

Univerzita  
Pardubice  
Fakulta  
chemicko-technologická

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

„O CENU FIRMY MERCK 2009“

3. února 2009

Fakulta chemicko-technologická,  
Univerzita Pardubice

**Editoři sborníku:**

Martin Adam

Jiří Barek

Petr Česla

Karel Ventura

Vlastimil Vyskočil



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

Ve úterý 3. února 2009 úspěšně proběhl v nových krásných prostorách Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice již 12. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos výborně zorganizovali kolegové z Katedry analytické chemie FChT Univerzity Pardubice ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck, s.r.o. Význam této akce podtrhlo i její slavnostní zahájení děkanem FChT panem prof. Ing. Petrem Lošťákem, DrSc. 18 účastníků ze 7 předních analytických pracovišť v České republice dokázalo, že kvalita vědecko-výzkumné práce v oblasti analytické chemie má v naší republice bezesporu vzrůstající trend a že stejný potěšitelný trend má i schopnost mladých vědeckých pracovníků z této oblasti prezentovat své poznatky na úrovni snesoucí mezinárodní srovnání. Všechny přednesené příspěvky byly rozhodně důstojnou reprezentací jak přednášejících, tak i vysílajících pracovišť a autor tohoto příspěvku s potěšením využívá této možnosti, aby všem soutěžícím bez rozdílu poděkoval za odvedenou práci, za kterou se rozhodně nemusí stydět.

1. místo získala Pavlína Novotná z Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské, VŠCHT v Praze za práci „Konformační studie poly-gama-benzyl-L-glutamátu metodou vibračního cirkulárního dichroismu“. 2. místo získala Veronika Mlejová z Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za práci „Aplikace vybraných mikroextrakčních technik při stanovení rostlinných silic“ a 3. místo získal Dalibor Húska z Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně za práci „Plně automatizovaná izolace celkové mRNA z in vitro kultivovaných rostlin ve spojení s elektrochemickou detekcí“.

Fotografie z celého průběhu soutěže, výsledky a další informace je možné najít na internetových stránkách <http://kalch.upce.cz/merck09/index.htm>. Zde je jistě namístě poděkovat celému týmu kolegů z Univerzity Pardubice, jmenovitě doc. Ing. Karlovi Venturovi, CSc., Ing. Martinu



*Foto: Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2009“ zleva: prof. RNDr. J. Barek, CSc., předseda odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické, manažerka prodejního týmu firmy Merck paní Ing. Lenka Ungrmanová, Bc., Dalibor Húska (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně), Veronika Mlejová (Univerzita Pardubice), Pavlína Novotná (VŠCHT v Praze) a doc. Ing. Karel Ventura, CSc., předseda organizačního výboru letošní soutěže.*

Adamovi, Ph.D., Ing. Petrovi Česlovi, Ph.D., Ing. Ivě Ulbrichové, CSc. a Ing. Bohuslavu Dvořákovi za dokonalé organizační zabezpečení celé akce a za vytvoření neobyčejně příjemné a přátelské atmosféry, která vyvrcholila kulinářskými hody v Mexické restauraci. Děk všem účastníkům patří pochopitelně i firmě Merck a jejím zástupcům přítomným na soutěži, jmenovitě paní Ing. Lence Ungrmanové, Bc., manažerce prodejního týmu a paní Ing. Marcelce Kubáskové, oblastní zástupkyni firmy Merck.

Na závěr nezbývá než sdělit, že 13. ročník této soutěže se uskuteční na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v únoru 2010 a můžeme se tedy těšit na další setkání v Českých Budějovicích.

*Jiří Barek*

## VYUŽITÍ ANALYTICKÝCH METOD PŘI SYNTÉZE A CHARAKTERIZACI NOVÉHO KONJUGÁTU AMFOTERICINU B CITLIVÉHO K $\beta$ -GLUKOSIDASAM

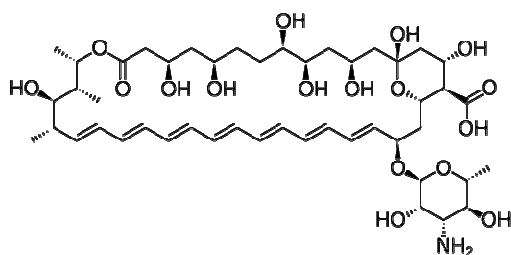
ELIŠKA BÍLKOVÁ a MILOŠ SEDLÁK

Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legii 565, 532 10 Pardubice  
eliska.bilkova@centrum.cz

### Úvod

Amfotericin B (AMB) (obr. 1) představuje život zachraňující antibiotikum aplikované u imunosupresivních pacientů (např. AIDS) při léčbě systémových houbových infekcí<sup>1</sup>.

Cílem této práce bylo využít instrumentálních analytických metod (NMR, HPLC, GPC, GC-MS, UV-VIS spektroskopie a elementární analýza) při přípravě a charakterizaci nového konjugátu, který byl syntetizován tak, aby uvolňoval AMB selektivně pouze v místě napadeného



Obr. 1. Struktura amfotericinu B

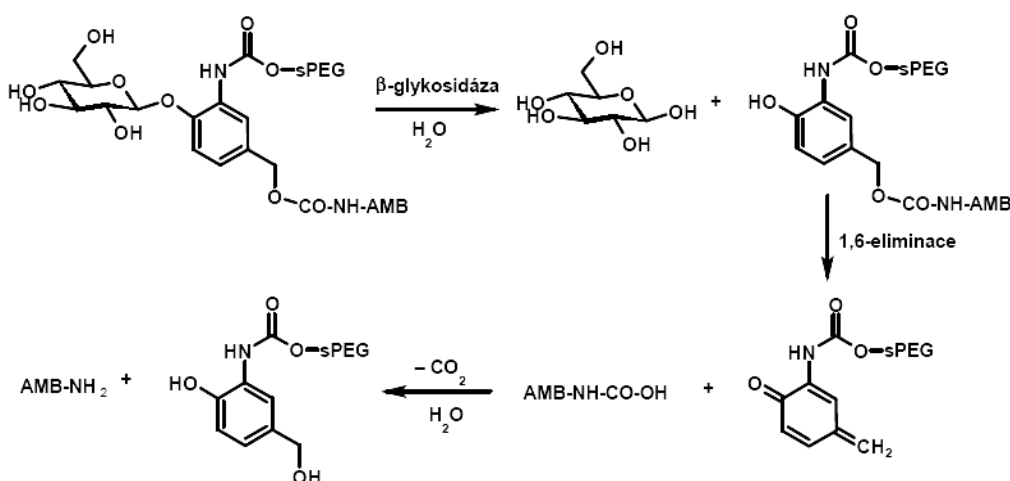


Schéma 1. Princip uvolňování amfotericinu B z AMB<sub>4</sub>-sPEG

orgánu. Enzymatickou hydrolyzou  $\beta$ -glukosidické vazby v molekule konjugátu AMB<sub>4</sub>-sPEG (sPEG = star poly (ethylenglykol)) vzniká glukosa a následnou 1,6-eliminací se uvolňuje amfotericin B (Schéma 1)<sup>2</sup>.

### Experimentální část

Finální konjugát AMB<sub>4</sub>-sPEG byl připraven následujícími reakcemi (Schéma 2)<sup>2</sup> a spolu s meziprodukty charakterizován vždy několika analytickými metodami. <sup>1</sup>H NMR spektra a <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker AVANCE 500. <sup>1</sup>H NMR spektra byla kalibrována na středový signál multipletu rozpouštědla ( $\delta_{\text{H}} = 2,55$  resp. 7,24). <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena standardním způsobem s širokopásmovým dekaplinkem protonů a pulzní sekvencí APT. Uhlíková spektra byla kalibrována na středový signál multipletu rozpouštědla ( $\delta = 39,6$ ). Pulzní sekvence <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC byla měřena s CH interakcí 145 Hz. Pro určení  $M_w$  polymerů byla použita gelová permeační chromatografie (GPC). Měření připravených polymerů a konjugátu AMB<sub>4</sub>-sPEG bylo provedeno na HEMA-BIO kolonách (hydrofilní modifikovaný HEMA-Gel, velikost částic 10  $\mu\text{m}$ , porozita 40/100/300/1000) při pokojové teplotě s využitím RI detektoru a UV/VIS detektoru. Jako eluent byla použita redestilovaná voda (pH 7,1). Kolony byly kalibrovány na sérii standardů PEG o různých molekulových hmotnostech (PSS, Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Germany). Čistota konjugátu AMB<sub>4</sub>-sPEG byla stanovena HPLC s použitím LiChroCART<sup>®</sup> 125  $\times$  4 mm kolony plněné LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e 5  $\mu\text{m}$  (Merck) a eluované mobilní fází acetonitril s 20 mM chelatonem II.

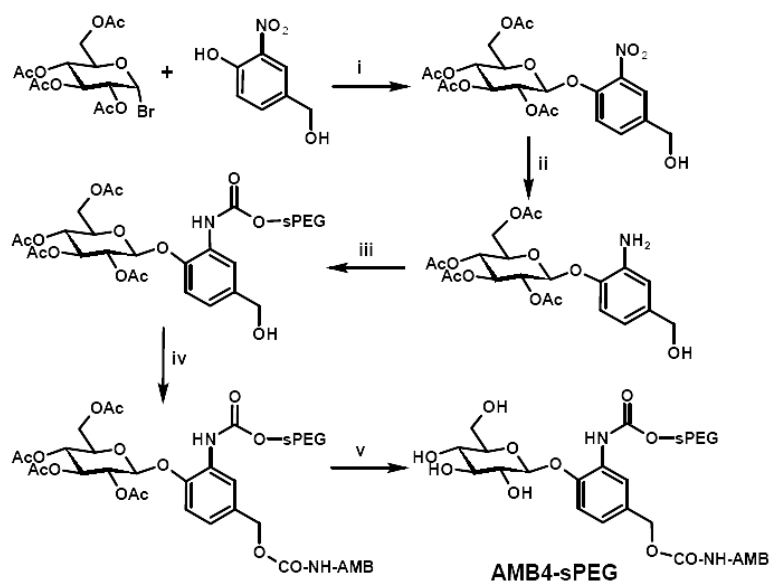
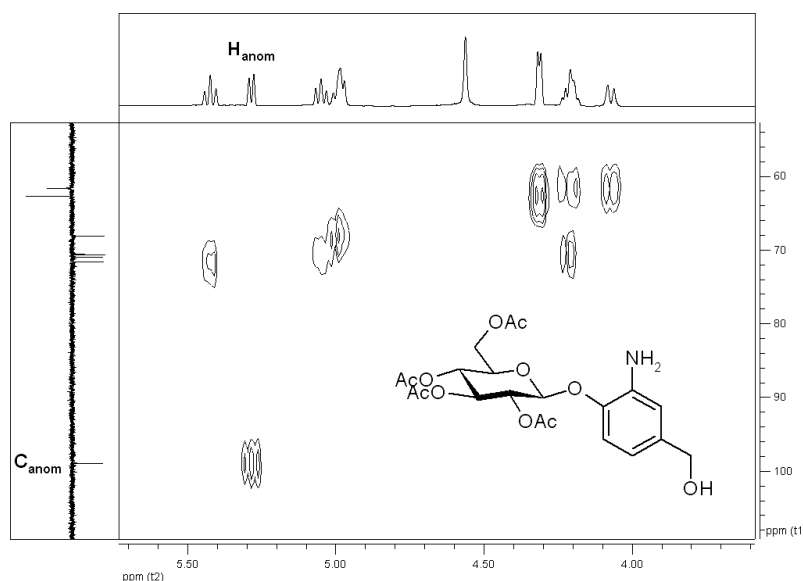


Schéma 2. **Syntéza AMB<sub>4</sub>-sPEG**; reagenty a podmínky: i: 2-nitro-4-hydroxymethylfenol, Ag<sub>2</sub>O/acetonitril, ultrazvuk 5 h 25 °C; ii: PtO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, ethylacetát 3 h 25 °C; iii: sPEG-O-CO-O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>, DMAP/DMF 48h 65 °C; iv: a) 4-nitrofenylchloroformiát/toluen 72 h 25 °C, b) AMB, DMAP/DMF 144 h 25 °C; v: a) KCN/methanol 5 h 25 °C, b) Amberlite 120-H/ methanol 10 min 25 °C



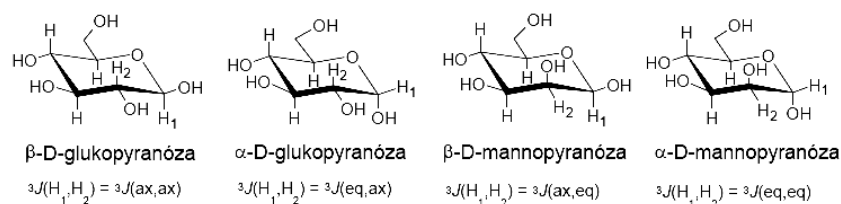
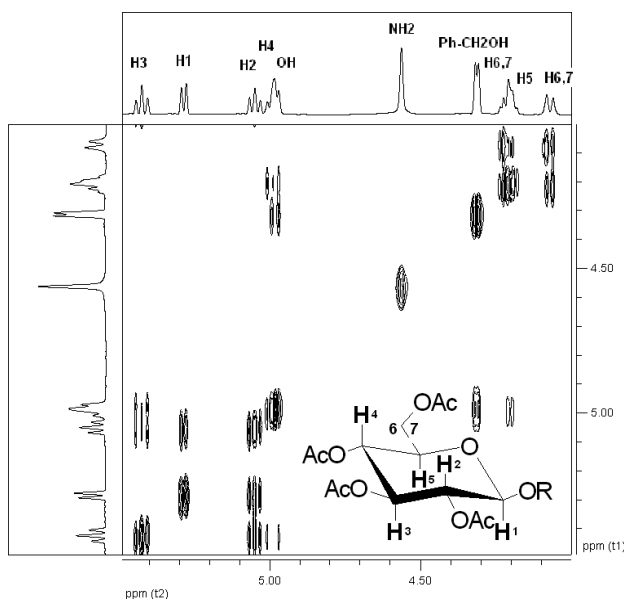
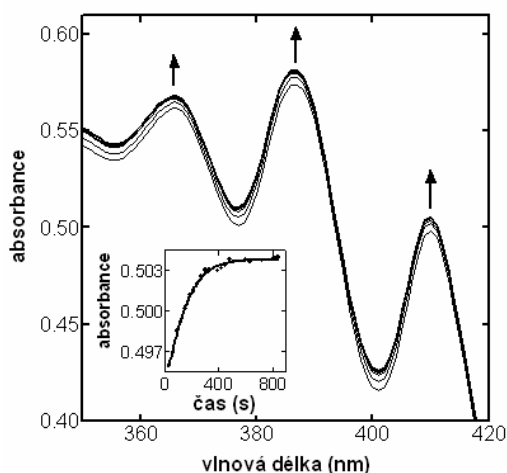
Obr. 2. <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMQC NMR spektrum (2-amino-4-hydroxymethylfenyl)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)-β-D-glukopyranosidu

## Výsledky a diskuse

K ověření β-konfigurace meziproduktů (glukopyranosidů) bylo využito <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMQC NMR spekter (obr. 2). (2-Amino-4-hydroxymethylfenyl)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)-β-D-glukopyranosid má anomerní atom uhlíku při 98,4 ppm, čemuž odpovídá dublet anomerního atomu vodíku při 5,68 ppm (<sup>3</sup>*J* = 7,9 Hz). Tato interakční konstanta odpovídá vicinální interakci anomerního atomu

vodíku (H<sub>1</sub>) se sousedním vodíkem (H<sub>2</sub>). Z její vysoké hodnoty vyplývá, že se oba tyto atomy nacházejí v axiální poloze, neboť interakční konstanty pro vodíky v diekvatoriálním resp. axiálně-ekvatoriálním uspořádání jsou v rozmezí 1–4 Hz (obr. 3). Glukosový fragment tedy zaujímá β-konfiguraci potřebnou pro reakci s enzymem β-glukosooxidase.

Homonukleární korelace <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY NMR (obr. 4) byla použita ke kompletnímu přiřazení signálů protonové-

Obr. 3. Možné prostorové uspořádání vodíků H<sub>1</sub> a H<sub>2</sub> v glykopyranosachObr. 4. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spektrum (2-amino-4-hydroxy-methylfenyl)-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)-β-D-glukopyranosiduObr. 5. Záznam časové změny spektra pro enzymatickou hydrolýzu konjugátu AMB<sub>4</sub>-sPEG (3·10<sup>-6</sup> M) katalyzovanou β-glukosidasou (2 mg/1 mL; 66,6 jednotek/g;) ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 2·10<sup>-2</sup> M) při 37 °C. Inset představuje kinetickou závislost absorbance na čase při 409 nm (τ<sub>1/2</sub> = 103 ± 4 s)

ho NMR spektra a určení struktury. Ve výřezu obsahujícím všechny glukosové vodíky je z jednotlivých krosníků patrná konektivita v celém kruhu. Navíc se v této oblasti chemických posunů objevují vodíky NH<sub>2</sub>-skupiny tvořící rozšířený singlet (4,61 ppm), které v HMQC spektru nemají žádný krosník a dále hydroxymethylová skupina na benzenovém jádře. Diastereotopickou CH<sub>2</sub>-skupinu představuje dublet 4,36 ppm s interakcí (5,5 Hz) s protonem OH-skupiny, který je díky tomuto 2D spektru odlišitelný od splývajícího multipletu při 5,02–5,06 ppm.

Finální konjugát AMB<sub>4</sub>-sPEG byl charakterizován pomocí elementární analýzy (C<sub>1198</sub>H<sub>2204</sub>N<sub>8</sub>O<sub>576</sub> (25 160) (%): C, 55,23; H, 8,70; N, 0,45; nalezeno: C, 55,61; H, 9,08; N, 0,52); GPC bylo využito ke stanovení M<sub>w</sub> (M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,12) a HPLC ke stanovení čistoty konjugátu; obsah volného AMB byl menší než 1 mol.%. Dále bylo pomocí UV/VIS spektroskopie (typická maxima shodná s polyenovým systémem AMB) prokázáno, že obsah AMB v konjugátu koresponduje s molárním zlomkem 1:4 (sPEG:AMB).

Připravený konjugát byl analyticky testován za podmínek *in vitro* ve fosfátovém pufru resp. s přidavkem β-glukosidas (E.C.3.2.1.21) (*Aspergillus niger*). Ze spektrálních záznamů je patrný přírůstek absorpčního pásu při 409 nm, který je specifický pro monomerní AMB (τ<sub>1/2</sub> = 103 ± 4 s) (obr. 5). Uvolnění AMB z konjugátu bylo také potvrzeno pomocí HPLC.

## Závěr

Uvedená práce dokumentuje, že úspěch cílené organické syntézy vyžaduje aktivní znalost a kombinaci všech dostupných instrumentálních metod analytické chemie. Z výsledků předběžné studie *in vitro* lze předpokládat, že k uvolnění AMB bude docházet cíleně v místě působení houbového patogenu.

*Tento projekt byl uskutečněn za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, Projekt č. MSM 002 162 7501.*

## LITERATURA

1. Trejo W., Bennett R.: J. Bacteriol. 85, 436 (1963).
2. Sedlák M., Drabina P., Bílková E., Šimůnek P., Buchta V.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2952 (2008).

## ANALÝZA LIPIDŮ V PŘÍRODNÍCH EXTRAKTECH POMOCÍ HPLC/MS

EVA ČÁNOVÁ, MIROSLAV LÍSA a MICHAL HOLČAPEK

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice  
canovae@seznam.cz

## Úvod

Lipidy jsou přírodní látky rostlinného i živočišného původu obsahující estery vyšších mastných kyselin. Funkčně i chemicky jsou velmi rozdílné, ale jejich společnou charakteristickou vlastností je nerozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech. Lipidy tvoří v lidském těle rezervoár energie, mechanickou a tepelnou ochranu některých orgánů, dále jsou důležité jako zdroj vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K), jsou součástí buněčných membrán a zdrojem esenciálních mastných kyselin. Převážnou část lipidů v potravě člověka představují triacylglyceroly, méně jsou zastoupeny fosfolipidy, glykolipidy a steroly. Poruchy metabolismu lipidů v lidském těle nebo jejich nevyvážený příjem potravou může způsobovat řadu onemocnění, např. obezitu, aterosklerózu, rakovinu, kardiovaskulární problémy, atd.

Na metabolismus lipidů má značný vliv jejich struktura, navázaná funkční skupina a složení mastných kyselin. Cílem této práce bylo vyextrahovat lipidy z přírodních vzorků a následně je separovat a identifikovat pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS).

## Experimentální část

## Vzorky

Pro extrakci lipidů z přírodních materiálů byla použita modifikovaná metoda extrakce podle Bligh a Dyer<sup>1</sup>. 1 g přírodního materiálu byl smíchán s 20 ml směsí chloroform/methanol (2:1) a homogenizován po dobu 3 min. Poté byl extrakt přefiltrován přes skládaný filtr a k filtrátu byly přidány 4 ml redestilované vody. Vzniklá emulze byla odstředěna na centrifuze po dobu 2 min. Po rozdělení extraktu na dvě fáze byla horní vodní fáze odstraněna. Dolní organická fáze s obsahem lipidů byla odpařena do sucha proudem dusíku a vzniklý odparek byl rozpuštěn v isopropanolu.

Pro oddělení polárních a nepolárních lipidů byla použita extrakce tuhou fází na kolonce Supelclean LC-NH<sub>2</sub> (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Kolonka byla nejprve promyta hexanem a poté bylo nanášeno 100  $\mu$ l extraktu.

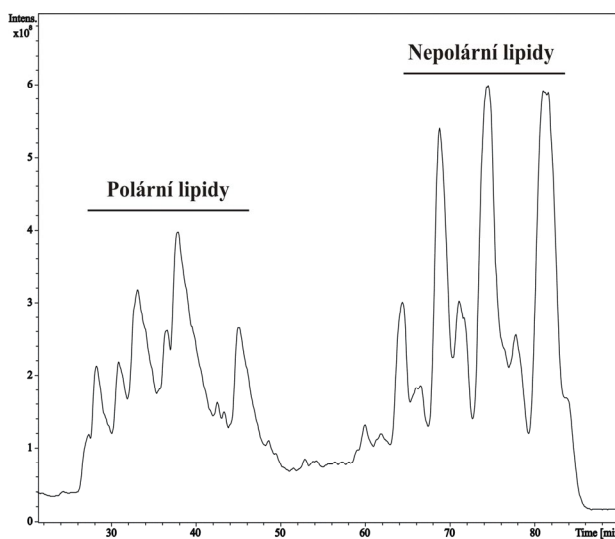
Nepolární lipidy byly vymyty 6 ml směsí isopropanol/hexan (2:1) a následně polární lipidy 6 ml methanolu.

## HPLC/MS analýza

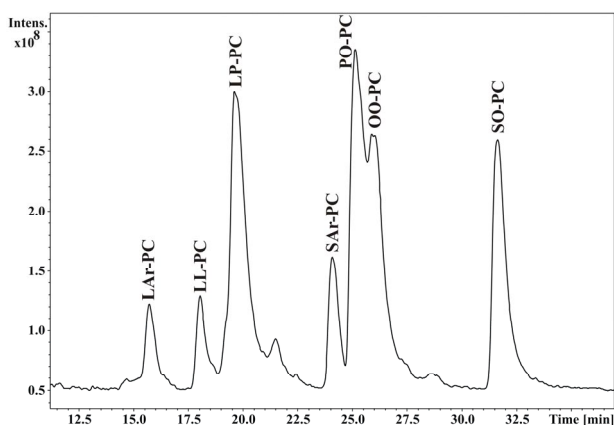
Měření bylo prováděno na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu sestaveném z pumpy Waters 616 s kvarterním gradientovým systémem, automatickým dávkovačem vzorků Waters 717 a chromatografickým softwarem Millennium (Waters, Milford, MA, USA). Pro separaci jednotlivých tříd lipidů byla použita kolona Nova-Pak Silica (3,9  $\times$  150 mm, Waters, Milford, MA, USA) a mobilní fáze H<sub>2</sub>O/isopropanol/hexan. Analýza triacylglycerolů byla prováděna na koloně Nova-Pak C<sub>18</sub> (150  $\times$  3,9 mm, Waters, Milford, MA, USA) s mobilní fází isopropanol/acetonitril. Analýza fosfolipidů byla provedena na koloně Luna C<sub>18</sub> (250  $\times$  4,6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) s mobilní fází isopropanol/acetonitril/H<sub>2</sub>O s různým obsahem aditiv. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml min<sup>-1</sup>, nástřik vzorku byl 5  $\mu$ l a teplota separace 35 °C. Byl použit hmotnostní spektrometr s analyzátozem typu iontová past (Bruker Daltonics, Brémy, Německo), na kterém byly nastaveny následující podmínky: zmlžující plyn 60 psi, sušící plyn 10 ml min<sup>-1</sup>, teplota sušícího plynu 365 °C a hmotnostní rozsah 50–1000 *m/z*.

## Výsledky a diskuse

Prvním krokem této práce bylo testování extrakce lipidů z biologického materiálu, která byla provedena pomocí systému rozpouštědel methanol/chloroform/H<sub>2</sub>O



Obr. 1. RP-HPLC/MS chromatogram extraktu lipidů



Obr. 2. RP-HPLC/MS separace fosfatidylcholinů z vaječného žloutku

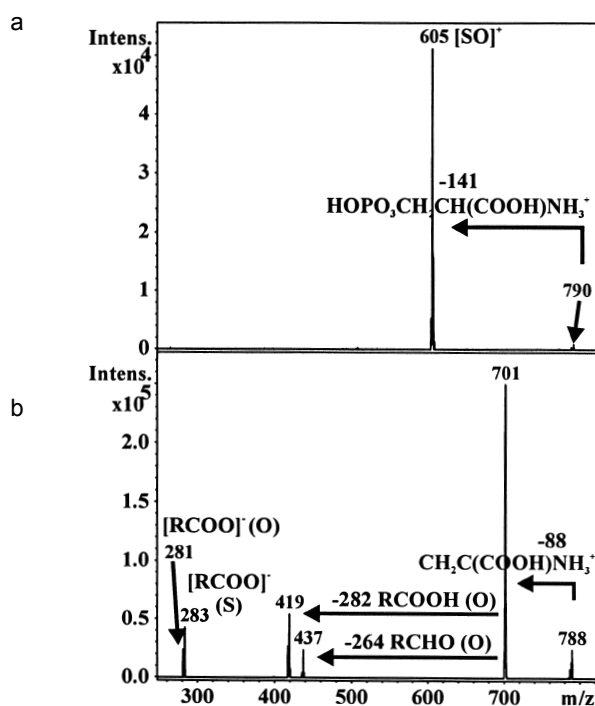
podle Bligh a Dyer<sup>1</sup>. Extrakce lipidů byla testována na vaječném žloutku, který obsahuje velké množství různých tříd polárních a nepolárních lipidů. Při extrakci lipidů použitými rozpouštědly vzniká emulze, která byla pomocí centrifugy rozdělena na vodnou a organickou fázi s obsahem lipidů (obr. 1).

Bylo testováno dělení extraktu lipidů na polární a nepolární lipidy pomocí extrakce tuhou fází na aminové kolonce podle Takatera<sup>2</sup>. K vymytí nepolárních lipidů byla místo směsi chloroform/propanol použita směs isopropanol/hexan vzhledem k používaným mobilním fázím. Extrakt lipidů byl rozdělen podle polaritu na nepolární (triacylglyceroly, sterolestery, atd.) a polární lipidy (fosfolipidy, sfingolipidy, atd.). Jednotlivé frakce byly kontrolovány pomocí HPLC/MS a bylo zjištěno, že polární a nepolární lipidy byly kvantitativně odděleny. Pro separaci tříd lipidů byla použita HPLC v systémech s normálními fázemi se silikagelovou kolonou a mobilní fází isopropanol/hexan/H<sub>2</sub>O. Výsledný chromatogram obsahoval separované jednotlivé třídy lipidů, jejichž frakce byly sbírány. Třídy lipidů byly separovány v normálních fázích podle jejich rozdílné polaritu, od nepolárních lipidů až po lipidy polární.

Dalším krokem byla analýza získaných frakcí tříd lipidů pomocí HPLC/MS. Polární lipidy byly analyzovány v systému s obrácenými fázemi s použitím mobilní fáze acetonitril/isopropanol/H<sub>2</sub>O s přidavkem různého obsahu aditiv podle druhu analyzovaných lipidů. V rámci tříd byly separovány podle přítomnosti mastných kyselin, jejich délky řetězce a počtu dvojných vazeb (obr. 2).

Jednotlivé polární lipidy byly identifikovány hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (ESI) v kladném a záporném záznamu iontů. Jednotlivé polární lipidy byly identifikovány na základě jejich molekulové hmotnosti, neutrálních ztrát mastných kyselin a neutrálních ztrát funkčních skupin lipidů (obr. 3).

Nepolární lipidy byly separovány v systému s obrácenými fázemi s mobilní fází acetonitril/isopropanol. Lipidy byly separovány podle hodnoty skupiny ECN, která vyja-



Obr. 3. ESI-MS/MS hmotnostní spektrum fosfatidylserinu; a – kladný záznam iontů, b – záporný záznam iontů

druje vztah mezi počtem uhlíků (CN) a počtem dvojných vazeb (DB) ( $ECN = CN - 2DB$ ). Jednotlivé nepolární lipidy byly identifikovány hmotnostním spektrometrem s chemickou ionizací za atmosférického tlaku na základě molekulové hmotnosti a neutrálních ztrát mastných kyselin.

## Závěr

Byla zoptimalizována extrakce lipidů z přírodního materiálu pomocí systému chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O. Polární a nepolární lipidy byly odděleny pomocí extrakce tuhou fází. Rozdělení na třídy lipidů bylo provedeno pomocí HPLC/MS na silikagelové koloně. V získaných frakcích byly separovány a identifikovány jednotlivé lipidy metodou HPLC/MS.

*Tato práce byla podporována grantovými projekty MSM0021627502 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy), dále 203/09/0139 a 203/09/P249 (Grantová agentura České republiky).*

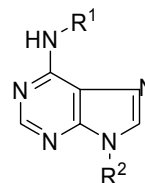
## LITERATURA

1. Bligh E. G., Dyer W. J.: Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 (1959).
2. Takatera A., Takeuchi A.: J. Chromatogr., B 838, 31 (2006).

## TERMODYNAMICKÉ STUDIUM INTERAKCÍ FYZIOLOGICKY VÝZNAMNÝCH DERIVÁTŮ PURINU

DANA DOSPIVOVÁ, PŘEMYSL LUBAL,  
MARTA FARKOVÁ a LIBUŠE TRNKOVÁ

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno  
160016@mail.muni.cz



### Úvod

Adenin (6-aminopurin) tvoří významnou stavební složku nukleových kyselin, které se podílejí na přenosu genetické informace, a koenzymů, spojených s přenosem energie, náboje a biologicky důležitých látek<sup>1</sup>.

N6-deriváty adeninu zvané cytokininy patří mezi fytohormony. Podle řetězce navázaného na N6 dusíku adeninu se dělí na isoprenoidní (např. isopentenyladenin, trans-zeatin aj.) a aromatické (6-benzyladenin, kinetin, topoliny aj.). Cytokininovou aktivitu vykazují také některé deriváty močoviny (např. *N,N'*-difenylničovina, thidiazuron).

Název pochází z řečtiny: cyto – „kytos“ – buňka, kinesis – pohyb a vyjadřuje jejich stimulaci buněčného dělení. CK a auxin ovlivňují celkový habitus (vnější vzhled) rostliny. Mezi další účinky patří vznik sekundárních meristémů, podporují zvýšení počtu i hmoty plodu, oddalují senescenci listů aj.

U některých analogů cytokininů jako olomoucín či roskovitín byly objeveny protirakovinné účinky. Efekt jejich účinku spočívá v inhibici cyklin-dependentních kinas, proteinů odpovědných za buněčné dělení. Při aplikaci *in vitro* k buňkám tumorové a zdravé linie došlo k apoptóze pouze u nádorové linie<sup>2</sup>.

Pro pochopení procesů, které probíhají nejen v roztocích, ale i na nabitém fázovém rozhraní, je třeba se zabývat studiem protonizačních rovnováh.

Cílem naší práce bylo předběžné studium těchto rovnováh adeninu a jeho derivátů pomocí potenciometrických acidobazických titrací.

### Experimentální část

#### Kalibrace elektrody

Pro výpočet disociačních konstant je důležitá kalibrace elektrody, která byla prováděna potenciometrickou titrací roztoku silné kyseliny (HCl, p.a, Penta) odměrným roztokem silné báze (NaOH, p.a, Penta) pomocí titrátoru 835 Titrand – Tiamo Metrohm (Švýcarsko). Změna po-

#### Schéma I. Strukturální vzorce studovaných ligandů

Titrace byly provedeny pro následující vzorky:

- R<sup>1</sup> = 2-chlorobenzyl (2-Cl-BAP)
- R<sup>1</sup> = 2-methoxybenzyl (2-methoxy-BAP)
- R<sup>1</sup> = 3-chlorobenzyl (3-Cl-BAP)
- R<sup>1</sup> = 3-methoxybenzyl (3-methoxy-BAP)
- R<sup>1</sup> = 4-chlorobenzyl (4-Cl-BAP)
- R<sup>1</sup> = 4-methoxybenzyl (4-methoxy-BAP)
- R<sup>1</sup> = benzyl (6-BAP)
- R<sup>2</sup> = H
- R<sup>2</sup> = D-ribosa

tenciálu během potenciometrického stanovení konstant byla měřena kombinovanými skleněnými elektrodami LL Ecotrode Plus Metrohm (pro vodná prostředí) a Solvotrode Metrohm (pro směsná organická rozpouštědla). Měření bylo prováděno v inertní atmosféře argonu z důvodu eliminace CO<sub>2</sub>. Bod ekvivalence této titrace a hodnota pK<sub>w</sub>, která byla důležitá pro výpočet disociačních konstant v bazické oblasti pH, byly vyhodnoceny pomocí Granovy linearizace titračních křivek. Při zpracování dat byly využity programy MS Excel a Opium.

#### Titrace vzorků, stanovení protonačních konstant

Pro titraci roztoku adeninu (Ade) a adenosinu (Ado) o koncentraci 5 mM ve vodném prostředí byla iontová síla 0,15 M nastavena pomocí NaCl (Sigma-Aldrich), teplota se zvyšovala pro Ade v rozmezí 25–45 °C, pro Ado byla teplota konstantní 25,0 ± 0,1 °C. Adenin i adenosin o nejvyšší dostupné čistotě byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. Spektra roztoků ligandu pro různá pH byla změřena na spektrofotometru PYE UNICAM UV2 (Velká Británie).

