B – voda s 1 % acetonitrilem, pH 3,5 – upraveno octanem amonným, poměr složek 50:50 (V/V)) na koloně Phenosphere SAX 80A (Phenomenex, USA) s iontoměničovou stacionární fází o rozměrech kolony 250 × 4,6 mm × 5 μm (délka × vnitřní průměr × zrnitost stacionární fáze). Průtok mobilní fáze na koloně činil 1 ml min⁻¹. Kolona byla temperována na teplotu 25 $^{\circ}\text{C}$. Objem nastříkovaného vzorku na kolonu byl 10 μl . Separované látky byly detegovány DAD detektorem při vlnové délce $\lambda = 220\text{ nm}$ (rychlost sběru dat 5 Hz) a s využitím 3D pole v rozmezí vlnových délek $\lambda = 190\text{--}400\text{ nm}$. Doba analýzy byla 40 min.

Identifikace látek byla realizována na LC-HRMS systému LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA) za identických podmínek pro kapalinovou chromatografii jako u LC-DAD analýzy. Při MS analýze bylo použito elektrosprejové ionizace v negativním modu. Při monitorování látek bylo použito full scan modu o $m/z = 100\text{--}2000\text{ Da}$ při rozlišení 30 000. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly optimalizovány na následující parametry: napětí na kapiláře –2500 V, teplota na vstupní kapiláře 400 $^{\circ}\text{C}$, teplota HESI výparníku 450 $^{\circ}\text{C}$, sheat gas (dusík) tlak 0,52 MPa, pomocný plyn (dusík) 20 ArbU.

Rentgenová fluorescenční analýza (XRF)

Byl použit plně automatický sekvenční XRF spektrometr ARL 9400 XP (THERMO ARL, Switzerland) vybavený Rh lampou, 4 kW generátorem, čtyřmi kolimátory, šesti krystaly (AX 20, TLAP, PET, Ge 111, LiF 200, LiF 220) a dvěma detektory (proporcionální a scintilační).

Bezstandardová analýza byla vyhodnocována softwarem UNIQUANT 4, analýzy pomocí kalibračních křivek softwarem WinXRF.

Skannovací elektronová mikroskopie (SEM)

Byl použit elektronový mikroskop Hitachi S4700 (Hitachi, Japonsko) se studenou katodou s rozlišením 1,5 nm (15 kV), byl vybaven dvěma detektory sekundárních elektronů a jedním detektorem odražených elektronů. K interpretaci obrazu bylo využito multiparametrové optimalizace, která optimalizovala emisní proud katody, pracovní vzdálenost, urychlovací napětí, geometrii vzorku a detektory. Zvětšení 20–500 000krát. Metoda byla využita ke stanovení velikosti částic připravených prášků.

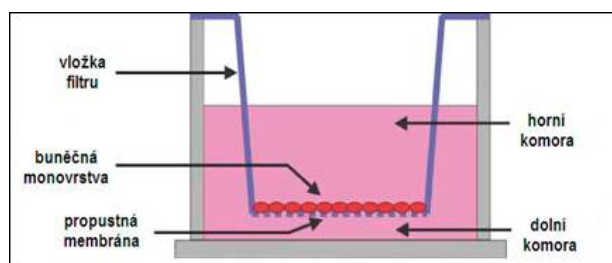
Rentgenová prášková difraktometrie (XRD)

Tato analytická metoda byla využita pro charakterizaci připravených monokrystalů. K měření byl využit systém XRD 3000 P systému (Seifert, Německo) řízený počítačem a používající Cu a Co lampy. Systém se skládal z goniometru, dvou počítačů (PC), jednoho měřícího a druhého pro vyhodnocení dat. Získaná data byla vyhodnocena softwarem HighScore Plus. Mezirovinné vzdálenosti a intenzity difrakčních linií byly porovnány s databází PDF 2 na CD-ROM.

Testování cytotoxicity na buněčných nádorových liniích

Všechny výše uvedené látky byly podrobeny tzv. XTT testům na buněčných nádorových liniích. V první řadě se jednalo o Caco-2 buněčné linie, které jsou kultivacími heterogenního lidského epitelálního kolorektálního adenokarcinomu, vyvinuté Institutem Sloan-Kettering pro výzkum rakoviny. V této podobě jsou rozlišeny na polarizovanou epitelální buněčnou monovrstvu, která poskytuje fyzikální a biochemickou bariéru pro průchod iontů a malých molekul³ (obr. 1).

Dále byly látky testovány na MCF-7 buněčných liniích, které byly poprvé izolovány v roce 1970 z prsní tkáně 69leté ženy a o tři roky později byly prokázány na Institutu v Detroitu. Používají se především pro *in vitro* studie rakoviny prsu, protože mají zachovány některé ideální charak-



Obr. 1. Zařízení pro testování látek na Caco-2 buněčných liniích

teristiky, a to především schopnost zpracovávat estrogen na formu estradiolu přes estrogenové receptory v buněčné cytoplazmě. Ačkoliv je jednoduché tyto kultivace rozmnožovat, jedná se o pomalu rostoucí buňky³.

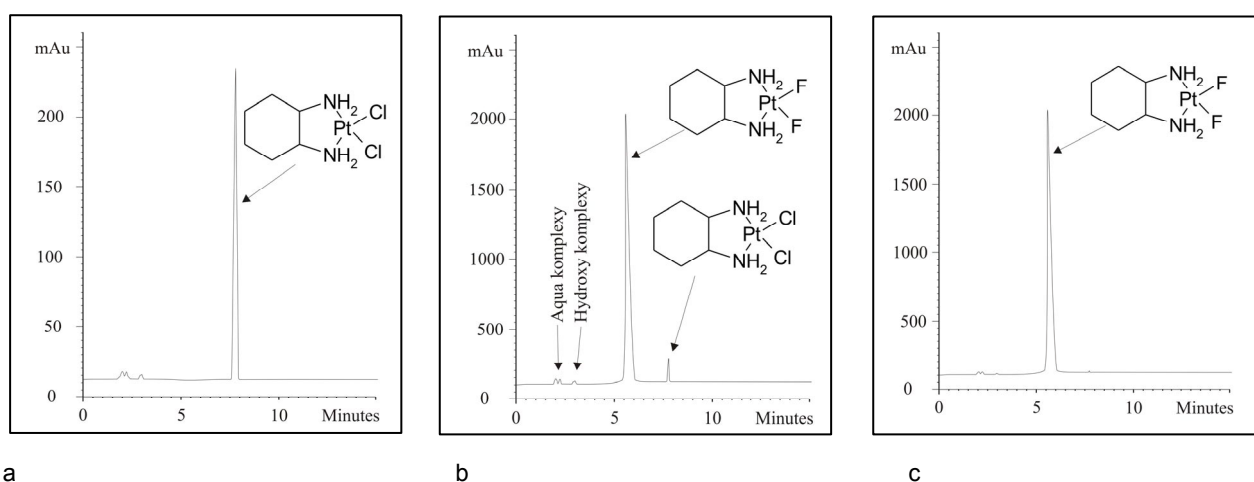
Testování akutní toxicity připravených látek

Testování bylo provedeno na samcích a samicích (50%:50%) potkanů Wistar o hmotnosti mezi 250 a 300 g a stáří 4 měsíců. Potkani byli krmeni potravinami a vodou *ad libitum*. Zvířata byla umístěna v párech v klecích z plexiskla při pokojové teplotě (24 °C) s 12 h cyklem světlo-tma (začátek cyklu světla v 7:00 h). Potkani byli náhodně rozděleni do exponované skupiny a kontrolní skupiny (podání fyziologického roztoku). Exponovaným

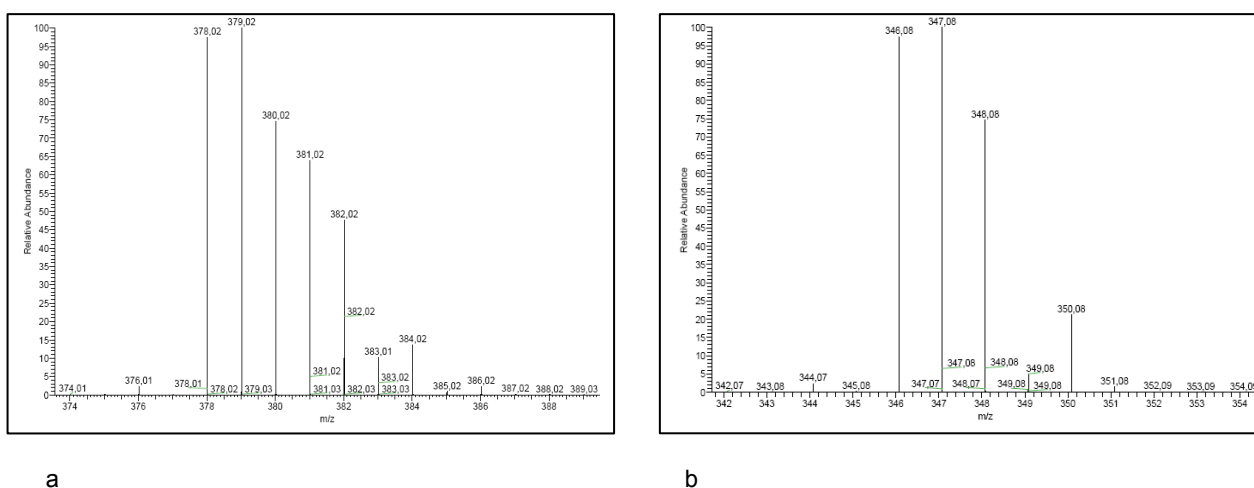
potkanům byla jednorázově podána subkutánně (s. c.) dávka do toxicitního testu předložené dávky v množství, které vedlo k určení parametru LD₅₀. Experimenty byly provedeny v souladu se zákony na ochranu zvířat ČR a v plném souladu s Evropskými požadavky Rady o používání pokusných zvířat (směrnice 86/609/EHS).

Výsledky a diskuse

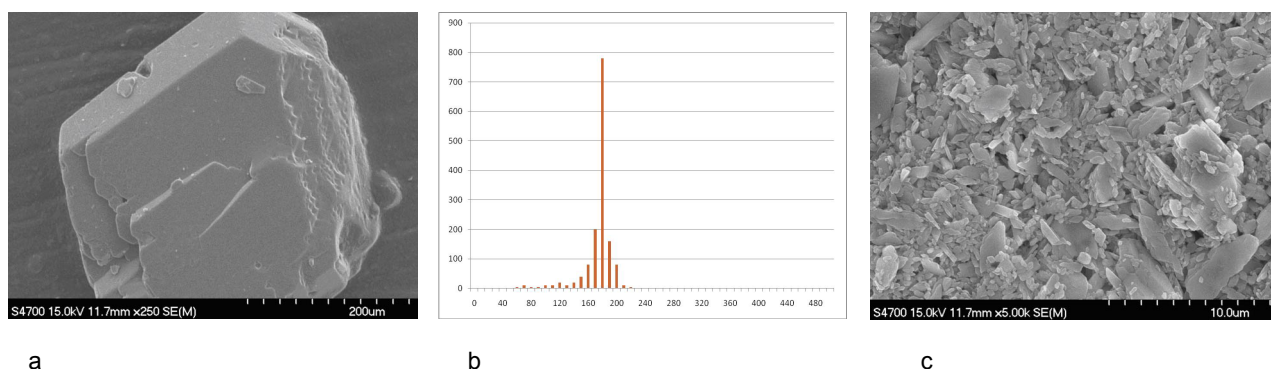
Všechny originální platinové komplexy byly připraveny podle postupů uvedených v experimentální části a následně charakterizovány uvedenými charakterizačními metodami, které poskytly informace o jejich fyzikálně-chemických a biologických vlastnostech (uvedeno tamtéž).



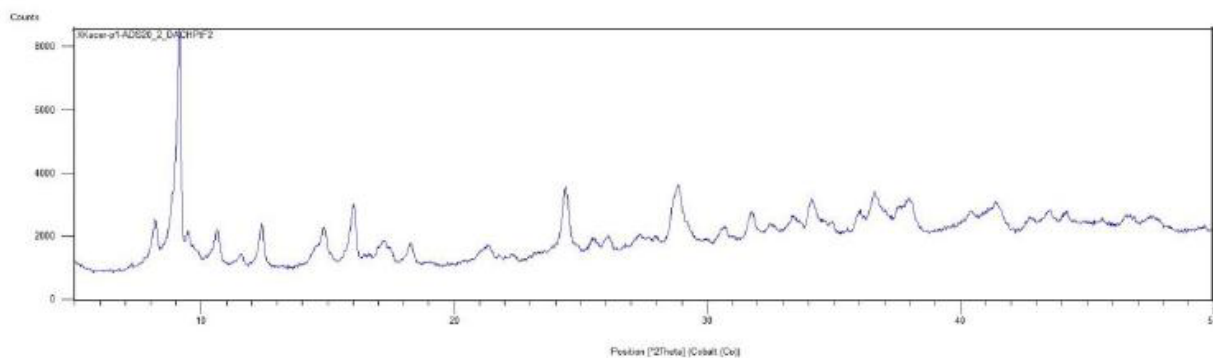
Obr. 2. Chromatogram vzorku (a) DACHPtCl₂, (b) reakční směsi, (c) DACHPtF₂



Obr. 3. MS analýza vzorku (a) DACHPtCl₂, (b) DACHPtF₂



Obr. 4. (a) částice původního vzorku, (b) distribuce velikosti částic, (c) částice získané po de-aglomeraci vzorku

Obr. 5. XRD práškový difraktogram vzorku DACHPtF₂

Jako látka s největším potenciálem pro další výzkum byl na základě získaných výsledků zvolen DACHPtF₂, na němž budou v dalším textu interpretovány jednotlivé výsledky detailně, přičemž na ostatních připravených platino- vých komplexech bude uvedena jen jejich sumarizace a vzájemné porovnání.

V případě přípravy DACHPtF₂ bylo využito skutečnosti, že rozpustnost AgF ve vodě je velice dobrá, a proto není zapotřebí dvoukrokové syntézy. Takto připravený produkt se vyznačuje vyšší rozpustností ve srovnání

s DACHPtCl₂ a DACHPtBr₂. Produkt byl získán ve vysokém výsledku a čistotě (tab. II).

HPLC analýza vzorku naředěného na koncentraci 1 mg ml⁻¹ prokázala, že látka neobsahuje výchozí sloučeninu DACHPtCl₂, ani hydroxo- a aqua-komplexy jako majoritní kontaminanty (obr. 2).

Dále byla provedena LC-MS, přičemž hmotnostní spektra sloužila ke strukturální charakterizaci všech látek přítomných v reakční směsi. Získaná spektra byla charakteristická svým typickým izotopickým klastrem (obr. 3).

Tabulka I
Výsledky XRF analýzy

	DACHPtCl ₂	DACHPtF ₂	DACHPtBr ₂	PicoPt	PicoPtF ₂	PicoPtBr ₂	PicoPtI ₂
Pt	73,4	83,7	54,9	73,4	83,7	54,9	43,5
F	–	16,3	–	–	16,3	–	–
Cl	26,6	–	–	26,6	–	–	–
Br	–	–	45,1	–	–	45,1	–
I	–	–	–	–	–	–	56,5

Tabulka II
Základní charakteristiky připravených platinových komplexů

	DACHPtF ₂	DACHPtDM	DACHPtDTs	PicoPtF ₂	PicoPtBr ₂	PicoPtI ₂
CAS RN	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Rozpustnost v H ₂ O (mg ml ⁻¹)	6,0	57,0	4,2	29,1	0,8	0,09
Výtěžek (%)	67	98	72	74	70	70
Čistota (LC-MS) (%)	98	99	96	> 99	> 99	> 99

Tabulka III
Výsledky XTT testů

	OxaliPt	DACHPtF ₂	DACHPtDM	DACHPtDTs	PicoPt	PicoPtF ₂	PicoPtBr ₂	PicoPtI ₂
Caco-2 IC ₅₀	2,1	3,1	2,04	2,3	15,7	40,5	75,1	30,3
MCF-7 (μM)	66,1	40,7	30,6	35,2	71,4	94,0	99,8	72,6

Tabulka IV
Výsledky testů akutní toxicity

	OxaliPt	DACHPtDM	DACHPtDTs	PicoPt	PicoPtF ₂
LD ₅₀ (mg kg ⁻¹)	≤ 19,5	3	6	11	6

Metoda SEM byla použita pro charakterizaci připravené krystalické fáze a to z hlediska velikosti částic a její distribuce. Na obr. 4a je zachycena typická částice přítomná v původním vzorku, který byl charakterizován přítomností aglomerátů s velikostí zrna 0,2 až 0,4 mm. Po deaglomeraci realizované ultrazvukem byly získány částice s téměř uniformní velikostí částic, viz obr. 4b a 4c, z nichž je zřejmé, že je více než 90 % částic charakterizovatelných velikostí z intervalu 170–190 nm. Ve vzorku nebyly téměř přítomny částice o velikosti větší než 200 nm a menší než 100 nm.

Rovněž byla provedena analýza rentgenovou práškovou difrakcí (XRD), ze které bylo zjištěno, že se jedná o krystalickou látku, jejíž difraktogram není přítomen v databázích (obr. 5).

Analoga Oxaliplatin i Picoplatin byla analyzována metodou XRF. Výsledky uvedené v tab. I poukazují na vysokou čistotu připravených látek, bez přítomných anorganických solí vznikajících jako vedlejší produkty.

Následující tab. II shrnuje základní údaje pro všechny jednotlivé syntetizované platinové komplexy. Jednou z důležitých informací je absence CAS RN čísla a rozpustnost ve vodě, která byla jedním z důležitých ukazatelů pro testy aktivity a toxicity.

Dále byly tyto látky testovány na cytotoxicitu na buněčných liniích Caco-2 a MCF-7. V tab. III jsou uvedeny hodnoty IC₅₀ pro všechny syntetizované látky v porovnání s Oxaliplatin a Picoplatin.

Z testů akutní toxicity uvedených v tab. IV lze usoudit, že výsledky testovaných látek jsou srovnatelné s výsledky referenčních látek, Oxaliplatin a Picoplatin.

Závěr

V laboratorním měřítku byla připravena a analyticky charakterizovány analoga Oxaliplatin (DACHPtF₂, DACHPtDM a DACHPtDTs) a analoga Picoplatin (PicoPtF₂, PicoPtBr₂ a PicoPtI₂). Pro celkové hodnocení potenciálu jednotlivých připravených platinových komplexů aspirovat na další farmaceutický výzkum je nutné posoudit veškerá získaná data, a to především výtěžky a čistoty připravených látek a dále pak jejich rozpustnost ve vodě, která je omezující vlastností u stávajících platinových cytostatik. Klíčovou úlohu samozřejmě hrají biologické testy cytotoxicity a akutní toxicity. Bylo zjištěno, že všechny připravené komplexy vykazují vlastnosti, které je *a priori* nevyřazují z dalšího výzkumu, nicméně tři z připravených komplexů vykazují vlastnosti výrazně perspektivní pro další výzkum jejich farmakologických vlastností, a to DACHPtF₂, DACHPtDM a PicoPtF₂.

Tato práce byla finančně podporována grantem MPO ČR č. 2A-2TP1/049.

LITERATURA

1. www.sukl.cz, Návrh hodnotící zprávy NHZ, staženo 5. 12. 2011.
2. Kelland L.: *Nat. Rev.* 7, 575 (2007).
3. Fogh J., Trempe G.: *Human Tumor Cells In Vitro* (J. Fogh, ed.), str. 115–141. Plenum Press, New York 1975.

VAZEBNÁ STUDIE NAFTALENOVÝCH BIS-TRÖGEROVÝCH BAZÍ JAKO POTENCIONÁLNÍCH RECEPTORŮ ELEKTRONOVĚ DEFICITNÍCH LÁTEK POMOCÍ SPEKTROSKOPIE NMR

MILAN JAKUBEK, BOHUMIL DOLENSKÝ
a MARTIN HAVLÍK

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, Ústav analytické chemie, Laboratoř molekulárního rozpoznávání, Technická 5, 166 28 Praha 6
jakubek.milan@seznam.cz

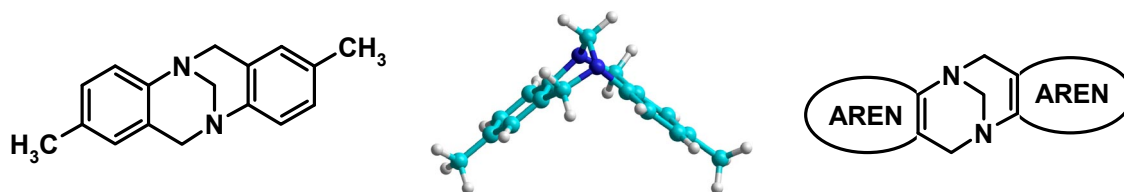
Úvod

Strukturní motiv Trögerovy báze (TB, 2,8-dimethyl-6H,12H-5,11-methanodibenzo[b,f]-[1,5]diazocin, obr. 1) je znám široké vědecké veřejnosti jako učebnicový příklad „chirálního dusíku“. Poprvé byla TB popsána jako báze neznámé struktury již v roce 1887 Trögerem¹. Struktura TB byla na základě reaktivity správně odvozena až v roce 1935 Spielmanem². Spojení atomů dusíku diazocinové jednotky methylenovou skupinou zamezuje inverzi konfigurace na atomech dusíku. Deriváty TB jsou tedy inherentně chirálními látkami. Poprvé byly enantiomery TB izolovány v roce 1944 Prelogem³. Dalším důsledkem spojení atomů dusíku methylenovou skupinou je pozice aromatických částí, jejichž roviny jsou na sebe kolmé (80–114°). Těchto vlastností se často využívá při konstrukci molekulárních receptorů^{4,5}.

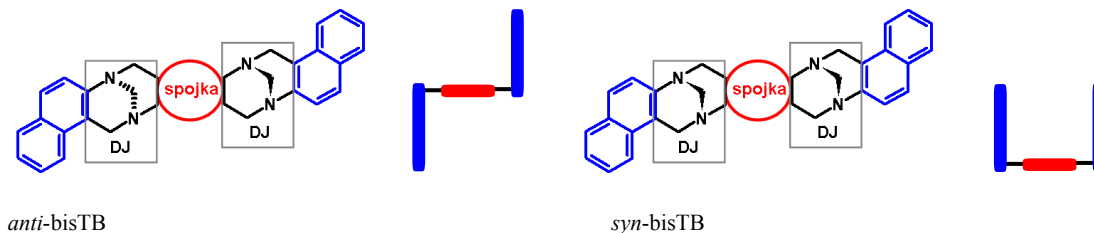
Začátkem 21. století byly představeny nové typy TB derivátů, tzv. oligo-Trögerovy báze (oligoTB)^{6,7}. Největší pozornost byla zatím věnována bis-Trögerovým bázím (bisTB), tj. látkám obsahujícím dva strukturální motivy TB. Látky lze obrazně popsat jako dva TB deriváty, které mají jeden aren společný (spojka). Díky vlastnostem methanodiazocinové jednotky (DJ) mají bisTB dva diastereoizomery lišící se orientací krajních arenů. Anti diastereoizomer (*anti*-bisTB) má krajní areny (např. naftaleny) kolmo k rovině arenu tvořící spojku, z opačných stran. Zatímco *syn* diastereoizomer (*syn*-bisTB) má krajní areny kolmé ze stejné strany (obr. 2).

Volbou struktury arenu tvořícího spojku a volbou způsobu napojení krajních arenů prostřednictvím DJ lze zvolit vzájemnou orientaci krajních arenů. Doposud byl jako spojka použit pouze benzen, který umožňuje pět variant (bisTB 1-5) napojení krajních arenů (obr. 3).

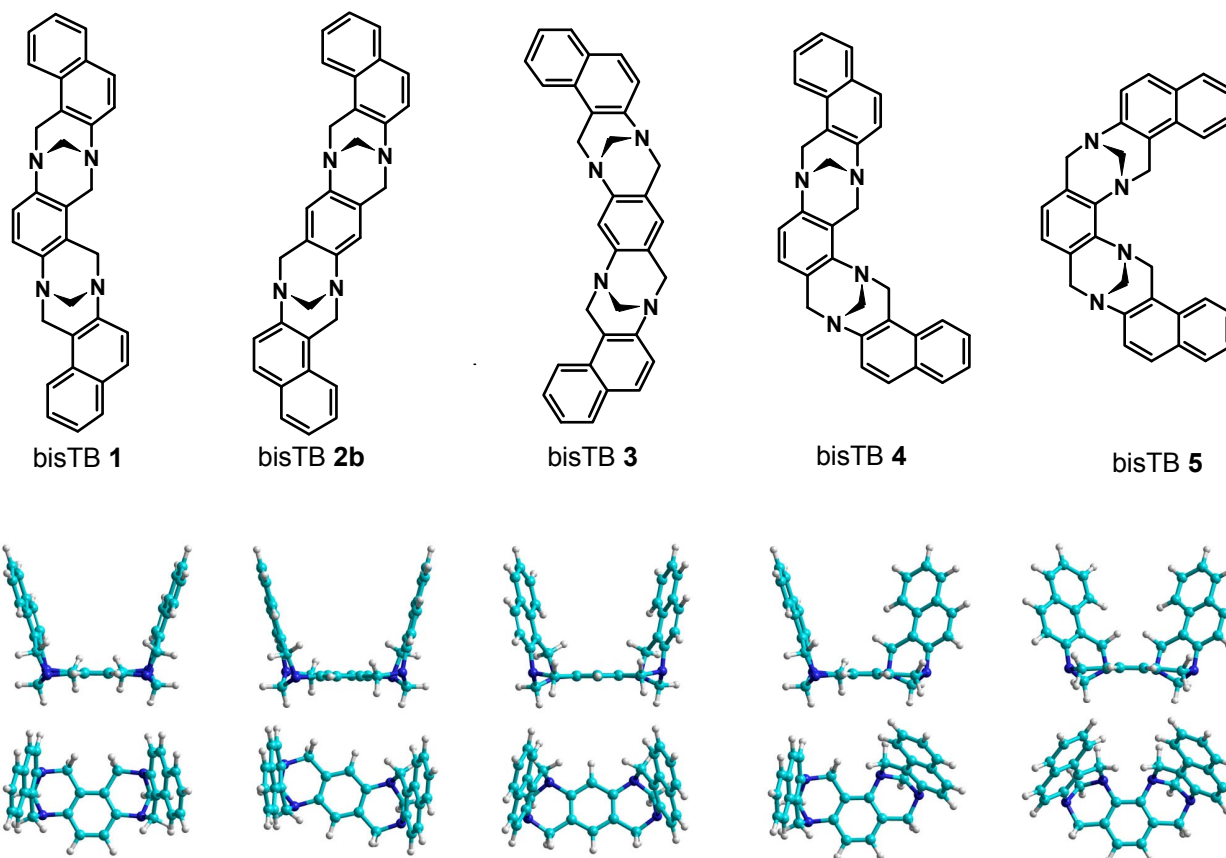
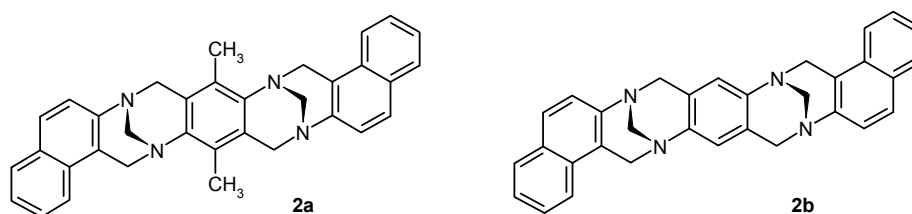
Jak je patrné z molekulárních modelů (geometrie optimalizována využitím semiempirické metody RM1, obr. 3), regioisomery bisTB 1, 2b a 3 mají naftalenové jednotky uspořádány téměř rovnoběžně, přičemž vzdálenost jejich rovin je ca. 0,75 nm. Právě toto prostorové uspořádání vzbudilo zájem o tyto látky, neboť velmi dobře splňuje požadavky na molekulární pinzetu^{8,9}, tedy látku, která je schopna prostřednictvím aren-aren interakcí tvořit komplex s elektron-deficitními látkami. Současnou snahou vědců je využít molekulární pinzety ke konstrukci chemicko-



Obr. 1. Trögerova báze a obecné schéma struktury TB derivátů



Obr. 2. Obecná struktura naftalenové bisTB a jejích diastereoizomerů

Obr. 3. *Syn* diastereoizomery regioisomerů naftalenových derivátů bisTBObr. 4. Struktury studovaných derivátů naftalenových *syn*-bisTB

kých receptorů, senzorů či léčivých přípravků.^{10–13}

Tato práce představuje přípravu vůbec prvních derivátů typu bisTB 2, tj. naftalenové deriváty **2a** a **2b** (obr. 4), a první kvantitativní údaje o vazebných vlastnostech bisTB derivátů obecně (na příkladu naftalenových derivátů bisTB **1**, **2a**, **2b**, **3**). Část výsledků již byla prezentována na mezinárodní konferenci¹⁴.

Experimentální část

Všechny chemikálie a rozpouštědla potřebné pro syntézu, separace a analýzy byly zakoupeny u firmy Merck nebo Sigma-Aldrich v čistotách p.a. či HPLC grade. Pro HPLC experimenty bylo využito systému LC 5000 HPLC (INGOS, Česká republika) s UV detektorem (Perkin Elmer 785A, 254 nm). Jako analytická kolona byla použita Repronil Si, 5 μm (250 × 4 mm, Dr. Maisch GmbH, Němec-

ko). Pro chirální separace byla použita kolona Reprosil Chiral – NR, 8 μm (250 \times 4,6 mm, Dr. Maisch GmbH, Německo). Pro preparativní účely byla použita kolona Reprosil 100 Si, 5 μm (250 \times 21,2 mm). Pro TLC analýzy byly použity 10 cm TLC aluminiové destičky s naneseným silikagelem 60 F₂₅₄ (Merck). Dále byla využita sloupcová chromatografie a preparativní TLC pro separaci a čištění připravených sloučenin. Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel MP Silitech 32 až 63 D, 60 Å (Merck). Mobilní fáze byly voleny na základě TLC analýz. Pro charakterizaci látek a vazebné studie byl použit Spektrometr NMR Varian Mercury Plus 300 MHz. Jako rozpouštědlo byl použit CDCl₃, který byl čerstvě předestilován a uchovávan s molekulárními síty (3A, 3,5 mm) a Al₂O₃. Všechna NMR spektra byla měřena při teplotě 25,0 \pm 0,1 °C a referencována na signál interního standardu (tetramethylsilan (TMS), $\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$ ppm). Pro charakterizaci látek bylo využito 1D (¹H a ¹³C APT) a 2D (gCOSY, gHSQC, gHMBC a NOESY1D) experimentů. Získaná NMR spektra byla zpracována programem Me-stReNova version 5.3.0.

Pro vazebné studie bisTB derivátů byl přesně odvážen vždy asi 1 mg analytu (*o*-, *m*-, *p*-dikyanobenzen (*o*-, *m*-, *p*-DCNB), *o*-, *m*-, *p*-dinitrobenzen (*o*-, *m*-, *p*-DNB), 1,2,4,5-tetrakyno-benzen (TCNB) a 1,2,3-trinitrobenzen (TNB)) přečištěného krystalizací z methanolu a rozpuštěn v asi 3,6 ml CDCl₃. Následně bylo přesně naváženo asi 20 mg receptoru a rozpuštěno v části již připraveného roztoku analytu. Všechny roztoky byly připraveny ve vialkách pod septem a koncentrace byly vypočteny pomocí vážení. Ke všem vážením byly použity pětimístné analytické váhy Mettler Toledo MS105DU. Přidávky roztoku receptoru do NMR kvety byly prováděny injekčními stříkačkami Hamilton. Následně byla změřena ¹H NMR spektra, nejprve samotného analytu a potom po každém přidávku roztoku receptoru. Vyhodnocení vazebných studií bylo provedeno nelineární regresí, přičemž ve všech případech vyhovoval model komplexu o stechiometrii 1:1.

Příprava bisTB 2a: 2,5-Dimethylbenzen-1,4-diamin (1,59 g; 11,6 mmol) a naftalen-2-amin (6,01 g; 42,0 mmol) byl rozpuštěn v trifluoroctové kyselině (TFA, 200 ml) a při pokojové teplotě byl přidán hexamethyltetramin (3,91 g; 27,9 mmol). Po 48 hodinách byla reakční směs neutralizována vodným 25 obj.% NH₃. Extrakcí do CH₂Cl₂ a separací organické fáze pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; CH₂Cl₂ : CH₃OH, 99:5) byl získán *syn*-**2a** 128 mg (2,2 %). *Anti*-**2a** byl připraven isomerizací *syn*-**2a** (20 mg; 0,04 mmol) v trifluoroctové kyselině (15 ml) při teplotě 130 °C po dobu 64 h v tlakové ampuli. Následnou neutralizací vodným roztokem 25 obj.% NH₃, extrakcí do CH₂Cl₂ a separací organické fáze pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; CH₂Cl₂:MeOH; 99:5) byl získán *syn*-**2a** 12 mg (60 %) a 8 mg (40 %) *anti*-**2a**.

Příprava bisTB 2b: 2,5-Dimethylbenzen-1,4-diaminu (1,59 g; 11,6 mmol) a di-*t*-butyl bikarbonát (12,5 g; 61,7 mmol) byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu (350 ml) a míchány 14 h při 70 °C. Následným odfiltrváním suspenze byl získán filtrát 2,5-dimethyl-*N*¹,*N*⁴-bis(*t*-butoxykarbonyl)

benzen-1,4-diaminu 8,1 g (98 %). Tento získaný diamin (3,01 g; 9,0 mmol) byl rozpuštěn v CCl₄ (250 ml) a do roztoku byl přidán NBS (3,31 g; 18,6 mmol) a AIBN (0,31 g). Roztok byl poté zahříván IČ lampou pod zpětným chladičem 14 hodin. Po následné neutralizaci vodným roztokem 25 obj.% NH₃, extrakcí do CH₂Cl₂ a vytřepáním organické fáze do diethyl etheru byla získána suspenze. Po filtraci suspenze byl získán filtrát 2,5-bis(bromomethyl)-*N*¹,*N*⁴-bis(*t*-butoxykarbonyl)benzen-1,4-diaminu 3,53 g (80 %). Získaný bromderivát (1,01 g; 2,1 mmol) byl rozpuštěn v DMF (100 ml) a do roztoku byl přidán naftyl-2-amin (2,88 g; 20,1 mmol) a K₂CO₃ (0,30 g). Směs poté byla míchána 5 hodin při 70 °C, následnou extrakcí do CH₂Cl₂ a separací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; toluen:ethylacetát:triethylamin; 83:16:1) byl získán *N*²,*N*⁵-Bis(*t*-butoxykarbonyl)-2,5-bis((naftalen-2-ylamino)methyl)-benzen-1,4-diamin 0,46 g (36 %). Tento získaný tetraamin (0,35 g; 0,57 mmol) byl rozpuštěn v trifluoroctové kyselině (30 ml) a do roztoku byl přidán paraformaldehyd (0,19 g; 6,41 mmol). Roztok byl poté míchán při laboratorní teplotě 14 hodin. Následnou neutralizací vodným roztokem 25 obj. % NH₃, extrakcí do CH₂Cl₂ a separací pomocí sloupcovou chromatografií (silikagel; dichlormethan:*i*-propanol; 96:4) byl získán *syn*-**2b** 181 mg (68 %). *Anti*-**2b** se pomocí isomerizace *syn*-**2b** (20 mg; 0,04 mmol) v trifluoroctové kyselině (15 ml) v tlakových ampulích při 25 °C, 60 °C a 130 °C se připravit nepodařilo.

Výsledky a diskuse

Naftalenové bisTB deriváty **1** a **3** byly připraveny dle popsáných postupů^{15–17}. Naftalenový bisTB derivát **2a** byl připraven modifikací „one-pot“ strategie¹⁸, tj. reakcí směsi naftaten-2-aminu a 2,5-dimethyl-1,4-benzendiaminu s hexamethyltetraminem v TFA. Nízký preparativní výtěžek (ca. 2 %) je kompenzován snadností přípravy. K přípravě naftalenového derivátu **2b** bylo nutno použít modifikaci „step-by-step“ strategie^{16,17}, neboť „one-pot“ strategie poskytuje regioisomer **1** a nikoli **2b**. Při přípravě bisTB **2a** i **2b** vznikaly pouze *syn* diastereoismery, které isomerizací v TFA poskytl *anti* diastereoismery. Relativní konfigurace diastereoismery byla stanovena dle publikovaných postupů¹³, tj. porovnáním parametrů ¹H NMR spekter a jejich kvantově chemickým výpočtem, a separací enantiomerů na chirální HPLC koloně (*anti*-**2a** a *anti*-**2b** jsou mezofomy, *syn*-**2a** a *syn*-**2b** jsou racemáty).

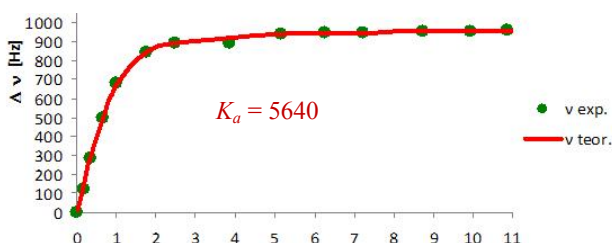
Vazebné studie byly monitorovány ¹H NMR spektry. Nejprve byly provedeny zředovací experimenty (30·10⁻³ – 1·10⁻⁵ mol l⁻¹), které neprokázaly dimerizaci studovaných bisTB derivátů. Následně byly provedeny titrační experimenty za konstantní koncentrace analytu. Změna chemického posunu analytu v závislosti na poměru koncentrací (*c*_{receptor} : *c*_{analyt}) byla vyhodnocena nelineární regresí (obr. 5). Získané asociační konstanty *K*_a jsou uvedeny v tab. I.

Tabulka I

Hodnoty K_a (mol l^{-1}) v CDCl_3 při 25 °C ^a

	<i>syn-1</i>	<i>syn-2a</i>	<i>syn-2b</i>	<i>syn-3</i>
<i>o</i> -DCNB	–	b	b	–
<i>m</i> -DCNB	b	5 ± 2	17 ± 2	–
<i>p</i> -DCNB	b	b	10 ± 3	b
TCNB	18 ± 1	665 ± 26	5640 ± 481	103 ± 2
<i>o</i> -DNB	–	–	11 ± 2	–
<i>m</i> -DNB	–	–	5 ± 2	–
<i>p</i> -DNB	–	–	7 ± 1	–
TNB	b	11 ± 1	47 ± 1	5 ± 1

^a Vypočtená hodnota ± směrodatná odchylka regrese ($\alpha = 0,05$; $k = 1$). ^b Hodnota je menší než 5, tj. nestanovitelná použitou metodikou



Obr. 5. Titrací experiment *syn-2b* s TCNB (exp. body a teor. průběh)

Závěr

Doposud neznámé naftalenové bisTB deriváty **2a** a **2b** byly připraveny a charakterizovány a jednoznačně stanovena relativní konfigurace jejich diastereoisomerů. Studium komplexačního chování bylo zjištěno, že *syn* diastereoisomery těchto látek (tj. *syn-2a* a *syn-2b*) mají řádově vyšší afinitu k elektron-deficitním látkám (zejména TCNB) než doposud známé isomerní deriváty *syn-1* a *syn-3* celkem čtyř naftalenových derivátů. Vysoké hodnoty asociačních konstant bisTB *syn-2a* a *syn-2b* potvrzují, že tento typ bisTB derivátů má vlastnosti molekulárních pinzet a lze ho využít ke konstrukci receptorů elektron-deficitních látek.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (203/08/1445).

LITERATURA

- Tröger J.: J. Prakt. Chem. 36, 225 (1887).
- Spielman M. A.: J. Am. Chem. Soc. 57, 583 (1935).
- Prelog V., Wieland P.: Helv. Chim. Acta 27, 1127 (1944).
- Dolenský B., Elguero J., Král V., Pardo C., Valík M.: Adv. Het. Cycl. Chem. 93, 1 (2007).
- Sergeyev S.: Helv. Chim. Acta 92, 415 (2009).
- Pardo C., Sesmilo E., Gutierrez-Puebla E., Monge A., Elguero J., Fruchier. A.: J. Org. Chem. 66, 1607 (2001).
- Valík M., Dolenský B., Petříčková H., Král V.: Collect. Czech Chem. Commun. 67, 609 (2002).
- Chen C. W., Whitlock H. W.: J. Am. Chem. Soc. 100, 4921 (1978).
- Zimmerman S. C.: Top. Curr. Chem. 165, 71 (1993).
- Smith R. G., D'Souza N., Nicklin S.: Analyst 133, 571 (2008).
- Zimmerman S. C., Saionz K. W.: J. Am. Chem. Soc. 117, 1175 (1995).
- Krebs F. C.: Tetrahedron Lett. 44, 6643 (2003).
- Kagan J., Chen S. Y., Agdeooa D. A.: Tetrahedron Lett. 18, 4469 (1977).
- Jakubek M., Dolenský B., Kessler J., Parchaňský V., Havlík M., Král V.: 6th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Brighton (UK), 3-7. 7. 2011, poster P105.
- Dolenský B., Valík M., Sýkora D., Král V.: Org. Lett. 7, 67 (2005)
- Havlík M., Král V., Kaplánek R., Dolenský B.: Org. Lett. 10, 4767 (2008).
- Havlík M., Král V., Dolenský B.: Collect. Czech. Chem. Commun. 72, 392 (2007).
- Havlík M., Král V., Dolenský B.: Org. Lett. 8, 4867 (2006).
- Dolenský B., Parchaňský V., Matějka P., Havlík M., Bouř P., Král V.: J. Mol. Struct. 996, 69 (2011).

CITP ANALÝZA BIOMINERÁLŮ

ZDEŇKA JAROLÍMOVÁ a PŘEMYSL LUBAL

Ústav chemie, Přírodovědecká Fakulta, Masarykova univerzita Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno
jarolimova.z@gmail.com

Úvod

Jedním z hlavních předmětů výzkumu v oblasti biomedicínských věd je stanovení obsahu jednotlivých prvků v lidských tkáních. Cílem je vysvětlit účinky nedostatku či nadbytku určitých prvků v orgánech, které mají za následek řadu zdravotních problémů. Velmi častým onemocněním je tvorba močových kamenů neboli urolitiáza^{1,2}. Toto onemocnění se vyskytuje u pacientů nezávisle na pohlaví, věku a bydlišti a je doprovázeno řadou dalších příznaků (pocení, nechutenství, obtíže při močení). Největší výskyt litiázy je zaznamenán v USA, Velké Británii, Skandinávii a na Středním Východě, nízká incidence je naopak ve Střední a Jižní Americe a v Africe³. Močové kameny se zařazují do několika skupin podle chemického složení, jejich polohy v močovém ústrojí či chování po rentgenovém ozáření. Z chemického hlediska se jedná o anorganické a organické sloučeniny nebo jejich směsi^{1,4}. Hlavními složkami močových kamenů jsou uráty, oxaláty a fosfáty^{1,5}. Dříve se pro stanovení složení používaly roztokové analýzy využívající klasických chemických analytických metod^{6,7}, dnes se složení kamenů stanovuje spektrometrickými metodami, které dávají informaci nejen o majoritním, minoritním a stopovém prvkovém složení, ale také o prostorovém uspořádání prvků v kamenech^{5,6}. K určení struktury močových kamenů se používají RTG difrakční analýza, infračervená a Ramanova spektrometrie nebo polarizační mikroskopie⁷, atomová absorpční a emisní spektrometrie⁸, zejména metody s indukčně vázaným plazmatem s hmotnostní a optickou emisní detekcí². Nevýhoda těchto metod je velká spotřeba vzorku, složitá příprava a zajištění reprezentativního vzorku.

Tato práce je zaměřena na využití kapilární izotachografie (CITP) pro analýzu látek majoritně zastoupených v močových kamenech⁹. Cílem bylo najít vhodné analytické metody pro stanovení vybraných analytů (fosforečnan a jeho species, šťavelan, močová kyselina, Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ a Na^+ ionty). Metody byly využity pro studium složení a rozpustnosti výše uvedených látek změnou experimentálních podmínek, což je velmi důležité pro zjištění příčin vzniku kamenů a popis mechanismu jejich růstu a následně pak pro diagnózu¹.

Experimentální část

Instrumentace

Experimenty byly provedeny na jednokolonovém elektroforetickém analyzátoru EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovenská republika). Přístroj je napojen na řídicí počítač a je ovládán programem ITPPro 32 (KasComp, Ltd, Bratislava, Slovenská republika). Analyzátor je vybaven analytickou PTFE (teflon) kolonou (průměr 0,3 mm, délka 200 mm) a vodivostním detektorem. Separace byla provedena při konstantním hnacím proudem 100 μA pro kationtový mód, 80 μA pro analýzu šťavelanu a fosfátu, 70 μA pro analýzu močové kyseliny, při změně signálu vodivostního detektoru o 10 mV byl proud snížen na 50 μA .

Chemikálie

Byly použity následující chemikálie: kyselina chlorovodíková (J. T. Baker), tetraboritan sodný (TB), hydrogenuhličitan sodný, fluorid sodný, hydrogenfosforečnan sodný (Lachema), kyselina sírová (Merck) (SA), L-histidin, hexanová kyselina (HEX), hydroxylapatit (HA), močová kyselina (MK), chlorid amonný, 1,3-bis[tris(hydroxymetyl)metylamino]propan (Sigma-Aldrich) (BTP), šťavelan vápenatý monohydrát (CaOx), chlorid vápenatý a hořečnatý, hydroxyetylcelulosa (HEC), hydroxid draselný (Merck), hydroxid tetrabutylamonný (Lachema) (TBA), imidazol (Fluka), Milli Q voda zbavená CO_2 , vzorky ze sbírky prof. P. Martince (Ústav geoniky AV ČR, Ostrava).

Příprava vzorků močových kamenů k analýze

Všechny poskytnuté vzorky močových kamenů byly chirurgicky vyjmuty z těla pacienta. Po vyjmutí byl kámen opláchnut vodou, osušen a zaevidován. Pak byl kámen



Obr. 1. Ukázka močových kamenů (převzato z cit.¹⁰)

zalit epoxidovou pryskyřicí nebo převeden na práškovou formu, která byla použita pro ITP analýzu. Navážky vzorků (≈ 15 mg) byly kvantitativně převedeny do varné baňky s varným kamínkem. K navážce byl přidán buď 1 ml 1M HCl (stanovení $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, PO_4^{3-} a jeho species, Mg^{2+} , Ca^{2+} a NH_4^+) anebo 1 ml 1M NaOH (analýza močové kyseliny, xantinu), poté bylo přidáno 15–20 ml destilované vody. Takto připravené roztoky byly povařeny pod zpětným chladičem, dokud nedošlo k rozpuštění. Potom byly roztoky ochlazeny a kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 25 ml. K analýze byly roztoky ředěny podle potřeby, pro kationtovou analýzu byly kyselé roztoky vzorků neutralizovány přidávkem BTP na pH 6–8.

Výsledky a diskuse

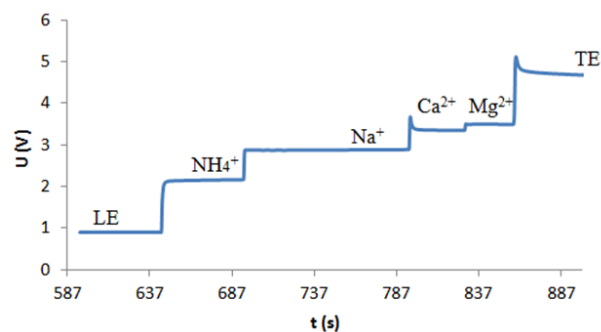
Analýza močových kamenů

Před ICTP analýzou močových kamenů bylo důležité optimalizovat postup přípravy vzorku. Pro úplné rozpuštění jak modelových sloučenin (CaOx , HA, MK) a jejich směsí, tak reálných vzorků byly testovány následující chemikálie: HCl, HClO_4 , H_2SO_4 , citronová kyselina, NaOH, KOH, TBA. K úplnému rozpuštění docházelo až za vyšší teploty (za varu pod refluxem). K převedení vzorků do roztoku byly použity roztoky 1M HCl a 1M NaOH, aby nedocházelo k prodloužení doby analýzy v důsledku přítomnosti dalších analytů (výskyt nových zón). HCl a NaOH byly vybrány proto, že chloridové a hydroxidové ionty migrují ve vedoucím elektrolytu v případě analýzy aniontů a organických sloučenin.

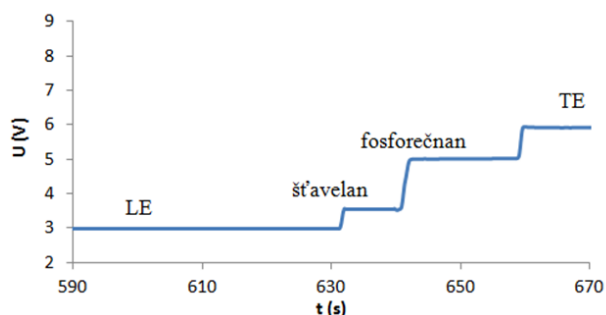
Jelikož charakter močových kamenů je složitý a není možné provést stanovení všech analytů ve vzorku v jednom kroku, bylo nutné analýzu rozdělit do více kroků:

- kationtová analýza (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+),
- aniontová analýza ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, HPO_4^{2-}),
- analýza organických sloučenin (močová kyselina).

Bylo optimalizováno složení vedoucího a koncového elektrolytu (pH, druh a koncentrace látek) pro analýzu močových kamenů (tab. I). Aby došlo k úplnému rozdělení všech analytů přítomných ve vzorku, bylo důležité optimalizovat pH elektrolytů, složení a kombinace vedoucího a koncového elektrolytu (tab. I a II). ITP záznamy jednotlivých analýz jsou uvedeny na obr. 2–4. Hodnoty RSH faktorů v tab. II ukazují dostatečnou účinnost separačního procesu. Dále byly odhadnuty metrologické parametry



Obr. 2. ITP záznam kationtové analýzy modelové směsi; systém LE_1/TE_1



Obr. 3. ITP záznam aniontové analýzy modelové směsi; systém LE_2/TE_2

Tabulka I

Experimentální podmínky použité pro ITP analýzu močových kamenů

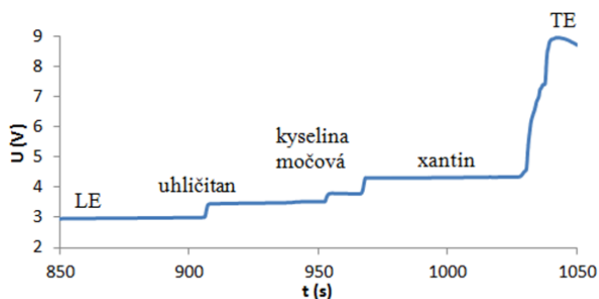
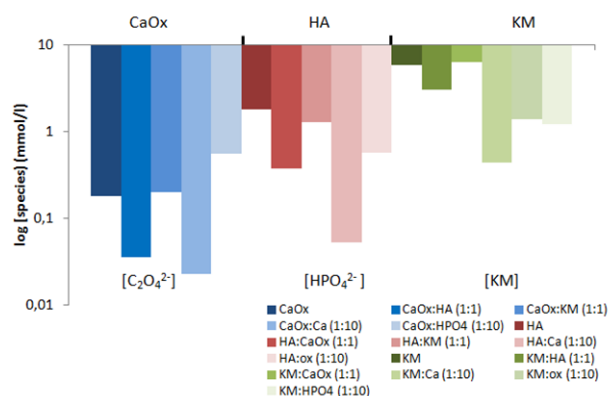
Parametry	Kationty ^a		Anionty ^a			
	LE_1	TE_1	LE_2	TE_2	LE_3	TE_3
iont	SA	BTP	Cl^-	HEX	Cl^-	TB
c (mM)	7,5	10	10	10	10	5
proti-iont	–	–	L-histidin	–	imidazol	–
pH	2,05		5,50		7,20	
aditivum			0,1 % HEC			

^a – proti-iont není přítomen

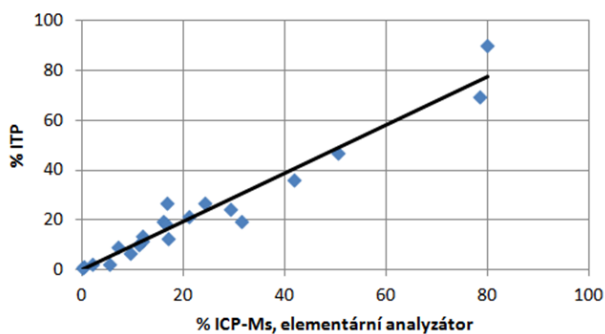
Tabulka II

Metrologické parametry analýzy. Směrodatné odchylky parametrů jsou uvedeny pro zjednodušení v závorkách

Analyt	RSH ^a	MD ^b [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	citlivost [$\text{s} \times \text{l} \times \text{mmol}^{-1}$]
Ox^{2-}	0,125(2)	12,9	51,3(2)
PO_4^{3-}	0,691(4)	24,5	149,7(9)
MK	0,271(5)	18,5	124,1(8)
Ca^{2+}	0,594(3)	16,2	164(4)
Mg^{2+}	0,625(3)	12,4	246(3)
Na^+	0,481(3)	14,7	390(1)
NH_4^+	0,304(3)	14,2	305(8)

^aRSH = relativní výška vlny v ITP záznamu, ^bMD = mez detekceObr. 4. ITP záznam modelové směsi organických sloučenin (uhličitanu, močová kyselina a xantin); systém LE₃/TE₃

Obr. 6. Vliv vybraných analytů na rozpustnost CaOx, HA, MK (pH 7)



Obr. 5. Srovnání výsledků získaných z ITP a ICP – MS/elementárního analyzátoru

(citlivost, mez detekce) navržené analytické metody (tab. II). Obecně lze říci, že citlivost a mez detekce (kolem $10 \mu\text{M}$) stanovení všech analytů je řádově stejná. Analytická metoda byla použita pro analýzu reálných vzorků proměnného složení hlavních komponent (šťavelan, fosforečnan, močová kyselina) s využitím metody přidavku stan-

dardu. Metoda byla validována srovnáním nalezených hodnot s výsledky obdrženy pomocí ICP-MS a elementárního analyzátoru (obr. 5). Postup pro stanovení aniontu lze také použít pro analýzu zubů, kostí nebo moči. V ITP záznamu se objevuje citran v případě moči (RSH = 0,388) nebo fluorid obsažený ve fluoroapatitu (RSH = 0,261).

Optimalizovaný analytický postup byl použit pro studium rozpustnosti látek majoritně zastoupených v močových kamenech (CaOx, HA, MK; obr. 6). Rozpustnost byla sledována jak pro jednotlivé látky, tak pro jejich modelové směsi v ekvimolárním poměru. Bylo zjištěno, že srážecí proces dospěje do rovnováhy po několika dnech a závisí na pH. Nejmenší rozpustnost vykazuje CaOx, MK naopak největší. Stejný trend byl pozorován i pro jejich modelové směsi, kdy jejich rozpustnost mírně poklesla ve srovnání s čistými sloučeninami. K ještě výraznějšímu poklesu rozpustnosti došlo s přidáním Ca^{2+} iontů, která má spojitost s pathobiochemickými příznaky choroby hyperkalciurie.

Závěr

Tato práce se zabývá vývojem a validací analytické metody pro analýzu močových kamenů. Byly nalezeny a optimalizovány vhodné experimentální podmínky jak pro úpravu vzorku, tak pro vlastní analýzu močových kamenů pomocí ITP. Metoda pak byla použita pro studium rozpustnosti látek a jejich modelových směsí vedoucí k tvorbě močových kamenů. Navržený postup lze použít jak pro kvalitativní analýzu (klasifikace kamenů), tak pro kvantitativní analýzu Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , F^- , močové kyseliny, xantinu a citronové kyseliny v biominerálech (ledvinové a močové kameny, zuby, kosti) a biotekutinách (moč). Postup je vhodný nejen pro analýzu směsí anorganických iontů, ale i organických sloučenin podobné chemické povahy. Metoda je rychlá (celková doba ITP analýzy je kolem jedné hodiny) a finančně nenáročná ve srovnání s jinými analytickými metodami (ICP-MS, iontová chromatografie, CE).

Tato práce byla podporována výzkumnými projekty MŠMT ČR (ME09065 a LC06035) a GA ČR (203/09/1394).

LITERATURA

1. Königsberger E., Königsberger L.-C.: *Biomineralization – Medical aspects of solubility*. Wiley, New York 2006.
2. Fang X., Ahmad S. R., Mayo M., Iqbal S.: *Lasers Med. Sci.* 20, 132 (2005).
3. Baitler T.: *Urolitiáza – přednáška*, www.urologieprostudenty.cz, staženo 15. března 2011.
4. Abboud I. A.: *Environ. Geochem. Health* 30, 445 (2008).
5. Singh V., Rai A. K., Rai P. K., Jindal P. K.: *Lasers Med. Sci.* 24, 749 (2009).
6. Proksová K., Novotný K., Galiová M., Vaculovič T., Kuta J., Nováčková M., Kanický V.: *Chem. Listy* 106, 229 (2012).
7. Schubert G.: *Urol. Res.* 34, 146 (2006).
8. Perk H., Serel T. A., Kosar A., Deniz N., Sayin A.: *Urol. Int.* 68, 286 (2002).
9. Boček P., Deml M., Gebauer P., Dolník V.: *Analytická kapilární izotachoforéza*. Academia, Praha 1987.
10. www.calculi.cz, staženo 5. ledna 2012.
11. Benová D.: *Rigorózní práce*. MU, Brno 2010.

CHARAKTERIZACE A PŘÍPRAVA KŘEMENNÝCH KAPILÁR MODIFIKOVANÝCH ZLATÝMI NANOČÁSTICEMI

JAKUB KOKTAN, PAVEL ŘEZANKA, PAVEL ŽVÁTORA, MAGDA VOSMANSKÁ, DAVID SÝKORA* a VLADIMÍR KRÁL

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

Úvod

Modifikaci stacionárních fází ve vysokoučinné kapalinové chromatografii, plynové chromatografii, kapilární elektroforéze (CE) a kapilární elektrochromatografii (CEC) pomocí nanočástic zlata (GNP) bylo v posledních letech věnováno několik prací. Pro ukotvení nanočástic na povrchy bylo využito nekovalentní (elektrostatické, van der Waalsovy interakce) i kovalentní navázání GNP prostřednictvím bifunkční spojky, např. (3-merkaptopropyl)trimethoxysilanu (MPTMS)^{1–3}.

V kapilární elektrochromatografii v otevřených kapilárách (OT-CEC, Open-Tubular Capillary Electro-Chromatography) byly modifikované GNP imobilizovány na vnitřní stěnu kapiláry z taveného křemene. Bohužel takto připravené kolony nemají dostatečně velký povrch pro efektivní retenci a separaci analytů. Jednou z alternativ vedoucích ke zvětšení povrchu je použití sol-gel techniky^{4,5}. Sol-gel technika spočívá ve vytvoření vnitřní 3D struktury na stěnách kapiláry prostřednictvím částečně polymerizovaných prekurzorů. Prekurzorem může být mimo jiné i MPTMS^{6,7}.

Cílem této práce bylo připravit kapilární kolony s GNP modifikovanou stacionární fází pro kapilární elektrochromatografii. Modifikace vnitřních stěn kapilár byla prováděna dvěma metodami. První z nich byla sol-gel technika, kterou byla vytvořena 3D struktura uvnitř kapilár. Druhým postupem bylo kovalentní navázání MPTMS na stěny kapilár. Na takto připravené kapiláry byly následně imobilizovány různě velké nanočástice zlata modifikované 1-oktadekanthiolem. Obě metody příprav kapilár byly porovnány zkoumáním separace několika aromatických látek v OT-CEC módu.

Experimentální část

Byly použity následující chemikálie: voda (redestilovaná, 10 MΩ), dihydrát citronanu sodného (≥99,0 %, Penta), tetrachlorozlatitan draselný (98,0 %, Aldrich), trihydrát kyseliny tetrachlorozlatité (≥99,8 %, Aldrich), acetonitril (pro HPLC super gradient, ≥99,9 %,

Lach-Ner), toluen (≥99,0 %, Penta), 1-oktadekanthiol (98,0 %, Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (99,0 %, Sigma-Aldrich), tetraoktylammonium bromid (TOAB, ≥98,0 %, Fluka), fluoren (98,0 %, Aldrich), anthracen (97,0 %, Aldrich), fenanthren (98,0 %, Aldrich), naftalen (99,0 %, Fluka), thiomocovina (99 %, Aldrich), kyselina fosforečná (85,0 %, p.a., Merck), hydroxid sodný (98,0 %, Lach-Ner), kyselina chlorovodíková (35,0 %, p.a., Lach-Ner), ethanol (96,6 %, Lach-Ner), hexan (≥80,0 %, Lach-Ner), (3-merkaptopropyl)trimethoxysilan (95 %, Aldrich).