Titrace vybraných purinových derivátů (*c* ≈ 1 mM) byly prováděny ve směsném organickém rozpouštědle 50% (v/v) CH<sub>3</sub>OH z důvodu jejich menší rozpustnosti. Iontová síla byla proměnná (*I* = 0–0,02 M), teplota byla konstantní 25,0 ± 0,1 °C. Studované deriváty byly syntetizovány na Katedře anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

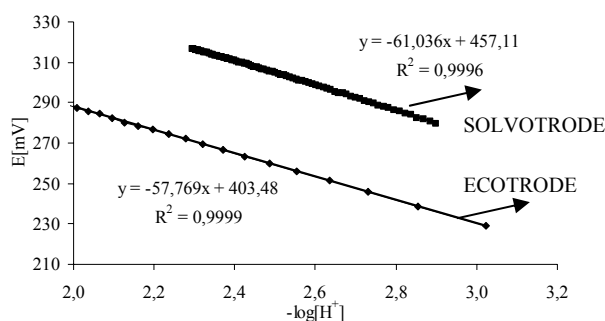


## Výsledky a diskuse

### Kalibrace elektrody

Cílem měření bylo kalibrovat používané elektrody stanovením jejich parametrů ( $E_0$ ,  $g$ ) a autoprotolytické konstanty  $pK_w$  a zjistit jejich správnou funkci v obou prostředích (vodné, směsné  $H_2O - CH_3OH$ ).

Z obr. 1 je vidět, že závislost elektromotorického napětí galvanického článku na  $-\log[H^+]$  je lineární v obou případech. Kalibrační parametry elektrod byly použity k výpočtu autoprotolytické konstanty vody  $pK_w$  (viz tab. I). Z experimentálních dat (viz obr. 1) bylo zjištěno, že obě elektrody vykazují správnou funkci v obou prostředích

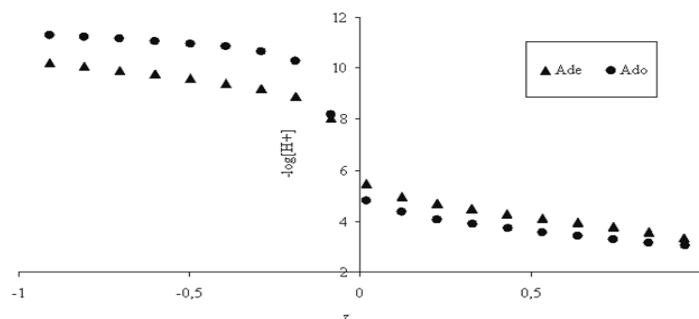


Obr. 1. Kalibrační přímky použitých elektrod

Tabulka I

Kalibrační parametry použitých skleněných elektrod

Typ elektrody	$pK_w$	Nernstova směrnice, $g$	$E^0$
Ecotrode	13,82(1)	-58,0 <sub>8</sub> (6)	404,0 <sub>5</sub> (1)
Solvotrode	14,04(6)	-61,7 <sub>0</sub> (3)	460,2 <sub>5</sub> (2)



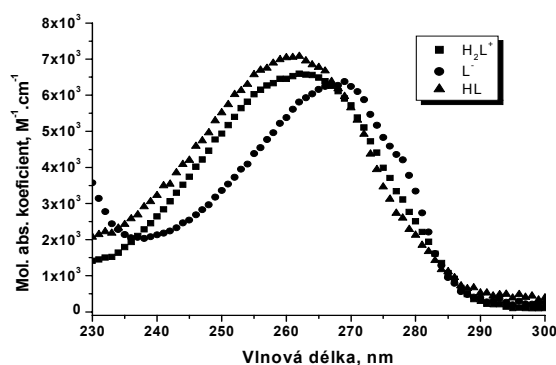
Obr. 2. Normalizované titrační křivky Ade a Ado

Tabulka II

Protonační konstanty a termodynamické parametry ligandů ( $I = 0,15 M$ )

Ligand	Teplota [ $^{\circ}C$ ]			Termodynamické parametry
	25	37	45	
Adenin	4,18(4) <sup>a</sup> 4,22 <sup>b</sup>	4,03(5) <sup>a</sup>	4,00(5) <sup>a</sup>	$\Delta H^0 = -17,4(4) \text{ kJ mol}^{-1}$ $\Delta S^0 = 23(13) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
Adenosin	3,59(5) <sup>a</sup> 3,58 <sup>b</sup>	---	---	---

<sup>a</sup> Tato práce, <sup>b</sup> cit.<sup>3</sup>

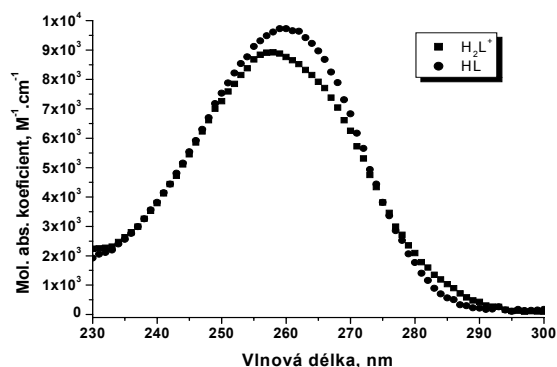


Obr. 3. Spektrální profil jednotlivých forem adeninu

a jsou použitelné pro stanovení protonačních konstant vybraných ligandů.

Titrace vzorků Ade a Ado

Experimentální data změřená z acidobazických titrací adeninu (Ade) a adenosinu (Ado) v rozmezí  $-\log[H^+] = 2-12$  (viz obr. 2) byly použity ke stanovení jejich protonačních konstant (viz tab. II). Z teplotní závislosti protonač-

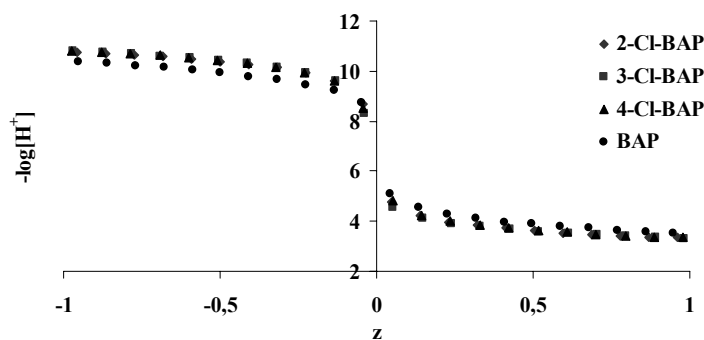


Obr. 4. Spektrální profil jednotlivých forem adenosinu

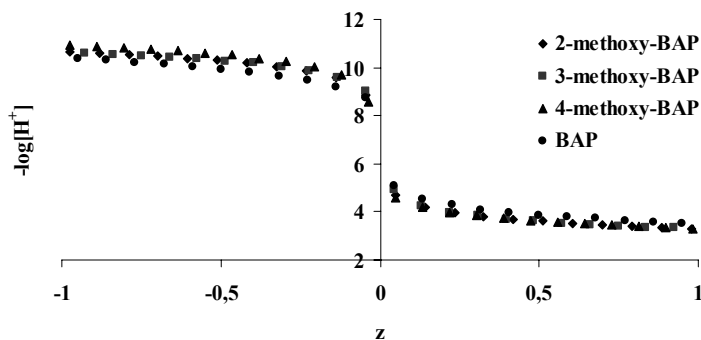
ních konstant byly stanoveny termodynamické parametry (viz tab. II). Porovnáním hodnot stanovených v této práci s hodnotami literárními je zřejmé, že jsou ve shodě. Dále je patrné, že bazicita Ado jako derivátu Ade, poklesla v důsledku substituce (viz tab. II). Ze závislosti protonačních konstant obou ligandů pro různá pH byly vypočteny spektrální profily jednotlivých forem (viz obr. 3 a 4).

Titrace vybraných derivátů 6-benzylaminopurinu (6-BAP)

Zkoumané deriváty 6-benzylaminopurinu jsou omezeně rozpustné ve vodných roztocích, proto bylo nutné provádět titrace ve směsném organickém rozpouštědle ( $\text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{OH}$ ). Experimentální data titračních křivek vybraných ligandů (viz obr. 5 a 6) byly použity k výpočtu protonačních konstant (viz tab. III).



Obr. 5. Normalizovaná titrační křivka chloroderivátů 6-benzylaminopurinu



Obr. 6. Normalizovaná titrační křivka methoxyderivátů 6-benzylaminopurinu

Tabulka III  
Protonační konstanty studovaných ligandů

Látka	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
Ade <sup>a</sup>	4,18(4)	9,58(4)
Ade <sup>b</sup>	3,99	10,12
Ade <sup>c</sup>	4,30(9)	9,30(6)
6-BAP <sup>c</sup>	3,87(7)	9,31(7)
6-BAP <sup>d</sup>	4,01; 4,24; 4,10	---
2-Cl-BAP <sup>c</sup>	3,57(9)	9,79(4)
3-Cl-BAP <sup>c</sup>	3,58(9)	9,81(6)
4-Cl-BAP <sup>c</sup>	3,59(9)	9,83(7)
2-Methoxy-BAP <sup>c</sup>	3,52(8)	9,66(7)
3-Methoxy-BAP <sup>c</sup>	3,68(9)	9,68(4)
4-Methoxy-BAP <sup>c</sup>	3,71(8)	9,91(6)

<sup>a</sup> H<sub>2</sub>O, I = 0,15 M-NaCl, *t* = 25 °C, <sup>b</sup> 50%(w/w) acetonitril, I = 0,15 M-NaCl, *t* = 37 °C, cit. <sup>4</sup>, <sup>c</sup> 50% (v/v) methanol, I = 0-0,02 M, *t* = 25 °C, <sup>d</sup> H<sub>2</sub>O, I = 0,075 M, *t* = 25 °C UV-VIS, CZE, DP voltametrie, cit. <sup>5</sup>

## Závěr

Cílem této práce bylo stanovení protonačních konstant adeninu a adenosinu a dále derivátů benzylaminopurinu s využitím potenciometrické acidobazické titrace.

Byly stanoveny protonační konstanty pro Ade a Ado pro iontovou sílu 0,15 M a jejich hodnoty byly porovnány s literárními hodnotami i mezi sebou navzájem. Protonační konstanty těchto ligandů velmi dobře odpovídají hodnotám literárním.

Při porovnání  $pK_a$  2-Cl-BAPu s 2-methoxy-derivátem lze říci, že hodnoty  $pK_{a1}$  jsou stejné a hodnoty  $pK_{a2}$  se liší, v případě 2-methoxy-BAPu je hodnota nižší. U 3-Cl-BAPu je  $pK_{a1}$  nižší než hodnota pro 3-methoxy-derivát. V případě  $pK_{a2}$  je tomu naopak. U 4-Cl-BAPu je opět  $pK_{a1}$  nižší než u 4-methoxy-BAPu. U  $pK_{a2}$  dochází ke změně –  $pK_{a2}$  pro 4-methoxy-BAP je výrazně vyšší. Při porovnání chloroderivátů BAPu bylo zjištěno, že obě hodnoty  $pK_a$  se u Cl-derivátů nemění, tedy poloha Cl jako substituentu

nemá vliv na jejich acidobazické chování. V případě methoxyderivátů BAPu jsou změny  $pK_a$  výraznější. Obě hodnoty  $pK_a$  s polohou substituentu rostou. Z toho vyplývá, že poloha substituentu u methoxyderivátů ovlivňuje elektronovou hustotu v molekule a tím bazické vlastnosti derivátu.

Benzyllová skupina na N6-atomu adeninu ovlivnila pouze hodnotu  $pK_{a1}$ , když pro 6-BAP došlo k jejímu poklesu. Porovnáním 6-BAPu s jeho Cl-deriváty se hodnota  $pK_{a1}$  snížila a naopak hodnota  $pK_{a2}$  se zvýšila. Srovnáme-li 6-BAP s methoxy-deriváty, je situace stejná jako u chloroderivátů.

Z výše uvedených porovnání bylo zjištěno, že adenin má nejvyšší hodnoty  $pK_{a1}$  a že navázáním benzylové skupiny a následně Cl, resp. (CH<sub>3</sub>O) skupiny se hodnota protonační konstanty snižuje. Hodnoty  $pK_{a2}$  jsou nejmenší u adeninu a s navázáním Cl, resp. (CH<sub>3</sub>O) skupiny se hodnota protonační konstanty zvyšuje.

Dosažených výsledků bude využito na možné analytické stanovení ve směsi pomocí separačních metod, zejména HPLC.

*Ráda bych poděkovala panu prof. Z. Trávníčkovi z Katedry anorganické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí 6-BAP derivátů.*

*Práce byla finančně podporována projekty MŠMT ČR BIO-ANAL-MED (LC06035).*

## LITERATURA

- Šípál Z., Anzenbacher P., Pospíšil J., Růžička I.: *Biochemie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1992.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: *Chem. Listy* 98, 834 (2004).
- Martell A. E. a kol.: *Database 46: NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 7*.
- Marqués I., Fonrodona G., Baró A., Guiteras J., Beltrán J. L.: *Anal. Chim. Acta* 471, 145 (2002).
- Barták P., Pěchová D., Tarkowski P., Bednář P., Koutouček M., Stránský Z., Vespalec R.: *Anal. Chim. Acta* 421, 221 (2000).

## PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ NÁPLŇOVÝCH KOLON PRO KAPILÁRNÍ KAPALINOVOU CHROMATOGRAFII

MARTIN FRANČ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
martinfrancx@gmail.com

### Úvod

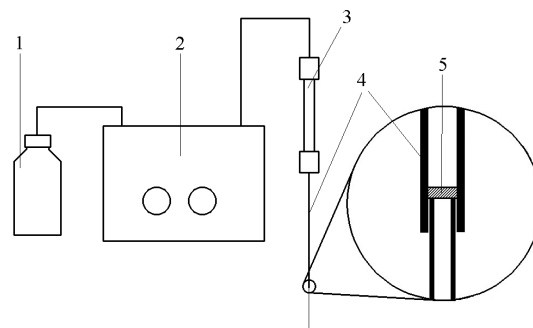
Plnění vlastních kapilárních kolon pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii přináší řadu výhod oproti používání kolon komerčních. Nejvýraznější je rozdíl v ceně. Zatímco komerční kolony stojí několik desítek tisíc Kč, naplnění kolony stojí pouze několik set Kč. Další výhodou je mnohem větší flexibilita. Je možné si připravit kolonu se stacionární fází, která je vyžadovaná k řešení daného problému. Ukáže-li se jako nevhodná, je velmi jednoduché a ekonomicky nenáročné připravit kolonu vhodnější. V některých případech je dokonce jediným způsobem, jak získat kolonu s příslušnou stacionární fází, její vlastní příprava. Týká se to například kapilárních kolon pro separace optických isomerů, které se komerčně nevyrábí.

Existují tři metody plnění kolon pro kapilární kapalinovou chromatografii. Podle média použitého k dopravě částic stacionární fáze rozlišujeme plnění plynem, superkritickým fluidním oxidem uhličitým a kapalinou. To se také označuje jako plnění suspenzí a jedná se o metodu použitou v této práci. Plnění chromatografických kolon bývá označováno za umění a téměř vždy probíhá metodou pokusů a omylů. Podmínky pro naplnění kvalitní kolony se pro každou stacionární fází liší, proto je nemožné v literatuře najít univerzální postup. Byl zkoumán vliv mnoha parametrů plnění na účinnost kolony, například vliv frity uzavírající kolonu<sup>1</sup>, vliv použitých rozpouštědel<sup>2</sup> nebo rozdílů v plnění při konstantním tlaku a konstantním průtoku<sup>3</sup>. Tato práce si klade za cíl najít postup pro plnění kvalitních kapilárních kolon, který bude co nejrychlejší a bude mít co nejmenší nároky na přístrojové vybavení.

### Experimentální část

Jako mobilní fáze byl použit acetonitril (čistota pro HPLC, LiChrosolv, Merck) a deionizovaná voda, jako stacionární fáze byl použit Nucleosil C18 s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel). Pro testování kolon byla použita thiomocovina (Sigma), fenol (p.a., Penta), toluen (čistý, Merck) a anilin (99,5%, Aldrich).

Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 H byla zakoupena u firmy P-lab. Kolony byly plněny na izokratické pumpě LCP 4000 (Ecom). Jako zásobník suspenze sloužila nerezová kolona pro HPLC s vnitřním objemem asi 1,7 ml. Testování kolon probíhalo na pumpě 100DM (ISCO)



Obr. 1. Plnicí aparatura; (1) zásobník mobilní (plnicí) fáze; (2) izokratická pumpa; (3) zásobník suspenze; (4) kolona; (5) fritra

s dvoukanalovým UV detektorem UVIS-205 (Linear Instruments). Dávkovací kohout (Valco Instruments) měl objem 100 nl. Chromatogramy byly zaznamenávány pomocí programu Clarity 2.4.4.105.

Postup plnění a sestavení aparatury byly převzaty z literatury<sup>4,5</sup> a upraveny dle naší instrumentace, jak je uvedeno na obr. 1. Na konec kolony (vnitřní průměr 320  $\mu\text{m}$ , délka přibližně 25 cm) byla vložena fritra ze skelné vaty a zajištěna vlepením kapiláry o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  do kolony (viz obr. 1). Kolona byla k zásobníku suspenze připojena PEEKovou trubičkou a promyta 65% acetonitrilem. Suspenze stacionární fáze v acetonitrilu o koncentraci 0,05 g  $\text{cm}^{-3}$  byla sonifikována v ultrazvukové lázni po dobu 10 min a poté naplněna do zásobníku. Následně byla suspenze pumpována skrz kolonu, jako plnicí fáze byl použit 65% acetonitril, tlak byl udržován přibližně 30 MPa. Po naplnění kolony byl tlak zvýšen na 33 MPa a udržován po dobu několika minut, aby došlo k usazení náplně. Některé kolony byly zároveň sonifikovány v ultrazvukové lázni (viz tab. I). Poté byla pumpa vypnuta a kolona ponechána, než tlak poklesl na

Tabulka I  
Podmínky plnění kolon

Označení kolony	Doba usazování náplně [min]	Doba sonifikace [min]
Eva, Fiona, Gertruda, Helenka	15	–
Eliška, Františka, Ginny	15	10
Iva	5	–
Jana	30	–

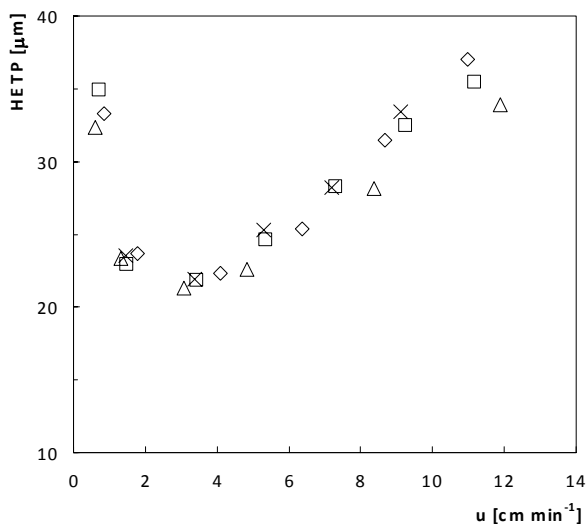
hodnotu atmosférického tlaku.

Testování kolon probíhalo formou měření Van Deemterovy křivky a výpočtem separační impedance. Jako mobilní fáze byl použit 65% acetonitril (v/v), nezadržujícím se analytem byla thiomocovina o koncentraci  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Na zjišťování počtu teoretických pater byl použit fenol a u některých kolon také toluen, oba analyty měly koncentraci  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Účinnost separace byla testována na směsi fenolu a anilinu o koncentracích obou analytů

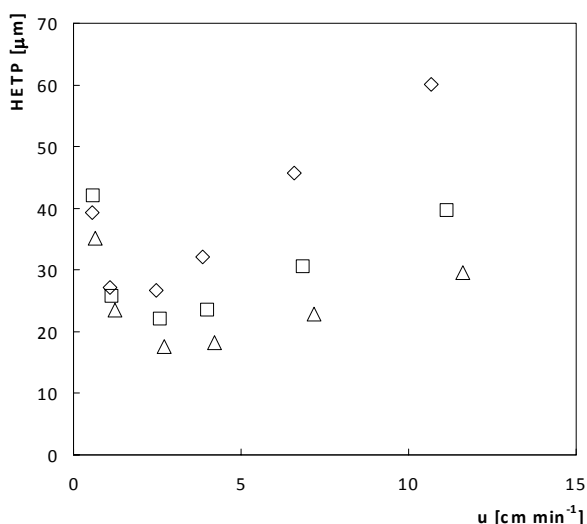
$5 \text{ mg cm}^{-3}$ . Měření probíhalo v módu konstantního tlaku, použitý tlak byl v rozsahu 0,6–7 MPa. Detekční kapilára měla vnitřní průměr  $100 \text{ }\mu\text{m}$ , vlnové délky detektoru byly nastaveny na 214 a 254 nm.

## Výsledky a diskuse

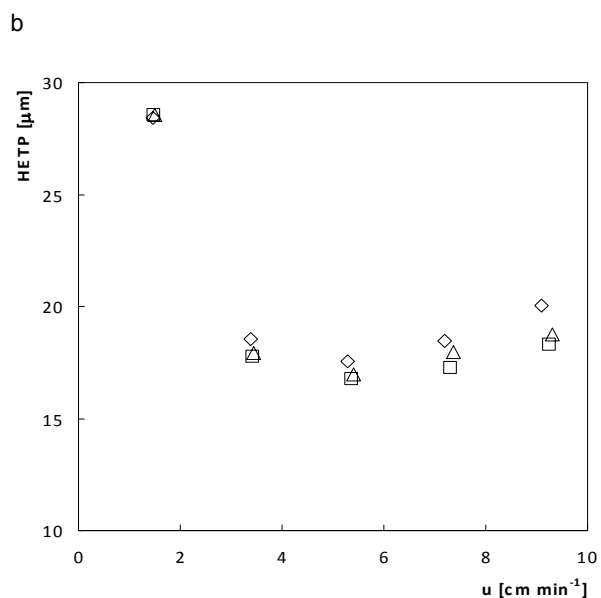
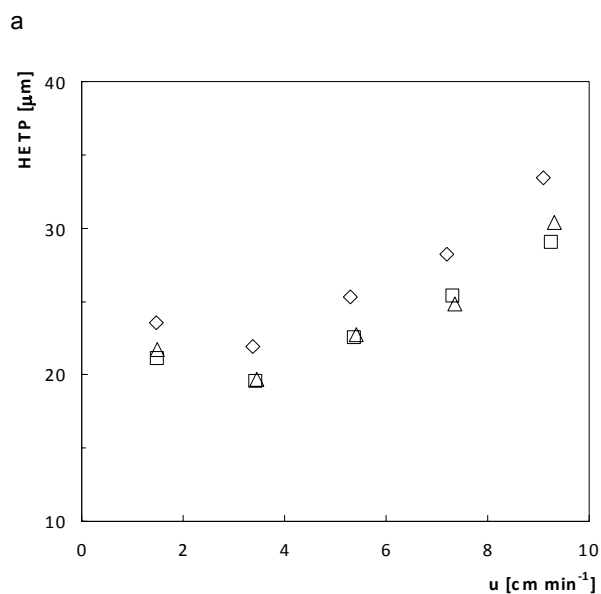
V první fázi byla zkoumána reprodukovatelnost plnění a vliv sonifikace při usazování náplně na účinnost kolo-



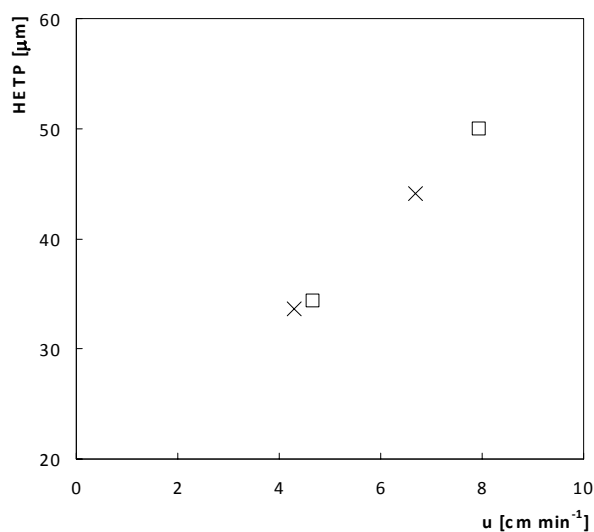
Obr. 2. Van Deemterova křivka pro kolony připravené bez použití sonifikace; (◇) Eva, (□) Fiona, (Δ) Gertruda, (×) Helenka; analyt fenol  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ; mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v); detekce UV při 214 nm



Obr. 3. Van Deemterova křivka pro sonifikované kolony; (◇) Eliška, (□) Františka, (Δ) Ginny; analyt fenol  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ; mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v); detekce UV při 214 nm



Obr. 4. Van Deemterova křivka pro (a) fenol  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ , (b) toluen  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ; kolony (◇) Helenka, (□) Iva, (Δ) Jana; mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v); detekce UV při 214 nm



Obr. 5. Van Deemterova křivka pro kolony (□) LiChrosorb RP-18, (×) Nucleosil 100 C8; analyt fenol  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ; mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v); detekce UV při 214 nm

ny. Výsledné Van Deemterovy křivky pro příslušné kolony jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Použití ultrazvukové lázně se ukázalo jako nevýhodné, protože do plnicího postupu vnáší určitý prvek náhodnosti. Zatímco všechny kolony plněné bez sonifikace (obr. 2) mají účinnost téměř stejnou, kolony sonifikované (obr. 3) vykazují velké rozdíly. Jejich účinnost je navíc v průměru o něco nižší než u kolon nesonifikovaných.

Druhým parametrem, který by mohl mít vliv na účinnost kolony, je doba usazování náplně. Bylo předpokládá-

no, že účinnost poroste s dobou usazování. Jak je vidět na obr. 4, tento předpoklad se nepotvrdil. Oba dva testované analyty vykazovaly velmi podobné Van Deemterovy křivky, nezávislé na době usazování náplně.

Pro zhodnocení celkové účinnosti kolon byly naměřeny části Van Deemterových křivek dvou kolon komerčních (stacionární fáze Nucleosil 100 C8 a LiChrosorb RP-18). Obě kolony měly účinnost téměř stejnou (viz obr. 5). Porovnání s obr. 3 ukazuje, že jejich účinnost odpovídá nejméně účinné laboratorně plněné koloně. Druhým testem byla separace směsi fenolu a anilinu. Na komerční i na laboratorně připravené koloně bylo dosaženo separace téměř na základní linii, příslušné chromatogramy jsou uvedeny na obr. 6.

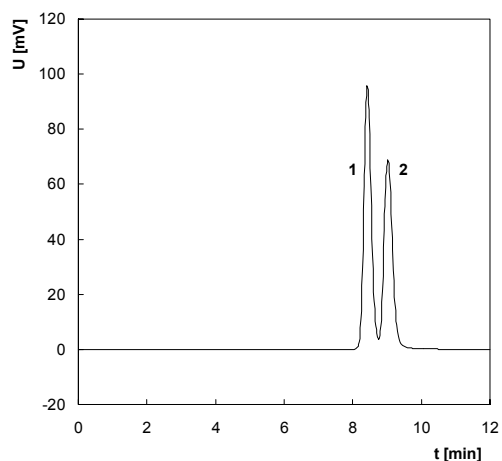
Druhým parametrem pro hodnocení kolon byl výpočet separační impedance. Separační impedance, zavedena Knoxem a Barstowem<sup>6</sup>, je bezrozměrná veličina charakte-

Tabulka II  
Separační impedance

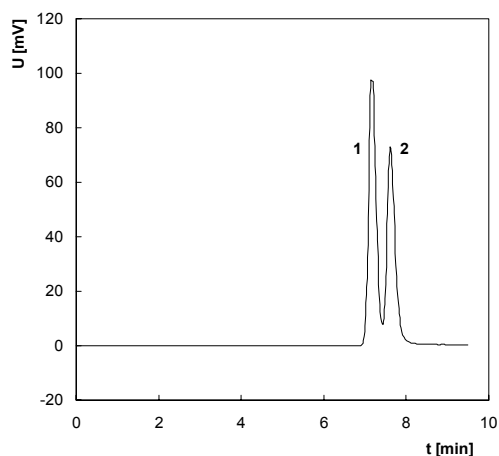
Kolona	$E(\text{fenol}) \cdot 10^{-3}$	$E(\text{toluen}) \cdot 10^{-3}$
LiChrosorb RP-18	27	–
Eva	13	–
Eliška	33	–
Ginny	9	–
Helenka	13	6,5
Iva	10	5,5
Jana	10	5,5

Hodnoty jsou zaokrouhlené na tisíce pro analyt fenol a stovky pro analyt toluen

a



b



Obr. 6. Separace směsi (1) fenolu a (2) anilinu o koncentracích  $5 \text{ mg cm}^{-3}$  na koloně (a) Eliška a (b) LiChrosorb RP-18; tlak 3 MPa; mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v); detekce UV při 214 nm

rizující kvalitu kolony. Zahrnuje v sobě separační účinnost, rychlost analýzy, provozní tlak i vliv mobilní fáze. Je možné ji spočítat jak z veličin absolutních, tak z veličin redukovaných. Platí, že čím menší impedance, tím kvalitnější kolona. U velmi kvalitních kolon je možné dosáhnout hodnoty až 2000. Separační impedance se počítá podle vztahu:

$$E = \frac{H^2 \cdot \Delta p}{L \cdot \eta \cdot u}$$

kde  $E$  je separační impedance,  $H$  je výškový ekvivalent teoretického patra [m],  $\Delta p$  je tlakový spád [Pa],  $L$  je délka kolony [m],  $\eta$  je viskozita mobilní fáze [ $0,65 \cdot 10^{-3}$  Pa s] a  $u$  je lineární průtoková rychlost [ $\text{m s}^{-1}$ ]. Výpočet byl proveden pro hodnoty naměřené při tlaku 3 MPa. Tento tlak totiž pro většinu studovaných kolon odpovídá optimální lineární průtokové rychlosti. Separační impedance pro vybrané kolony jsou uvedeny v tab. II. Hodnoty potvrzují závěry získané z Van Deemterových křivek. Impedance jsou ve srovnání s komerční kolonou velice nízké a ukazují na poměrně vysokou kvalitu kolon.

## Závěr

Bylo prokázáno, že k plnění kvalitních kolon není potřeba používat ultrazvukovou lázeň, což značně zjednodušuje provedení. Dále bylo zjištěno, že doba usazování náplně do kolony nemá na účinnost vliv a je tedy možné kolonu naplnit v minimálním čase. Takto naplněné kolony jsou svou účinností srovnatelné s kolonami komerčními.

*Autor děkuje projektu č. 78808 Grantové agentury Univerzity Karlovy a výzkumnému záměru MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.*

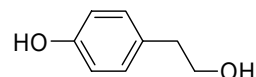
## LITERATURA

1. Shelly D. C., Gluckman J. C., Novotny M. V.: *Anal. Chem.* 56, 2990 (1984).
2. Vissers J. P. C., Claessens H. A., Laven J., Cramers C. A.: *Anal. Chem.* 67, 2103 (1995).
3. Meyer R. F., Hartwick R. A.: *Anal. Chem.* 56, 2211 (1984).
4. Borra C., Han S. M., Novotny M.: *J. Chromatogr.* 385, 75 (1987).
5. Lanças F. M., Rodrigues J. C., Freitas S. de S.: *J. Sep. Sci.* 27, 1475 (2004).
6. Bristow P. A., Knox J. H.: *Chromatographia* 10, 279 (1977).

## VÝVOJ DIAGNOSTICKÉ METODY PRO KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZU FARNESOLU A TYROSOLU JAKO PRODUKTŮ METABOLISMU KVASINKY *Candida albicans* V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH S VYUŽITÍM TECHNIKY UPLC/MS/MS

PETR GREGUŠ a LUCIE NOVÁKOVÁ

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK Praha, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
gregp4aa@faf.cuni.cz



Obr. 2. Farnesol

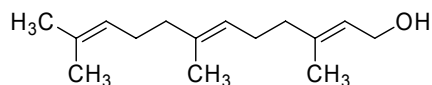
### Úvod

*Candida albicans* je obecně jeden z nejvíce izolovaných houbových patogenů v lidském těle. Je obecný původce nosokomiálních nákaz a čtvrtým nejrozšířenějším původcem infekcí krevního oběhu, stejně tak jako z 31 % je původcem urinárních infekcí a infekcí zažívacího traktu na jednotkách intenzivní péče. Je také běžně součástí lidské mikrobiální mikroflóry a medicínsky důležitým oportunním patogenem – zvláště u imunokompromitovaných osob. *Candida albicans* se také stala modelem pro systém hub v molekulární biologii. Může růst jako hyfa, pseudohyfa nebo rašící kvasinka. Dosažitelnost této různorodosti a vnitřní proměnlivosti morfologie je velkým přínosem pro patogenní život tohoto organismu. V tomto ohledu se zajímáme o tzv. quorum-sensing molekuly, jako je farnesol, který, pokud je akumulován nad určitou mez, zabraňuje přeměně z kvasinky na mycelium a způsobuje růst kultury jako aktivní rašící kvasinky bez ohledu na míru růstu<sup>1,2</sup>. Tato morfologická transformace z kvasinky v mycelium je rozhodující krok v patogenezi *Candidy albicans*. Zablokováním této přeměny by mohl být zastaven patogenní charakter tohoto oportunisty<sup>3</sup>. Naproti tomu tyrosol urychluje přeměnu v zárodečnou formu (germ tubes), tedy z kvasinky na vláknitou formu. Identifikace tyrosolu jako autoregulační molekuly má důležitý vliv na dynamiku růstu a morfogenezi *Candidy albicans*<sup>4,5</sup>.

Cílem naší práce bylo tyto dvě molekuly, tj. farnesol a tyrosol, selektivně identifikovat a kvantifikovat v biologickém materiálu. Výsledky pak poslouží pro lékařské účely jako nástroj k rozpoznání míry růstu kvasinky *Candida albicans*, jakožto infekčního agens.

### Experimentální část

K práci byly použity standardy látek farnesolu a tyrosolu:



Obr. 1. Tyrosol

Tyrosol – 2-(4-hydroxyfenyl)ethanol 500 µl (Fluka) o čistotě  $\geq 99,5\%$  (GC),  $C_8H_{10}O_2$ , průměrná Mr 138,17, vzorec obr. 1.

Farnesol – trans, trans-farnesol, 1 g (Aldrich) o čistotě 96 %,  $C_{15}H_{26}O$ , průměrná Mr 222,37, vzorec obr. 2.

Pro přípravu mobilní fáze byla použita rozpouštědla:

Ultra-čistá voda vyrobená na Farmaceutické fakultě, Milli-Q, Millipore před každým doplněním mobilní fáze byla přefiltrována.

Acetonitril – acetonitrile LC-MS II Chromasolv o čistotě (GC) 99,9 %, Riedel-de Häen.

Kyselina mravenčí – formic acid, 98–100 % puriss. p.a., Reag. ACS, Reag. Ph. Eur, II, Riedel-de Häen,  $CH_2O_2$ .

Analyzovány byly biologické vzory, konkrétně vaginální výplachy, dodané FN Hradec Králové.

Pro experimentální práci byl použit Acquity UPLC systém s duálním UV detektorem, Waters, ČR; separační kolona ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 × 100 mm, Waters, ČR a hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupolu Quattro Micro, Waters, ČR. Pro zpracování dat byl použit software MassLynx.

Cílem bylo nalézt vhodnou směs a vhodné složení mobilní fáze pro izokratickou eluci farnesolu a tyrosolu. Pro hmotnostní detekci byla používána ionizační technika ESI – ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Jako analyzátor byl využit trojitý kvadrupól s možností tandemové hmotnostní spektrometrie.

### Výsledky a diskuse

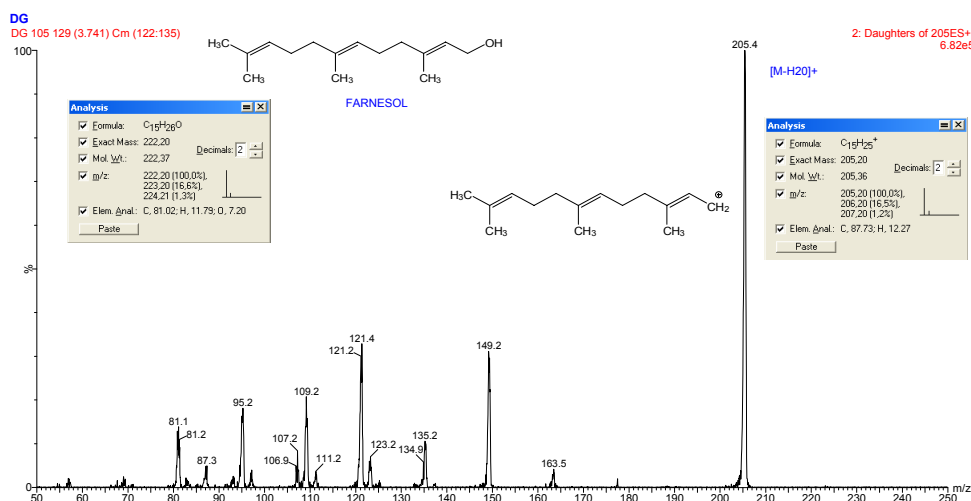
Během měření byl zjištěn vznikající molekulový iont jako  $[M+H-H_2O]^+$  u každé naší hodnocené látky.

V záznamu spekter tyrosolu byl vyhodnocen nejintenzivnější pik a vypočítána izotopická molekulová hmotnost (obr. 3).

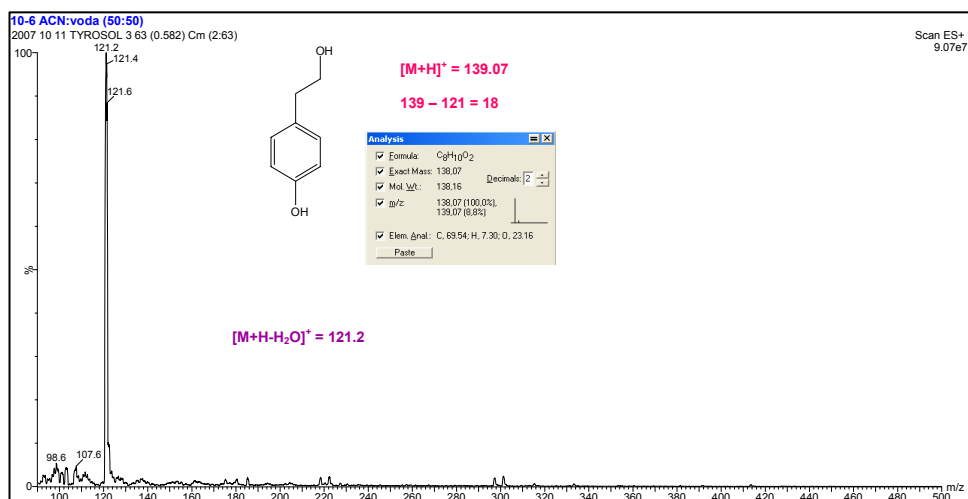
V záznamu spekter farnesolu byl vyhodnocen nejintenzivnější pik a vypočítána izotopická molekulová hodnota (obr. 4).

Dále byly získány záznamy produktových i prekurzorových iontů obou molekul pro jasnou identifikaci naší sledovaných molekul v biologickém materiálu.





Obr. 3. Záznam spekter tyrosolu v ESI – pozitivním módu



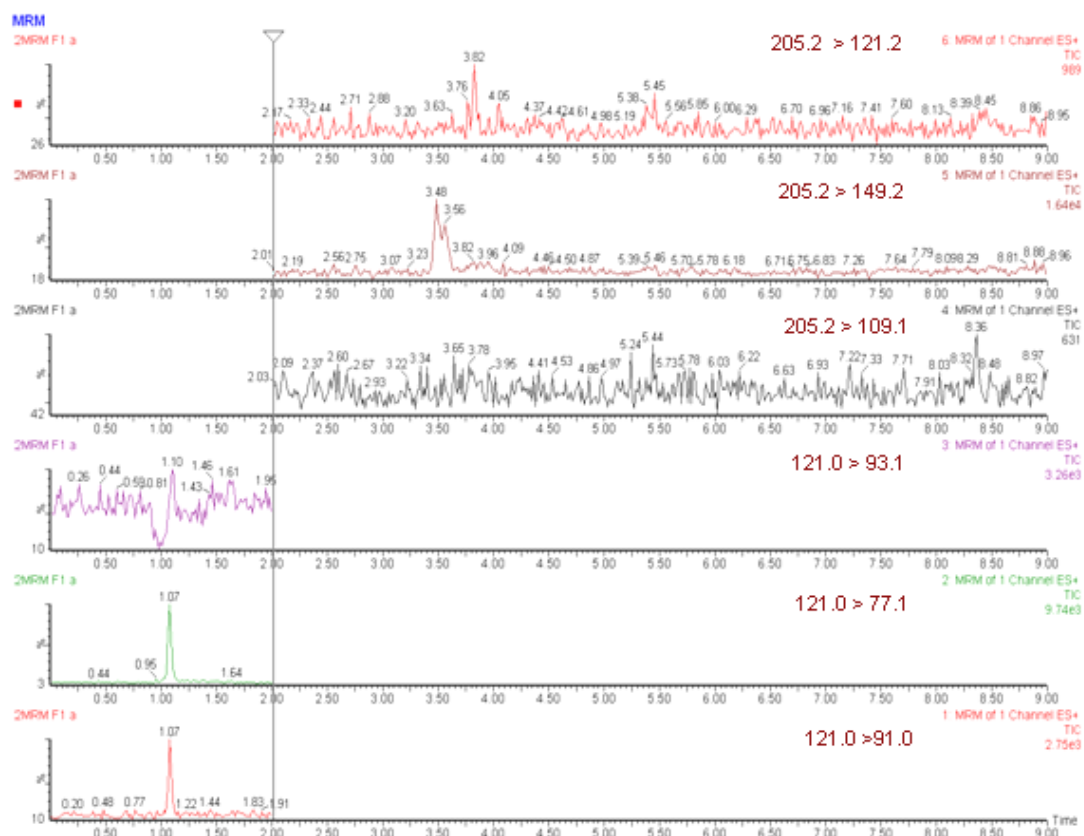
Obr. 4. Záznam spekter farnesolu v ESI – pozitivním módu

K vývoji metody vybraných přechodů iontů byly použity záznamy produktových iontů jednotlivých látek, čímž se vysledoval charakter těchto malých molekul. Aplikace této metody posloužila k sledování přítomnosti látek v biologickém vzorku. Na obr. 5 je uveden záznam jednoho vzorku, v němž je identifikována přítomnost molekuly tyrosolu. Tento fakt byl nadále potvrzen záznamem prekurzorových a produktových iontů této molekuly.

## Závěr

Z naměřených výsledků bylo stanoveno složení mobilní fáze, průtoková rychlost, aditivum pro vyšší odezvu signálu. Dále pak byly stanoveny hodnoty všech parametrů detektoru pro získání spekter.

Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení farnesolu a tyrosolu v biologickém materiálu. Tyto výsledky by měly posloužit k dalším výzkumným záměrům v klinickém lékařství v problematice onemocnění způsobené kvasinkou *Candida albicans* u žen.



Obr. 5. SRM biologického vzorku

*Autor děkuje doc. Vladimíru Buchtovi za zadání zajímavé práce a PharmDr. Lucii Novákové PhD. za odbornou konzultaci a vedení, poznatky a čas.*

## LITERATURA

1. Marins M., Henriques M., Azeredo J., Rocha S. M., Coimbra M. A., Oliveira R.: *Eucaryot. Cell* 6, 2429 (2007).
2. Hornby J. M., Kebaara B. W., Nickerson K. W.: *Anti-microb. Agents Chemother.* 47, 2366 (2003).
3. Semigh C. P., Hornby J. M., Dumitru R., Nickerson K. W., Harris S. D.: *Mol. Microbiol.* 59, 753 (2006).
4. Watanabe T., Yamamoto A., Magai S., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 825, 102 (1998).
5. Alem M. A. S., Oteef M. D. Y., Flowers T. H., Douglas L. J.: *Eucaryot. Cell* 5, 1770 (2006).

## PLNĚ AUTOMATIZOVANÁ IZOLACE CELKOVÉ mRNA Z *IN VITRO* KULTIVOVANÝCH ROSTLIN VE SPOJENÍ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

DALIBOR HÚSKA<sup>a</sup>, VOJTĚCH ADAM<sup>a,b</sup>, PETR BABULA<sup>c</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, <sup>b</sup> Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>c</sup> Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1-3, 612 42 Brno  
kizek@sci.muni.cz

### Úvod

Lidstvo na počátku 21. století řeší závažnou otázku spojenou se změnami klimatu a s tím souvisejícími závažnými globálními následky<sup>1</sup>. Organizace spojených národů na svém zasedání panelu věnovanému klimatické změně vyhlásilo jednoznačnou účast antropogenní činnosti (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), Fourth Assessment Report, 2007)<sup>2</sup>. Většina vlád světa panel klimatické změny přijala a zahájila programy směřující ke snížení emisí především skleníkových plynů. Nejvýznamnější roli v této oblasti mohou sehrát především programy trvalé udržitelnosti ve všech lidských činnostech. Do této oblasti je možné zařadit technologie využívající zelených rostlin pro zajištění výživy, zdraví a nebo ochrany prostředí. Bylo zjištěno, že rostliny jsou schopné z prostředí přijímat různé sloučeniny (organické i anorganické) v nezanedbatelných koncentracích a ty ukládat nebo přeměňovat. Rostliny vykazující takové vlastnosti byly označeny jako hyperakumulátory a staly se základním kamenem v technologických procesech označených jako fyto-remediace<sup>3</sup>. Většina takových rostlin však nevykazuje rychlý vzestup biomasy, ale je možné z těchto rostlin vyhledávat vhodné úseky DNA (geny) pro zavedení takových vlastností do rostlin kulturních<sup>4</sup>. Kulturní rostliny se vyznačují rychlým růstem biomasy a především s velmi dobře zvládnutou agrotechnikou. Kontaminované rostliny jsou následně uloženy na zabezpečených skládkách<sup>5</sup>. Nyní díky klimatické změně však mohou rostliny nastoupit jako technologie získávající průmyslově využitelné suroviny z prostředí za relativně nízkých energetických vstupů. V dohledné době se tak hyperakumulátory a geneticky upravené rostliny se značnou hyperakumulační schopností mohou stát „zelenými horníky“ při získávání zlata, stříbra, železa a dalších klíčových prvků z půd s jejich zvýšenými obsahy. Takové technologie budou vyžadovat řadu molekulárně-biologických úprav v genomech rostlin. Bude nezbytné jednotlivé geny nalézt, izolovat a následně také velmi pečlivě monitorovat. Expres vnesených genů je sledována na úrovni mRNA nebo výsledného proteinového produktu. Nejběžnější je sledování hladiny mRNA vět-

šinou pomocí technik využívající polymerázové řetězové reakce (PCR, nebo real time-PCR). Proto, abychom byli schopni takové detekce, je potřebné izolovat dostatečné množství nedegradované celkové mRNA s minimální kontaminací nežádoucími nukleovými kyselinami.

Cílem této práce bylo navrhnout plně automatizovanou izolaci celkové mRNA pomocí magnetizovatelných mikročastic z *in vitro* kultivovaných rostlin ve spojení s elektrochemickou detekcí na uhlíkových nanočásticích a na tištěných elektrodách.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Jednotlivé koncentrace poly(A) byly míchány ze zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  připraveného z lyofilizované poly(A) (0,5 mg  $\text{ml}^{-1}$ )  $M_r = 400\,000$  (Sigma-Aldrich, Česká republika). Oligonukleotidy byly syntetizovány společností Sigma-Aldrich a purifikovány pomocí HPLC. Koncentrace zásobních roztoků byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na přístroji Spekord 210 (Analytic Jena, Německo).

#### Pufry použité pro experimenty

a) fosfátový pufr: 0,1 M-NaCl + 50 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,2 M-NaCl + 100 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  
b) acetátový pufr: 0,2 M- $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0,2 M- $\text{CH}_3\text{COONa}$ .  
Ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma.

#### Magnetické mikročastice

Byly zakoupeny od společnosti INVITROGENE (Norsko). Povrch těchto mikročastic je upraven navázáním oligonukleotidové sekvence (dT)25. Velikost částic se pohybuje kolem  $2,80 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Další magnetické mikročastice byly zakoupeny od firmy ROCHE (Německo). O modifikaci povrchu mikročastic není nic známo s ohledem na patentovou ochranu společnosti ROCHE.

#### Tištěné elektrody

Byly vyrobeny na Ústavu mikroelektroniky Vysokého učení technického v Brně technikou sítotisku. Pracovní elektroda byla uhlíková, referentní stříbrná (Ag/AgCl) a pomocná uhlíková.

Na pracovišti Fyzikální elektroniky MU byly na povrch tištěných elektrod nanášeny uhlíkové nanotrubičky. Takové elektrody byly použity jako pracovní. Uhlíkové nanotrubičky byly syntetizovány v mikroplasmě ve směsi

argonu, vodíku a methanu. Železo a nikl byl použit jako katalyzátor. Teplota depozice byla kolem 970 K (cit.<sup>6</sup>).

#### Eliminační voltametrie

Metoda EVLS (eliminační voltametrie s lineárním skenem) byla uskutečněna pomocí programu EVLS z LSV (voltametrie s lineárním skenem) záznamů při různých rychlostech polarizace. Získané EVLS záznamy byly hodnoceny dle cit.<sup>8</sup>.

#### *In vitro* kultivace rostlin

Obilky kukuřice odrůdy Gila byly sterilizovány v roztoku 5% chlornanu sodného v prostředí sterilního flow-boxu. Poté byly omyty v destilované vodě. Následně byla každá takto připravená obilka umístěna do připravené skleněné zkumavky s médiem. Kultivační médium bylo připraveno podle postupu a složením uvedeného Murashigem a Skoogem<sup>7</sup> s přidávkem pevné složky, kterou tvořil gerlit. Do média byly přidány koncentrace kadmnatých iontů v podobě komplexu s EDTA v koncentracích (0, 5, 10, 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$ ). Takto připravené experimentální rostliny byly umístěny do kultivačního boxu (Sanyo) s 14 h osvětlením 80 luxů, teplotou vzduchu 22 °C a 60% vlhkostí vzduchu a 10 h tmy s teplotou vzduchu 18 °C a 60% vlhkostí. Všechny experimenty byly uskutečněny ve třech nezávislých opakováních. Použité chemikálie byly testovány pro explantátové kultury a byly zakoupeny od společnosti Duchefa (Nizozemí).

#### Měření fluorescence chlorofylu

Měření fluorescence chlorofylu bylo provedeno zařízením vyrobeným na Ústavu mikroelektroniky Vysokého učení technického v Brně. Pás světelných diod o vlnové délce 560 nm osvětluje terčík listu rostliny o ploše 50 mm<sup>2</sup>. Poté je detegován signál fluorescence chlorofylu. Získaný signál je zaznamenáván do PC pomocí řídicího a vyhodnocovacího programu.

#### Elektrochemická analýza na rtuťové elektrodě

Elektrochemické stanovení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE; s plochou kapky 0,4 mm<sup>2</sup>) jako pracovní elektrodou bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Holandsko), který byl napojený na VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla používána pracovní cela s tříelektrodovým zapojením. Referentní elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5,0). LSV parametry: počátek analýzy: 0 V, konec analýzy: -1,65 V, step potenciál: 5 mV, rychlost polarizace: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s<sup>-1</sup>.

#### Elektrochemická analýza na uhlíkové elektrodě

Elektrochemická analýza na uhlíkové pracovní elektrodě byla provedena na přístroji CH Instruments (USA), který byl tříelektrodově zapojen: referentní elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl, pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka a pracovní pastová uhlíková elektroda. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5,0). SWV (square wave voltametrie parametry): počátek analýzy: 0 V, konec analýzy: 1,5 V, frekvence 120 Hz, step potenciál: 5 mV.

#### Elektrochemická analýza na tištěných elektrodách

Elektrochemické měření pomocí tištěných elektrod (SPE, Screen Printed Electrodes) bylo provedeno na přístroji PalmSens (Holandsko) při aplikaci multikanálové analýzy. Pro všechny elektrochemické analýzy byl používán jako základní elektrolyt acetátový pufr pH 5. SWV parametry: počátek analýzy: 0 V, konec analýzy: 1,5 V, frekvence 50 Hz, step potenciál: 5 mV.

#### Postup izolace

Izolace poly(A) byla prováděna pomocí paramagnetických částic Dynabeads Oligo (dT)25 od firmy Dynal (Oslo, Norsko). Zachycení nukleových kyselin (polyA, ODN, mRNA) na paramagnetické částice spočívá v hybridizaci mezi řetězcem adeninu, kterým je tvořena poly(A) a řetězcem thyminu, který je ukotven na povrchu paramagnetických částic. Paramagnetické částice byly přitahovány pomocí magnetického stojanu MPC-S (Magnetic Particle Concentrator), který byl vyroben firmou Dynal Biotech ASA (Oslo, Norsko). Všechny experimenty s paramagnetickými částicemi byly prováděny za sterilních podmínek, které zajišťoval RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR (Biosan, Litva). Pro centrifugaci a třepání vzorků byla využita centrifuga multi-spin MSC-3000 (Biosan), která byla umístěna v RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR. Proces denaturace probíhal za konstantní teploty 85 °C za využití Thermomixer 5355 Comfort/ Compact (Eppendorf, Německo).

#### Plně automatická izolace technikou epMotions

Plně automatizovaná analýza byla provedena na pipetovací robotu epMotion 5075 (Eppendorf, Německo). Na pozici B4 je umístěn magnetický separátor (Promega). Pozice C1 a C4 jsou termostatovatelné (Eppendorf adapter PCR96). Přenos zabezpečuje robotické rameno s pipetovacími nástavci (TS50, TS300, TS1000) a přemisťovací gripper (TG-T). Vzorky jsou umístěny v pozici B3 v adaptéru Ep0.5/1.5/2ml. V pozici B1 je umístěn Module Reservoir, kde jsou k dispozici promývací roztoky a odpad. Zařízení je ovládáno mikroprocesorem a editace programové sekvence byla provedena v epEditoru 4.0. Špičky jsou umístěny v pozicích A4 (eTips 50), A3 (eTips 300) a A2 (eTips 1000). Jako pracovní jednotky byly používány PCR 96 destičky.

## Kapilární čipová elektroforéza

Kvalita izolované mRNA byla sledována za využití čipové kapilární elektroforézy na zařízení Experion (BioRad, USA). V analýze bylo využito RNASens Chips (BioRad, USA). Na čip se nanášely 2  $\mu\text{l}$  vzorku. Celý proces analýzy je řízen a kontrolován pomocí PC.

## Výsledky a diskuse

Trvale udržitelné získávání nerostných surovin za využití rostlin by mohlo přinést velmi zajímavé možnosti ve snížení emisí zvyšujících globální teplotu. Běžně se vyskytující rostliny nebudou schopny takové nároky uspokojit a je velmi pravděpodobné, že tyto rostliny budou geneticky upraveny s ohledem na zvýšení jejich průmyslového potenciálu. Za takovými cíli nesmí zaostat ani analytické techniky. Moderní analytické techniky musí být schopné monitorovat přítomnost takových genů (především jako specifické molekuly mRNA) jak z hlediska monitorování případného rizika, tak z hlediska zvyšování účinnosti. Takové nároky výrazným způsobem zvýší tlak na zabezpečení velkého počtu analýz při maximální opakovatelnosti celého analytického postupu s minimálními lidskými zásahy. Pro takové účely jsou vhodné plně automatizované robotické stanice a různé způsoby on-line nebo off-line napojení s detekčním systémem.

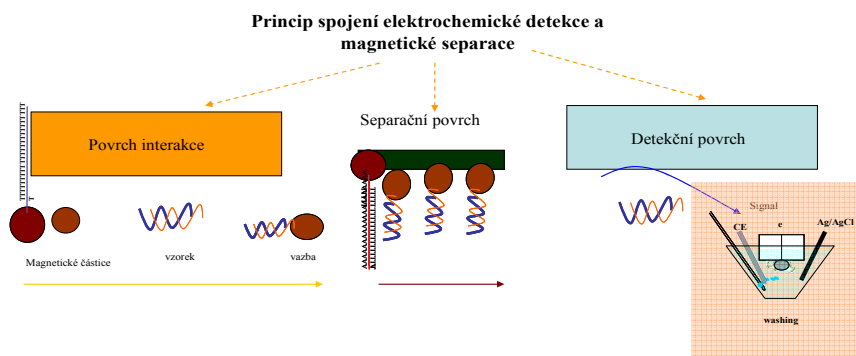
### Izolace mRNA za využití magnetických mikročásteček

Pro izolaci nukleových kyselin byly vypracovány různé postupy vycházející z odstranění interferujících proteinů a následného vysrážení alkoholem nebo ionty těžkých kovů. Klasická izolace vykazuje stále nejvyšší výtěžky nukleové kyseliny, ale je časově náročná a vnáší do postupu řadu systematických chyb způsobených lidským faktorem. Tento závažný problém je řešen několika různými způsoby, především za využití pevných sorbentů a nej-

nověji pomocí magnetizovatelných mini- a mikročásteček. Příprava magnetických mikročásteček pro poloautomatizovanou analýzu byla nedávno popsána v práci<sup>8</sup>. Zkráceně je možné postup shrnout do následujících kroků: ze zásobního roztoku se odebere 10  $\mu\text{l}$  mikročásteček do mikrozkušavky, která se přenesse do magnetického stojanu, přidá se 20  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku (0,1 M-NaCl + 50 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Následně se mikrozkušavka přesune ze stojanu a krátce protřepe v ruce tak, aby se paramagnetické částice rozptýlily v promývacím roztoku. Následuje série kroků za použití přístroje multispin MSC-3000, u kterého se střídá centrifugace a třepání. Oba procesy se 6krát opakují. Po odstranění zbylého promývacího roztoku se k paramagnetickým částicím přidá hybridizační roztok, který je složen z NaCl, fosfátového pufru a inhibičního roztoku. Celkový objem hybridizačního roztoku i se vzorkem byl 30  $\mu\text{l}$ . Hybridizace probíhala opět na přístroji multi-spin MSC-3000 po dobu 40 min. Po hybridizaci následovalo stejné promytí paramagnetických částic, které se opět 3krát opakovalo. Promytí paramagnetické částice s navázanou nukleovou kyselinou se umístily na Thermo-mixer 5355 a při teplotě 85 °C po dobu 5 min probíhala denaturace. Poté se paramagnetické částice přitáhly magnetickým stojanem a roztok obsahující pouze mRNA se odsál a přenesl do nové sterilní mikrozkušavky (obr. 1).

### Elektrochemická detekce mRNA na různých pracovních elektrodách

Izolovanou nukleovou kyselinou jsme analyzovali podle již optimalizovaného postupu technikou adsorptivního přenosu (5  $\mu\text{l}$  vzorku) při době akumulace 240 s. Byla sledována závislost elektrochemických signálů adeninu na době polarizace u poly(A) a ODN-A20, ODN-A25, ODN-A30 a ODN-A40 (5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) při rychlostech polarizace 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600  $\text{mV s}^{-1}$ . Na eliminačních voltamogramech studovaných nukleových kyselin byla jasně prokázána přítomnost typického signálu; pik-protipík (adsorbovaná částice) na povrchu pracovní elektrody<sup>9</sup>. Pozorované redukční signály adeninu byly velmi



Obr. 1. **Obrázek zachycení mRNA pomocí magnetických částic.** Interakce (probíhá interakce mezi magnetickou částicí a nukleovou kyselinou), separace (dochází k oddělení specificky zachycených molekul od ostatních), detekce (stanovení zachycené molekuly nukleové kyseliny)

dobře vyvinuté a symetrické. Jejich potenciál se měnil s rychlostí polarizace od pozitivnějších (kolem  $-1,395$  V při rychlosti polarizace  $25$  mV s $^{-1}$ ) do negativnějších (kolem  $-1,495$  V, při rychlosti polarizace  $600$  mV s $^{-1}$ ). Při vynesení závislosti výšky signálu ( $I_p$ ) na rychlosti polarizace ( $v$ ) byly získané závislosti lineární: polyA ( $R^2 = 0,991$ ), ODN-A20 ( $R^2 = 0,996$ ), ODN-A25 ( $R^2 = 0,994$ ), ODN-A30 ( $R^2 = 0,995$ ) a ODN-A40 ( $R^2 = 0,993$ ). Získané výsledky ukazují, že na povrchu pracovní elektrody probíhá difuzně řízená elektrodová reakce. Byly porovnány průměrné signály nukleových kyselin v elektrochemické nádobce a pomocí techniky adsorptivního přenosu. Signály v nádobce byly u všech studovaných nukleových kyselin signifikantně sníženy ( $t$ -test,  $P < 0,05$ ).

Studované molekuly byly, kromě detekce na HMDE, analyzovány také na tištěných uhlíkových elektrodách. Vzorek ( $3$   $\mu$ l) byl nanesen na povrch elektrody a následně akumulován po dobu  $240$  s. Poté byla SPE opláchnuta destilovanou vodou a probíhala elektrochemická analýza v acetátovém pufru (pH  $5,0$ ). Získané SWV signály adeninu byly pozorovány při průměrném potenciálu pro všechny studované molekuly  $+1,38 \pm 0,02$  V ( $n = 5$ ). Jedno elektrochemické čidlo (SPE) bylo možné pro stanovení nukleové kyseliny použít opakovaně. Pracovní elektroda byla po ukončení analýzy opláchnuta destilovanou vodou a pomocí jemné aluminy a vatového tamponu mechanicky obnoven povrch. Při deseti opakováních elektrochemické detekce polyA ( $30$   $\mu$ g ml $^{-1}$ ) byla relativní směrodatná odchylka stanovení  $8,8$  %. Výsledek naznačuje, že SPE je možné opakovaně použít při analýze nukleových kyselin. V dalším experimentu byly sledovány závislosti na koncentraci studovaných nukleových kyselin a byly charakterizovány rovnicemi přímek, jejichž korelační koeficient neklesl pod  $0,95$ . Limit detekce byl určen ředěním pro poly A:  $25$  ng ml $^{-1}$ ; ODN-A20:  $85$  ng ml $^{-1}$ ; ODN-A25:  $70$  ng ml $^{-1}$ ; ODN-A30:  $65$  ng ml $^{-1}$  a ODN-A40:  $50$  ng ml $^{-1}$ . Kromě použitého uhlíkového prášku k tisku pracovní elektrody byly vyzkoušeny také uhlíkové nanotrubičky jako indikační elektrody. Prozatím velkou technologickou nevýhodou uhlíkových nanotrubic je obtížnost jejich přípravy a případně definovaného růstu na určeném pracovním povrchu. Proto jsme měli k dispozici pouze omezený počet pracovních elektrod. Získané signály nukleových kyselin na uhlíkových elektrodách s uhlíkovými nanočásticemi byly v průměru o  $15$  % vyšší v porovnání se signály nukleových kyselin na SPE.

Vazba polyA na magnetické částice za použití poloautomatizovaného a plně automatizovaného způsobu izolace

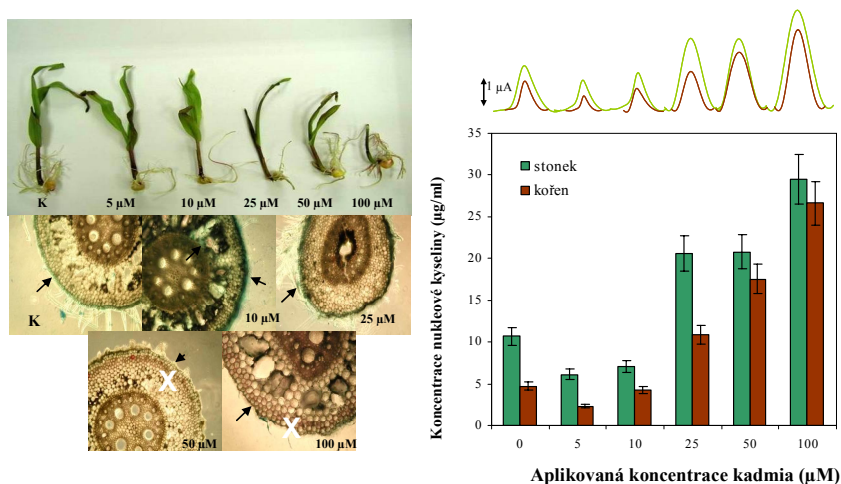
Manuální izolace nukleové kyseliny (polyA) je zatížena poměrně značnou experimentální chybou ( $7$  až  $10$  %), která je způsobena obtížným dodržováním časových bodů jak v průběhu promývacích, tak hybridizačních kroků. Experimentální chyba je snížena asi o  $1$ – $2$  % v případě, že je do experimentálního postupu zařazen ter-

moblok s časovačem, řízenou teplotou a intenzitou třepání. Pozorovaná účinnost separace se pohybuje kolem  $10$  až  $15$  % ve shodě s dříve publikovanými výsledky<sup>10</sup>. V případě, že do procesu přípravy je zařazen krok plně automatické přípravy magnetizovatelných částic, byla zvýšena účinnost separace polyA na  $30$  až  $55$  % s experimentální chybou stále kolem  $8$  %. Z výsledků je tedy zřejmé, že automatizační krok výrazným způsobem omezil chyby způsobené experimentátorem a umožnil tak zvýšit účinnost separace nukleové kyseliny<sup>11</sup>.

V dalších experimentech byla provedena plně automatická izolace polyA za využití robotického zařízení. Pro naše účely byla navržena následující pracovní sekvence: magnetizovatelné mikročástice ( $10$   $\mu$ l) se transportují do PCR destičky, promývací cyklus  $3$ krát ( $50$   $\mu$ l), přidání vzorku (polyA) ( $10$   $\mu$ l) a hybridizační roztok ( $30$   $\mu$ l), hybridizace  $15$  min,  $25$  °C, promytí  $3$ krát ( $50$   $\mu$ l). Následuje přenos PCR destičky na termostátovanou pozici, kde probíhá denaturace navázaného řetězce nukleové kyseliny. Účinnost separace polyA ( $25$   $\mu$ g ml $^{-1}$ ) se pohybovala kolem  $40$  % a experimentální chyba byla  $6,5$  % ( $n = 10$ ). Plně automatický postup přináší časovou úsporu pracovníka a především snižuje experimentální chybu. Mezi technické problémy, které jsou stále spojené s využitím tohoto postupu, je odpařování analyzovaného vzorku. Za využití plně automatické techniky byla sledována vazba polyA na DBT a ROCHE magnetické částice. Na DBT mikročástice byly nukleové kyseliny vázány s výtěžkem průměrně  $45$  %. Navíc bylo možné sledovat rostoucí trend elektrochemického signálu v závislosti na délce řetězce (směrnice rovnice přímky  $a = 16,5$ ). V případě magnetických mikročástic ROCHE byla výtěžnost průměrně  $25$  %. Pozorovaný elektrochemický signál nerostl s ohledem na délku řetězce zachyceného ODN.

#### *In vitro* kultivované rostliny kukuřice

Rostliny kukuřice byly vystaveny abiotickému stresu způsobenému kadmiovými ionty. Z růstové charakteristiky je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací kadmiových iontů a dobou kultivace byl růst rostlin více inhibován. Nejvýraznější změny v růstu byly pozorovány u aplikované koncentrace  $50$   $\mu$ M. U těchto rostlin byly pozorovatelné maximálně  $1$ – $2$  převážně zmenšené listy na konci experimentu. U kontrolní varianty byly zaznamenány dobře vyvinuté  $4$  až  $5$  listy. Histochemicky byly sledovány změny v pletivech.  $K_3[Fe(CN)_6]$  je v pletivech redukován látkami s volnými  $-SH$  skupinami na modře zbarvené redukční produkty (šipky, obr. 2). U kontrolních rostlin byla přítomnost látek s volnými  $-SH$  skupinami omezena pouze na rhizodermis. Vyšší syntéza látek s  $-SH$  skupinami byla pozorována v případě  $10$   $\mu$ M koncentrace Cd(II). Naopak téměř žádné látky s volnými  $-SH$  skupinami nebyly prokázány u dvou nejvyšších koncentrací kadmia. Zde bylo pozorováno, že v buňkách mezodermis docházelo k syntéze červeně zbarvených látek (označeno X), tj. látek ze skupiny polyfenolů s výraznými antioxidačními vlastnost-



Obr. 2. Fotografie explantátové kultury kukuřice vystavené kadmennatým iontům. Srovnání anatomických změn v kořenech. LSV elektrochemické záznamy signálů mRNA izolované přímo z pletiv *in vitro* kultivovaných rostlin. Hladina mRNA detegovaná v pátý den experimentu

mi (obr. 2). Změny ve fluorescenci chlorofylu mohou být považovány za jasné fyziologické ukazatele stresu u rostlin. Rostliny vystavené abiotickému stresu jsou nuceny zvýšit syntézu různých biologicky aktivních molekul, jako jsou sloučeniny obsahující volné –SH skupiny (glutathion, fytochelatin, metalothionein podobné proteiny). Řada takových molekul je syntetizována chemickou reakcí, avšak enzymy účastníci se těchto reakcí jsou genově regulovány. Z těchto příčin je možné pozorovat zvýšenou expresi určité skupiny genů, které povedou k nárůstu hladiny celkové mRNA (transkriptomu) v rostlinách. U všech analyzovaných vzorků byla získána mRNA pomocí magnetizovatelných mikročastic, která se analyzovala jak na HMDE, tak na SPE. Přítomnost a kvalita získané mRNA byla ověřena na kapilární elektroforéze. Na získaných voltametrických záznamech byly pozorovány dobře rozlišené píky při potenciálu kolem  $-1,5$  V. Množství izolované mRNA se pohybovalo od 10 do 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  po jejich přepočtu na polyA. V takto velmi dobře charakterizované mRNA je možné hledat specifickou sekvenci konkrétního genu. V oblasti stresové reakce na kadmennaté ionty u rostlin jsou to geny spojené s aktivitou thiolových sloučenin (glutathionu a fytochelatinu).