Elektrochromatografická měření byla prováděna na přístroji Agilent HPCE G1600A (Agilent Technologies, Švýcarsko). UV-Vis signál z detektoru s diodovým polem byl zaznamenáván na vlnových délkách 207, 220, 252 a 258 nm.

Pro zjištění množství zlata imobilizovaného na stěnách kapilár byla použita metoda hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Měření byla provedena na hmotnostním spektrometru Elan DRC-e (Perkin-Elmer, Kanada), který byl vybaven koncentrickým zmlžovačem s cyklónovou mlžnou komorou, reakční/kolizní celou (DRC) pro eliminaci interferencí a peristaltickým čerpadlem Gilson 212.

Byly připraveny dva typy nanočástic zlata, které se lišily svou velikostí a dalšími charakteristikami. První z nich byly syntetizovány redukcí citronanem ve vodném prostředí⁸. Do dvouhrdlé 250ml varné baňky se zábrusem bylo vloženo 100 ml redestilované vody a magnetické míchadlo. Na baňku bylo nasazeno septum a zpětný chladič. Voda byla přivedena k varu na olejové lázni. Za varu byly plynule během několika vteřin přidány injekční stříkačkou zásobní roztoky tetrachlorozlatitanu draselného (1 ml, $c = 26,46 \text{ mmol l}^{-1}$) a potom citronanu sodného (2,5 ml, $c = 34 \text{ mmol l}^{-1}$). Celá směs byla ponechána 10 min vařit. Reakční směs postupně změnila barvu ze žluté, přes tmavě hnědou až na vínově červenou. Tyto nanočástice jsou v dalším textu označovány „GNP(1)“.

Ve druhém případě byla použita Brustova-Schiffriova metoda v toluenové fázi¹. Do 25ml varné baňky bylo vloženo magnetické míchadlo, 3 ml roztoku tetrachlorozlatité kyseliny ($c = 27,36 \text{ mmol l}^{-1}$), 0,45 ml toluenového roztoku 1-oktadekanthiolu ($c = 79,90 \text{ mmol l}^{-1}$) a 8 ml TOAB ($c = 24,96 \text{ mmol l}^{-1}$) v toluenu. Ihned byl patrný přechod $[\text{AuCl}_4]^-$ do toluenové fáze doprovázený změnou barvy na červenooranžovou. Baňka byla uzavřena septem a chlazená na 0 °C v ledové lázni. Po ochlazení roztoku bylo injekční stříkačkou přikapáno 2,5 ml roztoku tetrahydridoboritanu sodného ($c = 40,01 \text{ mmol l}^{-1}$) na hladinu. Směs byla míchána hodinu na ledové lázni. Průběh reakce byl patrný změnou barvy na tmavě červenou. Nakonec byla směs přelita do děličky a po odstranění spodní vodné fáze byla horní toluenová fáze třepána postupně 15 ml H_2SO_4 ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$), 15 ml NaOH ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$)

a 3 × 15 ml destilované vody. Spodní vodná fáze byla vždy odlita. Takto získané nanočástice jsou v dalším textu označovány „GNP(2)“. GNP(2) byly připraveny již modifikované 1-oktadekanthiolem.

Použité křemenné kapiláry byly od firmy Polymicro (USA), měly vnitřní průměr 50 μm a délku 50 cm. Pro proplachování byly použity injekční stříkačky (1 ml) a lineární dávkovače. Po modifikaci bylo vytvořeno detekční okénko rozpuštěním polyimidové vrstvy kapiláry horkou kyselinou sírovou. Efektivní délka kolony byla 41,5 cm. Modifikace kolony byla prováděna postupně ve třech hlavních krocích. Prvním bylo navázání MPTMS na stěny křemenné kapiláry, druhým imobilizace GNP přes thiolovou skupinu MPTMS a třetím modifikace nanočástic na stěně kapiláry. Kolony byly připraveny technikou kovalentního navázání MPTMS a nebo sol-gel technikou, kdy se na stěnu kapiláry váže částečně polymerizovaný prekurzor. Sol-gel činidlo tvořil roztok MPTMS/ethanol (96%)/HCl ($c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$) v poměru 7:2:1 (V/V), celkový objem byl 1 ml. Roztok bylo třeba před samotným použitím intenzivně míchat 24 h při pokojové teplotě. Pro srovnání byla zkoumána i nemodifikovaná kapilára (blank kapilára), jejíž povrch nebyl nijak upravován.

Celkem byly připraveny čtyři kapiláry: kapilára I byla modifikována kovalentním navázáním MPTMS a byly použity GNP(1), kapilára II byla modifikována stejně, ale byly použity GNP(2). Kapilára III byla připravena sol-gel technikou a s imobilizovanými GNP(1), kapilára IV byla opět připravena sol-gel metodou a byly použity GNP(2).

Stacionární fáze na stěnách kapiláry I byla připravena propláchnutím roztokem NaOH ($c = 1 \text{ mol l}^{-1}$), vodou, HCl ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$) a opět vodou. Následně byla kapilára profouknuta argonem a sušena hodinu při 180 °C. Po promytí roztokem MPTMS/ACN (1:12, V/V) byla v tomto roztoku ponechána 24 hodin, poté byla kapilára propláchnuta acetonitrilem (ACN), usušena a nakonec byl do kapiláry nadávkován roztok GNP(1), ve kterém byla kolona ponechána 24 hodin. Zbytek roztoku byl z kapilár vyfouknut argonem a nanočástice uchycené na stěnách byly modifikovány roztokem 1-oktadekanthiolu v hexanu ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$), po 24 hodinách byla kapilára propláchnuta hexanem, profouknuta argonem a promyta vodou.

Kapilára II byla připravena podobně, ale byly použity GNP(2) 10× ředěné toluenem namísto GNP(1) a nebyl dávkován 1-oktadekanthiol, protože tyto nanočástice již byly modifikovány 1-oktadekanthiolem v průběhu syntézy.

Kapilára III byla modifikována sol-gel metodou. V postupu přípravy pro kapiláru I byly dva kroky promývání roztokem MPTMS/ACN (1:12, V/V) nahrazeny promytím 150 μl sol-gel činidla. Činidlo bylo v kapiláře ponecháno dvě hodiny, potom bylo vytlačeno argonem a kapilára byla přes noc sušena při 120 °C. Stejná modifikace byla provedena i pro kapiláru IV a následně byly aplikovány GNP(2).

Jako marker elektroosmotického toku byla použita thiomocovina (A). Separční schopnost kolony byla testována pomocí naftalenu (B), fluorenu (C), anthracenu (D) a fenanthrenu (E). Koncentrace analytů v základním elek-

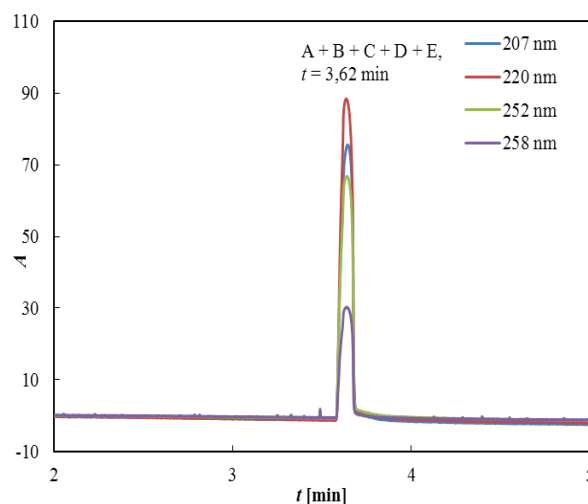
trolytu byla 1 mg ml⁻¹. Základním elektrolytem byl směsný roztok fosfátového pufru o pH 7 a ACN. Obsah ACN a koncentrace fosfátu byly optimalizovány, aby bylo dosaženo účinné separace.

Kapiláry byly před samotným měřením 20 min promývány elektrolytem při maximálním tlaku (asi 95 kPa) a potom na ně bylo 30 min vloženo napětí 25 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky, 15 mbar po dobu 10 s. Napětí při elektrochromatografii bylo nastaveno na 25 kV.

V kapilárních kolonách bylo stanoveno množství imobilizovaného zlata metodou hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Byla analyzována kapilára typu I a dvě kapiláry typu III. Kapiláry pro analýzu byly nejprve zbaveny polyimidového obalu horkou kyselinou sírovou a následně rozpuštěny v 7 ml koncentrované kyseliny fluorovodíkové. Kyselina fluorovodíková byla ze vzorků odkouřena a zbylé GNP byly rozpuštěny ve 4 ml lučavky královské. Kyselina byla odkouřena, do vzorků byl přidán 1 ml HNO₃ a obsah byl kvantitativně převeden do 25ml odměrných baněk. Do vzorků bylo přidáno 0,5 ml roztoku vnitřního standardu Bi. Obsah zlata byl stanoven pomocí kalibrační závislosti. Řada kalibračních roztoků měla koncentrace Au 0, 2, 5, 10 a 20 ng ml⁻¹ a vnitřního standardu bismutu 40 ng ml⁻¹. Pro analýzu byly použity zásobní roztoky Au $c = 1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, SRN) a Bi $c = 1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ (Merck).

Výsledky a diskuse

Syntetizované GNP byly charakterizovány transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) a UV/Vis absorpční spektroskopií. Pro nanočástice připravené redukcí



Obr. 1. Elektroferogram pro blank kapiláru; základním elektrolytem byl směsný roztok ACN (20%, V/V) a fosfátový pufr $c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7

Tabulka I

Retenční čas (t), počet teoretických pater (N) a výškový ekvivalent teoretického patra (H) pro kapiláry I, II, III, IV a jednotlivé analyty: thiomocovina (A), naftalen (B), fluoren (C), anthracen (D) a fenanthren (E)

Analyt	Kapilára	t [min]	N [$\times 10^{-3}$]	H [mm]	Analyt	Kapilára	t [min]	N [$\times 10^{-3}$]	H [mm]
A	I	8,2	84,0	4,9	C	I	8,7	40,0	10,3
	II	6,6	55,0	7,6		II	7,4	14,0	29,1
	III	12,6	22,0	19,3		III	14,3	4,0	103,9
	IV	9,5	43,0	9,6		IV	10,7	13,0	30,9
B	I	8,3	65,0	6,3	D	I	9,3	12,0	35,1
	II	6,8	19,0	21,5		II	8,3	2,0	265,9
	III	12,9	17,0	24,3	E	I	9,1	34,0	12,3
	IV	9,9	38,0	11,1		II	7,8	9,0	45,0

citronanem byla vlnová délka absorpčního maxima 518 nm. Z TEM snímků byla stanovena průměrná velikost nanočástic $14,7 \pm 2,2$ nm. Připravené GNP(2) byly menší s velikostí $5,2 \pm 1,2$ nm. Absorpční maximum nebylo možné určit, protože absorpční pás plasmonové rezonance byl široký a nevýrazný. Oba koloidní roztoky obsahovaly sférické nanočástice zlata.

Nejprve byla testována separační schopnost neupravené blank kapiláry. K separaci vybraných analytů (A – thiomocovina, B – naftalen, C – fluoren, D – anthracen, E – fenanthren) při podmínkách analýzy nedošlo (obr. 1).

Naopak kapiláry I, II, III i IV vykazovaly retenci a separaci studovaných analytů. Separace probíhala na základě hydrofóbních interakcí analyt–stacionární fáze. Účinnost separací byla vyjádřena počtem teoretických pater a výškovým ekvivalentem teoretického patra.

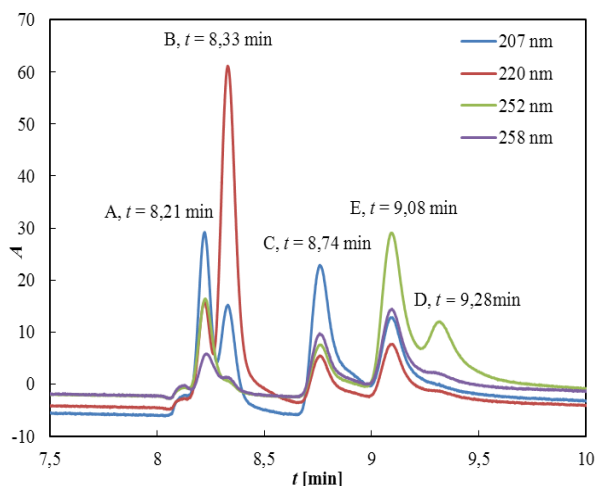
Nejúčinnější separace byla dosažena na kapiláře I,

která separovala všechny složky (obr. 2). Počty teoretických pater se pro všechny analyty pohybovaly v řádech 10^4 (tab. I).

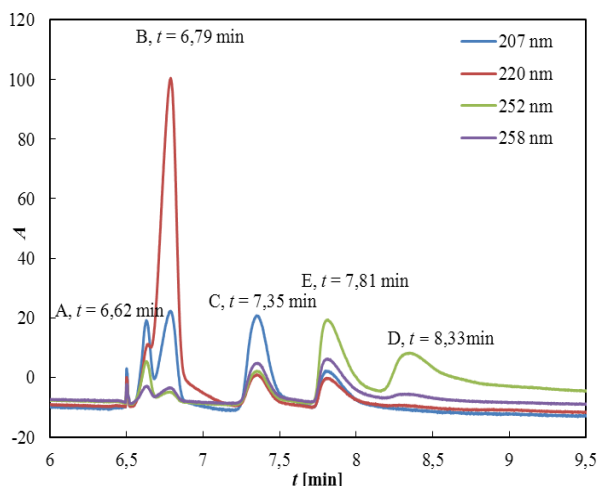
Kapilára II rovněž směs rozdělila, ale s nižší účinností (obr. 3). Pro anthracen a fenanthren se počet teoretických pater pohyboval jen okolo 2000 a 9000 (tab. I). Menší nanočástice v tomto případě nezlepšují separační schopnosti.

V případě kapilár III a IV připravovaných metodou sol-gel nebyly ze směsi odděleny analyty D a E (obr. 4 a obr. 5). Kolony poskytl pro dané analyty nižší účinnost. V experimentu nebyl potvrzen předpoklad, že větší aktivní povrch pro navázání nanočástic s 1-oktadekanthiolem znamená i lepší separační schopnosti (tab. I).

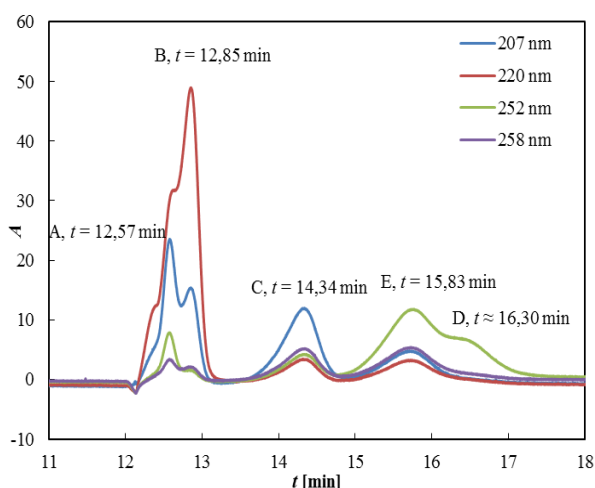
Množství zlata imobilizovaného na stěny kapilárních kolon bylo stanoveno ICP-MS analýzou. Z naměřených dat vyplývá, že modifikace stěn sol-gel metodou vedla



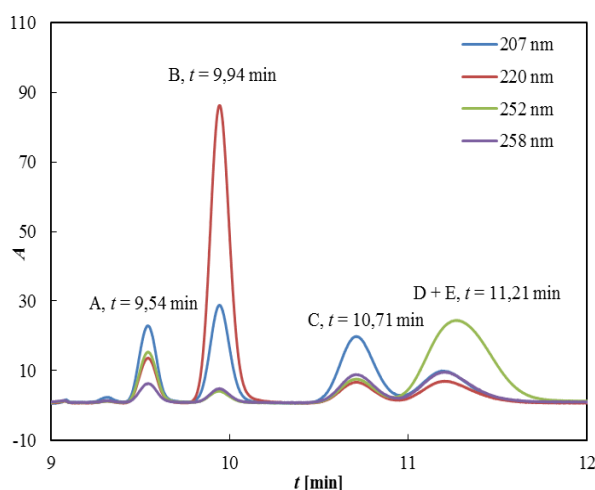
Obr. 2. Typický elektroferogram získaný na kapiláře I; základním elektrolytem byl směsný roztok ACN (30%, V/V) a fosfátový pufr, $c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7



Obr. 3. Typický elektroferogram získaný na kapiláře II; základním elektrolytem byl směsný roztok ACN (20%, V/V) a fosfátový pufr, $c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7



Obr. 4. Typický elektroferogram získaný na kapiláře III; základním elektrolytem byl směsný roztok ACN (20%, *V/V*) a fosfátový pufr, $c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7



Obr. 5. Typický elektroferogram získaný na kapiláře IV; základním elektrolytem byl směsný roztok ACN (50%, *V/V*) a fosfátový pufr, $c = 50 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7

Tabulka II

Porovnání množství zlata stanoveného metodou ICP-MS v kapilárách po jejich kovalentní modifikaci GNP

Typ kapiláry	w_{Au} [ppb]
I	217
III	931
III	1100

k asi $5\times$ většímu množství imobilizovaného zlata v kapilárách. Konkrétní naměřené hodnoty jsou shrnuty v tab. II.

Závěr

Dvěma různými postupy byly připraveny nanočástice zlata odlišných velikostí. Nanočástice získané citrátovou redukcí vykazovaly průměrnou velikost 15 nm, zatímco GNP modifikované 1-oktadekanthiolem a připravované v toluenu byly menší s průměrnou velikostí 5 nm.

Zlaté nanočástice byly použity k přípravě kolon pro kapilární elektrochromatografii. Kapiláry byly připraveny dvojím způsobem. Prvním byla imobilizace GNP na křemennou stěnu prostřednictvím spojky MPTMS. Ve druhém případě MPTMS sloužil jako prekurzor pro sol-gel proces, kterým se na stěně kapiláry nejprve vytvořila 3D struktura, a tím byl zvětšen aktivní vnitřní povrch kapiláry. ICP-MS analýza potvrdila, že se druhým způsobem na stěny navázalo asi pětinašobné množství zlata. Na GNP byl imobilizován 1-oktadekanthiol, který vytvořil hydrofobní stacionární fázi na stěnách kapilár.

Připravené kolony byly testovány v OT-CEC módu při separaci směsi hydrofobních analytů (naftalenu, fluorenu, anthracenu a fenanthrenu). Separace směsi bylo dosaženo na všech typech modifikovaných kapilár, ale pro sol-gel modifikované kolony nebyly rozděleny anthracen a fenanthren. Z pohledu účinnosti separace nebylo prokázáno, že by větší množství imobilizovaných nanočástic mělo pozitivní vliv na účinnost separace.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekty 203/09/0675 a P206/12/0453).

LITERATURA

- Daniel M., Astruc D.: *Chem. Rev.* 104, 293 (2004).
- Sýkora D., Kašička V., Mikšík I., Řezanka P., Záruba K., Matějka P., Král V.: *J. Sep. Sci.* 33, 372 (2010).
- Qu Q. S., Shen F., Shen M., Yin L., Hu X. Y., Yang G. J., Wang C. Y., Yac C., Zhang Y. K.: *Anal. Chim. Acta* 609, 76 (2008).
- Yang L., Guihen E., Glennon J. D.: *J. Sep. Sci.* 28, 757 (2005).
- Řezanka P., Navrátilová K., Žvátora P., Sýkora D., Matějka P., Miklík I., Kašička V., Král V.: *J. Nanopart. Res.* 13, 5947 (2011).
- Řezanka P., Ehala S., Koktan J., Sýkora D., Žvátora P., Vosmanská M., Král V., Mikšík I., Čefovský V., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 35, 73 (2012).
- Mikšík I., Lacinová K., Zmatlíková Z., Sedláková P., Král V., Sýkora D., Řezanka P., Kašička V.: *J. Sep. Sci.*, v recenzním řízení.
- Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J.: *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55 (1951).

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTID MELEKTIN: KONFORMAČNÍ STUDIE METODAMI CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU

STANISLAV KYKAL a VLADIMÍR SETNIČKA

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

Úvod

Peptidy jsou součástí téměř všech forem života. V imunitním systému živých organismů tvoří hlavní složku obrany proti infekcím. V tomto případě se jedná o tzv. antimikrobiální peptidy¹. Jejich mechanismus působení na buněčné membrány bakterií je odlišný od současně používaných konvenčních antibiotik, v důsledku čehož bakterie dosud nevykazují, na rozdíl od konvenčních antibiotik, významnou rezistenci vůči těmto peptidům. Proto by antimikrobiální peptidy mohly v budoucnu nahradit konvenční antibiotika, a hrát tak důležitou roli ve farmaceutickém průmyslu. Také z toho důvodu jsou tyto peptidy předmětem mnoha studií^{2,3}. V současné době jsou nejvíce studovány peptidy izolované z hmyzu, neboť právě hmyz se dokázal přizpůsobit téměř jakémukoliv prostředí, a to vlastní syntézou antimikrobiálních peptidů, díky kterým se stal rezistentní proti mnoha typům infekcí⁴. Antimikrobiální aktivita těchto peptidů je ovlivněna mnoha parametry⁵, jedním z nejdůležitějších je jejich konformace.

Cílem této práce bylo studovat konformaci jednoho z potenciálně zajímavých antimikrobiálních peptidů, zvaného melektin (MEP), a jeho syntetických analogů. MEP byl izolován z jedu kleptoparazitické včely *Melecta albifrons*³. Patří do skupiny kationických amfipatických α -helikálních peptidů. Skládá se z 18 aminokyselin, jejichž sekvence je H-Gly-Phe-Leu-Ser-Ile-Leu-Lys-Lys-Val-Leu-Pro-Lys-Val-Met-Ala-His-Met-Lys-NH₂.

V centrální části peptidového řetězce se nachází aminokyselina prolin, která dělá MEP strukturně zajímavým – značně ovlivňuje jeho antimikrobiální aktivitu³.

Spektroskopické studie peptidů se provádí nejen ve vodném prostředí, ale často se používají i jiná rozpouštědla, např. trifluoroethanol (TFE), chloroform, propanol a další⁶. Roztoky obsahující TFE dokáží dobře napodobit prostředí buněčné membrány bakterií. Proto jsou ve studii konformace MEP a jeho analogů jako rozpouštědla použita právě voda a TFE^{7,8}. V následujícím textu je kladen důraz na diskusi výsledků získaných ve vodných roztocích.

Velmi vhodnými metodami pro konformační studie peptidů jsou spektroskopie elektronového (ECD) a vibračního (VCD) cirkulárního dichroismu⁶. 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 ECD a VCD 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 tzv. oblasti amidu I' (C=O valenční vibrace) v případě VCD^{6,9,10}. Ze spekter ECD lze dokonce s poměrně velkou spolehlivostí určit procentuální zastoupení jednotlivých konformací v peptidu, např. metodami využívajícími neuronové sítě¹¹.

Experimentální část

Jako rozpouštědlo pro měření IČ a spekter VCD roztoků peptidů byla použita deuterovaná voda (D₂O, Isosar, 99,9% D), v případě ECD redestilovaná voda. Izolace jedu získaného ze včely *Melecta albifrons*, jeho přečištění pomocí RP-HPLC, určení sekvence aminokyselin v peptidovém řetězci melektinu metodou MALDI-TOF-MS a pomocí Edmanova odbourávání bylo provedeno skupinou RNDr. Václava Čerovského, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha)³. Poté byla touto skupinou provedena totální syntéza melektinu a jeho analogů (tab. I). Zkratky označující jednotlivé peptidy byly převzaty z reference³. Po syntéze byly dále surové peptidy přečištěny metodou RP-HPLC a byla provedena trojnásobná lyofilizace v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Roztoky peptidů o koncentraci 50 g l⁻¹ byly měřeny metodami ECD a VCD.

Měření IČ a VCD ve spektrální oblasti 1750–1400 cm⁻¹ bylo provedeno na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S vybaveného VCD/IRRS modulem PMA 37 (oboje Bruker, Německo)¹². Pro měření vzorků peptidů byla použita rozebíratelná kyveta typu A145 (Bruker, Německo) s okénky z CaF₂ a teflonovou distanční fólií tloušťky 23 μ m. Spektra byla měřena s rozlišením 8 cm⁻¹.

Tabulka I

Aminokyselinové sekvence melektinu a jeho studovaných analogů

Zkratka ^a	Sekvence peptidů
MEP	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂
MEP-1	GFLSILKKVLLKVMAMHK-NH ₂
MEP-3	GFLSILKKVLAKVMAMHK-NH ₂
MEP-4	GFLSILKKVLGKVMAMHK-NH ₂
MEP-5	KVMAMHK-NH ₂
MEP-6	PKVMAMHK-NH ₂
MEP-9	GFLSILKKVLP-NH ₂
MEP-10	GFLSILKKVL-NH ₂

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

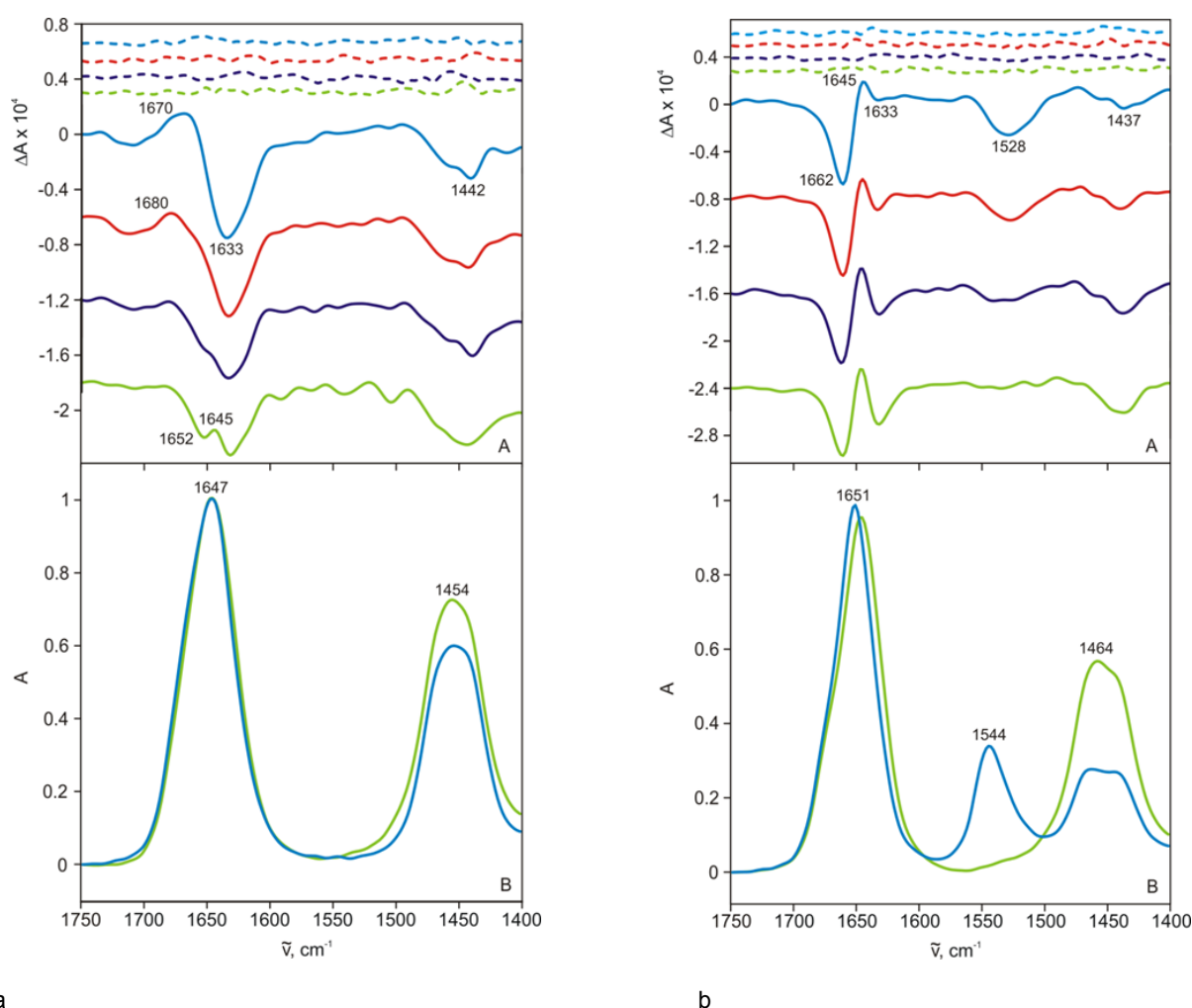
Měření spekter VCD probíhalo v blocích. Jeden blok byl získán akumulací 3680 dílčích záznamů (doba měření 20 min) a pro každý peptid byla provedena opakovaná měření typicky 6–10 bloků. Tyto bloky byly poté zprůměrovány a získáno tak VCD spektrum, od kterého bylo následně odečteno VCD spektrum rozpouštědla změřeného za identických podmínek. Tím byla provedena korekce základní linie a získáno výsledné spektrum VCD peptidu. Následně byla u všech spekter (IČ i VCD) provedena normalizace na jednotkovou hodnotu absorpce maxima pásu amidu I' v IČ spektru a takto získaná spektra jsou prezentována dále v textu.

Měření spekter ECD v oblasti 180–260 nm bylo provedeno na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko). Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě (Suprasil, Hellma)

s optickou dráhou 10 μm . Rychlost skenování byla nastavena na hodnotu 50 nm min^{-1} a počet akumulací na hodnotu 4. Spektra ECD peptidů byla poté korigována na základní linii odečtením spektra destilované vody použité pro přípravu roztoků peptidů. Odhad procentuálního zastoupení konformací v jednotlivých peptidech byl proveden na základě analýzy spekter ECD v programu CDNN 2.1 (Delphi).

Výsledky a diskuse

Nejprve byla měřena IČ a spektra VCD melekтину (MEP) v D_2O . Výsledná spektra jsou prezentována na obr. 1a. V prvním spektru VCD (čas měření 0–100 min)



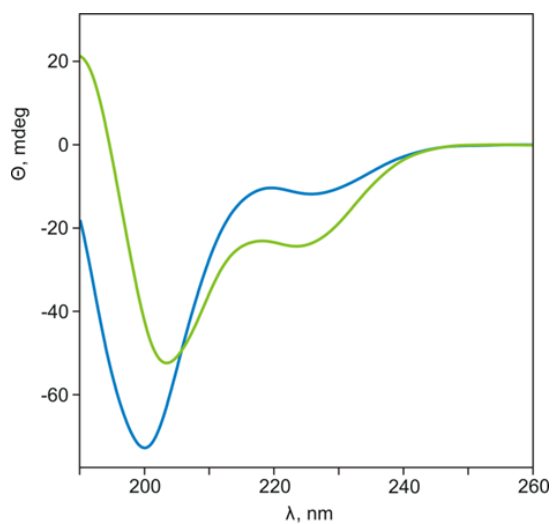
Obr. 1. a) Spektra VCD (plná čára) a příslušná spektra šumu S/N (přerušovaná čára) (A) peptidu MEP v D_2O měřená v čase 0–100 min (modrá), 100–180 min (červená), 180–280 min (tmavě modrá), 280–340 min (zelená) a IČ absorpční spektra (B) MEP v D_2O před měření (modrá) a po měření (zelená) spekter VCD; b) Spektra VCD (plná čára) a příslušná spektra šumu S/N (přerušovaná čára) (A) peptidu MEP-3 v D_2O měřená v čase 0–80 min (modrá), 80–140 min (červená), 140–220 min (tmavě modrá), 220–300 min (zelená) a IČ absorpční spektra (B) MEP-3 v D_2O před měření (modrá) a po měření (zelená) spekter VCD

Lze pozorovat negativní couplet v oblasti amidu I' tvořený kladným pásem $\approx 1670\text{ cm}^{-1}$ a záporným intenzivnějším pásem $\approx 1633\text{ cm}^{-1}$. Tento couplet je charakteristickým znakem konformace označované jako poly-prolin II (PPII) (cit.^{9,13}). Aminokyselina prolin vázaná uvnitř peptidového řetězce podporuje vznik této konformace, neboť u peptidů bohatých na prolin většinou nedochází ke vzniku konformace stabilizované intramolekulárními vodíkovými můstky. Spektra VCD se však začala měnit v závislosti na čase. V oblasti amidu I' vznikl nový záporný pás u vlnočtu $\approx 1652\text{ cm}^{-1}$, což naznačuje zvyšující se obsahu α -helikální konformace^{14,15}. Konečné spektrum po stabilizaci peptidu v rozpouštědle (v čase 280–340 min) tedy indikuje, že se jedná o zastoupení konformací PPII a α -helix, kde ovšem stále převažuje méně uspořádaná konformace PPII.

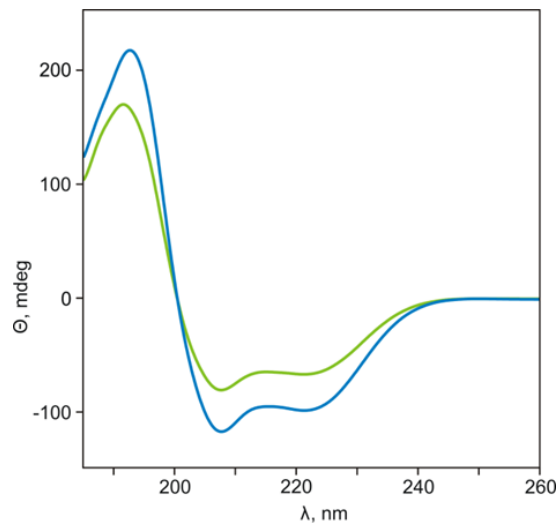
Konformace peptidu MEP byla také sledována metodou ECD. Spektra jsou zobrazena na obr. 2a. První spektrum bylo získáno změřením ECD ihned po rozpuštění peptidu v destilované vodě. Tvar spektra v oblasti ≈ 190 – 240 nm naznačuje, že se jedná o konformaci PPII bez významného podílu α -helixu. Druhé měření ECD bylo provedeno po 340 min od rozpuštění peptidu v destilované vodě. Z posunu záporného pásu směrem k vyšším vlnovým délkám (z původních $\approx 200\text{ nm}$ na $\approx 203\text{ nm}$) a ze snížení jeho intenzity spolu se zvýšením intenzity pásů v oblasti ≈ 206 – 240 nm lze usoudit, že došlo ke zvýšení podílu α -helikální konformace, avšak konformace PPII stále převažuje. Toto plně potvrzuje výsledky získané z VCD.

Konformační změny v čase byly zaznamenány také u peptidu MEP-3, v jehož sekvenci je aminokyselina prolin v centrální části řetězce nahrazena alaninem. IČ a spektra VCD měnící se v čase jsou zobrazena na obr. 1b. MEP-3 zaujal nejprve α -helikální konformaci v D_2O , kdy se záporný VCD pás nacházel u vlnočtu $\approx 1662\text{ cm}^{-1}$ a kladný u $\approx 1645\text{ cm}^{-1}$. Tyto vlnočty odpovídají polohám pásů typického α -helixu^{14,15}. Během měření ovšem začala růst intenzita záporného pásu $\approx 1633\text{ cm}^{-1}$, což naznačuje postupné zvyšování podílu konformace PPII na úkor α -helikální. V IČ absorpčních spektrech měřených před a po skončení VCD došlo k mírnému posunu pásu v amidu I' směrem k nižšímu vlnočtu (z původních $\approx 1651\text{ cm}^{-1}$ na $\approx 1646\text{ cm}^{-1}$) a současně ke snížení jeho intenzity. Tento efekt souvisí s postupnou konformační změnou peptidu z původní konformace α -helix (charakteristická poloha pásu $\approx 1651\text{ cm}^{-1}$) na konformaci PPII. α -helikální konformace zde však nezániká, pouze se zvyšuje relativní zastoupení PPII. Lze však konstatovat, že ve výsledné směsi těchto konformací stále převládá α -helix. Aminokyselina alanin v peptidovém řetězci všeobecně podporuje vznik α -helikální konformace^{16,17}. V sekvenci MEP-3 se nachází dva alaniny, což může být hlavním důvodem pro vznik α -helikální konformace již na samém počátku VCD experimentu.

Při studii ECD byla tedy opět provedena měření MEP-3 v závislosti na čase (obr. 2b). První měření ECD tohoto peptidu bylo opět provedeno ihned po rozpuštění peptidu



a



b

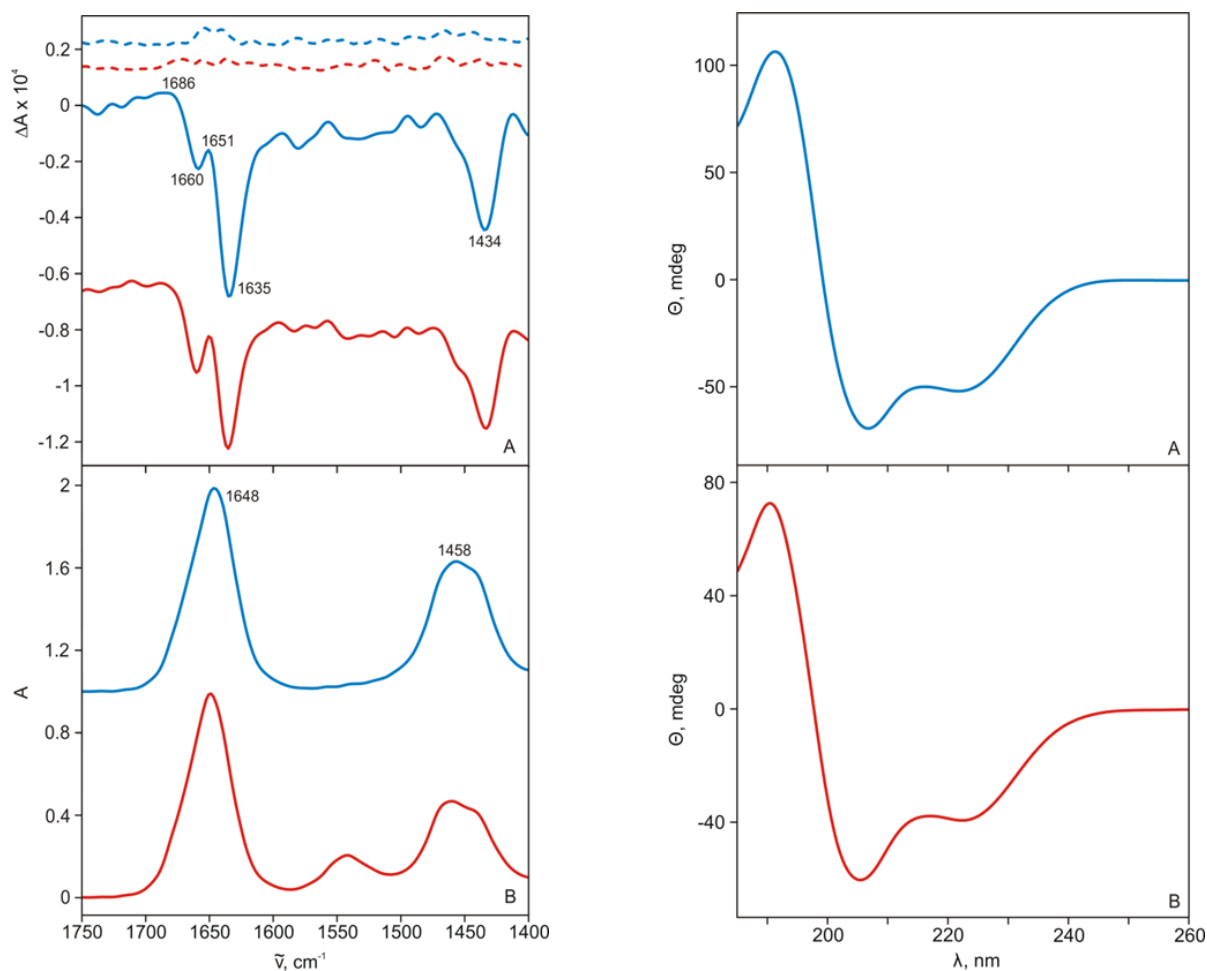
Obr. 2. a) Spektra ECD peptidu MEP v destilované vodě měřená v čase 0 min (modrá) a 340 min (zelená); b) Spektra ECD peptidu MEP-3 v destilované vodě měřená v čase 0 min (modrá) a 300 min (zelená)

v destilované vodě. Spektrum ECD vykazuje tvar typický pro α -helikální konformaci. Při druhém měření v čase 300 min od rozpuštění peptidu došlo ke snížení intenzity jak kladného pásu ≈ 193 nm, tak záporných pásů v oblasti 200–240 nm. Tento efekt je projevem vzrůstajícího zastoupení konformace PPII na úkor α -helix. ECD experimentem bylo tedy opět potvrzeno, že konformace MEP-3 se v čase mění z α -helix na PPII, kde ovšem stále převládá α -helix.

Další měřené peptidy, ve kterých je prolinu v centrální části řetězce nahrazen jinou aminokyselinou, jsou MEP-1 a MEP-4. U peptidu MEP-1 je místo prolinu v peptidovém řetězci navázán lysin a v MEP-4 je místo prolinu umístěn glycin. Jejich výsledná IČ a spektra VCD jsou znázorněna na obr. 3a. Spektra VCD těchto peptidů byla stabilní v čase, nedocházelo u nich ke změně konformace. Kladný

pás konformace PPII v oblasti kolem ≈ 1680 cm^{-1} není příliš intenzivní, záporný pás je lokalizován u vlnočtu ≈ 1635 cm^{-1} . Jak tomu bylo i v případě MEP, mezi těmito dvěma pásy vznikl nový záporný pás ≈ 1660 cm^{-1} . Tyto tvary spekter opět naznačují přítomnost současně α -helikální a konformace PPII. Toto platí pro oba studované peptidy. Je známo^{18–20}, že aminokyseliny lysin i glycin vázané uvnitř peptidového řetězce podporují vznik konformace PPII, přičemž toto tvrzení odpovídá získaným výsledkům.

Spektra ECD obou těchto peptidů lze pozorovat na obr. 3b. Z průběhu těchto spekter se zdá, že v obou peptidech převažuje α -helikální konformace. Avšak pásy ve sledované oblasti 200–240 nm jsou oproti pásům typickým pro α -helix mírně posunuty k nižším vlnovým délkám a jsou méně intenzivní. Proto lze usoudit, že MEP-1



a

b

Obr. 3. a) Spektra VCD (plná čára) a příslušná spektra šumu S/N (přerušovaná čára) (A) a IČ absorpční spektra (B) peptidů MEP-1 (modrá) a MEP-4 (červená) v D_2O ; b) Spektra ECD peptidů MEP-1 (A) a MEP-4 (B) v destilované vodě

a MEP-4 zaujímají současně jak konformaci α -helix, tak PPII. Zastoupení jednotlivých konformací bude uvedeno později.

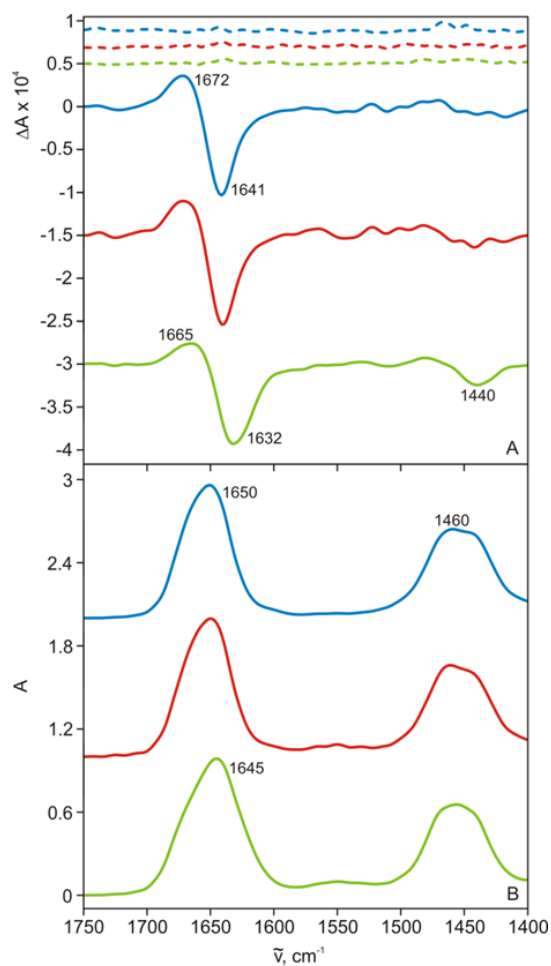
Pro další studii vlivu prolinu na konformaci peptidu byla měřena spektra VCD a ECD *C*-koncových a *N*-koncových fragmentů. Mezi *C*-koncové fragmenty patří MEP-5 a MEP-6, v případě *N*-koncových fragmentů se jedná o MEP-9 a MEP-10. Peptid MEP-10 (*N*-koncový fragment bez prolinu) se choval zcela odlišně než ostatní fragmenty. Jeho rozpuštění v D_2O trvalo velmi dlouhou dobu a muselo být podpořeno stálým mícháním na vibrační třepačce. Po úplném rozpuštění byl však při požadované koncentraci peptidu získán velmi hustý gel. Při měření VCD pak nebyly získány korektní a spolehlivě interpretovatelné výsledky. Spektra VCD se měnila s orientací kyvety a vzorek poskytoval o dva řády větší signál, než je ob-

vyklé, což naznačovalo vznik makroskopicky orientované struktury (spektra nejsou prezentována). Také v ECD byl získán netypický průběh spektra, který nenaznačoval přítomnost žádné ze základních sekundárních struktur. Metodami CD nelze konformaci v takovýchto případech spolehlivě určovat.

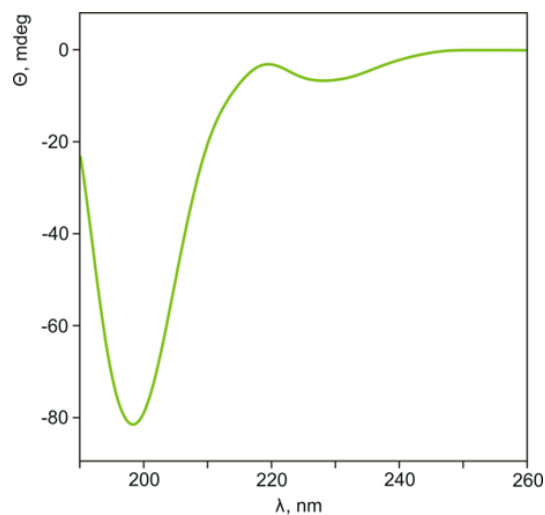
Spektra VCD fragmentů MEP-5, MEP-6 a MEP-9 zobrazená na obr. 4a se vzájemně velmi podobají. Peptid MEP-9, *N*-koncový fragment s prolinem, vykazuje konformaci PPII. Lze tedy tvrdit, že přítomnost aminokyseliny prolinu navázané na *N*-koncovém fragmentu hraje důležitou roli, protože významně ovlivňuje jeho konformaci. Také při měření spektra ECD peptidu MEP-9, které je prezentováno na obr. 4b, byla zjištěna přítomnost konformace PPII bez náznaku významného podílu α -helixu. Pro *C*-koncové fragmenty MEP-5 a MEP-6 byla naměřena v oblasti amidu I' téměř totožná spektra VCD. Oba peptidy dle spektrálního průběhu zaujaly konformaci PPII, což znamená, že konformace *C*-koncového fragmentu není závislá na přítomnosti prolinu v peptidovém řetězci. Na základě výsledků z VCD nebyla konformace *C*-koncových fragmentů studována pomocí ECD, neboť bylo prokázáno, že se sekundární struktura těchto peptidů příliš nemění.

Pro odhad procentuálního zastoupení jednotlivých konformací ve studovaných peptidech na základě analýzy ECD spekter byla použita metoda neuronových sítí (program CDNN). Výsledná zastoupení konformací α -helix a PPII v peptidech, u kterých byla naměřena spektra ECD, jsou prezentována v tab. II.

Procentuální zastoupení konformací v peptidech MEP a MEP-3 po stabilizaci těchto peptidů v rozpuštědle (tedy



a



b

Obr. 4. a) Spektra VCD (plná čára) a příslušná spektra šumu S/N (přerušovaná čára) (A) a IČ absorpční spektra (B) peptidů MEP-5 (modrá), MEP-6 (červená) a MEP-9 (zelená) v D_2O ; b) Spektra ECD peptidu MEP-9 v destilované vodě

Tabulka II

Odhad zastoupení konformací α -helix a PPII v jednotlivých peptidech (%)

Peptid	α -helix	PPII
MEP	13	32
MEP-1	37	32
MEP-3	51	22
MEP-4	25	30
MEP-9	5	48

Tabulka III

Zastoupení konformací α -helix a PPII v peptidech MEP a MEP-3 v závislosti na čase (%)

Peptid	Čas [min]	α -helix	PPII
MEP	0	6	45
	340	13	32
MEP-3	0	71	11
	300	51	22

v konečném měření čase) jsou uvedena v tab. III. Tyto statisticky získané výsledky z ECD odpovídají výsledkům ze studie VCD těchto peptidů.

Závěr

Pomocí spektroskopii ECD a VCD byly sledovány konformační změny peptidu MEP a jeho analogů ve vodných roztocích. Získané výsledky jsou shrnuty v následujících odstavcích.

Při měření VCD peptidů MEP a MEP-3 v D₂O docházelo ke změně konformace v čase. Tento efekt mohl být projevem pomalé stabilizace konformace peptidů v D₂O. Konformace MEP přecházela z PPII do α -helix, zatímco u MEP-3 tomu bylo naopak. Po stabilizaci oba peptidy vykazovaly rovnovážné zastoupení konformací α -helix a PPII, kdy MEP obsahoval více PPII a MEP-3 více α -helixu. Tyto efekty byly také sledovány při studii ECD těchto peptidů v destilované vodě. Výsledná spektra ECD byla použita pro výpočet procentuálního zastoupení konformací v obou peptidech pomocí neuronových sítí, čímž byla také potvrzena konformační změna v čase u těchto peptidů. Obdobné zastoupení obou základních konformací α -helix a PPII také vykazovaly peptidy MEP-1 a MEP-4. Peptidy MEP-5, MEP-6 a MEP-9 zaujaly v D₂O konformaci PPII. Pro peptid MEP-10 v D₂O nebylo možné konformaci určit, neboť vzorek zaujal makroskopicky orientovanou strukturu. Naproti tomu peptid MEP-9 vykazoval

konformaci PPII, a tudíž se ukázalo, že přítomnost prolinu v *N*-koncovém fragmentu hraje významnou roli. U *C*-koncových fragmentů MEP-5 a MEP-6 nebyl vliv přítomnosti prolinu pozorován.

Bylo potvrzeno, že spektroskopie CD je velmi citlivá na sekundární strukturu peptidů a je schopna podat podrobné informace i o konformaci antimikrobiálních peptidů. Proto bylo také možno statisticky vyhodnotit spektra ECD a zjistit přibližná procentuální zastoupení konformací α -helix a PPII v jednotlivých peptidech.

Největší potenciál tvořit α -helikální konformaci, která je podstatným faktorem ovlivňujícím antimikrobiální aktivitu, vykazoval peptid MEP-3. Z výsledků bylo také zjištěno, že právě *N*-koncový fragment má významný vliv na celkovou konformaci peptidu.

Tato studie byla realizována za podpory grantu P208/11/0105 (Grantová agentura České republiky). Autoři velmi děkují RNDr. Václavu Čeřovskému, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) za poskytnutí vzorků peptidů a Ing. Michalu Tatarovičovi (VŠCHT, Praha) za pomoc při vyhodnocování zastoupení sekundárních struktur.

LITERATURA

- Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).
- Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
- Čeřovský V., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Bednarova L., Borovičková L., Slaninová J., Fučík V.: *ChemBioChem* 9, 2815 (2008).
- Otvos L.: *J. Pept. Sci.* 6, 497 (2000).
- Bulet P., Stocklin R., Menin L.: *Immunol. Rev.* 198, 169 (2004).
- Keiderling T.A., v knize: *Circular dichroism. Principles and Applications* (Berova N., Nakanishi K., Woody R. W., ed.), str. 621. Wiley-VCH, New York 2000.
- Lehrman S. R., Tuls J. L., Lund M.: *Biochemistry* 29, 5590 (1990).
- Sonnichsen F. D., Van Eyk J. E., Hodges R. S., Sykes B. D.: *Biochemistry* 31, 8790 (1992).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5576 (1986).
- Böhm G., Muhr R., Jaenicke R.: *Protein Eng.* 5, 191 (1992).
- Urbanová M., Setnička V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biospectroscopy* 2, 83 (1996).
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5576 (1986).
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986).
- Yoder G., Pančoška P., Keiderling T. A.: *Biochemistry* 36, 15123 (1997).

17. Martinez G., Millhauser G.: *J. Struct. Biol.* 114, 23 (1995).
18. Setnička V., Hlaváček J., Urbanová M.: *J. Pept. Sci.* 15, 533 (2009).
19. Kelly M. A., Chellgren B. W., Rucker A. L., Troutman J. M., Fried M. G., Miller A. F., Creamer T. P.: *Biochemistry* 40, 14376 (2001).
20. Conlon J. M., Abdel-Wahab Y. H. A., Flatt P. R., Leprince J., Vaudry H., Jouenne T., Condamine E.: *Peptides* 30, 888 (2009).

STUDIUM FOSFORYLACE PROTEINŮ CYTOKININOVÉ SIGNÁLNÍ DRÁHY METODOU CE-LIF

LENKA MICHALCOVÁ^a, RADKA DOPITOVÁ^b,
MARTINA VÁLKOVÁ^b a JAN PREISLER^{a,b}

^a Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, CEITEC, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^b Výzkumná skupina Funkční genomika a proteomika rostlin, Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
lenamichalcova@tiscali.cz

Úvod

Cytokinininy, společně s dalšími látkami jako auxiny, gibberiliny, ethylén, abscisová kyselina a další, řadíme mezi růstové regulátory rostlin (fytohormony). Mezi procesy probíhající za účasti cytokininů patří vývoj chloroplastů a fotomorfogeneze, stárnutí listů, apikální dominance, produkce antokyanů, klíčení semen, tvorba postranních kořenů, vývoj cévních svazků či regulace aktivity meristemických pletiv a v neposlední řadě i v odpovědi na stresové faktory.

Bylo zjištěno, že cytokininový signál je realizována pomocí tzv. dvoukomponentního systému (TCS – Two Component System)¹ dříve známého především ze signálních drah bakterií, hub a hlenek, kde slouží jako základní mechanismus reakce na změny vnějšího prostředí.² TCS využívá k přenosu signálu fosforylaci proteinů. Jedním článkem této signální dráhy u *Arabidopsis thaliana* jsou AHP proteiny 1–5 (Arabidopsis Histidinphosphotransfer Proteins), které fosfátovou skupinu přenášejí z cytoplazmatické membrány do jádra. K fosforylaci AHP proteinů dochází na histidinovém zbytku v HPT doméně, která je evolučně konzervovaným strukturním motivem¹.

Fosforylovaná forma histidinu je labilní v kyselém prostředí, stejně jako i další fosfo-aminokyseliny patřící do skupiny N-fosfátů (Agr, His, Lys) a acyl-fosfátů (Asp, Glu). Proto jsou při běžných analýzách proteomu tyto formy ztraceny³.

Cílem této práce bylo optimalizovat separaci bakteriálního lyzátu v bazickém prostředí, vyzkoušet neenzymatickou fosforylaci proteinu a využít informace z bakteriálního systému k analýzám vzorků z rostlinného materiálu.

Experimentální část

Byly použity následující chemikálie: chlorid sodný – p.a. čistota, hydroxid sodný 98% (Lachema Brno, Česká republika), 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

99,9% dále jen „Tris“, riboflavin 98,8%, acetylfosfát p.a. čistota, dithiothreitol 99% (Sigma Aldrich, Steinherin, Německo) dále „DTT“, kyselina chlorovodíková p.a. čistota (Merci, Brno, Česká republika), chlorid hořečnatý hexahydrát p.a. čistota, ledová octová kyselina 100% (Merck, Praha, Česká republika), ethanol p.a. (Lach-Ner, Česká republika), amoniak – vodný roztok p.a. čistota (Mikrochem, Slovenská republika), aceton 99,8% (Scharlau, Španělsko), chlorid fosforylu 98% (Xenon Lodž, Polsko), fosforamid – syntéza v laboratoři⁴. Pro přípravu roztoků byla použita voda redestilovaná v křemenné aparatuře od firmy Haraeus (Německo).

Vzhledem k tomu, že v rostlinném materiálu je množství AHP proteinu malé, byl k optimalizaci metody CE-LIF využit vzorek bakteriální. Vzorek byl připraven tak, že bakterie s nadexprimovaným fúzním proteinem (AHP5-GFP) byly lyzovány sonikací (síla pulsu 35 W) v nativním lyzačním pufru (20 mM Tris, pH 7,9). Centrifugací vzorku (48 000 g, 30 min) byl získán supernatant obsahující rozpustnou frakci bakteriálních proteinů.

Rostlinný materiál byl homogenizován v extrakčním pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA a inhibitory proteas). Proteinový extrakt byl dvakrát centrifugován (12 000 g, 10 min). Byl získán supernatant obsahující rozpustnou frakci rostlinných proteinů.

Měření bylo prováděno na přístroji pro kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescencí (CE-LIF), který byl zkonstruován na Katedře analytické chemie PŘF MU Brno. Jako zdroj excitačního záření sloužila laserová dioda (NDHV310APC, Nichia, Japonsko nebo SHM405-7, Raitner LaserTechnik, Rakousko). Vlnová délka záření je 40 nm, výkon nastaven na 20 mW. Laserový paprsek je čočkou s fokální vzdáleností 1,25 cm (Edmund Optics, UK) zaostřen do středu křemenné kapiláry vyrobenou firmou Polymicro Technologies (USA). Vnější průměr byl 375 μm, vnitřní průměr 50 μm, efektivní délka 30 cm, celková délka 39 cm. Fluorescenční záření analytu procházelo objektivem (100×), zakoupeným od firmy Edmund Optics, UK, na fotonásobič (R1414, Hamamatsu, UK). Rozptýlené záření laseru je pohlcováno černými stěnami přístroje z eloxovaného hliníku, sada stínítek a štěrbina z černého papíru a dva long-pass filtry 455 nm a 475 nm (Edmund Optics, UK) slouží k tomu, aby k fotonásobiči prošlo pouze fluorescenční záření. Signál z fotonásobiče byl zaznamenáván programem CELIF405 vytvořeným v prostředí Labview v. 6.1 s kartou USB-6211 (National Instruments, Texas USA). Frekvence ukládání dat byla 4 Hz.

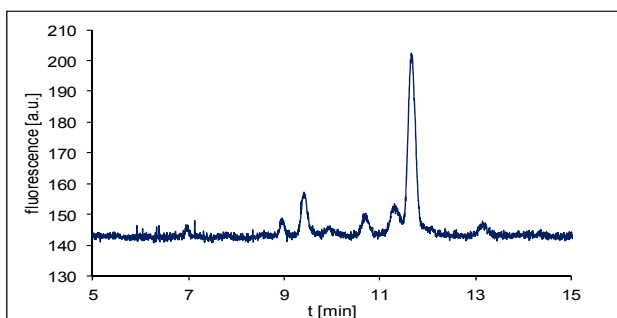
Výsledky a diskuse

Pro správné nastavení přístroje a jeho každodenní kontrolu byl jako modelový vzorek zvolen riboflavin. Separacním pufrům, kvůli pozdějšímu využití při analýze fúzního proteinu, byl zvolen 50 mmol l⁻¹ Tris s 50 mmol l⁻¹ NaCl, pH 8,0. Napětí bylo nastaveno na hodnotu 7,00 kV. Dávkování vzorku bylo hydrodynamické z výšky $\Delta h = 3$ cm po dobu $t_{inj} = 20$ s. Celková délka separace byla 10 min. Vzorek riboflavínu byl připraven z navážky standardu a byl zředěn před separací vodou na požadovanou koncentraci. Z trojnásobku směrodatné odchylky sto dvaceti hodnot šumu (30 s v blízkosti píku) byla vypočtena mez detekce 4·10⁻⁹ mol l⁻¹.

Opakovatelnost měření bakteriálního lyzátu

Předpokladem bylo, že v lyzátu bude viditelný dominantní pík fúznímu proteinu AHP5–GFP. Přirozené fluorofory budou v minimálním množství vzhledem k tomu, že se jedná o indukovanou overexpresi fúzního proteinu. Jak je patrné z obr. 1, v elektroforegramu je cca šest píků. V tab. I jsou shrnuty informace z pěti měření týkající se migračních času a výšky píků.

V úvahu připadala možnost štěpení fúzního proteinu. Tato úvaha byla potvrzena metodou western blotting, při které bylo GFP detegováno pomocí série dvou protilátek (primární protilátka *anti*-GFP a sekundární *anti*-mouse Ab značená alkalickou fosfátasou). V lyzátu jsou tedy přítomny formy jak fúzního proteinu, tak i samotného GFP.



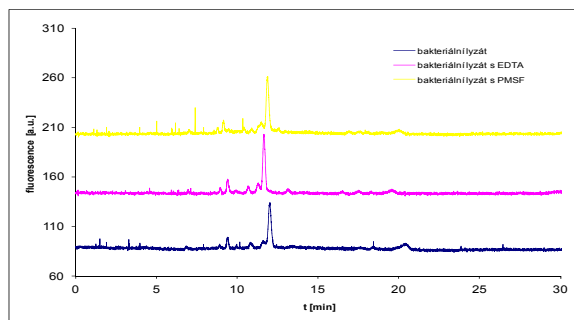
Obr. 1. Elektroforegram bakteriálního lyzátu; koncentrace celkových proteinů $c = 2,2$ mg ml⁻¹, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3$ cm po dobu $t_{inj} = 50$ s, separační napětí 7 kV, separační elektrolyt: 50 mmol l⁻¹ Tris s 50 mmol l⁻¹ NaCl, pH 8,0

Proto byly při další přípravě vzorků přidány během přípravy inhibitory proteas – EDTA, PMSF. Tyto inhibitory neměly na studované štěpení vliv (obr. 2). Dále byl zkoumán vliv skladování (čerstvý lyzát, zmražený na –20 a –80 °C) na přítomnost AHP5–GFP a GFP. Bylo zjištěno, že skladování po dobu jednoho roku nemá vliv na přítomnost obou složek.

Fosforylační procedura

Fosforylace proteinu by se měla projevit posunem píku/ů k vyšším migračním časům⁵. Dojde-li k fosforylaci, protein ponese více skupin se záporným nábojem, a tím pádem bude unášen elektroosmotickým tokem pomaleji. Fosforylace byla prováděna podle cit.⁶. Fosforylační směs I obsahovala 100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT a 10 mM acetylfosfát. Inkubační doba se pohybovala v rozmezí 10–240 min. Poměr proteinu ku fosforylační směsi při fosforylační proceduře je znázorněn v tab. II. Dále byla použita fosforylační směs II, ve které byl zvýšen obsah acetylfosfátu na 15mM. Ani v jednom případě nedošlo k očekávanému posunu píku či vzniku dalšího píku a zmenšení jiného. Typický záznam před a po fosforylační proceduře je na obr. 3.

K fosforylaci tedy nedošlo nebo daný separační systém není schopen oddělit fosforylovanou a nefosforylovanou formu AHP5–GFP nebo je fosforylovaný protein přítomen ve velmi malém množství a tedy pod limitem detekce. Také je možné, že fosforylace AHP5 není bez enzymatického aparátu či jiných složek rostlinného organismu



Obr. 2. Elektroforegram bakteriálního lyzátu vliv inhibitoru; koncentrace celkových proteinů $c = 2,2$ mg ml⁻¹, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3$ cm po dobu $t_{inj} = 50$ s, separační napětí 7 kV, separační elektrolyt: 50 mmol l⁻¹ Tris s 50 mmol l⁻¹ NaCl, pH 8,0

Tabulka I

Přehled migračních časů a výšek píků bakteriálního lyzátu

Pík	1	RSD %	2	RSD %	3	RSD %	4	RSD %	5	RSD %	6	RSD %
Čas, min	6,9	1,6	8,9	1,5	9,4	1,9	10,7	1,1	11,5	1,7	11,9	1,8
Výška	3	12	3	8	9	5	4	10	7	7	50	5

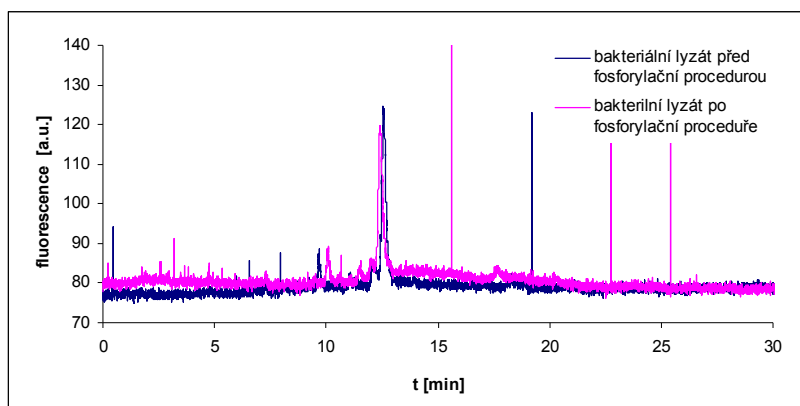
Tabulka II
Poměry proteinu a fosforylačních směsí

Protein [μg]	Fosforylační směs [μl]
22	10
22	19
13	14
13	20

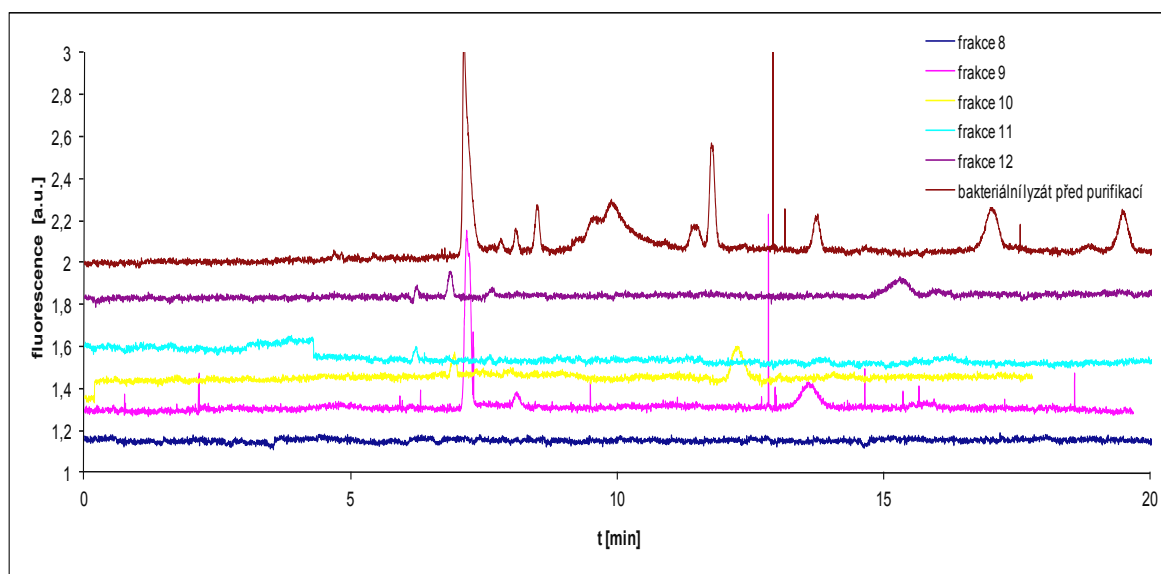
fungovat, popř. může být fosfát vychytán přednostně jinými proteiny, které jsou obsaženy v lyzátu.

Fraciacionace pomocí gelové permeační chromatografie – CE-LIF

Pro další práci byl připraven čerstvý bakteriální lyzát. Pro lepší orientaci v elektroforegramu bylo přistoupeno k částečnému přečištění vzorku gelovou permeační chromatografií podle velikosti částic. Bylo získáno několik



Obr. 3. Elektroforegram bakteriálního lyzátu – před a po fosforylační proceduře; koncentrace celkových proteinů $c = 2,2 \text{ mg ml}^{-1}$, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3 \text{ cm}$ po dobu $t_{\text{inj}} = 50 \text{ s}$, separační napětí 7 kV , separační elektrolyt: zvolen 50 mmol l^{-1} Tris s 50 mmol l^{-1} NaCl, pH 8,0

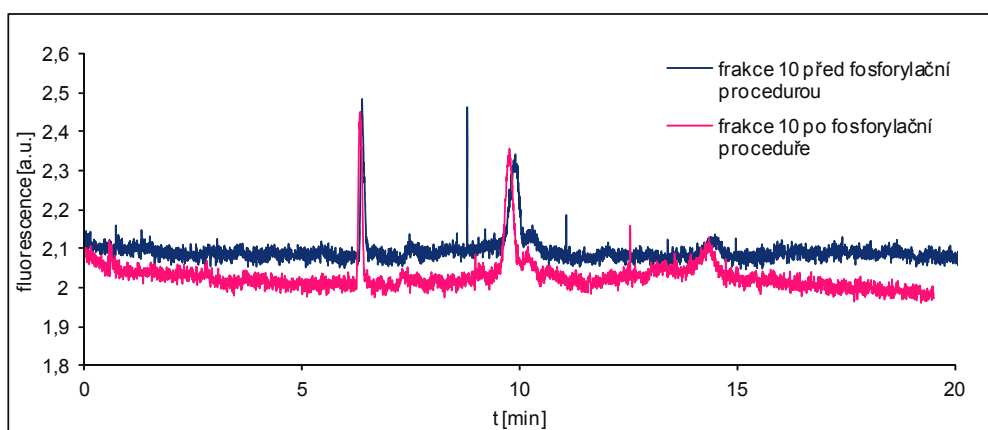


Obr. 4. Elektroforegram bakteriálního lyzátu a hmotnostních frakcí; koncentrace celkových proteinů ve směsi $c = 2,2 \text{ mg ml}^{-1}$, frakce 8: $c = 1,5 \text{ mg ml}^{-1}$, frakce 9: $c = 4,0 \text{ mg ml}^{-1}$, frakce 10: $c = 3,5 \text{ mg ml}^{-1}$, frakce 11: $c = 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, frakce 12: $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3 \text{ cm}$ po dobu $t_{\text{inj}} = 50 \text{ s}$, separační napětí 7 kV , separační elektrolyt: 50 mmol l^{-1} Tris s 50 mmol l^{-1} NaCl, pH 8,0

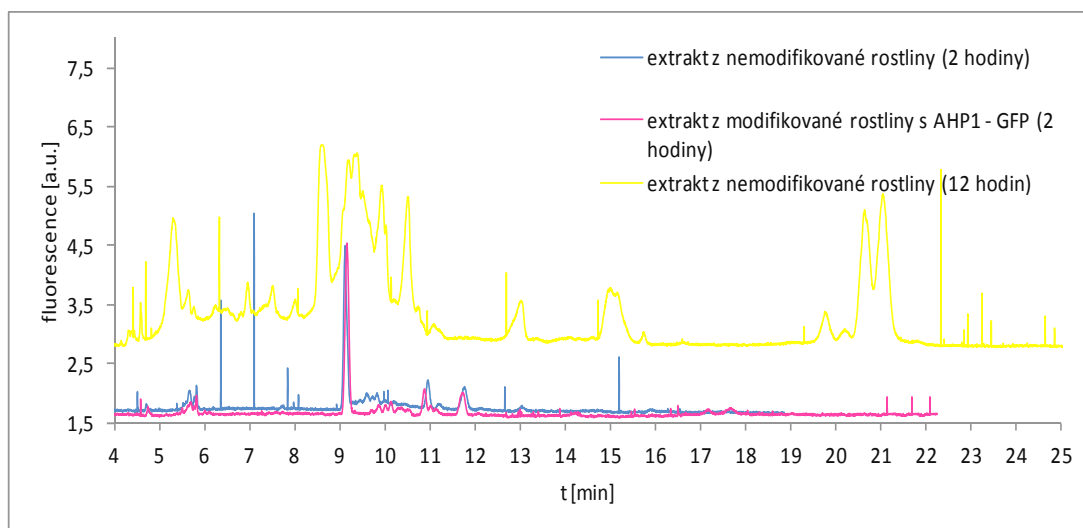
frakcí, přičemž v 5. frakci byly pomocí western blottingu detekovány fúzní proteiny AHP5–GFP, GFP nebo oba. Z obr. 4 je zřejmé, že některé frakce neposkytly viditelný signál, což může být způsobeno buď tím, že koncentrace dané látky je pod detekčním limitem přístroje a nebo během chromatografického dělení došlo k inaktivaci GFP, který tak ztratil fluorescenční vlastnosti.

Fosforylace vybrané frakce

K fosforylaci proteinové frakce byl využit stejný protokol jako u celkového bakteriálního lyzátu. Jako zdroj fosfátu zde byl využit kromě acetylfosfátu i fosforamid⁶. Opět ani v jednom případě nedošlo k očekávanému posunu píku či detekci nového píku a zmenšení jiného. S cílem zrychlení analýz a případného zvýšení separační účinnosti byly vyzkoušeny různé podmínky – velikost separačního napětí (7–8 kV), pH základního elektrolytu (pH v rozmezí 8–9). Typický záznam je zobrazen na obr. 5.



Obr. 5. **Elektroforegram bakteriální frakce před a po fosforylační proceduře**; koncentrace celkových proteinů ve frakci $c = 3,5 \text{ mg ml}^{-1}$, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3 \text{ cm}$ po dobu $t_{inj} = 50 \text{ s}$, separační napětí 8 kV, separační elektrolyt: 50 mmol l^{-1} Tris s 50 mmol l^{-1} NaCl, pH 9,0



Obr. 6. **Elektroforegram rostlinných extraktů** (trvání extrakce 2 hodiny); koncentrace celkových proteinů v extraktech $c = 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, hydrodynamické dávkování výšky $\Delta h = 3 \text{ cm}$ po dobu $t_{inj} = 5 \text{ s}$, separační napětí 8 kV, separační elektrolyt: 50 mmol l^{-1} Tris s 50 mmol l^{-1} NaCl, pH 9,0

Rostlinný materiál

Pro první seznámení se a rostlinným materiálem byla použita rostlina *A. thaliana* s fúzním proteinem AHP1–GFP. Byl vytvořen extrakt ze zelených částí rostlin. Bylo využito nemodifikované rostliny (Wild-Type), která neobsahuje žádný fúzovaný protein s GFP, ale slouží k zjištění výskytu přirozených fluoroforů absorbujících záření budícího zdroje o vlnové délce 405 nm v rostlině, jako jsou např. chlorofyly, FMN atd.^{7,8}, a modifikované rostliny obsahující i AHP1–GFP. Bylo zjištěno, že alespoň bez částečného přečištění nebude možné extrakt analyzovat, neboť přirozené fluorofory v rostlině jsou příliš dominantní (obr. 6). V elektroforegramech analyzovaných extraktů, které byly extrahovány 2 hodiny, je patrné menší vyloučení rostlinných fluoroforů, zatímco při extrakci 12 hodinové jsou vyloučena ve větším množství.

Při pokusu přečistit rostlinné extrakty od nízkomolekulárních fluoroforů metodou gelové permeační chromatografie bylo zjištěno, že skutečná hmotnost proteinu AHP1–GFP neodpovídá hmotnosti teoretické. Tento fakt naznačuje další možnou modifikaci těchto proteinů v rostlinách či interakci s nějakým partnerem, který by se mohl podílet na možné fosforylaci těchto proteinů.

Závěr

Byla prostudována fosforylace bakteriálních lyzátů a částečně přečištěné bakteriální frakce. Tyto experimenty nepotvrdily možnost neenzymatické fosforylace cílového proteinu, resp. celé rodiny AHP proteinů exprimovaných v bakterii *E.coli*.

Byly udělány první předběžné analýzy rostlinného materiálu, při kterých bylo zjištěno, že rostlinná barviva

neumožňují přímé stanovení fúzního proteinu z extraktu. Dále bylo zjištěno, že skutečná hmotnost AHP1–GFP neodpovídá hmotnosti teoretické.

V rámci dalšího výzkumu budou zkoumány další možné zdrojové materiály rostlinného původu (např. extrakty z kořene či rostlinných kultur *in vitro*), které by neobsahovaly dominantní množství rostlinných fluoroforů. Dále se bude zabývat problematikou rozdílné hmotnosti AHP1–GFP. A také budou porovnány LOD CE-LIF a western blottingu.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č.203/09/1025), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM0021622415) a v projektu "CEITEC - Středoevropský technologický institut" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu pro regionální rozvoj).

LITERATURA

1. Suzuki T., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno T.: *Plant Cell Physiol.* 39, 1258 (1998).
2. Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N.: *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183 (2000).
3. Stickamnn A., Meyer H. E.: *Proteomics* 1, 200 (2001).
4. Sheridan R. C., McCullough J. F., Wakefield Z. T.: *Inorg. Synth.* 13, 23 (1971).
5. Yoon S., Han K. Y., Nam H. S., Nga L. V., Yoo Y. S.: *J. Chromatogr., A* 1056, 237 (2004).
6. Lukat G. S., McCleary W. R., Stock A. M., Stock J. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 718 (1992).
7. http://www.photobiology.com/photobiology2000/VSitaps_abs_sp_resd.htm.
8. Buschmann C., Langsdorf G., Lichtenthaler H. K.: *Photosynthetica* 38, 483 (2000).

ZMĚNY POVRCHOVÉ STRUKTURY PASTOVÉ ELEKTRODY Z MIKROČÁSTIC SKELNÉHO UHLÍKU V METHANOLICKÉM ROZTOKU

JAN MIKA, JIŘÍ ZIMA, JIŘÍ BAREK
a HANA DEJMKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
mikaja@natur.cuni.cz

Úvod

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) jsou známé již více než 50 let¹. K jejich objevu došlo vlastně nezáměrně. Při snaze o vývoj nového materiálu na bázi uhlíku vhodného pro využití jako kapající elektroda v anodické oblasti potenciálového okna, byla připravena směs uhlíkového prášku a kapaliny, která nebyla kvůli své hustotě použitelná pro původně zamýšlený účel, ale měla spíše pastovitou konzistenci. Takto připravenou směsí bylo možné plnit tělo elektrody. Velkou předností tohoto uspořádání je snadné obnovování pasivovaného povrchu elektrody. Část pasty, která podlehla pasivaci, je možné jednoduše vytlačit z těla elektrody a otřít například pomocí filtračního papíru.

Snadná obnova povrchu elektrody však není jedinou předností CPE. Tyto elektrody se vyznačují širokým potenciálovým oknem, nízkým šumem pozadí a hlavně velice snadnou modifikovatelností past. Do pasty lze přidat další složku^{2,3} nebo použít jinou formu uhlíku, či odlišnou pastovací kapalinu. Výsledkem je široké spektrum různých druhů uhlíkových past s různými elektrochemickými vlastnostmi, a tedy i široká možnost aplikace připravených elektrod.

Na přípravu uhlíkové pasty bylo od jejího vzniku vyzkoušeno velké množství jednotlivých forem uhlíku, a to od jeho nejběžnější formy v podobě grafitového prášku, přes práškový diamant⁴ až po moderní nanostruktury, jako například fullereny⁵. Stejná rozmanitost platí i pro pastovací kapaliny. Nejběžněji používané minerální a silikonové oleje² lze nahradit například aromatickými uhlovdíky¹, anorganickými kyselinami⁶ nebo iontovými kapalinami⁷.

Naopak výrazným nedostatkem uhlíkových past je rozpustnost pastovacích kapalin s vhodnými elektrochemickými vlastnostmi v organických rozpouštědlech, například v methanolu, a ve směsných vodně-organických roztocích. Z těchto důvodů nelze uhlíkové pasty použít pro stanovení látek nerozpustných ve vodě. Obtížná je i aplikace v HPLC^{2, 8, 9}, kde jsou organická rozpouštědla běžnou součástí mobilní fáze.

Zvýšenou odolnost uhlíkové pasty přineslo nahrazení grafitu sférickými mikrokuličkami skelného uhlíku (GCPE). GCPE byly představeny v roce 2001 jako voltametrický senzor¹⁰. Jde o pastové elektrody, jejichž elektro-

chemické vlastnosti jsou blízké klasické elektrodě ze skelného uhlíku. Pro přípravu pasty byl použit minerální olej. Až posléze vyšlo najevo, že takto připravená pasta odolává i v prostředí s vysokou koncentrací organických rozpouštědel¹¹. Tento fakt dokládají již publikované práce, které dokumentují úspěšné použití GCPE v prostředích obsahujících acetonitril nebo methanol^{12–16}. Jak bylo již ale zmíněno, rozpouštění v methanolu podléhá pastovací kapalina, nikoliv uhlíková složka pasty. Důvody větší stability GCPE v organických rozpouštědlech nejsou v současné době zcela zřejmé. Tato práce se snaží tyto důvody odhalit, popsat a pozorováním CPE v různě koncentrovaných roztocích methanolu určit hlavní faktory přispívající k zvýšení stability pasty.

Experimentální část

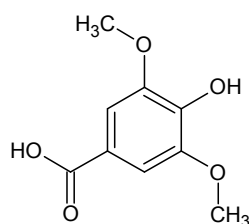
Pro mikroskopickou studii povrchu byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Německo).

Voltametrická měření byla provedena pomocí Eco-Tribo-Polarografu (PolaroSensors, Praha, Česká republika) s tří-elektrodovým zapojením, skládajícím se z pomocné platinové elektrody a z referentní argentochloridové elektrody (3 M KCl), ke které jsou vztaženy hodnoty potenciálů. Pracovní uhlíková elektroda ze skelného uhlíku (GCPE) byla připravena z 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (velikost částic 10–20 μm , Alfa Aesar, Německo) a ze 100 μl minerálního oleje (Fluka, Švýcarsko). Takto připravená pasta byla naplněna do teflonového těla s ocelovým pístem¹⁷. Vnitřní průměr teflonového těla je 3 mm. Obnova povrchu byla prováděna pomocí filtračního papíru navlhčeného vodou. DC voltamogramy byly měřeny při rychlosti skenu 100 mV s⁻¹.

Měrný systém pro FIA se skládal z pumpy HPP 5001 a z amperometrického detektoru ADLC 2 (oba Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), doplněných spektrometrickým detektorem Sapphire (ECOM, Česká republika). Amperometrický detektor se skládal ze stejné sestavy elektrod jako v případě DC voltametrie. Pracovní elektroda byla umístěna v uspořádání „wall-jet“ v kontrolované vzdálenosti proti výstupní kapiláře¹⁶.

Syringová kyselina (obr. 1) ($c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) byla vybrána jako modelová látka pro svou strukturu, jenž zaručuje snadnou elektrochemickou oxidaci a vzhledem ke snadné rozpustnosti ve vodě i v methanolu. Jako základní elektrolyt a nosný roztok byl použit Brittonův-Robinsonův (B-R) pufr o pH 3 (cit.¹⁸).

Při pozorování změn chování GCPE v důsledku působení roztoku methanolu byla tato elektroda nejprve vystavena toku tohoto roztoku a teprve následně přesunuta do roztoku vzorku. V proudu methanolu byla elektroda zapo-



Obr. 1. Chemická struktura syringové kyseliny

jena do uspořádání simulujícího wall-jet. Pro porovnání posloužila elektroda s čerstvě obnoveným povrchem nevystaveným proudem methanolu.

Není-li uvedeno jinak, byla všechna měření opakována třikrát.

Výsledky a diskuse

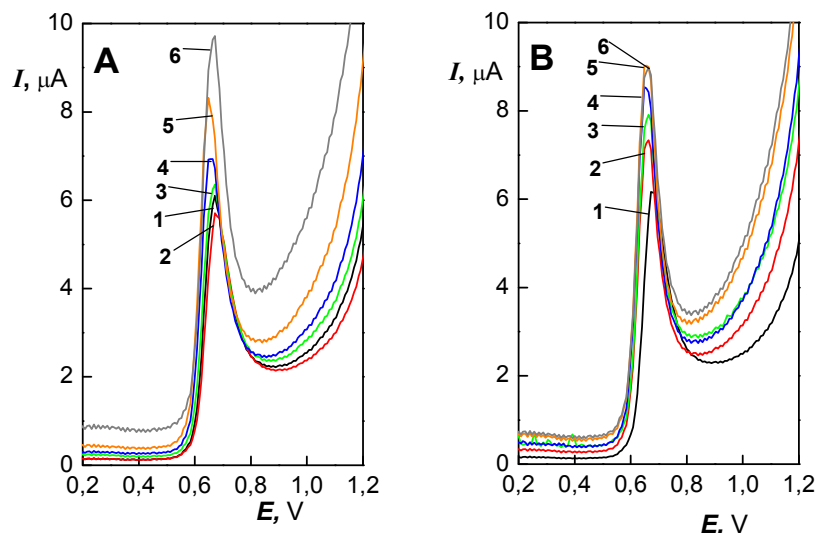
Voltametrické chování

Vystavení uhlíkové pastové elektrody působení roztoku methanolu má za následek změny v průběhu voltamogramu. Není přitom důležité, jestli je elektroda vystavena toku nebo zdali je pouze umístěna v míchaném roztoku, v obou těchto případech dochází k identickým změnám: potenciál píku se posouvá k méně pozitivním hodnotám a narůstá výška píku. Změny ve tvaru píků jsou doprová-

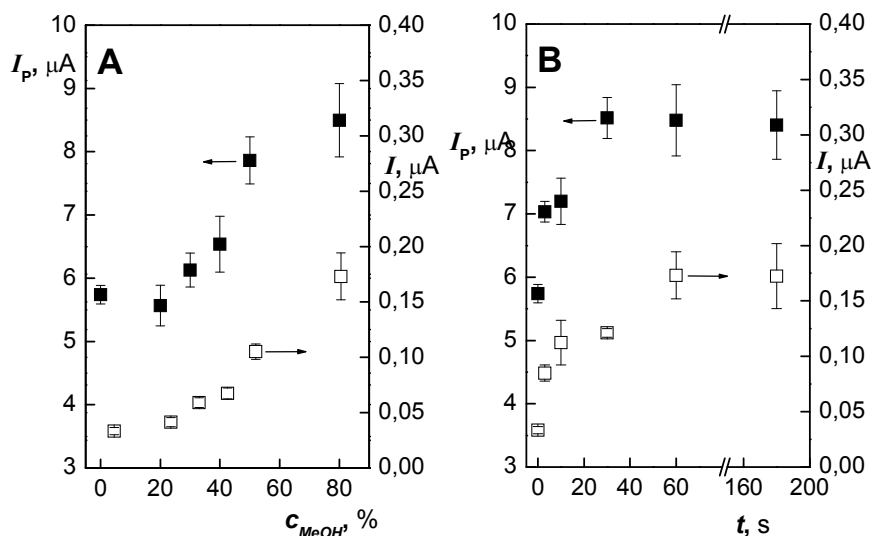
zeny nárůstem pozadí a šumu měření (obr. 2). Tyto změny lze odůvodnit pomocí dvou teorií. Většina uhlíkových částic v pastě je pokryta inertní pastovací kapalinou. Do kontaktu s analytem přijde tedy jen nezakrytá plocha uhlíkové mikrokuličky. Methanol by mohl pastovací kapalinu vymývat, což by vedlo k obnažení větší plochy uhlíku, a tedy ke zvětšení aktivní plochy elektrody¹⁹. Druhá teorie předpokládá zhrubnutí povrchu vlivem působení methanolu²⁰. Rozlišit vliv těchto dvou faktorů pomocí voltametrie bohužel není možné, protože trend změn je v obou případech stejný a složitá struktura povrchu uhlíkové pasty znemožňuje přesný teoretický popis povrchu.

I přes tento nedostatek je DC voltametrie vhodnou metodou pro studium postupu dějů spojených se změnami na povrchu uhlíkové pasty. Z tohoto hlediska byly studovány dva faktory. Prozkoumán byl vliv koncentrace roztoku methanolu na změny povrchu elektrody, jejichž projevem jsou výše popsané změny v DC voltamogramech. Druhá prostudovaná oblast se zaměřuje na změnu povrchu uhlíkové pasty v závislosti na době působení roztoku methanolu na elektrodu. Získané výsledky výšek píku a šumu pozadí jsou uvedeny na obr. 3.

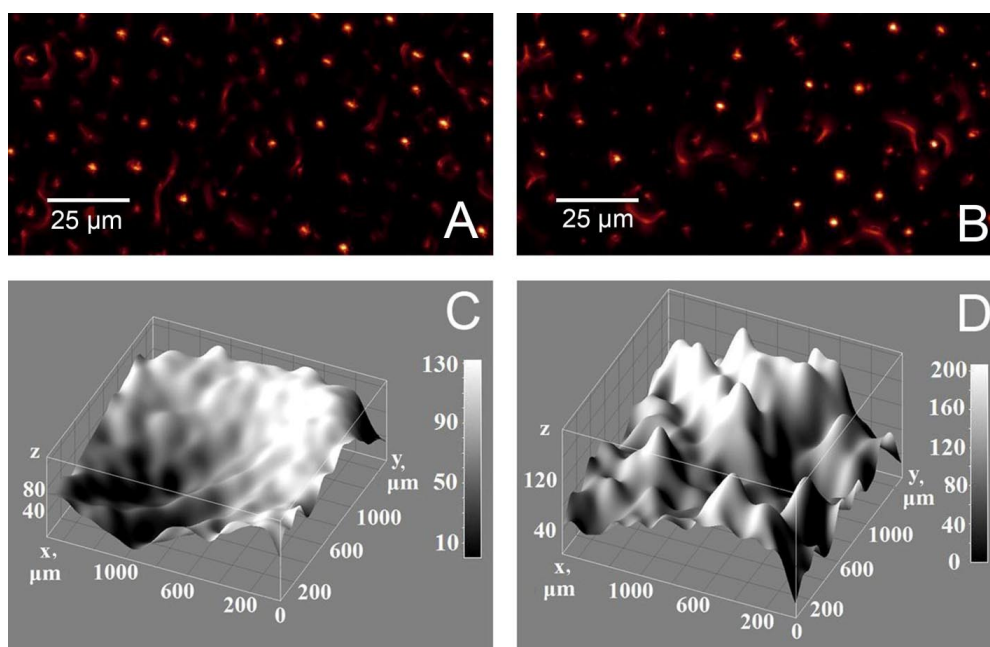
Z výsledků měření vyplývá, že roztoky methanolu s koncentrací nižší než 50 % neovlivňují signál elektrody. Nízké koncentrace methanolu jsou zřejmě nedostačující k rozpuštění pastovací kapaliny a nedochází tedy ani k významným změnám na povrchu uhlíkové pasty. Tento závěr potvrzují publikace zabývající se prací s uhlíkovými pastovými elektrodami připravenými z grafitového prášku v roztocích s nízkou koncentrací methanolu nejen ve vsádkových²¹, ale i v průtokových systémech²². Z časové závis-



Obr. 2. DC voltamogramy syringové kyseliny ($c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$); měřeno v B-R pufru při pH 3 na GCPE po vystavení elektrody toku roztoku methanolu (A) obsahujícím 0 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4), 50 (5), 80 (6) % MeOH po dobu 60 s; (B) po 0 (1), 3 (2), 10 (3), 30 (4), 60 (5), 180 (6) s v 80% MeOH



Obr. 3. Závislost výšky anodického DCV píku syringové kyseliny ($c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) (plné symboly) a absolutní hodnoty pozadí (prázdní symboly) na koncentraci roztoku methanolu působícího na povrch elektrody v průtokovém uspořádání po dobu 60 s (A) a na době expozice 80% roztoku methanolu na povrch elektrody v průtoku v závislosti na době expozice (B); měřeno v B-R pufru o pH 3 na GCPE. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro pět po sobě jdoucích měření



Obr. 4. Mikrosnímek (A, B) a stereometrická projekce (C, D) povrchu uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku; čerstvě obnovený povrch (A, C) a povrch vystavený působení roztoku 80% methanolu po dobu 60 sekund (B, D)

losti je patrné, že změny povrchu elektrody jsou rychlé, a že dochází k rychlému ustálení rovnovážného stavu a to již po 30 sekundách. Rychlé ustálení povrchu se dá předpokládat i v průtokových metodách.

Mikroskopická studie

Pro pozorování povrchu elektrody a jeho změn byl použit konfokální mikroskop. Byl pořízen snímek elektrody s čerstvě obnoveným povrchem. Následně byla elektroda vystavena po dobu 60 s působení 80% roztoku methanolu a opět byl pořízen snímek jejího povrchu. Na obr. 4 jsou znázorněny mikrosnímky a stereometrické projekce pro oba snímané povrchy.

Snímky nepotvrzují původní teorii o změně pokrytí mikrokuliček skelného uhlíku pastovací kapalinou. Odhalená část mikrokuliček na obou snímcích se výrazně nemění a v obou případech je její průměr zhruba 5 μm . Stereometrická projekce však ukazuje, že oba zkoumané povrchy se výrazně liší; působením methanolu se povrch elektrody stal hrubším a členitějším. Tyto změny povrchu mohou být způsobené odnosem části uhlíkového materiálu.

Detekce v průtokových metodách

Pro zkoumání změn odezvy elektrody v průtokovém uspořádání byla použita metoda průtokové injekční analýzy (FIA). Naměřeny byly záznamy pěti následujících nástříků na elektrodě s čerstvě obnoveným povrchem a na elektrodě, na kterou působil roztok methanolu o koncentraci 20 % a 80 %. Elektroda byla pro obě koncentrace

methanolu vystavena jeho toku po dobu 60 s. Na obr. 5 je znázorněn typický záznam, jehož součástí je i stabilizace proudového pozadí po vložení potenciálu. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v tab. I.

Výsledky získané metodou FIA jsou v dobré shodě s voltametrickým měřením. Výška píku i posun pozadí je obdobný pro obě metody.

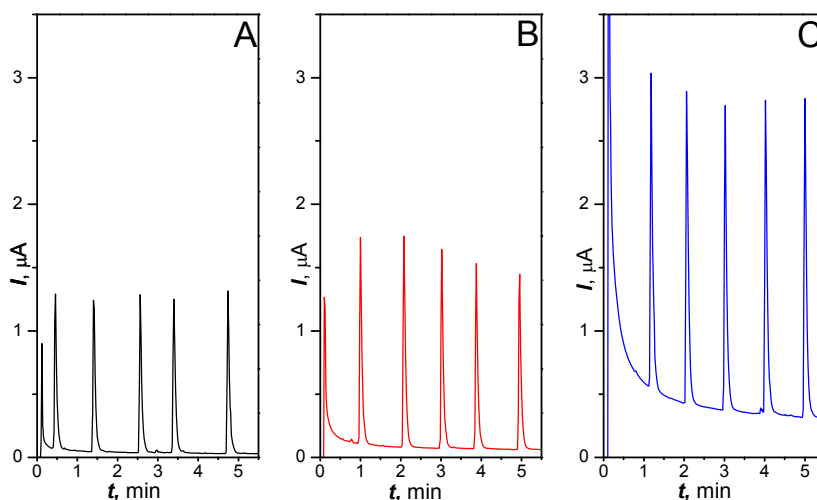
Měření hustoty

Fakt, že methanol rozpouští pastovací kapalinu, je neoddiskutovatelný. Na povrchu elektrody tedy zřejmě dochází k ustalování dynamické rovnováhy: pastovací kapalina se rozpouští a je kontinuálně vymývána z povrchu elektrody. Tím se s časem může měnit celkové složení uhlíkové pasty. Obě její složky se od sebe výrazně

Tabulka I

Statisticky zpracované výsledky výšky píků a proudového pozadí pro pět následujících nástříků syringové kyseliny ($c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$); měřeno na GCPE vystavené toku různě koncentrovaného roztoku methanolu

	Výška píku [μA]	Proudové pozadí [nA]
Čerstvě obnovený povrch	$1,31 \pm 0,11$	36 ± 11
20% methanol	$1,58 \pm 0,14$	80 ± 20
80% methanol	$2,46 \pm 0,21$	297 ± 65



Obr. 5. FIA záznamy získané na obnoveném povrchu elektrody (A), po působení 20% MeOH v průtoku po 60 s (B) a 80% MeOH po 60 s (C); Pětkrát nadávkována syringová kyselina ($c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) v B-R pufru o pH 3, měřeno na GCPE, $E_{\text{DET}} = +0,8 \text{ V}$

Tabulka II

Změna hustoty uhlíkové pasty po dlouhodobé expozici v míchaném roztoku 80% methanolu

Čas [h]	Hustota [g cm ⁻³]
0	1,148 ± 0,013
7	1,166 ± 0,012
14	1,179 ± 0,057

liší hustotou. Pokud se tedy mění složení pasty ve prospěch uhlíkové komponenty, měla by tato změna být doprovázena i nárůstem hustoty pasty. K prokázání tohoto předpokladu byla elektroda vystavena několikahodinovému působení míchaného roztoku 80 % methanolu. Hustota pasty se během tohoto experimentu opravdu navyšovala, čímž byl předpoklad ustálení dynamické rovnováhy úspěšně potvrzen. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedené v tab. II.

Závěr

GCPE jsou stabilní ve vodných roztocích methanolu, což bylo již dříve prokázáno^{11,16}. Interakce s roztokem methanolu o koncentraci nižší než 50 % nezpůsobuje významné změny v odezvě uhlíkových pastových elektrod. Nižší koncentrace roztoku methanolu tedy zřejmě není dostačující k rozpouštění pastovací kapaliny. Při vyšších koncentracích dochází k rychlému ustálení stabilního stavu, při voltametrických měřeních vykazuje elektroda stabilní odezvu již po 30 sekundách. Charakter změn signálu elektrody je dán rozdílnou výškou píku a nárůstem pozadí. Toto chování je společné pro voltametrické měření i pro měření v průtoku. V případě voltametrického měření dochází ještě k posunu potenciálu píku k méně pozitivním hodnotám. Mikroskopická studie povrchu elektrody odhalila, že změna chování elektrody je způsobena hrubnutím jejího povrchu. Předpoklad, že dochází díky vymývání pastovací kapaliny k odhalování větší části plochy uhlíkových částic, se prokázat nepodařilo. Stabilita uhlíkové pasty z mikrokuliček skelného uhlíku je tedy zřejmě dána mechanickým uspořádáním sférických mikročástic. Toto uspořádání odolává i ve chvíli, kdy slábnou podpora poskytovaná pastovací kapalinou. Grafit, jehož částice jsou vločkovité, je v těchto případech zranitelnější. Měření hustoty však prokázalo, že i GCPE s časem mění své složení, na jejím povrchu se zřejmě vytváří dynamická rovnováha, kde i při stabilnějším uspořádání mikročástic skelného uhlíku dochází k rozpouštění pastovací kapaliny. Stabilita signálu elektrody nicméně ukazuje, že elektroda je proti takto mírným změnám složení dostatečně robustní.

Za pořízení mikroskopických snímků povrchu pastové elektrody děkujeme Ondřeji Šebestovi, z Laboratoře konfokální a fluorescenční mikroskopie, Univerzita Karlova

v Praze. Tato práce byla finančně podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. MSM 0021620857), Karlovou Univerzitou v Praze (projekty č. SVV 2012-263204 a UNCE 2012/44), Grantovou agenturou ČR (projekt č. P206/12/G151) a Technologickou agenturou ČR (projekt č. TA01020565).

LITERATURA

- Adams R. N.: *Anal. Chem.* 30, 1576 (1958).
- 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).
- Stefan R. I., Bairu S. G.: *Talanta* 63, 605 (2004).
- Rivas G. A., Rubianes M. D., Pedano M. L., Ferreyra N. F., Luque G. L., Rodriguez M. C., Misorcia S. A.: *Electroanalysis* 19, 823 (2007).
- Ramirez, M. T., Palomar, M. E., Gonzalez, I., Rojashernandez, A.: *Electroanalysis* 7, 184 (1995).
- Liu H. T., He P., Li Z. Y., Sun C. Y., Shi L. H., Liu Y., Zhu G. Y., Li J. H.: *Electrochem. Comm.* 7, 1357 (2005).
- Kalcher K., Kauffmann J. M., Wang J., Svancara I., Vytras K., Neuhold C., Yang Z.: *Electroanalysis* 7, 5 (1995).
- Svancara I., Vytras K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J.: *Electroanalysis* 21, 7 (2009).
- Wang J., Kirgoz U. A., Mo J.-W., Lu J., Kawde A. N., Muck, A.: *Electrochem. Commun.* 3, 203 (2001).
- Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: *Sensors* 4, 47 (2004).
- Jemelkova Z., Zima J., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 150 (2009).
- Nemcova L., Zima J., Barek J., Janovska D.: *Food Chem.* 126, 374 (2011).
- Stevic M. C., Ignjatovic L. M., Ciric-Marjanovic G., Stanisic S. M., Stankovic D. M., Zima J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 6, 2509 (2011).
- Zima J., Cienciala M., Barek J., Moreira J. C.: *Chem. Anal.* 52, 1049 (2007).
- Zima J., Dejmekova H., Barek J.: *Electroanalysis* 19, 185 (2007).
- Svancara I., Baldrianova L., Vlcek M., Metelka R., Vytras K.: *Electroanalysis* 17, 120 (2005).
- Mattusch J., Baran H., Schwedt G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 426 (1991).
- Gueshi T., Tokuda K., Matsuda H.: *J. Electroanal. Chem.* 101, 29 (1979).
- Menshikau D., Streeter I., Compton R. G.: *J. Physic. Chem. C* 112, 14428 (2008).
- Svancara I., Vytras K., Renger F., Smyth M. R.: *Electrochim. Acta* 37, 1355 (1992).
- Danielson N. D., Wangsa J., Targove M. A.: *Anal. Chem.* 61, 2585 (1989).

HPLC ŠTÚDIUM ENANTIOSEPARÁCIE POTENCIÁLNYCH LIEČIV POUŽITÍM MAKROCYKLICKÝCH CHIRÁLNYCH STACIONÁRNYCH FÁZ

JAKUB MORAVČÍK
a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

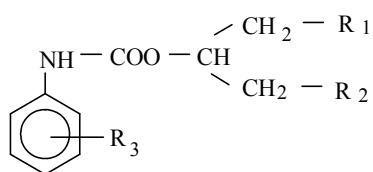
Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
moravcikjakub@gmail.com

Úvod

Lieky sú významnou súčasťou nášho života. Organizmus človeka pozostáva z rôznych chirálnych zlúčenín,

a preto je schopný rozpoznávať optické izoméry jednotlivých liečiv. Enantioméry týchto látok sa vyznačujú tým, že majú rozdielny farmakologický účinok. Z tohto dôvodu je separácia chirálnych terapeutík nevyhnutným procesom vo farmaceutickom priemysle. V súčasnosti sa enantioseparácie realizujú mnohými metódami, najmä elektromigračnými a chromatografickými. V prípade chirálnej chromatografie sa využíva početná skupina chirálnych selektorov. Podľa typu selektora rozlišujeme niekoľko skupín chirálnych stacionárnych fáz (CSF). Sú to crown-étery, CSF na báze proteínov, CSF s výmenou ligandu, cyklo-dextríny, deriváty amylózy a celulózy, makrocyklické antibiotiká a Pirklove stacionárne fázy. Novým typom

Tabuľka I
Prehľad študovaných derivátov fenylnkarbámovej kyseliny



Označenie látky ^a	R ₁	R ₂	R ₃
1		- OCH ₃	2 - OC ₄ H ₉
2		- OC ₃ H ₇	2 - OC ₄ H ₉
3		- OC ₂ H ₅	3 - OC ₄ H ₉
4		- OC ₃ H ₇	3 - OC ₄ H ₉
5		- OCH ₃	3 - OC ₆ H ₁₃
6		- OCH ₃	2 - OC ₄ H ₉
7		- OC ₂ H ₅	2 - OC ₄ H ₉
8		- OC ₃ H ₇	2 - OC ₄ H ₉
9		- OCH ₃	3 - OC ₄ H ₉
10		- OC ₂ H ₅	3 - OC ₄ H ₉
11		- OC ₃ H ₇	3 - OC ₄ H ₉
12		- OCH ₃	2 - OC ₅ H ₁₁
13		- OCH ₃	3 - OC ₇ H ₁₃

^a Látky 6, 9 a 12 sú vo forme hydrochloridov. Ostatné deriváty fenylnkarbámovej kyseliny uvedené v tejto tabuľke sú vo forme šřavelanov³⁻⁵

chirálného selektora pre HPLC stacionárne fázy sú cyclofruktány (CF), ktoré patria do skupiny makrocyclických oligosacharidov. Ich molekulovú štruktúru tvorí šesť až osem D-fruktofuránózových jednotiek navzájom pospájaných β -(2 \rightarrow 1) glykozidovou väzbou. Podľa počtu monosacharidových jednotiek v makrocyclickom kruhu sa cyclofruktány označujú skratkami CF6, CF7, CF8, atď. Každá z týchto jednotiek obsahuje štyri stereogénne centrá a jednu primárnu hydroxylovú skupinu, resp. dve sekundárne hydroxylové skupiny. Ich prítomnosť je príčinou hydrofilného charakteru molekúl CF^{1,2}.

Práca sa zaoberá možnosťami separácie enantiomérov potenciálnych liečiv s lokálno-anestetickými účinkami – esterov alkoxyfenylnkarbamových kyselín. Na štúdium enantioseparácií sa použila metóda HPLC s rôznymi druhmi makrocyclických CSF. Okrem chirálnych selektorov na báze cyklodextrínu a teikoplanínu sa testovala cyclofruktánová CSF, ktorá je v oblasti chirálnych separácií predmetom intenzívneho výskumu.

Experimentálna časť

Chemikálie

Cieľovou skupinou zlúčenín pre chirálne separácie boli deriváty fenylnkarbamovej kyseliny. Analyzované látky (1-metoxymetyl, 1-etoxyetyl, 1-propoxymetyl-2-(1-pyrolidino), (1-piperidino), (1-perhydroazepino)-etyl-estery alkoxyfenylnkarbamovej kyseliny) boli syntetizované na Katedre farmaceutickej chémie FaF UK v Bratislave^{3–5}. V tab. I je uvedený ich prehľad spolu s chemickou štruktúrou. Roztoky racemických zmesí študovaných látok boli rozpustené v metanole (koncentrácia 1 mg cm⁻³).

Pri príprave mobilných fáz sa použili nasledujúce chemikálie: acetonitril (pre gradientovú elúciu HPLC, Merck, Nemecko), metanol (pre gradientovú elúciu HPLC, J. T. Baker, Rakúsko), etanol (pre UV spektroskopiu, MikroChem, SR), izopropanol (pre gradientovú elúciu HPLC, Fisher Scientific, ČR), heptán (pre analýzu, Loba Feinchemie, Rakúsko), hexán (pre gradientovú elúciu HPLC, Merck, Nemecko), octan sodný (pre analýzu, Lachema, ČR), octová kyselina (100%, Merck, Nemecko), trifluoroctová kyselina (pre analýzu, Merck, Nemecko), trietylamín (pre syntézu, Merck, Nemecko).

Prístroje a zariadenia

Experimentálna časť práce bola realizovaná kvapalinovým chromatografom, ktorý pozostával z vysokotlakového čerpadla CHROM SDS 15S, dávkovacieho ventilu RHEODYNE (objem dávkovacej slučky 20 μ l), spektrofotometrického detektora KNAUER VARIABLE WAVELENGTH MONITOR (chromatogramy boli zaznamenané pri vlnovej dĺžke maxima absorpčného pásu λ_{\max} =240 nm). Na vyhodnocovanie chromatogramov sa použila chromatografická datastanica CSW 32. Na separáciu boli použité chromatografické kolóny SEPARON SGX C18 (125 mm

\times 4 mm, 7 μ m) (Tessek, ČR) pre nechirálnu separáciu, CF6-DCP (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) (Azyp, USA, chirálny selektor dichlorofenylnkarbamát CF6), CF7-DMP (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) (Azyp, USA, chirálny selektor dimetylfenylnkarbamát CF7), CHIROBIOTIC T (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) (Astec, USA, chirálny selektor teikoplanín), ChiraDex (250 mm \times 4 mm I.D., 5 μ m) (Merck, Nemecko, chirálny selektor β -cyclodextrín) pre chirálne separácie.

Príprava mobilných fáz

Pre nechirálnu separáciu na chromatografickej kolóne SEPARON SGX C18 bola použitá ako mobilná fáza zmes metanol/octan sodný ($c = 8,29 \cdot 10^{-2}$ mol dm⁻³) (90/10, V/V).

Pre chirálne separácie na chromatografickej kolóne ChiraDex bola použitá ako mobilná fáza zmes metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (20/80/0,3/0,2, V/V/V).

Pre chirálne separácie na chromatografickej kolóne CF7-DMP boli použité mobilné fázy: metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (20/80/0,3/0,2, V/V/V/V), hexán/izopropanol/trifluoroctová kyselina (50/50/0,1, V/V/V), heptán/etanol/trifluoroctová kyselina (50/50/0,1, V/V/V).

Pre chirálne separácie na chromatografickej kolóne CF6-DCP boli použité mobilné fázy: heptán/etanol (80/20, V/V), hexán/izopropanol (70/30, V/V).

Pre chirálne separácie na chromatografickej kolóne CHIROBIOTIC T bola použitá ako mobilná fáza zmes metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (45/55/0,3/0,2, V/V/V/V).

Pred použitím boli mobilné fázy odvdzdušené pomocou ultrazvuku. Prietok mobilnej fázy bol 0,8 cm³ min⁻¹ pre chirálne stacionárne fázy a 0,5 cm³ min⁻¹ pre nechirálnu stacionárnu fázu. Teplota kolóny bola 22 °C.

Výsledky a diskusia

Výber látok

Estery alkoxyfenylnkarbamových kyselín patria medzi lokálne anestetiká (LA). Mechanizmus účinku týchto liečiv spočíva v dočasnej alebo úplnej blokade šírenia nervového vzruchu v senzitivných nervoch. Lokálne znecitlivnenie sa využíva najmä pri menej závažných chirurgických a stomatologických zákrokoch⁶. V molekulách týchto látok sú prítomné tri hlavné časti, a to hydrofilná a lipofilná časť, ktoré sú navzájom prepojené spojovacím reťazcom. Lipofilnú časť predstavuje benzénový kruh, ktorý môže byť v závislosti od typu LA rôzne substituovaný (napríklad aminoskupinou v *p*-polohe v prípade LA esterového typu). Hydrofilnou časťou je sekundárna, resp. terciárna aminoskupina alebo dusíkatý nenasýtený heterocyclus. Spojovací reťazec medzi týmito dvomi časťami je zvyčajne dvojhlíkatý a obsahuje amidovú, éterovú, esterovú alebo ketonickú skupinu⁶. Na štúdium enantioseparácie pomocou makrocyclických CSF sa vybrala skupina alkoxyderivátov kyseliny fenylnkarbamovej, ktorých che-

mické štruktúry sú uvedené v tab. I. Zvolená skupina derivátov obsahuje vo svojej molekule asymetrický atóm uhlíka. Hydrofilná časť molekuly obsahuje dusikátý heterocyklus (-pyrolidíno, -piperidíno, -perhydroazepíno skupina). Lipofilnú časť molekuly študovaných látok tvorí benzénový kruh substituovaný alkoxykupinou (C_4-C_7) v polohe *o*- a *m*-. Spojovací reťazec je modifikovaný alkylou skupinou C_1-C_3 . Tieto štruktúrne zmeny v molekulách vybranej skupiny látok dovoľia študovať vplyv štruktúry analytu na retenciu a separáciu enantiomérov.

Výsledky enantioseparácie jednotlivých látok nezávisia iba od druhu použitej chromatografickej kolóny, ale sú ovplyvnené aj zložením mobilnej fázy. Taktiež sa skúmal vplyv štruktúry analytov na retenciu a separáciu optických izomérov. Delenie enantiomérov pomocou rôznych chirálnych selektorov sa vyhodnotilo základnými chromatografickými parametrami, a to retenčným a rozlišovacím faktorom.

Nechirálna separácia derivátov fenylnkarbámovej kyseliny

Separácia vybranej skupiny esterov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny sa najprv uskutočnila použitím nechirálnnej stacionárnej fázy typu C18 (SEPARON SGX C18) v systéme s obrátenými fázami (ako mobilná fáza sa použila

Tabuľka II

Elučné časy (t_R) a retenčné faktory (k) vybraných esterov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny použitím C18 stacionárnej fázy.

Chromatografické podmienky: stacionárna fáza: SEPARON SGX C18, mobilná fáza: metanol/octan sodný ($c = 8,29 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (90/10, *V/V*), detekcia: UV, 240 nm, prietok: $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, dávkovaný objem: 20 μl , teplota kolóny: 22 °C

Látka	t_R (min)	k
1	9,64	2,84
2	9,76	2,89
3	16,46	5,56
4	10,59	3,22
5	16,65	5,63
6	8,09	2,22
7	7,91	2,15
8	8,56	2,41
9	8,39	2,34
10	8,09	2,22
11	8,80	2,51
12	10,78	3,29
13	9,34	2,72

$$t_M = 2,51 \text{ min, RSD} \leq 3\% (n=3)$$

zmes metanolu a vodného roztoku octanu sodného ($c = 8,29 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) v pomere 90:10 (*V/V*)). Namerané elučné časy jednotlivých analytov a vypočítané hodnoty retenčných faktorov sú uvedené v tab. II. Výsledky separácie analytov na nechirálnnej stacionárnej fáze potvrdzujú vplyv štruktúry látok na hodnoty retenčného faktora. Pri predĺžovaní alkylu v spojovacom reťazci nebol pozorovaný výrazný vplyv na hodnoty retenčného faktora. Zmena polohy alkoxy reťazca z *o*- do *m*- v lipofilnej časti molekuly (R_3) spôsobovala zvyšovanie hodnôt retenčného faktora. Zväčšovanie počtu uhlíkov v heterocykle spôsobovalo zvyšovanie hodnôt retenčného faktora.

Chirálna separácia derivátov fenylnkarbámovej kyseliny

β -cyklodextrínová chirálna stacionárna fáza

V predošlých štúdiách⁷ boli enantioméry alkoxy-substituovaných derivátov fenylnkarbámovej kyseliny separované použitím β -cyklodextrínovej CSF v systéme s obrátenými fázami. Mobilnou fázou bola zmes acetonitril/octan sodný ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 5,2) (88/12, *V/V*). Cieľom štúdie bolo prešetriť vplyv štruktúry látok na selektivitu a rozlíšenie enantiomérov esterov 2-alkoxyfenylkarbámovej kyseliny. Sledoval sa aj vplyv teploty na chirálne separácie týchto látok. Zistilo sa, že β -cyklodextrínový chirálny selektor bol v systéme s obrátenými fázami vhodný na enantioseparácie 2-alkoxy-substituovaných derivátov fenylnkarbámovej kyseliny, avšak 3-alkoxy-substituované deriváty sa použitím tejto CSF neseperovali. Predpokladá sa, že pri derivátoch s 3-alkoxy-substitúciou sa alkoxy-substituent nachádza vo väčšej vzdialenosti od stereogénneho centra ako pri 2-alkoxy-substituovaných derivátoch, a preto nemá výrazný vplyv na interakcie s CSF. Z výsledkov vyplynulo, že na rozlíšenie enantiomérov má výrazný vplyv dĺžka alkoxy-substituenta a jeho poloha vzhľadom k chirálnemu centru. Typ dusíkového substituenta v hydrofilnej časti molekuly ako aj dĺžka spojovacieho reťazca nemajú výrazný vplyv na enantioseparáciu. Z výsledkov termodynamickej štúdie vyplýva, že enantioselektivita sa zlepšuje so znižovaním teploty, a preto je vhodné tieto látky separovať pri teplotách nižších ako je laboratórna teplota⁷.

Cieľom predloženej práce bolo prešetriť možnosti separácie vybraných látok na β -cyklodextrínovej CSF v polárno-organickom móde. Mobilnou fázou bola zmes metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamin (20/80/0,3/0,2, *V/V/V/V*). Výsledky separácie sú zhrnuté v tab. III. Z tabuľky vyplýva, že β -cyklodextrínová CSF s použitím testovanej mobilnej fázy nie je vhodná na separáciu študovaných enantiomérov. Enantiomérne formy študovaných látok sa v použitej mobilnej fáze neseperovali. Pri uvedených chromatografických podmienkach dochádzalo iba k čiastočnej separácii analytov ($R_{ij} \leq 0,5$). Retenčné faktory látok boli z intervalu 0,20–0,56.

Tabuľka III

Elučné časy (t_R), retenčné faktory (k) a hodnoty rozlíšenia ($R_{1,2}$) študovaných esterov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny použitím makrocyclických CSF

Látka	Chiradex ¹				CF7-DMP ²		Chirobotic T ³		
	t_R [min]	k	t_R [min]	k	t_{R1} [min]	t_{R2} [min]	k_1	k_2	$R_{1,2}$
1	4,20	0,30	8,67	1,68	11,96	–	2,19	–	–
2	3,94	0,22	8,77	1,71	9,26	–	1,47	–	–
3	4,61	0,42	11,11	2,43	11,08	11,84	1,95	2,16	1,57
4	4,83	0,49	11,52	2,56	10,56	11,24	1,82	2,00	1,47
5	4,86	0,50	9,17	1,83	11,24	12,26	2,00	3,27	1,98
6	3,76	0,16	6,52	1,01	–	–	–	–	–
7	3,73	0,15	8,56	1,64	8,33	–	1,22	–	–
8	3,63	0,12	8,54	1,64	7,13	–	0,90	–	–
9	4,46	0,38	9,90	2,06	9,54	10,10	1,54	1,69	1,10
10	4,29	0,32	9,03	1,79	9,21	9,57	1,46	1,55	1,00
11	4,22	0,30	11,22	2,46	–	–	–	–	–
12	4,75	0,47	15,96	3,93	10,71	–	1,86	–	–
13	5,04	0,56	7,33	1,26	9,70	10,39	1,59	1,77	1,63

¹ chirálny selektor: β -cykloextrín, mobilná fáza: metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (20/80/0,3/0,2, V/V/V/V), detekcia: UV, 240 nm, prietok: 0,8 cm³ min⁻¹, dávkovaný objem: 20 μ l, teplota kolóny: 22 °C, $t_M = 3,24$ min, RSD $\leq 3\%$ ($n=3$)

² chirálny selektor: dimetylfenylkarbamát CF7, mobilná fáza: I metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (20/80/0,3/0,2, V/V/V/V), , detekcia: UV, 240 nm, prietok: 0,8 cm³ min⁻¹, dávkovaný objem: 20 μ l, teplota kolóny: 22 °C, $t_M = 3,90$ min, RSD $\leq 3\%$ ($n=3$)

³ chirálny selektor: teikoplanín, mobilná fáza: metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (45/55/0,3/0,2, V/V/V/V), detekcia: UV, 240 nm, prietok: 0,8 cm³ min⁻¹, dávkovaný objem: 20 ml, teplota kolóny: 22 °C, $t_M = 3,75$ min, RSD $\leq 3\%$ ($n=3$)

Chirálna stacionárna fáza na základe cyklofruktánov

Okrem chirálneho selektora na báze β -cykloextrínu boli estery alkoxyfenylkarbámovej kyseliny separované použitím cyklofruktánovej CSF CF7-DMP (dimetylfenylkarbamát CF7) a CF6-DCP (dichlorofenylkarbamát CF6) v polárno-organickom móde a v systéme s konvenčným usporiadaním fáz. Pre kolónu CF7-DMP sa experimentálne testovali mobilné fázy (I) metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (20/80/0,3/0,2, V/V/V/V), (II) hexán/izopropanol/trifluorooctová kyselina (50/50/0,1, V/V/V), a (III) heptán/etanol/trifluorooctová kyselina (50/50/0,1, V/V/V). Z výsledkov separácie uvedených v Tabuľke III je zrejmé, že k separácii enantiomérov použitím polárno-organického módu (mobilná fáza I) nedochádzalo. V systéme s konvenčným usporiadaním fáz (mobilné fázy II, III) nedochádzalo k separácii enantiomérov. Hodnoty retenčných faktorov pre vybranú látku č. 9 boli 4,80 (mobilná fáza II, t_M (II) = 3,45 min) a 4,25 (mobilná fáza III, t_M (III) = 5,53 min).

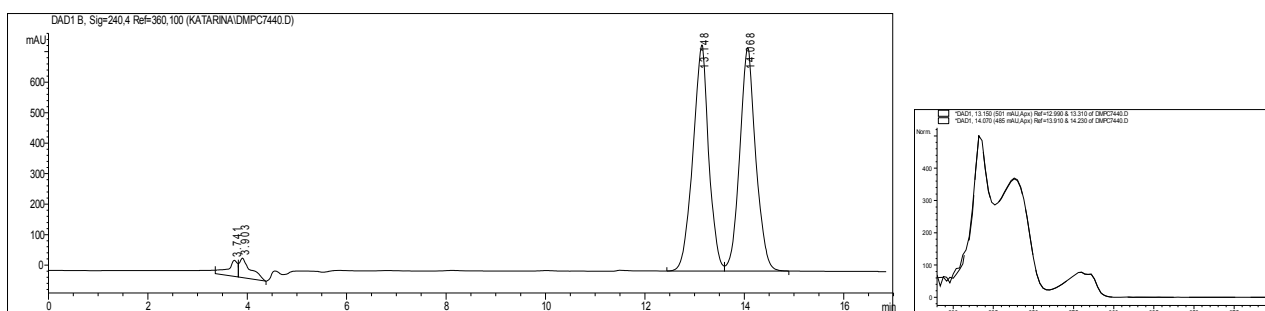
Pre chirálnu stacionárnu fázu s chirálnym selektorom CF6-DCP (dichlorofenylkarbamát CF6) sa testovali mobilné fázy (I) heptán/etanol (80/20 v/v) a (II) hexán/izopropanol (70/30, V/V), pričom ostatné podmienky boli rovnaké ako v predošlých experimentoch. Retenčné fakto-

ry študovaných derivátov fenylkarbámovej kyseliny sa len nevýznamne líšili a boli z intervalu od 0,44 do 0,68. K separácii enantiomérov použitím uvedených mobilných fáz nedochádzalo.