## Závěr

Izolace a detekce nukleových kyselin bude hrát stále významnější roli v oblasti trvale udržitelných průmyslově využitelných technologií.

Prezentované výsledky bylo možné získat za podpory projektu: FRVŠ A GA AV KAN208130801.

## LITERATURA

- Abbott A.: Nature 374, 584 (1995).
- Rosenzweig C., Karoly D., Vicarelli M., Neofotis P., Wu Q., Casassa G., Menzel A., Root T. L., Estrella N., Seguin B., Tryjanowski P., Liu C., Rawlins S., Imeson A.: Nature 453, 353 (2008).
- Salt D., Smith R., Raskin I.: Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 49, 643 (1998).
- M. C., Feng X., Feng X., He Y., Liang D., Marton L.: Environ. Geochem. Health 28, 103 (2006).
- Supalkova V., Huska D., Diopan V., Hanustiak P., Zitka O., Stejskal K., Baloun J., Pikula J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Beklova M., Kizek R.: Sensors 7, 932 (2007).
- Jasek O., Elias M., Zajickova L., Kudrle V., Bublan M., Matejkova J., Rek A., Bursik J., Kadlecikova M.: Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Supramol. Syst. 26, 1189 (2005).
- Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A., Vasil I. K.: In Vitro-J. Tiss. Cult. Assoc. 12, 473 (1976).
- Huska D., Adam V., Kizek R.: Talanta, odesláno 2008.
- Trnkova L., Kizek R., Dracka O.: Electroanalysis 12, 905 (2000).
- Palecek E., Billova S., Havran L., Kizek R., Miculko-va A., Jelen F.: Talanta 56, 919 (2002).
- Huska D., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Prusa R., Havel L., Kizek R.: Tumor Biology 28, 124 (2007).

## SCREENING DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH PURINOVÉ *DE NOVO* SYNTÉZY

HANA KRÄTSCHMEROVÁ<sup>a,b</sup>, PETRA VYSKOČILOVÁ<sup>b</sup> a TOMÁŠ ADAM<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc,

<sup>b</sup> Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice v Olomouci, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc  
kratschmerovah@email.cz

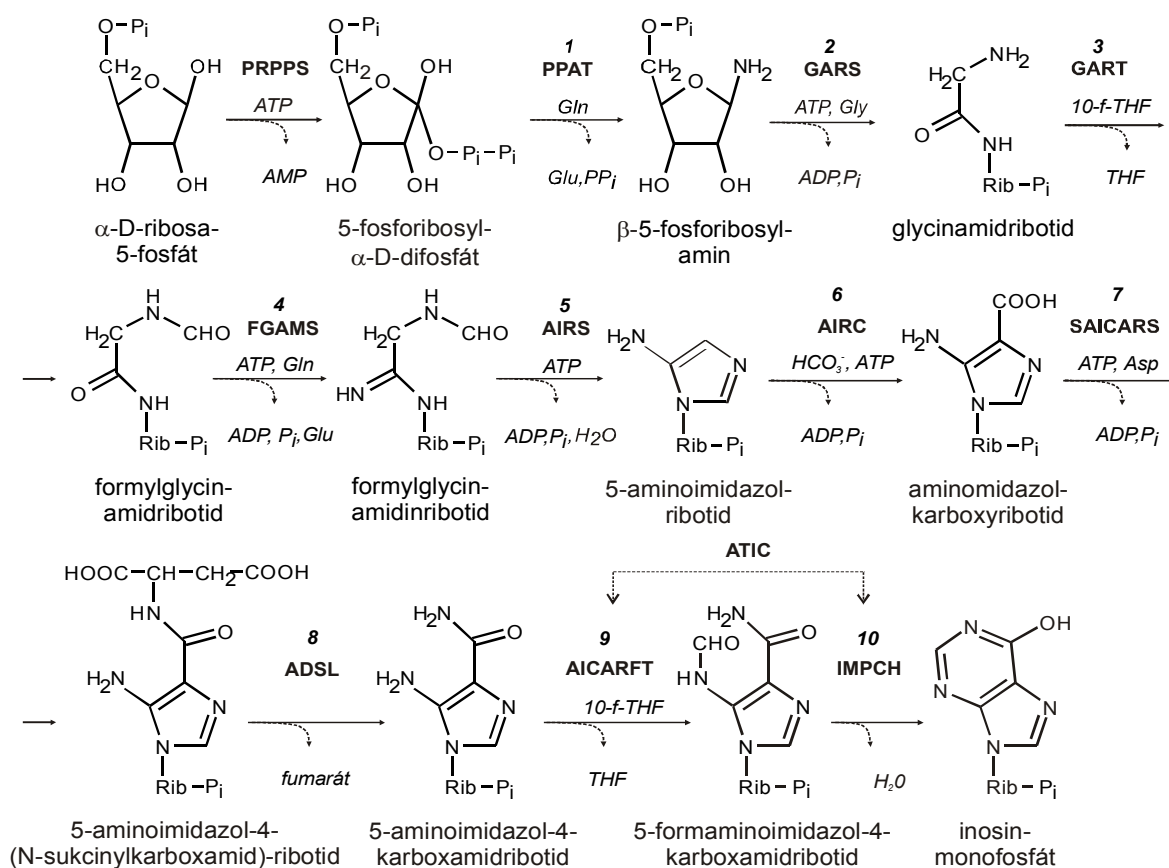
### Úvod

Purinové nukleotidy jsou v buněčném metabolismu velmi důležité. Jsou syntetizovány *de novo* (obr. 1) nebo prostřednictvím záchranných drah.

Dosud byly popsány pouze genetické dysfunkce tří enzymů purinové *de novo* syntézy (PDNS) – superkaktivita/deficit fosforibosyldifosfátsynthetasy<sup>1–3</sup>, deficit adenylosukcinát-lyasy<sup>4</sup> a AICA-ribosidurie<sup>5</sup>. Enzymové deficity jsou charakterizovány abnormální koncentrací substrátů v buňce a jejich následným vyloučením do tělních tekutin v defosforylované formě (ve formě ribosidů).

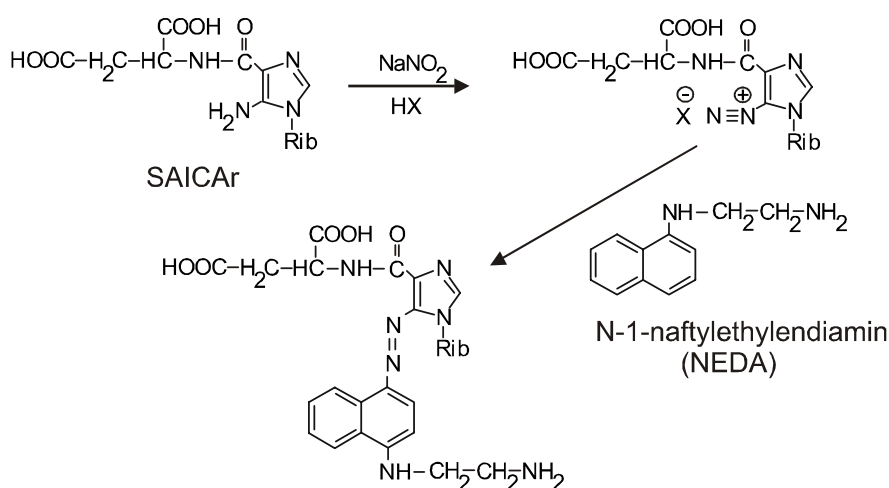
S rozvojem dostupnosti léčby metabolických poruch v poslední době (genová terapie, terapie enzymovou náhradou) se zvyšuje rozsah novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch. Pro vysoký průstup vzorků (1 vzorek/4 min), automatizovatelnost a relativní ekonomickou přijatelnost je v současnosti nejpožívanější technikou tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)<sup>6</sup>.

Vzhledem k výjimečné struktuře aminoimidazolribosidů může být absorpční spektrometrie k jejich stanovení



Obr. 1. Purinová *de novo* syntéza; PRPPS – fosforibosyldifosfátsynthetasa, PPAT – amidofosforibosyltransferasa, GARS – glycylamidoribonukleotid-synthetasa, GART – glycylamidoribonukleotidtransformylasa, FGAMS – fosforibosylformylglycylamidinsynthetasa, AIRS – fosforibosylaminoimidazolsynthetasa, AIRC – fosforibosylaminoimidazolkarboxylasa, SAICARS – fosforibosylaminoimidazolsukcinkarboxamidsynthetasa, ADSL – adenylosukcinátlyasa, AICARFT – fosforibosylaminoimidazolkarboxamid-formyltransferasa, IMPCH – inosinmonofosfátcyklohydrolasa





Obr. 2. Schéma Brattonovy-Marshallovy reakce

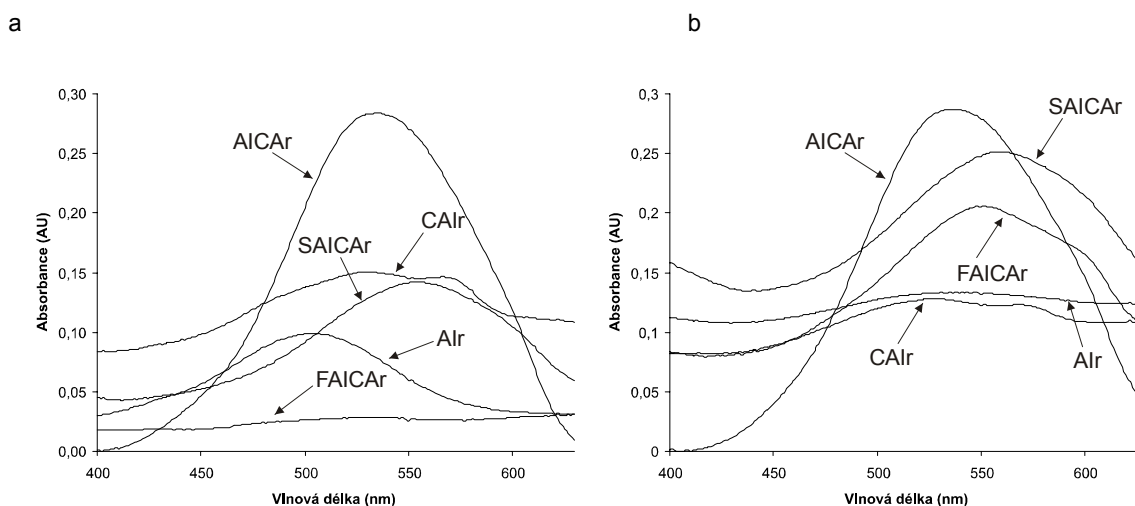
po derivatizaci vhodnou alternativou. Tato technika má velmi vysoký průstup vzorků (1 vzorek/15 s), lze ji robotizovat a je velice ekonomicky výhodná.

Cílem práce bylo vyvinout jednoduchou a ekonomicky efektivní screeningovou fotometrickou metodu pro stanovení všech ribosidů druhé poloviny PDNS v moči. Protože všechny ribosidy (kromě FAICAr) mají primární aminoskupinu na aromatickém jádře, mohla se pro jejich stanovení uplatnit Brattonova-Marshallova reakce<sup>7</sup> (obr. 2). Principem je tvorba diazoniové soli, která podléhá kopulační reakci s *N*-1-nafylethyldiaminem.

## Experimentální část

### Chemikálie

Při této studii byly použity defosforylované meziprodukty (ribosidy) druhé části PDNS a sulfonamidy (možné interference). 5-Aminoimidazol-4-karboxamidribosid (AICAr) byl zakoupen u firmy Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Kanada). 5-Formaminoimidazol-4-karboxamidribosid (FAICAr), aminoimidazolkarboxyribosid (CAIr) a 5-aminoimidazolribosid (Alr) byly připraveny, jak bylo popsáno dříve<sup>8</sup>. 5-Aminoimidazol-4-(*N*-sukcinylnkarboxamid)ribosid (SAICAr) byl obdržen od Dr. Marie Zikánové<sup>9</sup> (Ústav dědičných metabolických poruch v Praze, Všeobecná fakultní nemocnice Praha).



Obr. 3. Absorpční spektra azobarviv jednotlivých ribosidů, A – bez kyselé hydrolyzy, B – s kyselou hydrolyzou

Tabulka I  
Absorpční maxima produktů Brattonovy-Marshallovy reakce

Stanovovaný ribosid	$\lambda_{\max}$ [nm]	
	bez kyselého hydrolyzy	s kyselou hydrolyzou
AIr	500	–
CAIr	530/570	530/570
SAICAr	555	560
AICAr	540	540
FAICAr	–	550

### Pacienti

Byly analyzovány vzorky močí od dětí vyšetřovaných pro podezření na dědičnou metabolickou poruchu a vzorky močí od pacientů s molekulárně biologicky prokázaným deficitem ADSL.

### Postup

Po kyselém hydrolyze (1 hodina v 1,5 M-HCl; konverze FAICAr na AICAr) byly vzorky neutralizovány a poté inkubovány 30 min s acetanhydridem (zabránění interference sulfonamidů – acetylace jejich aminoskupin). Poté následovala inkubace na ledu a postupné přidávání 4 M-HCl, 0,1 % NaNO<sub>2</sub>, 0,5 % amidosulfonanu amonného a 0,1 % N-1-naftylethylendiaminu (NEDA). Absorbance vzniklé azosloučeniny byla spektrofotometricky stanovena při 530 nm na mikrotitrační destičce pomocí multifunkčního modulární readeru (Infinite 200, Tecan, Švýcarsko).

### Výsledky a diskuse

Protože AIr je v 1,5 M-HCl nestabilní, musí být součástí metody dva různé postupy – bez a s předchozí kyselou hydrolyzou (obr. 3).

Metoda umožňuje stanovení všech ribosidů v rozsahu linearity 40–500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ( $R^2 > 0,99$ ) s limitem detekce nižším než 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . U 300 vzorků močí nebyly pozorovány žádné interference. V případě pozitivního výsledku je možné rozlišit jednotlivé ribosidy podle jejich absorpčního spektra v rozsahu vlnových délek 400–630 nm (obr. 3, tab. I).

Všechny ribosidy byly stanoveny v simulovaných reálných vzorcích (přídavek ribosidů do vzorků močí),

SAICAr byl též stanoven přímo ve vzorcích močí pacientů s prokázaným deficitem adenylosukcinátlyasy.

### Závěr

Námi popsanou metodou mohou být stanoveny všechny ribosidy druhé poloviny PDNS. Metoda je velmi jednoduchá na provedení (může být plně robotizována), o řád rychlejší než MS/MS a ekonomicky velmi výhodná. Může být tedy uplatněna jako jednoduchý screeningový test pro již existující či dosud nepopsané enzymové defekty druhé části PDNS. Pro potvrzení jednotlivých poruch pak může sloužit např. HPLC/MS<sup>10</sup> či kapilární elektroforesa<sup>11</sup>.

### LITERATURA

1. Sperling O., Boer P., Persky-Brosh S., Kanarek E., de Vries A.: *Rev Eur. Etud. Clin. Biol.* 17, 703 (1972).
2. de Brouwer A. P., Williams K. L., Duley J. A., van Kuilenburg A. B., Nabuurs S. B., Egmont-Petersen M., Lugtenberg D., Zoetekouw L., Banning M. J., Roeffen M., Hamel B. C., Weaving L., Ouvrier R. A., Donald J. A., Wevers R. A., Christodoulou J., van Bokhoven H.: *Am. J. Hum. Genet.* 81, 507 (2007).
3. Kim H. J., Sohn K. M., Shy M. E., Krajewski K. M., Hwang M., Park J. H., Jang S. Y., Won H. H., Choi B. O., Hong S. H., Kim B. J., Suh Y. L., Ki C. S., Lee S. Y., Kim S. H., Kim J. W.: *Am. J. Hum. Genet.* 81, 552 (2007).
4. Jaeken J., Van den Berghe G.: *Lancet* 2, 1058 (1984).
5. Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., Van den Berghe G., Vincent M. F.: *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1276 (2004).
6. Wilcken B., Wiley V.: *Pathology* 40, 104 (2008).
7. Laikind P. K., Seegmiller J. E., Gruber H. E.: *Anal. Biochem.* 156, 81 (1986).
8. Vyskočilová P., Hornik P., Friedecký D., Fryčák P., Lemr K., Adam T.: *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 25, 1237 (2006).
9. Zikánová M., Krijt J., Hartmannová H., Kmoch S.: *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 493 (2005).
10. Hartmann S., Okun J. G., Schmidt C., Langhans C. D., Garbade S. F., Burgard P., Haas D., Sass J. O., Nyhan W. L., Hoffmann G. F.: *Clin. Chem.* 52, 1127 (2006).
11. Adam T., Friedecký D., Fairbanks L. D., Sevcík J., Barták P.: *Clin. Chem.* 45, 2086 (1999).

## HPLC-ED AMINOBIFENYLŮ POMOCÍ BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

LUCIE MAIXNEROVÁ<sup>a</sup>, KAROLINA PECKOVÁ<sup>b</sup> a JIŘÍ BAREK<sup>b</sup>

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, <sup>a</sup> Katedra učitelství a didaktiky chemie, <sup>b</sup> Katedra analytické chemie  
maixner1@natur.cuni.cz

### Úvod

Aminoderiváty bifenyly jsou toxické při vdechování, styku s kůží a při požití, hrozí nebezpečím kumulativních účinků, jsou škodlivé pro vodní organismy a mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí<sup>1</sup>. Současně představují metabolity dalších genotoxických polutantů – nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH)<sup>2</sup> a tudíž mohou sloužit jako biomarkery míry expozice těmto nebezpečným látkám<sup>3</sup>. Proto neustále roste poptávka po stanovení těchto genotoxických látek v nejrůznějších matricích.

Elektrochemická detekce (ED) získala od svého zavedení v průtokových metodách v sedmdesátých letech minulého století nezastupitelné místo mezi ostatními detekčními metodami<sup>4</sup>, podpořené v posledních deseti letech zájmem o miniaturizované detekční systémy<sup>5</sup>. Největší uplatnění nacházejí materiály obsahující různé formy uhlíku (skelný uhlík, uhlíková vlákna, porézní grafit, modifikované uhlíkové pasty a inkousty) a platiny zlata a stříbra, které jsou zpravidla používány v komerčně dostupných přístrojích.

Extrakce patří mezi separační metody, které jsou založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází. V extrakci tuhou fází v dynamickém uspořádání je tuhý sorbent v extrakční koloně proléván roztokem vzorku. V analytické chemii se extrakce tuhou fází využívá zejména k prekoncentraci a předběžné separaci látek<sup>6</sup>.

Velkou oblibu v posledních dvou desetiletích si v elektroanalytické chemii získaly borem dopované diamantové filmy (BDDF). K výhodným vlastnostem těchto filmů patří mechanická a chemická stabilita, malá náchylnost k pasivaci, široké potenciálové okno, nízký zbytkový proud a biokompatibilita<sup>7</sup>.

Cílem této práce bylo stanovení 2-aminobifenyly (2-AB), 3-aminobifenyly (3-AB) a 4-aminobifenyly (4-AB) v modelových vzorcích pitné a říční vody metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) v tenkovrstvé cele pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody (BDDFE) a nalezení vhodných podmínek pro jejich předběžnou separaci a prekoncentraci pomocí extrakce na tuhou fází.

### Experimentální část

Zásobní roztoky 2-AB (Sigma-Aldrich, 97%), 3-AB (Katedra organické chemie PŘF UK) a 4-AB (Sigma-Aldrich, 97%) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v 250 ml deionizované vody (Milli-Q plus system, Millipore, USA) za pomoci ultrazvuku. Dále byly použity tyto chemikálie čistoty p.a.: Kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice), hydroxid sodný (Lach-Ner, Neratovice), kyselina fosforečná (Lach-Ner, Neratovice), aceton (Lach-Ner, Neratovice), diethylether (Lachema, Neratovice), ethylester kyseliny octové (Lachema, Brno), kyselina chlorovodíková (Lachema, Neratovice). Methanol a acetonitril v chromatografické čistotě dodal Merck, Praha. Octanový tlumivý roztok o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> a pH 5,0 byl připraven smísením 0,577 ml 99% kyseliny octové s 900 ml deionizované vody. pH vzniklého roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,0 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,2 mol l<sup>-1</sup>. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l. Fosfátový tlumivý roztok o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> a pH 1,5 byl připraven smísením 0,068 ml 85% kyseliny fosforečné s 90 ml deionizované vody. pH vzniklého roztoku bylo upraveno na hodnotu 1,5 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a doplněno deionizovanou vodou na 100 ml. Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

HPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu ve složení: gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrofotometrický UV/VIS detektor L-7400, řídicí jednotka D-7000 (vše Merck-Hitachi, Německo). Obsluhu systému, sběr a vyhodnocení dat zajišťoval osobní počítač s programem HSM (Merck-Hitachi, Německo) pracující v operačním systému MS Windows NT. Pro HPLC separaci aminobifenyly byla použita kolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, Německo) s kovalentně vázaným β-cyklohextrinem a předkolonka LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (4 × 4 mm, 5 μm, Merck, Německo). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována. Používané mobilní fáze byly odvodušňovány ultrazvukem. Spektrofotometrický UV/VIS detektor byl stabilně nastaven na 290 nm (cit.<sup>8</sup>). Tenkovrstvý ampérometrický detektor pracující v tříelektrodovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byla BDDFE, byl sériově zapojen za výstup ze spektrofotometrického UV/VIS detektoru. Pracovní potenciál, tj. potenciál vkládaný na pracovní elektrodu, při kterém dosahuje poměr signálu k šumu maximální hodnoty, byl +1,2 V (převzato z práce Jandové<sup>9</sup>). Byl použit potenciostat ADLC 2 (Laboratorní přístroje, ČR).

Pracovní elektroda byla poskytnuta prof. G. M. Swainem (Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA). Jednalo se o borem dopovaný mikrokrystalický diamantový film připravený technikou CVD ze směsi methanu, vodíku a diboranu. Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová referenční elektroda typu 66-EE009 (Cypress Systems, Chelmsword, USA). Použitá tenkovrstvá detekční cela se skládá se ze dvou polychlorotrifluoroethylenových (Kel-F) částí. V horní jsou vyvrtány tři otvory – pro vstup a výstup mobilní fáze a pro umístění referenční elektrody. Pomocnou elektrodu představuje 6 cm dlouhá kapilára z nerezové oceli sloužící zároveň pro výstup mobilní fáze z kolony. Na spodním dílu je uložen měděný plíšek zajišťující elektrický kontakt a pracovní elektroda. Oddělení pracovní elektrody od horního dílu je zajištěno 0,1 cm silným těsněním z Vitonu® (GÜSCHU – těsnící technika, ČR). Předpokládáme-li 25% stlačení Vitonu® při utažení šroubu, pak by objem detekční cely měl být 10  $\mu\text{l}$ .

Extrakce tuhou fází byla prováděna na kolonách Li-Chrolut®EN (Merck, Německo, objem 6 ml, 500 mg sorbentu divinilbenzenu a ethylvinylbenzenu) za použití vzduchové vývěvy a dvanáctimístného extrakčního manifoldu.

Používaná mobilní fáze byla připravována smísením 40 objemových dílů 0,01 mol  $\text{l}^{-1}$  octanového pufru o pH 5,0, 30 dílů methanolu a 30 dílů acetonitrilu<sup>9</sup>. Před měřením byla mobilní fáze 10 min odvzdušňována ultrazvukem a dále 10 min probublávána heliem. Po každém dni měření byl podle doporučení dodavatele kolony celý systém minimálně 15 min promýván směsí methanolu, acetonitrilu a deionizované vody v poměru 30:30:40 (v/v/v), čímž došlo k vymytí pufru ze systému.

Při přímém stanovení aminobifenyly v pitné a říční vodě byly modelové vzorky připraveny tak, že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobních roztoků 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a doplněno na 10 ml pitnou, nebo říční vodou. Říční voda byla před HPLC přefiltrována.

Při extrakci 2-AB, 3-AB a 4-AB z pitné a říční vody byla příprava vzorků, aktivace extrakčních kolonek (LiChrolut®EN) a dávkování vzorku prováděna dle postupu uvedeného výrobcem pro stanovení anilinu<sup>10</sup>. pH vzorků bylo upraveno před extrakcí na hodnotu 9,0 roztokem 0,2 M-NaOH. Byla provedena aktivace kolony jejím

postupným promytím 3 ml ethylacetátu, 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody. Následně bylo na kolonku naneseno 100 ml analyzovaného vzorku a prosáto rychlostí 2 ml  $\text{min}^{-1}$ . Poté byla kolonka promyta 1 ml destilované vody sloužící k vymytí nežádoucích příměsí a 1 min vysušována vzduchem. Zachycené analyty byly eluovány 10 ml diethyletheru. Eluát byl následně odpařen odfoukáním dusíkem, k odparku přidán 1,0 ml mobilní fáze obsahující směs methanolu, acetonitrilu a octanového pufru o koncentraci 0,01 mol  $\text{l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v) a tento roztok byl dávkován do HPLC systému. Tento typ eluce byl použit pro proměření kalibračních závislostí pro vzorky pitné a říční vody. Výtěžek extrakce byl vždy vyhodnocován jako poměr výšky analytu  $I_{\text{px}}$  k výšce píku  $I_{\text{p}^0}$  získaného přidávkem potřebného objemu standardního roztoku k roztoku po extrakci slepého vzorku. Slepý vzorek byl vždy podrobován stejným extrakčním postupům jako modelové vzorky říční a pitné vody. Meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byly stanovovány jako koncentrace analytů poskytující signál odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

## Výsledky a diskuse

### Přímé stanovení v pitné vodě

Přímým stanovením metodou HPLC-ED v pitné vodě byly získány kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB a 4-AB v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . Kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném rozsahu, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce I.

Pro přímé stanovení aminobifenyly v pitné vodě byla také sledována reprodukovatelnost odezvy detektoru s BDDFE v šesti jednotlivých dnech v průběhu dvou měsíců. 7% relativní směrodatná odchylka pro proudové pozadí a maximálně 20% relativní směrodatná odchylka pro odezvu detektoru na studované analyty svědčí o dostatečné stálosti odezvy elektrochemického detektoru při jeho dlouhodobém používání. Opakovatelnost odezvy detektoru (sedm po sobě následujících dávkování) pro 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$  je  $< 2,9\%$ .

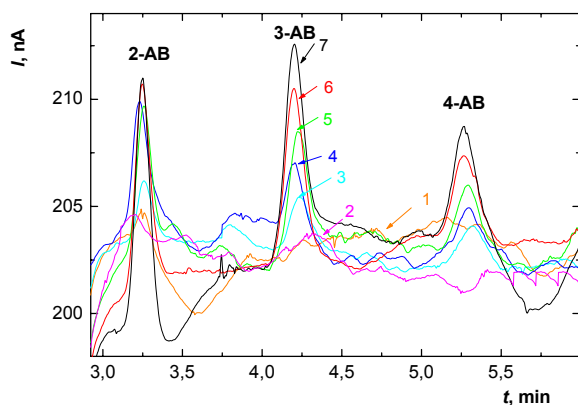
Tabulka I

Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z výšek píků při přímém stanovení v pitné vodě. Měreno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze: methanol: acetonitril: octanový pufr o koncentraci 0,01 mol  $\text{l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

Látka	LDR [mol $\text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [mA mol $^{-1}$ l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol $\text{l}^{-1}$ ]
2-AB	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$12,7 \pm 0,2$	$-0,1 \pm 0,8$	0,9992	$2,1 \cdot 10^{-7}$
3-AB	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,4$	0,9996	$3,0 \cdot 10^{-7}$
4-AB	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,4$	0,9988	$6,2 \cdot 10^{-7}$

## Přímé stanovení v říční vodě

Přímým stanovením metodou HPLC-ED v říční vodě byly obdobně jako v pitné vodě získány kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> a 4-AB v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>. Kalibrační přímky byly opět lineární v celém rozsahu, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. II. Získané chromatogramy jsou pro ilustraci na obr. 1.



Obr. 1. Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB při přímém stanovení v říční vodě;  $c$ : 0 (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6),  $1 \cdot 10^{-6}$  (7) mol l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0$  ml s<sup>-1</sup>,  $E_{det} = +1,2$  V, mobilní fáze: methanol: acetonitril: octanový pufr o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

## Tabulka II

Parametry kalibračních závislostí 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z výšek piků při přímém stanovení v říční vodě. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0$  ml s<sup>-1</sup>,  $E_{det} = +1,2$  V, mobilní fáze: methanol: acetonitril: octanový pufr o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

Analyt	LDR [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$12,8 \pm 0,2$	$-0,7 \pm 0,7$	0,9993	$2,1 \cdot 10^{-7}$
3-AB	$1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$9,7 \pm 0,1$	$-0,4 \pm 0,4$	0,9996	$2,8 \cdot 10^{-7}$
4-AB	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	0,9996	$5,5 \cdot 10^{-7}$

## Tabulka III

Výtěžek a opakovatelnost extrakce 2-AB a 4-AB ( $c = 1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>) ze 100 ml pitné vody vyhodnocovaný jako poměr  $I_{px}/I_p^0$ , kde  $I_p^0$  je výška piků standardu ( $c = 1 \cdot 10^5$  mol l<sup>-1</sup>) a  $I_{px}$  je výška piků po extrakci. Eluční činidlo: diethylether,  $V_{e.č.} = 10$  ml

Analyt	$I_p^0$ [nA]	$I_{px}$ [nA]	$I_{px}/I_p^0$ [%]	$s$ [%]	$s_r$ [%]
2-AB	88,9	61,3	69,0	4,0	5,8
4-AB	37,5	24,0	63,9	11,6	18,1

Stanovení aminoderivatů bifenyly v pitné a říční vodě metodou HPLC s elektrochemickou detekcí s využitím extrakce tuhou fází

## Nalezení optimálních extrakčních podmínek

Ke stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné a říční vodě s využitím extrakce tuhou fází je nutné nalézt optimální extrakční podmínky, tj. především vhodnou tuhou fází a eluční činidlo. Jako tuhá fáze byl zvolen sorbent kolonek LiChrolut®EN obsahující kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu.

Při volbě elučního činidla byly testovány následující rozpouštědla: methanol : acetonitril : aceton (50:50:1), acetonitril : 0,01 mol l<sup>-1</sup> fosfátový pufr pH 1,5 (1:1), diethylether.

Nejlépe se osvědčil diethylether. Ten byl pro extrakci zvolen i pro jeho snadné odpaření umožňující vysokou koncentraci stanovených látek.

Při eluci 10,0 ml diethyletheru bylo dosaženo pro oba analyty ~70 % výtěžku, další zvyšování elučního objemu by nebylo účelné. Opakovatelnost tohoto stanovení pro 10,0 ml diethyletheru byla testována analýzou čtyř modelových vzorků pitné vody obsahující 2-AB a 4-AB ( $c = 1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>). Výsledky jsou shrnuty v tab. III.

Z výsledků vyplývá, že výtěžek se pro 2-AB i 4-AB blíží 70 %. Vzhledem k uspokojivému výtěžku a vysoké koncentraci analytů umožněné odpařením eluátu byl tento extrakční postup zvolen pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve vzorcích pitné a říční vody.

Stanovení aminobifenyly v pitné vodě metodou HPLC-ED s využitím extrakce tuhou fází

Pro stanovení aminobifenyly v pitné vodě metodou HPLC-ED s využitím extrakce tuhou fází byl použit čtvrtý

Tabulka IV

Parametry kalibračních závislostí vyhodnocené z výšek pík při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné vodě s využitím extrakce tuhou fází. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze: methanol: acetonitril: octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v), elučňi činidlo: diethylether,  $V_{\text{e.č.}} = 10 \text{ ml}$

Analyt	LDR [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [A mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$5,0 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,78 \pm 0,04$	$-4,1 \pm 1,9$	0,9925	$3,4 \cdot 10^{-9}$
3-AB	$7,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,62 \pm 0,05$	$-5,2 \pm 2,5$	0,9851	$4,4 \cdot 10^{-9}$
4-AB	$7,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,25 \pm 0,02$	$-2,1 \pm 1,0$	0,9849	$1,1 \cdot 10^{-8}$

Tabulka V

Parametry kalibračních závislostí vyhodnocené z výšek pík při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v říční vodě s využitím extrakce tuhou fází. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze: methanol: acetonitril: octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v), elučňi činidlo: diethylether,  $V_{\text{e.č.}} = 10 \text{ ml}$

Analyt	LDR [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [A mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$2,5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,32 \pm 0,04$	$-1,0 \pm 2,5$	0,9869	$8,4 \cdot 10^{-9}$
3-AB	$2,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,20 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,3$	0,9985	$1,3 \cdot 10^{-8}$
4-AB	$5,0 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	$0,16 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,4$	0,9953	$1,7 \cdot 10^{-8}$

Tabulka VI

Meze stanovitelnosti  $L_Q$  pro 2-AB, 3-AB a 4-AB pro přímé stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné a říční vodě a pro stanovení těchto analytů po extrakci tuhou fází s využitím diethyletheru jako elučňiho činidla

Analyt	Meze stanovitelnosti $L_Q$ [mol l <sup>-1</sup> ]				
	přímé stanovení			extrakce tuhou fází	
	destilovaná voda <sup>a</sup>	pitná voda	říční voda	pitná voda	říční voda
2-AB	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-9}$
3-AB	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8}$
4-AB	$5 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$

<sup>a</sup> Hodnoty převzaty z práce<sup>9</sup>

typ eluce diethyletherem a jeho následné odpaření. Byly získány kalibrační závislosti 2-AB v koncentračním rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , 3-AB a 4-AB v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Získané závislosti jsou lineární v celém rozsahu, parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v tab. IV.

Stanovení aminobifenylů v říční vodě metodou HPLC-ED s využitím extrakce tuhou fází

Pro stanovení aminobifenylů v říční vodě metodou HPLC-ED s využitím extrakce tuhou fází byla použita eluce diethyletherem a jeho následné odpaření. Byly získány kalibrační závislosti 2-AB v koncentračním rozmezí

$2,5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , 3-AB v koncentračním rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  a 4-AB  $5,0 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Získané závislosti jsou lineární v celém rozsahu, parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v tab. V.

Jako optimální elučňi činidlo při extrakci tuhou fází byl zvolen diethylether, který lze snadno odpařit. Navrženým postupem bylo dosaženo cca 65 % výtěžků a byl dále aplikován pro proměření kalibračních závislostí pro modelové vzorky pitné a říční vody.

Dosažené meze stanovitelnosti  $L_Q$  pro toto stanovení jsou nižší v porovnání s  $L_Q$  dosaženými při přímém stanovení, jak vyplývá z tabulky VI. Extrakce 2-AB a 3-AB z modelových vzorků pitné vody umožňuje jejich stanovení v koncentračním řádu  $10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ , tj. až při stokrát niž-

ších koncentracích než při přímém stanovení. 4-AB, který na ampérometrickém detektoru s BDDFE vyznačuje nejnižší odezvy. Tyto koncentrace jsou limitní pro stanovení analytů v říční vodě, která představuje složitější matici než voda pitná.

## Závěr

V této práci bylo HPLC ve spojení s ampérometrickým detektorem s BDDFE použito pro analýzu aminobifenylů v modelových maticích pitné a říční vody.