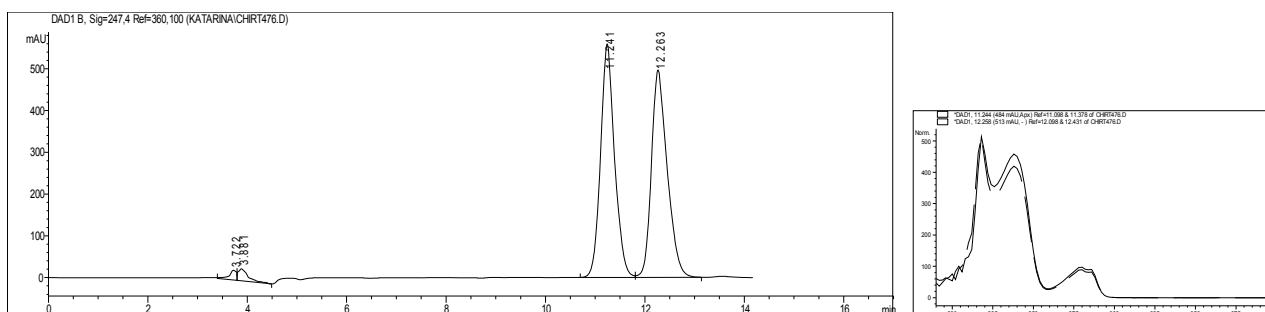
Chirálna stacionárna fáza na základe teikoplanínu

Tretím typom marocyclických chirálnych stacionárnych fáz testovaných na separáciu alkoxy-substituovaných derivátov kyseliny fenylkarbámovej bola stacionárna fáza s chirálnym selektorom zo skupiny makrocyclických antibiotík – teikoplanín. Na separáciu sa zvolil polárno-organický separačný mód s mobilnou fázou metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (45/55/0,3/0,2, V/V/V/V). Táto CSF vo svojej molekule obsahuje veľké množstvo funkčných skupín a chirálnych centier, a preto je schopná interakcií s rozličnými druhmi opticky aktívnych látok. Ako dokumentujú výsledky uvedené v tabuľke III, CSF s teikoplanínom ako chirálnym selektorom bola vhodná na separáciu enantiomérov 2-alkoxy-substituovaných derivátov. 3-alkoxyderiváty sa na tejto CSF neseperovali. Dosažené hodnoty rozlíšenia boli v rozsahu od 1,00 do 1,98. Chromatografické záznamy a UV spektrá vybraných látok (3 a 5, viď tabuľka I) sú uvedené na obr. 1.

Látka 3



Látka 5



Obr. 1. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov a UV spektrá vybraných látok; Chromatografické podmienky: stacionárna fáza: CHIROBIOTIC T, mobilná fáza: metanol/acetonitril/octová kyselina/trietylamín (45/55/0,3/0,2, V/V/V/V), detekcia: UV, 240 nm, prietok: 0,8 cm³ min⁻¹, dávkovaný objem: 20 ml, teplota kolóny: 22 °C

Záver

Práca bola zameraná na separáciu enantiomérov esterov alkoxyfenylkarbámbovej kyseliny. Táto skupina látok predstavuje potenciálne terapeutiká s lokálno-anestetickými účinkami. Enantioseparácie boli realizované vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, ktorá je rozšírenou metódou na separáciu optických izomérov. Cieľom práce bolo otestovať makrocyclické chirálne selektory na báze cyklofruktánov (CF6-DCP, CF7-DMP), β -cykloextrínu a teikoplanínu. V experimentálnej časti bola pozornosť venovaná štúdiu vplyvu zloženia mobilnej fázy na separáciu enantiomérov. Základnými chromatografickými parametrami, pomocou ktorých boli charakterizované separácie použitím jednotlivých chirálnych stacionárnych fáz, boli retenčný faktor (k) a rozlišovací faktor (R_{ij}). Na hodnoty týchto chromatografických veličín vplývala štruktúra analyzovaných látok.

Separácia enantiomérov vybraných látok bola úspešná použitím chirálnej stacionárnej fázy CHIROBIOTIC T. Použitím β -cykloextrínovej CSF dochádzalo iba k čiastočnej separácii analytov. Testovanými cyklofruktánovými CSF sa optické izoméry cieľovej skupiny zlúčenín neseperovali.

Práca bola vypracovaná s finančnou podporou Grantovej agentúry Slovenskej republiky VEGA (grant č. 1/0164/11).

LITERATÚRA

1. Qiu H., Loukotková L., Sun P., Tesařová E., Bosáková Z., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr., A* 1218, 270 (2011).
2. Sun P., Wang Ch., Breitbach Z., Zhang Y., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 81, 10215 (2009).
3. Bučiová L., Borovanský A., Čižmárik J., Csölei J., Švec P., Kozlovský J., Račanská E., Beneš L.: *Českoslov. Farmacie* 36, 339 (1978).
4. Bučiová L., Csölei J., Borovanský A., Čižmárik J., Račanská E.: *Českoslov. Farmacie* 40, 102 (1991).
5. Bučiová L., Csölei J., Račanská E., Švec P.: *Arch. Pharm.* 325, 393 (1992).
6. Kutschy P. a kol.: *Základy farmaceutickej chémie*. Bratislava, 2004.
7. Hroboňová K., Lehotay J., Čižmárik J.: *Česká Slovenská Farmacie* 53/4, 197 (2004).

HPLC METODA STANOVENÍ BENZODIAZEPINŮ

MAREK MUCHA^a, PETR KURKA^b
a JIŘÍ KALINA^a

^a Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta, katedra chemie, 30. dubna 22, 701 33 Ostrava, ^b Fakultní nemocnice Ostrava, Ústav soudního lékařství, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava - Poruba
marek.mucha@centrum.cz

Úvod

Benzodiazepiny patří v současné době k nejpoužívanějším a bohužel také nejzneužívanějším psychofarmakům. Vyznačují se hlavně svým tlumivým účinkem na centrální nervovou soustavu (dále CNS), díky němuž se používají mimo jiné jako sedativa, anxiolytika (tlumí strach), antiepileptika či spasmolytika (léky proti křečím) – např. při léčbě úzkostných či panických stavů nebo jako premedikace před chirurgickým zákrokem. Stejně jako každý jiný lék, i benzodiazepiny mají své nežádoucí účinky, mezi něž mimo jiné patří únava a ospalost, které jsou častou příčinou nehod při obsluze strojů, závratě, zmatenost či přibývání na hmotnosti. Současným užíváním benzodiazepinů s alkoholem, drogami či léky (tedy látkami tlumícími CNS) jsou jejich účinky zesilovány, což může vést ke vzniku velmi nebezpečných situací, které mohou skončit i smrtí v důsledku zástavy dechu a selhání krevního oběhu. I když mají benzodiazepiny velkou terapeutickou šíří (rozdíl mezi účinnou a smrtelnou dávkou) je jejich rychlé stanovení velmi důležité pro další postup léčby^{1–3}. Cílem práce bylo vyvinout HPLC metodu pro stanovení terapeutických koncentrací vybraných šesti nejpoužívanějších benzodiazepinů (Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Chlordiazepoxid a Oxazepam) v tělních tekutinách, která by se dala aplikovat v nemocničních laboratořích bez nutnosti zakoupení hmotnostního spektrometru jako detektoru.

Experimentální část

Pro přípravu mobilní fáze A byly využity octan amonný a mravenčí kyselina (oba Lachema, Brno, ČR). Mobilní fáze A měla složení 0,01 M octan amonný + 10% (V/V) mravenčí kyselina. Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril (Merck, Německo).

Pro standardizaci byly použity práškové standardy Alprazolamu – ALP, Bromazepamu – BRO, Clonazepamu – CLO, Diazepamu – DIA, Chlordiazepoxidu – CLDIA a Oxazepamu – OXA (Chromservis, ČR) rozpuštěné v methanolu (Merck, Německo). Rozpuštěním 4 mg práško-

vých standardů benzodiazepinů ve 4 ml methanolu byly připraveny základní roztoky o koncentraci 1 mg ml⁻¹, ze kterých byly ředěním směsí mobilních fází A a B v poměru 1:1 připraveny modelové vzorky pro stanovení parametrů metody.

Metoda byla vyvíjena na přístroji Agilent 1200 (Agilent, USA) s UV detekcí vybaveným kolonou Gemini 5 μ C18 110A (Phenomenex, USA). Jako základ pro vývoj metody posloužila metoda užívaná na Ústavu soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava (dále označována jako metoda USL)⁴.

Pro kontrolu správnosti koncentrací připravených modelových vzorků byl využit kapalinový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem Shimadzu LCMS – 2010A (Shimadzu, Japonsko) s využitím metody USL.

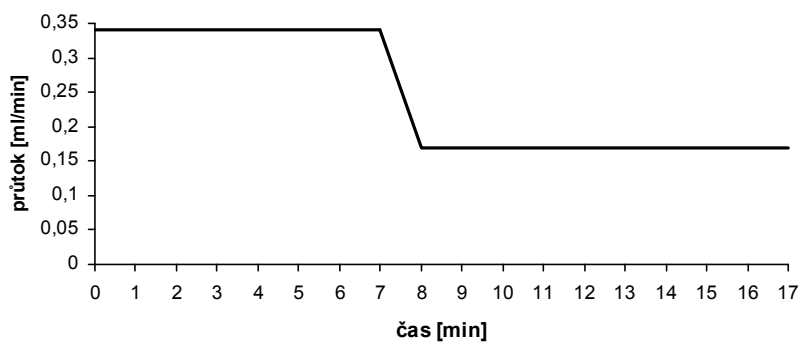
Modelový vzorek o koncentraci 2 μg ml⁻¹ byl nejdříve proměřen za podmínek shodných s metodou USL na kapalinovém chromatografu Agilent 1200. Detekce byla realizována při čtyřech vlnových délkách (254, 245, 227 a 220 nm) odpovídajících absorpčním maximům^{5–9}. Následně byla upravována teplota kolony, nástřik, průtok a gradient mobilních fází tak, aby došlo k oddělení všech šesti piků a k získání vyhovující detekční meze. Získaná metoda se od původní metody USL liší v teplotě kolony, nástřiku, detekci, průtoku a gradientu mobilních fází. U získané metody pak byly za pomoci modelových vzorků stanoveny limity detekce a kvantifikace, linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost a přesnost v oblasti od 2 do 0,2 μg ml⁻¹ (od terapeutické koncentrace až po limit kvantifikace). Tyto parametry byly testovány podle principu validace analytických metod^{10–12}.

Výsledky a diskuse

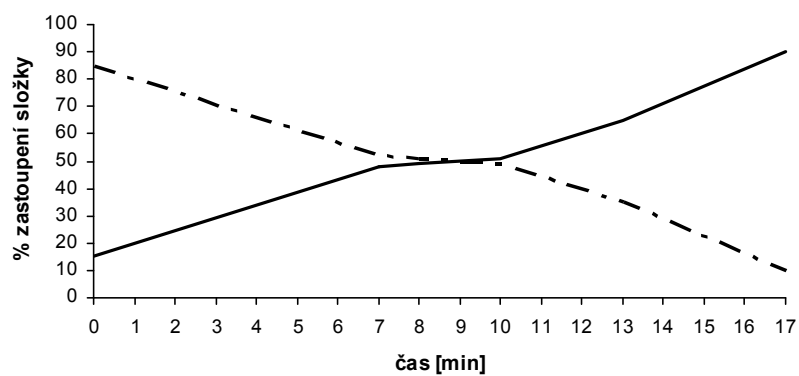
Byla ustavena metoda s následujícími parametry: kolona Gemini C18, teplota kolony 20 °C, nástřik 20 μl, detekční vlnová délka 245 nm, mobilní fáze A – 0,01 M octan amonný + 10% (V/V) mravenčí kyselina, mobilní fáze B – acetonitril. Celkový průtok mobilních fází se pohyboval od od 340 do 170 ml min⁻¹ (obr. 1). Gradient mobilních fází je zobrazen na obr. 2. Získaný chromatogram směsi benzodiazepinů při vlnové délce 245 nm pak ukazuje obr. 3.

U získané metody pak byly pomocí modelových vzorků stanoveny její parametry (limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost a přesnost) v oblasti od 2 do 0,2 μg ml⁻¹. Tyto parametry jsou uvedeny v tabulkách I–IV.

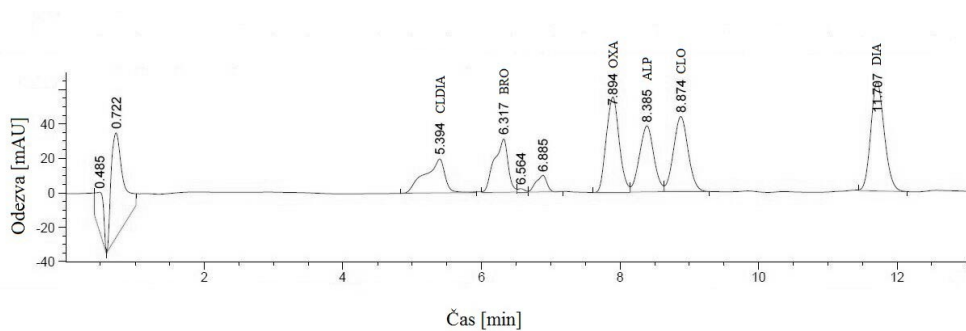
Odchylka v reprodukovatelnosti a opakovatelnosti se obvykle pohybuje v rozmezí ± 10 %, korelační koeficienty linearit se pohybují v intervalu od 0,99 do 1 a odchylka v přesnosti nepřesahuje 10 % (cit.^{5–9}). Naše výsledky vy-



Obr. 1. Celkový průtok mobilních fází A i B v průběhu analýzy



Obr. 2. Gradient mobilních fází v průběhu analýzy; octan amonný (čerchovaná čarou) a acetonitril (plnou čarou)



Obr. 3. Chromatogram směsi benzodiazepinů získaný pomocí vyvinuté metody

Tabulka I

Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) získané pro šest vybraných benzodiazepinů pomocí vyvinuté metody

Limity	ALP	BRO	CLO	DIA	CLDIA	OXA
LOD, $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
LOQ, $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tabulka II

Kalibrační závislosti získané pro vybraných šest benzodiazepinů ze tří nezávislých stanovení; x = koncentrace vzorku, y = odezva

	1. stanovení		2. stanovení		3. stanovení	
	rovnice	R ²	rovnice	R ²	rovnice	R ²
ALP	y= 277,90x – 10,801	0,9966	y= 272,66x – 10,171	0,9966	Y= 276,33x – 11,134	0,9982
BRO	y= 211,26x – 2,197	0,9972	y= 213,74x – 5,540	0,9959	y= 206,95x – 2,782	0,9963
CLO	y= 320,92x – 8,611	0,9962	y= 315,65x – 8,428	0,9956	y= 315,80x – 9,881	0,9965
DIA	y= 424,56x – 4,423	0,9970	y= 420,88x – 2,558	0,9969	y= 432,09x – 10,086	0,9939
CLDIA	y= 154,55x + 6,160	0,9851	y= 160,01x + 7,124	0,9861	y= 159,03x + 3,844	0,9865
OXA	y= 327,51x + 0,142	0,9978	y= 329,81x + 0,715	0,9976	y= 319,84x + 3,114	0,9966

Tabulka III

Opakovatelnost a reprodukovatelnost získaná pro šest vybraných benzodiazepinů (spodní mez je nejnižší získaná hodnota a horní mez nejvyšší získaná hodnota v % správné hodnoty)

Parametr	Meze	ALP	BRO	CLO	DIA	CLDIA	OXA
Opakovatelnost	spodní	97,81	93,98	98,54	97,59	97,92	98,10
	horní	101,97	101,53	101,14	101,17	102,15	101,21
Reprodukovatelnost	spodní	97,37	93,65	97,31	96,72	94,54	96,83
	horní	103,69	103,69	103	101,7	105,37	104

kazují v oblasti reprodukovatelnosti a opakovatelnosti odchylku lepší, maximálně $\pm 7\%$, korelační koeficienty linearit jsou vyšší než 0,99 (s výjimkou chlordiazepoxidu, kde jsou vyšší než 0,985) a odchylka v přesnosti se pohybuje v oblasti $\pm 7\%$. Je tedy možné tvrdit, že námi vyvinutá metoda pro stanovení benzodiazepinů je vhodná a výhodná vzhledem k možnosti použití pouze HPLC bez MS a to i v koncentracích odpovídajících terapeutické dávce.

Závěr

Byla vyvinuta HPLC metoda ke stanovení šesti vybraných benzodiazepinů (Alprazolamu, Bromazepamu, Clonazepamu, Diazepamu, Chlordiazepoxidu a Oxazepamu), kterou je možno využít v laboratořích bez nutnosti zakoupení hmotnostního spektrometru jako detektoru. U získané metody byly stanoveny její parametry (limity de-

tekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost a přesnost) a bylo shledáno, že je využitelná ke stanovení benzodiazepinů v koncentracích odpovídajících terapeutické dávce těchto látek s použitím pouze HPLC s UV/VIS detekcí.

V rámci dalšího výzkumu bude zkoumána extrakce benzodiazepinů z tělních tekutin (krev a moč) s cílem připravit zavedení této metody do praxe.

Príspevek byl vypracován v rámci projektu Institut environmentálních technologií, registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR. Poděkování rovněž patří Ústavu soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava za umožnění provádění velké části prací na tomto pracovišti.

Tabulka IV

Přesnost u vybraných šesti benzodiazepinů pro jednotlivé koncentrace (*c*) modelových vzorků

Látka	<i>c</i> [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Stř. hod [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Správnost [%]	Rozptyl	95% interval spolehlivosti			
					SM ^a	%	HM ^b	%
ALP	2	2,0043	100,21	0,0157	1,9938	-0,52	2,0147	0,52
	1,5	1,5088	100,59	0,0208	1,4949	-0,92	1,5227	0,92
	1	1,0018	100,18	0,0066	0,9974	-0,44	1,0062	0,44
	0,7	0,7070	100,99	0,0155	0,6966	-1,46	0,7173	1,46
	0,5	0,4988	99,76	0,0048	0,4956	-0,64	0,5020	0,64
	0,2	0,2001	100,03	0,0550	0,1964	-1,84	0,2037	1,84
BRO	2	1,9726	98,63	0,0886	1,9134	-3,00	2,0318	3,00
	1,5	1,4865	99,10	0,0553	1,4495	-2,49	1,5234	2,49
	1	1,0015	100,15	0,0062	0,9974	-0,41	1,0056	0,41
	0,7	0,7034	100,49	0,0086	0,6977	-0,82	0,7091	0,82
	0,5	0,4858	97,16	0,0314	0,4648	-4,32	0,5068	4,32
	0,2	0,1998	99,90	0,0028	0,1979	-0,94	0,2017	0,94
CLO	2	2,0022	100,11	0,0085	1,9965	-0,28	2,0078	0,28
	1,5	1,5031	100,20	0,0171	1,4916	-0,76	1,5145	0,76
	1	0,9997	99,97	0,0038	0,9972	-0,25	1,0022	0,25
	0,7	0,7013	100,19	0,0066	0,6969	-0,63	0,7057	0,63
	0,5	0,4990	99,80	0,0050	0,4957	-0,67	0,5023	0,67
	0,2	0,1996	99,78	0,0049	0,1963	-1,64	0,2028	1,64
DIA	2	1,9981	99,91	0,0106	1,9910	-0,35	2,0052	0,35
	1,5	1,5024	100,16	0,0064	1,4981	-0,28	1,5067	0,28
	1	0,9965	99,65	0,0131	0,9877	-0,88	1,0052	0,88
	0,7	0,7013	100,18	0,0025	0,6996	-0,24	0,7029	0,24
	0,5	0,4971	99,42	0,0080	0,4918	-1,08	0,5024	1,08
	0,2	0,1991	99,53	0,0027	0,1972	-0,91	0,2009	0,91
CLDIA	2	2,0026	100,13	0,0099	1,9959	-0,33	2,0092	0,33
	1,5	1,4944	99,63	0,0394	1,4681	-1,76	1,5207	1,76
	1	1,0070	100,70	0,0170	0,9956	-1,13	1,0184	1,13
	0,7	0,6978	99,68	0,0125	0,6894	-1,20	0,7061	1,20
	0,5	0,4970	99,39	0,0117	0,4891	-1,57	0,5048	1,57
	0,2	0,1988	99,38	0,0087	0,1929	-2,92	0,2046	2,92
OXA	2	1,9927	99,63	0,0213	1,9784	-0,71	2,0069	0,71
	1,5	1,5134	100,89	0,0445	1,4836	-1,96	1,5431	1,96
	1	1,0039	100,39	0,0220	0,9892	-1,46	1,0186	1,46
	0,7	0,7058	100,83	0,0184	0,6935	-1,74	0,7181	1,74
	0,5	0,5004	100,08	0,0062	0,4963	-0,83	0,5045	0,83
	0,2	0,2005	100,25	0,0038	0,1980	-1,27	0,2030	1,27

^a SM je spodní mez, ^b HM je horní mez 95% intervalu spolehlivosti

LITERATURA

1. Wenke M., Eybl L., Hynie S., Inczinger F., Kovařík V., Květina J., Lenfeld J., Mráz M., Nicák A., Vaněček J., Višňovský P.: *Farmakologie*. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha 1986.
2. Rašková H., Vaněček J., Votava Z., Wenke M.: *Farmakologie*. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha 1970.
3. Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A.: *Atlas farmakologie*. Grada Publishing, Praha 1994.
4. Metoda stanovení benzodiazepinů na Ústavu soudního lékařství FNO. Ústav soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava.
5. Pérez-Lozano P., García-Montoya E., Orriols A., Miñarro M., Tico J. R., Suñé-Negre J. M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 979 (2004).
6. Bastos Borges K., Figueiredo Freire E., Martins I., Pereira Bastos de Siqueira M. E.: *Talanta* 78, 233 (2009).
7. Rouini M., Ardakani Y. H., Hakemi L., Mokhberi M., Badri G.: *J. Chromatogr., B* 823, 167 (2005).
8. Bugey A., Staub Ch.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 555 (2004).
9. Mahjoub A. E., Staub Ch.: *J. Chromatogr., B* 742, 381 (2000).
10. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/17660/P04.pdf>, staženo 8.10.2011.
11. <http://www.effichem.cz/reseni/laboratorni-specialiste/validace-metod/>, staženo 8.10.2011.
12. <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm>, staženo 8.10.2011.

LIPIDOMICKÁ CHARAKTERIZACE VZORKŮ PLAZMY PACIENTŮ S KARDIOVASKULÁRNÍMI CHOROBAMI

MAGDALÉNA OVČAČÍKOVÁ, EVA CÍFKOVÁ,
MICHAL HOLČAPEK a MIROSLAV LÍSA

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

Magda.O@seznam.cz

Úvod

Lipidy patří do skupiny přirozeně se vyskytujících látek středně polárního až nepolárního charakteru, které jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, jako jsou uhlovodíky, chloroform, benzen, ethery a alkoholy, a nerozpustné ve vodě. Zahrnují pestrou škálu látek obsahující mastné kyseliny a jejich deriváty, karotenoidy, terpeny, steroidy a žlučové kyseliny¹. Jsou nezbytnou složkou potravy a významnou složkou všech biologických tkání, ve kterých zastávají spoustu důležitých rolí spojených se správnou funkcí organismu. Jsou vydatným zdrojem energie, složkami biologických membrán a podílejí se na různých biosyntetických procesech. Biologické funkce a aktivita lipidů významně závisí na jejich struktuře. Většina lipidů obsahuje řetězce mastných kyselin, které reprezentují nepolární části molekul. Počet dvojných vazeb, jejich konfigurace (*cis* x *trans*) a pozice (ω -3 x ω -6) v řetězci mastné kyseliny významně ovlivňují jejich biologickou aktivitu a riziko vzniku kardiovaskulárních a jiných závažných onemocnění.

Cílem této práce byla optimalizace extrakcí lipidů ze vzorku plazmy, porovnání výtěžností jednotlivých metod s využitím postupů extrakce podle Folche², Bligh/Dyera³ a podle Shevchenka (MTBE)⁴. Dále byla provedena frakcionace všech tříd lipidů ze vzorků plazmy pacientů s kardiovaskulárním onemocněním pomocí chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Pro získání detailnějšího obrazu zastoupení jednotlivých lipidů v sesbíraných frakcích tříd lipidů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzních fázích (RP-HPLC) v druhé dimenzi.

Experimentální část

Vzorky

Pro extrakci lipidů z plazmy byla použita modifikovaná metoda extrakce podle Folche². K 500 μ l vzorku plazmy bylo přidáno 10 ml směsi chloroform/methanol (2:1, *V/V*). Vzniklá směs byla homogenizována a poté byla přefiltrována přes skládaný filtr. Po přidání 2 ml 1 M NaCl k filtrátu došlo ke vzniku emulze, která byla odstředěna na

centrifuze po dobu 2 min při 2000 otáček/min. Po rozdělení extraktu na dvě fáze byla horní (vodná) fáze odstraněna a dolní (organická) fáze odpařena do sucha pod proudem dusíku. Před vlastní HPLC separací byl vzorek rozpuštěn ve směsi chloroform a 2-propanol (1:1, *V/V*).

HPLC/MS podmínky

Všechny HPLC/MS experimenty byly prováděny na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) ve spojení s hmotnostním spektrometrem iontová past Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Brémy, Německo). V první dimenzi byla při HILIC frakcionaci extraktů⁵ lipidů použita silikagelová kolona Spherisorb Silica (250 \times 4,6 mm, velikost částic 5 μ m, Waters, Milford, MA, USA), průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹, dávkovaný objem 10 μ l rozpuštěného extraktu lipidů, teplota kolony byla 40 °C. Byla použita mobilní fáze se složkami A – acetonitril a B – 5 mM vodný roztok octanu amonného s následujícím složením gradientu: 0 min – 94 % A + 6 % B, 60 min – 77 % A + 23 % B. Jednotlivé třídy lipidů v první dimenzi byly identifikovány pomocí ionizace elektrosprejem (ESI) při záznamu kladných i záporných iontů v rozsahu m/z = 50–1000, teplota sušícího plynu 365 °C, tlak zmlžujícího plynu 0,41 MPa, průtok sušícího plynu 10 ml min⁻¹. Pro HPLC/MS/MS analýzu byla použita izolační šířka m/z = 2 a kolizní amplituda 1,0 V. Frakce odpovídající jednotlivým třídám lipidů byly postupně sesbírány a následně odpařeny do sucha proudem dusíku.

V druhé dimenzi byly sesbírané frakce rozpuštěny směsí chloroform/2-propanol a následně separovány pomocí dvou různých RP-HPLC metod. Frakce polárních lipidů byly analyzovány pomocí RP-HPLC s využitím povrchově porézní kolony Kinetex C₁₈ (150 \times 2,1 mm, velikost částic 2,6 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA), průtok mobilní fáze 0,3 ml min⁻¹, dávkovaný objem 1 μ l, teplota kolony 40 °C. Pro separaci byl použit gradient mobilní fáze: 0 min – 75 % A + 25 % B, 100 min – 88 % A + 12 % B, kde A byla směs acetonitril/2-propanol (1:1, *V/V*) a B byl 5 mM vodný roztok octanu amonného. Polární lipidy byly identifikovány pomocí ESI-MS při záznamu kladných i záporných iontů v rozsahu m/z = 50–1500, teplota sušícího plynu 365 °C, tlak zmlžujícího plynu 0,28 MPa, průtok sušícího plynu 9 ml min⁻¹. Frakce nepolárních lipidů byly analyzovány pomocí RP-HPLC⁶ s využitím kolon Nova-Pak C₁₈ (150 \times 300 \times 3,9 mm, velikost částic 4 μ m, Waters, Milford, MA, USA) v celkové délce 45 cm, dávkovaný objem byl 5 μ l, teplota kolony 25 °C a detekce složek UV detektorem při vlnové délce 205 nm. Pro separaci nepolárních lipidů byla použita mobilní fáze acetonitril/2-propanol se složením gradientu: 0 min – 100 % acetonitrilu, 106 min – 31 % acetonitrilu +

69 % 2-propanolu. Pro identifikaci nepolárních lipidů byla použita ionizace APCI při záznamu kladných iontů v rozsahu $m/z = 50\text{--}1200$, teplota APCI sondy $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota iontového zdroje $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlak zmlžujícího plynu $0,48\text{ MPa}$ a průtok sušícího plynu 3 l min^{-1} .

Výsledky a diskuse

Prvním krokem této práce bylo testování extrakce lipidů z plazmy a porovnání účinnosti jednotlivých extrakcí. Byly srovnány extrakce podle Folche, Bligh/Dyera a Shevchenka na směsi standardů lipidických tříd obsahující kyselinu olejovou ($\Delta 9_{cis} - C18:1$) a vzorku plazmy. Ze získaných výsledků byla pro další měření vybrána extrakce podle Folche, která poskytovala největší výtěžnost jednotlivých tříd lipidů a také se jedná o nejrozšířenější metodu používanou pro extrakci lipidů v literatuře. Dalším krokem byla HILIC frakcionace extraktu plazmy, kde byly použity podmínky separace⁵. Extrakt lipidů z plazmy byl pomocí HILIC metody separován na jednotlivé třídy lipi-

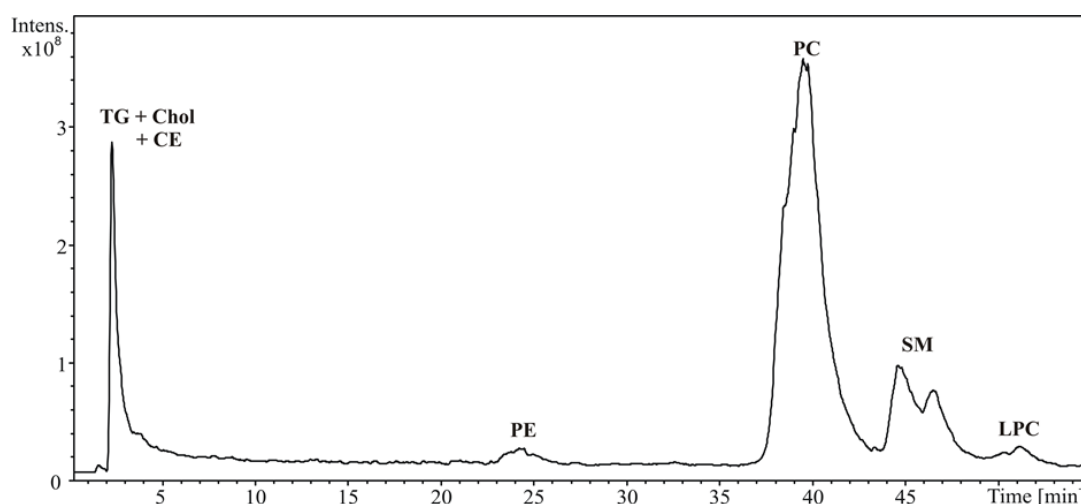
dů. Ty byly dále separovány podle jejich polaritě a rozpustnosti ve vrstvě vody neadsorbované na stacionární fázi. HILIC frakcionace plazmy umožnila separaci složitých (polárních) tříd lipidů, kde byly získány třídy fosfatidylcholinů (PC), fosfatidylethanolaminů (PE), lysofosfatidylcholinů (LPC) a sfingomyelinů (SM). Jednoduché (nepolární) třídy lipidů byly eluovány v mrtvém objemu kolony, proto byly separovány a identifikovány pomocí RP-HPLC v druhé dimenzi. K identifikaci složených tříd lipidů byla použita hmotnostní spektrometrie s ionizací ESI se záznamem kladných iontů. Separované třídy lipidů byly identifikovány na základě charakteristických neutrálních ztrát navázaných funkčních skupin (tab. I). Frakce jednotlivých tříd lipidů byly preparativně izolovány, odpařeny do sucha proudem dusíku a rozpuštěny ve směsi chloroform/2-propanol.

Tyto frakce byly dále separovány v druhé dimenzi na jednotlivé lipidy pomocí RP-HPLC. V RP-HPLC jsou polární lipidy separovány podle délky acylového řetězce a počtu dvojných vazeb. Frakce nepolárních lipidů jsou separovány podle hodnoty ekvivalentního počtu uhlíků

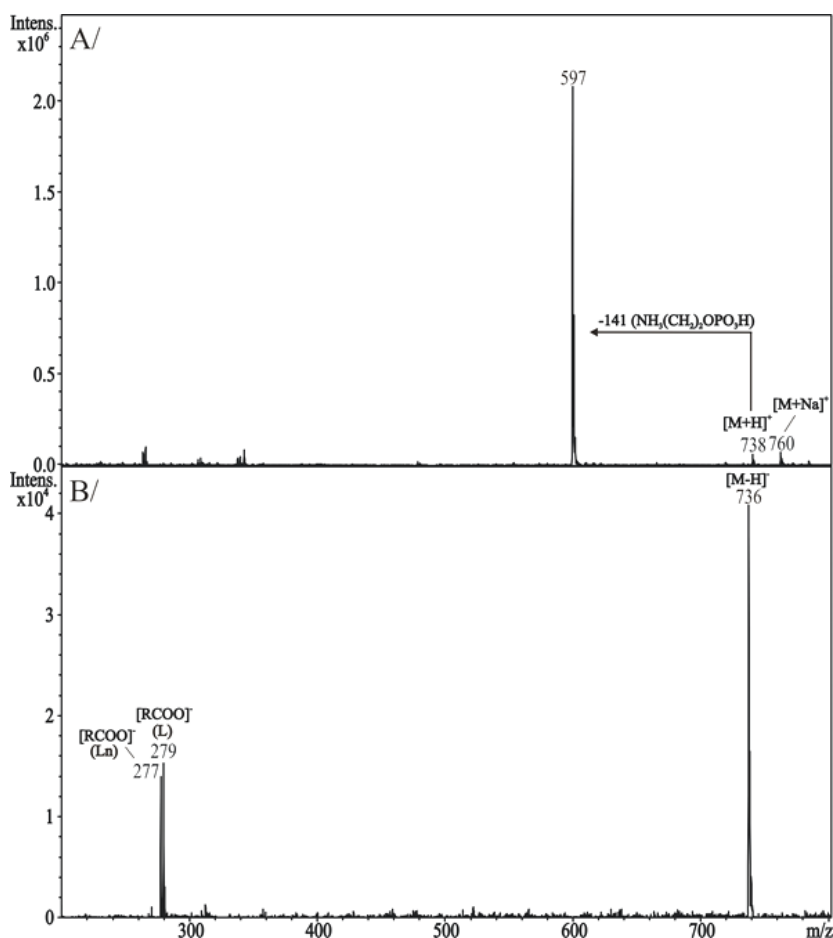
Tabulka I

Hmotnostně-spektrometrické charakteristiky sledovaných tříd lipidů

Třída lipidů	Zkratka	Neutrální ztráta ($\Delta m/z$)	Charakteristický ion [m/z]
Triacylglyceroly	TG	–	$[M+H-R_1COOH]^+$
Cholesteroly	Chol	–	369
Cholesterol estery	CE	–	369
Fosfatidylethanolaminy	PE	141	–
Fosfatidylcholiny	PC	183	184
Sfingomyeliny	SM	183	184
Lysofosfatidylcholiny	LPC	183	184



Obr. 1. HILIC HPLC/MS chromatogram extraktu lipidů z plazmy s využitím extrakce podle Folche



Obr. 2. ESI-MS/MS hmotnostní spektra fosfatidylethanolaminu: A) kladný záznam iontů, B) záporný záznam iontů

(ECN), které se vypočte z celkového počtu uhlíků zmenšeného o dvojnásobný počet dvojných vazeb ($\text{ECN} = \text{CN} - 2\text{DB}$).

K identifikaci polárních lipidů byla použita ionizace ESI v kladném i záporném módu. V kladném záznamu byla určena molekulová hmotnost pomocí protonované molekuly $[\text{M}+\text{H}]^+$ a aduktů se sodíkovým iontem $[\text{M}+\text{Na}]^+$. V záporném záznamu iontů byly identifikovány fragmentové ionty $[\text{R}_i\text{COOH}]^-$, které umožňují určit složení mastných kyselin. Poměr relativních intenzit fragmentových iontů $[\text{R}_i\text{COO}]^-$ lze použít k určení převažující mastné kyseliny v $sn-2$ poloze⁷. K identifikaci nepolárních lipidů byla použita ionizace APCI v kladném záznamu iontů, který umožnil určení molekulové hmotnosti pomocí protonované molekuly $[\text{M}+\text{H}]^+$ a aduktů s amonným iontem $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. Navázané mastné kyseliny byly identifikovány pomocí fragmentových iontů $[\text{M}+\text{H}-\text{R}_i\text{COOH}]^+$. Z poměru těchto fragmentových iontů lze stanovit převládající mastnou kyselinu v poloze $sn-2$. Pomocí MS nelze rozlišit polohy $sn-1$ a $sn-3$, které jsou považovány za ekvi-

valentní. Ztráta z polohy $sn-2$ je ve srovnání se ztrátami z polohy $sn-1$ a $sn-3$ energeticky více náročná, proto má výsledný fragmentový iont nižší relativní intenzitu oproti statisticky očekávané⁸.

Závěr

Byla provedena optimalizace extrakce vzorku plazmy podle Folche, Bligh/Dyera a Shevchenka, z čehož jako nejlepší typ extrakce s nejvyšší výtěžností jednotlivých tříd lipidů byla vybrána extrakce podle Folche. Vzorky plazmy pacientů s kardiovaskulárním onemocněním byly následně extrahovány pomocí modifikovaného postupu podle Folche a frakcionovány na jednotlivé třídy lipidů pomocí HILIC separace. HILIC metodou byly získány a identifikovány čtyři třídy polárních a tři třídy nepolárních lipidů. Jednotlivé frakce byly preparativně izolovány a separovány pomocí RP-HPLC v druhé dimenzi, která umožnila získat detailnější profilování jednotlivých lipidů ve vzorku plazmy.

Tato práce byla vypracována za podpory grantového projektu č. 203/11/0022 Grantové agentury České republiky.

LITERATURA

1. <http://lipidlibrary.aocs.org/>
2. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1956).
3. Bligh E. G., Dyer W. J.: *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911 (1957).
4. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T. V., Shevchenko A., Schwudke D.: *J. Lipid Res.* 49, 1137 (2008).
5. Lísa M., Cífková E., Holčápek M.: *J. Chromatogr., A* 1218, 5146 (2011).
6. Holčápek M., Lísa M., Jandera P., Kabátová N.: *J. Sep. Sci.* 28, 1315 (2005).
7. Han X., Gross R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10635 (1994).
8. Holčápek M., Jandera P., Zderadička P., Hrubá L.: *J. Chromatogr., A* 1010, 195 (2003).

ANALÝZA AKRYLAMIDU METODOU GC/MS

ROMAN PAPOUŠEK, PETRA NOVÁKOVÁ
a PETR BARTÁK

*Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů,
Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Uni-
verzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46
Olomouc
roman.papousek@hotmail.com*

Úvod

Akrylamid (prop-2-enamid, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) je monomer, který se přes více než padesát let využívá v různých průmyslových aplikacích. Tato nízkomolekulární krystalická látka bez barvy a zápachu je vysoce rozpustná ve vodě, na vzduchu reaktivní a schopná rychle polymerizovat za vzniku polyakrylamidu¹.

Polyakrylamid se v moderním chemicko-technologickém průmyslu využívá jako flokulant při čištění odpadních a pitných vod, jako těsnicí materiál při stavbě přehrad, tunelů, vodních nádrží, dále také pro zpevnění půdy při stavbě silnic, jako pojivo v papírenském průmyslu a také jako aditivum při výrobě průmyslových a kosmetických produktů. V neposlední řadě je také velmi často využíván v analytické biochemii při elektroforetické separaci a purifikaci proteinů^{2,3}. Samotný polyakrylamid je netoxický, ale ve většině případů obsahuje rezidua nezpolymerizovaného akrylamidu, který už toxické účinky vykazuje⁴.

Nespočetem studií bylo prokázáno, že akrylamid je karcinogenním, genotoxickým, toxickým pro reprodukci a neurotoxickým pro centrální nervový systém člověka^{5–8}. Testy na laboratorních zvířatech, která byla vystavena příjmu akrylamidu v pitné vodě, prokázaly zvýšené riziko nádorů centrálního nervového systému, štítné žlázy, dělohy, prsní žlázy a dalších orgánů. Z těchto důvodů v roce 1994 zařadila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny akrylamid do skupiny látek s označením 2A, tedy jako „potenciální lidský karcinogen“¹.

Je tedy pochopitelné, že v roce 2002 vyvolal rozruch objev švédských vědců, kteří poukázali na přítomnost a vysoký obsah akrylamidu v některých potravinách⁹. Významné koncentrace akrylamidu našli v potravinách rostlinného původu, které jsou bohaté na škrob a tepelně upravované při více než 120 °C (smažení, pražení, pečení, grilování apod.). Jedná se především o smažené bramborové lupínky a hranolky, kávu, pečivo, sušenky, snídaně cereálie a mnoho dalších. Přítomnost akrylamidu v potravinách lze z větší části vysvětlit jako důsledek Maillardovy reakce, při které dochází k reakci mezi aminokyselinami (asparaginem) a redukujícími cukry (především glukosou a fruktosou)^{3,10,11}. Za další nezane-

dbatelný zdroj akrylamidu pro lidský organismus lze považovat tabákový kouř, kosmetiku, obalový materiál potravin a pitnou vodu. Ke kontaminaci pitných vod dochází snadno, a to díky vysoké mobilitě akrylamidu v půdě a podzemních vodách³.

Všechny doposud zjištěné poznatky o výskytu a nebezpečnosti akrylamidu poukazují na nutnost vývoje a validace spolehlivých a citlivých analytických metod, které by umožnily kvantifikovat velmi nízké koncentrace akrylamidu v rozmanitých a komplikovaných maticích, mezi něž tepelně upravené potraviny bezesporu patří. Dříve vytvořené metody založené na klasické HPLC popř. GC jsou vhodné pro stanovení akrylamidu ve vodách, biologických tekutinách a tepelně neopracovaných potravinách (kukuřice, brambory, cukrová řepa apod.). Pro analýzu potravin upravovaných za vysokých teplot nejsou tyto metody příliš vhodné z důvodu nedostatečné selektivity¹².

Jako vhodnější alternativa se jeví metody využívající spojení chromatografické separace (LC popř. GC) s hmotnostní spektrometrií. Vedle přímé detekce akrylamidu se výhodnější zdají být postupy zahrnující rovněž derivatizaci analytu¹³. Cílem této práce je aplikace robustní a citlivé GC/MS metody, založené na bromaci akrylamidu. Snahou je využít tuto velmi citlivou metodu nejen při analýze matričně složitějších vzorků potravin, ale také při stanovení akrylamidu v plynných produktech uvolňovaných při spalování a pyrolyze různých typů vzorků.

Experimentální část

Chemikálie

Hexan, akrylamid (98%), H_2SO_4 (96%), KBrO_3 , KBr , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, ethylacetát, triethylamin (99%) (vše Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Z uvedených chemikálií byl připraven zásobní roztok akrylamidu o koncentraci 1 mg ml^{-1} , dále 10% roztok H_2SO_4 , roztok KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$.

Instrumentace a chromatografické podmínky GC/MS analýzy

Všechna měření byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, USA). Byla použita nepolární kapilární kolona HP-5ms ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ } \mu\text{m}$) a teplotní program $50 \text{ } ^\circ\text{C} - 2 \text{ min } 10 \text{ } ^\circ\text{C/min} - 300 \text{ } ^\circ\text{C} - 15 \text{ min}$. Hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu 29 až 520 m/z nebo v režimu monitorování selektivních iontů 106, 149 a 151 m/z .

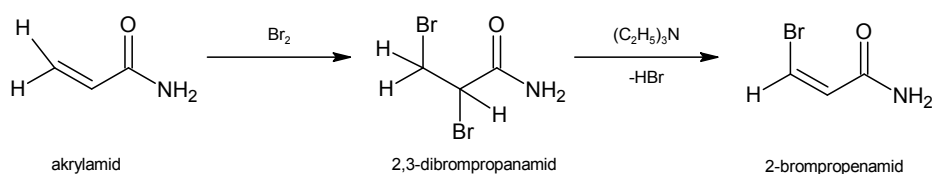
Analýza akrylamidu v plynných produktech pyrolýzy

Jako vzorek pro analýzu akrylamidu v plynech uvolňovaných při pyrolýze byl vybrán vonný františek a vonná tyčinka. Aparatura sestavená pro pyrolýzu a následný zachyt produktů spalování se skládala z držáku pro vzorek, těsně nad ním umístěné skleněné nálevky napojené na promývačku s absorpčním roztokem (40 ml destilované vody + 8 ml 10% H_2SO_4), která byla dále napojena na vakuum. Po zapálení vzorku v držáku byl vznikající kouř veden do promývačky s absorpčním roztokem. Po dokončení spalování (cca 30 min) byly z promývačky odebrány alikvotní podíly absorpčního roztoku (6 ml). Odebrané vzorky a vzorky se standardními přídávky akrylamidu byly bromovány přídávkem 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a 1,5 g pevného KBr . Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě 4°C po dobu 60 min. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáváním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl

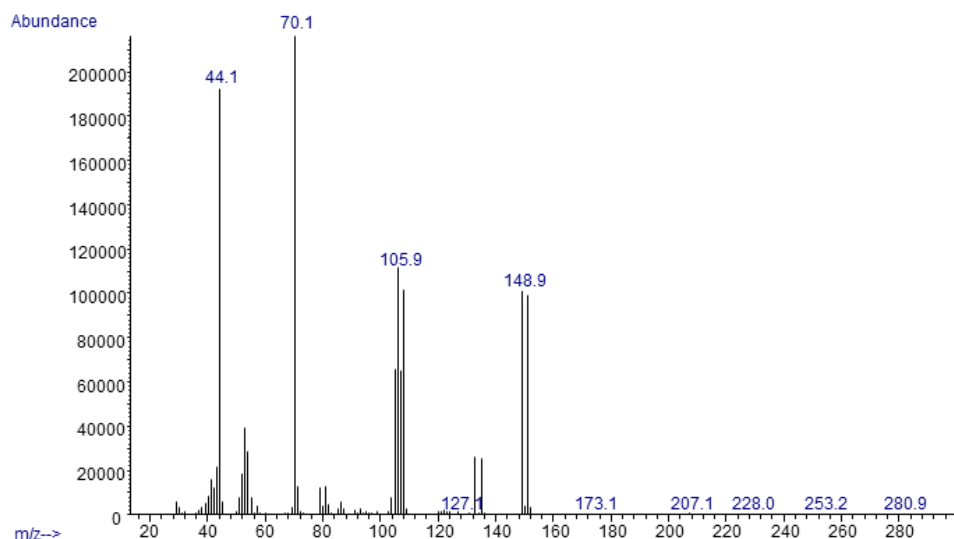
extrahován $2 \times 2 \text{ ml}$ ethylacetátu. Spojené extrakty byly zakonzentrovány v proudu dusíku na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno $10 \mu\text{l}$ triethylaminu.

Analýza akrylamidu v potravinách

Pro ukázkou konkrétního postupu při analýze potravin byly vybrány smažené bramborové lupínky. K navážce 10 g nadrcených bramborových lupínek bylo přidáno 40 ml destilované vody a 40 ml hexanu. Směs byla sonifikována 20 min při teplotě 50°C . Následně byla směs rozdělena do centrifugačních zkumavek a centrifugována 10 min při 4400 ot min^{-1} . Vodná fáze byla ze zkumavek odebrána, hexanová fáze byla spolu s pevným vzorkem smíchána s 20 ml destilované vody a celý sonifikační i centrifugační postup byl zopakován. Spojené vodné podíly byly v odměrné baňce doplněny do 50 ml. Z tohoto objemu bylo odebráno $4 \times 5 \text{ ml}$ a doplněny standardní přídávky akrylamidu v rozmezí 0–50 μg . Odebrané vzor-



Obr. 1. Derivatizace akrylamidu



Obr. 2. Hmotnostní spektrum 2-bromopropenamidu

ky a vzorky se standardními přísadky byly bromovány přísadkem 1 ml roztoku KBrO_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, 1,5 g pevného KBr a 1 ml 10% H_2SO_4 . Reakce probíhala v kyselém prostředí za tmy a při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 min. Po této době byl nadbytečný brom rozložen přikapáním roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ do úplného odbarvení reakční směsi. Bromovaný derivát byl extrahován $2 \times 2 \text{ ml}$ ethylacetátu. Spojené extrakty byly zakonzentrovány v proudě dusíku na výsledný objem 1 ml. Před GC/MS analýzou bylo ke všem vzorkům přidáno $10 \mu\text{l}$ triethylaminu.

Výsledky a diskuse

Vzhledem k vysoké polaritě a velmi dobré rozpustnosti akrylamidu ve vodě bylo pro extrakci akrylamidu ze všech vzorků respektive pro záchyt akrylamidu z plynné fáze zvoleno vodné prostředí. V případě analýzy vzorků obsahujících tuk bylo využito dvoufázového extrakčního systému s přísadkem hexanu pro odstranění tuků, jejichž nadbytek nepříznivě ovlivňuje průběh derivatizace, zpracování vzorku i následnou chromatografickou analýzu.

Pro samotnou derivatizaci analytu (obr. 1) se využívá bromoční směs skládající se z bromičnanu draselného a bromidu draselného. Reakce probíhala v kyselém prostředí bez přístupu světla a za teploty okolo $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Za těchto podmínek se pro dosažení reprodukovatelných výsledků doporučuje reakční doba okolo 60 min (cit.¹²). Bromací akrylamidu vzniká 2,3-dibrompropanamid. Nadbytečný brom byl z reakční směsi odstraněn thiosíranem sodným, který byl přidáván až do odbarvení roztoku. Vzniklý dibromderivát je méně polární než původní akrylamid a je možné jej extrahovat do ethylacetátu. Získaný extrakt byl

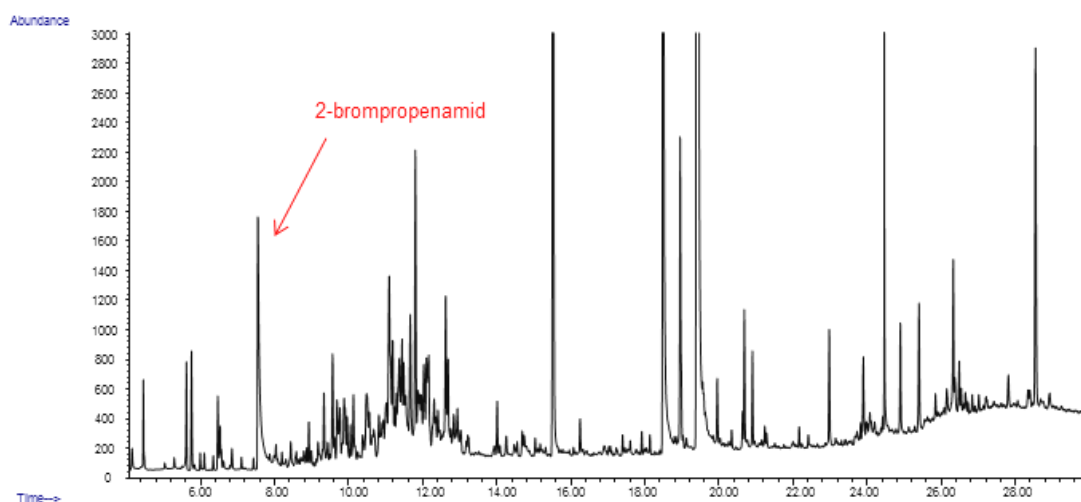
zakonzentrován odpařením v proudě dusíku na objem 1 ml. Z důvodu nedostatečné stability 2,3-dibrompropanamidu byl v závěrečném kroku před GC/MS analýzou přidán do extraktu triethylamin. Reakcí s triethylaminem dochází v nástřikovém prostoru plynového chromatografu k dehydrobromaci 2,3-dibrompropanamidu za vzniku stabilnějšího 2-brompropenamidu.

Na základě získaného hmotnostního spektra (obr. 2) byly pro kvantifikaci akrylamidu vybrány ionty 106, 149 a 151 m/z . V iontovém chromatogramu pro ion 149 m/z je možné 2-brompropenamid snadno identifikovat a stanovit (obr. 3).

Souhrn naměřených hodnot obsahu akrylamidu jak ve vonných františcích a vonné tyčince, tak také v některých typech potravin je uveden v tab. I.

Tabulka I
Obsah akrylamidu v různých typech vzorků

Vzorek	Obsah akrylamidu [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
Vonný františek	1712
Vonná tyčinka	nedetekováno
Smažené bramborové lupínky	82
Karamelové sušenky	79
BEBE rodinné sušenky	nedetekováno
Perník	46
Mletá káva	1984
Kávovinová náhražka	1251
Kakaový prášek	85
Mletá červená paprika	259



Obr. 3. Ionový chromatogram pro ion 149 (2-brompropenamid) z analýzy smažených bramborových lupínků

Výhodou bromačního stanovení akrylamidu je převedení na méně polární dibromderivát, který je na rozdíl od nativního, ve vodě velmi dobře rozpustného akrylamidu, extrahovatelný organickými rozpouštědly. Rovněž výsledný produkt, 2-brompropenamid, je ve srovnání s akrylamidem méně polární, při chromatografii poskytuje symetričtější pik lépe oddělený od ostatních složek matrice s lepším odstupem signálu od šumu. Vyšší molekulová hmotnost a přítomnost atomu bromu je výhodnější rovněž pro spolehlivější identifikaci substance přítomné obvykle ve stopách. Popsaný způsob bromace navíc do značné míry eliminuje nepříjemnou manipulaci s elementárním bromem a významně snižuje environmentální a bezpečnostní rizika. Nevýhodou derivatizačního postupu je vyšší časová náročnost, která je ovšem bohatě vyvážena vyšší selektivitou, vyšší účinností extrakce a nižším detekčním limitem.

Závěr

Byly zkoumány možnosti stanovení akrylamidu v různých matricích plynovou chromatografií po převedení na 2-brompropenamid. Navržená metoda byla využita pro stanovení akrylamidu v některých potravinách a v plyných zplodinách po spalování (pyrolýze) vonných františků a tyčinek na úrovni desítek $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tato práce byla finančně podpořena operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, CZ.1.05/2.1.00/03.0058).

LITERATURA

1. Mojska H., Gielecińska I., Szponar L., Ołtarzewski M.: *Food Chem. Toxicol.* 48, 2090 (2010).
2. Besaratinia A., Pfeifer G. P.: *Carcinogenesis* 28, 519 (2007).
3. Friedman M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504 (2003).
4. Muhlendahl K. E., Otto M.: *Eur. J. Pediatr.* 162, 447 (2003).
5. Rice J. M.: *Mutat. Res.* 580, 3 (2005).
6. Besaratinia A., Pfeifer G. P.: *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1023 (2004).
7. Wang R. S., McDaniel L. P., Manjanatha M. G., Shelton S. D., Doerge D. R., Mei N.: *Toxicol. Sci.* 117, 72 (2010).
8. Besaratinia A., Pfeifer G. P.: *Carcinogenesis* 28, 519 (2007).
9. Swedish National Food Administration, *Information about Acrylamide in Food*, 2002, www.slv.se.
10. Svensson K., Abramsson L., Becker W., Glynn A., Hellenas K. E., Lind Y., Rosén J.: *Food Chem. Toxicol.* 41, 1581 (2003).
11. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin*. 3. vydání. Osis, Tábor 2009.
12. Pittet A., Périsset A., Oberson J. M.: *J. Chromatogr., A* 1035, 123 (2004).
13. Dybing E., Farmer P. B., Andersen M., Fennell T. R., Lalljie S. P. D., Muller D. J. G., Olin S., Petersen B. J., Schlatter J., Scholz G., Scimeca J. A., Slimani N., Tornqvist M., Tuijelaars S., Verger P.: *Food Chem. Toxicol.* 43, 365 (2005).

STANOVENÍ JASMONOVÉ KYSELINY V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU

JAN PAVLÍK^{a,b}, PETRA AMAKOROVÁ^a
a ONDŘEJ NOVÁK^a

^a Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, v.v.i., Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^b Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
jan.pavlk@gmail.com

Úvod

Jasmonová kyselina (JA) patří mezi velmi důležité fytohormony. V nižších koncentracích se v rostlinách vyskytuje během „klidového“ stádia, kdy svou přítomností ovlivňuje klíčení semen, stáčení výhonků, vývoj květů a plodů či stárnutí rostliny. Její koncentrace se zvyšuje jako reakce na patogeny, škůdce či lokální stres. V poslední době dochází i k výzkumu protinádorových účinků jasmonové kyseliny¹. Jedná se o sloučeninu, jejímž základem je cyklopentanon. V molekule JA se vyskytují dvě chirální centra a to na uhlíku C-3 a C-7. Jsou známy dvě diastereomerní formy a jejich antipody. V rostlinách se přirozeně syntetizují dvě z nich, (–)-JA a (+)-7-*iso*-JA. Izomery (+)-7-*iso*-JA a (–)-7-*iso*-JA drží postranní řetězce v *cis* konfiguraci, zatímco u jejich antipodů (–)-JA a (+)-JA leží v poloze *trans*².

Jasmonová kyselina je významným signálním činitelem při biotickém stresu rostlin a hraje významnou roli při aktivaci sebeobraného systému rostliny³. U *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že pokud rostlině poraníme listy, buněčné dělení v růstové aktivních vrcholech bude inhibováno, dojde k potlačení dělení buněk díky zvýšené biosyntéze jasmonátů a nové listy budou menší, než kdyby nedošlo k lokálnímu stresu. Logicky rostliny nesyntetizující JA dorostou do větších rozměrů, tedy neomezují svůj růst ani při poranění⁴.

Analýza této kyseliny, jakožto i jiných látek hormonální povahy, je velmi obtížná. V rostlinném extraktu se vyskytuje ve velmi malých koncentracích, proto je nutné zvolit velmi specifický postup extrakce a purifikace, vedoucí k eliminaci zbytečných ztrát samotných molekul analytu a odstranění možných balastních látek. Cílem této práce je předložit zcela nový postup pro stanovení jasmonové kyseliny kombinující extrakci prováděnou v mikroměřítku s přečištěním na purifikačních kolonách složených ze směsných iontově výměnných a reverzních fází sorbentu. Nový přístup byl porovnáván s dříve publikovaným postupem⁵. Jako analytická koncovka byla použita kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS).

Experimentální část

Použité chemikálie: methanol (99,9%) a mravenčan amonný byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Acetonitril (99,9%), amoniak (25%), mravenčí kyselina (98–100%) a octan amonný pocházel z Merck (Darmstadt, SRN). Ethanol (96%) a diethylether (99%) byl vyroben firmou Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Standard jasmonové kyseliny (\pm)-JA a izotopově stabilně značený standard ²H₆-JA byly zakoupeny od firmy OIChemim (Olomouc, Česká republika) a byly použity k přípravě kalibrační řady standardů o výsledné koncentraci JA v rozsahu 10⁻⁴ mol l⁻¹ až 5·10⁻⁹ mol l⁻¹, zatímco koncentrace ²H₆-JA byla v celé řadě konstantní (5·10⁻⁶ mol l⁻¹). Deionizovaná voda byla získávána z přístroje Simplicity 185 (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). Kolony SpeedTM C₁₈ (500 mg/3 ml a 100 mg/1 ml) byly vyrobeny firmou Applied Separations (Allentown, Pensylvánie, USA), Sep-Pak[®] C₁₈ (360 mg) a Oasis[®] MAX (30 mg/1 ml) firmou Waters (Milford, Massachusetts, USA), DEAE-Sephadex firmou Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Švédsko). Micro-spin centrifugační filtry (0,45 micron) pocházely od firmy Alltech Associates (Deerfield, Illinois, USA).

Jasmonová kyselina byla stanovována na přístroji Acquity UPLCTM System (Waters, Milford, Massachusetts, USA) spojeným s hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól (QqQ) Micromass Quattro *micro*TM API (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Výsledky byly procesovány pomocí programu MassLynx (v4.1). UPLC systém obsahoval kolonu Jupiter 5u C₄, 300 Å, 150×2 mm (Phenomenex, USA) a jako mobilní fáze byly použity acetonitril (A) a 10 mM mravenčí kyselina (B). Celkový čas analýzy byl 10 minut a gradientová eluce měla při průtoku 0,25 ml min⁻¹ lineární průběh (0–5 min, 25–40 % A). Poté následovalo minutové promytí 100% A a čtyřminutová ekvibrace kolony v počátečních podmínkách (25 % A/75 % B). Kalibrační roztoky a vzorky byly uloženy v autosampleru při teplotě 4 °C, a nastříkovaný postupně (10–15 µl) na termostátovanou kolonu (30 °C). Čistota systému LC-MS/MS byla na začátku a v průběhu analýz ověřována nástřiky kontrolního roztoku, který svým složením odpovídal počátečnímu poměru mobilních fází z gradientu. Analýza vzorků probíhala na MS za pomoci ionizace elektrosprejem v negativním módu – *ESI*(–). Kapilára měla teplotu 350 °C a teplota odpařovacího bloku byla 100 °C. Na kapiláru bylo přivedeno napětí 1 kV, na vstupní šterbinu napětí 25 V a na extrakční šterbinu 2 V. Průtok zmlžovacího plynu (dusík) byl 500 l h⁻¹ a průtok plynu (dusík) na vstupní šterbině byl 2 l h⁻¹. Další parametry na QqQ byly následující: rozlišení LM/HM 12,5; iontová energie na Q1 0,3 V; iontová energie na Q2 1,5 V;

vstupní a výstupní napětí 2 V a napětí detektoru 650 V. Záznam dat byl prováděn v režimu MRM za optimalizovaných podmínek kolizního napětí 12 eV při tlaku kolizního plynu (argon) $4,3 \cdot 10^{-3}$ mbar. Bylo zvoleno jedno časové okno v rozsahu 4,5–6,5 min obsahující dva MRM přechody, první pro JA (209,15 > 58,75) a druhý pro vnitřní standard $^2\text{H}_6\text{-JA}$ (215,15 > 58,75). Doba jednoho skenu trvala 1,25 sekundy (dwell time 0,35 s) a byla počítána pro získání 16 datových bodů přes celou šířku chromatografického píku.

Pro tuto studii byly používány 36 dnů staré rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Colombia (obr. 1), pěstované ve fytostronu za daných podmínek: vlhkost 70 %, 21 °C, 16hodinová fotoperioda (16 hodin světlo/8 hodin tma). Některé rostliny byly vystaveny lokálnímu stresu poraněním kovovými kleštěmi a v pravidelných časových intervalech (0, 30, 60, 90, 120 min) byly odebírány vzorky. Odebrané listy (cca 50 mg, 3–4 listy) byly hluboce zmrazeny tekutým dusíkem, uloženy k dlouhodobému skladování při teplotě -70 °C a postupně purifikovány pomocí dvou postupů extrakce a purifikace pro stanovení JA (obr. 2).

Postup přípravy vzorku A (Extrakce \rightarrow C_{18} \rightarrow DEAE-Sephadex + C_{18})⁵

Vzorky zamražených listů (cca 50 mg živé hmoty) byly homogenizovány v kapalném dusíku ve třecí misce a extrahovány ve 5×4 ml (celkově 20 ml) vychlazeného 80% methanolu (I/V) v -20 °C přes noc. Ke vzorkům byl přidán vnitřní, izotopově značený, standard $^2\text{H}_6\text{-JA}$ (40 pmol/vzorek). Poté byly vzorky převedeny do centrifugačních kyvet, baňky propláchnuty 4 ml 80% methanolu a zcentrifugovány (20 min, 4 °C, otáčky 15 000 rpm). Extrahovaný materiál byl znovu promíchán 4 ml 80% methanolu a společně se zbytky vypláchnutého zeleného materiálu z baňek (2×4 ml 80% methanolu) převeden do centrifugační kyvety a odstředěn. Získané supernatanty byly následovně spojeny a purifikovány na kolonách C_{18} (500 mg/3 ml), které byly aktivovány 2×4 ml 96% ethanolu a posléze 2×4 ml deionizovanou vodou. Vzorky (asi

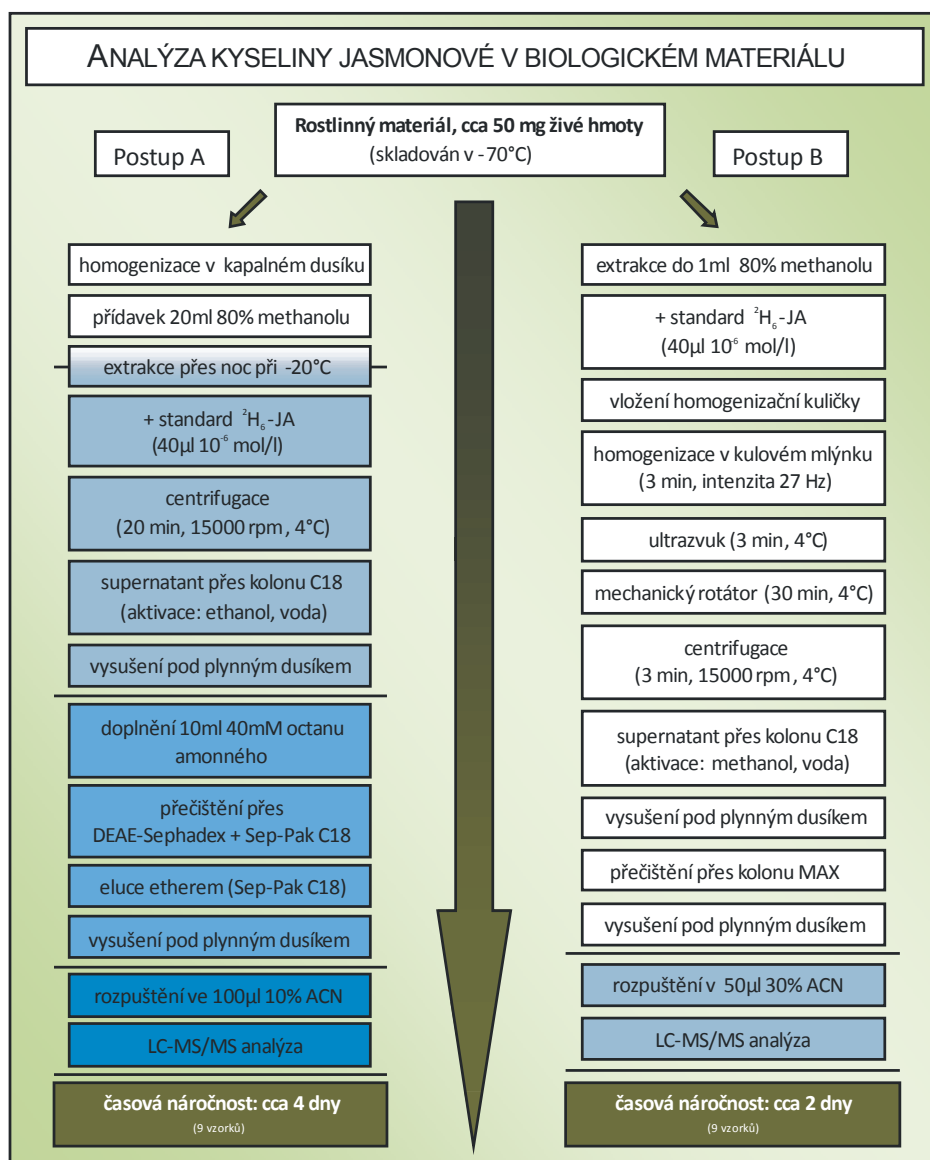
40 ml) byly postupně nanášeny na kolonu a eluát posbíráán do nových skleněných baněk umístěných pod C_{18} kolonami. Po nanesení celého objemu vzorku byl zbytek analytu vypláchnut z baňky 4 ml 80% methanolu a i tento objem protlačen přes C_{18} kolonu. Baňky byly poté uloženy ve vodní lázni (37 °C) a vzorky sušeny pod plynným dusíkem do "vodné fáze" (asi do objemu 8–9 ml) po dobu okolo dvou hodin. Pro další část purifikace byly připraveny DEAE-Sephadex kolony, které byly promyty 2×4 ml deionizované vody a aktivovány 2×4 ml 40 mM octanu amonného. Tyto kolony byly spojeny s C_{18} patronami (Sep-Pak[®], 360 mg) propláchnutými 10 ml 96% ethanolu, 10 ml deionizované vody a 10 ml 40 mM octanu amonného. Vzorky po vysušení na vodnou fázi byly doplněny 10 ml 40 mM octanu amonného a naneseny na DEAE-Sephadex kolony, kterými volně prokapávaly přes C_{18} patrony. Do prázdných baněk se zbytky vzorků bylo přidáno dalších 10 ml 40 mM octanu amonného a naneseno opět na kolonu. Poté byly analyty z jednotlivých C_{18} patron eluovány 2 ml diethyletheru (99%) za vzniku dvou fází. Spodní fáze byly ze zkumavek odsáty pipetou a zbývající horní fáze byly vysušeny pod plynným dusíkem (během 15 minut). Vzorky byly připraveny pro LC-MS/MS analýzu rozpuštěním odparku v 50 μl 10% acetonitrilu a následováním přefiltrováním přes mikrofiltr (0,45 μm).

Postup přípravy vzorku B (Mikroextrakce \rightarrow C_{18} \rightarrow MAX)

K připravenému rostlinnému materiálu (cca 50 mg ve 2ml mikrozskumavkách) byl napipetován 1 ml 80% methanolu (-20 °C), přidán vnitřní deuterovaný standard (40 pmol $^2\text{H}_6\text{-JA}$ /vzorek) a vložena jedna homogenizační kulička. Vzorek byl homogenizován ve vibračním kulovém mlýnku (3 min, intenzita 27 Hz), poté umístěn na 3 min do ultrazvuku a během následující půl hodiny promícháván pomocí mechanického rotátoru v lednici při 4 °C. Následně provedená centrifugace splňovala tyto parametry – čas 3 min, teplota 4 °C, otáčky 15 000 rpm. Získaný supernatant byl odpipetován a původní sediment byl opět



Obr. 1. Schéma studovaného lokálního stresu listů Huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*)



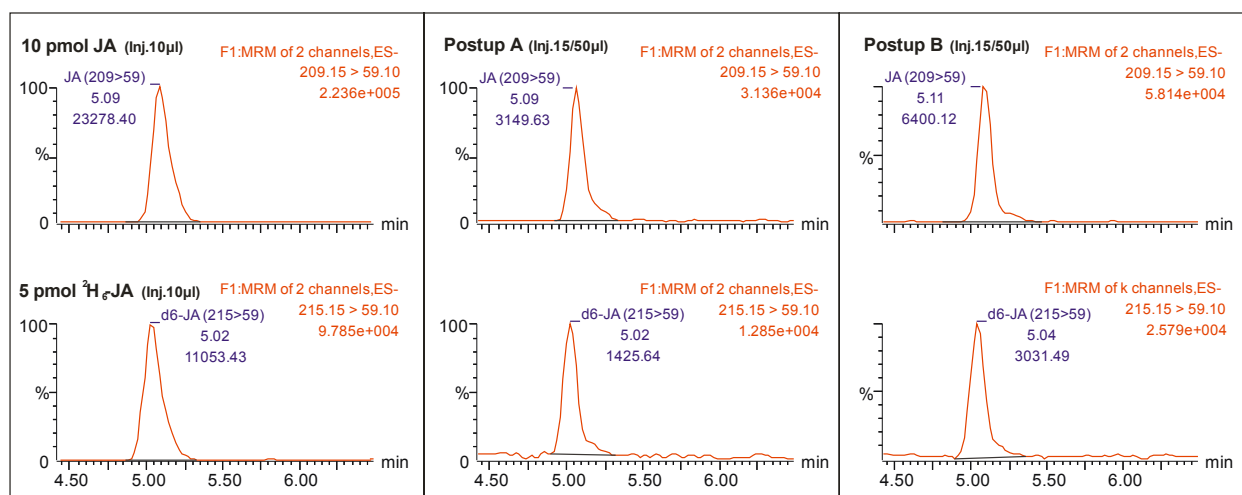
Obr. 2. Schéma popisovaných postupů extrakce a purifikace A a B s naznačenou časovou náročností

reextrahován za stejných podmínek. Sekundární supernatant byl posléze spojen s primárním. Vzorek byl postupně nanesen na zaktivované kolony C₁₈ (100 mg/1 ml; aktivace 2 ml 99,9% methanolu a 2 ml deionizované vody) a protlačený eluát odpařen pod plynným dusíkem na vodnou fázi. Druhý krok purifikace byl proveden na Oasis[®] MAX SPE koloně (30 mg/1 ml). Nejprve byla kolona solvatována 1 ml 99,9% methanolu, ekvilibrována nanesením 1 ml 5% amoniaku (V/V, vodný roztok) a následně propláchnuta 1ml deionizované vody. Po nanesení vzorku, ke kterému byl přidán 1 ml 5% amoniaku za důkladného promíchání a ultrazvuku, byl analyt navázán na médium v koloně a propláchnut 2 ml 5% amoniaku a posléze 2 ml 99,9% methanolu. V posledním kroku purifikace bylo cíleně změ-

něno pH za pomoci 3 ml 2% mravenčí kyseliny v methanolu (V/V) a analyt byl uvolněn z kolony. Vzorek byl odpařen do sucha pod plynným dusíkem a připraven k analýze na LC-MS/MS rozpuštěním v 50 μl 30% acetonitrilu.

Výsledky a diskuse

Jasmonová kyselina patří mezi sloučeniny, které jsou schopné lehce odštěpovat proton, a proto je elektrosprej v negativním módu vhodnou ionizační technikou při LC-MS/MS analýze⁶. Na začátku je fytohormon separován od



Obr. 3. Iontové chromatogramy sledovaných MRM přechodů u směsi standardů JA/²H₆-JA (o koncentraci 10 pmol/5 pmol) a záznamy reálných vzorků (cca 50 mg živé hmoty) při testu purifikačních protokolů A a B s přidavkem stejné směsi

ostatních látek (možných interferencí) obsažených v reálném vzorku na reverzní fázi a posléze detegován na základě selektivního MRM módu – sledování produktu rozpadu iontu – probíhajícího v tandemovém hmotnostním spektrometru⁷. Interní standard pro daný analyt automaticky koriguje možné ztráty během úpravy rostlinného materiálu a je zároveň použit při kvantifikaci JA metodou izotopového zředování⁸. Ve shodě s dříve publikovanými výsledky⁹ byl tedy pro JA i ²H₆-JA nalezen charakteristický MRM přechod 209 > 59 a 215 > 59. Na koloně Jupiter C4 byla za daných podmínek získána rychlá a robustní separace s velmi dobrou stabilitou retenčních časů 5,11±0,02 min pro JA a 5,04±0,02 min pro ²H₆-JA (obr. 3). Bylo dosaženo linearit v rozsahu čtyř řádů s koeficientem determinace R² 0,9997. Limita detekce byla definována jako trojnásobek poměru signál/šum a byla stanovena na hladině 25 fmol/nástřík. Limita kvantifikace (signál/šum = 10) se shodovala s nejnižším prvním bodem kalibrace a dosahovala hodnot 50 fmol/nástřík.

K porovnání jednotlivých aplikovaných protokolů (obr. 2) byla zvolena metoda standardních přidavků pro dva typy vzorků – v první sadě vzorků byla použita pouze směs standardů JA/²H₆-JA v množství 10 pmol/5 pmol ve vzorku; druhá sada byla tvořena navázkou cca 50 mg listů 36denní *Arabidopsis thaliana* opět s přidavkem směsi JA/²H₆-JA. Byla počítána návratnost známého přidaného množství jasmonové kyseliny a pomocí metody izotopového zředování také celková analytická přesnost a správnost testovaných postupů (tabulka I). Postup A (Extrakce -> C₁₈-> DEAE-Sephadex + C₁₈) poskytl u vzorků obsahujících pouze směs standardů JA/²H₆-JA relativně nízkou návratnost 41 %. U vzorků obsahujících nestresovaný rostlinný materiál (s velmi nízkou přirozenou hladinou jasmonové kyseliny) s přidáním směsi standardů JA/²H₆-JA byla návratnost procentuálně podobná (37 %). Tento postup byl

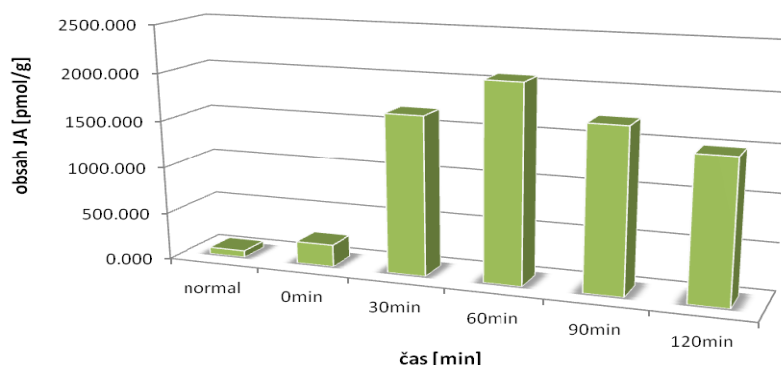
časově i svými požadavky na zručnost velmi náročný. Příprava vzorku pro analýzu LC-MS/MS (od surového rostlinného materiálu po poslední bod ve výše popsaném postupu) trvala 4–5 dní (obr. 2). Postup B (Mikroextrakce -> C₁₈-> MAX) při první sadě vzorků, které obsahovaly pouze 10 pmol/5 pmol JA/²H₆-JA, poskytl vysokou návratnost 99 %. Tyto hodnoty vycházely velmi podobně i u vzorků, které obsahovaly nejen směs JA/²H₆-JA, ale i nestresované listy rostliny *A. thaliana* (93 %). Postup B byl časově úspornější o 40–50 % než postup A. Příprava vzorku (od surového rostlinného materiálu po poslední bod ve výše popsaném postupu) trvala 2 až 3 dny v závislosti na počtu vzorků (obr. 2). Také vypočtená přesnost a správnost nového postupu B vykazovala lepší hodnoty v porovnání s dříve publikovaným postupem A u obou typů vzorků (tabulka I). Získané výsledky ukázaly jednoduchost a rychlost mikroextrakčního protokolu (Postup B) bez ztráty citlivosti a většího rušivého vlivu možných interferencí z reálného materiálu pro navazující LC-MS/MS analýzu. Limita detekce pro JA přepočtená na živou hmotu *A. thaliana* byla stanovena na hladině 0,25 pg JA v 1 gramu reálného vzorku. Naše metoda tedy poskytovala podobné či lepší výsledky jako jiné publikované práce používající zjednodušené purifikace^{9–12}.

Druhá část měření byla soustředěna na stanovení závislosti mezi obsahem JA v listech rostliny *Arabidopsis thaliana* a časem, který uplynul po lokálním poranění. Získaný rostlinný materiál posbíraný v 30minutových intervalech byl extrahován a purifikován postupem B (80% methanol -> C₁₈-> MAX) a v praxi tak byla prokázána jeho použitelnost pro analýzu JA. Výsledky naznačily, že lokální stres na rostlině aktivuje obranný mechanismus, jehož součástí je syntéza jasmonové kyseliny. Obsah JA v listech *A. thaliana* byl nejvyšší po šedesáti minutách od poranění (obr. 4). V tomto okamžiku byla hladina jas-

Tabulka I

Porovnání jednotlivých typů extrakce a purifikace metodou standardních přídavek. Test dvou typů vzorků – směs standardů JA/²H₆-JA o koncentraci 10 pmol/5 pmol a navážky cca 50 mg listů 36denní *Arabidopsis thaliana* opět s přídávkem směsi JA/²H₆-JA (počet opakování $n = 3$)

Typ vzorků	POSTUP A		POSTUP B	
	návratnost [%]	obsah JA [pmol/vzorek]	návratnost [%]	obsah JA [pmol/vzorek]
10pmol JA	54,22%	10,51	101,00%	10,26
	32,91%	8,92	93,38%	9,82
	34,83%	9,87	101,22%	10,44
	40,65±9,63%	9,77±0,65	98,53±3,64%	10,17±0,26
Přesnost, % RSD		6,7%		2,6%
Správnost, % bias		2,35		-1,70
<i>A.thaliana</i> + 10pmol JA	46,54%	8,24	85,98%	9,64
	34,69%	8,36	92,81%	10,39
	30,89%	9,22	99,67%	10,62
	37,38±6,67%	8,61±0,44	92,82±5,56%	10,22±0,42
Přesnost, % RSD		5,1%		4,1%
Správnost, % bias		13,92		-2,16



Obr. 4. Graf závislosti obsahu jasmonové kyseliny (pmol g⁻¹) na čase (0 až 120 min) po lokálním poranění listů 36denní *Arabidopsis thaliana*

monové kyseliny až 30krát větší (2076,3 pmol g⁻¹) než u rostliny, která nebyla stresována (70,2 pmol g⁻¹). Největší množství JA bylo rostlinou nasyntetizováno mezi časy nula a třicet minut po stresu (1681,2 pmol g⁻¹), kdy se hladina JA zvedla více než 7krát. Nalezený trend v biosyntéze jasmonové kyseliny ve druhé části měření se pohyboval v rozmezí dvou až tří koncentračních řádů a ukázal, že nový purifikační protokol pro nízké navážky v kombinaci s LC-MS/MS analýzou je použitelnou metodou pro sledování hladin jasmonové kyseliny u podobných biologických jevů. Naměřená data korespondovala s výsledky například publikovanými Panem a spol., kteří analyzovali v *Arabidopsis thaliana* celou škálu fytohormonů a stanovili největší obsah JA v čase 60 min po lokálním stresu¹². Také Tamogami a Kodama stanovovali metaboli-

ty jasmonové kyseliny v rostlinách *Oryza sativa* (rýže setá) a došli ke stejnému závěru – obsah metabolitů JA byl maximální v čase 60 minut po lokálním stresu³.

Závěr

Nově navržený postup extrakce v mikroměřítku kombinovaný s purifikací na směsných Oasis[®] MAX kolonách se zdá být nejen časově výhodný, ale i jeho návratnost (pohybující se kolem 90 %) je výborná. Konečné spojení s LC-MS/MS přináší rychlou a jednoduchou analýzu jasmonové kyseliny. Praktičnost tohoto postupu byla ověřena tvorbou závislosti obsahu JA na čase po lokálním stresu rostliny *Arabidopsis thaliana*. Obsah jasmonové kyseliny

je na maximum po 60 min od poranění listů testovaných rostlin.

Prezentovaná práce přinesla podrobný popis poprvé aplikovaného protokolu mikroextrakce a purifikace na MAX SPE kolonách pro analýzu se zaměřením na jasmonovou kyselinu. Výsledky naznačují vhodnost této metody pro sledování biosyntézy i metabolismu jasmonátů v různých biologických materiálech a experimentech. V rámci dalšího výzkumu bude zkoumáno univerzální použití mikroextrakce a purifikace na SPE kolonách ve smyslu analýzy různých typů fytohormonů současně – několik skupin biologicky aktivních látek stanovených v jednom extraktu – což by mělo přispět k další časové i finanční úspoře. Taková metoda bude vhodná pro sledování biosyntézy i metabolismu různých rostlinných hormonů v různých biologických materiálech a experimentech.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Akademie věd České republiky (projekt KAN200380801) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM6198959216).

LITERATURA

1. Saniewski M., Czapski J.: *Experientia* 39, 1373 (1983).
2. Wasternack C.: *Ann. Bot.* 100, 681 (2007).
3. Tamogami S., Kodama O.: *J. Chromatogr., A* 822, 310 (1998).
4. Zhang Y., Turner J. G.: *PLoS One* 3, e3699 (2008).
5. Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová M., Strnad M.: *Planta* 225, 235 (2006).
6. Kallenbach M., Baldwin I. T., Bonaventure G.: *Plant Methods* 5, 17 (2009).
7. Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: *Chem. Listy* 98, 834 (2004).
8. Rittenberg D., Foster, L.: *J. Biol. Chem.* 133, 727 (1940).
9. Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O., Miersch O., Sancho J. V., Gomez-Cadenas A. J.: *Agric. Food Chem.* 53, 8437 (2005).
10. Forcat S., Bennett M. H., Mansfield J. W., Grant M. R.: *Plant Methods* 4, 16 (2008).
11. Segarra G., Jauregui O., Casanova E., Trillas I.: *Phytochem.* 67, 395 (2006).
12. Pan X., Welti R., Wang X.: *Phytochem.* 69, 1773 (2008).

VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY PRO ANALÝZU ATORVASTATINU, ROSUVASTATINU A JEJICH METABOLITŮ S VYUŽITÍM UHPLC-MS/MS A MEPS PRO PŘÍPRAVU VZORKU

VERONIKA PILAŘOVÁ, HANA VLČKOVÁ,
PAVEL SVOBODA a LUCIE NOVÁKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského
1203, 500 05 Hradec Králové
Pilarovv@faf.cuni.cz

Úvod

Statiny jsou skupinou léčiv, která se využívá pro snížení hladiny cholesterolu v krvi. Zahrnují přírodní (lovastatin), polosyntetické (simvastatin, pravastatin) a syntetické látky (fluvastatin, cerivastatin, pitavastatin, atorvastatin a rosuvastatin). První statin (mevastatin) byl objeven a izolován jako metabolit houby *Penicillium citrinum*, ale nebyl v praxi využit. Další statiny byly poté získávány semisyntetickou a syntetickou cestou a v klinické praxi již našly využití. Statiny existují ve dvou různých formách – ve formě laktonu a otevřené hydroxykyseliny (obr. 1). Hydroxykyselina je vlastní aktivní formou, lakton musí být v organismu transformován na účinnou formu.

Účinek statinů spočívá v inhibici 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductasy, která je klíčovým enzymem endogenní syntézy cholesterolu především v hepatocytech. Vlivem statinů nedochází k přeměně

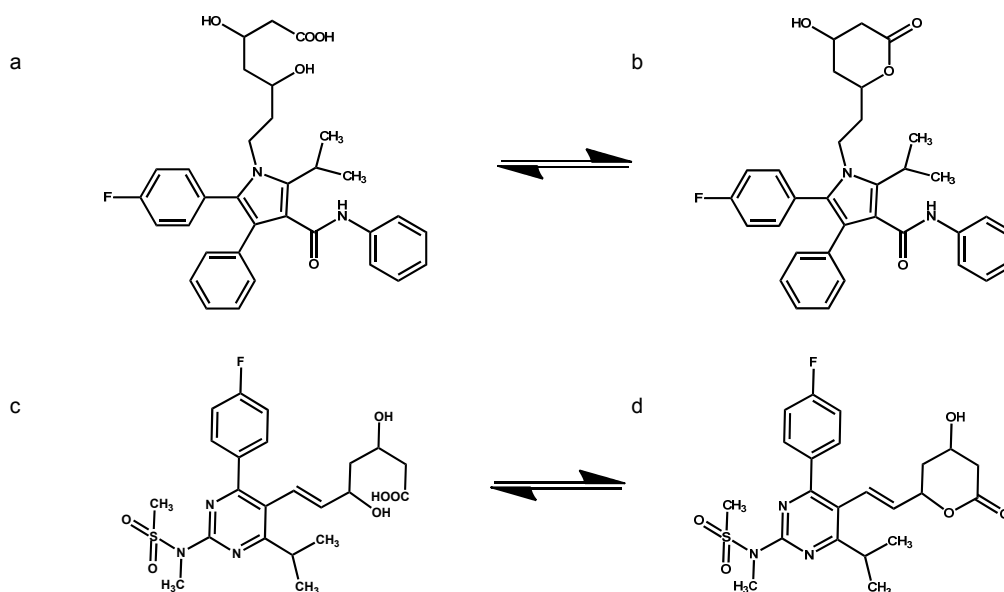
3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A na mevalonát a vzniku cílové molekuly cholesterolu. Snížením nitrobutné tvorby cholesterolu dochází ke zvýšené prezentaci proteinů LDL-receptorů na povrchu buněk a urychluje se tak vychytávání LDL částic z plazmy. Koncentrace LDL v krvi klesá. Zároveň dochází k nižší tvorbě VLDL částic v játrech a snížení koncentrace triacylglyceridů v krvi.

Statiny mají významné místo v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, jsou užívány pacienty trpícími metabolickým syndromem, hypercholesterolemií a koronárními chorobami.

Cílem práce bylo molekuly atorvastatinu, rosuvastatinu a jejich metabolitů selektivně identifikovat a kvantifikovat v biologickém materiálu. Tyto dva statiny byly zvoleny pro svoje výhodné farmakologické vlastnosti (dlouhý biologický poločas) a také proto, že patří k nejvíce využívaným statinům v klinické praxi v ČR. Rosuvastatin je navíc výhodný z toho důvodu, že minimálně ovlivňuje izoenzymy CYP-450, čímž dochází k eliminaci nežádoucích účinků a interakcí s jinými podávanými léčivými. Vyvinutá metoda poté poslouží pro rutinní analýzu biologických vzorků pacientů a stanovování hladin statinů¹⁻⁴.

Experimentální část

K práci byly použity standardy následujících látek: atorvastatin, atorvastatin-d₅, atorvastatin laktón, *p*-hydroxykyselina atorvastatinu, *o*-hydroxykyselina ator-



Obr. 1. a) atorvastatin; b) atorvastatin laktón; c) rosuvastatin; d) rosuvastatin laktón

Tabulka I
Optimální podmínky pro SRM

Analyty	Způsob ionizace	Prekurzorové ionty	Fragmenty	Dwell Time	Cone Voltage	Kolizní energie	t_R
RV	ESI–	479,8	418,2	0,1	30	15	2,28
DES RV	ESI–	465,8	404,1	0,1	30	15	0,99
RV-d ₆	ESI–	485,8	424,2	0,1	30	15	2,29
RVL	ESI+	463,9	270,0	0,05	50	35	3,57
AT-d ₅	ESI–	562,1	283,3	0,1	40	40	4,24
p-OH-AT	ESI–	573,1	413,1	0,1	35	30	2,27
o-OH-AT	ESI–	573,1	278,3	0,05	40	40	3,90
AT	ESI–	557,1	278,3	0,1	40	40	4,26
ATL	ESI–	539,2	278,2	0,05	30	40	5,28
PV	ESI–	422,9	321,3	0,1	30	15	1,21

DES RV = desmethylrosuvastatin, RV = rosuvastatin, RVL = rosuvastatin lakton, p-OH-AT = *p*-hydroxykyselina atorvastatinu, o-OH-AT = *o*-hydroxykyselina atorvastatinu, AT = atorvastatin, ATL = atorvastatin lakton, RV-d₆ = rosuvastatin-d₆, AT-d₅ = atorvastatin-d₅, PV = pravastatin

vastatinu, rosuvastatin, rosuvastatin-d₆, rosuvastatin lakton, desmethylrosuvastatin a pravastatin. Tyto standardy byly získány u Toronto Research Chemicals, Kanada, pravastatin u Sigma-Aldrich, Praha.

Pro přípravu mobilní fáze byla použita rozpouštědla: ultračistá voda vyrobená na Farmaceutické fakultě, Milipore, před použitím byla přefiltrována; acetonitril – acetonitrile, LC-MS Chromasolv, minimum 99,9%, Sigma-Aldrich; octová kyselina – acetic acid, minimum 99,9%, Sigma-Aldrich; amoniak – ammonium hydroxide solution pro LC-MS, minimum 25% ve vodě, Sigma-Aldrich.

Úprava vzorků byla prováděna pomocí MEPS stříkačky o kapacitě 500 μ l (SGE Analytical Science), sorbentu C8 MEPS BIN pro XCHANGE® a ruční automatické eVol® pipety (SGE Analytical Science).

Pro separaci byl použit Acquity UPLC systém (Waters), analytická kolona Acquity BEH C18 (50 \times 2,1 mm, 1,7 μ m, Waters), gradientová eluce s použitím mobilní fáze ACN:0,5 mM octan amonný pH 4,0, průtok 0,3 ml min⁻¹, nástřik 5 μ l. Pro tandemovou hmotnostní detekci byl použit hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupólu Quattro Micro, Waters. Pro zpracování dat byl použit software MassLynx. Pro hmotnostní detekci byla použita ionizační technika ionizace elektrosprejem v negativním i pozitivním módu – ESI⁻/ESI⁺. Iontový zdroj byl nastaven v ESI takto: napětí na kapiláře 2,5 kV, teplota iontového zdroje 130 °C, extrakční kužel 1,0 V, hexapól 0,5 V. Nebulizačním plynem byl dusík o průtoku 650 l h⁻¹ a o teplotě 450 °C. Na vstupním kuželu byl také použit dusík o průtoku 70 l h⁻¹. Napětí na vstupním kuželu (Cone Voltage) bylo nastaveno pro každý analyt zvlášť (viz tab. I).

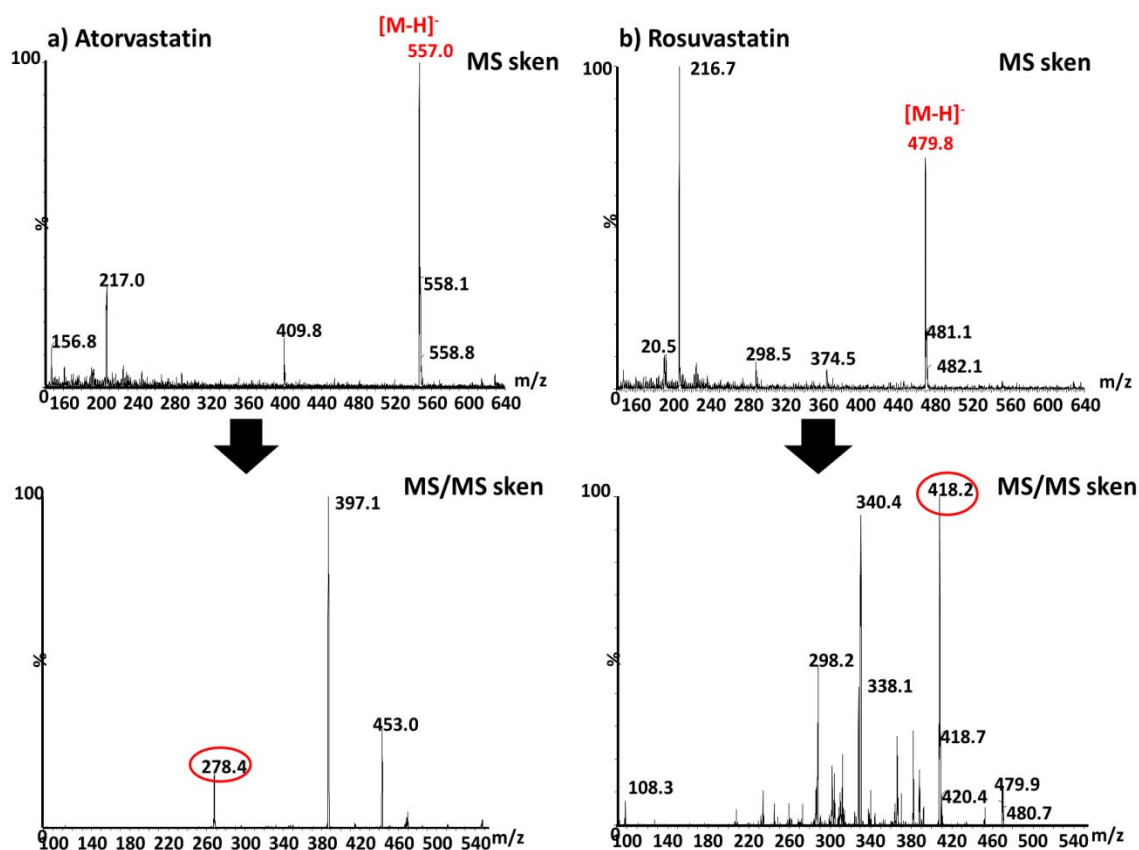
Kvantifikace všech analytů byla provedena s využitím SRM (Selected Reaction Monitoring) experimentu, kdy pro každou látku byly vybrány ionty prekurzoru, fragmentu a optimalizována kolizní energie (tab. I).

Výsledky a diskuse

Pro separaci analytů byl využit UHPLC systém. UHPLC analýza byla prováděna na analytické koloně Acquity BEH C18 (50 \times 2,1 mm, 1,7 μ m, Waters) pro získání vysoké účinnosti separace a rychlé analýzy. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5 mM octanu amonného o pH 4,0. Byla použita gradientová eluce o počátečním složení acetonitril: octan amonný (30:70). Octan amonný je důležitý pro zvýšení účinnosti ionizace a následně citlivosti metody. Hodnota pH v rozmezí 4,0–5,0 je klíčová pro zamezení interkonverze analytů z laktonové formy na kyselou a opačně. Proto byl pufr o pH 4,0 resp. 4,5 používán v průběhu celé analýzy (příprava vzorků, standardů, úprava vzorků a chromatografie).

Pro MS/MS detekci byly nejprve podrobně optimalizovány podmínky v pozitivním a negativním záznamu ESI. Byly vybrány prekurzorové ionty i fragmenty pro SRM kvantifikaci v obou módech. Pro každou látku byly zjištěny optimální podmínky pro SRM (viz tab. I). Následně byly změřeny kalibrační křivky a na základě citlivosti, linearit a opakovatelnosti metody bylo pro kvantifikaci všech analytů vybráno sledování prekurzorů [M-H]⁻ kromě rosuvastatinu laktonu, pro který byl zvolen ion [M+H]⁺.

Příklad MS spekter v ESI⁻ a MS/MS spekter v ESI⁻ pro atorvastatin a rosuvastatin je na obr. 2. Byl proveden



Obr. 2. MS a MS/MS spektrum iontů v negativním záznamu ESI pro a) atorvastatin; b) rosuvastatin

test způsobilosti systému na třech koncentračních hladinách, a to 10, 100 a 500 nmol l⁻¹ pro všechny stanovované látky (viz tab. II). Opakovatelnost retenčních časů byla < 1 % pro všechny analyty. Opakovatelnost plochy píku byla < 5 % pro všechny analyty. Ukázka separace směsi standardů je uvedena na obr. 3.

Podmínky uvedené v tab. I byly použity pro vývoj a optimalizaci metody MEPS. MEPS je v podstatě miniaturizované provedení techniky extrakce na tuhou fázi SPE. Optimalizace tedy zahrnuje optimalizaci roztoků používaných při izolaci léčiva pomocí této metody (složení promývacího a elučního činidla, koncentrace pufrů). Největším problémem byla optimalizace elučního činidla, kde byly vyzkoušeny roztoky o různých poměrech acetonitrilu a 0,1 M octanu amonného pH 4,5 v rozmezí 75:25 – 100:0, a promývacího činidla, kde se vyzkoušely roztoky o poměrech acetonitrilu a 0,01 M octanu amonného pH 4,5 v rozmezí 25:75–0:100. Tento problém byl způsoben velmi různou polaritou hodnocených látek. Po vyhodnocení výsledků bylo vybráno eluční činidlo acetonitril: 0,1 M octan amonný pH 4,5 o poměru 95:5 a promývací činidlo acetonitril: 0,01 M octan amonný pH 4,5 o poměru 5:95.

Metoda byla zvalidována v souladu s ICH směrnici.

Pro kvantitativní hodnocení byla použita metoda vnitřního standardu s využitím stabilních izotopicky značených vnitřních standardů (atorvastatin-d₅ pro atorvastatin, atorvastatin lakton, hydroxykyseliny atorvastatinu, rosuvastatin lakton; rosuvastatin-d₆ pro desmethylrosuvastatin a rosuvastatin; pravastatin byl zkoušen jako vnitřní standard pro desmethylrosuvastatin, ale lepší výsledky byly dosaženy s rosuvastatinem-d₆).

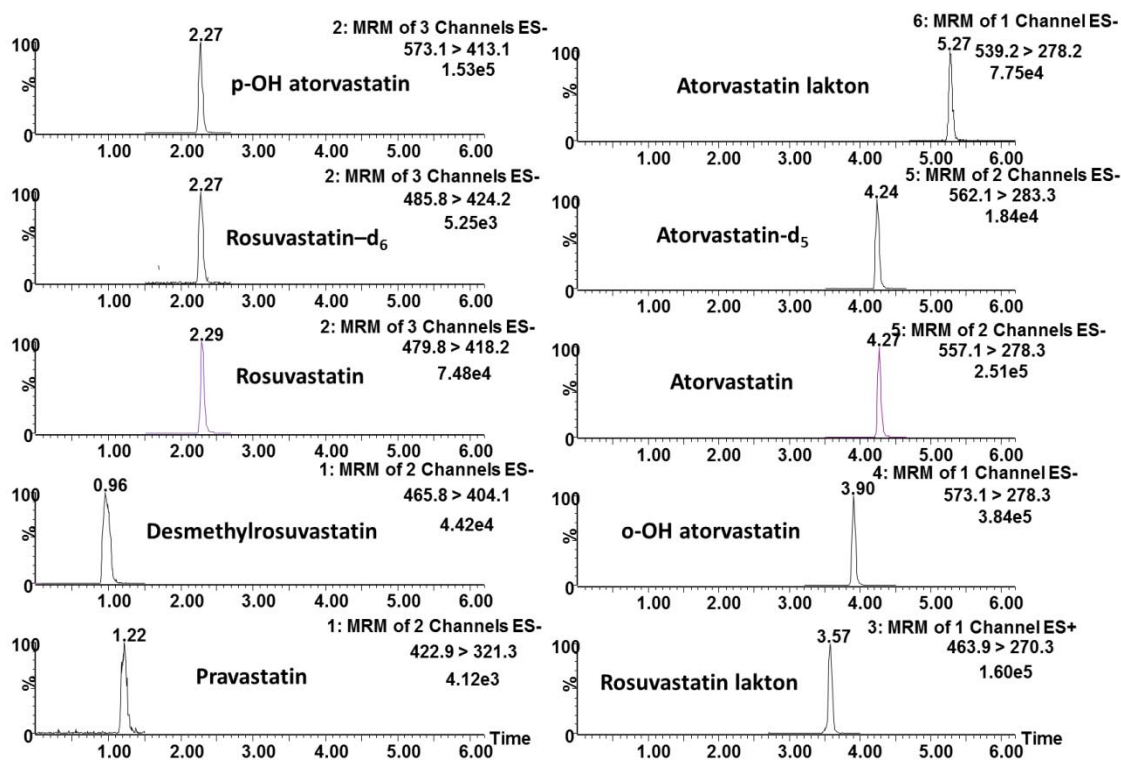
Ověřeny byly všechny validační parametry (linearita, správnost, přesnost, matricové efekty, selektivita, limit detekce a limit kvantifikace), viz tab. III. Linearita byla ověřována pro všechny analyty pomocí standardní kalibrační křivky v rozsahu 0,1–1000 nmol l⁻¹ a v tom samém rozsahu také na základě matricové kalibrační křivky. Korelační koeficienty pro všechny analyty byly > 0,999 s výjimkou atorvastatinu (0,998).

Pro správnost a přesnost metody byly proměřeny vzorky na třech koncentračních hladinách, měření bylo zopakováno ve třech dnech. K ověření matricových efektů a správnosti metody byly použity tři různě připravené vzorky pro každý analyt, a to standard látky, blankové sérum obohacené analyty a upravené MEPS metodou a blankové sérum upravené metodou MEPS a obohacené

Tabulka II
Test způsobilosti systému

Analyty	RSD- t_R [%]			RSD – plocha píku [%]		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
RV	0,13	0,10	0,11	1,34	1,32	2,88
DES RV	0,25	0,31	0,46	3,29	1,84	2,11
RVL	0,13	0,01	0,11	3,21	2,89	3,96
p-OH-AT	0,11	0,12	0,00	2,51	1,37	2,08
o-OH-AT	0,20	0,24	0,07	2,19	1,40	2,41
AT	0,10	0,08	0,04	2,05	0,94	2,56
ATL	0,07	0,07	0,09	3,86	0,83	2,27
PV	0,00	0,00	0,62	2,08	1,25	3,77

DES RV = desmethylrosuvastatin, RV = rosuvastatin, RVL = rosuvastatin lakton, p-OH-AT = *p*-hydroxykyselina atorvastatinu, o-OH-AT = *o*-hydroxykyselina atorvastatinu, AT = atorvastatin, ATL = atorvastatin lakton, PV = pravastatin, L1, L2, L3 = koncentrace 10, 100 a 500 nmol l⁻¹



Obr. 3. Záznam SRM přechodů pro zjišťované analyty ve formě standardů

Tabulka III

Validace metody pro analýzu atorvastatinu a rosuvastatinu z biologického materiálu

Validace metody		DES RV	RV	RVL	p-OH AT	o-OH AT	AT	ATL
Linearita (R^2) – matricová kalibrační křivka		0,9991	0,9996	0,9990	0,9997	0,9993	0,9998	0,9982
Linearita (R^2) – kalibrační křivka standardu		0,9991	0,9998	0,9995	0,9991	0,9996	0,9998	0,9998
Správnost metody, %	L1	104,4	102,1	113,2	84,7	71,0	100,0	94,5
	L2	99,9	102,5	119,6	85,5	77,0	103,3	92,9
	L3	109,7	113,7	122,1	101,1	85,1	110,2	100,2
Přesnost metody, RSD %	L1	1,9	0,6	0,5	1,4	3,4	1,4	2,7
	L2	4,0	5,2	2,1	5,4	2,7	2,7	5,6
	L3	3,3	7,3	14,8	3,6	12,5	6,6	6,9
Matricové efekty, %	L1	96,0	100,4	98,8	98,0	99,4	102,3	99,3
	L2	94,1	100,2	97,0	98,3	95,9	98,1	93,9
	L3	105,1	99,4	99,6	89,7	95,7	98,3	89,9
LOD, nmol l ⁻¹		1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1
LOQ, nmol l ⁻¹		2,5	1	1	1	0,5	1	2,5

DES RV = desmethylrosuvastatin, RV = rosuvastatin, RVL = rosuvastatin lakton, p-OH-AT = *p*-hydroxykyselina atorvastatinu, o-OH-AT = *o*-hydroxykyselina atorvastatinu, AT = atorvastatin, ATL = atorvastatin lakton, L1, L2, L3 = koncentrace 500, 50 a 5 nmol l⁻¹, LOD, LOQ = hodnoty pro matricovou kalibrační křivku

analyty. Z výsledků plyne, že analyty nejsou matricovými efekty výrazně ovlivněny. Přesnost a správnost metody byla ověřena na třech koncentračních hladinách s mezidenní přesností <15 % a výtěžností v rozsahu 70 až 125 % pro všechny analyty. Dostatečná citlivost s LOQ 0,5–2,5 nmol l⁻¹ umožňuje využití této techniky v monitorování hladin atorvastatinu, rosuvastatinu a jejich metabolitů v biologických tekutinách.

Závěr

Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení atorvastatinu, rosuvastatinu a jejich metabolitů v biologickém materiálu (sérum) s využitím stabilních izotopicky značených vnitřních standardů. Byly optimalizovány jednotlivé kroky analýzy MEPS-UHPLC-MS/MS a provedena validace. Vyvinutá metoda byla rychlá a poskytovala přesné a správné výsledky. Spojení MESP a UHPLC umožňuje snížit spotřebu vzorku i rozpouštědel jak v kroku přípravy vzorku, tak v kroku vlastní analýzy. Obě metody také umožňují časovou úsporu a větší prostupnost vzorků v laboratoři. Tato metoda bude nyní využita pro analýzu vzorků pacientů, kteří užívají analyzované statiny.

Autorka děkuje za zadání zajímavé práce, odbornou konzultaci, vedení, poznatky a čas Doc. PharmDr. Lucii Novákové Ph.D. a Mgr. Haně Vlčkové.

LITERATURA

1. Nováková L., Šatínský D., Solich P.: Trends Anal. Chem. 27, 352 (2008).
2. Hing-Biu Lee, Peart T. E., Lewina Svoboda M., Bacus S.: Chemosphere 77, 1285 (2009).
3. Martinková J. a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Grada, 2007.
4. Lüllman H., Mohr K., Hein L.: *Barevný atlas farmakologie*, 3. české vydání, Grada, 2007.

CHEMOMETRIA FLUORESCENČNEJ SPEKTROMETRIE – URČOVANIE PRAVOSTI BRANDY

ROMAN POLÁČEK, PAVEL MÁJEK a JANA SÁDECKÁ

*Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
rmap09@gmail.com*

Úvod

V posledných rokoch sa kladie veľký dôraz na autentifikáciu potravín, či už na ich geografický pôvod alebo na originalitu. Medzi významné oblasti patria vína a vínne produkty, ako je napríklad brandy a víny destilát. Brandy je liehovina vyrobená z víneho alkoholu s minimálnym obsahom 94,8 % za predpokladu, že tento destilát tvorí maximálne 50 % objemu konečného výrobku, ktorý nesmie obsahovať víny destilát. Zreje po dobu najmenej jedného roku v dubových sudoch o objeme 1000 litrov, prípadne väčších, alebo minimálne šesť mesiacov o objeme menšom ako 1000 litrov. Víny destilát je liehovina vyrábaná destiláciou vína alebo alkoholizovaného vína s minimálnym obsahom 86 % alkoholu. Víny destilát nesmie obsahovať pridaný etylalkohol poľnohospodárskeho pôvodu¹. Z uvedených charakteristík vyplývajú rozdiely v pridanej hodnote jednotlivých výrobkov ako i možnosť falšovania brandy prídavkom víneho destilátu, čím sa umelo zvýši produkcia brandy a tým aj zisk.

Fluorescenčná spektroskopia je rýchla a lacná metóda, ktorej spektrá obsahujú chemické, fyzikálne a štruktúrne informácie o rôznych zložkách a javoch vo vzorke, teda analytická informácia obsiahnutá vo fluorescenčnom spektre je už svojou podstatou viacrozmerná, a preto je jej spojenie s viacrozmernou analýzou viac než žiaduce.

V uvedenej práci, sme sa snažili vyvinúť rýchlu a lacnú metódu na autentifikáciu brandy, pomocou fluorescenčnej spektroskopie v spojení s viacrozmernou kalibráciou viaczložkových zmesí.

Experimentálna časť

Prístroje a zariadenia

Na meranie fluorescenčných spektier sa použil Perkin-Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer s Xe lampou. Spektrometer bol spojený s počítačom a na zber údajov a spracovanie spektier sa použil FL Data Manager Software (Perkin-Elmer).

Meranie fluorescenčných spektier

Vzorky destilátov sa merali v dvoch geometriách, v pravouhlej geometrii (RG) a z povrchu (FFG). V RG sa meralo v rozsahu vlnových dĺžok 485–580 nm, pričom excitačná vlnová dĺžka sa nastavovala od 363 do 483 nm s krokom 8 nm. Pri FFG sa meralo v rozsahu vlnových dĺžok 450–545 nm pričom excitačná vlnová dĺžka sa nastavovala od 328 do 440 nm s krokom 8 nm. Pri oboch geometriách bola šírka excitačnej a emisnej štrbiny monochromátora 5,0 nm; rýchlosť skenovania bola 200 nm/min.

Vzorky

Pre kalibračný a testovací súbor sa namerali emisné fluorescenčné spektrá zmesi Karpatského brandy (ďalej označovaného ako víny destilát – vd) a Karpatské brandy špeciál (ďalej označovaného ako brandy). Trojrozmerná fluorescenčná excitačno-emisná dátová matica (3D EEM) sa použila na zostrojenie a testovanie modelu paralelnej faktorovej analýzy (PARAFAC) ako aj na výpočet kalibračnej závislosti. Následne sa zmeralo 5 náhodne vybraných brandy, ktoré boli zakúpené v supermarkete.

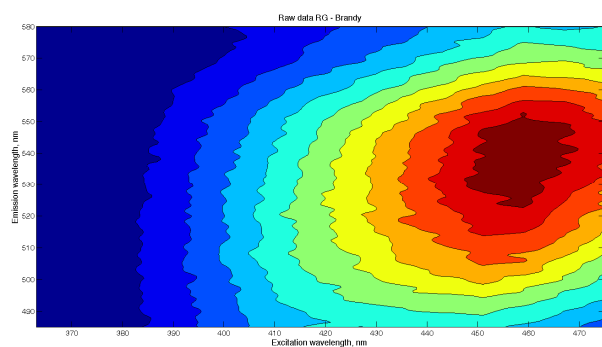
Viacrozmerná analýza

Z nameraných spektier sa pre kalibračné a testovacie roztoky ako i pre vzorky vytvorili excitačno-emisné dátové matice (EEM), ktoré sa kombinovali do vstupnej 3D EEM pre model PARAFAC. Vhodnosť modelu PARAFAC navrhnutého z kalibračnej matice sa otestovala použitím testovacieho súboru. Rozkladom získané jednotlivé faktorové skóre modelu sa použili ako vstupné parametre do lineárnej viaczložkovej kalibrácie – použila sa viacnásobná lineárna kalibrácia (MLR) a metóda čiastočne lineárnych štvorcov (PLS1).

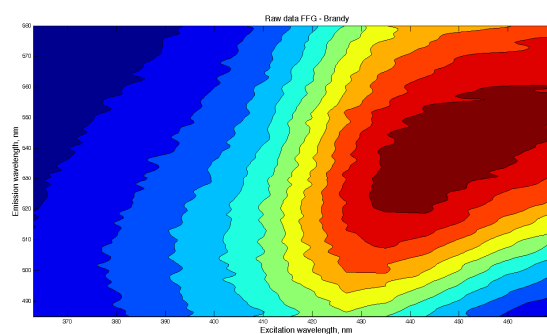
Na vyhodnotenie sa použil softvér Microsoft Office Excel 2010, Statistica version 7.0 (StatSoft, USA, 2004), MATLAB verzia 7.0 (The MathWorks Inc., USA, 2005) a PLS_Toolbox verzia 6.0 (Eigenvector Research Inc., USA, 2010).

Výsledky a diskusia

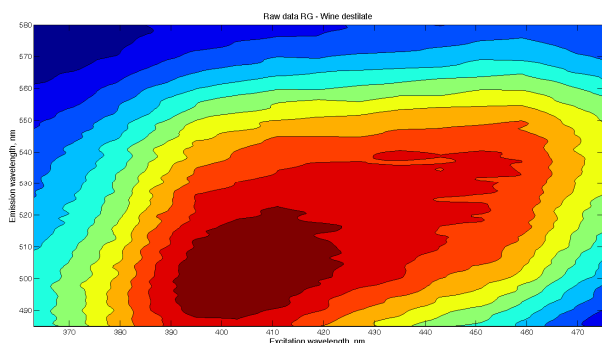
Podľa vizuálneho hodnotenia vrstevnicových máp, ktoré boli namerané pre čisté látky – brandy (obr. 1) a víny destilát (obr. 2) pri RG sa dá očakávať, že navrhnutý PARAFAC model bude mať dobrú predikčnú schopnosť, pre dostatočne oddelené fluorescenčné maximá v excitačných a emisných vlnových dĺžkach. V prípade FFG pre čisté látky – brandy (obr. 3) a víny destilát (obr. 4) môžeme predpokladať, že navrhnutý model bude



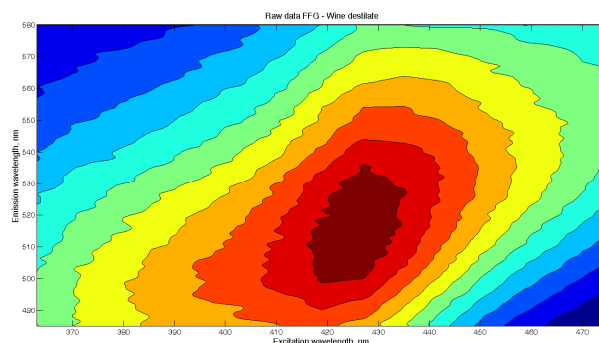
Obr. 1. RG vrstevnicová mapa excitačno-emisného spektra brandy



Obr. 3. FFG vrstevnicová mapa excitačno-emisného spektra brandy



Obr. 2. RG vrstevnicová mapa excitačno-emisného spektra vínneho destilátu



Obr. 4. FFG vrstevnicová mapa excitačno-emisného spektra vínneho destilátu

poskytovať menej presnú predikciu, pretože fluorescenčné maximá pre vínný destilát a brandy sú v tesnej blízkosti excitačných vlnových dĺžok a prekrývajú sa v oblasti emisných vlnových dĺžok.

Pre obidve geometrie sa pripravilo 21 štandardných roztokov, 10 testovacích roztokov a 5 vzoriek. Z nameraných EEM sa pripravili 3D EEM vstupné matice pre model PARAFAC. Vzhľadom na časovú náročnosť výpočtov modelu sa použili redukované 3D matice. Z kalibračnej matice sa navrhol model PARAFACu, kde počet faktorov sa určil na základe hodnoty presnosti "core consistency" (popisuje percento celkovej informácie vstupnej matice), ktorá pre obe geometrie (FFG_model a RG_model) bola väčšia ako 98 %. Potom sa oba modely testovali testovacími 3D redukovanými maticami – hodnota presnosti pre FFG_model a RG_model bola väčšia ako 99 %.

Rozkladom získané jednotlivé faktorové skóre (I_1, \dots, I_n) FFG a RG kalibračného modelu sú vstupné parametre – prediktory do lineárnej MLR a PLS1 kalibrácie. Parametre kalibračných závislostí – regresné koeficienty, štandardné

chyby regresných koeficientov a korelačný koeficient sú uvedené v tabuľke I (FFG_MLR a FFG_PLS1) a v tabuľke II (RG_MLR a RG_PLS1). Zistilo sa, že ako pre FFG, tak aj pre RG sa lineárne závislosti pre MLR a PLS1 nelíšia (majú zhodné koeficienty regresie b_1 , b_2 a korelačný

Tabuľka I
Výsledky MLR a PLS1 kalibrácie pre meranie intenzity fluorescence z povrchu

Regresný koeficient	Hodnota	Štandardná chyba pre b	Korelačný koeficient
b_0 (MLR)	-49,327	25,533	0,989
b_1	0,085	0,004	
b_2	0,059	0,037	
b_0 (PLS1)	-49,327	24,685	0,989
b_1	0,085	0,085	
b_2	0,059	0,059	

Tabuľka II
Výsledky MLR a PLS1 kalibrácie pre meranie intenzity fluorescencie pri pravouhlej geometrii

Regresný koeficient	Hodnota	Štandardná chyba pre b	Korelačný koeficient
b_0 (MLR)	-181,311	11,575	0,997
b_1	0,449	0,027	
b_2	0,032	0,007	
b_0 (PLS1)	-181,311	12,717	0,997
b_1	0,449	0,029	
b_2	0,032	0,006	

koeficient), líšia sa však v absolútnom člene, kde regresný koeficient b_0 v RG_MLR je zaťažený menšou chybou. PLS1 regresie vo všeobecnosti budú mať horšiu predikčnú schopnosť, pretože dvoma faktormi popíšu iba 99,4 % celkového rozptylu údajov (tabuľka III).

Stanovenie obsahu vínneho destilátu v brandy

Namerali sa exitačno-emisné spektrá pre päť náhodne vybraných zahraničných vzoriek, na ktorých sa otestoval kalibračný model na stanovenie obsahu vínneho destilátu v brandy pre obe geometrie. Z rozkladu získané jednotlivé faktorové skóre z redukovanej 3D vstupnej matice pre FFG_model a RG_model sa použili na výpočet obsahu vínneho destilátu v brandy pre jednotlivé vzorky z kalibračných závislostí FFG_MLR, FFG_PLS1, RG_MLR a RG_PLS1.

Výsledky zo stanovenia obsahu vínneho destilátu v brandy pre neznáme vzorky sú uvedené v tabuľke IV a v tabuľke V.

Testovanie stanovenia prídavku vínneho destilátu v brandy v reálnych vzorkách ukázalo, že kalibračný model konštruovaný na faktorovom skóre je navrhnutý správne a je možné ho použiť v rámci zisťovania kvality výrobu jednotlivých producentov brandy ako aj vplyvu geografickej oblasti. Zistilo sa, že pravdepodobne nemožno jedným kalibračným modelom pokryť celú koncentračnú oblasť prídavku vínneho destilátu v brandy.

Tabuľka III
RG a FFG faktorová analýza pre PLS1

Faktor	Vysvetlená smerodajná odchýlka pre prediktory [%]	Kumulatívna hodnota [%]	Vysvetlená smerodajná odchýlka pre analyt [%]	Kumulatívna hodnota [%]
1	96,32	96,32	98,33	96,32
2	3,68	100,00	1,10	99,43

Tabuľka IV
Výsledky vzoriek pre meranie intenzity fluorescencie z povrchu

Vzorka	l_1	l_2	c_{vd} [obj. %]
FFG00	885,507	525,888	56,60
FFG01	537,493	588,215	30,69
FFG02	682,755	589,557	43,11
FFG03	274,490	597,299	8,89
FFG04	217,411	524,476	-0,21

Tabuľka V
Výsledky vzoriek pre meranie intenzity fluorescencie v pravouhlej geometrii

Vzorka	l_1	l_2	c_{vd} [obj. %]
RG00	326,050	259,613	-26,42
RG01	417,974	204,921	13,13
RG02	445,616	333,756	29,70
RG03	353,654	72,806	-20,03
RG04	293,612	20,889	-48,69

Záver

Navrhla sa metóda na stanovenie prídavku vínneho destilátu v brandy fluorescenčnou spektroskopiou v spojení s chemometrickým spracovaním údajov. Otestoval sa experimentálne vhodný spôsob geometrického usporiadania merania fluorescenčnej intenzity vzorky, ako aj model paralelnej faktorovej analýzy s následnou viacrozmernou lineárnou kalibráciou pre stanovenie jednotlivých analytov vo viacložkovom systéme súčasne. Ukázalo sa, že kalibračný model konštruovaný na faktorovom skóre je navrhnutý správne a je možné ho použiť v rámci zisťovania kvality výrobu jednotlivých producentov brandy ako aj vplyvu geografickej oblasti.