Nejprve byla ověřena možnost přímého stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné a říční vodě metodou HPLC-ED. Kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné vodě byly změřeny v koncentračním řádu  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>, v říční vodě v koncentračním řádu  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> pro 2-AB a 3-AB a  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> pro 4-AB. Dosažené meze stanovitelnosti jsou srovnatelné s hodnotami dosaženými v destilované vodě jako ideální matici a leží v koncentračním řádu  $10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>.

Dále bylo navrženo stanovení využívající předběžnou separaci a prekoncentraci extrakcí tuhou fází na kolonkách Lichrolut®EN. Jako nejvhodnější eluční činidlo byl zvolen diethylether. Kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné vodě jsou pro 2-AB lineární v koncentračním řádu  $5,0 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>, pro 3-AB a 4-AB v koncentračním řádu  $7,5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>. Kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB a 4-AB v říční vodě byly změřeny pro 2-AB v koncentračním řádu  $2,5 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>, pro 3-AB v koncentračním řádu  $2,5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup> a pro 4-AB v koncentračním řádu  $5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>.

Ze získaných výsledků vyplývá, že popsání metody HPLC-ED jsou za daných podmínek vhodné pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve vzorcích pitné a říční vody a testo-

vaný ampérometrický detektor s bórem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou poskytuje stabilní odezvu pro studované analyty.

*Tato práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, dále byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035) a Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR 203/07/P261).*

## LITERATURA

1. Sigma-Aldrich s.r.o.: *Material safety data sheets*. Sigma-Aldrich, Praha 2006. <http://www.sigmaaldrich.com>, staženo 9. října 2008.
2. O'Neill I. K., Fishbein L.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 26, 229 (1986).
3. Moreira J. C., Barek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
4. Štulík K., Pacáková V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha 1989.
5. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Barek J.: *Chem. Listy* 100, 124 (2006).
6. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum, Praha 2002.
7. Ferancová A., Korgová E., Labuda J., Zima J., Barek J.: *Electroanalysis* 14, 1668 (2002).
8. Jolley S., Koppang M., Jackson T., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 69, 4099 (1997).
9. Jandová K.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2007.
10. Merck s.r.o.: *ChromBook 06/07, Chromatography at Merck – Experience drives Innovation*. Merck, Darmstadt 2006. <http://chrombook.merck.de>, staženo 21. prosince 2008.

## SPECIAČNÍ ANALÝZA STOPOVÝCH PRVKŮ V LISTECH VRBY

KATEŘINA MALIŠOVÁ a OTO MESTEK

Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5,  
166 28 Praha 6

Kateřina.Malisova@vscht.cz

### Úvod

Fytoremediace je definována jako využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů životního prostředí. Při fytoremediacích se mohou uplatňovat čtyři různé procesy: extrakce kontaminantů z půdy a vody (hlavně těžkých kovů a radionuklidů), degradace organických sloučenin, volatilizace organických sloučenin a některých anorganických sloučenin Hg, Se a As a stimulace mikrobiálního metabolismu v rhizosféře. Proces fytoremediace těžkých kovů může být zjednodušeně popsán jako odstranění kovů z půdy jejich transportem do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně sklizeny a odstraněny a plocha je opět osázena rostlinami do té doby, než se koncentrace kovů v půdě sníží na přijatelnou hladinu<sup>1</sup>. Rostlina vhodná pro fytoremediaci by měla splňovat tři základní předpoklady: měla by rychle růst a produkovat velké množství biomasy, měla by mít dostatečně hluboké kořeny, lehce sbíratelnou nadzemní část a akumulovat velké množství kovů v nadzemní části. Dodnes však nebyla nalezena rostlina, která by všechny tři podmínky splňovala. Nejvýhodnější je aplikovat fytoremediaci na místa s mělkou kontaminací organickými látkami, makroživinami, nebo kovy, a to na velké plochy s nižší kontaminací. Nevýhodami fytoremediací jsou dlouhé časy na odstranění kontaminace, omezená účinnost na horní část půdy a možný vstup kontaminantů do potravního řetězce<sup>2</sup>.

Jako hyperakumulátory jsou označovány látky, které vážou kovy ve velkých množstvích, koncentrace těžkých kovů v biomase takovýchto rostlin překračuje o jeden až dva řády hodnoty získané v běžných rostlinách. Penizek modravý (*T. caerulescens*) dokáže vázat až 30 g kg<sup>-1</sup> niklu, 43 g kg<sup>-1</sup> zinku, a 2 g kg<sup>-1</sup> kadmia a olova, jeho nedostatek je však malá tvorba biomasy<sup>3</sup>.

V současné době využívají fytoremediační technologie dvě dostupné strategie. První možností je použití výše zmíněných hyperakumulátorů např. *T. caerulescens* nebo druh tařice *Alyssum bertolonii* Desv., které specificky přijímají jeden nebo dva kovy, malá produkce biomasy je kompenzována velmi vysokým obsahem těžkých kovů v nadzemních částech rostliny. Druhou možností je pěstování rostlin, jenž mají vysokou produkci biomasy, tyto rostliny zpravidla nepřijímají specificky některý kov a dosahují mírně nadprůměrných obsahů kovů v biomase,

toto ale kompenzují vysokým výnosem biomasy. Na půdách kontaminovaných do hlubších vrstev se při fytoremediacích osvědčují druhy čeledi *Salicaceae* (vrby a topoly)<sup>4</sup>. Velkou výhodou vrb je možnost častých sklizní, vysoký výnos biomasy, dobrá regenerace (posklizňové odrůstání), efektivní příjem živin, vysoká intenzita a specifická kapacita jednotlivých druhů, hybridů a klonů absorbovat těžké kovy<sup>5</sup>. Některé druhy a klony vrb a topolů však mají vysoký koeficient bioakumulace, díky němuž mohou vykazovat až 5krát vyšší kapacitu příjmu kovů než *T. caerulescens*<sup>5,6</sup>.

Cílem této práce je výzkum rozpustných forem stopových prvků v listech vrby rostoucí v kontaminované půdě.

### Experimentální část

#### Vzorky

Směs listů (VK) stromů *Salix smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* a *S. dasyclados* byla sbírána na podzim roku 2007 v okolí řeky Litavky na Příbramsku v půdě kontaminované po protržení hráze odkaliště. Půda obsahovala 64,1 ± 4,3 mg kg<sup>-1</sup> As, 30,5 ± 2,9 mg kg<sup>-1</sup> Cd, 2297 ± 42 mg kg<sup>-1</sup> Pb a 3718 ± 317 mg kg<sup>-1</sup> Zn (cit.<sup>7</sup>). Dva kontrolní vzorky byly trhány v nekontaminované oblasti u řeky Vltavy v Praze Zbraslavi na jaře (VZJ) a na podzim (VZP) roku 2008.

#### Chemikálie

Použité kyseliny dusičná a chlorovodíková, hydroxid sodný a amoniak byly třídy Suprapur® (Merck, Německo), octová kyselina byla čistoty p.a. (Lachema, ČR). Základní roztoky prvků o koncentraci 1000 mg l<sup>-1</sup> byly pořízeny od firmy Merck. Látka tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) byla získána od firmy Fluka (Německo). K ředění roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Millipore, USA).

#### Příprava extraktu v 0,02 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl

Navážka 2 g rozdrcených listů byla extrahována 50 ml pufru 0,02 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5) po dobu jedné hodiny v PE lahvičce. Poté byla směs odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

#### Příprava extraktu v 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH

Navážka 0,5 g rozdrcených listů byla extrahována 5 ml NaOH o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup> v PP zkumavce po dobu jedné hodiny. Po naředění byla suspenze neutralizována na pH 7,5 přidávkou kyseliny octové o koncentraci



1,7 mol l<sup>-1</sup> a 0,17 mol l<sup>-1</sup> za neustálého míchání a sledování pH, směs byla doplněna na objem 50 ml a odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

#### Stanovení celkového obsahu prvků

0,5 g listů nebo 10 ml extraktu bylo v 110 PTFE nádobce rozkládáno s 3 ml kyseliny dusičné v mikrovlnném rozkladném zařízení Uniclever BM1-Z (Plazmatronika, Polsko). Digerát byl převeden do 50 ml odměrné baňky a obsah prvků byl stanoven metodou ICP-MS, přístroj Elan DRC-e (Perkin-Elmer, USA).

#### Spojení GPC/ICP-MS

Aparatura pro kvantitativní vyhodnocení frakcionace stopových prvků byla sestavena z vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, USA), dvou injektorů umístěných před (smyčka 100 µl pro dávkování vzorku) a za kolonou (smyčka 500 µl pro dávkování kalibračních roztoků prvků) a kolony Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko); jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr, mobilní fáze byla Tris-HCl (pH 7,5) o průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Pro preparativní separace byla použita kolona Fractogel EMD Bio SEC (Merck), smyčka pro dávkování vzorku měla objem 2 ml, jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr a detektor 9050 UV (Varian, USA), jako mobilní fáze byl použit pufr Tris-HCl (pH 7,5), průtok 2 ml min<sup>-1</sup>.

#### Izolace ligandů stopových prvků pomocí afinitní chromatografie

Ligandy stopových prvků obsažené v nízkomolekulární frakci extraktu v roztoku Tris-HCl byly zachyceny absorpcí v 1 ml chelatační kolonce HiTrap (GE Healthcare, Švédsko) nasycené ionty Cu<sup>2+</sup>. Absorbované látky byly eluovány pomocí 0,3 mol l<sup>-1</sup> roztoku amoniaku a eluát byl lyofilizován.

#### MALDI-MS

Měření proběhlo na spektrometru Biflex IV (Bruker Daltonics, Německo), jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, měření probíhalo v pozitivním módu.

#### Analýza aminokyselin

Po kyselinovém rozkladu vzorku byly aminokyseliny stanoveny pomocí iontově výměnné chromatografie s pokolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí.

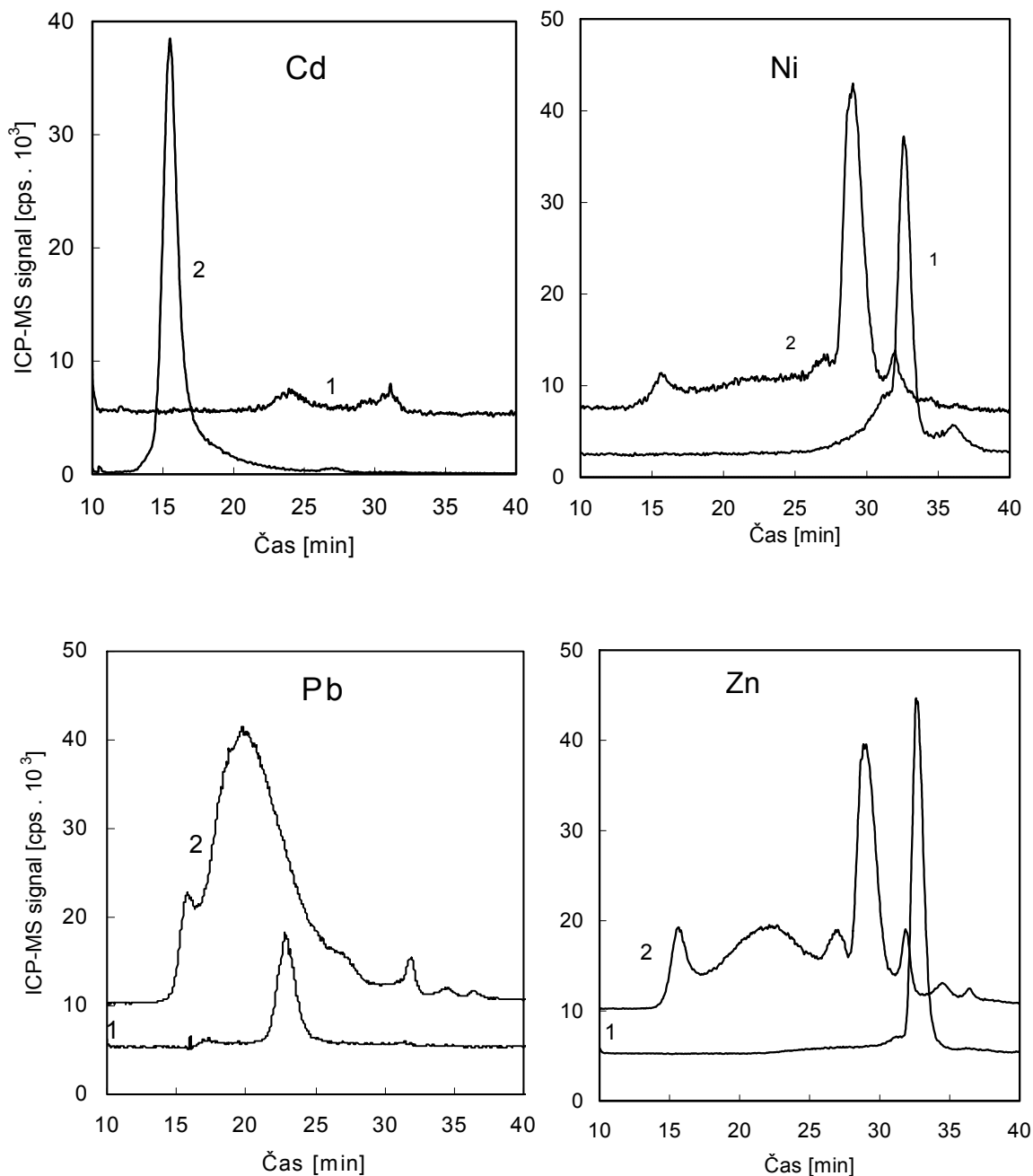
#### Výsledky a diskuse

Celkové obsahy stanovovaných prvků v analyzovaných vzorcích shrnuje tab. I. Ze získaných dat je patrné, že listů kontaminovaných vzorků obsahuje výrazně více kadmia (30×), olova (30×) a zinku (5×) než listů nekontaminovaných. Arzen, který byl v půdě obsažen také ve vysokém množství, nebyl rostlinou akumulován. Z porov-

Tabulka I

Celkové obsahy stopových prvků v sušině [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]

Prvek	VK	VZJ	VZP
V	0,230 ± 0,021	0,657 ± 0,065	3,5 ± 0,2
Ag	0,0611 ± 0,0062	0,0088 ± 0,0019	0,0476 ± 0,0028
Cd	60,4 ± 4,0	0,398 ± 0,032	1,81 ± 0,14
Co	0,742 ± 0,034	1,299 ± 0,068	7,86 ± 0,33
Cu	7,33 ± 0,38	9,28 ± 0,40	39,5 ± 1,8
Cr	0,462 ± 0,054	0,655 ± 0,074	3,77 ± 0,53
Fe	200 ± 11	290 ± 22	1452 ± 233
Mo	0,096 ± 0,012	0,205 ± 0,012	1,351 ± 0,078
Mn	318 ± 28	120,0 ± 8,3	1057 ± 62
Ni	8,93 ± 0,53	1,94 ± 0,12	13,8 ± 1,8
Zn	1543 ± 101	66,4 ± 5,2	334 ± 21
As	0,535 ± 0,059	0,1224 ± 0,0091	1,303 ± 0,075
Tl	0,0318 ± 0,0019	0,00486 ± 0,00049	0,0275 ± 0,0023
Pb	89,7 ± 8,6	0,518 ± 0,044	3,74 ± 0,21
Sušina	91,8 %	90,2 %	98,0 %



Obr. 1. GPC profily jednotlivých prvků pro extrakci do Tris-HCl (1) a do NaOH (2)

nání obsahů stopových prvků v nekontaminovaných vzorcích VZJ a VZP vyplývá, že během vegetačního období došlo k pěti až desetinásobnému nárůstu obsahu stopových prvků. Dále je patrné, že nekontaminovaný vzorek VZP obsahuje výrazně více železa, manganu a mědi, než vzorek kontaminovaný.

Tab. II ukazuje extrahovatelné obsahy stopových prvků ve vzorku VK. Při extrakci do pufru Tris-HCl se vyextrahovalo více Fe, Mn a Tl; při extrakci do roztoku NaOH se vyextrahovalo více Cu, Mo, Ni, Zn, As a Pb. Při frakcionaci specií stopových prvků pomocí spojení GPC a ICP-MS byly sledovány pouze prvky obsažené

Tabulka II  
Extrahovatelné obsahy prvků a podíly prošlé kolonou [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]

Prvek	Extrahovatelný podíl <sup>a</sup>		Podíl prošlý kolonou <sup>b</sup>	
	extrakce do Tris	extrakce do NaOH	extrakce do Tris	extrakce do NaOH
V	<0,001 (<1%)	<0,001 (<1%)		
Ag	0,002 (3%)	0,009 (15%)		
Cd	8,8 (15%)	9,9 (16%)	0,045 (<1%)	7,5 (76%)
Co	0,31 (42%)	0,27 (37%)		
Cu	1,1 (14%)	3,3 (45%)		
Cr	0,01 (2%)	0,25 (54%)		
Fe	56 (28%)	37 (19%)		
Mo	0,03 (34%)	0,06 (61%)		
Mn	245 (77%)	193 (61%)	0,16 (<1%)	0,13 (<1%)
Ni	5,4 (61%)	6,5 (73%)	4,0 (61%)	4,4 (66%)
Zn	573 (37%)	956 (62%)	10,5 (1%)	60,8 (6%)
As	0,096 (18%)	0,39 (73%)		
Tl	0,012 (37%)	0,0052 (16%)		
Pb	2,6 (3%)	18,9 (21%)	0,21 (1%)	5,4 (29%)

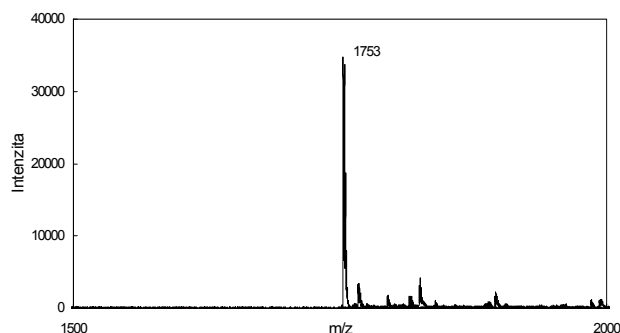
<sup>a</sup> Procentický podíl je vztažen k celkovému obsahu, <sup>b</sup> procentický podíl je vztažen k extrahovatelnému obsahu

Tabulka III  
Výsledky analýzy aminokyselinového složení

Aminokyselina	Zastoupení [% mol/mol]
Asp	19
Ser	12
Glu	13
Gly	14
Cys	36
Lys	6

v extraktu ve vyšších koncentracích (Cd, Zn, Pb, Mn a Ni). Tabulka II ukazuje podíly těchto prvků prošlé kolonou GPC. Tato veličina určuje podíl kovů vázaných do stabilních komplexů. Zbýlý podíl obsažený v iontové formě je GPC kolonou pevně vázán a musí být po skončení analýzy odstraněn roztokem EDTA. Je patrné, že při extrakci do NaOH se v případě Cd, Pb a Zn uvolňuje vyšší podíl stabilních komplexů. V případě Ni a Mn podíly prošlé kolonou na použitím typu extrakčního činidla nezávisí. V obr. 1 jsou ukázány prvkově specifické chromatogramy extraktu v pufru Tris-HCl a v roztoku NaOH. Je patrné, že pro případ extrakce do roztoku Tris-HCl jsou ligandy eluovány převážně v jednom retenčním čase v nízkomolekulární oblasti, zatímco v případě extrakce do roztoku NaOH jsou ligandy eluovány ve více retenčních časech ve vysokomolekulární, středně i nízkomolekulární oblasti.

Nízkomolekulární frakce extraktu v pufru Tris-HCl (retenční čas na koloně Superdex 32 min) byla separována pomocí preparativní GPC (kolona Fractogel), dále přečištěna technikou afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu a podrobena dalším analýzám. V tab. III jsou ukázány nalezené obsahy aminokyselin. Je zřejmý vysoký výskyt kyseliny asparagové či asparaginu a glutamové či glutaminu, serinu, glycinu a cysteinu. V MALDI-MS spektrum této přečištěné frakce byl nalezen jeden pík odpovídající molekulové hmotnosti 1753 Da (obr. 2).



Obr. 2. MALDI-MS spektrum nízkomolekulární frakce vzorku vrby VK přečištěné technikou IMAC

## Závěr

Vrba rostoucí v kontaminované půdě dovede do svých listů akumulovat značné množství těžkých kovů. Tyto kovy jsou obsaženy převážně v nerozpustné formě. Nízkomolekulární látky tvořící rozpustné komplexy s kovy v extraktech obsahují vysoký podíl aminokyselin cysteinu a kyselin asparagové a glutamové, tedy u látek s vysokou komplexační schopností.

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

## LITERATURA

1. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Koryta J., Vaněk T.: Chem. Listy 102, 346 (2008).
2. Kaduková J., Miškuřová A., Štofko M.: Acta Mont. Slovaca 2, 130 (2006).
3. Dercová K., Makovníková J., Barančíková G., Žuffa J.: Chem. Listy 99, 682 (2005).
4. Saxena P. K., Krishana Raj S., Dan T., Perras M. R., Vettakkorumakankav N. N., v: (Prasat M. N. V., Hagemeyer J., ed.): *Heavy Metal Stress in Plants – From Molecules to Ecosystems*, Springer-Verlag, Berlin 1999.
5. Pulford I. D., Watson C.: Environ. Intern. 29, 529 (2003).
6. Robinson B. H., Mills T. M., Petit D., Fung L. E., Green S. R., Clothier B. E.: Plant Soil 227, 301 (2000).
7. Tlustoš P., Száková J., Vysloužilová M., Pavlíková D., Weger J., Javorská H.: Cent. Eur. J. Biol. 2, 254 (2007).

## STANOVENÍ HLADIN IMATINIBU POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ

KATEŘINA MIČOVÁ<sup>a</sup>, DAVID FRIEDECKÝ<sup>a</sup>,  
EDGAR FABER<sup>b</sup> a TOMÁŠ ADAM<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoř dědičných metabolických poruch, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, <sup>b</sup> Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc  
K.Micova@seznam.cz

### Úvod

Chronická myeloidní leukemie je myeloproliferativní onemocnění charakteristické přítomností Filadelfského chromosomu, který vzniká translokací chromosomu 9 a 22. Nově vzniklý gen BCR/ABL má za následek produkci proteinu p210, konstitutivně aktivní tyrosinkinasy zapříčínující vznik choroby. Její léčba je v současnosti úspěšná díky nově vyvinutým lékům (Imatinib, Dasatinib, Nilotinib) založených na selektivní inhibici těchto tyrosinkin. Imatinib poskytuje velmi dobrou hematologickou, cytogenetickou a molekulární odpověď, ale znevýhodňuje jej možný vznik rezistence. Monitorování hladin léku v tělních tekutinách nám poskytuje informace o jednotlivých odpovědích na látku u léčených pacientů, čímž může být léčba vhodně modifikována.

Práce je zaměřena na stanovení imatinibu v krevní plasmě pacientů s CML na terapii Glivecem metodou vysoce účinné kapilární elektroforézy. Plasma byla deproteinovaná methanolem, zcentrifugována, vysušena v proudu dusíku a následně rozpuštěna ve vodě. Separační pufr je složený z kyseliny citronové ( $c = 50 \text{ mmol l}^{-1}$ ) titrované kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou na pH 3,6. Analýza byla provedena na nepokryté křemenné kapiláře o efektivní délce 20 cm (celková délka 27 cm) a průměru 75  $\mu\text{m}$ , při napětí 15 kV a nástřiku 3 nebo 6 s.

Nově vyvinutá metoda pro stanovení imatinibu v krevní plasmě pomocí HPCE je vysoce účinná, časově nenáročná a má nízké náklady na provoz.

### Chronická myeloidní leukemie (CML)

CML je klonální myeloproliferativní onemocnění vznikající transformací hemopoetické kmenové buňky. V krvi pacientů se nachází velké množství nemocných nezralých buněk – blastů, v případě CML se jedná z největší části o basofilní granulocyty. Charakteristickým rysem patologické buněčné populace je v 90 % případů CML přítomnost chromosomálního markeru – Ph chromosomu (Filadelfský chromosom, BCR/ABL). Filadelfský chromosom vzniká v důsledku reciproké translokace t(9;22)(q34;q11), která byla poprvé popsána u pacientů

s CML ve Filadelfii v roce 1960. Fúzí genu BCR – „breakpoint cluster region“ na 22. chromosomu s genem ABL – „Abelson tyrosine kinase gen“ na 9. chromosomu vzniká onkogen BCR/ABL, který vede ke vzniku chimerického onkogenního proteinu BCR/ABL s molekulovou hmotností od 185 do 230 kD (dle oblasti breakpointu v BCR genu). U většiny pacientů s CML se exprimuje protein o velikosti 210 kD zvaný p210<sup>bcr-abl</sup>. Tento protein je konstitutivně aktivní tyrosinkinasa (2.7.10.2.), která aktivuje cytoplasmatické a jaderné signální transdukční dráhy, které podporují buněčné dělení a blokují apoptózu, což vede k neregulovanému množení hemopoetických kmenových buněk. Tato kinasa rovněž ovlivňuje reparaci DNA, což může podporovat další chromosomální změny a mutace zahrnuté v progresi choroby a mohou hrát roli v agresivní povaze pozdních stádií CML.

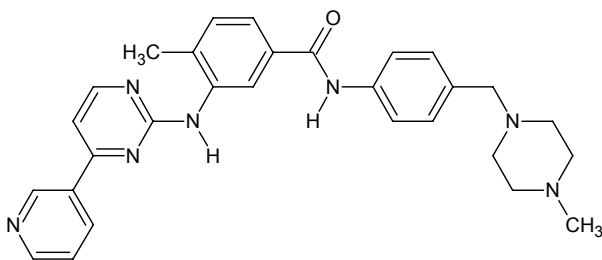
Onemocnění má tři fáze vývoje: chronickou fázi (zvýšený počet leukocytů či krevních destiček a počet blastů v kostní dřeni nepřesahující 10 %), akcelerovanou fázi (zvýšená splenomegalie a leukocytosa, zvýšený počet blastů od 10 do 30 % a basofilů do 20 %) a blastický zvrát (počet blastů v kostní dřeni překračuje 30 %, myeloidní prekursorů mohou rovněž tvořit nádory v lymfatických uzlinách, kůži a kostech). Přejít mezi jednotlivými fázemi je plynulý, ale obrazy jednotlivých fází se výrazně liší. Rovněž se liší vlastnosti nádorových buněk v průběhu onemocnění.

Cílem léčby je redukce nádorové hmotnosti, eliminace Ph pozitivního chromosomu a zabránění vývoje nemoci do akcelerované a blastické fáze. Úspěšnost léčby je hodnocena dosažením hematologické remise (normalizace počtu krevních buněk), cytogenetické remise (eliminace dřevňových buněk pozitivních na Ph chromosom) a molekulární odpovědi (vymizení Ph chromosomu). Díky novým poznatkům v molekulární biologii a patofyziologii CML jsou hledány vysoce účinné a cílené metody léčby. Nadějným objevem nových léků se stal vývoj selektivních inhibitorů tyrosinkin. Používaných k inhibici maligního růstu buněk a utváření metastáz. V druhé polovině 90. let vedla tato snaha k objevení derivátů 2-fenylaminopyrimidinu, kam řadíme Imatinib, Dasatinib a Nilotinib.

### Imatinib (STI571, Glivec)

Tento selektivní inhibitor konstitutivně aktivní tyrosinkinasy je derivát fenylnaminopyrimidinu označovaný také jako STI-571 (signal transduction inhibitor) nebo CGP57148B. Konkrétně se jedná o 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]-feny]-benzamid (obr. 1).

Imatinib (IM) interaguje s bílkovinou p210<sup>bcr-abl</sup> tak, že obsadí ABL doménu enzymu ve vazebném místě pro ATP, stabilizuje protein v inaktivní konformaci a nedochází



Obr. 1. Molekula Imatinibu

zí k fosforylaci tyrosinu bílkovin patřících k substrátům p210<sup>bcr/abl</sup>. Zablokováním fosforylace tyrosinových zbytků bílkovin dochází k zastavení celé řady signálních drah, které hrají roli ve vzniku leukemického fenotypu buňky. Působením IM dochází k apoptóze buněk exprimujících p210<sup>bcr/abl</sup> a také k inhibici jejich proliferace.

Navzdory prvotní velké úspěšnosti léčby CML pomocí imatinibu – velkému stupni hematologických i cytogenetických odpovědí, je sledován stále vzrůstající počet pacientů stávajících se na léčbu rezistentní, a to hlavně u pokročilejších fází nemoci. V dnešní době známe 5 hlavních mechanismů rezistence na IM.

Jako první mechanismus je velmi pevná vazba IM na  $\delta$ -1-kyselý glykoprotein, dále dochází ke zvýšenému vylučování léku pomocí P-glykoproteinové pumpy, zvýšené expresi a amplifikaci genu BCR/ABL a dále k aktivaci signálních drah nezávislých na BCR/ABL. Pátou a zároveň nejhlavnější příčinou rezistence jsou BCR/ABL genové mutace – mutace ABL kinasové domény, které zabráňují vazbě IM.

Stanovení léčebné dávky IM je problematické, protože rezistentní CML mutace mohou být selektivní a rychle se šířící. Monitorování hladiny IM je velmi užitečné, ale jen málo laboratoří je schopno toto měření vykonávat zejména kvůli náročné instrumentaci a vysokým finančním nákladům. Nicméně nově generovaná data naznačují, že hladina IM zcela určuje stupeň odpovědi (HR, CR a MR).

## Experimentální část

Plasma byla získána z hemato-onkologického oddělení FN Olomouc. Pacientům s CML byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s EDTA v průměru 18 hodin po užití poslední dávky přípravku Glivec. Krev byla poté zcentrifugována a získaná plasma byla zamrazena na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Imatinib obdrženy od firmy Novartis (Curych, Švýcarsko) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a deionizované vodě ( $18,3\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ ) na výslednou koncentraci  $10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ . Tento standardní roztok byl použit pro přípravu všech ostatních standardů.

Všechny reagentie měly analytický stupeň čistoty a byly získány od firmy Sigma (St. Luis, MO, USA). K přípravě citrátového pufru byla použita pevná kyselina

citronová, která byla rozpuštěna v deionizované vodě na koncentraci  $50\text{ mmol l}^{-1}$  a následně titrována kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) na pH 3,6.

Příprava vzorku spočívala v deproteinaci  $90\text{ }\mu\text{l}$  plasmy pomocí  $400\text{ }\mu\text{l}$  methanolu. Poté byl vzorek 3 min třepán na vortexu a následně 1 min centrifugován při  $10\text{ }000\text{ RPM}$ . Supernatant byl vysušen v proudu dusíku, vysušený vzorek byl rozpuštěn v  $50\text{ }\mu\text{l}$  vody a následně analyzován nebo uchován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro pozdější analýzu. Modifikovaný postup byl převzat z publikace Velpandian T. a spol., 2004.

Veškeré experimenty byly prováděny na přístroji Beckman P/ACE 5510 s detektorem diodového pole (Fullerton, USA).

Kapilára: Elektroforetická separace probíhala v nepokryté kapiláře z taveného křemene ( $75\text{ }\mu\text{m i.d.} \times 375\text{ }\mu\text{m o.d.}$ ; Polymicro Technologies). Její efektivní délka činila  $20\text{ cm}$ , celková délka  $27\text{ cm}$ .

Termostat: Systém byl termostatován na teplotu  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Detektor: Byla použita UV detekce v rozmezí  $190\text{ až }300\text{ nm}$ . Pro dosažení lepší citlivosti metody byl aplikován součet vlnových délek v rozmezí  $255\text{--}275\text{ nm}$ , čímž bylo dosaženo  $7\times$  lepší odezvy ve srovnání se standardním záznamem. Analyty byly kvantifikovány integrací plochy píků korigovaných na migrační čas.

Zdroj napětí: Na kapiláru bylo aplikováno napětí o velikosti  $15\text{ kV}$ , což odpovídá intenzitě elektrického pole  $555,56\text{ V cm}^{-1}$ . Frekvence sběru dat byla  $2\text{ Hz}$ .

Vzorky byly dávkovány použitím nízkotlakového nástřiku ( $0,5\text{ psi}$ ;  $3\text{ s}$ ;  $2\%$ ). Pufr byl filtrován pomocí  $13\text{ mm}$  nilonového filtru ( $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ; Fisons Ins., Mountain View, CA, USA) a před analýzou byl  $0,5$  minuty sonifikován pro eliminaci vzduchových bublin. Před začátkem analýzy byla kapilára vždy promyta aplikací vysokého tlaku ( $20\text{ psi}$ )  $5$  minut HCl ( $0,1\text{ mol l}^{-1}$ ), NaOH ( $1\text{ mol l}^{-1}$ ) a SDS ( $50\text{ mmol l}^{-1}$ ) a mezi jednotlivými analýzami vodou po dobu  $0,3$  min a separačním pufrům po  $0,7$  min.

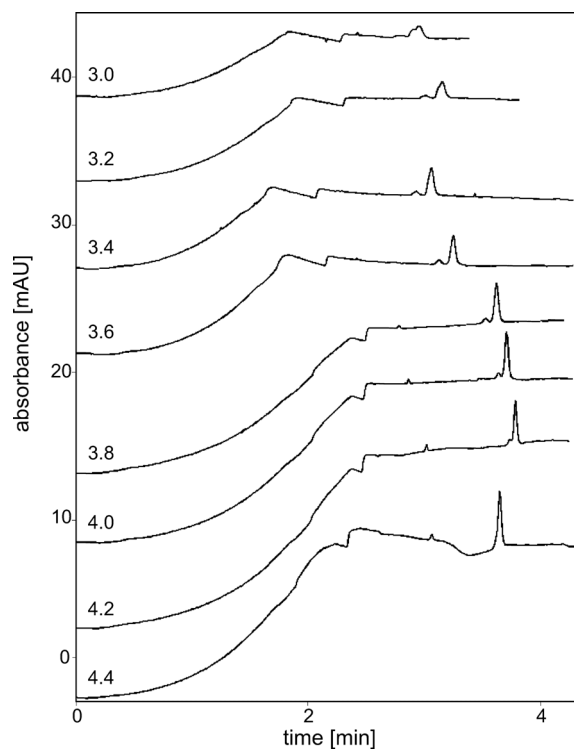
## Výsledky

Při iniciálním experimentu se vycházelo ze struktury látky, která se v kyselém prostředí chová jako kation. Proto bylo testováno několik pufrů: fosfátový ( $100\text{ mmol l}^{-1}$ , pH 1,8 a 2), formiátový, chloridový a citrátový ( $50\text{ mmol l}^{-1}$ , pH 3,6). Mimo citrátový pufr byl systém v těchto podmínkách velmi nestabilní díky vysokému proudu a generaci velkého Jouleova tepla v kapiláře, dále docházelo k variaci migračních časů, účinnosti a selektivity. Píky byly chvostující a z důvodu extrémně kyselého pH elektroforegram obsahoval množství interferujících kladně nabitých analytů. Chloridový pufr poskytoval velmi špatné rozlišení a účinnost.