MLR kalibračné závislosti sú mierne presnejšie ako PLS1 modely. Na základe exitačno – emisných spektier ako i porovnaním FFG_MLR a RG_MLR kalibrácie je zrejmé, že pravouhlá geometria je vhodnejšia pre transparentné vzorky brandy, naopak experimentálne výsledky vzoriek preferujú jednoznačne FFG_MLR. Je veľmi prav-

depodobné, že správnu autentifikáciu brandy nemožno pokryť jedným kalibračným modelom. Z experimentu ďalej vyplýva, že kalibračný model je vhodný na autentifikáciu slovenského brandy, avšak nie je vhodný pre zahraničné značky.

V budúcnosti, by sme chceli vyvinúť metódu, ktorá by bola univerzálna na autentifikáciu ako slovenských, tak aj zahraničných produktov brandy.

Táto práca vznikla za podpory Vedeckej grantovej agentúry VEGA, projekt č. 1/0182/11.

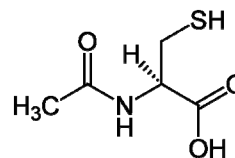
LITERATÚRA

1. Regulation (EC) No 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the Definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) No 1576/89. Official Journal of the European Union, 51(L39), 16–54.

PRESNÉ STANOVENIA AKTÍVNYCH ZLOŽIEK VO FARMACEUTICKÝCH PREPARÁTOCH KAPILÁRNOU ELEKTROFORÉZOU NA ČIPOCH

MARÍNA RUDÁŠOVÁ a MARIÁN MASÁR

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava
marina.rudasova@gmail.com

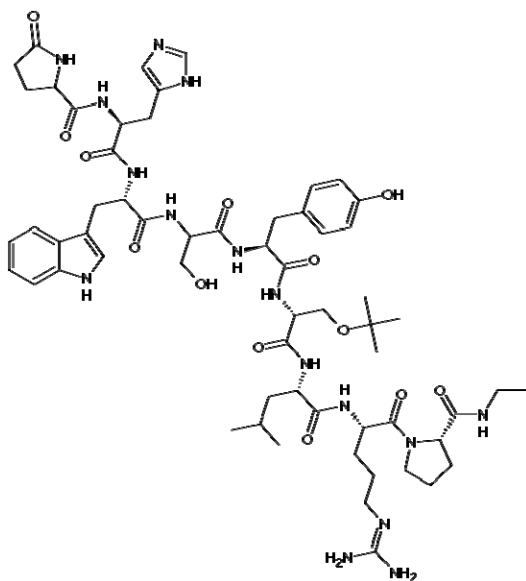


Obr. 2. Štruktúra *N*-acetylcysteínu

Úvod

V súčasnosti nachádzajú metódy kapilárnej elektroforézy (CE) významné uplatnenie vo farmaceutickom priemysle, napríklad v analýze biofarmaceutík. Kontrola farmaceutických preparátov všeobecne zahŕňa dva prístupy a to stanovenie hlavných zložiek (majoritne zastúpené zložky) a stanovenie prímiesí a nečistôt (minoritne zastúpené zložky) v preparáte. Analýza farmaceutík za účelom stanovenia hlavnej zložky vyžaduje použitie analytickej metódy s vysokou separačnou kapacitou; požiadavky na detekčný limit však nie sú kritické. Jednou z CE techník, ktorá spĺňa tieto požiadavky, je izotachofóza (ITP), ktorá bola použitá v tejto práci.

Buserelin octan (obr. 1) je synteticky vyrábaný nonapeptid, ktorý sa používa na liečbu rôznych druhov rakoviny, predovšetkým rakoviny prostaty. Má schopnosť blokovat produkciu pohlavných hormónov, čím ničí hormonálne prostredie potrebné pre delenie rakovinomerných buniek, a zároveň ich aj priamo atakuje. Týmto spôsobom môže byť tvorba nádorov závislých na hormónoch pozastavená, príp. nádor môže byť zničený¹.



Obr. 1. Štruktúra Buserelin octanu

N-Acetylcysteín (NAC) (obr. 2) je aktívna zložka v liečivách na vykašliavanie, pretože jeho jednosulfidrylová skupina (-SH) reaguje s disulfidovou väzbou v mukoproteínoch a tie rozdeľuje na menšie celky, pričom dochádza ku zníženiu viskozity hlienu a toho dôsledkom je jeho ľahšie vykašliavanie². Tento proces štiepenia disulfidových väzieb tiež funguje pri riedení abnormálne hustého hlienu u pacientov s cystickou fibrózou. Kvôli jeho antioxidantným vlastnostiam je NAC známy ako protivírusový, protinádorový a protizápalový prípravok a tiež býva využívaný vo vírusovej terapii syndrómu získanej imunitnej nedostatočnosti (AIDS) a hepatitídy typu B, pre rakovinovú prevenciu a v liečbe oxidatívneho stresu rôzneho pôvodu.

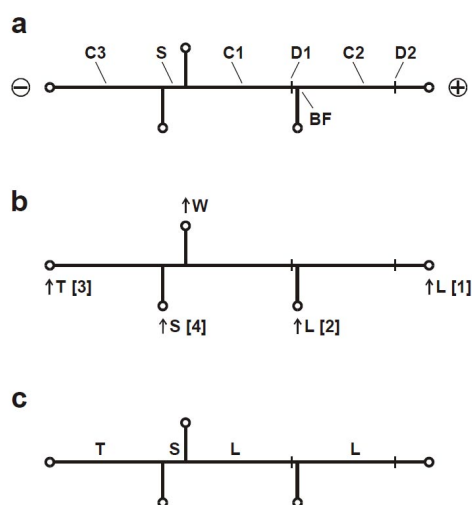
CE na čipe (MCE) zaznamenala výrazný rozvoj po tom, čo bola prvýkrát zavedená Manzom a spol.³ MCE má mnoho výhod, napríklad vysokú separačnú účinnosť, nízku spotrebu vzoriek, nízke finančné náklady a široký okruh využitia. V posledných rokoch, obrovské množstvo výskumov sa sústreďuje na vývoj detekčných systémov, aby ponúkli lepší analytický výkon a ľahšiu integráciu⁴.

Hoci použitie vodivostnej detekcie nie je zriedkavé v konvenčnej CE, zvýšený záujem o tento typ detekcie v miniaturizovaných CE systémoch nastal až v posledných rokoch. Táto detekčná technika hrá kľúčovú úlohu v monitorovaní ITP separácií. Pre ITP je univerzálnou detekčnou technikou s vysokou rozlišovacou schopnosťou, pričom fluktuácie odozvy vodivostného detektora nemajú významnejší vplyv na kvantitatívnu analýzu (dĺžka zóny separandu).

Cieľom tejto práce bol návrh a realizácia experimentov na ITP stanovenie analytov prítomných vo vzorkách vo vyššej koncentrácii (majoritne zastúpená zložka) a vypracovanie postupov ITP stanovenia hlavných zložiek – octanu v biofarmaceutickom preparáte – buserelin octane a *N*-acetylcysteínu vo farmaceutiku Solmucoľ.

Experimentálna časť

Chemikálie používané na prípravu roztokov elektrolytov a modelových vzoriek boli získané od fy. Merck



Obr. 3. CC čip použitý v ITP separáciách; a) usporiadanie kanálikov na čipe; b) sekvencia plnenia kanálikov na čipe roztokmi elektrolytov a vzorky (číslo v zátvorke indikuje poradie plnacej sekvencie); c) počiatočné usporiadanie roztokov elektrolytov a vzorky pred zapnutím hnacieho prúdu C3 = tretí (terminátorový) kanálik (9,8 μ l), S = dávkovací kanálik (900 nl), C1 = prvý separačný kanálik (4,5 μ l, 59 mm) s Pt vodivostným sensorom D1; C2 = druhý separačný kanálik (4,3 μ l; 56 mm s Pt vodivostným sensorom D2; BF = bifurkačná oblasť; W = odpad; L = vodiaci elektrolyt; T = zakončujúci elektrolyt; S = vzorka

(Darmstadt, Nemecko), Sigma-Aldrich (Seelze, Nemecko), Serva (Heidelberg, Nemecko) a Lachema (Brno, ČR).

Na prípravu elektrolytov a roztokov vzoriek bola použitá deionizovaná voda čistená cez Pro-PS systém (Labconco, Kansas City, KS, USA) a následne deionizovaná zariadením Simplicity (Millipore, Molsheim, Francúzsko). Roztoky elektrolytov boli pred použitím filtrované cez membránové filtre s priemerom pórov 0,8 μ m (Millipore).

Polymetylmakrylátový (PMMA) čip so spájanými separačnými kanálikmi (CC) a integrovanými vodivostnými sensorami (Merck, Darmstadt, Nemecko) použitý v tejto práci bol vyrobený technologickým postupom detailne popísaným v práci⁵. Schematický náčrt použitia čipu je znázornený na obr. 3.

ITP separácie na čipe boli uskutočnené za pomoci laboratórne skonštruovaného prístroja, ktorý sa skladal z dvoch jednotiek: (1) elektrolytová jednotka (E&SMU, obr. 4) a (2) elektronická a riadiaca jednotka (E&CU, obr. 4), ktorá bola zdrojom hnacieho prúdu. E&CU riadila peristaltické pumpy v prípravnom kroku analýzy a spájala separačnú jednotku s PC.

MicroCE Win softvér, ver. 2.4 (Merck) bol použitý na automatickú prípravu analýzy (plnenie kanálikov na čipe príslušnými roztokmi v požadovanom poradí), časovo-

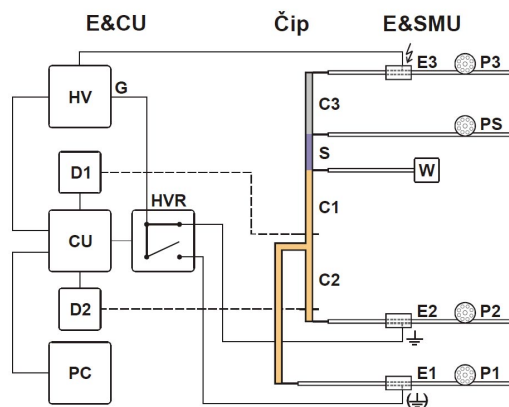
programovateľné riadenie CE analýz a zber dát z detektorov a ich vyhodnotenie.

Výsledky a diskusia

Práca bola orientovaná metodologicky na vyhodnotenie základných aspektov kvantitatívnej ITP analýzy na čipe s využitím vodivostnej detekcie a aplikácie na vypracovanie postupu ITP stanovenia octanu ako hlavnej zložky v biofarmaceutickom prípravku – buserelin octane a *N*-acetylcysteínu ako účinnej zložky v rôznych farmaceutických preparátoch.

Robustnosť ITP kvantitatívnej analýzy bola sledovaná na základe vyhodnotenia vplyvu fluktuácií experimentálnych podmienok (fluktuácie hnacieho prúdu, koncentrácie vodiacich iónov, pH vodiaceho elektrolytu a nečistôt v roztokoch elektrolytov) na stanovenie octanov.

Najväčší rozptyl hodnôt smerníc kalibračných grafov pre octan bol pozorovaný pri fluktuáciách hnacieho prúdu (RSD = 8,6 %); použitím vnútorného štandardu došlo k významnému poklesu rozptylu tejto hodnoty (RSD = 0,6 %). Fluktuácie koncentrácie vodiaceho iónu a pH vodiaceho elektrolytu nemali významnejší vplyv na hodnoty smerníc kalibračných grafov pre octan. Pri všetkých sledovaných fluktuáciách experimentálnych podmienok boli hodnoty RSD smerníc kalibračných kriviek pre octan cca 6-násobne nižšie použitím oboch vnútorných štandardov



Obr. 4. Schéma prístroja použitého v ITP separáciách na čipe; Elektronická a riadiaca jednotka (E&CU): CU = riadiaca jednotka; HV = zdroj vysokého napätia trvale pripojený k hnacej elektróde E3 (0–50 μ A, 0–7 kV); D1, D2 = vodivostné detektory pre prvý a druhý separačný kanálik; HVR = vysokonapäťové relé prepínajúce smer hnacieho prúdu v separačnom priestore (pohyblivé časti relé pripájajú E1 alebo E2 k zemiacemu pólu (G) HV). Elektrolytová jednotka (E&SMU): P1, P2, P3, PS = peristaltické pumpy pre plnenie prvého (C1) a druhého (C2) separačného, tretieho (C3) a dávkovacieho (S) kanáliku roztokmi elektrolytov a vzorky. W = odpadová nádobka spojená s výstupom z kanálikov na čipe; E1, E2 = hnacie elektródy pre C1 a C2 separačné kanáliky

Tabuľka I

Parametre regresných rovníc ($Y = aX + b$) pre kalibračné grafy octanu s použitím jantáranu ako vnútorného štandardu

Parameter	Metóda externej kalibrácie			Metóda vnútorného štandardu			<i>n</i>	Δc [mg l ⁻¹]
	a [s.l/mg]	b [s]	r	a	b	r		
A	0,310	0,513	0,9988	1,179	0,011	0,9999	20	20–100
B	0,305	0,457	0,9972	1,178	0,013	0,9999	42	20–100
C	0,310	0,708	0,9833	1,166	0,015	0,9999	64	20–100
Priemer	0,308	0,559		1,174	0,013			
SD	0,01	0,13		0,01	0,01			
RSD, %	1,0	23,6		0,6	15,9			

(A) ITP merania uskutočnené v priebehu 1 dňa na 1 čipe a 1 prístroji; (B) ITP merania uskutočnené v priebehu 2 dní na 2 čipoch a 1 prístroji; (C) ITP merania uskutočnené v priebehu 3 dní na 2 čipoch a 2 prístrojoch. Y = dĺžka zóny octanu (s); X = koncentrácia octanu vo vzorke (mg l⁻¹); a = smernica kalibračného grafu; b = úsek kalibračného grafu; r = korelačný koeficient; n = počet meraní; Δc = koncentračný interval. Koncentrácia jantáranu (vnútorný štandard) v modelových vzorkách bola cca 100 mg l⁻¹

Tabuľka II

Obsah octanu vo vzorkách buserelin octanu vypočítané metódami externej kalibrácie a vnútorného štandardu

Parameter	Vzorka	Koncentrácia vzorky [mg l ⁻¹]	Obsah octanu vo vzorke [%]					
			metóda externej kalibrácie			metóda vnútorného štandardu		
			priemer	SD	RSD [%]	priemer	SD	RSD [%]
A	BAc-1	1805,89	4,58	0,08	1,7	4,48	0,01	0,1
B			4,67	0,07	1,6	4,47	0,01	0,1
C			4,56	0,08	1,6	4,51	0,01	0,1
A	BAc-2	885,35	4,49	0,07	1,5	4,52	0,01	0,3
B			4,60	0,07	1,6	4,51	0,02	0,3
C			4,43	0,07	1,5	4,53	0,01	0,3

(A) ITP merania boli uskutočnené v priebehu 1 dňa na 1 čipe a 1 prístroji; (B) ITP merania uskutočnené v priebehu 2 dní na 2 čipoch a 1 prístroji; (C) ITP merania uskutočnené v priebehu 3 dní na 2 čipoch a 2 prístrojoch. Koncentrácia jantáranu (vnútorný štandard) vo vzorkách buserelin octanu bola cca 100 mg l⁻¹

v porovnaní s externou kalibráciou. Na dosiahnutie presných ITP stanovení bolo potrebné zabezpečiť vysokú čistotu elektrolytových roztokov; v opačnom prípade môže byť kvantitatívna analýza zaťažená chybami.

ITP separácie boli uskutočnené v hydrodynamicky uzatvorenom separačnom systéme s potlačením EOF a HDF. Za týchto preferovaných pracovných podmienok sa hodnota RSD dĺžky zóny octanu pohybovala na úrovni 3–4 % nezávisle od použitého čipu a prístroja. Korekciou dĺžky zóny octanu na vnútorný štandard (jantáran) sa opakovateľnosť tohto kvantitatívneho parametra zlepšila cca. 6–8násobne (0,1–0,7 % RSD), pričom merania boli uskutočnené v priebehu niekoľkých dní na 2 čipoch a 2 prístrojoch.

Vynikajúca zhoda parametrov regresných rovníc kalibračných grafov pre octan na 2 čipoch a 2 prístrojoch

dokumentuje ich dlhodobú platnosť za predpokladu, že ITP separácie sú uskutočnené za rovnakých separačných (elektrolytových) podmienok. Tieto fakty favorizujú ITP pred inými (CE) technikami na čipe v prípade, ak sa vyžaduje prenos analytickej metódy od čipu k čipu a od prístroja k prístroju.

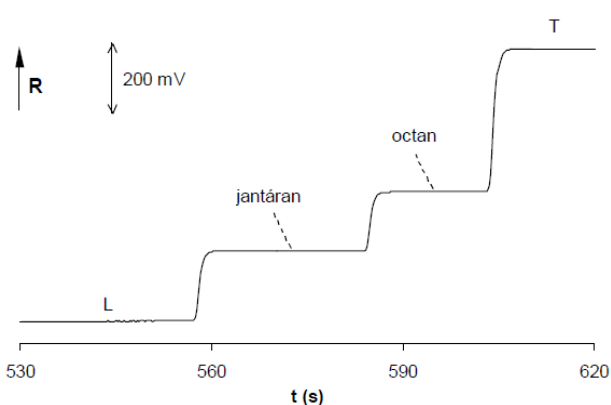
Na základe vyhodnotenia základných aspektov ITP kvantitatívnej analýzy na čipe bola vypracovaná metóda na stanovenie octanu ako anionicky migrujúcej zložky v buserelin octane (obr. 5). Obsahy octanu v buserelin octane boli vyhodnotené metódami externej kalibrácie a vnútorného štandardu, pričom metóda externej kalibrácie vykazovala výraznejší rozptyl hodnôt obsahu octanu vo vzorke (cca 5násobne vyššie RSD hodnoty). Vypočítané hodnoty výtťažnosti (99–100 %) predurčujú navrhnutú ITP metódu na veľmi presné stanovenie octanu v buserelin octane.

Tabuľka III

Parametre regresnej rovnice ($Y = aX + b$) pre *N*-acetylcysteín s použitím antranilovej kyseliny ako vnútorného štandardu

Parameter	Metóda externej kalibrácie			Metóda vnútorného štandardu			<i>n</i>	Δc [mg l ⁻¹]
	a [s.l/mg]	b [s]	r	a	b	r		
A	0,0721	0,3165	0,9995	0,0095	0,0116	0,9997	19	25–200

(A) ITP merania uskutočnené v priebehu 1 dňa na 1 čípe a 1 prístroji; Y = dĺžka zóny *N*-acetylcysteínu (s); X = koncentrácia *N*-acetylcysteínu vo vzorke (mg l⁻¹); a = smernica kalibračného grafu; b = úsek kalibračného grafu; r = korelačný koeficient; n = počet meraní; Δc = koncentračný interval. Koncentrácia antranilovej kyseliny (vnútorný štandard) v modelových vzorkách bola cca 100 mg l⁻¹

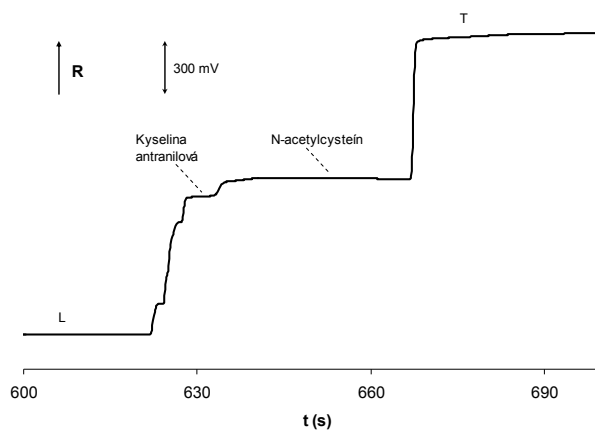


Obr. 5. ITP separácia octanu v buserelin octane s jantáranom použitým ako vnútorný štandard na čípe; Dávkovaná vzorka obsahovala buserelin octan o koncentrácii cca. 1189 mg l⁻¹ a jantáran (vnútorný štandard) o koncentrácii cca. 100 mg l⁻¹. Separácia bola uskutočnená s hnacím prúdom 10 μ A. L = vodiaci ión; T = zakončujúci ión; R = odpor

Obdobne sa postupovalo pri analýze *N*-acetylcysteínu vo farmaceutickom preparáte Solmuco. Ako vnútorný štandard bola použitá antranilová kyselina (obr. 6). V tab. III sú uvedené parametre regresnej rovnice pre daný analyt.

Záver

Práca sa zaoberala presným stanovením účinných zložiek rôznych farmaceutických preparátov, octanu v Buserelin octane a *N*-acetylcysteínu v Solmucole ITP metódou na čípe s vodivostnou detekciou. Výsledky práce ukázali, že MCE môže byť výhodne použitá na rýchle analýzy týchto farmaceutík. Zároveň vývoj nových analytických metód, ktoré by poskytli rýchle a presné stanovenia týchto zložiek je v súčasnosti veľmi žiadaný nielen vo farmaceutickej analýze. Miniaturizované analytické systémy v tomto ohľade spĺňajú všetky požiadavky na rýchly



Obr. 6. ITP separácia *N*-acetylcysteínu v liečive solmuco s antranilovou kyselinou použitým ako vnútorný štandard na čípe; Dávkovaná vzorka *N*-acetylcysteínu obsahovala 10 \times zriedený Solmuco a antranilovú kyselinu ako vnútorný štandard o koncentrácii 100 mg l⁻¹. Separácia bola uskutočnená s hnacím prúdom 20 μ A. L = vodiaci ión; T = zakončujúci ión; R = odpor

monitoring, ale aj koncentračnú citlivosť kladené na takéto moderné analytické prístupy vo farmaceutickej analýze.

Táto práca bola finančne podporená grantovou agentúrou MŠ SR VEGA 1/1149/12 a firmou Merck (Darmstadt, Nemecko).

LITERATÚRA

1. <http://www.klinik-marinus.de/buserelin.htm>.
2. Tomkiewicz R. P., App E. M., De Sanctis G. T., Cofiner M., Maes P., Rubin B. K., King M.: *Pulm. Pharm.* 8, 259 (1995).
3. Manz A., Harrison D. J., Verpoorte E. M. J., Fetting J. C., Paulus A., Lüdi H., Widmer H. M.: *J. Chromatogr., A* 593, 253 (1992).
4. Zhao J., Chen Z., Li X., Pan J.: *Talanta* 85, 2614 (2011).
5. Grass B., Neyer A., Jöhnck M., Siepe D., Eisenbeiss F., Weber G., Hergenroder R.: *Sens. Actuators, B* 72, 249 (2001).

STANOVENÍ ALKYLFFENOLŮ A BISFENOLU A V ENVIRONMENTÁLNÍCH MATRICÍCH METODOU HPLC-MS/MS

MARTA SEIFERTOVÁ a ZDENĚK ŠIMEK

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta,
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí RE-
CETOX, Kamenice 126/3, 625 00 Brno
seifertova.marta@mail.muni.cz

Úvod

Alkylfenoly a bisfenol A jsou organické sloučeniny, které prokazatelně působí toxicky na živé organismy. Narušují především endokrinní systém živočichů. Díky své strukturní podobnosti nahrazují přírodní pohlavní hormony v organismu, blokují jejich produkci a tím zamezují možnosti se rozmnožovat.

Hlavním zdrojem alkylfenolů jsou neionogenní tenzidy (alkylfenolpolyethoxyláty), mycí a čisticí prostředky, hnojiva a kosmetika. V případě bisfenolu A jsou hlavními zdroji výrobky z polykarbonátu (kojenecké lahve, dózy na potraviny), z epoxidové pryskyřice a z polysulfonu. Residua vstupují do povrchových vod, sedimentů, díky hnojení se dostávají do půd, mohou prosakovat do podzemních vod a také vytěkávají do atmosféry. Rozsáhlý obsah těchto látek v prostředí má negativní dopad, zahrneme-li i úvahu o narušení rozmnožovací schopnosti lidské populace¹.

Pro stanovení alkylfenolů a bisfenolu A v environmentálních matricích byla zvolena metoda kapalínové

chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Sledovanými analyty jsou bisfenol A (BPA), 4-*terc*-oktylfenol (4-t-OP), 4-oktylfenol (4-OP), 4-*n*-nonylfenol (4-n-NP) a nespecifikované izomery v technické směsi nonylfenolů (TECH. NP). Optimalizace parametrů metody HPLC-MS/MS se standardními roztoky uvedených analytů poskytla metodu s limity detekce na úrovni jednotek ng ml⁻¹, avšak pro stanovení environmentálně relevantních koncentrací analytů v různých matricích (půdy, sedimenty) a posouzení maticích efektů je nutné dosáhnout nižších limitů detekce. Proto byla studována účinnost derivatizace sledovaných analytů metodou používanou pro stanovení polutantů vykazujících obdobné toxické efekty (estrogeny). Metoda využívá reakce s dansylchloridem za vzniku dansylderivátů. Lze tak dosáhnout až 100krát nižších hodnot limitů detekce. Metoda využívající derivatizace dansylchloridem nebyla dosud pro stanovení alkylfenolů a bisfenolu A v environmentálních matricích použita.

Experimentální část

Použité chemikálie a přístroje

Analytické standardy 4-*n*-nonylfenol (čistota 99,9%), 4-oktylfenol (99%), 4-*terc*-oktylfenol (97%), nonylfenol – směs izomerů, bisfenol A (>99%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Rozpouštědla: methanol, toluen a aceton (99,9%) (LAB-SCAN, Poland). Amoniak, kyselina

Tabulka I

Optimalizované podmínky HPLC-MS/MS analýzy nederivatizovaných alkylfenolů a bisfenolu A

Parametr	BPA	4-t-OP	4-OP	TECH. NP	4-n-NP
Mobilní fáze	methanol + 0,1% NH ₃ , isokratická eluce 90%:10%				
Průtok MF	0,5 ml min ⁻¹				
Objem nástřiku	10 µl				
Teplota kolony	40 °C				
Ionizační mod	Negativní ionizace NI				
Ionty	[M-H] ⁻				
<i>m/z</i> prekursor. ion	227,4	205,4	205,3	219,2	219,4
<i>m/z</i> produkt. ion	212,2; 133	133,9	106,3	133,1	106,3
Kapilání napětí	2000 V				
Napětí fragmentoru	140 V				
Kolizní energie	14 eV	13 eV	14 eV	30 eV	17 eV
Tlak v nebulizeru	0,34 MPa				
Desolvatační teplota	350 °C				
IDL	12 ng ml ⁻¹	240 ng ml ⁻¹	96 ng ml ⁻¹	24 ng ml ⁻¹	130 ng ml ⁻¹

mravenčí, derivatizační činidlo dansylchlorid a hydrogenuhlíčan sodný (Fluka, Sigma-Aldrich, Germany).

K LC/MS/MS analýze byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series a hmotnostní detektor 6410 Triple Quad s ESI ionizací (Agilent Technologies). K chromatografické separaci se používala kolona ACE 5 C18 5 μm , 150 \times 4,6 mm i.d. (ACE, Scotland, UK). K extrakci vzorků půdy byl použit extraktor ASE 150 (Dionex, California, USA).

Metody

K derivatizaci alkylfenolů a bisfenolu A dansylchloridem byla použita upravená metoda derivatizace estrogenů.

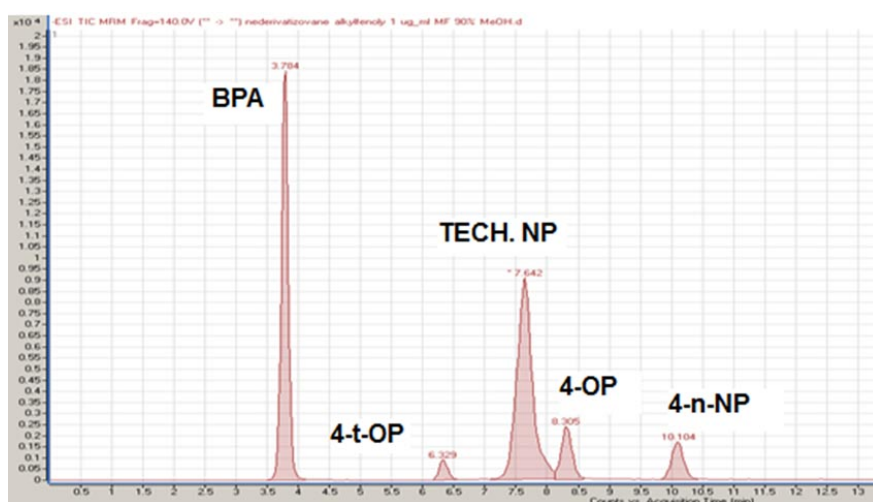
K 200 μl roztoku směsi analytů v acetonu (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) přidáno 50 μl 100 mM NaHCO_3 , 1 min mícháno (Vortex), přidáno 200 μl roztoku dansylchloridu v acetonu (0,5 mg ml^{-1}), opět 1 min mícháno (Vortex), poté byla směs inkubována 3 min při 60 $^\circ\text{C}$, odpařena do sucha pod mírným proudem dusíku, rozpuštěna v 1 ml methanolu².

K separaci nederivatizovaných alkylfenolů a bisfenolu A v izokratickém režimu byla použita mobilní fáze methanol:0,1% amoniak³ v poměru 90:10 *V/V*. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml min^{-1} a teplota 40 $^\circ\text{C}$. Objem nastříkaného vzorku byl 10 μl . K MS/MS analýze nederivatizovaných analytů byla použita ESI(-) ionizace. Optimalizované podmínky pro MS/MS detekci iontů $[\text{M-H}]^-$ jsou uvedeny v tabulce I.

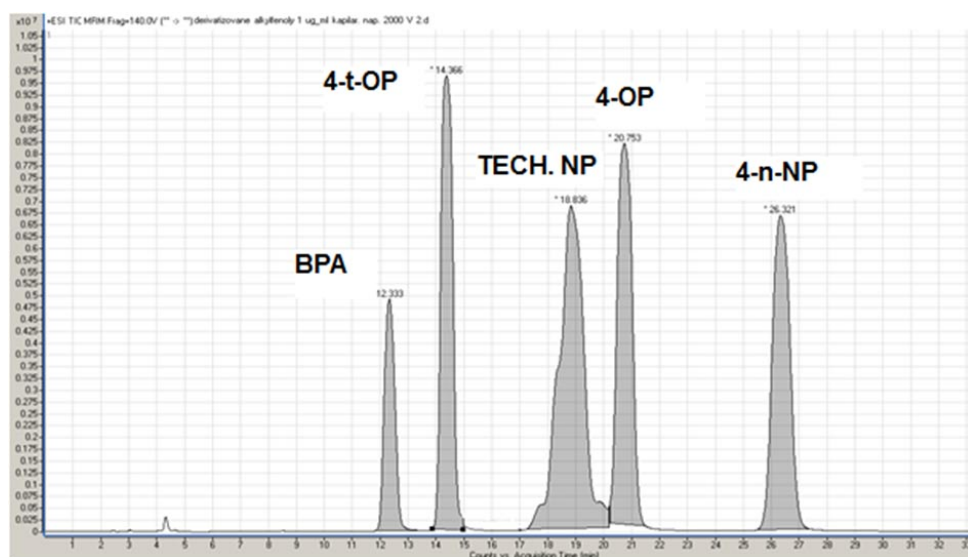
Tabulka II

Modifikované podmínky HPLC-MS/MS analýzy derivatizovaných alkylfenolů a bisfenolu A

Parametr	BPA	4-t-OP	4-OP	TECH. NP	4-n-NP
Mobilní fáze	methanol + 7mM HCOOH, isokratická eluce 90%:10%				
Průtok MF	0,5 ml min^{-1}				
Objem nástřiku	10 μl				
Teplota kolony	40 $^\circ\text{C}$				
Ionizační mod	Pozitivní ionizace PI				
Ionty	$[\text{M}+\text{H}]^+$				
<i>m/z</i> prekursor. ion	695,3	440,3	440,3	454,3	454,3
<i>m/z</i> produkt. ion	461,2; 171	156, 171	156, 171	156, 171	156, 171
Kapilární napětí	2000 V				
Napětí fragmentoru	150 V				
Kolizní energie	44 eV	38 eV	34 eV	44 eV	34 eV
Tlak v nebulizeru	0,34 MPa				
Desolvatační teplota	350 $^\circ\text{C}$				
IDL	44 pg ml^{-1}	23 pg ml^{-1}	28 pg ml^{-1}	33 pg ml^{-1}	32 pg ml^{-1}



Obr. 1. Separace alkylfenolů a bisfenolu A bez derivatizace



Obr. 2. Separace alkylfenolů a bisfenolu A po dansylderivatizaci

K separaci dansylderivátů alkylfenolů a bisfenolu A v izokratickém režimu byla použita mobilní fáze methanol:7mM kyselina mravenčí z důvodu podpory ionizace v pozitivním modu (vznik a detekce iontů $[M+H]^+$). Optimalizované podmínky pro MS/MS detekci iontů $[M+H]^+$ jsou uvedeny v tabulce II.

K extrakci alkylfenolů a bisfenolu A z půd byl použit extrakční systém pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem ASE 150 při optimalizovaných podmínkách extrakce: extrakční směs methanol a toluen v poměru 6:1 (cit.⁴), teplota extrakce 100 °C, jeden extrakční cyklus 14 min. Vstup a výstup extrakční cely (objem 10 ml) byl uzavřen křemennými filtry (QUARTZ, \varnothing 25 mm). Doporučované kypřicí medium Hydromatrix není z důvodu zvýšené kontaminace alkylfenoly používáno.

Výsledky a diskuse

Optimalizovaná metoda separace a MS/MS detekce umožňuje detekci a stanovení velmi nízkých koncentrací nejčastěji sledovaných oktylfenolů a směsi izomerů nonylfenolů používané technické směsi. 4-*n*-nonylfenol, který není součástí komerčně používané technické směsi, je eluován v samostatné zóně a může být využit jako interní standard (obr. 1 a 2).

Závěr

Byla vyvinuta nová analytická metoda vhodná pro stanovení velmi nízkých koncentrací alkylfenolů a bisfenolu A v environmentálních matricích po jejich dansylderivatizaci. Metoda je používána pro studium osudu sledovaných látek v půdním prostředí a bude modifikována pro analýzu alkylfenolů a bisfenolu A v povrchových a odpadních vod a vzorcích ovzduší.

LITERATURA

1. Seifertová M.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita, Brno 2010.
2. Lin Y., Chen Ch. Y., Wang G. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1973 (2007).
3. Shao B., Han H., Zhao J., Zhang S.: *Anal. Chim. Acta* 530, 245 (2005).
4. Gong J., Xu L., Yang Y.: *J. Hazard. Mater.* 192, 643 (2011).

KONKURENČNÍ VAZBA METABOLITŮ HEMU A ANTIBIOTIK NA SÉROVÝ ALBUMIN: STUDIUM POMOCÍ SPEKTROSKOPIE CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU

JAROSLAV SCHWARZ a IRYNA GONCHAROVÁ

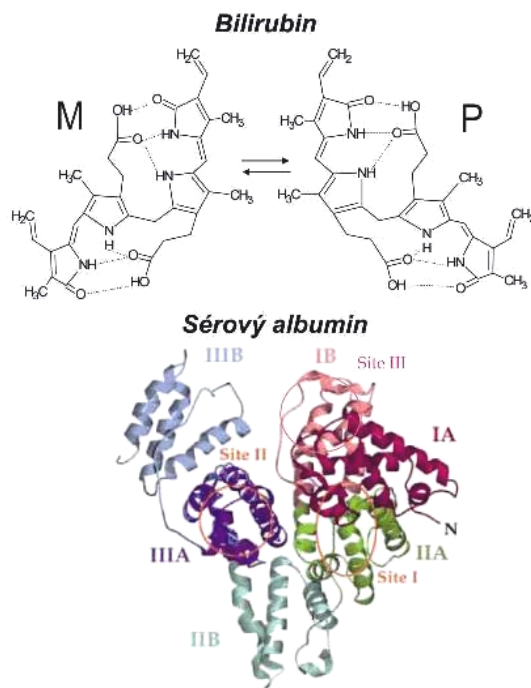
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, Ústav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6
Jaroslav.Schwarz@vscht.cz

Úvod

Spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) je moderní nedestruktivní metoda, která se používá ke kvalitativní a kvantitativní analýze chirálních látek, biomolekul a polymerů¹. ECD je zároveň unikátní metoda ke sledování změn konformací molekul vlivem různých faktorů (např. pH, teplota) a také během interakcí s jinými chirálními a nechirálními molekulami, kovovými ionty apod., a to přímo v roztocích². Široké koncentrační rozmezí pro analýzu pomocí ECD (10^{-8} až 1 mol l^{-1}) umožňuje provádět měření nejen modelových biologických systémů, ale také přímo v reálných biologických vzorcích. ECD je primární metoda, která se používá pro sledování interakcí polypeptidů a bílkovin v roztocích.

Sérový albumin (SA) je hlavní transportní bílkovina v krvi savců. Její molekula má 583 (BSA) nebo 585 (HSA) aminokyselinových zbytků a její prostorová struktura je tvořena třemi doménami, každá z nich se skládá ještě ze dvou sub-domén A a B (obr. 1)³. SA přenáší v krvi hormony, léčiva, produkty metabolismu, kovové ionty. Ve své struktuře má specifická vazebná místa pro určité třídy organických látek. Sérové albuminy jednotlivých savců mají velkou homologii, čímž umožňují studovat interakce s ligandy v široké homologické řadě. V tomto případě odlišnosti ve vazbě ligandů společně se sekvenční analýzou umožňují analyzovat vznikající komplex na molekulární úrovni.

Bilirubin (BR), lineární tetrapyrrolový pigment, je produkt katabolismu hemu v systémové cirkulaci. Specifická struktura bilirubinu je fixována šesti intramolekulárními vodíkovými můstky, které způsobují blokaci expozice polárních skupin molekulám rozpouštědla, a tím tvoří rigidní strukturu molekuly (obr. 1). Tato konformace a konfigurace vysvětluje hydrofobní chování bilirubinu a jeho extrémně nízkou rozpustnost ve vodě ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$)⁴. V roztocích se bilirubin nachází jako směs dvou isoenergetických M a P konformerů a nevykazuje optickou aktivitu. Řada biomolekul selektivně váže jeden z konformerů.



Obr. 1. Chemická struktura M a P konformeru bilirubinu a struktura sérového albuminu

Vzniklý komplex vykazuje optickou aktivitu a může být studován pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu.

V plazmě se bilirubin váže zejména na albumin jako hlavní transportní bílkovinu. Vazba bilirubinu na albumin je biologicky důležitá, protože solubilizuje nepolární nekonjugovaný bilirubin, a umožňuje tak jeho transport k játrům ve vodném prostředí. V játrech je bilirubin převáděn na konjugovanou formu a vylučován z organismu.

Nadprodukcí bilirubinu nebo poruchou jeho transportu může docházet k nebezpečí rozvoje toxických účinků, zejména v oblasti centrálního nervového systému. Tímto nebezpečím jsou ohroženi především novorozenci. Vysoké koncentrace pigmentu v krvi mohou vést ke ztrátě sluchu či k poruchám motorického a psychosomatického vývoje⁵.

Dalším rizikovým faktorem je podání léků, zvláště antibiotik, které mohou vést ke zvýšení koncentrace nevázaného bilirubinu v krvi. Léčiva na bázi sulfonamidu jsou známa jako látky, které koncentraci pigmentu ovlivňují nejvíce⁶. V tomto případě se předpokládá, že léčivo konkuruje bilirubinu v navázání na albumin.

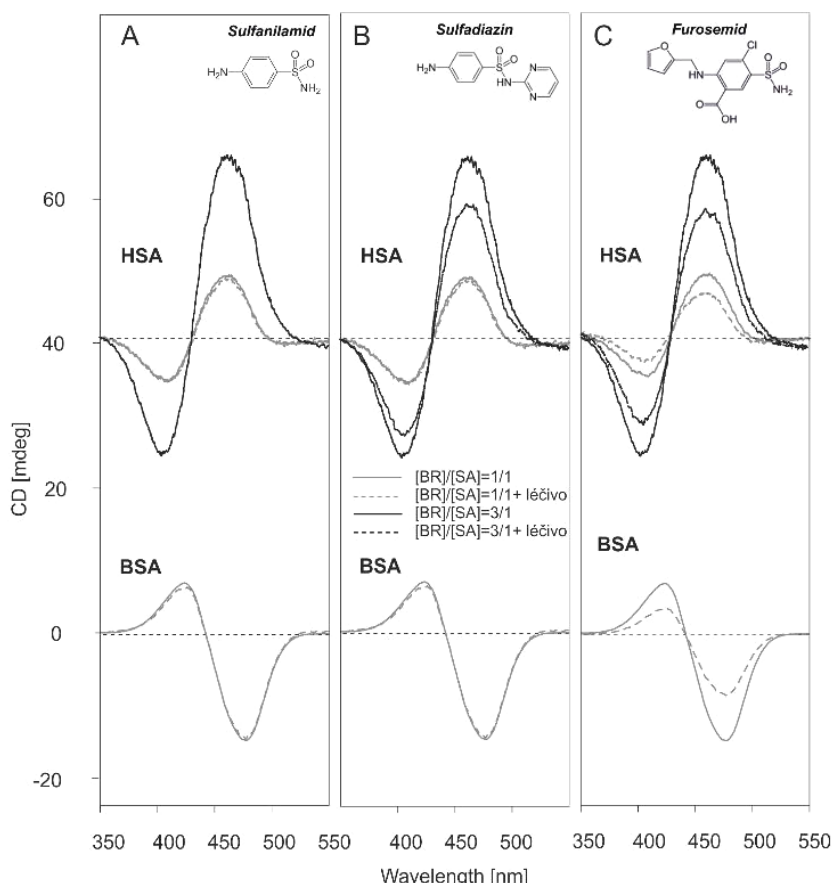
Cílem této práce bylo vyzkoušet možnost sledování společné vazby sulfonamidových léčiv a bilirubinu na

lidský a hovězí sérový albumin s použitím spektroskopie ECD. Výsledky získané v této práci budou porovnány s výsledky biochemických a lékařských studií. Spektroskopie cirkulárního dichroismu bude navržena jako referenční nedestruktivní metoda pro analýzu konkurenční vazby léčivo–bilirubin nejen v modelových systémech, ale i přímo v reálných vzorcích plazmatu savců.

Experimentální část

V předkládané práci byly použity následující látky: bilirubinu IX α (Frointer), lidský a hovězí sérový albumin (oba Sigma), sulfanilamid, sulfadiazin a furosemid (všechny Sigma), fosfátový pufr (pH 7,40).

Spektra ECD byla měřena na spektrofotometru J-810 (Jasco, Japonsko) s rozlišením 0,5 nm, časovou konstantou 1 s a rychlostí záznamu 100 nm min⁻¹. K měření byly použity křemenné kvivety o tloušťce 1 cm. U spektrálních měření byla provedena korekce na nulovou linii (odečteno spektrum rozpouštědla). Koncentrace sérového albuminu byla 2,5·10⁻⁵ mol l⁻¹. Koncentrace bilirubinu byla dána požadovaným poměrem [SA]/[BR]. Koncentrace sulfonamidových derivátů byla 2,5·10⁻⁵ mol l⁻¹.



Obr. 2. ECD spektra lidského (HSA) a hovězího (BSA) sérového albuminu s bilirubinem a (A) sulfanilamidem, (B) sulfadiazinem, (C) furosemidem; $c(\text{SA}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $c(\text{léčivo}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, pH 7,40

Výsledky a diskuse

Bilirubin má tři vazebná místa ve struktuře sérového albuminu, primární ($K_d \approx 10^7$) a dvě další s řádově nižší vazebnou konstantou³. Volný (nevázaný) BR nemá žádný ECD signál. Tři vazebná místa lidského sérového albuminu vážou BR jako P konformer, výsledné spektrum je tzv. pozitivní couplet se dvěma maximy 413(-)/460(+) nm. Hovězí sérový albumin se selektivně váže BR jako M-konformer v primárním vazebném místě a jako P-konformer v sekundárních vazebných místech a jeho ECD spektrum je suma signálů obou forem⁷. Měření bylo prováděno v systémech s molárním poměrem (BR)/(SA) = 1/1, při kterém byl bilirubin navázán jenom v prvním (hlavním) vazebném místě pro oba albuminy, a pro lidský v poměru (BR)/(SA) = 3/1, při kterém byla všechna vazebná místa byla obsazena bilirubinem.

Oba systémy byly měřeny bez a za přítomnosti sulfonamidových léčiv (sulfanilamid, sulfadiazin a furosemid). Podle výsledků naměřených ECD a absorpčních spekter se léčiva rozdělila na tři skupiny (obr. 2).

Panel A (obr. 2) představuje výsledky získané v systémech BR–SA po přidání sulfanilamidu – látky, která je základem pro většinu sulfonamidových léčiv. Žádné změny nebyly pozorovány v systémech s oběma albuminy ani v hlavním, ani v obou dalších vazebných místech. Z výsledků je možné vyvodit, že tato látka přímo nekonkuruje BR ve vazbě na sérový albumin. Přítomnost sulfonamidové skupiny není dostačující faktor pro vytěsnění navázaného bilirubinu v systému albumin–bilirubin.

Druhý typ látek představuje sulfadiazin (panel B, obr. 2), který má na rozdíl od předchozího léčiva ve své struktuře jeden aromatický substituent navíc. Ze struktury obou látek lze usuzovat, že vazba ligandu na bílkovinu je sumou několika druhů nekovalentních interakcí, ze kterých jsou nejdůležitější elektrostatické a π - π interakce. Právě přítomnost dalšího aromatického kruhu ve struktuře má vést ke větší pravděpodobnosti navázání se v jednom ze třech vazebných míst ve struktuře albuminu a konkurovat bilirubinu. U obou albuminů bylo pozorováno, že přídavek sulfadiazinu k systému BR–SA nevede ke změně ECD ani absorpčního spektra v případě, kdy BR je navázán jen v primárním vazebném místě. Bylo však zjištěno, že přídavek této látky snižuje celkový počet navázaných molekul BR na jednu molekulu albuminu ze tří na dvě. Výsledný signál ECD měl o 30 % nižší intenzitu ve srovnání se systémy bez léčiva a pás v absorpčním spektru se posouvá k pásu nevázaného (volného) BR. Sulfadiazin neovlivňuje vazbu BR v primárním vazebném místě, jelikož nemá aktivní skupinu schopnou konkurovat skupinám BR při vazbě na bílkovinu. Na základě těchto výsledků předpokládáme vytlačení BR při vazbě daného sulfonamidového derivátu v jednom ze dvou dalších vazebných míst.

Třetí typ látek představuje furosemid (panel C, obr. 2), v jehož struktuře je přítomna karboxylová skupina, která umožňuje přímou konkurenci léčiva BR při vazbě na argininové a lysinové aminokyselinové zbytky v hlavním

vazebném místě. Při přebytku furosemidu ve vzorku byl pozorován pokles intenzit ECD signálu o 30 % v systému BR s lidským SA a hovězím SA. BR uvolněný z prvního vazebného místa se částečně mohl navázat do sekundárních míst. Proto jsme experiment opakovali v systému s molárním poměrem (SA)/(BR) = 1/3, ve kterém byla všechna místa obsazena BR. I v tomto případě byl zaznamenán pokles intenzity výsledného signálu o ≈ 40 %, což svědčí o vytěsnění BR z primárního vazebného místa. V absorpčním spektru byl pozorován posun maxima pásu vázaného BR směrem k poloze charakteristické pro nevázaný bilirubin.

Výsledky získané v této práci jsou v souladu s biochemickými a lékařskými studii o vlivu sulfonamidových derivátů na vazbu bilirubinu na sérový albumin^{6,8}.

Daná práce je jen první etapou ve studii konkurenčních interakcí léčiv a metabolitů hemu s transportními bílkovinami obsaženými v krvi. Hlavním cílem je prokázat možnost využití spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu jako plnohodnotné nedestruktivní referenční metody, která poskytuje informaci o místu, způsobu a množství navázaného ligandu na bílkovinu.

Závěr

Spektroskopická studie vlivu léčiv na základě sulfonamidu na systém BR–SA ukázala, že pouhá přítomnost sulfonamidové skupiny není postačující faktor pro vytěsnění BR z jeho hlavního vazebného místa na albuminu, jak vyplývá ze studia v systému se sulfanilamidem. Další aromatické substituenty přítomné v molekule léčiva (např. sulfadiazinu) jsou schopny konkurovat bilirubinu při vazbě na další vazebná místa. Dodatečná přítomnost karboxylové skupiny schopné tvořit iontové můstky s kladně nabitými aminokyselinovými zbytky a skupin schopných formovat vodíkové vazby je rozhodujícím faktorem pro schopnost konkurovat bilirubinu v navázání na sérový albumin.

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

LITERATURA

1. Nakanishi K., Berova N., Woody R.: *Circular dichroism: principles and applications*. J. Wiley-VCH, New York 2000.
2. Urbanova M.: *Chirality* 21, 215 (2009).
3. Peters T.: *Adv. Prot. Chem.* 37, 161 (1985).
4. Boiadjev S. E., Lightner D. A.: *Tetrahedron-Asym.* 10, 607 (1999).
5. Vitek L., Sedlackova L., Branny P., Ruml T.: *Chem. Listy* 97, 24 (2003).
6. Wadsworth S. J., Suh B.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1571 (1988).
7. Goncharova I., Urbanova M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1355 (2008).
8. Brodersen R., Friis-Hansen B., Stern L.: *Dev. Pharmacol. Ther.* 6, 217 (1983).

VOLTAMPÉROMETRICKÉ STANOVENIE VYBRANÝCH ANTIBIOTÍK NA BÁZE PENICILÍNŮV

JOZEF SOCHR a LUBOMÍR ŠVORC

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

Úvod

Penicilín V patrí spolu s príbuznými cefalosporínmi a ďalšími derivátmi penicilínov (ampicilín, amoxicilín) do skupiny β -laktámových antibiotík. Práve prítomnosť β -laktámového kruhu v ich štruktúre je dôležitým prvkom pre ich liečivé vlastnosti. Dlhodobým a najmä nesprávnym užívaním penicilínov dochádza k tvorbe rezistentných kmeňov baktérií¹. Navyše sa často stáva, že penicilíny sa dostávajú do potravy určenej pre zvieratá či ľudí. Zdrojom kontaminácie môže byť voda z okolia farmaceutických spoločností, prípadne sú umelo pridávané do krmív pre zvieratá ako prevencia voči bakteriálnym chorobám. V pokročilom nesledovanom štádiu dochádza k spomínanému vzniku rezistencie. Z tohto dôvodu je potrebné striktne kontrolovať prítomnosť penicilínov v environmentálnych, klinických a potravinárskych vzorkách. Vo všeobecnosti, na štúdium mechanizmu účinkov liečiv a ich stanovenia v organizme sa vyvinulo niekoľko analytických metód. Chromatografické^{2–4} a spektrálne^{5,6} metódy sú v súčasnosti z dôvodu vysokej citlivosti a selektivity bežnou rutinnou praxou v laboratóriách určených práve pre špecifikáciu a stanovenie liečiv napr. v biologických vzorkách, potravinách, ale aj v odpadových vodách z výrobného procesu farmaceutickej spoločnosti. Tieto metódy sú však z ekonomického hľadiska relatívne drahé (veľká spotreba mobilnej fázy, spotreba chemikálií na prípravu vzorky a eliminovanie vplyvu matrice) a z časového hľadiska vďaka nutnosti predkoncentračného kroku častokrát príliš zdĺhavé.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť novú elektroanalytickú metódu ako jednoduchú, rýchlu a lacnú alternatívu k chromatografickým metódam (najmä HPLC) na stanovenie penicilínov a aplikovať ju na reálne vzorky komerčne dostupných tabliet. Elektrochemicky možno penicilín V stanoviť jeho oxidovaním pri značne kladných potenciáloch⁷. Tento aspekt bol zohľadnený pri výbere materiálu pracovnej elektródy, ktorý bol z bórom dopovaného diamantu (BDD)⁸. Veľmi dôležitý je aj fakt, že o elektrochemickom stanovení penicilínov bolo na základe rešerše publikovaných len minimálne množstvo prác, žiadna však na tomto novom a perspektívnom type elektródového materiálu.

Experimentálna časť

Pre účely práce boli použité nasledovné chemikálie: penicilín V (Hoechst-Biotika, Slovenská Ľupča, čistota 99,5%), kyseliny: dusičná, sírová, fosforečná, octová, chlorovodíková, chloristá, boritá, hydroxid sodný, vodný roztok amoniaku, octan sodný, chlorid draselný, chlorid sodný, hydrogénfosforečnan sodný (všetko Lachema, Brno).

Všetky voltampérometrické merania boli uskutočnené na elektrochemickom analyzátore AUTOLAB PGSTAT 302N (EcoChemie, Utrecht, Holandsko) s externým stojanom PA-4 (Laboratorní přístroje, Praha) určeným pre statickú ortuťovú kvapkovú elektródu, ktorý bol upravený pre potreby merania s BDD ako pracovnou elektródou. Pomocná elektróda bol platinový drôtik a ako referenčná elektróda slúžila argentochloridová Ag/AgCl/KCl (3 mol l⁻¹). Na vopred okalibrovanom pH metri (Denver Instrument) sa merali pH hodnoty pripravených pufrov. Jednotlivé voltampérogramy boli spracované a vyhodnotené pomocou programového balíku NOVA[®] 1.7, poskytujúci 2D, 3D a tiež tabuľkové zobrazenie nameraných dát. Na prípravu všetkých roztokov sa použila dvakrát prevarená deionizovaná voda. Kalibračné roztoky boli pripravené postupným riedením zásobného roztoku 1·10⁻² mol l⁻¹ penicilínu V so základným elektrolytom. Do elektrochemickej cely sa vždy dávkovalo 10 ml stanovovaného roztoku. Na zostrojenie kalibračnej krivky metódou najmenších štvorcov bol použitý program OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Medza detekcie (LOD) a medza stanovenia (LOQ) boli vypočítané na základe trojnásobku resp. desaťnásobku smerodajnej odchýlky úseku podelenej smernicou kalibračnej krivky.

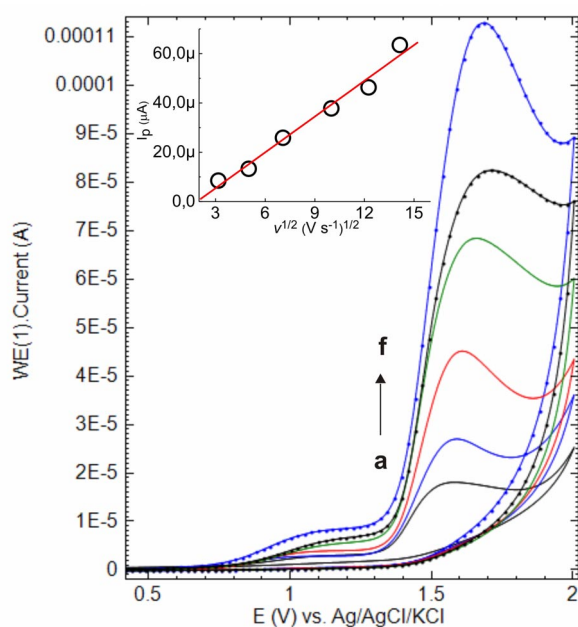
Vzorka komerčnej tablety PENICILÍN V[®] 500 sa pripravila rozpustením prášku z rozomletých tabliet po presnom odvážení v deionizovanej vode za neustáleho miešania po dobu 30 min pri laboratórnej teplote. Roztok s nerozpustným podielom sa prefiltraval a filtračný koláč sa niekoľkokrát prepláchol deionizovanou vodou. Filtráty boli kvantitatívne prenesené do 100ml odmernej banky a doplnené deionizovanou vodou po rysku. Následne boli riedené so základným elektrolytom a analyzované v elektrochemickej cele.

Výsledky a diskusia

Úvodné voltampérometrické merania boli uskutočnené metódou cyklickej voltampérometrie (CV). Výsledky ukázali, že vhodnými elektrolytmami pre účely práce boli kyslé a neutrálne roztoky, v zásaditom prostredí bola prúdová odozva oxidácie penicilínu V výrazne horšia.

V nasledovných meraniach sme sa rozhodli pre fosfátový pufoľ (PBS) s pH 7,0. Ukázalo sa, že penicilín V o koncentrácii $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v PBS s pH 7,0 v rozsahu od -1 až $+1$ V je elektrochemicky inaktívny a nameraný voltampérogram prakticky predstavoval prúdovú odozvu čistého elektrolytu. Rozšírením potenciálového okna na -2 až $+2$ V, čo odolný materiál BDD elektródy umožňuje, bol vo vysoko kladných potenciáloch pozorovaný anodický pík prislúchajúci oxidácii penicilínu V. Tento potenciálový rozsah sme použili aj v ďalších meraniach najmä vďaka dobrej opakovateľnosti a výraznej prúdovej odozve v porovnaní napr. s rozsahom 0 až $+2$ V, čo možno vysvetliť tým, že použitie širšieho potenciálového rozsahu plní funkciu elektrochemického čistenia elektródového povrchu.

Pri potenciáli $+1,6$ V vs. Ag/AgCl/3M KCl bol zaznamenaný anodický pík prislúchajúci oxidácii penicilínu V, redukčný protipík v spätnom scane nebol pozorovaný. Je teda zrejme, že elektrochemický systém sa správa vysoko ireverzibilne podobne ako väčšina organických látok BDD elektróde. V snahe získať opakovateľné výsledky sme dospeli k názoru, že v difúznej vrstve BDD elektródy pravdepodobne ostáva naadsorbovaný produkt oxidácie penicilínu V (jeho sulfoxidový derivát), čo sa prejavilo znížením prúdovej odozvy pri opakovaných paralelných meraniach. Z tohto dôvodu bolo nutné elektrochemicky čistiť povrch elektródy polarizáciou BDD elektródy do záporných potenciálov, keďže najviac používané mechanické čistenie nie je v tomto prípade vhodné kvôli poškodeniu diamantového filmu.



Obr. 1. Vplyv polarizačnej rýchlosti na veľkosť prúdovej odozvy oxidácie $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ penicilínu V v PBS s pH 7,0 na BDD elektróde; polarizačné rýchlosti: (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 100, (e) 150 a (f) 200 V s^{-1}

Pre charakterizáciu procesov v tesnej blízkosti povrchu BDD elektródy sme študovali vzťah medzi polarizačnou rýchlosťou a veľkosťou prúdovej odozvy oxidácie penicilínu V. Polarizačnú rýchlosť sme menili v rozsahu od 10 až po 200 V s^{-1} . Získané voltampérogramy sú znázornené na obr. 1. Z obrázku je zrejme, že s rastúcou polarizačnou rýchlosťou rastie oxidačný prúd a potenciálové maximum sa mierne posúva k pozitívnejším hodnotám. Na základe Randles-Ševčíkovej rovnice: $I_p = 269000n^{3/2}AD^{1/2}v^{1/2}c$ sme metódou najmenších štvorcov zostrojili lineárnu závislosť $I_p = f(v^{1/2})$ a korelačný koeficient bol $R = 0,9899$. Na základe tejto skutočnosti možno povedať, že prúd je limitovaný difúziou, kým konvekčné a adsorpčné prúdy sú zanedbateľné.

Diferenčná pulzná voltampérometria (DPV) bola vybraná ako citlivá elektrochemická metóda pre kvantitatívne účely na zostrojenie kalibračnej krivky, t.j. závislosti oxidačného prúdu od koncentrácie penicilínu V. Metóda si pred samotným použitím vyžaduje najširšiu optimálnu hodnotu modulačnej amplitúdy ovplyvňujúcej na polohu, veľkosť a tvar oxidačného píku. Pre tieto účely sme vo vybranom pufoľi pripravili roztok penicilínu V o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Vplyv modulačnej amplitúdy na prúdovú odozvu sme sledovali v rozsahu od 5 do 200 mV . S rastúcou amplitúdou sa poloha prúdového maxima posúvala k negatívnejším hodnotám za súčasného rozširovania oxidačného píku. Ako optimálnu hodnotu v ďalších meraniach sme si zvolili 100 mV , pri ktorej ešte nedochádza k výraznému posunu potenciálu a anodický pík nie je veľmi široký.