Na základě těchto experimentů byl pro další optimalizaci zvolen citrátový pufr ( $c = 50\text{ mmol l}^{-1}$ ) titrován GABA (díky lepším pufracím schopnostem), u kterého díky hodnotám  $pK$  citrátu ( $pK_{a1} = 3,15$ ;  $pK_{a2} = 4,77$ ;  $pK_{a3} =$

Tabulka I  
Účinnost citrátového pufru v závislosti na pH. Měřeno na reálném vzorku

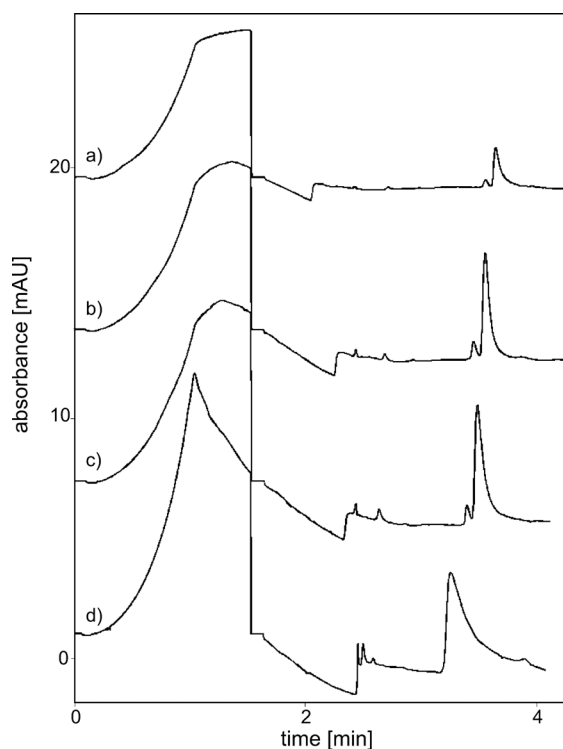
pH vzorku	t [min]	$W_{1/2}$	N	N/m
4,4	3,170	0,027	76366	381830
4,2	3,233	0,024	100531	502655
4,0	3,166	0,030	61701	308505
3,8	3,092	0,033	48636	243180
3,6	2,775	0,038	29544	147720
3,4	2,616	0,045	18722	93612
3,2	2,695	0,058	11961	59805
3,0	2,524	0,057	10863	54315



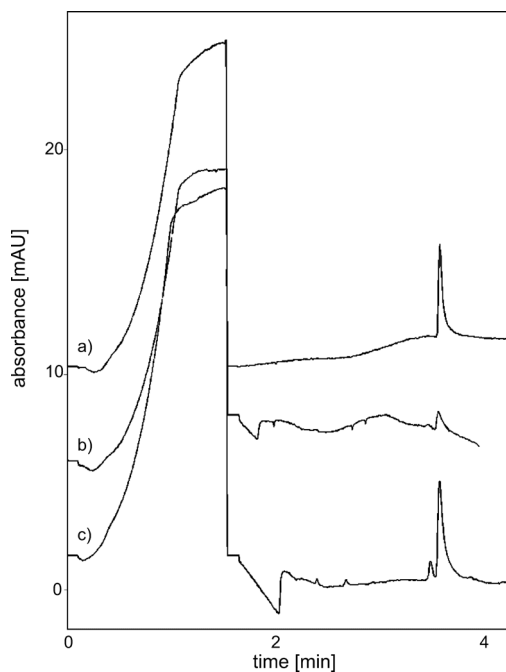
Obr. 2. Porovnání účinnosti citrátového pufru o různých hodnotách pH

6,40) bylo možno zvolit pH základního elektrolytu v širokém rozmezí. Dále byl pufr v rozmezí pH 2,8–4,4 testován na reálných vzorcích (obr. 2). S rostoucím pH se výrazně zvyšuje účinnost separace (tab. I), ale zároveň klesá rozlišení mezi imatinibem a jeho metabolitem. Jako kompromis mezi účinností a rozlišením bylo zvoleno pH 3,6.

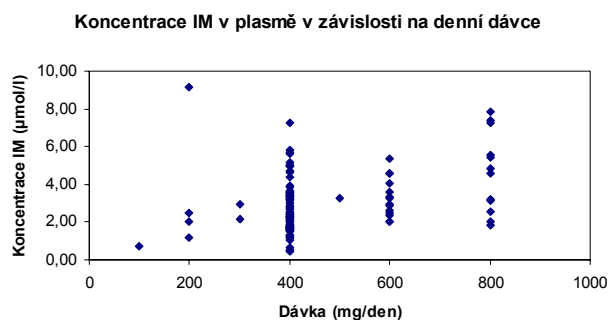
Dále byla sledována doba nástřiku (obr. 3). S rostoucí dobou nástřiku se zvyšuje účinnost separace, ale zmenšuje



Obr. 3. Účinnosti různé délky nástřiku; a – 6 s; b – 12 s, c – 18 s a d – 36 s



Obr. 4. Měření koncentrace imatinibu v plasmě v závislosti na denní dávce užívané pacientem: a) standard ( $c = 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ); b) denní dávka 400 mg; c) denní dávka 800 mg



Obr. 5. Aplikace metody na reálné vzorky pacientů

se rozlišení mezi látkou a jejím metabolitem. Optimální doba nástřiku je 6 s. Při nástřiku 18 s byl dosažen limit detekce roven  $8 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ . Vysoký nástřik byl umožněn nízkou vodivostí vzorku díky deproteinaci methanolem.

Finální pufr použitý pro validaci metody měl složení kyselina citronová o koncentraci  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  titrovaná GABA na pH 3,6.

Koncentrace imatinibu v plasmě byla měřena na 116 vzorcích pacientů s CML a pohybovala se v rozmezí 0,46 až  $9,14 \text{ µmol l}^{-1}$ . V žádném analyzovaném vzorku nebyly pozorovány interference. Plasmatická koncentrace imatinibu byla v souladu s množstvím užívané dávky (200 až  $1600 \text{ mg den}^{-1}$ ) (obr. 4, 5), s dobou odběru krve po poslední podané dávce (0,5–28 h) a s jinými parametry pacientů (váha, věk, ...).

## Závěr

Tato práce je zaměřena na vývoj nové metody pro stanovení imatinibu v krevní plasmě pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií, a to pomocí techniky vysoce účinné kapilární elektroforézy.

V experimentální části byla popsána optimalizace a aplikace metody. Metoda se v současné době dostává do rutinní praxe v laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc.

Další výzkum bude směřován do oblasti stanovení imatinibu v leukocytech pacientů s CML. Předpokládá se, že stanovení hladiny intracelulárního IM a v kombinaci se stanovením plasmatické hladiny při současném vyšetření aktivity transportních systémů umožní lépe předpovědět vznik rezistence na IM a bude mít lepší praktický dopad na rozhodování o léčbě u nemocných s CML léčených IM, než izolované stanovení plasmatické hladiny IM.

## LITERATURA

1. Faber E.: Farmakoterapie 3, 233 (2005).
2. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian H. M.: Ann. Intern. Med. 131, 207 (1999).
3. Kantarjian H. M., Talpaz M., Giles F., O'Brien S., Cortes J.: Ann. Intern. Med. 145, 913 (2006).
4. Voglová J.: Encyklopedie Leukemie 3, 1 (2007).



## APLIKACE VYBRANÝCH MIKROEXTRAKČNÍCH TECHNIK PŘI STANOVENÍ ROSTLINNÝCH SILIC

VERONIKA MLEJOVÁ, MARTIN ADAM,  
PETR DOBIÁŠ, PETRA PAVLÍKOVÁ  
a KAREL VENTURA

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legii 565, 532 10 Pardubice  
Martin.Adam@upce.cz*

### Úvod

Běžně používané metody pro izolaci silic z rostlin jsou destilace s vodní parou, lisování či extrakční metody. Vzhledem k tomu, že silice jsou těkavé sloučeniny, je možné je analyzovat po zakoncentrování z plynného prostoru nad vzorkem, tzv. headspace (HS). K tomuto účelu se jako perspektivní jeví mikroextrakční techniky, mezi které patří mikroextrakce tuhou fází (SPME) a mikroextrakce jednou kapkou (SDME). Obě tyto techniky využívají ustavování rovnováhy mezi vzorkem, headspace prostorem a sorpční fází (sorbentem nebo rozpouštědlem).

V případě SPME je vzorek sorbován na křemenné vlákno potažené vhodným sorbentem, ze kterého jsou analyty uvolňovány tepelnou desorpcí. V případě SDME jde o absorpci těkavých látek do vhodného extrakčního rozpouštědla a získaný extrakt obsahující zachycené sloučeniny je následně zaveden do nástřikového prostoru plynového chromatografu bez nutnosti zařazení desorpčního kroku. Pro identifikaci jednotlivých sloučenin je možné použít metodu standardního přídatku.

Silice jsou komplexní směsi organických sloučenin obsažených v rostlinách. Vyskytují se prakticky ve všech částech (květy, plody, listy, stonky, kořeny ...). Skládají se především z terpenických sloučenin (monoterpeny a seskviterpeny), které ale většinou nemají velký vliv na vůni a chuť silic, protože nositelem těchto vlastností jsou hlavně kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, estery atd.). Vliv silic na lidské zdraví je známý již mnoho let. Lidé využívali mnoho druhů bylin a koření k léčení různých nemocí (např. meduňka proti kašli, pelyněk pro zažívání, levandule má protizánětlivý a analgetický účinek, atd.).

Hlavními cíli této studie byla optimalizace experimentálních podmínek HS-SPME a její porovnání s HS-SDME. Výsledky obou metod byly srovnány s klasickou technikou destilace s vodní parou, a to při analýzách silic v bylinách levandule lékařská, šalvěj lékařská, máta peprná a meduňka lékařská.

### Experimentální část

K analýze byly použity rostliny od firmy Botanicus s.r.o. (Ostrá, Česká republika). Jednalo se o květ levandule lékařské (*Lavandula spica*), listy šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*), listy máty peprné (*Mentha piperita*) a listy meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Všechny vzorky byly rozděleny na jednotlivé části a usušeny při laboratorní teplotě. Skladovány byly na tmavém místě v tmavých lahvích při cca 4 °C.

Zkoumané vzorky byly extrahovány z plynného prostoru nad vzorkem technikami SDME a SPME. Pro srovnání byly všechny vzorky ještě analyzovány klasickou destilační metodou. Pro SDME byla používána GC mikrostríkačka HAMILTON Microliter 756N o objemu 5 µl (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko). Jako rozpouštědlo byl použit *p*-xylen p.a. od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Při SPME byla testována 3 různá vlákna, a to 100 µm polydimethylsiloxan (PDMS), 65 µm polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB) a 50/30 µm divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS) s použitím SPME držáku pro manuální vzorkování (vše Supelco, Bellefonte, PA, USA). Všechny extrakce byly provedeny 3×. Extrakční teplota byla upravena termostatem typu Julabo EC-5 (Julabo Labor-technik, Seelbach, Německo).

Extrakce silic byly prováděny bezprostředně po teplotě vzorku. Byly použity 10ml vzorkovací nádoby (Supelco, Bellefonte, PA, USA), do kterých bylo navažováno 0,5 g nadrceného vzorku byliny. SDME byly prováděny do 2 µl *p*-xylynu při 70 °C po dobu 90 s, SPME byly prováděny při 70 °C po dobu 25 min. Na destilaci s vodní parou bylo použito 20 g nadrceného vzorku, destilace probíhala po dobu 4 h, silice byly zachytávány do 1 ml *p*-xylynu.

Získané extrakty byly analyzovány na plynovém chromatografu Hawlett-Packard 5890 (Hawlett-Packard, Avondale, PA, USA) s plamenově-ionizačním detektorem na kapilární koloně Ultra #2 o rozměrech 25 m × 0,32 mm, film 0,52 µm fenylmethylsilikon (HPST s.r.o., Praha, ČR).

Podmínky GC analýzy byly následující: teplota nástřiku 250 °C, teplota FID detektoru 290 °C, nosný plyn dusík (čistota 5,0, Linde gas a.s., Praha, ČR), vodík a vzduch (oba Linde) o průtoku 30 a 300 ml min<sup>-1</sup> (přetlak na koloně 50 kPa), dělič toku 1:10. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 60 °C, teplota byla zvyšována do 150 °C rychlostí 5 °C min<sup>-1</sup>, nárůst rychlostí 30 °C min<sup>-1</sup> do 280 °C a tato teplota byla 2 min udržována konstantní.

Vyhodnocování jednotlivých silic bylo prováděno metodou standardního přídatku, pomocí něž byla nejen potvrzena přítomnost sledovaných sloučenin, ale i provedena kvantitativní analýza jednotlivých silic.

## Výsledky a diskuse

Cílem této studie bylo srovnání extrakčních technik (SPME a SDME) vhodných k analýze silic v bylinách. Předtím bylo nutné provést optimalizaci jednotlivých ex-

trakčních parametrů, aby bylo dosaženo maximální účinnosti extrakce analyzovaných složek.

U techniky SPME byla testována vhodná doba extrakce, teplota extrakce, navážka vzorku, velikost vzorkovací nádoby, teplota nástřiku, výběr vlákna. Byly použity

Tabulka I

Obsah silic ve 100 g květů levandule lékařské a listů meduňky lékařské

Silice	Levandule lékařská						Meduňka lékařská					
	SDME [mg]	RSD [%]	SPME [mg]	RSD [%]	dest. [mg]	RSD [%]	SDME [mg]	RSD [%]	SPME [mg]	RSD [%]	dest. [mg]	RSD [%]
$\alpha$ -Pinen	11,09	7,63	3,22	3,30	6,48	1,84	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Myrcen	8,26	7,78	2,59	5,63	28,01	2,79	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
1,4-Cineol	9,09	6,65	4,02	5,48	5,49	1,27	4,84	3,24	2,72	1,86	3,90	2,31
Eucalyptol	191,57	3,13	64,56	0,84	36,43	2,64	96,33	5,36	6,69	3,78	10,51	1,46
Limonen	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
$\alpha$ -Tujon	6,68	8,54	8,40	2,03	8,90	4,23	15,63	3,27	3,37	4,23	3,78	3,22
Camphor	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Menthon	14,45	5,94	12,74	5,98	15,81	1,31	129,49	4,70	73,29	0,15	33,09	7,18
Borneol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Menthol	86,52	7,95	18,57	4,68	17,45	1,70	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Nerol	62,52	3,11	21,45	5,41	44,15	0,51	62,42	3,45	31,12	3,46	34,16	5,25
Carvacrol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---

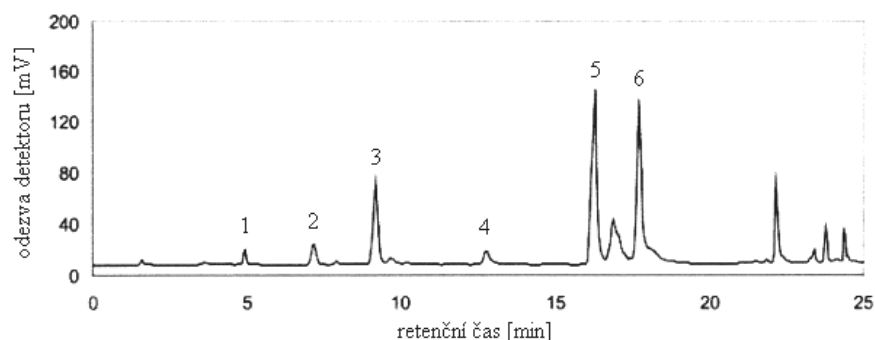
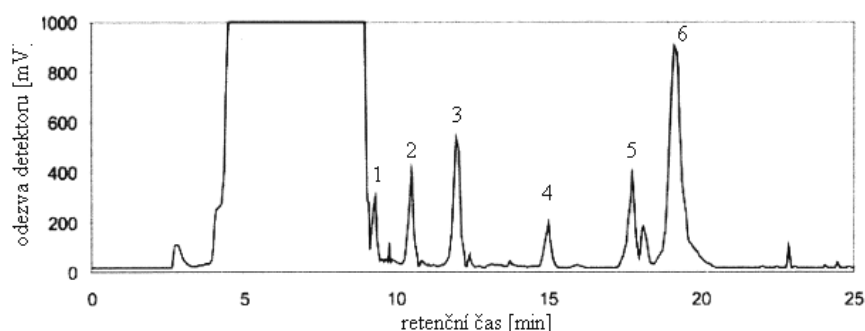
< LoQ = pod mezí stanovitelnosti (Limit of Quantification); RSD – relativní směrodatná odchylka [%], n = 3

Tabulka II

Obsah silic ve 100 g listů máty peprné a šalvěže lékařské

Silice	Máta peprná						Šalvěj lékařská					
	SDME [mg]	RSD [%]	SPME [mg]	RSD [%]	dest. [mg]	RSD [%]	SDME [mg]	RSD [%]	SPME [mg]	RSD [%]	dest. [mg]	RSD [%]
$\alpha$ -Pinen	5,15	3,41	3,64	2,47	3,52	2,10	16,26	5,69	11,87	1,94	15,37	3,48
Myrcen	17,72	7,78	3,99	0,95	29,44	0,36	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
1,4-Cineol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	0,62	2,92	0,37	6,08	1,06	1,54
Eucalyptol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Limonen	247,98	3,00	331,50	2,10	118,01	4,55	54,89	8,73	44,93	5,49	72,24	4,58
$\alpha$ -Tujon	22,82	8,81	3,37	1,13	13,49	1,15	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Camphor	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	221,02	2,76	91,69	0,63	131,37	6,84
Menthon	308,73	8,51	888,46	0,93	187,66	0,71	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Borneol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	32,59	6,08	11,39	5,43	25,22	4,87
Menthol	828,00	2,64	790,00	2,25	888,32	0,30	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Nerol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---
Carvacrol	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---	< LoQ	---

< LoQ = pod mezí stanovitelnosti (Limit of Quantification); RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Obr. 1. Chromatogram SPME extraktu máty peprné; 1 –  $\alpha$ -pinen, 2 – myrcen, 3 – limonen, 4 –  $\alpha$ -tujon, 5 – menthon, 6 – mentholObr. 2. Chromatogram SDME extraktu máty peprné; 1 –  $\alpha$ -pinen, 2 – myrcen, 3 – limonen, 4 –  $\alpha$ -tujon, 5 – menthon, 6 – menthol

3 typy vláken, nejvyšší citlivost byla pozorována při použití vlákna 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS. Proto bylo toto vlákno zvoleno pro další extrakce. Navážka vzorku byla zvolena 0,5 g sušeného vzorku byliny do 10ml vzorkovací nádoby. Optimalizace extrakční teploty byla provedena následujícím způsobem. Teplota byla měněna od 40 do 90  $^{\circ}\text{C}$  v intervalu po 10  $^{\circ}\text{C}$ , extrakční doba byla 30 min, bylo sledováno množství  $\alpha$ -pinenu, myrcenu,  $\alpha$ -tujonu, a mentonu ve směsi bylin. Bylo pozorováno, že největší plochy píku se vyskytovaly při teplotě 70  $^{\circ}\text{C}$ , proto byla tato teplota zvolena pro další extrakce. K optimalizaci extrakční doby byla stejná směs bylin extrahována při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min. Za optimální byla považována extrakční doba 25 min, při delší době již k nárůstu extrahovaného množství silic nedocházelo.

Pro metodu SDME byl jako extrakční rozpouštědlo použit *p*-xylen, 2  $\mu\text{l}$ . Extrakční teplota byla 70  $^{\circ}\text{C}$ , extrakce probíhala 90 sekund. Navážka vzorku byla 0,5 g sušeného vzorku bylin, extrakční nádobka měla objem 10 ml.

Optimalizované podmínky byly následně aplikovány na reálné vzorky bylin uvedených v experimentální části. Každá extrakce byla provedena třikrát, k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých sloučenin byla použita metoda standardního přídatku. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulkách I a II.

Metody byly porovnány na základě několika kritérií. První bylo založeno na srovnání hodnot LOD (mez detekce) a RSD pro jednotlivé vzorky. Bylo zjištěno, že metoda SDME měla větší citlivost, ale přesnější výsledky poskytla metoda SPME. Porovnáním výsledků kvantitativní analýzy byly různými metodami zjištěny odlišné obsahy silic. Odchytky mohou být způsobeny tím, že všechny metody (SPME, SDME a destilace vodní parou) mají odlišné extrakční mechanismy.

Typické GC-FID chromatogramy extraktů pro mátu peprnou jsou znázorněny na obr. 1 (technika SPME) a na obr. 2 (SDME).

## Závěr

Studie se zabývala izolací silic z bylin pomocí metod mikroextrakce tuhou fází (SPME), mikroextrakce jednou kapkou (SDME) a destilace vodní parou. Analyzované silice byly extrahovány z levandule lékařské, máty peprné, šalvěže lékařské a meduňky lékařské. Nejprve byla provedena optimalizace jednotlivých mikroextrakčních technik a pak jejich porovnání. Získané extrakty byly analyzovány na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Porovnáním LOD a RSD hodnot bylo zjištěno, že metoda SDME je více citlivá v porovnání

s SPME, ale metoda SPME má větší přesnost. Navržené mikroextrakční metody jsou jednoduché na provedení a vhodné pro semi-kvantitativní stanovení silic v bylinách.

*Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantového projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).*

## LITERATURA

1. Pawliszyn J., *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practise*. Wiley-VCH, New York 1997.
2. Dugay J., Miede C., Hennion M.-C.: *J. Chromatogr., A* 795, 27 (1998).
3. Zhang Z., Yang M., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 66, 844 (1994).
4. Jeanot M. A., Cantwell F. F.: *Anal. Chem.* 69, 235 (1997).
5. Zhao E., Han L., Jiang S., Wang Q., Zhou Z.: *J. Chromatogr., A* 1114, 269 (2006).
6. Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: *J. Sep. Sci.* 31, 356 (2008).

## LASEROVÁ ABLACE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V INDUKČNĚ VÁZANÉM PLAZMATU PRO 2D MAPOVÁNÍ MOČOVÝCH KAMENŮ

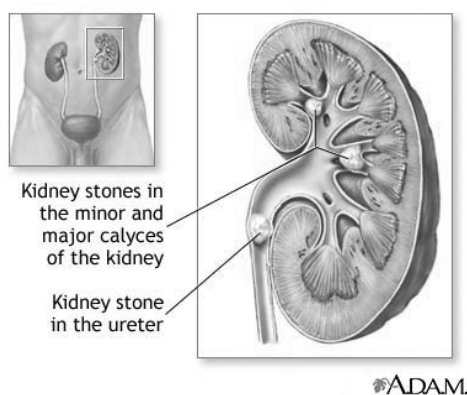
MONIKA NOVÁČKOVÁ, MARKÉTA HOLÁ  
a VIKTOR KANICKÝ

Oddělení analytické chemie, Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
monikanovackovam@seznam.cz

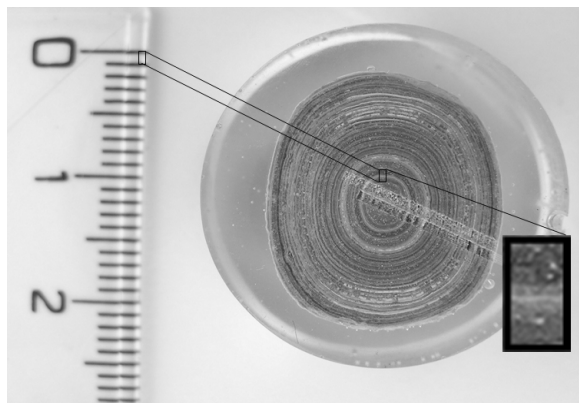
### Úvod

Tvorba močových kamenů je jedním z nejčastějších onemocnění a na jeho léčbu je vynakládáno značné množství finančních prostředků<sup>1</sup>. Onemocnění močovými kameny je pro pacienta nepříjemné a bolestivé. Jednou z nejnepříjemnějších stránek tohoto onemocnění je dlouhodobá léčba. Toto onemocnění se ve velké většině případů bohužel vrací<sup>2</sup>. Močové kameny jsou útvary pro lidské tělo cizí, tvoří se v ledvinách a při uvolnění putují močovodem do močového měchýře (obr. 1). Přesný důvod jejich vzniku zatím není znám, jako možné důvody jsou uváděny geneticky získané předpoklady jako odlišná stavba ledvin a metabolická porucha, složení stravy a nedostatek tekutin a také těžké kovy<sup>3</sup>.

V minulosti byly močové kameny většinou rozpouštěny a zkoumány metodami, které kvantifikovaly a kvalifikovaly látky, z nichž jsou močové kameny složeny. Jejich struktura a samotné zárodečné jádro tak unikly pozornosti. Tím, jak se zdokonalují přístroje, je možné separovat a analyzovat menší množství materiálu. Například pomocí laseru je možné z velkého nehomogenního vzorku analyzovat přesně tu část, která je pro nás zajímavá (laserová ablace). K tomuto účelu je možné použít laser. Laserová ablace se nejčastěji používá ve spojení se spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (ICP), ať už s optickou (ICP-



Obr. 1. Tvorba močových kamenů v ledvinách<sup>4</sup>



Obr. 2. Řez močového kamene, zalitého v epoxidové pryskyřici. V pravém dolním rohu je v obdélníku zvětšenina, jejíž delší strana je 1 mm

OES) nebo hmotnostní (ICP-MS) detekcí<sup>5</sup>. V dnešní době je dobře známo, z jakých látek se močové kameny převážně skládají, jsou to jednoduché látky, apatity, oxaláty, kyselina močová<sup>6</sup>, a proto nám stačí znát poměr prvků, abychom určili složení vzorku. Močový kámen má vrstevnatou strukturu, jednotlivé vrstvy jsou přírůstkovými liniemi, vzniklými za určité časové období<sup>3</sup>. Na obrázku (obr. 2) je znázorněn řez močovým kamenem, delší strana obdélníku, který označuje výřez, je 1 mm dlouhá a je přes tři různé vrstvy. Šířka jednotlivých vrstev se pohybuje většinou kolem 50  $\mu\text{m}$ , a proto se laserová ablace jeví jako velmi vhodná metoda k analýze zárodečného jádra i okrajových částí močového kamene.

Jelikož není možné opakovat měření, musíme optimalizovat metodu, kterou budeme močové kameny zkoumat. Parametry, které hrají významnou roli, jsou: frekvence pulsů, průměr a energie laserového paprsku, rychlost posuvu vzorku a integrační doba hmotnostního spektrometru. Na průměru laserového paprsku záleží, zda je ablatována jedna, nebo více vrstev. Energie laserového paprsku ovlivňuje množství ablatovaného materiálu. Frekvence pulsů laserového paprsku určuje počet pulsů za sekundu, a tudíž udává, jak často je odebrán vzorek k analýze. Rychlost posuvu vzorku ovlivňuje, kolikrát dopadne paprsek na stejné místo. Hodnota integrační doby stanovuje čas, po který je snímán signál daného izotopu.

Cílem této práce je zjištění možností laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (LA-ICP-MS) pro 2D mapování močových kamenů. Práce zahrnovala studium vlivu parametrů laseru a hmotnostního spektrometru na intenzitu a stabilitu signálu a oddělení linií močového kamene. Zkoumanými parametry byla frekvence pulsů, průměr a energie laserového

paprsku, rychlost posuvu vzorku a integrační doba hmotnostního spektrometru.

### Experimentální část

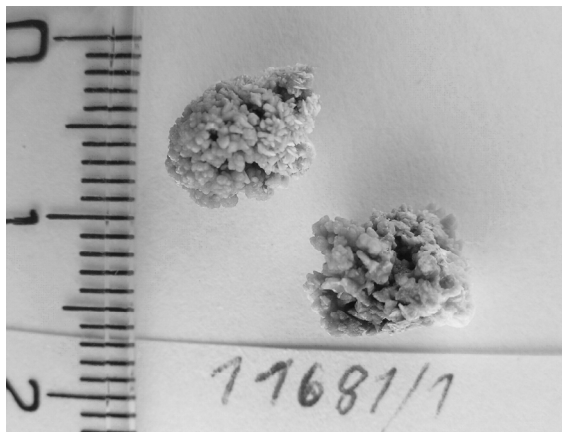
Vzorky močových kamenů se k analýze ve většině případů dostávají z nemocnice v celku (obr. 3). Je potřeba je upravit, tak aby na nich mohlo být provedeno měření. Úprava pro laserovou ablací může být provedena dvěma způsoby, jejichž výsledkem je buď tenký výbrus na podložním sklíčku, nebo tlustší řez zalitý do epoxidové pryskyřice. V obou případech je konečným krokem vyleštění řezu (obr. 4).

Upravené vzorky byly analyzovány laserem (Nd:YAG laser UP-213), ablatovaný materiál byl ionizován v indukčně vázaném plazmatu a detegován

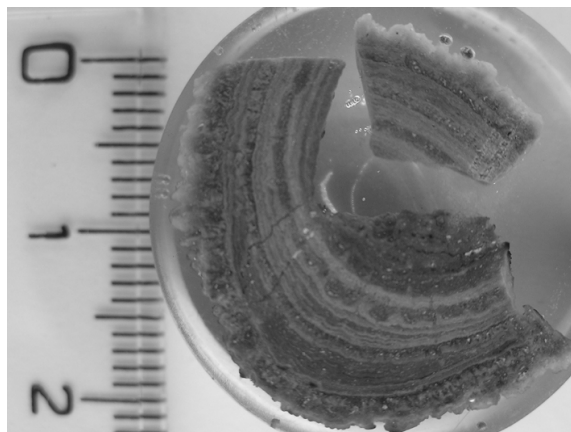
v hmotnostním spektrometru (ICP-MS Agilent 7500ce). Pro zkoumané parametry byly vybrány dvě až tři hodnoty, které by teoreticky měly být vhodné k měření. Pro průměr laserového paprsku byly vybrány hodnoty 25  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , pro energii laserového paprsku byly vybrány hodnoty 40 %, 55 %, 70 % (hustota zářivého výkonu 1,2 J  $\text{cm}^{-2}$ , 9,9 J  $\text{cm}^{-2}$ , 20,9 J  $\text{cm}^{-2}$ ), pro frekvenci pulsů laserového paprsku byly vybrány hodnoty 5 Hz, 10 Hz, pro rychlost posuvu vzorku byly vybrány hodnoty 30  $\mu\text{m s}^{-1}$ , 60  $\mu\text{m s}^{-1}$ , 80  $\mu\text{m s}^{-1}$ , pro integrační dobu hmotnostního spektrometru byly vybrány hodnoty 0,05 s a 0,01 s.

### Výsledky a diskuse

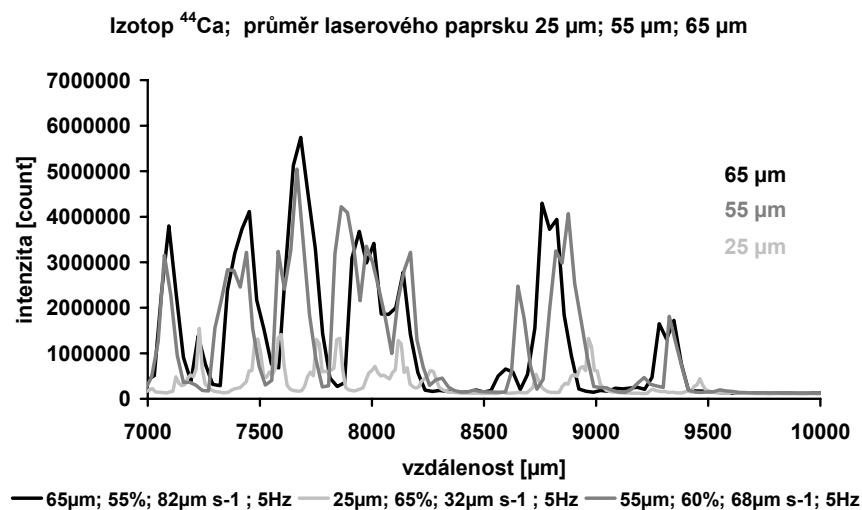
Z grafu 1 je patrná zvyšující se intenzita signálu s poloměrem laserového paprsku. Velikost průměru lasero-



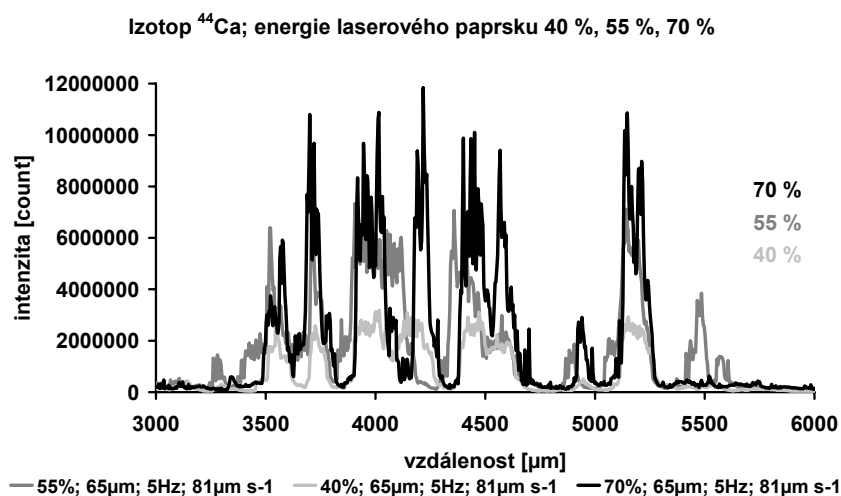
Obr. 3. Močové kameny bez úpravy



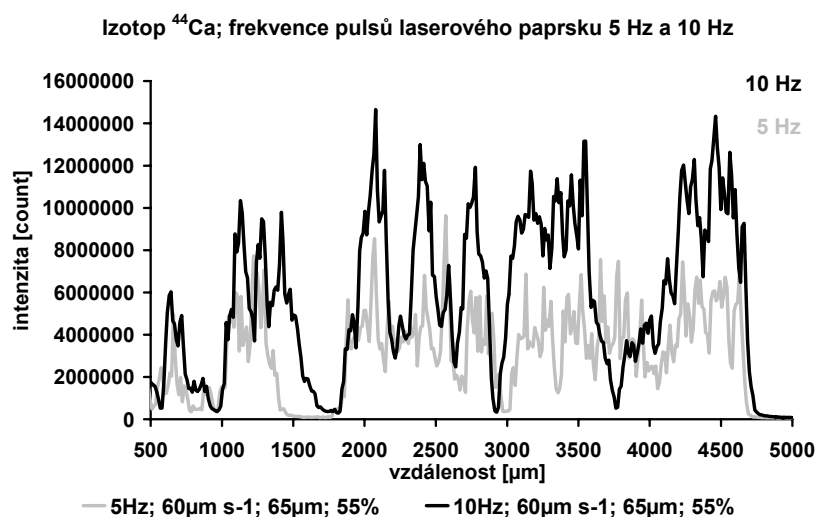
Obr. 4. Vyleštěný řez močového kamene zalitého v epoxidové pryskyřici



Graf 1. Vliv průměru laserového paprsku na intenzitu, stabilitu signálu a oddělení přírůstkových linií močového kamene



Graf 2. Vliv energie laserového paprsku na intenzitu, stabilitu signálu a oddělení přírůstových linií močového kamene



Graf 3. Vliv frekvence pulsů laserového paprsku na intenzitu, stabilitu signálu a oddělení přírůstových linií močového kamene

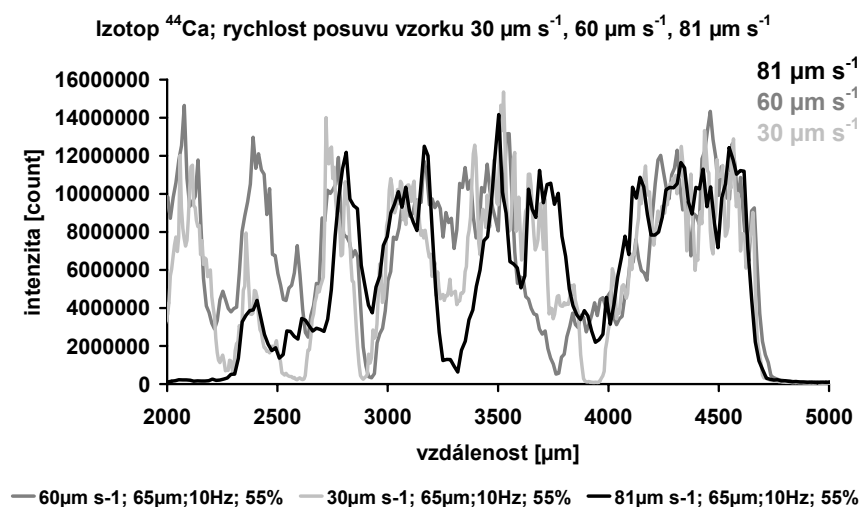
vého paprsku nemá vliv na stabilitu signálu a oddělení přírůstových linií močového kamene, avšak hodnota 65  $\mu\text{m}$  je hraniční hodnotou, kterou lze použít, protože okrajové linie močového kamene mají cca 50  $\mu\text{m}$ . Mezi intenzitami signálu pro poloměr laserového paprsku 65  $\mu\text{m}$  a 55  $\mu\text{m}$  není významný rozdíl. Proto doporučujeme hodnotu průměru laserového paprsku 55  $\mu\text{m}$ .

Z grafu 2 vyplývá zvyšující se intenzita signálu s energií laserového paprsku, avšak snižuje stabilitu signálu, velikost průměru laserového paprsku nemá vliv na oddělení přírůstových linií močového kamene. Proto doporu-

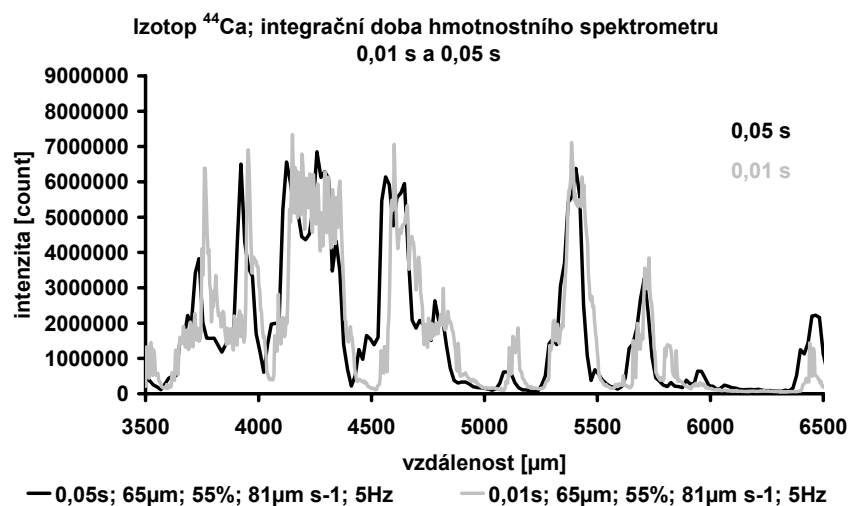
čujeme hodnotu energie laserového paprsku 70 %.

Z grafu 3 je patrná zvyšující se intenzita signálu i oddělení přírůstových linií močového kamene s frekvencí pulsů laserového paprsku, na stabilitu signálu frekvence pulsů laserového paprsku nemá vliv. Frekvence pulsů laserového paprsku 10 Hz je hraniční hodnotou, kterou lze použít, protože při vyšších hodnotách by docházelo k propalování do jiných vrstev močového kamene. Proto doporučujeme hodnotu frekvence pulsů laserového paprsku 10 Hz.

Z grafu 4 je patrné, že na intenzitu signálu rychlost



Graf 4. Vliv rychlosti posuvu vzorku na intenzitu, stabilitu signálu a oddělení přírůstových linií močového kamene



Graf 5. Vliv integrační doby hmotnostního spektrometru na intenzitu, stabilitu signálu a oddělení přírůstových linií močového kamene

posuvu nemá vliv, hodnota  $81 \mu\text{m s}^{-1}$  nedostatečně vykresluje jednotlivé linie močového kamene oproti  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  a  $30 \mu\text{m s}^{-1}$  má nestabilnější signál. Proto doporučujeme hodnotu rychlosti posuvu vzorku  $60 \mu\text{m s}^{-1}$ .

Z grafu 5 vyplývá, že na intenzitu signálu a oddělení linií močového kamene integrační doba hmotnostního spektrometru nemá vliv, kratší integrační doba hmotnostního spektrometru je sice nestabilnější, avšak čím kratší je integrační doba hmotnostního spektrometru, tím více izotopů je možné během jednoho pulsu laserového paprsku změřit. Proto doporučujeme hodnotu integrační doby

hmotnostního spektrometru  $0,01 \text{ s}$ .

### Závěr

Ze zjištěných vlivů jednotlivých parametrů na průběh a stabilitu signálu LA-ICP-MS při 2D mapování močových kamenů můžeme pro měření doporučit hodnoty jednotlivých parametrů uvedené v tabulce I.

Závěrem lze konstatovat, že při měření metodou laserové ablace by za těchto podmínek nemělo docházet



## Tabulka I

Doporučené hodnoty pro jednotlivé parametry LA-ICP-MS

Zkoumané parametry	Vhodné hodnoty pro LA-ICP-MS
Průměr laseru	55 $\mu\text{m}$
Energie laseru	55 %
Frekvence pulsu	10 Hz
Rychlost posuvu	60 $\mu\text{m s}^{-1}$
Integrační doba	0,01 s

ke zkrácení výsledků, intenzita signálu je dostačující a jednotlivé přírůstové linie močového kamene jsou dostatečně oddělené.

Za budoucí cíle si klademe zjištění typu závislosti jednotlivých parametrů na intenzitu a stabilitu signálu LA-ICP-MS. Studium bude provedeno na homogenním materiálu, který je svými vlastnostmi a složením podobný močovým kamenům.

Jako další cíl si klademe přepočítávání intenzit signálu na koncentrace pomocí dostupných standardů.

Konečným krokem by měla být kvalitativní a kvantitativní 2D analýza zájmových prvků v jádře a okrajových částech močového kamene a statistické zpracování výsledků.

*Výzkum byl finančně podporován Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 203/09/1394).*

## LITERATURA

1. Sperrin M., Rogers K., Lane D., Southerden P.: J. Mater. Sci.: Mater. M. 13, 7 (2002).
2. Unal D., Yeni E., Verit A., Karatas O. F.: Int. Urol. Nephrol. 37, 447 (2005).
3. Zvara V., Revúsová V.: *Močové konkrementy*. Veda, Vydavateľstvo slovenskej akademie vied, Bratislava 1988.
4. [http://www.ehow.com/how\\_2112639\\_encourage-kidney-stones-pass.html](http://www.ehow.com/how_2112639_encourage-kidney-stones-pass.html), staženo dne 1. ledna 2009.
5. Engst P., Horák M.: *Aplikace laserů*. Nakladatelství technické literatury, Praha 1989.
6. <http://www.calculi.cz/kameny.php>, staženo dne 1. ledna 2009.

## KONFORMAČNÍ STUDIE POLY- $\gamma$ -BENZYL-L-GLUTAMÁTU METODOU VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

PAVLÍNA NOVOTNÁ<sup>a</sup> a MARIE URBANOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice

Novotnap@vscht.cz

### Úvod

Polypeptidy jsou významné látky především díky jejich blízkému vztahu k proteinům. Kromě chemického složení jsou unikátní a různorodé vlastnosti proteinů dány především konfigurací jejich řetězce a pořadím a počtem aminokyselin v řetězci. Jedinečnou příležitostí, jak zkoumat vzájemné vztahy mezi těmito základními vlastnostmi určujícími funkci a strukturu proteinů, je studium syntetických polypeptidů, jako poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu (PBLG).

Polypeptid PBLG vykazuje topologickou chiralitu. Jeho konformace a agregační stav jsou výrazně závislé na použitém rozpouštědle a koncentraci. Představuje tak velmi dobrý modelový systém pro studium biologicky významných interakcí v závislosti na použitém rozpouštědle a tím i na struktuře použité chirální matrice. Právě chiralita je důležitou vlastností charakterizující živé organismy. Biologicky významné molekuly jsou často chirální a jejich enantiomery se navíc mnohdy v přírodě vůbec nevyskytují. Také většina reakcí v lidském těle probíhá za účasti jednoho i ze stovek možných stereoisomerů. Stereospecifičnost takových reakcí je pak často založena právě na interakci chirálních látek a na ovlivňování jejich konformace. Sledování systémů, jako např. PBLG v různých rozpouštědlech, vede k bližšímu pochopení konformačních a agregačních změn přírodních polypeptidů či proteinů, což je jeden z prvních kroků k pochopení stereospecifických reakcí probíhajících v živých organismech.

Chirální molekuly absorbují v jiné míře levo- a pravotočivé cirkulárně polarizované záření. Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl absorbance vlevo a vpravo cirkulárně polarizovaného záření. Při použití záření v infračervené oblasti spektra dochází k přechodům mezi vibračními hladinami molekuly a jedná se o vibrační cirkulární dichroismus (VCD)<sup>1</sup>.

Vlastnosti syntetických polypeptidů byly charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod. VCD nabízí alternativní pohled na PBLG s výhodami<sup>1</sup> oproti běžnějšímu elektronovému cirkulárnímu dichroismu (ECD) a infračervené (IČ) spektroskopii.

Pro konformační a agregační stav PBLG je důležitá především polarita a acidita rozpouštědla. V rozpouštědlech, jako trichlormethan, benzen či nitrobenzen, zaujímá PBLG  $\alpha$ -helikální konformaci<sup>2</sup>, která je stabilizována

intramolekulárními vodíkovými můstky. Dochází zde k molekulární asociaci za vzniku agregátů. Roztok PBLG má pak z tohoto důvodu velmi velkou viskozitu – převládá zde interakce polymer-polymer nad interakcí polymer-rozpouštědlo. Možnost tvorby vodíkových můstků mezi polymerem a rozpouštědlem je zde tudíž minimální. Naopak, tvoří se intermolekulární vodíkové vazby typu „end to end“ (antiparalelní) a „side-by-side“ v nepolárním benzenu, benzylalkoholu a dioxanu a typu „head-to-tail“ v trichlormethanu<sup>3,4</sup>. V asociátech si PBLG většinou ponechává svou nativní helikální konformaci. Po překročení určité kritické koncentrace dochází v těchto roztocích ke vzniku chirálních struktur, tzv. kapalných cholesterických krystalů<sup>5</sup>. Molekuly jsou v nich orientovány ve vrstvách, v nichž jsou osy molekul navzájem rovnoběžné, ale v každé vrstvě je směr os molekul oproti osám molekul v předchozí vrstvě pootočen. Tak vzniká helikální struktura – tzv. superhelix. Ta vykazuje vysokou optickou aktivitu<sup>5</sup>, která vysvětluje velmi silný signál ve VCD pozorovaný pro cholesterické krystaly<sup>10</sup>.

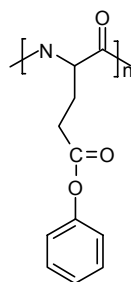
V kyselých rozpouštědlech, jako je trifluoroctová kyselina (TFA), naopak molekuly PBLG neasociují a PBLG nabývá konformace polyprolin II<sup>6</sup>. Velký význam mají především sekundární interakce mezi rozpouštědlem a polypeptidovým řetězcem<sup>6</sup>. Konformace polyprolin II byla dříve označována jako „random coil“, statistické klubko. ECD<sup>7</sup> a VCD<sup>8</sup> studie ale prokázaly, že se jedná o lokálně pravidelnou strukturu tvořenou levotočivými helikálními úseky. Metoda VCD se zde ukázala mnohem vhodnější k rozpoznávání struktury polyprolin II než ECD<sup>8</sup>.

V této práci jsou metodou VCD doplněnou o IČ absorpční spektroskopii charakterizovány jednotlivé zmíněné konformace, sledována agregace a hledány podmínky pro realizaci různých konformačních forem PBLG v roztoku.

### Experimentální část

Pro tuto práci byl použit poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamát (obr. 1) s průměrnou molekulovou hmotností 69 000 g mol<sup>-1</sup> (Sigma), tedy polymer střední délky řetězce. K přípravě roztoků byla použita deuterovaná rozpouštědla trichlormethan-d1, trifluoroctová kyselina-d1, benzen-d6 a nitrobenzen-d5 (vše Sigma).

Spektrální měření byla prováděna na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) ve spektrální oblasti 1800–1400 cm<sup>-1</sup> s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup>. Spektra VCD jsou průměrem ze 6 bloků, každý měřený 20 min, a jsou normována na jednotkovou hodnotu absorbance pásu amidu I. Před a po měření VCD byla změněna absorpční spektra z důvodu kontroly stálosti a homogenity studovaného vzorku. V některých uvedených spektrech

Obr. 1. Strukturální vzorec poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu (PBLG)

byly vynechány určité spektrální oblasti z důvodu vysoké absorpce rozpouštědel, která by mohla vést ke vzniku nežádoucích artefaktů ve VCD spektru. Byly použity skládané kyvety tvořené okny z  $\text{CaF}_2$  a teflonovou distanční folií o tloušťce 50  $\mu\text{m}$  (25  $\mu\text{m}$  pro kapalně krystaly).

VCD signál byl korigován na nulovou linii, kterou představovala spektra příslušných rozpouštědel měřených za stejných podmínek jako roztoky vzorků. Absorpční spektra byla také korigována na signál rozpouštědla.

Roztoky PBLG v  $\text{CDCl}_3$ , benzeno- $d_6$ , nitrobenzeno- $d_5$  a směsném rozpouštědle  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$  byly měřeny pro hmotnostní koncentraci  $\rho = 30 \text{ g l}^{-1}$ , objemové zlomky TFA ve směsných rozpouštědlech měly hodnoty 0,05; 0,1; 0,15 a 0,20.

Kapalně krystaly byly připraveny z roztoku polypeptidu v benzeno- $d_6$  o hmotnostní koncentraci  $50 \text{ g l}^{-1}$ . Vysoce viskózní roztok byl nanesen přímo na spodní okno kyvety ( $\text{CaF}_2$ ) do prostoru vymezeného teflonovou folií, kde se odpařil zbytek rozpouštědla, aby byla dosažena koncentrace nutná k vytvoření krystalů, a poté byla kyveta sestavena běžným způsobem.

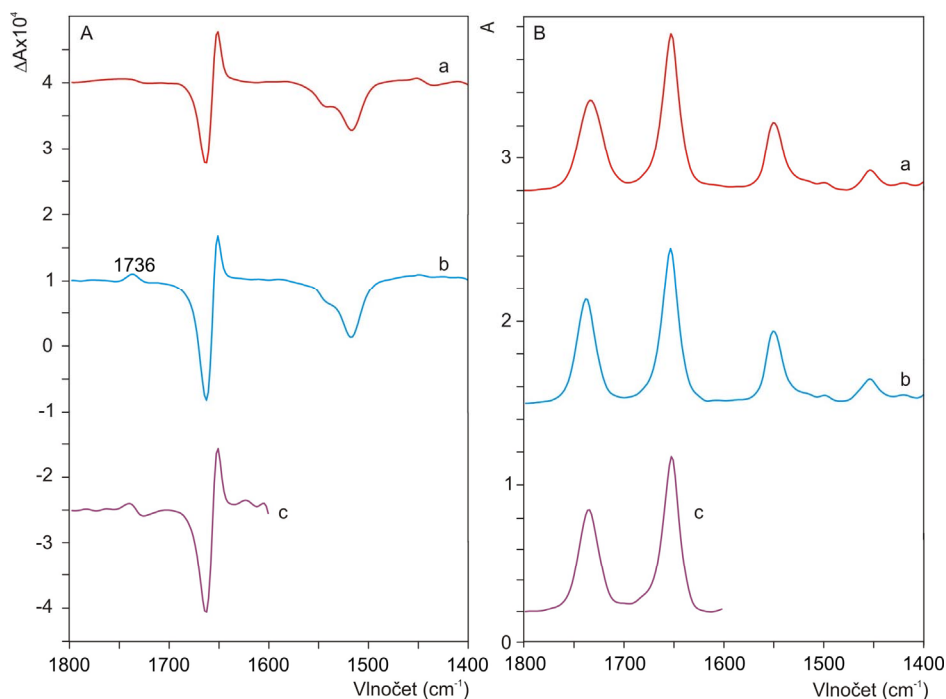
## Výsledky a diskuse

### Asociované formy PBLG

Na obr. 2 jsou VCD a absorpční spektra PBLG v  $\text{CDCl}_3$ , benzeno- $d_6$  a nitrobenzeno- $d_5$ , která mají obdobný průběh – pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I se středem u  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , který je charakteristický pro  $\alpha$ -helikální konformaci<sup>9</sup>. Vzhledem k citlivosti VCD spekter ke struktuře peptidů je možné toto pozorování interpretovat tak, že  $\alpha$ -helix je základní sekundární strukturou PBLG v těchto roztocích. Nicméně jednotlivá spektra nejsou zcela totožná.

V benzeno- $d_6$  je negativní signál coupletu v oblasti amidu I intenzivnější než v  $\text{CDCl}_3$ . Zesílení intenzity negativního pásu je patrné i ze spektra PBLG v nitrobenzeno- $d_5$ . V roztocích benzeno- $d_6$  a nitrobenzeno- $d_5$  se objevuje nový pozitivní VCD signál u  $1736 \text{ cm}^{-1}$ , navíc je patrné i zesílení intenzity tohoto pásu v absorpčním spektru.

Zesílení intenzity negativního signálu coupletu amidu



Obr. 2. VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v  $\text{CDCl}_3$  (a), v benzeno- $d_6$  (b) a v nitrobenzeno- $d_5$  (c); spektrální oblast 1620 až  $1400 \text{ cm}^{-1}$  byla u posledního spektra vynechána z důvodu vysoké absorpce nitrobenzeno- $d_5$

I oproti pozitivnímu signálu je patrné u všech tří roztoků a mohlo by být projevem interakce mezi šroubovicemi, neboť signál charakteristický pro  $\alpha$ -helix vykazuje větší vyrovnanost obou pásů coupletu amidu I<sup>9</sup>. Jiná intenzita tohoto signálu v benzeno-d6 a nitrobenzeno-d5 ukazuje buď na jiný způsob agregace šroubovic než v roztoku CDCl<sub>3</sub>, nebo na výraznější agregaci, kterou je možno předpokládat i z mnohem viskóznějšího roztoku polypeptidu v benzeno-d6 než v CDCl<sub>3</sub>.

Při agregaci pravděpodobně dochází k mírné deformaci  $\alpha$ -helikální kostry tvorbou intermolekulárních můstků mezi jednotlivými řetězci PBLG, která se odráží ve změně poměru intenzity obou pásů. V benzeno-d6 a nitrobenzeno-d5 je tato interakce ještě zesílena přítomností benzenových jader v rozpouštědle. Solvatační efekt benzeno-d6 a nitrobenzeno-d5 je tak jiný než CDCl<sub>3</sub> a pravděpodobně podporuje vznik  $\pi$ - $\pi$  interakcí. Důsledkem těchto interakcí je i pozitivní VCD signál u 1736 cm<sup>-1</sup> v obou spektrech a zesílení intenzity tohoto signálu v absorpčním spektru. Signál VCD u 1736 cm<sup>-1</sup> byl pozorován dříve pro roztoky PBLG v benzeno-d6 a interpretován jako důsledek vlivu chirálního uspořádání polypeptidové matrice na C=O skupinu esteru v postranním řetězci polypeptidu<sup>10</sup>. Ve spektru PBLG v CDCl<sub>3</sub> tento signál není patrný. Benzylové kruhy v postranním řetězci PBLG jsou totiž z důvodu výše uvedené interakce více stabilizovány v roztocích obsahujících benzenová jádra než v CDCl<sub>3</sub>, nemohou již

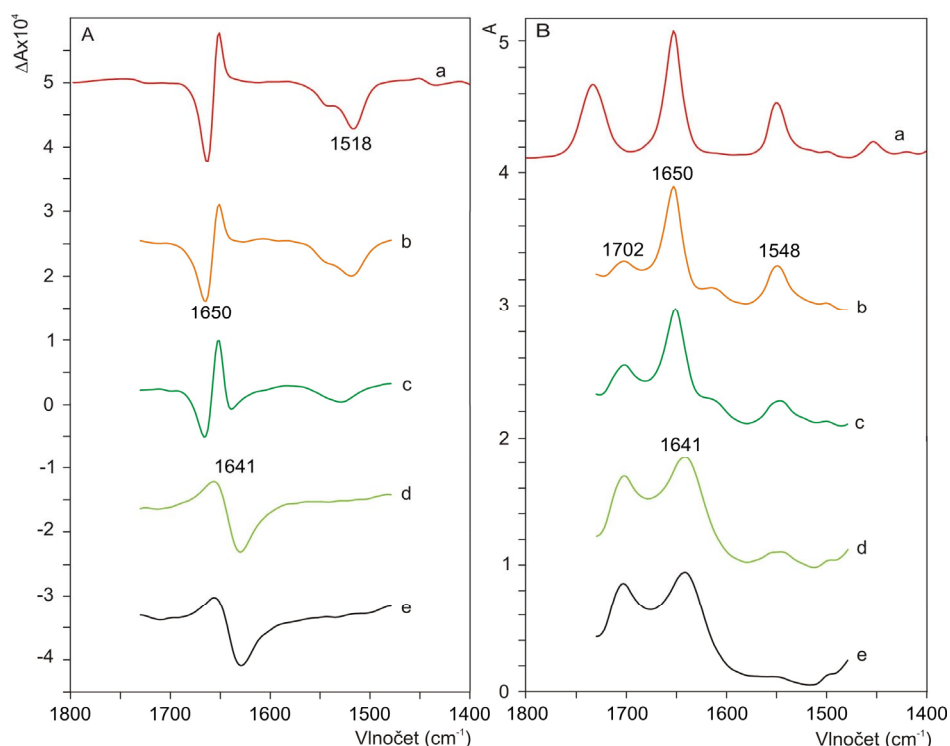
tedy volně rotovat kolem esterové vazby, což se projeví na zesílení jejího signálu<sup>10</sup>.

Důsledkem silnější agregace PBLG v benzeno-d6 než v CDCl<sub>3</sub> je i tvorba kapalných krystalů PBLG v benzeno-d6 při nižších koncentracích PBLG než v roztoku CDCl<sub>3</sub>.

#### Závislost struktury PBLG na složení směšného rozpouštědla CDCl<sub>3</sub>/TFA

Na obr. 3 jsou uvedena spektra PBLG v CDCl<sub>3</sub> a poté ve směšném rozpouštědle CDCl<sub>3</sub>/TFA o různém obsahu TFA. S postupným zvyšováním obsahu kyseliny dochází ke změnám jak v absorpčním, tak ve VCD spektru. Intenzita absorpčního pásu u 1548 cm<sup>-1</sup> se s přidávkou kyseliny snižuje. Naopak přibližně současně narůstá intenzita pásu u 1702 cm<sup>-1</sup>. Ve VCD spektrech lze ovšem pozorovat výraznější změny. Zvyšováním obsahu TFA v rozpouštědle do 10 obj.% dochází k vyrovnání intenzity pásů coupletu v oblasti amidu I, poté se při přidávku kyseliny na 15 obj.% změni znaménka pásů coupletu a pás se posune k nižším vlnovým – střed pásu z 1650 na 1641 cm<sup>-1</sup>. Současně se posouvá i pás absorpčního spektra. Ke změnám dochází také v oblasti amidu II – intenzita VCD pásu u 1518 cm<sup>-1</sup> se postupně snižuje.

Změny intenzit absorpčních pásů 1548 a 1702 cm<sup>-1</sup> lze vysvětlit následovně. V obou případech se jedná o vib-



Obr. 3. VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v CDCl<sub>3</sub> (a), ve směšném rozpouštědle CDCl<sub>3</sub>/TFA – 5 obj.% TFA (b), 10 obj.% TFA (c), 15 obj.% TFA (d) a 20 obj.% TFA (e); některé spektrální oblasti byly u spekter pro PBLG ve směšném rozpouštědle vynechány, z důvodu vysoké absorbance TFA

race volných koncových skupin řetězce polypeptidu, pás u  $1548\text{ cm}^{-1}$  je přiřazen asymetrické vibraci  $\text{COO}^-$ , pás u  $1702\text{ cm}^{-1}$  pak vibraci  $\text{C=O}$  nedisociované skupiny  $\text{COOH}$ . S přidáním kyseliny roste kyselost roztoku a tudíž ubývá volných disociovaných skupin  $\text{COO}^-$ , naopak roste počet skupin  $\text{COOH}$ , odtud také proporcionální změna intenzity obou pásů.

Vyrovnění intenzity coupletu amidu I ve VCD spektru může být spojeno s klesající intenzitou agregace jednotlivých šroubovic. Mnohem více polární a kyselé rozpouštědlo TFA zabráňuje asociaci tím, že interakcí TFA-PBLG konkuruje tvorbě intermolekulárních vodíkových můstek mezi molekulami PBLG. Tyto změny lze pozorovat i na základě konzistence vzorku. Při obsahu 10 obj.% TFA v rozpouštědle je viskozita vzorku malá, nedochází tedy pravděpodobně k výrazné molekulární asociaci PBLG a pozorovaná intenzita negativního a pozitivního pásu coupletu je stejná. To, že vyrovnění obou pásů není způsobeno pouhou konkurencí spektrálních pásů struktury polyprolin II a  $\alpha$ -helix, je patrné z absorpčního spektra, kde nedochází k postupnému posunu polohy pásu amidu I. Jeho poloha se mění skokově z  $1650$  na  $1641\text{ cm}^{-1}$  až se změnou znamének coupletu.

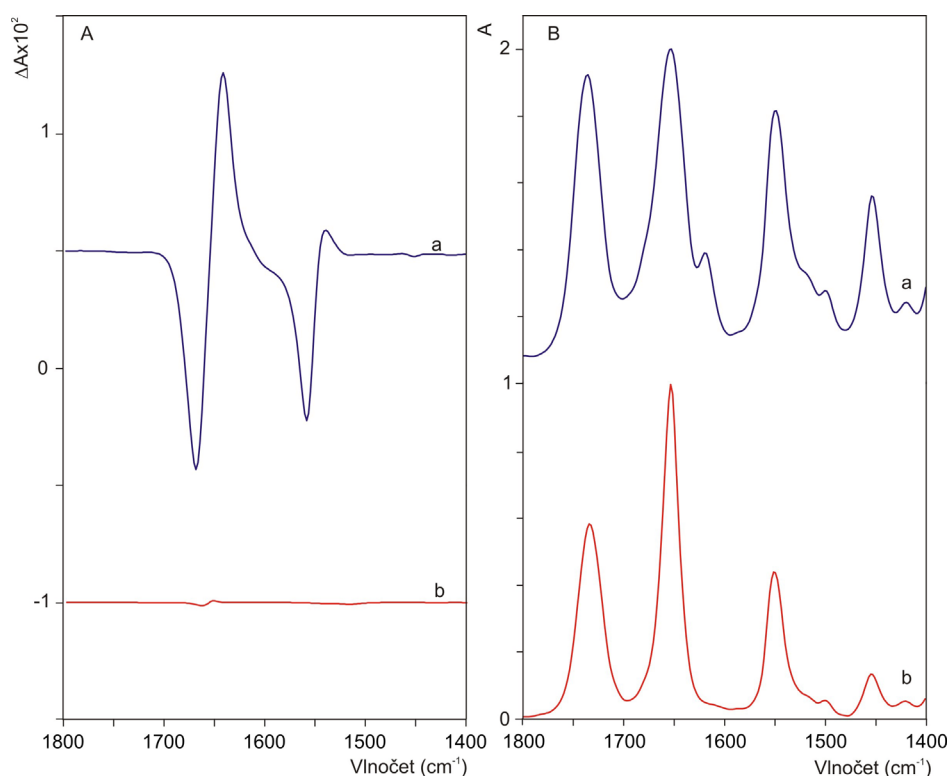
Při obsahu kyseliny 15 obj.% TFA v rozpouštědle dochází ke změně znamének pásů coupletu amidu I a k posunu celého tohoto pásu. Sledované změny lze vysvětlit změnou konformace z pravotočivé  $\alpha$ -helikální na

strukturu polyprolin II charakterizovanou jako lokální levotočivou šroubovicí<sup>8</sup>. Protože se lokálně mění smysl stáčení šroubovice z pravotočivé na levotočivou, mění se zcela i znaménka VCD pásů v opačná. Posun středu coupletu je taktéž charakteristický pro konformaci polyprolin II<sup>11</sup>. Současný posun pásu absorpčního spektra je způsoben změnou dihedralních úhlů ve struktuře polypeptidu. VCD spektra jsou pro obsah kyseliny 15 a 20 obj.% téměř totožná, z toho je možno usoudit, že již k žádným konformačním ani agregacním změnám nedochází. Postupným přidáváním TFA se navíc snižuje intenzita pásu v oblasti amidu II. Tento efekt je opět v souladu s tvarem spektra pro strukturu polyprolin II<sup>8</sup>.

Získané výsledky tedy interpretujeme tak, že postupným zvyšováním obsahu TFA v roztoku PBLG v  $\text{CDCl}_3$  do 10 obj.% nejprve přestanou jednotlivé šroubovice agregovat a výrazně se sniží viskozita roztoku. V rozmezí obsahu kyseliny 10–15 obj.% dojde k výrazné konformační změně – pravotočivá šroubovice se změní na strukturu polyprolin II. Dalším přidáním TFA do 20 obj.% již k žádným konformačním ani agregacním změnám vzorku nedochází.

#### Kapalné krystaly

Na obr. 4 je uvedeno VCD a absorpční spektrum kapalných krystalů PBLG v benzenu-d6 a pro srovnání



Obr. 4. VCD (A) a absorpční (B) spektrum PBLG v benzenu-d6 nad kritickou koncentrací, při níž se tvoří kapalné krystaly (a), pro srovnání je ve stejném měřítku uvedeno VCD (A) a absorpční (B) spektrum PBLG v  $\text{CDCl}_3$  (b)

i spektrum PBLG v  $\text{CDCl}_3$ , které bylo již uvedeno na obr. 1. Pro srovnání intenzit signálů obou forem PBLG je ve VCD spektru zachováno měřítko, které odpovídá intenzitě VCD pásů kapalných krystalů. Spektra kapalných krystalů jsou zde uvedena bez odečtu rozpouštědla, neboť prakticky nelze určit míru jeho absorpce v tomto systému.

Intenzita VCD signálu kapalných krystalů při srovnatelných hodnotách absorpce je asi stonásobná než u všech ostatních naměřených spekter. Opět je však pozorován pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I, který je charakteristický pro  $\alpha$ -helikální konformaci. Nelze zde již pozorovat signál u  $1736\text{ cm}^{-1}$  typický pro vibraci  $\text{C}=\text{O}$ . Kapalně krystalaly totiž obsahují velmi malé množství rozpouštědla, které je pravděpodobně imobilizováno ve struktuře superhelix, která vzniká agregací jednotlivých šroubovic polypeptidu. Nedochází tak již k tak intenzivnímu propojení mezi jednotlivými šroubovicemi pomocí  $\pi$ - $\pi$  interakcí. To vede k opětovnému uvolnění esterové funkční skupiny a tak k výraznému snížení intenzity tohoto pásu ve spektru.

## Závěr

Výsledky získané v předkládané práci jsou shrnuty do následujících bodů.

1. Jasně se prokázalo, že metoda VCD je velmi citlivou metodou na rozpoznávání jak změn v sekundární struktuře PBLG, tak i jemnějších rozdílů v agregačních stavech. Ve VCD spektru byly ukázány různé agregační stavy PBLG – od specificky organizovaného v benzenu- $d_6$ , který vede až ke vzniku kapalných krystalů, přes slabší agregaci v  $\text{CDCl}_3$ , až po dispergované šroubovice polypeptidu ve směsném rozpouštědle  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$  při 10 obj.% TFA. Toto pozorování odpovídá i konzistenci měřených roztoků.
2. Poprvé byla metodou VCD ukázána závislost sekundární struktury PBLG na složení směsného rozpouštědla  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ . Ve VCD spektrech byly pozorovány charakteristické pásy v oblasti amidu I pro formy  $\alpha$ -helix a polyprolin II. Ke zcela jednoznačnému přechodu mezi oběma formami, jejichž VCD spektra se v oblasti amidu I a II výrazně liší, dochází v rozmezí 10–15 obj.% TFA v rozpouštědle.
3. Bylo pozorováno VCD spektrum kapalných krystalů PBLG v benzenu- $d_6$ , které je charakteristické vysokou intenzitou jednotlivých VCD pásů. Tato tematika však bude kvůli své komplexnosti předmětem dalšího studia, neboť postup pro přípravu vzorků kapalných krystalů vhodných pro měření VCD spekter je třeba dále optimalizovat.

*Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 6046137307).*

*P. N. děkuje za pomoc při počátečních měřeních VCD spekter Ondřeji Julínkovi a Tomáši Krupinskému.*

## LITERATURA

1. Urbanová M., Maloň P., v knize: *Analytical methods in Supramolecular Chemistry* (Schalley C., ed.) Wiley-VCH, Weinheim 2007.
2. Pauling L., Corey R. B.: *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 241 (1951).
3. Chakrabarti S., Miller W. G.: *Biopolymers* 23, 719 (1984).
4. Torii T., Yamashita T., Horie K.: *Eur. Polym. J.* 29, 1265 (1993).
5. Patel D. L., Dupre D. B.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 53, 323 (1979).
6. Elias H. G.: *Int. J. Polym. Mater.* 4, 209 (1976).
7. Berova N., Nakanishi K., Woody R. W.: *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley-VCH 2000.
8. Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
9. Yasui S. C., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986).
10. Palivec L.: *Disertační práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2006.