Na zostrojenie kalibračnej závislosti $I_p = f(c_i)$ sme pripravili kalibračné roztoky. Namerané DPV voltampérogramy, kalibračná krivka a jej parametre sú zobrazené na obr. 2.

Z parametrov kalibračnej krivky sme vypočítali hodnoty $\text{LOD} = 6,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a $\text{LOQ} 2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Opakovateľnosť merania bola vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou $\text{RSD} = 2,5 \%$ pre 6 meraní vykonaných na koncentračnej hladine $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v krátkych časových intervaloch na tom istom prístroji a tým istým pracovníkom. Z hodnôt RSD, LOD a LOQ možno konštatovať, že navrhovaná metóda má výbornú opakovateľnosť a dobrú citlivosť. Na overenie správnosti metódy bola technika aplikovaná na vzorkách tabliet PENICILÍN V® 500. Na potlačenie vplyvu matrice sa použila metóda prídavku štandardu a získané údaje sú zobrazené v tabuľke I.

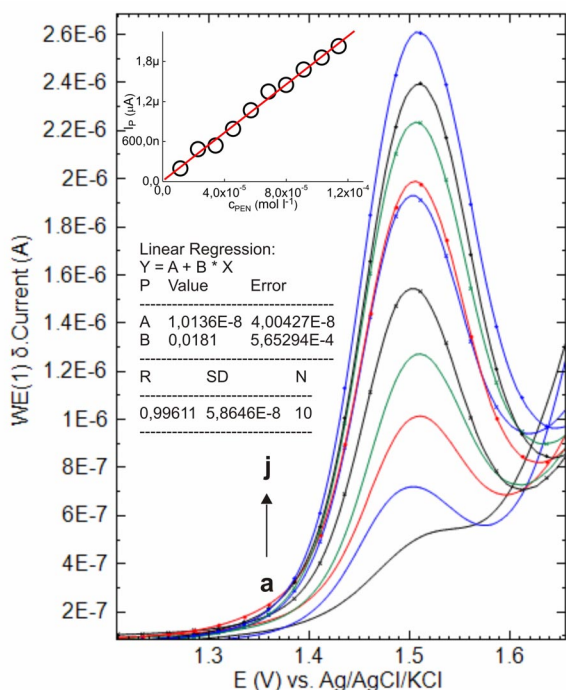
V tab. I sú uvedené stanovené hodnoty koncentrácie penicilínu V po prídavkoch štandardu so smerodajnými odchýlkami, intervalmi spoľahlivosti a výtťažnosťami. Vypočítané výtťažnosti potvrdzujú správnosť metódy, keď ich hodnoty sa pohybovali v rozmedzí $97,7$ až $101,5 \%$. Výrobca na obale liečiva uvádza obsah 500 mg účinnej látky penicilínu V v jednej tablete. Priemerná hmotnosť tablety v jednom balení je 762 mg , tableta teda obsahuje $65,7 \text{ hm.}\%$ penicilínu V. Stanovená koncentrácia vo vopred zriedenej pripravenej vzorke penicilínu V bola $9,24 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, v prepočte na hmotnostnú koncentráciu $323,8 \text{ mg l}^{-1}$. Návažok vzorky tablety bol $500,7 \text{ mg}$ a po

Tabuľka I

Metóda prídavku štandardu: stanovenie obsahu penicilínu V v tablete pomocou navrhovanej metódy na BDD elektróde

Pridaná koncentrácia [mol l ⁻¹]	Očakávaná koncentrácia [mol l ⁻¹]	Stanovená koncentrácia ^{a)} [mol l ⁻¹]	SD [mol l ⁻¹]	Interval spoľahlivosti pre P = 95 % ^{b)} [mol l ⁻¹]	Výtťažnosť [%]
0	9,38 · 10 ⁻⁴	9,24 · 10 ⁻⁴	6,0 · 10 ⁻⁵	(9,24 ± 0,49) · 10 ⁻⁴	98,5
2 · 10 ⁻⁴	1,14 · 10 ⁻³	1,13 · 10 ⁻³	1,1 · 10 ⁻⁴	(1,13 ± 0,09) · 10 ⁻³	99,1
4 · 10 ⁻⁴	1,34 · 10 ⁻³	1,36 · 10 ⁻³	1,2 · 10 ⁻⁴	(1,36 ± 0,11) · 10 ⁻³	101,5
6 · 10 ⁻⁴	1,54 · 10 ⁻³	1,55 · 10 ⁻³	1,8 · 10 ⁻⁴	(1,55 ± 0,15) · 10 ⁻³	100,6
8 · 10 ⁻⁴	1,74 · 10 ⁻³	1,70 · 10 ⁻³	2,0 · 10 ⁻⁴	(1,70 ± 0,17) · 10 ⁻³	97,7

a) aritmetický priemer zo 6 meraní: \bar{x} , b) vypočítané podľa vzťahu: $\bar{x} \pm t_{n-1, \alpha} \cdot \frac{SD}{\sqrt{n}}$, z tabuliek $t_{5,0,05} = 2,0150$



Obr. 2. DPV voltampérogramy rôznych koncentrácií penicilínu V a kalibračná závislosť s parametrami regresnej priamky; koncentrácia penicilínu V: (a) $1,14 \cdot 10^{-5}$, (b) $2,28 \cdot 10^{-5}$, (c) $3,42 \cdot 10^{-5}$, (d) $4,56 \cdot 10^{-5}$, (e) $5,71 \cdot 10^{-5}$, (f) $6,85 \cdot 10^{-5}$, (g) $7,99 \cdot 10^{-5}$, (h) $9,13 \cdot 10^{-5}$, (i) $1,03 \cdot 10^{-4}$ a (j) $1,14 \cdot 10^{-4}$, DPV parametre: modulačná amplitúda 100 mV, modulačný čas 0,05 s, čas medzi pulzami 0,5 s

zohľadnení riedenia je nami stanovený obsah penicilínu V v tablete 64,7 hm.%. Tento obsah dobre korešponduje s hodnotou uvádzanou výrobcom.

Záver

Trendom analytickej chémie v súčasnosti je minimalizovať náklady na vývoj techník a dosahovať spoľahlivé výsledky v čo možno najkratšom čase. Elektrochemické metódy sú z tohto pohľadu pomerne rýchle a ich cenová dostupnosť oproti ostatným analytickým metódam (chromatografickým a optickým) ich predurčuje na stanovenie koncentrácie analytov vo vzorkách potravinárskej, klinickej a environmentálnej povahy.

V predkladanej práci sme sa zaoberali vývojom novej elektrochemickej metódy na stanovenie penicilínových antibiotík na báze penicilínov, konkrétne penicilínu V využitím BDD elektródy ako citlivého elektrochemického senzora. Navrhovaná analytická metóda je v porovnaní s inými analytickými metódami rýchla a jednoduchá. Výkonnosť analytickej metódy bola charakterizovaná základnými metrologickými parametrami: medza detekcie LOD = $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹, medza stanovenia LOQ = $2,2 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ a opakovateľnosť RSD = 2,5 %. Praktická aplikovateľnosť metódy bola overená na reálnych vzorkách komerčne dostupných tabliet. Hodnoty výtťažností (97,7 až 101,5 %) potvrdzujú, že navrhovaná metóda je správna.

Predkladaná práca je len prvotným úsilím vývoja rýchlej, selektívnej a dostatočne citlivej elektrochemickej metódy na stanovenie penicilínových liečiv v biologických vzorkách a ich simultánneho stanovenia s inými liečivami, ktoré sa pri ochoreniach bežne užívajú s penicilínmi napr. aspirín, paracetamol. Práca nadväzuje aj na aktuálny trend v oblasti vývoja nových elektrochemických metód stopovej analýzy a využitia nových elektródových materiálov na riešenie potravinárskych, klinických a environmentálnych problémov.

Táto práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou VEGA Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (Projekt č. 1/0182/11) a Programom na podporu mladých výskumníkov (č. 6406).

LITERATÚRA

1. <http://scienceaid.co.uk/biology/micro/antibiotics.html>, stiahnuté dňa 4.11.2011.
2. Medvedovici A., Ionescu M., Mircioiu C., David V.: *Microchem. J.* 72, 85 (2002).
3. Hsieh S. H., Huang H. Y., Lee S.: *J. Chromatogr., A* 1216, 7186 (2009).
4. Sorouraddin M. H., Iranifam M., Imani N. A.: *Centr. Eur. J. Chem.* 7, 143 (2009).
5. Garcia-Reiriz A., Damiani P. C., Olivieri A. C.: *Talanta* 71, 806 (2007).
6. Benito-Pena E., Urraca J. L., Moreno-Bondi M. C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 289 (2009).
7. Chen B., Ma M., Su X.: *Anal. Chim. Acta* 674, 89 (2010).
8. Pecková K., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 3014 (2011).

STRUKTURNĚ ANALYTICKÁ CHARAKTERIZACE PRODUKTŮ DEKONTAMINACE PLATINOVÝCH CYTOSTATIK POUŽITÍM PAR PEROXIDU VODÍKU

DAVID STÍBAL, KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 160 00 Praha 6
stibald@vscht.cz

Úvod

Bioaktivní látky jako kontaminanty životního prostředí jsou co do své rizikovosti pro živé organismy vážným problémem pravděpodobně již od doby, kdy je lidstvo poprvé začalo používat¹. Jako příklad mohou sloužit léčivé substance, které jsou velice často po aplikaci do organismu nedokonale metabolizovány a částečně vyloučeny do odpadních vod, čímž přecházejí do životního prostředí. Pokud nejsou degradovány, případně zachyceny v čističkách odpadních vod, mohou se nakonec dostat v aktivní formě až do pitné vody, a vyvolávat tak chronické efekty na lidské populaci. Ačkoliv jejich primární koncentrace jsou velmi nízké, jejich biologická aktivita, tedy schopnost vyvolávat změny biologických funkcí, tímto není ovlivněna a v případě vstupu do organismu vyvolávají nežádoucí účinky. Teprve díky technologickému pokroku a s rozvojem moderních analytických metod jsme schopni tyto látky v prostředí stanovit a posoudit jejich rizika a vlivy na přírodu^{1,2}. Vysokou rizikovost biologicky aktivních látek vytvořených lidskou činností a ve značných objemech vstupujících do životního prostředí si začínáme uvědomovat často velice pozdě, většinou teprve tehdy, kdy jsou jejich účinky manifestovány. Příkladem může být vstup pohlavních hormonů z antikoncepčních přípravků do říčních toků a jejich negativní vliv na vývoj vodní fauny. Dalším příkladem mohou být léčiva s významnými nežádoucími účinky, jako jsou cytostatika, immunosupresiva aj., vstupující do prostředí při manipulaci ve výrobních závodech, vědeckých institucích nebo nemocničních zařízeních³.

Z těchto důvodů je potřeba vyvinout nové metody degradace a deaktivace bioaktivních látek. Jedním z moderních způsobů dekontaminace prostor je použití par peroxidu vodíku (VPHP – Vapor Phase Hydrogen Peroxide). Tato metoda je oproti jiným dekontaminačním procesům charakteristická možností využívat velmi nízkých koncentrací dezinfekčního agens, jelikož peroxid vodíku v parní fázi vykazuje vysokou efektivitu. Činidlo se rozkládá na neškodné produkty (O_2 a H_2O) a jeho největší předností je, že vstupuje i do obtížně dostupných prostor (dutín, pórů). Alternativou pro dekontaminace v kapalném prostředí je pak použití vodných roztoků H_2O_2 , které působí často mechanisticky stejně jako VPHP.

Cílem této práce bylo ověřit, zda VPHP proces může být prostředkem pro dekontaminaci platinových cytostatik. Pro počáteční výzkum byla zvolena modelová látka aminotrichloridoplatinat draselný (TCAP), která je strukturálním prekursorem platinových cytostatik, postrádá však jejich vysokou bioaktivitu a toxicitu a zajišťuje tak vyšší bezpečnost práce. Tato látka byla použita pro optimalizaci dekontaminační metody, při které byla posuzována řada parametrů majících vliv na průběh procesu (teplota, koncentrace par peroxidu vodíku, přítomnost vlhkosti, přítomnost/absence potenciačního agens atd.). Z důvodu kinetického monitoringu při optimalizaci podmínek procesu a strukturální charakterizaci vznikajících dekontaminačních produktů byla vyvíjena a optimalizována i řada analytických metod, které toto dovolily. Vyvinutá dekontaminační metoda byla následně aplikována na aktuálně používaná platinová cytostatika (Oxaliplatin, Piko-platin, Cisplatin).

Experimentální část

Použité chemikálie

70% vodný roztok H_2O_2 (Overlack, Česká republika). Calsit-5 (Slovnaft VÚRUP, Slovensko). Aminotrichloridoplatinat draselný (VÚAB-Pharma, Roztoky u Prahy, Česká republika). Platinová cytostatika: cis(oxalato)(trans-1-1,2-diaminocyklohexane)platnatý komplex (Oxaliplatin), diamindichloridoplatinat (Cisplatin), cisamindichlorido(2-methylpyridin)platnatý komplex (Piko-platin) (VÚAB-Pharma, Roztoky u Prahy, Česká republika). Rozpouštědla pro HPLC: acetonitril (99,9%), voda (HPLC Grade), methanol (99,9%), (CHROMASOLV, USA). Technický vzduch (Siad, Itálie).

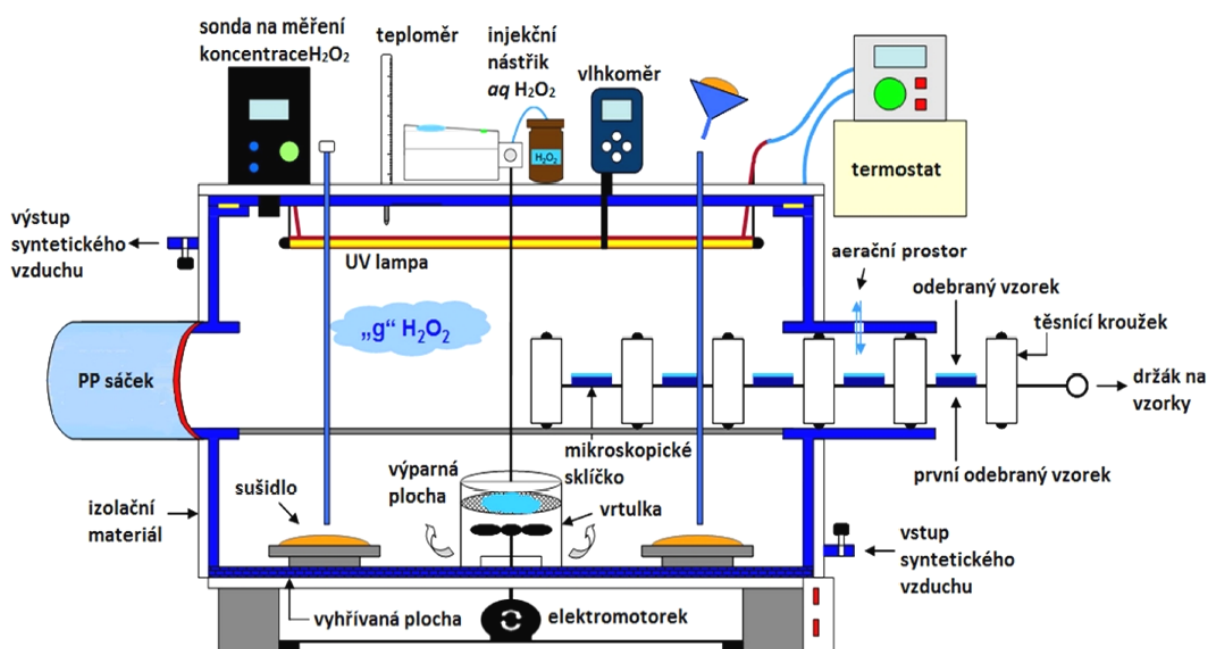
Typický degradační experiment v plynné fázi

Testování degradace bioaktivních látek probíhalo v experimentálním zařízení, pro tyto účely speciálně navrženém na ústavu organické technologie, VŠCHT Praha. Zařízení (tzv. laboratorní peroxybox) slouží k simulaci průběhu dekontaminace v reálných prostorách. Peroxybox a všechny jeho součásti jsou znázorněny na obr. 1.

Typický VPHP dekontaminační cyklus provedený v laboratorním peroxyboxu se skládal ze čtyř následných fází (všechny vedeny za atmosférického tlaku):

I. fáze – dehumidifikace anebo humidifikace – snížení, příp. zvýšení vlhkosti v atmosféře laboratorního peroxyboxu (LP) pomocí předsušeného anebo naopak zvlhčeného vzduchu na požadovanou hodnotu.

II. fáze – kondicionace – ustálení počátečních podmínek dekontaminace (standardně 25 °C, vlhkost vzduchu 40 %).



Obr. 1. Schéma laboratorního peroxyboxu

III. fáze – dekontaminace – zavedení dekontaminačního agens (H_2O_2) na odpařovací povrch LP, dosažení požadované koncentrační úrovně par H_2O_2 .

IV. fáze – aerace – redukce koncentrace VPHP na bezpečnou úroveň (1 ppm podle agentury OSHA).

Analytické metody

Kinetika degradace látek byla monitorována na systému Dionex Ultimate 3000 (Dionex, USA) skládající se z degaséru, kvarterní pumpy, autosampleru, termostatu kolon a DAD detektoru. Separace látek byla realizována isokratickou elucí (mobilní fáze A – voda, mobilní fáze B – voda s 1% acetonitrilem, pH 3,5 – upraveno octanem amonným a kyselinou octovou, poměr složek 50:50 (V/V) na koloně Phenosphere SAX 80A (Phenomenex, USA) s iontoměničovou stacionární fází o rozměrech kolony $250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ (délka \times vnitřní průměr \times zrnitost stacionární fáze). Průtok mobilní fáze na koloně činil 1 ml min^{-1} , objem nastříkovaného vzorku byl 10 ml. Kolona byla temperována na teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Separované látky byly detekovány DAD detektorem při vlnové délce $\lambda = 220 \text{ nm}$ (frekvence sběru dat 5 Hz) a s využitím 3D pole v rozmezí vlnových délek $\lambda = 190\text{--}400 \text{ nm}$. Doba analýzy byla 40 min.

Identifikace látek byla realizována na LC-MS systému LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA) za identických podmínek pro kapalinovou chromatografii jako u LC–DAD analýzy. Při MS analýze bylo použito elektrosprejové ionizace v negativním modu. Při monitoro-

vání látek bylo použito full scan modu o $m/z = 100$ až 2000 Da při rozlišení $30\,000$. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí na kapiláře – 2500 V , teplota na vstupní kapiláře $400 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota HESI výparníku $450 \text{ }^\circ\text{C}$, sheath gas (dusík) tlak $0,52 \text{ MPa}$, pomocný plyn (dusík) 20 ArbU .

Testování toxicity připravených látek

Testování bylo provedeno na samcích a samicích (50 % + 50 %) potkanů Wistar o hmotnosti mezi 250 a 300 g a stáří 4 měsíců. Potkani byli krmeni potravinami a vodou *ad libitum*. Zvířata byla umístěna v párech v klecích z plexiskla při pokojové teplotě ($24 \text{ }^\circ\text{C}$) s 12h cyklem světlo-tma (začátek cyklu světla v 7:00 hod.). Potkani byli náhodně rozděleni do exponované skupiny a kontrolní skupiny (podání fyziologického roztoku). Exponovaným potkanům byla jednorázově podána subkutánně (s.c.) dávka předložené látky v množstvích, která vedla k určení LD_{50} parametru. Experimenty byly provedeny v souladu se zákony na ochranu zvířat v České republice a v plném souladu s Evropskými požadavky Rady o používání pokusných zvířat (směrnice 86/609/EHS).

Výsledky a diskuse

Předkládaná práce byla věnována vývoji efektivní degradace látky TCAP v laboratorním peroxyboxu (LP). Byly zkoumány parametry ovlivňující rychlost a průběh

reakce, jmenovitě teplota v LP, vlhkost vzduchu, koncentrace par peroxidu vodíku a možnost urychlení degradace kombinací s UV-C zářením.

Prvním parametrem, jehož vliv na dekontaminaci byl zkoumán, byla vlhkost prostředí. V LP byly provedeny degradační experimenty s nebo bez výskytu kondenzace během dekontaminačního cyklu – tzv. „mokrý“ a „suchý“ VPHP proces. Mokrý VPHP proces, tedy dekontaminační proces s výskytem kondenzace par H_2O a H_2O_2 na vnitřních površích LP, vykazoval vyšší účinnost k degradaci modelového kontaminantu, než proces „suchý“. Vlivem kondenzace par H_2O_2 docházelo ke zkrácení indukční periody a k celkovému vzrůstu rychlosti degradace. Vyšší účinnost „mokrého“ VPHP procesu je pravděpodobně způsobena vyšší koncentrací H_2O_2 v kondenzátu na látku kontaminovaném povrchu, v porovnání s adsorbovaným množstvím H_2O_2 při procesu „suchém“. Při „suchém“ procesu je pracováno s výrazně méně korozivním prostředím a navíc dochází ke zkrácení aerační fáze dekontaminačního cyklu a tedy i celé procedury.

Dalším zkoumaným parametrem byla teplota. Vzhledem k cíli výzkumu – dekontaminaci velkých prostor, jako jsou např. výrobní haly a operační sály, byl rozsah zkoumaných teplot omezen pouze na teploty v daných podmínkách relevantní, tedy 18–30 °C. Podle očekávání docházelo při zvyšování teploty k zvýšení rychlosti degradace (Arrheniova rovnice).

Vzhledem ke korozivním vlastnostem peroxidu vodíku je vhodné snížit používanou koncentraci dekontaminačního činidla na minimum. Zkoumáním vlivu koncentrace H_2O_2 na průběh reakce byl nalezen spodní limit množství H_2O_2 , při kterém reakce probíhá, a to 200 ppm. Tato koncentrace je již velmi nízká a zajišťuje vysokou kompatibilitu s velkým množstvím materiálů (zabránění poškození vybavení dekontaminovaného prostoru). Zároveň je také docíleno vysoké efektivity, jelikož většina generovaného plynného H_2O_2 je využita na degradaci kontaminantů.

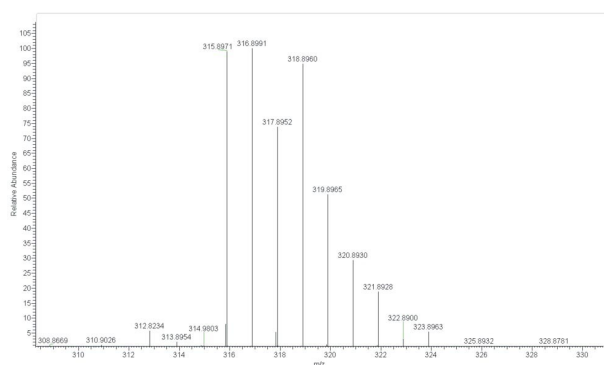
Významného zvýšení rychlosti a kvality degradace kontaminantů bylo dosaženo spřažením VPHP procesu s UV-C zářením. Toto záření je díky své vysoké energii schopné štěpit H_2O_2 na OH radikály a tím teoreticky zvyšovat rychlost a účinnost degradace. Při experimentech se prokázalo, že kombinací VPHP/UV-C je možno degradaci urychlit až trojnásobně. Výsledky z VPHP/UV-C experimentů také ukazují, že v tomto případě probíhá degradace modelového kontaminantu „mokrým“ procesem pomaleji než procesem „suchým“. Zjištěné reverzní chování souvisí s množstvím H_2O_2 na kontaminovaném povrchu. Při užití UV-C záření pro aktivaci H_2O_2 dochází u „mokrého“ procesu vlivem vyšší koncentrace H_2O_2 v kondenzátu přednostně k rekombinaci většiny vzniklých OH radikálů, než k aktivaci daného kontaminantu těmito radikály. Naopak v případě „suchého“ procesu je adsorbované množství H_2O_2 dostatečně nízké, vzniklé radikály se tedy spotřebovávají primárně na degradaci modelového kontaminantu. Toto je velkou výhodou kombinace VPHP/UV-C vzhledem k již zmíněné korozivnosti prostředí při „mokrém“ procesu.

Optimalizací parametrů analytické metody na HPLC/

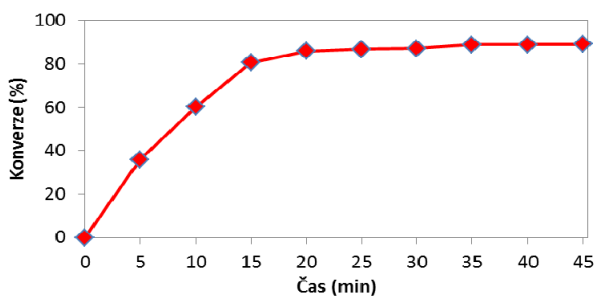
MS (typ kolony, průtok, mobilní fáze, gradient, parametry ionizace) bylo dosaženo separace degradačních produktů a byla získána jejich spektra (obr. 2), která sloužila ke strukturální charakterizaci.

Analýzou vzorků kontaminantů v průběhu reakce byla získána kinetická data, dokládající průběh a účinnost dekontaminačního procesu (obr. 3).

S využitím MS spekter s vysokým rozlišením (LTQ Orbitrap) byl určen pík náležící výchozí látce ($t_r = 32$ min). Pomocí iontových chromatogramů bylo možno dosáhnout separace většiny vznikajících látek (obr. 4). S využitím kinetických dat a HPLC/MS/MS analýz byly určeny další degradační meziprodukty reakce.

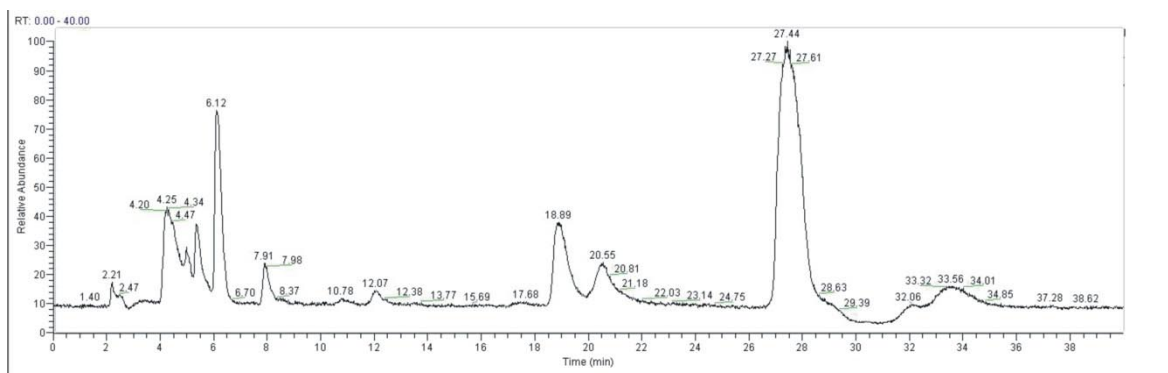


Obr. 2. MS spektrum výchozí látky TCAP



Obr. 3. Konverze modelové látky TCAP v čase pomocí VPHP, 1200 ppm

Degradační metoda a metody analytické byly následně aplikovány na Oxaliplatinu, Pikoplatinu a Cisplatinu, tedy látky s vysokou bioaktivitou a toxicitou. Bylo prokázáno, že degradace probíhá stejnými mechanismy, jako v případě modelové látky. Analýzou reakčních směsí byly určeny vznikající meziprodukty. Při reakcích dochází ke vzniku aqua-komplexů (aquatace je možná až do čtvrtého stupně), hydroxo-komplexů a oxidačních produktů platiny (oxidace z platnatanu na platičitan). Oxidační efekt peroxidu vodíku se také projevuje na organických ligandech.



Obr. 4. Chromatogram reakční směsi po 30 minutách

Všechny zmíněné procesy přispívají k výraznému a velmi rychlému snížení biologické aktivity a toxicity všech zkoumaných látek. Toto bylo dokázáno *in vivo* testy na pokusných zvířatech.

Závěr

Byla vyvinuta metoda rychlé degradace modelové substance platinových cytostatik – ammintrichloridoplatnatanu draselného. Degradace látky je rychlá a efektivní – k 90% konverzi látky dochází během 45 minut. Velkou výhodou je použitelnost metody pro velké prostory, například výrobní haly a operační sály v nemocnicích. Využití metody v praxi napomáhá nízká toxicita dekontaminačního činidla, jeho ekologičnost a existence komerčně dostupných generátorů par H_2O_2 .

In vivo testováním bylo prokázáno, že toxicita produktů dekontaminace je výrazně nižší, než u výchozích cytostatik. Degradací produkty byly identifikovány pomocí HPLC/MS analýz. Pro degradaci v kapalně fázi je možno použít vodných roztoků H_2O_2 , ve kterých probíhá degradace identickými mechanismy.

Výsledky z této práce jsou aktuálně využívány pro experimentální testy aplikující VPHP v reálném prostředí (nemocniční prostory). Další výzkum se bude soustředit na aplikaci metody na další bioaktivní látky z oblasti léčiv. Rovněž potenciace procesu UV zářením a odlišný dekontaminační mechanismus jsou výsledky s velkým potenciálem pro další výzkum. Kombinace VPHP/UV-C je velmi účinným řešením, které je zajímavé nejen pro svou vysokou materiálovou kompatibilitu s běžně užívanými materiály.

LITERATURA

1. <http://www.epa.gov/ppcp>.
2. Kümmerer K.: *Chemosphere* 45, 957 (2001).
3. Švrček J.: *Dizertační práce*. VŠCHT, Praha 2010.

STANOVENÍ ORGANICKÝCH KONTAMINANTŮ PLYNOVOU CHROMATOGRafiÍ S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (GC-MS/MS)

MICHAL STUPÁK, KAMILA KALACHOVÁ,
JANA PULKRABOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice
michal.stupak@vscht.cz*

Úvod

Environmentální kontaminanty tvoří různorodou skupinu látek, do které jsou řazeny jednak persistentní organické polutanty (POP), jako polychlorované bifenyly (PCB), polybromované difenyl etery (PBDE) a organochlorové pesticidy (OCP) a dále např. také polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Všechny tyto kontaminanty pocházejí z průmyslového znečištění. PAU mohou navíc kontaminovat životní prostředí také z neantropogenních zdrojů (např. přírodní průsaky ropy, lesní požáry, vulkanická činnost atd.) a mohou vznikat také při kulinářské úpravě potravin. PBDE představují důležitou a rozsáhlou skupinu bromovaných retardérů hoření (BFR), které se používají v různých materiálech, jako jsou plasty, textilie a elektronika, k omezení jejich hořlavosti. PCB reprezentují skupinu perzistentních organických látek, která byla široce používána v mnoha oblastech, např. jako dielektrická a teplonosná media v průmyslových zařízeních. OCP byly používány ve velké míře pro zemědělské a nezemědělské účely po celém světě. Ačkoli jsou ve většině zemí zakázány, s ohledem na jejich vysokou perzistenci jsou jejich residua stále nacházena v životním prostředí. OCP, PCB a PBDE mají díky své struktuře lipofilní charakter a kumulují se v tukové tkáni^{1–7}.

Všechny tyto skupiny se dostávají do lidského organismu převážně potravinami, příjem PAU a BFR je možný také ze vzduchu, ve kterém jsou vázány především na povrch prachových částic. Z tohoto důvodu se sledováním těchto látek zabývá mimo jiné také Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). PCB, PBDE a OCP jsou zařazeny také na seznam Stockholmské konvence^{1,2,5,6}.

V současné době je možné v literatuře dohledat široké spektrum extrakčních a přečišťovacích technik pro jednotlivé skupiny látek. Na základě podobných fyzikálně-chemických vlastností lze však předpokládat, že by bylo možné tyto látky stanovovat simultánně. První a velmi často využívanou možností extrakce je extrakce dle Soxhleta. Alternativou tohoto postupu může být např. extrakce za zvýšeného tlaku (PLE), která je časově méně náročná a dochází při ní k výrazně menší spotřebě chemikálií. Pokud je do extrakční cely navíc přidán vhodný sorbent, je možné spojit krok extrakce a přečištění do jedno-

ho. Mezi další použitelné techniky patří např. extrakce s podporou mikrovln (MAE) a superkritická fluidní extrakce (SFE). Pro přečištění primárního extraktu se nejčastěji používají gelová permeační chromatografie (GPC) a extrakce na tuhou fázi (SPE). GPC může být plně automatizována; tato metoda je však časově náročnější a vyžaduje větší spotřebu rozpouštědla^{2,3,11–13}.

Stanovení všech výše uvedených skupin látek v potravinách se v současné době provádí především pomocí plynové chromatografie (GC) s hmotnostní spektrometrií (MS). Pro stanovení PBDE, PCB a OCP lze také použít GC ve spojení s detektorem elektronového záchytu (ECD). Pro stanovení PAU je často využívána kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s fluorescenčním detektorem (FLD). Tento typ detekce však nemůže být použit pro některé nefluoreskující PAU, mezi které patří např. cyklopenta[cd]pyren a benzo[j]fluoranthren, a proto i u této skupiny látek začíná nacházet uplatnění GC–MS v módu elektronové ionizace (EI)^{2,3,6,7,9,10}.

Cílem prezentované studie je optimalizace analytické metody pro stanovení vybraných skupin environmentálních kontaminantů (PCB, BFR, PAU, atd.) v rybí svalovině s využitím GC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií typu trojitý kvadrupól (MS/MS), která umožňuje simultánní stanovení těchto látek. Práce navazuje na předchozí činnost na Ústavu chemie a analýzy potravin na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, která probíhá v rámci Evropského projektu CONFIDENCE (Contaminants in Food and Feed: Inexpensive Detection for Control of Exposure).

Experimentální část

Chemikálie

V prezentované studii byly použity následující chemikálie: deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Francie), aceton (Penta Praha, ČR), ethylacetát (Fluka, Německo), dichlormetan, hexan, isooktan (Merck, Německo), chlorid sodný, (Lach Ner, ČR), síran hořečnatý bezvodý (Sigma-Aldrich, Německo), síran sodný (Penta Praha, ČR; příprava bezvodého síranu sodného probíhá v sušárně při 600 °C po dobu 7 hodin), Silikagel 60 (velikost částic 0,063–0,100 mm, Merck, Německo; aktivace silikagelu probíhá v sušárně při 180 °C po dobu 5 hodin. Po vychladnutí se deaktivuje přidávkou 2 % (w/w) vody, dobře protřepe v zábrusové prachovnici a poté se ponechá 3 hodiny třepat na laboratorní třepačce. Takto připravený silikagel se uloží do exsikatoru a po 16 hodinách je možné ho použít. Doba použitelnosti silikagelu je maximálně 14 dní.).

Použité technické plyny: dusík 4.0 (Siad, ČR), helium 6.0 (Siad, ČR).

Použité standardy: jednotlivé PBDE kongenery #28, 47, 49, 66, 85, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 203, 206, 207, 209 (vše s deklarovanou čistotou >98 %) byly dodány od Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Kanada), standardy PCB #28, 52, 77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 180 a 189 (vše s deklarovanou čistotou >97%) byly nakoupeny od Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Německo), standardy ^{13}C -PCB 101, 77 a PBDE 37, 77 byly dodány od Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) a Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Kanada), v uvedeném pořadí. Certifikované standardy jednotlivých PAU: acenaften (AC), acenafylen (ACL), antracen (AN), benz[a]antracen (BaA), benzo[a]pyren (BaP), benzo[b]fluoranten (BbFA), benzo[c]fluoren (BcFA), benzo[j]fluoranten (BjFA), benzo[k]fluoranten (BkFA), benzo[ghi]perylene (BghiP), chrysen (CHR), cyclopenta[cd]pyren (CPP), dibenzo[ah]antracen (DBahA), dibenzo[ae]pyren (DBaeP), dibenzo[ah]pyren (DBahP), dibenzo[ai]pyren (DBaiP), dibenzo[al]pyren (DBalP), dibenzothiofen (DBT), fluoranten (FA), fluoren (FL), indeno[1,2,3-cd]pyren (IP), naftalen (NA), fenantren (PHE), pyren (PY), 2-methylantracen (2-MA), 1-methylchrysen (1-MC), 3-methylchrysen (3-MC), 5-methylchrysen (5-MC), 1-methylnaftalen (1-MN), 2-methylnaftalen (2-MN), 1-methylfenantren (1-MPH) a 1-methylpyren (1-MP) (vše s deklarovanou čistotou >98 %) byly dodány od Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Německo), certifikovaný standard roztoku značených PAU - US EPA 16 PAH směs ($^{13}\text{C}_6$ -AC, $^{13}\text{C}_6$ -ACL, $^{13}\text{C}_6$ -AN, $^{13}\text{C}_6$ -BaA, $^{13}\text{C}_4$ -BaP, $^{13}\text{C}_6$ -BbFA, $^{13}\text{C}_6$ -BkFA, $^{13}\text{C}_{12}$ -BghiP, $^{13}\text{C}_6$ -DBahA, $^{13}\text{C}_6$ -FA, $^{13}\text{C}_6$ -CHR, $^{13}\text{C}_6$ -IP, $^{13}\text{C}_6$ -NA, $^{13}\text{C}_6$ -PHE, $^{13}\text{C}_3$ -PYR) byl zakoupen od Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Certifikované standardy $^{13}\text{C}_{12}$ -DBaiP a $^{13}\text{C}_6$ -DBaeP byly dodány Cambridge Isotope Laboratories Inc (Andover, MA, USA). Certifikované individuální roztoky standardů alternativních BFR: pentabromtoluen (PBT), hexabrombenzen (HBB), pentabrommethylbenzen (PBEB), 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)etan (BTBPE), oktobromtrimethylfenylindan (OBIND), dekabromdifenylytan (DBDPE) byly zakoupeny od Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Kanada). Jednotlivé OCP: α -HCH, HCB, β -HCH, γ -HCH, heptachlor, aldrin, *cis*-HEPO, *trans*-HEPO, oxychlordan, *trans*-chlordan, o,p'-DDE, α -endosulfan, *cis*-chlordan, p,p'-DDE, dieldrin, o,p'-DDD, endrin, β -endosulfan, p,p'-DDD, o,p'-DDT, endosulfansulfát, p,p'-DDT – byly dodány Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Německo).

Použité přístroje a zařízení

Analytické váhy GR-202EC (A & D Instruments, Japonsko), váhy HF-1200G EC (A & D Instruments, Japonsko), předvážky AND HF-1200 (AND, Japonsko), dávkovač kapalin 10 ml (Fischer Scientific, USA), automatické pipety FINNPIPETTE 2–10 ml (Thermo Scientific, USA), rotační vakuová odparka s vodní lázní, BüchiRotavapor R-114 a Waterbath B-480 (Švýcarsko), odstředivka, HETTICH Zentrifugen, EBA 21 (A. Hettlich, Německo), polypropylenové kyvety – 50ml (Greiner Bio-

one, SRN), laboratorní stříkačky 10 až 1000 μl (Hamilton, USA).

Analyzovaný materiál

Pro vývoj a následnou validaci metody byly použity dva druhy ryb o různé tučnosti zakoupené v české obchodní síti, které byly předem vyšetřeny na obsah cílových analytů – pstruh (0,6 % tuku) a losos (10,4 % tuku). Všechny vzorky byly po homogenizaci uchovávány při $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

Izolace analytů

Do kyvety bylo naváženo cca 10 g předem zhomogenizovaného vzorku rybí svaloviny, ke kterému bylo přidáno 5 ml deionizované vody. Následně bylo přidáno 10 ml ethylacetátu a květa byla třepána po dobu 1 min. Poté byly do kyvety přidány 2 g NaCl a 4 g MgSO_4 a opět byla květa 1 min třepána. Následovalo odstředění vzorku na centrifuze při 11 000 otáčkách/min při teplotě $20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 min. Z ethylacetátové (horní) fáze bylo odebráno do srdcové baňky 5 ml extraktu a extrakt byl odpařen na vakuové rotační odparce a jemně odfoukán do sucha slabým proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml hexanu.

Přečištění extraktu

Přečištění extraktu bylo provedeno metodou extrakce na tuhou fázi (SPE) na ručně připravené silikagelové kolonce – Pasteurova pipeta nebo kolonka pro adsorpční chromatografii plněná od spoda skelnou vatou, malým množstvím bezvodého Na_2SO_4 , 1 nebo 5 g silikagelu a opět bezvodým Na_2SO_4 . Krok přečištění, resp. velikost kolonky je dána množstvím aplikovaného tuku, byly proto použity dva typy kolonek: (i) malá, s použitím 1 g silikagelu pro vzorky ryb do 2 % tuku a (ii) velká, tvořena 5 g silikagelu 60 pro vzorky s více než 2 % tuku. Kondicionace kolonek byla provedena 6 (18) ml směsi hexan:dichlormetan (3:1, *V/V*) a 4 (12) ml hexanu. Poté byl nanesen vzorek rozpuštěný v 1 ml hexanu a analyty byly eluovány 10 (30) ml směsi hexan:dichlormetan (3:1, *V/V*). Po přečištění byl vzorek opět odpařen a odfoukán do sucha. Následně byl vzorek rozpuštěn v 0,5 ml isooktanu se syringe standardy BDE 77 o koncentraci 5 ng ml^{-1} , ^{13}C -PCB 101 o koncentraci 40 ng ml^{-1} a ^{13}C -PAU o koncentraci 2 ng ml^{-1} , a převeden do vialky.

Eluční profil a výtěžnost SPE silikagelových kolonek

Eluční profil byl proveden pro získání informace, kdy se cílový analyt eluuje. Pro zjištění elučního profilu kolonek byl po kondicionaci na silikagel nanesen v 1 ml hexanu směsný standard všech cílových analytů. Eluát byl jímán (i) 1 g kolonka – po 1 ml, (ii) 5 g kolonka – po 2 ml. Po odpaření a odfoukání do sucha byla každá frakce rozpuštěna ve 250 μl isooktanu. Pro ověření výtěžnosti SPE kolonek byl na nakondicionovanou kolonku aplikován

směsný standard všech cílových analytů v 1 ml hexanu. Postup kondicionace a eluce byl stejný jako u vzorků.

Plynový chromatograf

Pro instrumentální stanovení všech analytů byl použit plynový chromatograf Agilent 7890As tandemovým hmotnostním spektrometrem 7000A Triple Quad (Agilent Technologies, USA) v módu s elektronové ionizací (EI). GC-MS/MS podmínky byly následující: kolona 1: Rxt 1614 (15 m × 0,25 mm × 0,1 μm; Restek, USA), kolona 2: DB5 (0,5 m × 0,15 mm × 0,15 μm; Agilent Technologies, USA), nosný plyn: helium, konstantní tlak nosného plynu 0,12 MPa při teplotě 80 °C, objem nástřiku: 2 μl, technika nástřiku: pulsní splitless (0,14 MPa po dobu 1,5 min), teplotní program nástřiku: 80 °C (0,2 min), 600 °C/min do 300 °C (1 min), 100 °C/min do 280 °C. V rámci experimentů byly vyzkoušeny tři teplotní programy pece: (i) 80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 240 °C, 2 °C/min do 270 °C, 5 °C/min do 320 °C, 40 °C/min do 340 °C (5 min); (ii) 80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 240 °C, 5 °C/min do 340 °C; (iii) 80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 240 °C, 10 °C/min do 340 °C (5 min). Teplota interface: 300 °C, teplota zdroje: 280 °C.

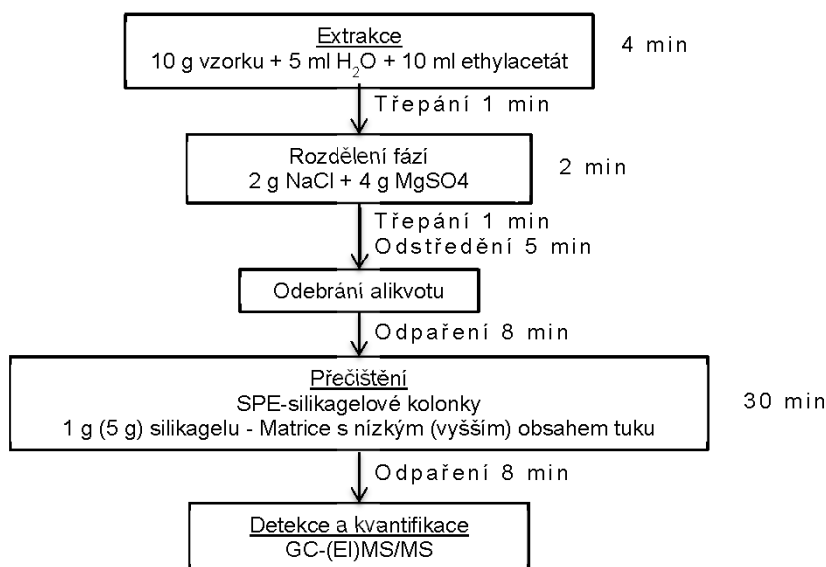
Výsledky a diskuse

Předkládaná studie shrnuje výsledky práce, která navazuje na předchozí činnost na Ústavu chemie a analýzy potravin v rámci evropského projektu CONFIDENCE,

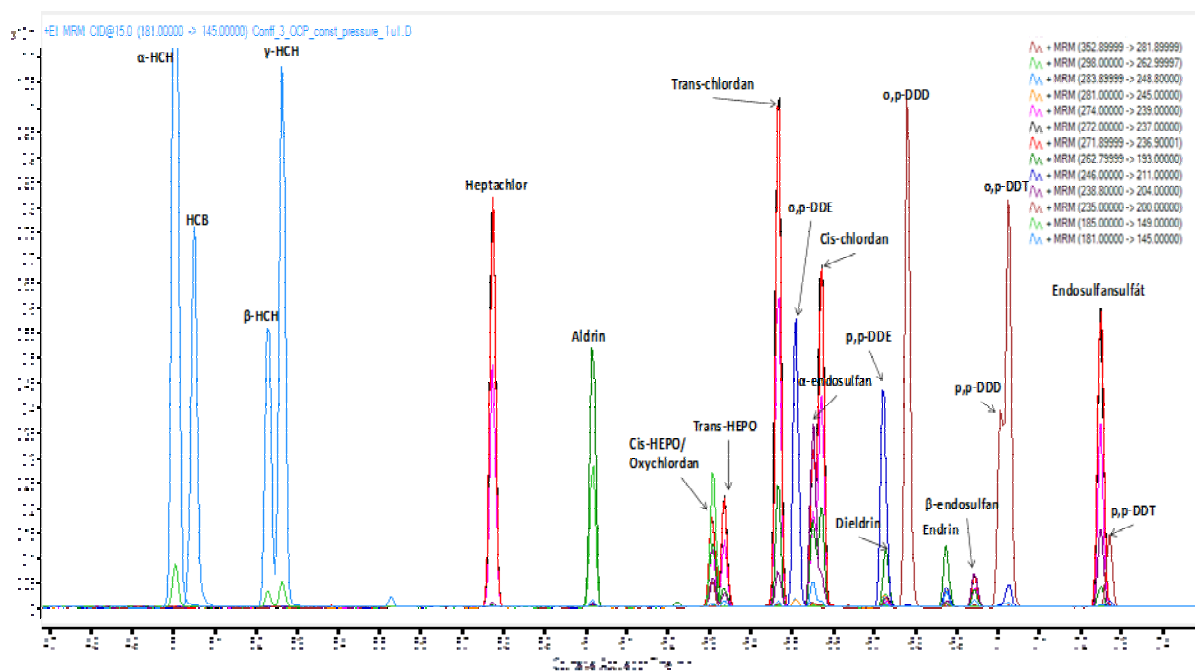
v rámci kterého byla již dříve vyvinuta metoda pro simultánní stanovení PCB, PBDE a PAU. Jedním z cílů této studie bylo rozšíření stávající metody o další analyty (OCP, další kongenery PBDE, ABFR, další PAU a jejich metylované deriváty), které nebyly původně zahrnuty do metody. Z důvodu dosažení co nejnižších limitů kvantifikace bylo dalším cílem zavedení instrumentální techniky plynové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól (GC-MS/MS).

Pro přípravu vzorků byla použita metoda (obr. 1) založená na extrakci třepáním ethylacetátem s následným dočištěním pomocí extrakce na tuhou fázi (silikagelové kolonky). Prvním krokem rozšíření metody o další analyty bylo zjištění, zda je daný extrakční a přečišťovací postup vhodný i pro nově zaváděné analyty. Bylo proto nutné stanovit eluční profily všech cílových analytů a jejich výtěžnost na SPE kolonkách. Z elučních profilů a výtěžností bylo zjištěno, že přečišťovací metoda není vhodná pro dieldrin, endrin, β-endosulfan, endosulfansulfát a NA, které jsou na silikagelovou kolonku ireverzibilně navázány a z kolonky je tedy není možné vyeluovat (v případě NA může být nižší výtěžnost dána také jeho extrémní těkavostí a s tím souvisejícími problémy při odpařování). Pro všechny ostatní analyty bylo dosaženo výtěžností vyšších než 75 % pro obě velikosti kolonek.

V rámci původní metody pro stanovení PAU, PCB a PBDE vyvinuté v projektu CONFIDENCE byla jako instrumentální koncovka použita dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátozem iontů (GC×GC-TOF-MS), která umožňuje kromě stanovení cílových analytů také



Obr. 1. Schéma použité analytické metody



Obr. 2. Chromatografický záznam OCP (500 ng ml⁻¹ isooktanu) z teplotního programu (iii)

případný screening ostatních látek potenciálně přítomných ve vzorku. Nevýhodou této techniky je značně časově náročné zpracování získaných dat. Převedení metody na GC-MS/MS, která v dnešní době představuje čím dál častěji používanou analytickou koncovku, bylo provedeno s cílem zjednodušit závěrečné zpracování dat. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) navíc umožňuje dosažení lepších výsledků s ohledem na selektivitu a limity detekce celé metody.

Prvním krokem zavedení instrumentální koncovky GC-MS/MS bylo určení jednoho kvantifikačního a jednoho nebo dvou konfirmačních MS/MS přechodů, které jsou specifické pro každou jednotlivou látku (v případě isomerů mají dané látky přechody identické). Zjištění přechodů zahrnovalo nejprve analýzu směšného standardu všech cílových sloučenin o vysoké koncentraci (1000 ng ml⁻¹) v módu scan, kdy byla zjištěna spektra daných látek, ze kterých byly v dalším kroku vybrány nejintenzivnější a co nejvíce specifické ionty. Tyto tzv. mateřské ionty byly následně fragmentovány v kolizní cele za vzniku dceřiných iontů, ze kterých byly opět vybrány nejintenzivnější a co nejvíce specifické hmoty. Daný mateřský a dceřiný ion tvoří hledaný MS/MS přechod. V rámci fragmentace bylo nutné optimalizovat pro vybraný MS/MS přechod také tzv. kolizní energii, která určuje míru fragmentace mateřského iontu. Příklad chromatografického záznamu stanovení OCP v módu MRM je zobrazen na obr. 2.

V další části experimentů byly modifikovány parametry GC analýzy vycházející z původní GC×GC metody

používané v laboratoři ve spojení s TOF-MS detektorem. Z důvodu zlepšení podmínek separace pro nově přidané analyty byly kromě původního teplotního programu (i) navrženy další dva teplotní programy (ii) a (iii) uvedené v experimentální části. Pro další experimenty byl nakonec vybrán teplotní program (iii) (80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 240 °C, 10 °C/min do 340 °C (5 min)). Tento teplotní program byl zvolen s ohledem na výše bromované látky, které s vyšší retencí na koloně více podléhají degradaci. Nevýhodou tohoto teplotního programu je koeluce BbFA, BkFA a BjFA, pro které by byl vhodnější teplotní program s pomalejším teplotním programováním.

V rámci validace metody byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost metody pomocí přídatku známého množství analytů do matrice na dvou koncentračních hladinách (1 a 5 µg kg⁻¹). Bylo dosaženo následujících výtěžností a opakovatelností: PCB 75–113 % a 3–9 %, PAU 85–104 % a 1–12 %, PBDE 78–120 % a 2–13 %, ABR 82–114 % a 2–14 %. Z časových důvodů nebyly naměřeny a vyhodnoceny validační experimenty pro OCP a některé další analyty, pro které bude validace metoda v nejbližší době dokončena.

Limity kvantifikace (LOQ), určené jako nejnižší body kalibrace (LCL), se pro všechny analyty pohybovaly v intervalu od 0,01 do 10 µg kg⁻¹. Vyšších LOQ bylo dosaženo pro výše bromované kongenery PBDE (BDE 206 a 207 – 5 µg kg⁻¹ a BDE 209 – 10 µg kg⁻¹) a OBIND (10 µg kg⁻¹). Pro DPBDE původně zahrnutý mezi cílové analyty nebyly z důvodu nízké citlivosti v EI naladěny

vhodné přechody. V dalším kroku byly porovnány LOQ dosažené nově vyvinutou metodou s metodou GC×CG-TOF-MS, kde byla použita technika nástřiku PTV a objem nástřiku byl 8 μl . U techniky GC-MS/MS byla použita technika nástřiku pulzní splitless a objem nástřiku byl 2 μl . Z porovnání vyplývá, že použitím GC-MS/MS jako instrumentální koncovky je možné dosáhnout i při nástřiku čtyřikrát menšího množství srovnatelných či dokonce nižších LOQ ve srovnání s GC×CG-TOF-MS.

Závěr

Předkládaná zpráva shrnuje výsledky zavedení nových analytů (OCP, další kongenery PBDE, ABFR, další PAU a jejich methylované deriváty) do stávající analytické metody, která byla vyvinuta v rámci předchozí činnosti na Ústavu chemie a analýzy potravin jako součást evropského projektu CONFIDENCE a převedení stávající instrumentální koncovky z GC×CG-TOF-MS na GC-MS/MS.

Během experimentů byly zjištěny charakteristické MS/MS přechody s optimální kolizní energií pro každý analyt. V rámci optimalizace GC metody byl vybrán s ohledem na tvar piků, odezvy a dobu analýzy následující teplotní program 80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 240 °C, 10 °C/min do 340 °C (5 min).

Z pokusů bylo dále zjištěno, že přečištění extraktu přes silikagelové kolonky není vhodné pro dieldrin, endrin, β -endosulfan, endosulfansulfát a naftalen. Pro ostatní cílové analyty byla metoda přípravy vzorku shledána jako optimální.

Výtěžnost a opakovatelnost pro PCB, PBDE, ABFR a PAU byla následující 75–120 %, RSD 1–14 %, v uvedeném pořadí. LOQ metody se pro všechny analyty pohybovaly v intervalu 0,01–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Vyšší LOQ byly stanoveny pro výše bromované PBDE (BDE 206, 207 a 209) a OBIND z důvodu použití ionizační techniky EI, které není příliš vhodná pro bromované látky. V navazujících experimentech, v rámci mé diplomové práce, budou dokončeny validace zbylé skupiny analytů a dále bude vyzkoušena negativní chemická ionizace (NCI) vhodná především pro výšebromované látky.

Uvedená studie byla uskutečněna za podpory grantu Evropské Unie CONFIDENCE (FP7-211326-CP) „Contaminants in food and feed: Inexpensivedetectionfor-controlofexposure“, který je součástí 7. rámcového programu a grantu MSM 604637305 kontrakt č. IDS 7E08068 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

LITERATURA

1. EFSA: EFSA Journal (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/33r.pdf>).
2. EFSA: EFSA Journal (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>).
3. EFSA: EFSA Journal (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2156.pdf>).
4. EFSA: EFSA Journal (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1701.pdf>).
5. Roosens L., Cornelis C., D'Hollander W., Bervoets L., Reynders H., Van Campenhout K., Van Den Heuvel R., Neels H., Covaci A.: *Environ. Int.* 36, 368 (2010).
6. Xiaojing L.: *Diplomová práce*. University of Waterloo, Waterloo 2009.
7. Rezaei F., Bidari A., Birjandi A. P., Milani Hosseini M. R., Assadi Y.: *J. Hazard. Mater.* 158, 621 (2008).
8. Rodrigues M. V. N., Reyes F. G. R., Rehder V. L. G., Rath S.: *Chromatographia* 61, 291 (2005).
9. Nevado J. J., Martin-Doimeadios R. C., Guzman Bernardo F. J., Farinas N. R., Cogolludo J. M., Osma J. A.: *Talanta* 81, 887 (2010).
10. Famigliani G., Palma P., Termopoli V., Trufelli H., Cappiello A.: *Anal. Chem.* 81, 7373 (2009).
11. Derek M., Sverko E.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 769 (2006).
12. Keller J. M., Swarthout R. F., Carlson B. K., Yordy J., Guichard A., Schantz M. M., Kucklick J. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 747 (2009).
13. Oluseyi T., Olayinka K., Alo B., Smith R. M.: *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 482 (2011).

ANALÝZA SYNTETICKÝCH POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV S VYUŽITÍM EXTRAKCE METODOU QuEChERS

PETRA SUCHÁNKOVÁ, MARTIN ADAM,
PETRA PAVLÍKOVÁ a KAREL VENTURA

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

Úvod

Barviva jsou látky udělující potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo rekonstruuje barvu, která byla poškozena či zeslabena během technologického procesu¹. Všechna syntetická barviva použitá v této práci jsou v České republice povolena pouze jako přídavné látky a mohou být použita při výrobě definovaných potravin nebo jejich skupin jednotlivě či v kombinaci, avšak maximálně do výše daných limitů². Při použití některých potravinářských barviv (např. E102, E104, E124 a E129) musí označení potravin obsahovat doplňující informaci, že dané barvivo může nepříznivě ovlivnit činnost a pozornost u dětí³. Jako perspektivní pro izolaci potravinářských barviv se jeví metoda QuEChERS. Jedná se o extrakční metodu používanou především pro analýzu široké škály reziduí pesticidů v ovoci, zelenině, obilovinách a produktech z nich vyrobených. Tato technika zahrnuje několik kroků vedoucích k převodu analytu do rozpouštědla a získaný extrakt lze dále využít pro další analýzu^{4,5}. Přesto, že je tato metoda nejvíce využívána především pro extrakce reziduí pesticidů, existují předpoklady jejího využití pro extrakce dalších analytů z rozličných vzorků. Aplikace metody QuEChERS na extrakci syntetických barviv z potravinářských vzorků by mohla vést k nalezení vhodné a současně rychlé a efektivní metody k dosud běžně užívané metodě založené na extrakci s využitím vlněného vlákna. Extrakty by mohly být jednoduše proměřeny spektrofotometricky ve viditelné oblasti při vlnových délkách příslušných absorpčních maxim, v případě složitějších směsí pak analyzovány metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí ve viditelné oblasti světla^{6,7}.

Experimentální část

Pro extrakci byla připravena sada vodných roztoků syntetických potravinářských barviv (E102, E104, E124, E129, E131, E133). Jako extrakční činidlo byl vyzkoušen acetonitril, methanol, ethanol, 2-propanol a 1-propanol. Průběh extrakce byl podpořen přidávkou solí NaCl a MgSO₄ (vše čistoty p.a., Sigma Aldrich, Praha, ČR). V neposlední řadě byla pro zvýšení odezvy extraktu přidána 35% HCl (Penta, Chrudim).

Extrakce byla prováděna v plastových uzavíratelných zkumavkách o objemu 13 ml, do kterých bylo odměřeno 6 ml roztoku barviva, 3 ml extrakčního činidla (1-propanol), přidáno 0,6 g NaCl, 2,4 g MgSO₄ a 0,75 ml 35% HCl a obsah zkumavky byl uzavřen a důkladně protřepán do rozpuštění přidaných solí. Po oddělení fází byla horní organická odebrána, její objem změřen a obsah jednotlivých barviv analyzován. U sledovaných barviv bylo určeno absorpční maximum pomocí spektrometru HELIOS Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a příslušné vlnové délky byly použity i pro chromatografickou analýzu.

Syntetická barviva byla analyzována pomocí HPLC s VIS detekcí. Kapalinový chromatograf byl sestaven z autosamperu, pumpy LC 1150 a detektoru LC 1210 od firmy GBC (Regents Park, Austrálie) a degasseru od firmy ERC (Saitana, Japonsko). K separaci byla použita kolona LiChrospher 100 RP-18e (250 × 4 mm i.d., zrnitost 5 μm) s předkolonkou LiChrospher 100 RP-18e (4 × 4 mm i.d., zrnitost 5 μm) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Pro separaci byla použita gradientová eluce při průtoku 1 ml min⁻¹. Složení mobilní fáze bylo následující: acetonitril (MF-A, čistota 99,9%, Sigma Aldrich, Praha ČR) a 100 mM octan sodný (čistota 99,0%, Sigma Aldrich, Praha ČR) v redestilované vodě o pH upraveném pomocí HCl na hodnotu 7,0. Roztok octanu sodného byl zfiltrován přes membránový filtr 0,45 μm (Sigma Aldrich, Praha ČR). Program gradientové eluce byl následující: 0–5,5 min 100 % MF-B, 5,5–44 min lineární gradient do 70 % MF-B a 44–53 min lineárně do 0 % MF-B.

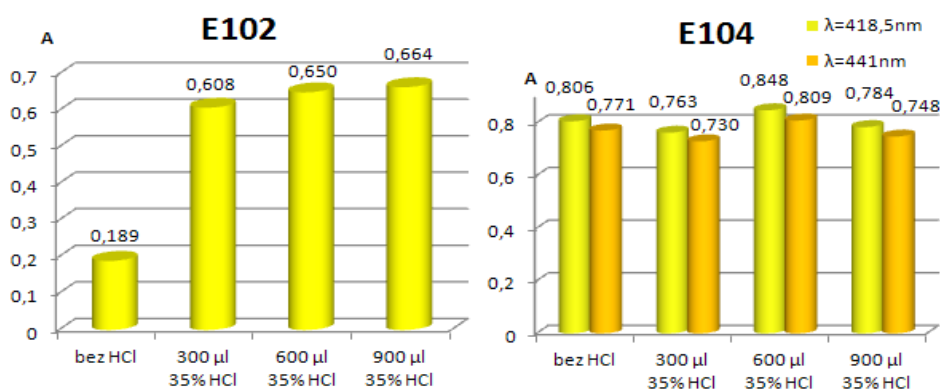
Výsledky a diskuse

Metoda QuEChERS byla optimalizována z několika hledisek. V původní metodě byl jako extrakční rozpouštědlo použit acetonitril. Ten však není vhodný pro syntetická potravinářská barviva, protože s výjimkou barviva E131 je výtěžnost jednotlivých barviv velmi malá. Proto byla dále testována řada alkoholů. Methanol nebyl vhodný, protože v průběhu extrakce nedošlo k oddělení fází. Také ethanol nebyl vhodný, protože vzhledem k dobré mísitelnosti s vodou došlo k vytvoření fází ve nesprávném poměru. Jako vhodná extrakční činidla byla vyhodnocena 2-propanol a 1-propanol, přičemž 1-propanol vykazoval vyšší výtěžnosti po úpravě pH 35% HCl, což dokazuje tabulka I.

Především u žlutého barviva E102 bylo zaznamenáno výrazné zvýšení odezvy po extrakci při přidávku 0,5 ml 35% HCl (tab. I). Proto byl u žlutých barviv E102 a E104 proměřen vliv přidávky HCl na výsledné odezvě barviva. Ke 4 ml standardního roztoku byly přidány 4 ml 1-propanolu, 0,4 g NaCl, 1,6 g MgSO₄ a dané množství HCl.

Tabulka I
Srovnání extrakčních činidel propanolu a isopropanolu

Barvivo	λ_{\max} [nm]	1-propanol bez okyselení výtěžnost [%]	1-propanol s okyselením výtěžnost [%]	2-propanol výtěžnost [%]
E102	429,5	22	77	29
E104	417,5	82	73	81
E124	512,0	57	74	67
E129	509,5	94	93	82
E131	635,0	83		79
E133	630,0	83		75



Obr. 1. Změny absorpčních vlnových délek v závislosti na množství přidané kyseliny pro žlutá barviva

Tabulka II
Množství jednotlivých komponent užitých při extrakci

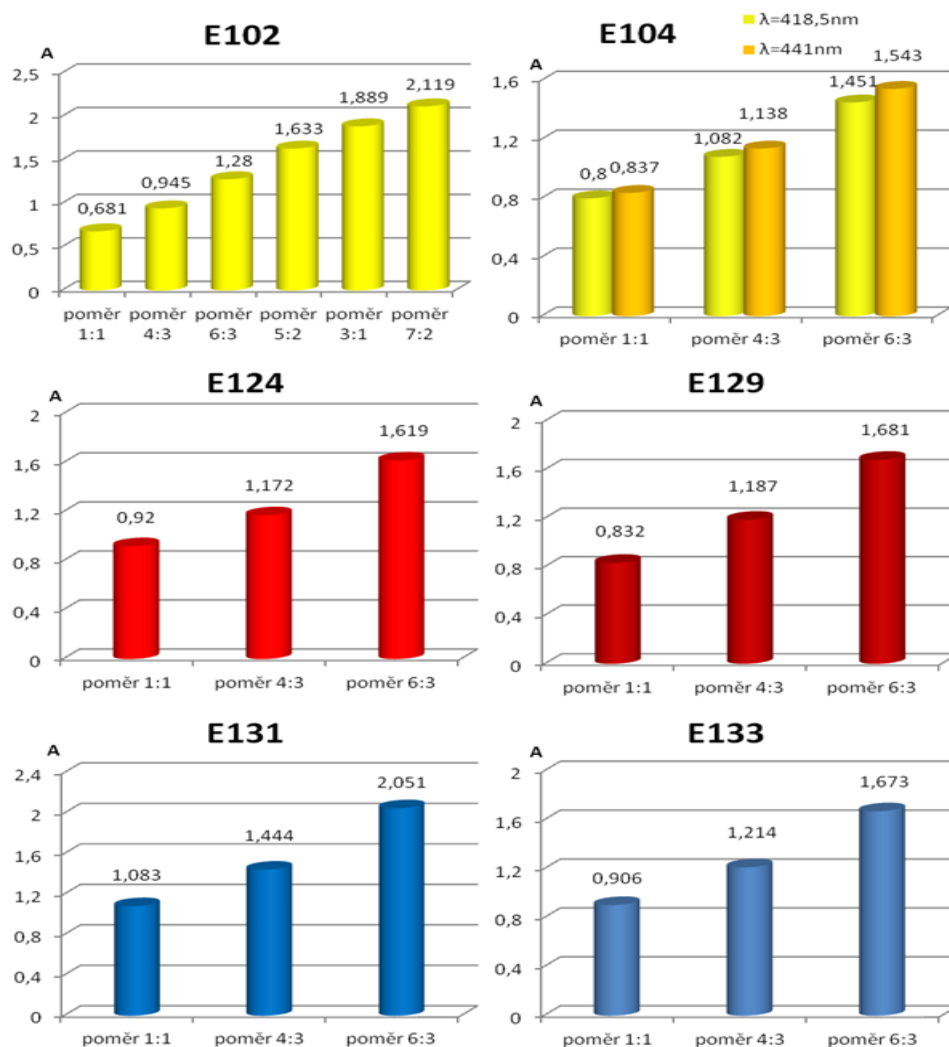
Poměr vodné a organické fáze		1:1	4:3	6:3	5:2	3:1	7:2
Objem vodného roztoku standardu barviva, ml		4	4	6	10	12	14
Objem propanolu, ml		4	3	3	4	4	4
Množství přidané soli, g	NaCl	0,4	0,4	0,6	1,25	1,5	1,75
	MgSO ₄	1,6	1,6	2,4	5	6	7
Množství přidané 35% HCl, ml		0,5	0,5	0,75	1,25	1,5	1,75

Změny absorpčních vlnových délek u standardů E102 a E104 v závislosti na množství přidané kyseliny ukazuje obr. 1.

Na základě testování možnosti zakoncentrování barviva do organické fáze byla provedena extrakce ze standardních roztoků barviv v rozdílném poměru k organickému rozpouštědлу (1-propanolu), a to v poměrech 1:1, 4:3, 6:3 a později i u žlutého barviva E102 v poměru 5:2, 3:1 a 7:2 (obr. 2). Při vyšších poměrech od 5:2 docházelo k pozvolnému posunu vlnové délky absorpčního maxima, a to až o 8 nm. Vzhledem k použití větších objemů roztoků standardů barviv byla ekvivalentně zvýšena i dávka přida-

ných solí a kyseliny dle tabulky II.

Množství přidaných solí pro extrakci bylo na počátku experimentu odvozeno poměrově. Empiricky však bylo nutné ověřit, jak se množství přidaných solí podílí na účinnosti extrakce potravinářských barviv v 1-propanolu. Proto byla připravena sada extrakcí pro vodné roztoky červených barviv E124 a E129 (4 ml) s přidanými 4 ml 1-propanolu, 0,5 ml 35% HCl a odstupňovaným množstvím přidaných solí (avšak při zachování jejich vzájemného poměru 1 : 4) – viz tab. III.



Obr. 2. Změny absorpance vzhledem k rozdílným poměrům vodné a organické fáze

Byly zkoumány vzorky cukrovinek obsahující syntetická potravinářská barviva, a to lentilky, želé cukrovinky a dropsy Clever. Z příslušných částí vzorků byly připraveny vodné roztoky, které byly použity při extrakci. Výsledky analýz reálných vzorků udává tab. IV.

Standardy syntetických barviv byly rovněž analyzovány pomocí HPLC/VIS. Na obr. 3 je uveden ukázkový chromatogram směsi standardů. Pro detekci byly vybrány vlnové délky absorpčních maxim pro jednotlivé barvy vzhledem ke spektrům syntetických barviv. Detektor zaznamenával měření na dvou kanálech (kanál A a kanál B) – viz tab. V.

Závěr

Jako nejvhodnější extrakční činidlo ze všech testovaných byl shledán 1-propanol. Přechod do organické fáze byl podpořen přidavkem cca 0,5 ml 35% HCl, což vedlo ke zvýšení absorpance extraktu u sledovaného barviva E124 a především u barviva E102.

Během experimentů u zakoncentrování docházelo k očekávanému nárůstu absorpance, avšak u vyšších poměrů množství vodného roztoku standardu ku množství propanolu 5:2 a vyšších se začala měnit také vlnová délka absorpčního maxima.

S přidavkem solí docházelo k pozvolnému nárůstu výtěžnosti. Přidaný poměr solí 0,6 g NaCl a 2,4 g MgSO₄ byl rozpouštěn po delší době intenzivního třepání (několik

Tabulka III

Výsledky měření absorbance standardů E124 a E129 po extrakci při různých přídavných solí (se zachováním poměru přídavných solí 1 : 4)

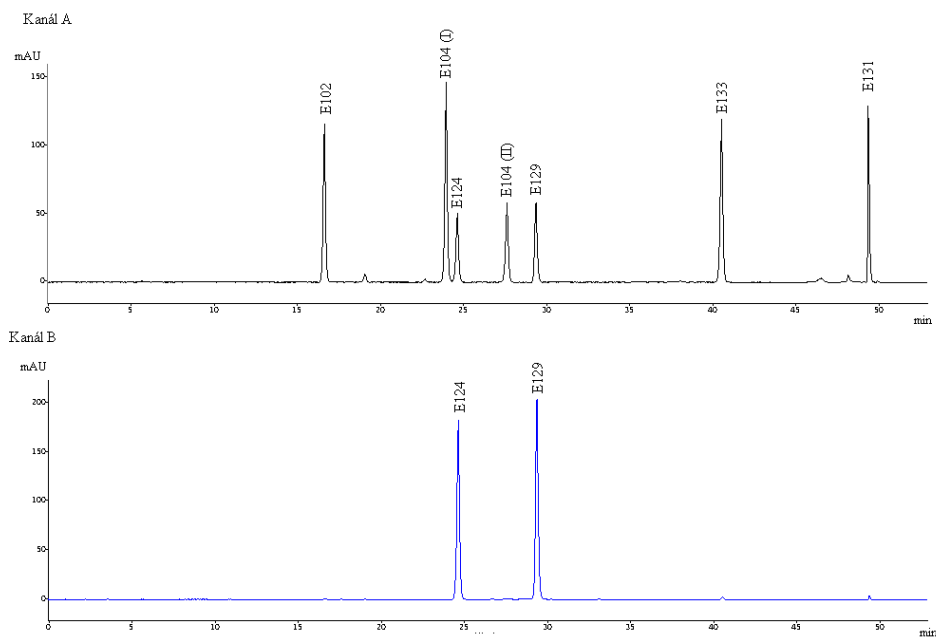
Množství přidaných solí		E124	E129
NaCl	MgSO ₄	výtěžnost [%] ^a	výtěžnost [%] ^a
0 g	0 g	neoddělily se fáze	neoddělily se fáze
0,1 g	0,4 g	neoddělily se fáze	neoddělily se fáze
0,2 g	0,8 g	70	83
0,3 g	1,2 g	76	83
0,4 g	1,6 g	79	87
0,5 g	2,0 g	81	89
0,6 g	2,4 g	85	88
0,7 g	2,8 g	88	87

^a V porovnání s dávkovaným množstvím barviva (viz tab. II)

Tabulka IV

Výsledky měření absorbance vzorků po extrakci do propanolu

Vzorek	Množství vzorku	A_{\max}	Nalezené barvivo
Lentilka ČERVENÁ	1 ks	0,417	E124
Lentilka MODRÁ	1 ks	0,105	E133
Lentilka ZELENÁ	1 ks	0,245; 0,049	E102; E133
Lentilka ŽLUTÁ	1 ks	0,198	E102
Želé ČERVENÉ	1,0486 g / 25 ml	0,272	E129
Želé MODRÉ	1,1298 g / 25 ml	0,193; 0,989	E133
Želé ŽLUTÉ	0,8867 g / 25 ml	0,246; 0,233	E104



Obr. 3. HPLC chromatogram směsi standardů barviv z obou kanálů detektoru

Tabulka V
Program detektoru pro měření vlnových délek

Kanál	Čas [min]	Vlnová délka [nm]	Barviva
Kanál A	0–30	420	žlutá
	30–53	610	modrá
Kanál B	0–53	510	červená

minut) a přidavek 0,7 g NaCl a 2,8 g MgSO₄ nebyl rozpouštěn celý. S rostoucím přídatkem solí také mírně klesal objem organické fáze, do které byla barviva extrahována. Tento objem se v proměřené šklále již přibližně od přídatku solí 0,5 g NaCl a 2,0 g MgSO₄ zásadně neměnil. Jako nejvhodnější množství přidávaných solí lze pro budoucí experimenty doporučit poměr přidávaných solí 0,5 g NaCl a 2,0 g MgSO₄.

V chromatogramu standardů přísluší každému barviva jeden pík s výjimkou barviva E104, což je způsobeno formou barviva (E104 (I) mono- a E104 (II) bisulfonovou formou).

Práce byla realizována díky finanční podpoře výzkumného záměru CZ 310006 Univerzity Pardubice a grantového projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).

LITERATURA

1. Vyhláška č. 304/2004 kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. Sbírka zákonů č.304/2004, částka 100, str. 6326.
2. Vyhláška č. 4/2008Sb, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Sbírka zákonů č.4/2008, částka 3, str. 258.
3. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách.
4. Wilkowska A., Biziuk M.: Food Chem. 125, 803 (2011).
5. Lehotay S., Anastassiades M., Majors R.: LC-GC Europe 23, 418 (2010).
6. Kirschbaum J., Krause C., Pfalzgraf S., Brückner H.: Chromatographia 57, 115 (2003).
7. Miniotti K. S., Sakellariou Ch. F., Thomaidis N. S.: Anal. Chim. Acta 583, 103 (2007).

VYUŽITÍ LA-ICP-MS VE FORENZNÍ ANALÝZE – ANALÝZA POVÝSTŘELOVÝCH ZPLODIN

KRISTÝNA ŠTŮLOVÁ, TOMÁŠ VACULOVÍČ
a VIKTOR KANICKÝ

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav
chemie, Kamenice 5, 625 00 Brno
styna@seznam.cz

Úvod

Jedním z mnoha oborů forenzních věd je kriminalistická balistika, která se zabývá zkoumáním různých objektů, jež mají vztah ke střelbě nebo jinému použití zbraně. Kriminalistická balistika se dále zabývá mechanismem výstřelu, pohybem střely v hlavní zbraně a dráhou střely při letu na cíl. Mimo to zkoumá funkčnost zbraní, střeliva, ale také se zaměřuje na analýzu povýstřelových zplodin^{1,2}, které pomohou určit střelce a místo střelby.

Analýza povýstřelových zplodin se rozšířila až v posledních letech, kdy bylo umožněno detekovat a analyzovat mikroskopické částice. Ve forenzní analýze je v dnešní době pro stanovení povýstřelových zplodin upřednostňována skenovací elektronová mikroskopie. Její výhodou je určování morfologie povýstřelových částic a prvková analýza. Nevýhodou je vyšší mez detekce, proto je nemožné stanovit stopové prvky. Toto přispělo k rozvoji nových metod. V posledních letech byla zkoumána i metoda ICP, u které byly vzorky rozpouštěny v kyselinách. Při úpravách vzorků rozpouštěním dochází velmi často ke kontaminacím a následně k nepřesným výsledkům.

Povýstřelové zplodiny jsou kovové i nekovové částice, které jsou často mikroskopických až submikroskopických rozměrů³. Tyto částice vznikají hořením zápalkové složky, prachové náplně^{1,3} a při průchodu střely hlavní. Obsahují zbytky nespáleného střelného prachu, nábojnice⁴.

Charakteristická morfologie částic povýstřelových zplodin je dána tvorbou zplodin vznikajících rychlým ochlazením oblaku (obsahující prvky Pb, Ba a Sb). Tento oblak vzniká hořením zápalné směsi⁵. Nejčastěji pozorovatelnou morfologií jsou kulovité částice¹.

Ve složení povýstřelových zplodin může být identifikovaná celá řada prvků: Pb, Ba, Sn, Sb, Hg, Ca, Si, Cl, K, Al, Ti, S. Uvedené prvky pochází ze zápalkových složek. Dále se v povýstřelových zplodinách mohou stanovit prvky: Cu, Ni, Zn, Fe, Pb, které pocházejí z dalších komponent náboje či zbraně. Není vyloučena identifikace dalších chemických prvků, které budou charakterizovat určitý zbraňový systém¹.

Částice jednoznačně dokazující zápalkové zplodiny (tedy zplodiny pocházející ze zápalkové složky) mají kulovitý (zaoblený) tvar. Obsahují, v závislosti na výrobci, ráži a provedení zápalky, některou z kombinací chemických prvků. Tyto kombinace jsou pevně dané¹:

- Pb, Sb, Ba,
- Pb, Sb, Sn, Ba,
- Pb, Sn, Ba, Ca, Si,
- Hg, Sb, Sn, Cl, K (Pb, Sn),
- Ti, Zn (Gd).

Dále je možné určit částice, které jsou charakteristické pro zápalkové zplodiny, ale nejsou schopny jednoznačné identifikace. Což znamená, že mohou pocházet i z jiného zdroje než ze zápalkové složky. Tyto částice se vykazují taktéž kulovitým tvarem. Částice opět obsahují některou z následně uvedených kombinací chemických prvků¹:

- Pb, Sb, Sn nebo Pb, Sb, nebo Pb, Sn nebo Pb, Ba,
- Ba, Sn nebo Ba, Sb,
- Hg, Sb nebo Hg, Sn.

Cílem této práce je aplikace metody LA-ICP-MS pro analýzu povýstřelových zplodin, jejíž výhodou je, že vzorek zůstává v původním (pevném) stavu a nemusí být podroben různým úpravám.

Experimentální část

Analýza povýstřelových zplodin byla prováděna metodou LA-ICP-MS. Laserová ablace byla prováděna komerčním laserovým ablačním systémem UP 213 (New Wave, USA). Typ laseru – Nd:YAG emitující záření o vlnové délce 213 nm. Trvání laserového pulzu je 4,2 ns. Při měření byl vzorek umístěn do pohyblivé ablační cely Supercell, jejíž objem je 33 cm³. Nosným plynem do ICP-MS bylo helium. ICP-MS spektrometr Agilent 7500 (Agilent, Japonsko) s kvadrupólovým analyzátozem byl spojen s laserovým ablačním systémem pomocí transportních hadiček (vyrobené z polyuretanu). Plazmovým plynem byl argon. V tab. I jsou uvedeny pracovní parametry ICP-MS.

Pro měření byly vybrány čtyři různé druhy nábojnic: 22 LR; S&B 7, 65 Br; S&B 9×19 a S&B 9 mm Luger.

Tabulka I
Pracovní parametry ICP-MS

Parametr	Hodnota
Vnější plazmový plyn (Ar)	15 l min ⁻¹
Střední plazmový plyn (Ar)	1 l min ⁻¹
Nosný plyn (He)	1 l min ⁻¹
Pomocný plyn (Ar)	0,6 l min ⁻¹
Vzdálenost cívky od vstupu do MS	8 mm
Příkon generátoru	1500 W

Tabulka II
Parametry optimalizace LA

Parametr	Hodnota
Hustota zářivého výkonu	7 J cm ⁻²
Frekvence laserových pulzů	10 Hz
Průměr laserového paprsku	40 μm

U všech zmíněných nábojnic byl plášť vyroben z mosazi. Z uvedených nábojnic byly mechanicky sejmuty povýstřelové zplodiny, které byly následně zachyceny na oboustrannou lepicí pásku, umístěnou na podložním sklíčku. Takto nachystaný vzorek byl připraven na analýzu.

Pro měření byl využit ablační mód – ablace do bodu. Optimalizované parametry pro laserovou ablací jsou uvedeny v tab. II.

Výsledky a diskuse

Vzorky byly připravovány stejným způsobem a za stejných podmínek. Vždy se jednalo o mechanické odstranění povýstřelových zplodin z vnitřní strany vystřelené nábojnice. Takto připravené povýstřelové zplodiny byly sejmuty na oboustrannou lepicí pásku na podložním sklíčku. Vzorek byl následně vložen do ablační cely, ve které probíhalo měření.

Intenzita byla měřena u těchto izotopů: ²⁷Al, ²⁹Si, ³⁴S, ³⁹K, ⁴³Ca, ⁴⁷Ti, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁷Fe, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁸⁸Sr, ⁹⁰Zr, ¹⁰⁹Ag, ¹¹¹Cd, ¹¹⁸Sn, ¹²¹Sb, ¹³⁷Ba, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb. Intenzity jednotlivých měřených izotopů jsou vyjádřeny v poměru

s izotopem ²⁰⁸Pb (např. ²⁷Al / ²⁰⁸Pb). Výsledky jsou uváděné jako poměry naměřených intenzit.

Hodnoty vypočtené pro vzorek z nábojnice 22 LR jsou uvedeny v tab. III. Z těchto hodnot bylo usouzeno, že se jedná o povýstřelovou zplodinu. Dvacet částic bylo vybráno k měření. Částice byly vybrány náhodně pomocí kamerového systému. Tento kamerový systém je umístěn v ablační cele.

Je patrné, že vzorek z nábojnice obsahuje jednu z charakteristických kombinací, která není identifikující pro zápalkovou složi. I přesto tato kombinace dokazuje, že se jedná o povýstřelovou zplodinu. Jedná se o kombinaci Pb a Ba.

Hodnoty poměrů signálů izotopů naměřené pro vzorek z nábojnice 9 mm Luger jsou uvedeny v tab. IV. Opět jsou uvedeny hodnoty, podle kterých bylo usouzeno, že se jedná o povýstřelovou zplodinu. Pro měření bylo vybráno opět dvacet náhodných částic.

Z výsledků je zřejmé, že vzorek z nábojnice 9 mm Luger obsahuje pevně danou prvkovou kombinaci zápalkové složky: Pb, Sb, Sn, Ba. Z toho vyplývá, že se jedná o povýstřelovou zplodinu s jednoznačně identifikovanou zápalkovou složí.

Hodnoty izotopových poměrů odpovídající povýstřelovým zplodinám pro vzorek z nábojnice 9×19 jsou uvedeny v tab. V.

Z tabulky je patrné, že naměřené výsledky charakteristických prvků vzorku z nábojnice 9×19 představují jednu pevně daných prvkových kombinací zápalkové složky: Pb, Sb, Ba. Z těchto výsledků je patrné, že se opět jedná o povýstřelovou zplodinu s jednoznačně identifikovanou zápalkovou složí.

Hodnoty poměru signálů izotopů pro povýstřelové zplodiny z nábojnice 7,65 Br jsou uvedeny v tab. VI.

Tabulka III
Poměry signálů izotopů charakteristických a stopových prvků

CHARAKTERISTICKÉ PRVKY				STOPOVÉ PRVKY			
izotopy				izotopy			
¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	²⁰⁷ Pb	²⁷ Al	⁵⁶ Fe	⁶³ Cu	⁸⁸ Sr
poměry intenzit				poměry intenzit ^a			
118/208	121/208	137/208	207/208	27/208 * 10 ⁴	56/208 * 10 ⁴	63/208 * 10 ⁴	88/208 * 10 ⁴
–	–	0,05	0,44	4,55	3,00	41,3	1,66
–	–	0,54	0,43	15	7,23	2,08	7,31
–	–	0,10	0,45	16,5	18,1	3,58	5,66
–	–	0,44	0,42	0,44	2,85	3,17	7,68
–	–	0,72	0,38	55,4	18,6	2,39	23,4
–	–	0,73	0,39	9,64	5,56	16,1	8,80

^a * 10^x – vypočtená hodnota byla vynásobená uvedenou hodnotou

Tabulka IV

Poměry signálů izotopů charakteristických a stopových prvků

CHARAKTERISTICKÉ PRVKY				STOPOVÉ PRVKY					
izotopy				³⁴ S	izotopy				
¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	²⁰⁷ Pb		⁵⁵ Mn	⁵⁶ Fe	⁶³ Cu	⁶⁶ Zn	⁸⁸ Sr
poměry intenzit				poměry intenzit ^a					
118/208	121/208	137/208	207/208	34/208 *10 ⁴	55/208 *10 ⁴	56/208 *10 ²	63/208 *10 ²	66/208 *10 ⁴	88/208 *10 ⁴
0,29	0,66	0,90	0,54	11,2	15,7	1,70	6,18	5,41	3,94
0,42	0,57	0,77	0,37	8,44	9,78	0,98	0,88	4,96	3,26
0,29	0,61	0,88	0,38	11,3	10,8	1,31	0,74	3,30	5,78
0,52	0,31	0,27	0,45	2,38	2,67	0,45	2,72	11	1,37
0,25	0,44	0,76	0,40	5,32	5,50	0,67	0,14	1,34	1,73
0,22	0,36	0,48	0,23	4,13	4,98	0,60	0,14	1,20	1,71
0,16	0,422	0,31	0,39	3,32	2,90	0,51	0,19	1,04	1,61

^a * 10^x – vypočtená hodnota byla vynásobená uvedenou hodnotou

Tabulka V

Poměry signálů izotopů charakteristických a stopových prvků

CHARAKTERISTICKÉ PRVKY				STOPOVÉ PRVKY				
izotopy				³⁴ S	izotopy			
¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	²⁰⁷ Pb		⁵⁶ Fe	⁶³ Cu	⁶⁶ Zn	⁸⁸ Sr
poměry intenzit				poměry intenzit ^a				
118/208	121/208	137/208	207/208	34/208 *10 ⁴	56/208 *10 ⁴	63/208 *10 ³	66/208 *10 ⁴	88/208 *10 ⁴
–	0,36	0,23	0,38	2,86	7,03	1,92	3,26	3,70
–	0,24	0,11	0,40	15,8	10,5	6,22	2,57	1,50
–	0,35	0,21	0,36	6,96	5,39	6,16	2,95	0,89
–	0,42	0,18	0,34	8,68	13,0	0,91	8,28	2,30
–	0,27	0,12	0,32	3,64	5,42	18,5	41	3,38
–	0,39	0,15	0,40	5,72	6,93	2,23	1,31	1,19
–	0,31	0,19	0,37	7,49	10,9	3,17	4,92	3,73
–	0,47	0,18	0,37	18,9	28,7	3,00	7,73	8,14

^a * 10^x – vypočtená hodnota byla vynásobená uvedenou hodnotou

Z uvedených hodnot charakteristických prvků v tabulce bylo usouzeno, že naměřené výsledky vzorku z nábojnice 7,65 Br představují jednu pevně daných prvkových kombinací zápalkové složce: Pb, Sb, Sn, Ba. Pomocí této kombinace je patrné, že se opět jedná o povýstřelovou zplodinu s jednoznačně identifikovanou zápalkovou složkou.

Závěr

Na základě dosažených výsledků u analyzovaných vzorků metodou LA-ICP-MS jsme schopni určit, zda jsou stanovované částice povýstřelové zplodiny či nikoliv. Pomocí pevných kombinací chemických prvků je možné identifikovat, jestli se jedná o zápalkové zplodiny pochá-

Tabulka VI
Poměry signálů izotopů charakteristických a stopových prvků

CHARAKTERISTICKÉ PRVKY				STOPOVÉ PRVKY					
izotopy				izotopy					
¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	²⁰⁷ Pb	²⁷ Al	²⁹ Si	⁵⁶ Fe	⁶³ Cu	⁶⁶ Zn	⁸⁸ Sr
poměry intenzit				poměry intenzit ^a					
118/208	121/208	137/208	207/208	27/208 *10 ³	29/208 *10 ³	56/208 *10 ³	63/208 *10 ²	66/208 *10 ²	88/208 *10 ⁴
0,17	10,1	4,83	0,51	1,39	1,52	2,96	2,29	2,42	4,88
0,15	13,8	5,65	0,38	3,10	5,19	1,98	4,52	2,07	6,97
0,07	9,31	7,24	0,47	8,30	2,56	37,8	11,2	3,57	7,50
0,09	6,98	2,36	0,40	9,46	2,14	1,78	1,01	0,21	0,54
0,32	2,19	17,1	0,50	1,12	1,38	1,66	0,04	0,02	9,54
0,01	5,32	7,94	0,46	1,65	7,77	1,35	1,88	0,83	5,41
0,02	2,01	4,59	0,30	1,36	1,51	3,16	18,2	4,31	14,2

^a * 10^x – vypočtená hodnota byla vynásobena uvedenou hodnotou

Tabulka VII
Přehled vzorků a jejich prvkové složení

VZOREK	CHARAKTERISTICKÉ PRVKY	STOPOVÉ PRVKY
22 LR	Pb, Ba	Al, Fe, Cu, Sr
9 mm Luger S&B	Pb, Sb, Sn, Ba	S, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr
9x19 S&B	Pb, Sb, Ba	S, Fe, Cu, Zn, Sr
7, 65 Br S&B	Pb, Sb, Sn, Ba	Al, Si, Fe, Cu, Zn, Sr

zející ze zápalkové složky nebo jestli se jedná pouze o povýstřelovou zplodinu.

Metodou LA-ICP-MS je možné stanovit kromě charakteristických prvků i prvky stopové, což nám pomůže k určení konkrétního druhu nábojnice, ze které povýstřelové zplodiny pocházejí. Druh nábojnice můžeme určit na základě rozdílných prvkových složení povýstřelových zplodin (tab. VII). Stopové prvky (Cu, Zn a Fe) patří mezi prvky obsažené v plášti nábojnice a mohou kontaminovat povýstřelové zplodiny, proto musí být jako stopové prvky brány s rezervou.

Cílem této práce byla aplikace metody LA-ICP-MS pro forenzní analýzu povýstřelových zplodin. Tento cíl byl splněn. Metoda je tak citlivá, že dokáže naměřit i stopové prvky, které mohou napomoci k bližší identifikaci, z jaké nábojnice povýstřelové zplodiny pochází.

Tato práce je nadále rozvíjena a metoda LA-ICP-MS je využívána pro analýzu povýstřelových zplodin odebraných z rukou střelce. Tyto odběry se provádí na speciální terčiky s uhlíkovou adhezí vrstvou. Paralelně s novými měřeními je rozvíjeno statistické zpracování výsledků.

LITERATURA

1. Planka B. a spol.: *Kriminalistická balistika*, Aleš Čeněk, Plzeň 2010.
2. Suchánek J. a spol.: *Kriminalistika, kriminalisticko-technické metody a prostředky*, PA ČR, Praha 1999.
3. Mazánek M., Suchánek J.: *Povýstřelové zplodiny a jejich význam v kriminalistické praxi*. Kriminalistika XXXIII 1/2000 (2000).
4. Meng H. H., Lee H. C.: *J. Forensic. Sci.* 6, 39 (2007).
5. Schwoeble A. J., Exline D. L.: *Current Methods in Forensic Gunshot Residue Analysis*, CRC Press, Boca Raton 2000.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ TECHNIK POVRCHEM ZESÍLENÉ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI ANALÝZE PŘÍPRAVKU CHAMOMILLA VULGARIS

DANUŠE VAVŘINOVÁ a PAVEL MATĚJKA

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
vavrinod@vscht.cz*

Úvod

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopy – SERS Spectroscopy) a povrchem zesílená infračervená absorpční spektroskopie (Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy – SEIRA Spectroscopy) jsou metodami povrchem zesílené vibrační spektroskopie¹. Největší výhodou těchto metod je, že právě díky povrchovému zesílení spektrální odezvy lze detegovat i velmi malé koncentrace analytu, případně několika analytů. Intenzita signálů v zesílených spektrech je oproti nezesíleným spektřům o několik řádů vyšší, v případě SEIRA se jedná o zesílení cca stonásobné až tisícinásobné, zatímco v případě SERS je běžné zesílení o více než šest řádů, v tzv. „hot spot“ i o více než deset řádů.

Aby mohlo docházet k uvedeným jevům, musí být molekuly adsorbovány na povrchu některých kovů s vhodnou nanostrukturální morfologií. K tomuto účelu se používají především tzv. mincovní kovy, konkrétně zlato, stříbro či měď.

Efekt povrchového zesílení je dle současných poznatků výsledkem kombinace elektromagnetického a chemického mechanismu. Elektromagnetický mechanismus je založen na interakci záření s lokalizovanými povrchovými plasmony v nanostrukturálních motivech na povrchu kovu. Plasmony můžeme chápat jako kvantované hromadné oscilace valenčních elektronů. Chemický mechanismus zesílení spočívá v ovlivnění polarizovatelnosti (důležitá pro případ Ramanova rozptylu), resp. dipolového momentu (klíčový pro infračervenou spektroskopii) adsorbované molekuly v důsledku její interakce s kovovým substrátem.

Cílem předkládané práce bylo otestování možnosti využití technik SERS a SEIRA pro analýzu homeopatického přípravku Chamomilla vulgaris. Výrobce udané složení je následující: účinná látka – Chamomilla recutita (heřmánek lékařský, synonymní český název heřmánek pravý); pomocné látky – sacharosa a monohydrát laktosy.

Experimentální část

Chemikálie

Pro přípravu platinových terčků byly použity následující chemikálie: oxid hlinitý, p.a. (Sigma Aldrich),

uhlíčan vápenatý, p.a. (Penta), peroxid vodíku (30%), p.a. (Lach-Ner), kyselina sírová (97%), p.a. (Penta). K přípravě zlatem pokovených terčků byly využity: peroxidisíran amonný, p.a. (Lach-Ner), platinové terčky (Safina), dikiyanozlatnan draselný, p.a. (Safina), citronová kyselina, monohydrát, p.a. (Merck), citrát sodný, dihydrát, p.a. (Merck), hydroxid sodný (Lach-Ner), redestilovaná voda. K extrakci homeopatického přípravku a heřmánkového čaje sloužil methanol, p.a. (Penta). Vzorkem homeopatického přípravku byl preparát Chamomilla vulgaris 9CH od výrobce Boiron CZ, s.r.o. Heřmánkový čaj byl od výrobce Megafyt-R s.r.o.

Příprava nanostrukturovaných substrátů

Jako podkladový materiál, na němž byl vytvářen nanostrukturovaný kovový (konkrétně zlatý) povrch, byly použity masivní platinové terčky o průměru cca 10 mm a tloušťce cca 2 mm. Terčky byly nejprve mechanicky broušeny brusným papírem a poté vyleštěny oxidem hlinitým a uhlíčanem vápenatým. Po přešetření byly asi na 30 min ponořeny do roztoku peroxidu vodíku a kyseliny sírové v poměru 1:3 (V/V) z důvodu odstranění nečistot z předchozího používání. Poté byly terčky důkladně opláchnuty destilovanou vodou.

Elektrochemické pokovování terčků bylo prováděno katodickou redukcí podle dříve používaného postupu². Jako zdroj napětí byl používán stabilizovaný zdroj BS 525 Tesla a proud procházející obvodem byl měřen digitálním multimetrem Davo 2. Platinový terčik byl zapojen jako katoda, jako anoda sloužila zlatá spirála. Obě elektrody byly ponořeny do elektrochemické lázně (připravené rozpouštěním dikiyanozlatnanu draselného) a bylo na ně postupně vkládáno napětí. Na katodě (Pt terčiku) docházelo k vylučování zlata ve formě nanostrukturované vrstvy dříve charakterizované mikroskopickými technikami³. Po ukončení pokovování byly terčky vyvářeny v nasyceném roztoku peroxidisíranu amonného po dobu 4–5 hodin. Na některé terčky byly poté aplikovány oxidačně-redukční cykly pro lepší morfologii povrchu a vyšší hodnotu povrchového zesílení³. Oxidačně-redukční cykly byly prováděny v uzavřené elektrochemické cele s tříelektrodovým zapojením. Na pracovní elektrodě (pozlacený terčik) se postupně měnil potenciál od jedné mezní hodnoty (610 mV) k druhé (340 mV) a zase zpět (tento dopředný a zpětný sken tvoří jeden oxidačně-redukční cyklus).

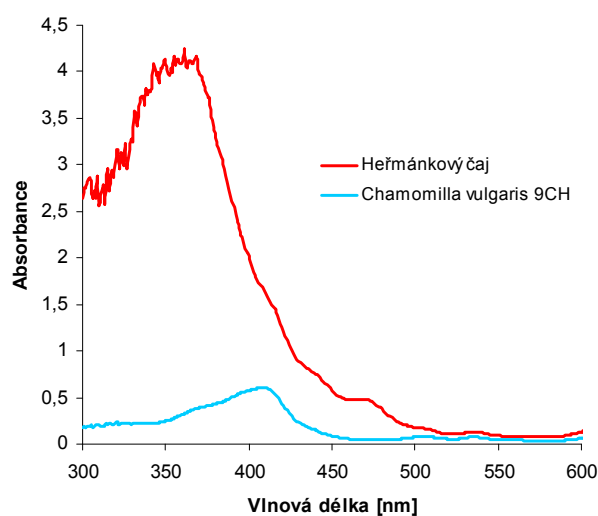
Depozice vzorků

Pro depozici látek z homeopatického přípravku (resp. z heřmánkového čaje) bylo v každém jednotlivém pokusu extrahováno methanolem zvlášť 0,5 g heřmánkového čaje a paralelně 0,5 g homeopatického přípravku.

Připravené pozlacené terčíky byly předem vloženy do vialek a teprve poté byl přidán extrakt tak, aby se molekuly extrahované látky sorbovaly především na vrchní stranu terčíku. Terčíky byly takto ponechány bez třepání a bez přístupu světla cca 20 hodin, poté byly opatrně vyndány pinzetou a methanol se nechal volně odpařit. Tímto způsobem zůstaly na povrchu terčíku sorbované látky extrahované z příslušného výchozího materiálu.

Nejprve bylo prováděno několik typů referenčních, resp. pomocných měření. Proměřovány byly oba methanolicke extrakty, a to infračervenou (IČ) a UV-viditelnou (UV-vis) absorpční spektrometrií. Samotné tablety homeopatického přípravku byly analyzovány buď v podobě celých kuliček Ramanovou spektrometrií (Raman), nebo byly před měřením rozdrceny (IČ a Raman).

Zesílená Ramanova spektra na terčících s deponovanými vzorky byla měřena při různých excitačních vlnových délkách (633, 785 a 1064 nm). Infračervená spektra byla zaznamenávána v reflexním módu s využitím nástavce pro difusní reflexi.



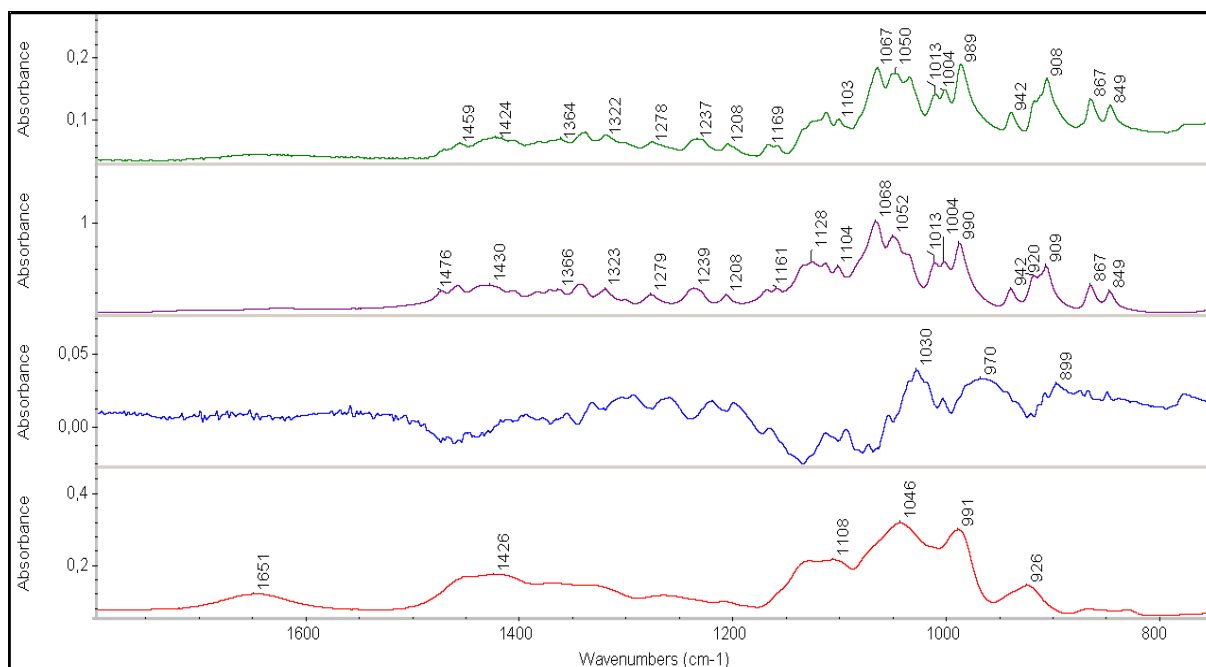
Obr. 1. UV spektra methanolickech extraktů z čaje a homeopatického přípravku

Výsledky a diskuse

Při zpracování zesílených infračervených spekter získaných pomocí difusně reflexní techniky byla od sebe vždy odečtena spektra naměřená z horní strany terčíku (strana s deponovaným vzorkem) a ze spodní strany terčíku (strana s minimální depozicí vzorku). Takto byla získána diferenční spektra, od nichž bylo odečteno korekční

spektrum (korekce vodní páry a vzdušného CO₂, případně byla upravena základní linie).

Methanolicke extrakty z heřmánkového čaje i z homeopatického přípravku byly měřeny pomocí UV-vis absorpční spektrometrie. Ze spektra (obr. 1) je patrné, že homeopatický preparát Chamomilla vulgaris obsahuje



Obr. 2. Srovnání infračervených spekter výchozí homeopatické tablety (zeleně), sacharosy (fialově), jejich diferenčního spektra (modře) a zesíleného spektra (SEIRA) extraktu homeopatika na pozlaceném terčíku (červeně)

kromě sacharosy i jiné látky vykazující absorpční pás v oblasti okolo 400 nm. Nicméně extrakt z heřmánkového čaje poskytuje významně intenzivnější spektrum s intenzivním pásem okolo 350 nm a několika zřetelnými raménky okolo 400, 440 a 470 nm.

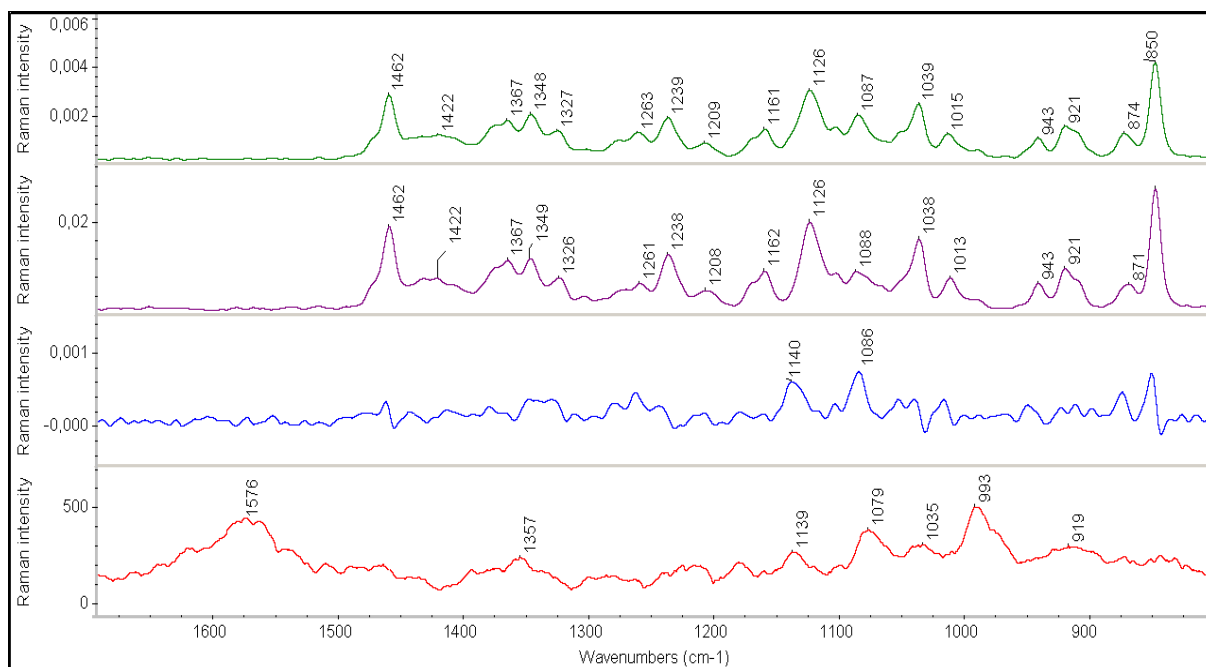
Byla srovnávána infračervená spektra drti z tablet homeopatika (obr. 2 – zelené spektrum) a samotné sacharosy (obr. 2 – fialové spektrum), aby se zjistilo, ve kterých pásech spektra se tablety homeopatického přípravku liší od obyčejného cukru. Ačkoli se na první pohled zdají spektra téměř stejná, po jejich odečtení (obr. 2 – modré spektrum) je patrný rozdíl. Diferenční spektrum bylo dále porovnáváno se zesíleným infračerveným spektrem extraktu Chamomilly vulgaris (obr. 2 – červené spektrum) deponovaném na pozlaceném terčíku (předtím upraveném pomocí ORC).

V diferenčním spektru tablety a sacharosy pozorujeme pásy nenáležící sacharose, a to především pásy okolo 1030 cm^{-1} a 970 cm^{-1} , jejichž analogy posunuté o cca 15 až 20 cm^{-1} k vyšším vlnočtům (tj. při 1046 a 991 cm^{-1}) objevují i v SEIRA spektru terčíku s deponovaným extraktem z homeopatika. Tyto pásy přísluší valenčním vibracím C-O vazeb zatím neidentifikovaných složek homeopatického přípravku. SEIRA spektrum bylo naměřeno s minimální úrovní šumu. I tak je ale problémem obtížná identifikace látek z tohoto spektra, protože všechny zde pozorované pásy jsou široké pravděpodobně kvůli neuspořádanému systému molekul na povrchu terčíku. Navíc v důsledku adsorpce látek na povrch kovu obecně dochází v SEIRA spektrech k určitému posunu pásů oproti běžným IČ spektřům. Přesto se ale můžeme domnívat, že i pásy sacharosy

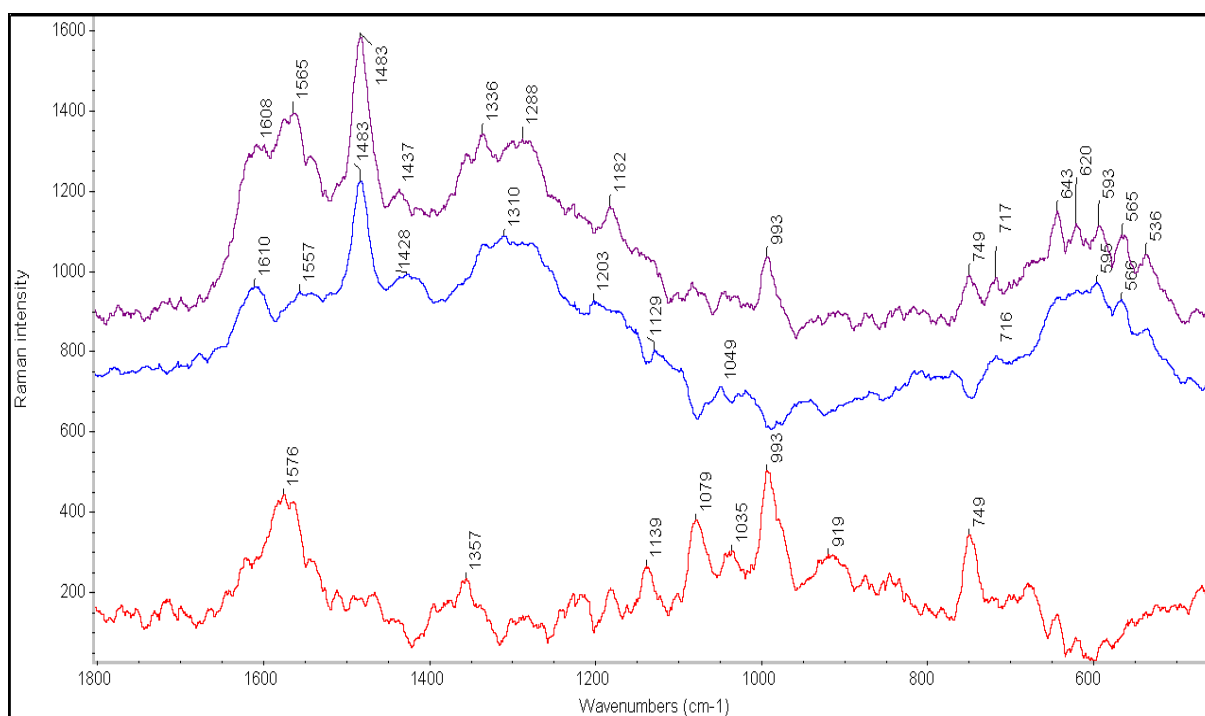
(byť v nižší intenzitě a posunutě) se objevují i v SEIRA spektru (například pásy okolo 1279 , 1239 a 1208 cm^{-1}).

Analogické srovnání bylo provedeno i v případě sady Ramanových spekter (obr. 3). I v tomto případě je spektrum samotné tablety na první pohled téměř shodné se spektrem sacharosy. V diferenčním spektru je opět vidět malý rozdíl, především v případě pásů v oblasti 1140 a 1086 cm^{-1} . Téměř shodné pásy se objevují i v SERS spektru extraktu homeopatika na terčíku (1139 a 1079 cm^{-1}), které tedy poukazují na skutečnost, že v extraktu je obsažena jiná látka, resp. jiné látky než sacharosa. Intenzivní pás sacharosy v oblasti 1462 cm^{-1} , za nějž je zodpovědná deformační vibrace CH_2 skupin, se již prakticky neobjevuje (nad úroveň šumu) v SERS spektru přípravku Chamomilla vulgaris. Naproti tomu se ve spektru deponátu na terčíku objevují pásy (1576 , 1357 a 993 cm^{-1}), které se neshodují s pásy ve spektrech sacharosy a tablety. Můžeme proto usuzovat, že do methanolickeho extraktu přešly především ostatní organické látky obsažené v homeopatickém přípravku.

Aby bylo možné porovnat pásy SERS spektra extraktu homeopatika (obr. 4 – červené spektrum), které se neshodují se sacharosou, s pásy SERS spektra extraktu heřmánkového čaje (obr. 4 – fialové spektrum), byla tato spektra od sebe odečtena (obr. 4 – modré spektrum). Při vzájemném porovnání spekter se ukazuje, že SERS spektrum extraktu z tablety homeopatika je poměrně slabé, ale jak je patrné z obr. 4, opravdu obsahuje některé pásy pozorované v extraktu z heřmánku (především pásy 1576 a 993 cm^{-1}). Ve spektru extraktu heřmánkového čaje jsou



Obr. 3. Srovnání Ramanových spekter homeopatické tablety (zeleně), sacharosy (fialově), jejich diferenčního spektra (modře) a zesíleného spektra (SERS) extraktu homeopatika na pozlaceném terčíku (červeně)



Obr. 4. Srovnání zesílených Ramanových spekter homeopatické tablety (červeně), extraktu z heřmánkového čaje na pozlaceném terčíku (fialově) a jejich odečet (modře)

však vidět další pásy, které jsou zřetelné v diferenčním spektru. Jsou to hlavně pásy okolo 1610, 1483, 1310 a 1203 cm⁻¹, odpovídající fenolickým látkám obsaženým v heřmánku⁴ (tyto však nejsou nad úroveň šumu patrné ve spektru extraktu z homeopatiky).

Závěr

Z uvedených SERS a SEIRA spekter a i dalších referenčních měření je patrné, že kromě „cukru“ obsahuje homeopatický přípravek i další látky. Jejich identifikace se zatím nepodařila, k tomu bude třeba analyzovat další referenční systémy a provést podrobnější interpretaci spekter s využitím dalších literárních zdrojů. Zároveň je zřejmé, že homeopatický přípravek neobsahuje fenolické látky, které byly prokázány v heřmánkovém čaji.

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky, projekt číslo P206/11/0951

LITERATURA

1. Aroca R.: *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, J. Wiley, Chichester 2006.
2. Cieslarová Z., Matějka P.: *Chem. Listy* 105, s10 (2011).
3. Prokopec V., Čejková J., Matějka P., Hasal P.: *Surf. Interface Anal.* 40, 601 (2008).
4. Harbourne N., Jacquier J. C., O'Riordan D.: *Food Chem.* 115, 15 (2009).

OBSAH PŘÍSPĚVKŮ

<i>E. Čechová, Z. Šimek</i>	Možnosti kvantitativního stanovení estrogenů v povrchových a odpadních vodách technikou HPLC-MS-MS	s3
<i>J. Dědík, M. Janovcová, H. Dejmková, J. Barek, K. Pecková</i>	Voltametrická a ampérometrická detekce amino derivátů bifenyly a naftalenu na síťotiskové uhlíkové elektrodě	s7
<i>M. Gajdošová, K. Syslová, P. Kačer</i>	Molekulárně diagnostický přístup k onemocněním indukovaným oxidativním stresem	s11
<i>F. Grelich, J. Koucký, Š. Urban</i>	Whiteova multireflexní kyveta a její užití v mikrovlnné oblasti	s17
<i>A. Hájková, V. Vyskočil, J. Barek</i>	Stanovení genotoxického 2-aminofluoren-9-onu pomocí polarografických a voltametrických metod	s21
<i>K. Hájková, B. Beňová</i>	Analýza významných bioaktivních látek v rakytníku technikou HPLC-Coularray	s28
<i>E. Horáková, V. Vyskočil, J. Barek</i>	Voltametrické stanovení karcinogenního 4-nitrobifenyly	s32
<i>M. Hrdá, P. Kačer, K. Syslová, J. Holakovská</i>	Nové platinové komplexy s cytostatickou aktivitou: analytická a molekulárně-biologická charakterizace	s37
<i>M. Jakubek, B. Dolenský, M. Havlík</i>	Vazebná studie naftalenových bis-trógerových bazí jako potencionálních receptorů elektronově deficitních látek pomocí spektroskopie NMR	s43
<i>Z. Jarolímová, P. Lubal</i>	CITP analýza biominerálů	s47
<i>J. Koktan, P. Řezanka, P. Žvátora, M. Vosmanská, D. Sýkora, V. Král</i>	Charakterizace a příprava křemenných kapilár modifikovaných zlatými nanočásticemi	s51
<i>S. Kykal, V. Setnička</i>	Antimikrobiální peptid melectin: konformační studie metodami cirkulárního dichroismu	s55
<i>L. Michalcová, R. Dopitová, M. Válková, J. Preisler</i>	Studium fosforylace proteinů cytokininové signální dráhy metodou CE-LIF	s62
<i>J. Míka, J. Zima, J. Barek, H. Dejmková</i>	Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku v methanolickém roztoku	s67
<i>J. Moravčík, K. Hroboňová</i>	HPLC štúdium enantioseparácie potenciálních léčiv použitím makrocyclických chirálních stacionárných fáz	s72
<i>M. Mucha, P. Kurka, J. Kalina</i>	HPLC metoda stanovení benzodiazepinů	s77
<i>M. Ovčáčková, E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa</i>	Lipidomická charakterizace vzorků plazmy pacientů s kardiovaskulárními chorobami	s82
<i>R. Papoušek, P. Nováková, P. Barták</i>	Analýza akrylamidu metodou GC/MS	s86
<i>J. Pavlík, P. Amakorová, O. Novák</i>	Stanovení jasmonové kyseliny v biologickém materiálu	s90
<i>V. Pilařová, H. Vlčková, P. Svoboda, L. Nováková</i>	Vývoj a optimalizace metody pro analýzu atorvastatinu, rosuvastatinu a jejich metabolitů s využitím UHPLC-MS/MS a MEPS pro přípravu vzorku	s96
<i>R. Poláček, P. Májek, J. Sádecká</i>	Chemometria fluorescenční spektrometrie – určovanie pravosti brandy	s101
<i>M. Rudášová, M. Masár</i>	Presné stanovenia aktívnych zložiek vo farmaceutických preparátoch kapilárnou elektroforézou na čípoch	s105

<i>M. Seifertová, Z. Šimek</i>	Stanovení alkylfenolů a bisfenolu a v environmentálních matricích metodou HPLC-MS/MS	s109
<i>J. Schwarz, I. Goncharová</i>	Konkurenční vazba metabolitů hemu a antibiotik na sérový albumin: studium pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu	s112
<i>J. Sochr, E. Švorc</i>	Voltampérometrické stanovení vybraných antibiotik na báze penicilínů	s115
<i>D. Štíbal, K. Syslová, P. Kačer</i>	Strukturně analytická charakterizace produktů dekontaminace platino- vých cytostatik použitím par peroxidu vodíku	s119
<i>M. Stupák, K. Kalachová, J. Pulkrabová, J. Hajšlová</i>	Stanovení organických kontaminantů plynovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS)	s123
<i>P. Suchánková, M. Adam, P. Pavlíková, K. Ventura</i>	Analýza syntetických potravinářských barviv s využitím extrakce metodou QUECHERS	s128
<i>K. Štůlová, T. Vaculovič, V. Kanický</i>	Využití LA-ICP-MS ve forenzní analýze – analýza povýstřelových zplodin	s133
<i>D. Vavřínová, P. Matějka</i>	Možnosti využití technik povrchem zesílené vibrační spektroskopie při analýze přípravku Chamomilla Vulgaris	s137

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

- Adam M. s128
Amakorová P. s90
Barek J. s7, s21, s32, s67
Barták P. s86
Beňová B. s28
Cífková E. s82
Čechová E. s3
Dědík J. s7
Dejmková H. s7, s67
Dolenský B. s43
Dopitová R. s62
Gajdošová M. s11
Goncharová I. s112
Grelich F. s17
Hájková A. s21
Hájková K. s28
Hajšlová J. s123
Havlík M. s43
Holakovská J. s37
Holčapek M. s82
Horáková E. s32
Hrdá M. s37
Hroboňová K. s72
Jakubek M. s43
Janovcová M. s7
Jarolímová Z. s47
Kačer P. s11, s37, s119
Kalachová K. s123
Kalina J. s77
Kanický V. s133
Koktan J. s51
Koucký J. s17
Král V. s51
Kurka P. s77
Kýkal S. s55
Lísa M. s82
Lubal P. s47
Májek P. s101
Masár M. s105
Matějka P. s137
Michalcová L. s62
Mika J. s67
Moravčík J. s72
Mucha M. s77
Novák O. s90
Nováková L. s96
Nováková P. s86
Ovčačíková M. s82
Papoušek R. s86
Pavlík J. s90
Pavlíková P. s128
Pecková K. s7
Pilařová V. s96
Poláček R. s101
Preisler J. s62
Pulkrabová J. s123
Rudášová M. s105
Řezanka P. s51
Sádecká J. s101
Seifertová M. s109
Setnička V. s55
Schwarz J. s112
Sochr J. s115
Stíbal D. s119
Stupák M. s123
Suchánková P. s128
Svoboda P. s96
Sýkora D. s51
Syslová K. s11, s37, s119
Šimek Z. s3, s109
Štůlová K. s133
Švorc L. s115
Urban Š. s17
Vaculovič T. s133
Válková M. s62
Vavřínová D. s137
Ventura K. s128
Vlčková H. s96
Vosmanská M. s51
Vyskočil V. s1, s32
Zima J. s67
Žvátora P. s51

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 106 (S), čís./no. Symposia • LISTY CHEMICKÉ roč./vol. 136, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 122 • 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 Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: P. Chuchvalec • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, B. Kratochvíl, J. Podešva, P. Rauch; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • 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, T. Mišek, K. Melzoch, 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., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují • Redakce čísla Symposia (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2012 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2012 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2012 (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 zaslány 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 26.3.2012.