## KINETICKÉ STUDIUM Ce(III) A Cu(II) KOMPLEXŮ CYKLENOVÝCH DERIVÁTŮ S PENDANTNÍMI SKUPINAMI OBSAHUJÍCÍMI FOSFOR

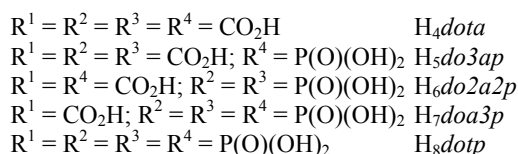
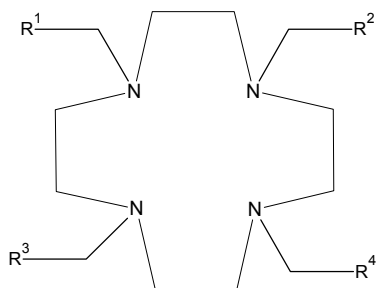
RADEK ŠEVČÍK a PŘEMYSL LUBAL

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně,  
Kotlářská 2, 611 37 Brno  
150735@mail.muni.cz

### Úvod

Polyazamakrocyclické ligandy s koordinujícími pendantními skupinami tvoří stabilní komplexy s celou řadou iontů kovů, které se vyznačují vysokou termodynamickou stabilitou a kinetickou inertností. Těchto jedinečných vlastností se využívá v medicíně jak v léčbě, tak k diagnostickým účelům, kdy vysoká kinetická inertnost komplexu zajišťuje jeho pomalou disociaci a zároveň vzhledem k jeho termodynamické stabilitě *in vivo* pak nedochází k nežádoucímu ukládání iontů kovů v lidském těle.

Nejčastěji se k tvorbě komplexů používají 12- až 14-členné deriváty tetraazamakrocyclů s acetatovými, methylfosfonovými nebo methylfosfinovými pendantními funkčními skupinami, které tvoří s ionty kovů komplexy vhodné pro medicínskou aplikaci. Strukturální faktory, jako je velikost dutiny, rigidita makrocyclického skeletu, typ a pozice donorových atomů hrají zásadní roli při tvorbě komplexu požadovaných vlastností. Ukazuje se, že právě komplexy, které obsahují tetraazamakrocyclický skelet s výše uvedenými pendantními rameny, vykazují vysokou kinetickou inertnost a termodynamickou stabilitu.



Zmiňované komplexy se nejčastěji používají jako bifunkční cheláty komplexující ionty kovů jednak v radiofarmaceutické léčbě (např.  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , aj.) nebo jako:

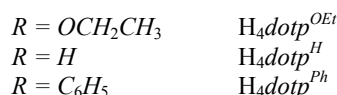
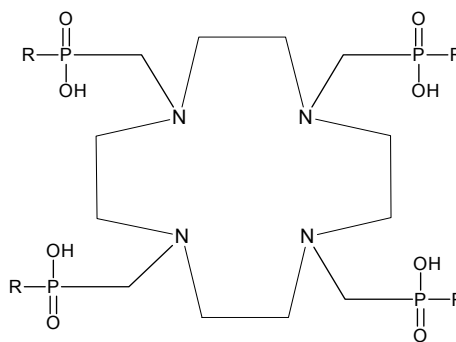
- kontrastní látky v tomografii magnetické rezonance (např.  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) (cit.<sup>1</sup>);
- PET/SPECT sondy (např.  $^{64}\text{Cu}$ ) (cit.<sup>2</sup>);
- luminiscenční sondy v VIS ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ) nebo NIR ( $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ) oblastí<sup>2</sup>.

Také lze využít komplexů tetraazamakrocyclických ligandů pro analytické stanovení Cu(II) iontů<sup>3,4</sup>.

Cílem této práce je studium kyselosti katalyzované disociační kinetiky Ce(III) a Cu(II) komplexů s makrocyclickými ligandy cyklenového typu (cyklen = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan). Strukturální vzorce ligandů jsou znázorněny na obr. 1.

### Experimentální část

Měření byla prováděna na spektrofotometrech Hewlett Packard 8453A (Agilent, USA) a Unicam UV2 (Pye Unicam, UK). Disociační kinetika Ce(III) komplexů byla měřena při teplotách v rozmezí 25–90 °C v 0,05 až 3,00 mol dm<sup>-3</sup> HCl a konstantní iontové síle ( $I = 3$  mol dm<sup>-3</sup> (Na, H)Cl). Disociační kinetika Cu(II) komplexů byla měřena při teplotách 10–60 °C v 0,10–5,00 mol dm<sup>-3</sup> HClO<sub>4</sub> a konstantní iontové síle ( $I = 5$  mol dm<sup>-3</sup> (Na, H)ClO<sub>4</sub>). Koncentrace komplexů byly 0,5·10<sup>-4</sup>–1·10<sup>-3</sup> M. Měření byl prováděna při vlnových délkách 300–327 nm.



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných a diskutovaných ligandů

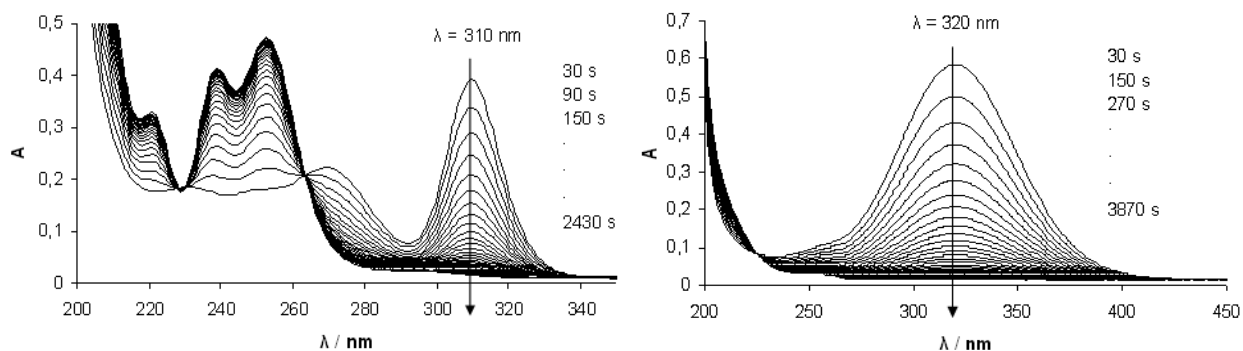
## Výsledky a diskuse

Kyselý katalyzovaný rozklad Cu(II) a Ce(III) komplexů byl sledován z časové změny jejich spekter za daných experimentálních podmínek (viz obr. 2) a z nich pak byly vypočteny rychlostní konstanty pseudo-prvního řádu  $k_{obs}$ , které byly měřeny jako funkce acidity roztoku a teploty (viz obr. 3). Ze závislosti na aciditě roztoku (viz obr. 3) byly pro jednotlivé komplexy vypočteny rychlostní konstanty  $k$ ,  $k_0$  a  $k_H$  (viz obr. 3) a z jejich teplotních závislostí byly vyhodnoceny jejich termodynamické a aktivační parametry.

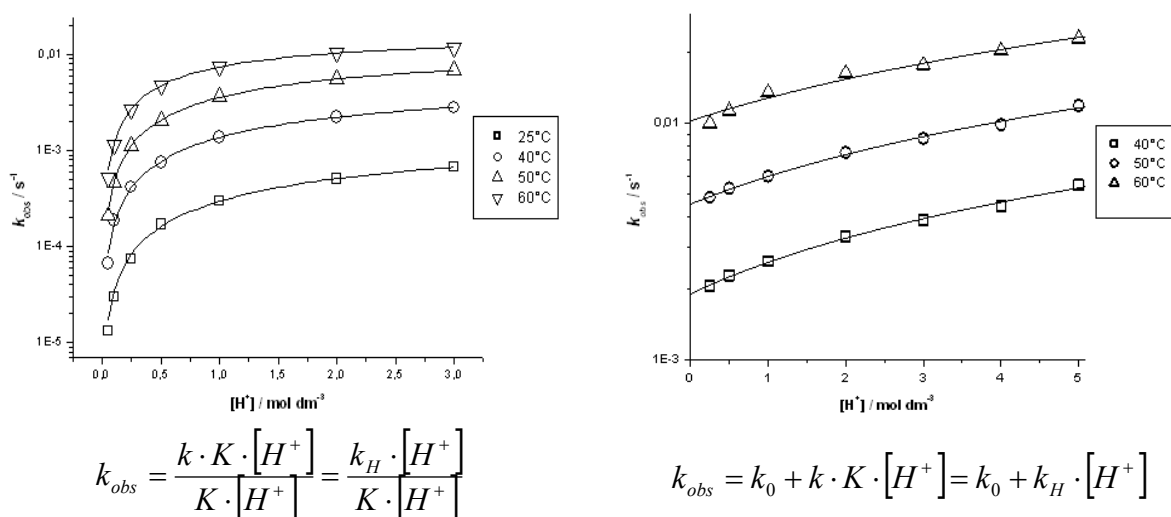
Nejdříve byl studován vliv záměny karboxylové funkční skupiny za skupinu fosfonovou na pendantních ramenech makrocyclů (viz obr. 4 a tab. I). Zatímco u Ce(III) komplexů se pro zvětšující počet fosfonových skupin rychlost dekomplexační reakce snižuje, pro Cu(II) komplexy je tento trend opačný. Významnou roli hraje přístup

protonů do vnitřní dutiny makrocyclického skeletu komplexů. Transfer protonů do dutiny komplexů může být bráněn protonací (formací sítě stálých vodíkových vazeb, např. s kyselinami obsahující fosfor) nebo přítomností hydrofobního substituentu. V případě Cu(II) komplexů, přítomnost nekoordinovaných pendantních skupin pomáhají přenosu protonů k centrálnímu iontu u dutině komplexu během dekomplexační reakce, což pak vede ke snížení jejich kinetické inertnosti.

Ce(III) komplexy obsahující na pendantních ramenech fosfonovou ( $[Ce(dotp)]^{5-}$ ,  $[Ce(dotp^{OEt})]^{-}$ ) nebo fosfinovou skupinu  $[Ce(dotp^H)]^{-}$  podléhají dekomplexační reakci řádově stejnou rychlostí. Ce(III) komplex obsahující fenylofosfinovou pendantní skupinu  $[Ce(dotp^{Ph})]^{-}$  se rozkládá o řád menší rychlostí v důsledku vyšší hydrofobicity této skupiny. Jiná situace nastává u Cu(II) komplexů, kde komplexy  $[Cu(dotp)]^{6-}$ ,  $[Cu(dotp^{OEt})]^{2-}$  a  $[Cu(dotp^{Ph})]^{2-}$  vykazují podobnou inertnost, kdežto komplex  $[Cu(dotp^H)]^{2-}$



Obr. 2. Časová změna spekter komplexů  $[Ce(do2a2p)]^{3-}$  ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí  $3,00 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  při teplotě  $40^\circ \text{C}$  a  $[Cu(do2a2p)]^{4-}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí  $5,00 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$  při teplotě  $25^\circ \text{C}$

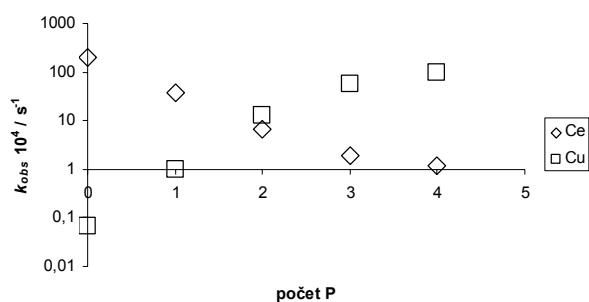


$$k_{obs} = \frac{k \cdot K \cdot [H^+]}{K \cdot [H^+]} = \frac{k_H \cdot [H^+]}{K \cdot [H^+]}$$

$$k_{obs} = k_0 + k \cdot K \cdot [H^+] = k_0 + k_H \cdot [H^+]$$

Obr. 3. Závislost  $k_{obs}$  na aciditě roztoku pro komplexy  $[Ce(do2a2p)]^{3-}$  a  $[Cu(do2a2p)]^{3-}$



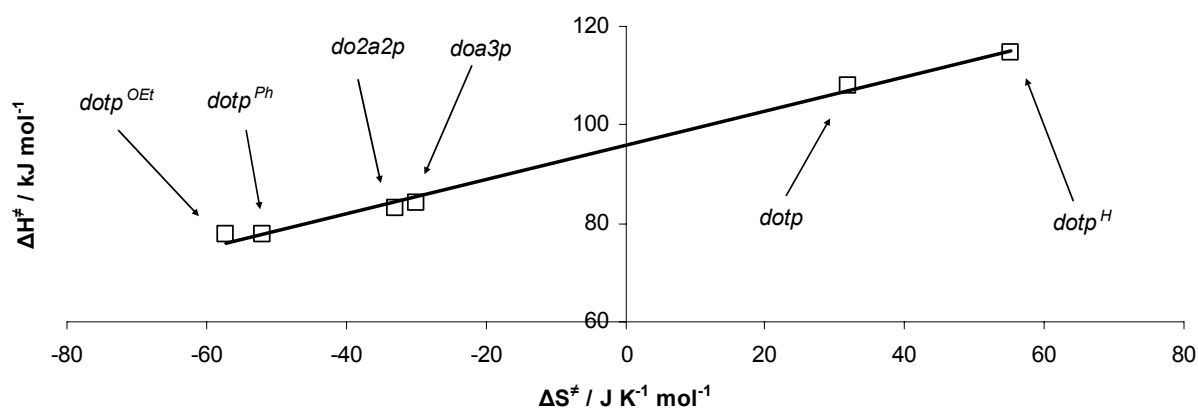


Obr. 4. Vliv záměny karboxylové funkční skupiny za skupinu fosfonovou na pendantních ramenech makrocyclických komplexů

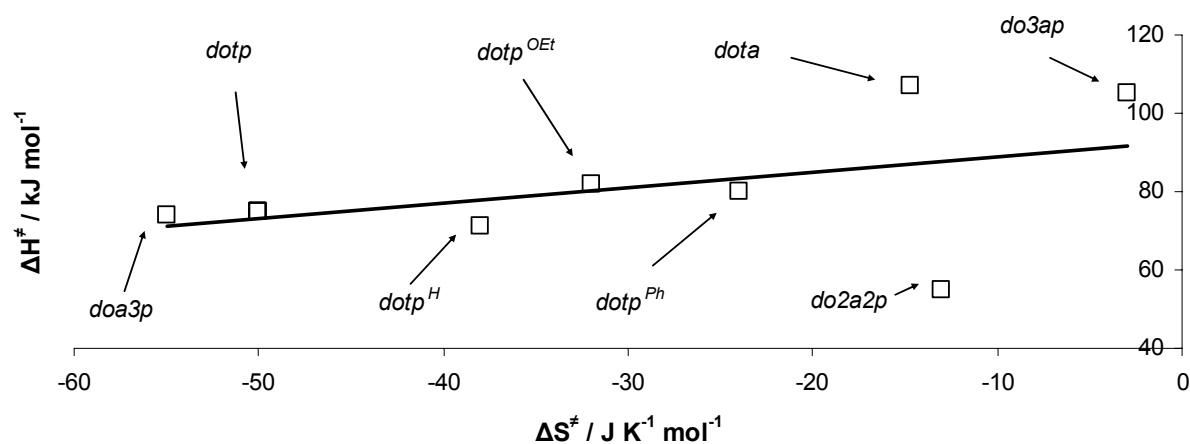
Tabulka I

Hodnoty rychlostních konstant pseudoprvního řádu pro Cu(II) ( $c_{\text{HClO}_4} = 5 \text{ mol dm}^{-3}$ ) a Ce (III) ( $c_{\text{HCl}} = 3 \text{ mol dm}^{-3}$ ) komplexy při teplotě 25 °C

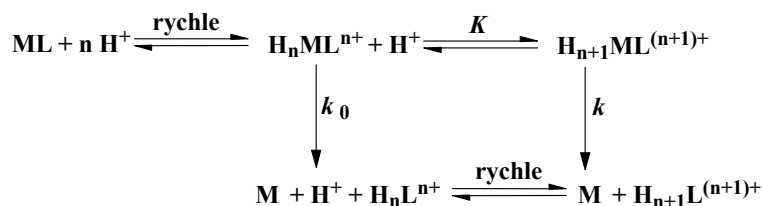
	Ce(III)		Cu(II)	
	$k_{\text{obs}} 10^4 / \text{s}^{-1}$	$\tau_{1/2}$	$k_{\text{obs}} 10^4 / \text{s}^{-1}$	$\tau_{1/2}$
$\text{H}_4\text{dota}$	204 <sup>[5]</sup>	33,97 s	0,0687	28,1 h
$\text{H}_5\text{do3ap}$	36,6 <sup>[6]</sup>	3,16 min	1,00	1,9 h
$\text{H}_6\text{do2a2p}$	6,71	17,21 min	12,8	9,05 min
$\text{H}_7\text{doa3p}$	1,91	1,0 h	58,8	1,97 min
$\text{H}_8\text{dotp}$	1,18	1,6 h	100	1,15 min
$\text{H}_4\text{dotp}^{\text{OEt}}$	1,18	1,6 h	43,8	2,64 min
$\text{H}_4\text{dotp}^{\text{H}}$	1,01	1,9 h	1583	4,38 s
$\text{H}_4\text{dotp}^{\text{Ph}}$	0,01842 <sup>[7]</sup>	10,5 h	48,4	2,39 min



Obr. 5. Isokinetic diagram Ce(III) komplexů vypočtený pro rychlostní konstantu  $k_{\text{H}}$



Obr. 6. Isokinetic diagram Cu(II) komplexů vypočtený pro rychlostní konstantu  $k_{\text{H}}$



Obr. 7. Schéma disociace komplexů

disociuje o řád rychleji. Navíc Ce(III) komplexy s DOTP analogy makrocyclických ligandů jsou kineticky inertnější ve srovnání s Cu(II) komplexy. Na základě isokinetických diagramů (viz obr. 5 a 6) bylo prokázáno, že studované Ce(III) a Cu(II) komplexy disociují podle stejného reakčního mechanismu (viz obr. 7).

## Závěr

Byla studována disociační kinetika Cu(II) a Ce(III) komplexů. Bylo zjištěno, že nahrazením karboxylové funkční skupiny za skupinu fosfonovou se u Ce(III) komplexů rychlost dekomplexační reakce snižuje, naopak opačný trend byl pozorován u Cu(II) komplexů. Vysvětlením je rozdílná koordinační schopnost obou iontů kovů, kdy Ce(III) ion (koordinační číslo 8–9) koordinuje více donorových atomů než Cu(II) ion (koordinační číslo 4–6), a rozdílná schopnost transferu protonů do dutiny makrocyccklu, která se jeví jako rozhodující pro kinetickou inertnost studovaných komplexů.

*Děkuji doc. P. Hermanovi a jeho spolupracovníkům z Katedry anorganické chemie PrF UK a prof. I. Santos (ITN, Sacavém, Portugalsko) za syntézu a poskytnutí studovaných ligandů. Tato práce je podporovaná EU programem COST D38 a grantem MŠMT (LC06035).*

## LITERATURA

1. Hermann P., Kotek J., Kubiček V., Lukeš I.: Dalton Trans. 23, 3027 (2008).
2. Liu S., Edwards D. S.: Bioconjugate Chem. 12, 7 (2001).
3. Svobodová I., Lubal P., Kotek J., Hermann P., Havel J.: J. Incl. Phenomena Macrocycl. Chem. 49, 11 (2004).
4. Svobodová I., Lubal P., Kotek J., Hermann P., Havel J.: Microchim. Acta 148, 21 (2004).
5. Brücher E., Laurenzy G., Makra Z. S.: Inorg. Chim. Acta 139, 141 (1987).
6. Táborský P., Lubal P., Havel J., Kotek J., Hermann P., Lukeš I.: Collect. Czech. Chem. Commun. 70, 1909 (2005).
7. Lubal P., Kývala M., Hermann P., Holubová J., Rohovec J., Havel J., Lukeš I.: Polyhedron 20, 47 (2001).

## INTERAKCE BENZO(c)FENANTRIDINOVÝCH KVARTERNÍCH ALKALOIDŮ S DNA

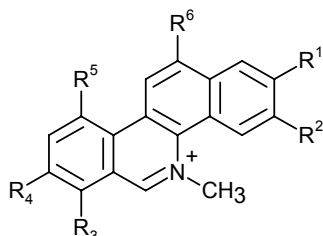
JANA URBANOVÁ<sup>a</sup>, PŘEMYSL LUBAL<sup>a</sup>,  
EVA TÁBORSKÁ<sup>b</sup> a PETR TÁBORSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 2, 625 00 Brno  
jani.urba@gmail.com

## Úvod

Tato práce se zabývá studiem spektrálních, zejména fluorescenčních vlastností sedmi vybraných kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (sanguinarin, chelerythrin, chelirubin, sanguirubin, chelilutin, sanguilutin a makarpin). Dále jsou studovány interakce alkaloidů s DNA s cílem porovnat afinitu jednotlivých alkaloidů k DNA. Pro všechny zkoumané alkaloidy byly odhadnuty fluorescenční kvantové výtěžky a také byla studována změna fluorescenčních vlastností alkaloidů v přítomnosti DNA. Z výsledků experimentů byly vypočteny asociační konstanty, které sloužily jako kritérium pro porovnání afinity jednotlivých alkaloidů k DNA<sup>1</sup>.

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity. V rostlinách se vyskytují v minoritním podílu, a to v čeledi



Obr. 1. *N*-Methylbenzo[c]fenantridinový kationt

Tabulka I  
Pozice substituovaných skupin jednotlivých alkaloidů

Alkaloid	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
Sanguinarin	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>2</sub> O-		-H	-H
Chelerythrin	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
Chelirubin	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>3</sub>	-H
Cheliluthin	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
Sanguirubin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>3</sub>	-H
Makarpin	-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>2</sub> O-		-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Sanguiluthin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H

Pryskyřníkovité (Ranunculaceae), Zemědýmovitě (Fumariaceae), Routovité (Rutaceae) a Mákovité (Papaveraceae)<sup>2</sup>. Do poslední čeledi patří i u nás hojně se vyskytující Vlaštovičník větší. Tyto alkaloidy mají významné biologické aktivity, za zmínku stojí zejména jejich antiproliferační, antiapoptotický, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Triviální názvy alkaloidů jsou zpravidla tvořeny z názvu rostliny a latinského názvu barvy alkaloidu např.: z rostliny *Sanguinaria canadensis* byl izolován žlutý alkaloid, který byl pojmenován sanguilutin (luteus = žlutý), z téže rostliny byl izolován i červený alkaloid, byl proto pojmenován sanguirubin (ruber = červený). Sanguinarin a chelerythrin byly izolovány již v 19. století a jsou to jediné dva alkaloidy dostupné komerčně, ostatní alkaloidy studované v této práci byly izolovány na Lékařské fakultě MU v Brně. Základem struktury kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů je *N*-methylbenzo[c]fenantridinový kationt (obr. 1), který má různé substituované vodíkové atomy skupinami -OCH<sub>3</sub> a -OCH<sub>2</sub>O- (tab. I)<sup>3</sup>.

Kondenzovaná aromatická jádra s elektronodonorovými skupinami obsahujícími kyslík zodpovídají za barevnost a schopnost látek vykazovat fluorescenci. Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy jsou též schopny rychle pronikat do živých buněk a kvantitativně se vázat na DNA. Při vědomí toho, že tyto látky mají různé biologické aktivity, jsou barevné a schopné fluoresce, je na místě studovat interakce těchto alkaloidů s buněčnými strukturami pomocí fluorescenční mikroskopie, dále je využívat např. jako fluorescenční sondy a některé dokonce jako látky pronikající do živých nepermeabilizovaných buněk, jako tzv. DNA supravitální sondy<sup>2,4</sup>.

## Experimentální část

Pomocí fluorescenční spektroskopie byla změřena emisní a excitační spektra jednotlivých benzo(c)fenantridinových kvartérních alkaloidů (KBA) a také zá-

vislosti intenzity fluorescenční emise KBA na koncentraci CT DNA. Pomocí fluorescenční a UV-VIS spektroskopie byly změřeny kvantové výtěžky KBA. Všechny experimenty byly prováděny při pH 5,3 v prostředí fosfátového pufru, kdy se alkaloidy vyskytují v nabitě kvartérní neboli iminiové formě. Tato forma je důležitá, neboť je schopná interakce s DNA. Měření probíhala při pokojové teplotě.

#### Použité přístroje

SPEKTROFLUORIMETR AMINCO – Bowman, Series 2 (AB-2), Thermospectronic, USA  
150 W xenonová lampa  
7 W záblesková xenonová lampa  
rozsah vlnových délek 220–950 nm  
ovládání pomocí programu AB-2

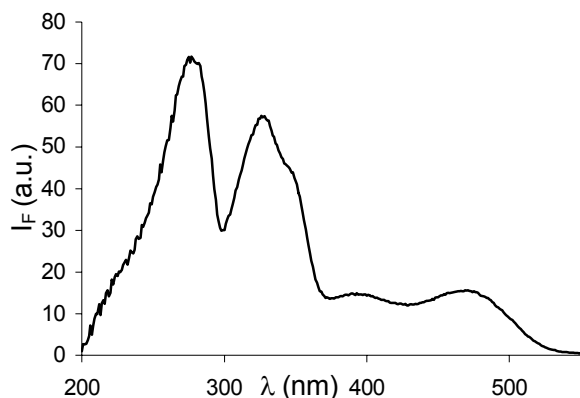
UV-VIS SPEKTROFOTOMETR UNICAM UV2, ATI UNICAM, UK  
dvoupaprskový spektrofotometr  
wolframová a deuteriová výbojka (záměna při 325–370 nm)  
rozsah vlnových délek 190–900 nm  
ovládání pomocí programu VISION 32

pH-metr ORION, 720 A, Thermo Electron, USA  
skleněná iontově selektivní elektroda

## Výsledky a diskuse

### Excitační a emisní spektra studovaných alkaloidů

U všech sedmi studovaných alkaloidů se objevují v excitačním spektru čtyři pásy, kdy třetí a čtvrtý pás u některých alkaloidů téměř splývá v jeden. Dále je pro ně typické emisní spektrum o dvou pásech, vysokoenergetický (350–500 nm) a nízkoenergetický (500–700 nm)



Obr. 2. Excitační spektrum sanguinarinu; vlnová délka emise byla 586 nm, koncentrace sanguinarinu byla  $2,134 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$

(obr. 2 a 3). Změnu intenzity těchto dvou pásů sledujeme při interakci alkaloidů s CT DNA (viz níže).

### Kvantové výtěžky

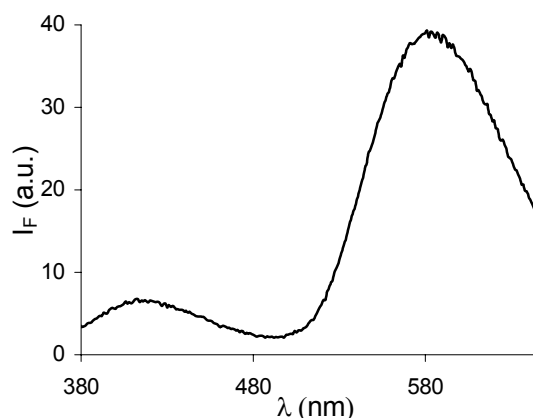
Kvantové výtěžky byly stanoveny sekundární metodou, podle IUPAC<sup>5</sup>, kdy byl jako standard použit fluorescein v ethanolu. Pro výpočet byla použita rovnice (1) (viz níže).  $A_s$  je ve zmiňované rovnici označením pro absorbanci standardu,  $A_x$  je symbol pro absorbanci alkaloidu,  $F_s$  resp.  $F_x$  jsou hodnoty z integrované plochy emisního spektra standardu resp. alkaloidu.  $\phi_s$  je kvantový výtěžek fluoresceinu v ethanolu, který činí 0,79 (cit.<sup>6</sup>).

$$\phi_x = [(A_s \times F_x)] / (A_x \times F_s) \times \phi_s \quad (1)$$

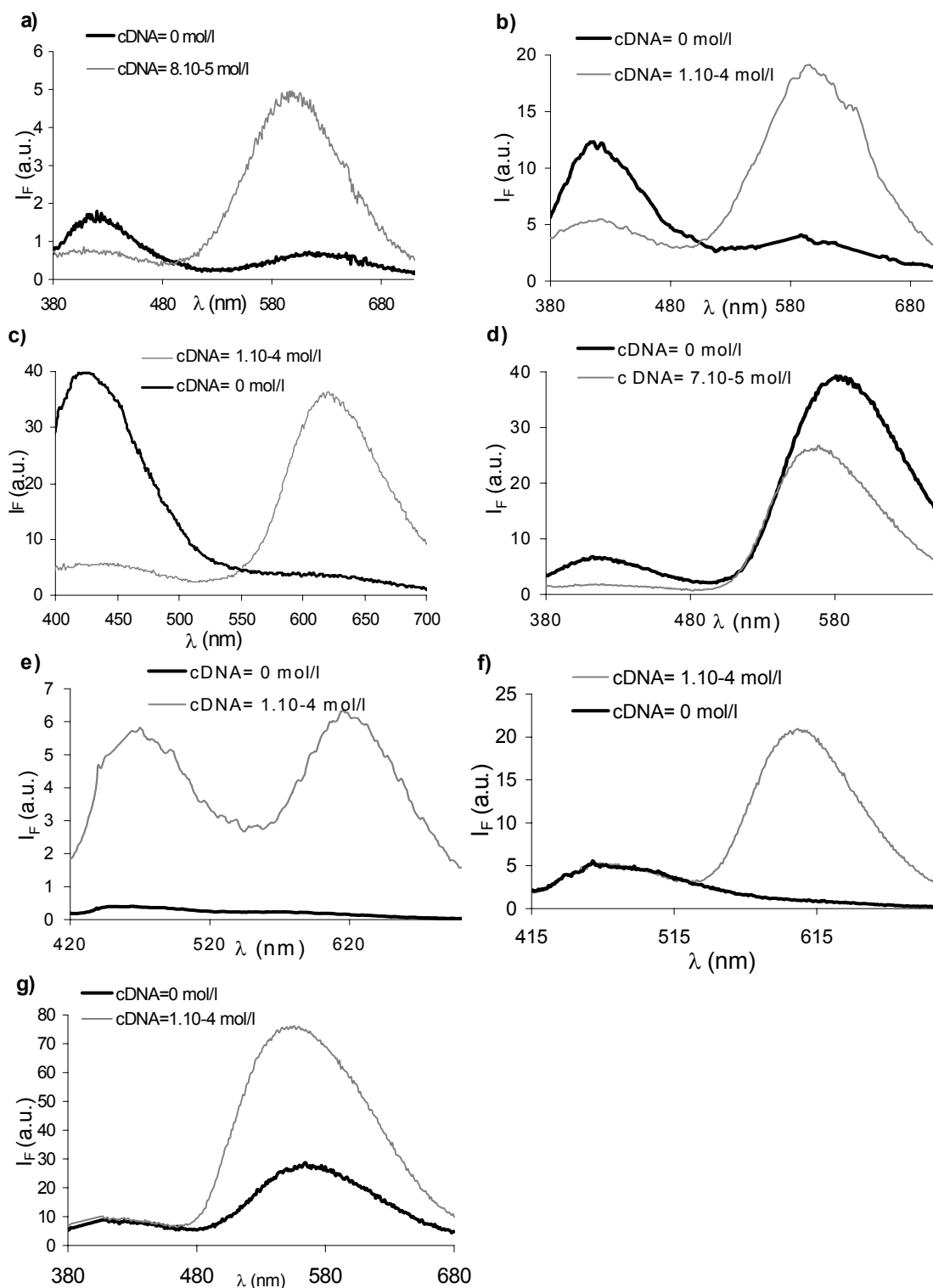
Hodnoty kvantového výtěžku se pohybují v rozmezí třech řádů (viz tab. II). Nejvyšší hodnota je u makarpinu, což odpovídá jeho rigidní a planární struktuře. Naopak u sanguilutinu se objevuje nižší hodnota, což může být vysvětleno tím, že je molekula tohoto alkaloidu méně aromatická a planární.

Tabulka II  
Kvantové výtěžky studovaných alkaloidů

Alkaloid (x)	$\phi_x$
Makarpin	0,016
Sanguinarin	0,0084
Chelirubin	0,0062
Sanguirubin	0,0043
Chelerythrin	0,0031
Chelilutin	0,0015
Sanguilutin	0,000098



Obr. 3. Emisní spektrum sanguinarinu; vlnová délka excitace byla 330 nm, koncentrace sanguinarinu byla  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$



Obr. 4. Emisní spektrum a) sanguilutinu ( $\lambda_{ex} = 328$  nm), b) chelilutinu ( $\lambda_{ex} = 287$  nm), c) chelirubinu ( $\lambda_{ex} = 360$  nm), d) sanguinarinu ( $\lambda_{ex} = 330$  nm), e) sanguirubinu ( $\lambda_{ex} = 390$  nm), f) makarpinu ( $\lambda_{ex} = 390$  nm), g) chelerythrinu ( $\lambda_{ex} = 348$  nm), samotného a s CT DNA

## Studium interakce KBA s CT DNA

CT DNA neboli *calf thymus* je směs ribonukleových a deoxyribonukleových kyselin, ve které převažuje DNA v nativní B formě. KBA reaguje s DNA pomocí interkalace, kdy se alkaloid v kvartérní formě vmezeří mezi dvě vlákna dvoušroubovice<sup>7</sup>. Při této studii byly pozorovány změny intenzity vysoko- a nízkoenergetického pásu v emisním spektru alkaloidu v závislosti na měnící se koncentraci CT DNA. Experiment byl prováděn tak, že roztok alkaloidu a CT DNA se zředoval roztokem samotného alkaloidu. Koncentrace alkaloidu tedy zůstávala konstantní a to  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  a koncentrace CT DNA se měnila v rozsahu  $1 \cdot 10^{-4} - 0 \text{ mol l}^{-1}$ . pH bylo nastaveno fosfátovým pufrům na 5,3 o koncentraci  $0,03 \text{ mol l}^{-1}$  a kontrolováno pH metrem. Ukázky měnících se emisních spekter v závislosti na koncentraci CT DNA jsou na obr. 4.

Ze změny intenzity fluorescence při vybrané vlnové délce, závislé na koncentraci CT DNA byly sestrojeny křivky, jejichž ukázka pro sanguinarin a chelerythrin je na obr. 5.

Poté byly z experimentálních dat pomocí programu OPIUM<sup>8</sup> spočítány asociační konstanty pro interakci alkaloidů s CT DNA. Výsledky jsou uvedeny v tab. III.

U sanguilutinu, chelilutinu a chelirubinu se intenzita prvního (vysokoenergetického) pásu snižuje s rostoucí koncentrací CT DNA, intenzita druhého (nízkoenergetického) pásu se naopak zvyšuje. U makarpinu a chelerythrinu zůstává intenzita prvního pásu téměř nezměněná, intenzita druhého pásu se s rostoucí koncentrací CT DNA zvyšuje. Pro sanguinarin platí, že intenzita klesá pro oba pásy s rostoucí koncentrací CT DNA, sanguirubin se chová přesně naopak (viz obr. 4). Z doposud dosažených vý-

Tabulka III

Asociační konstanty alkaloidů s CT DNA

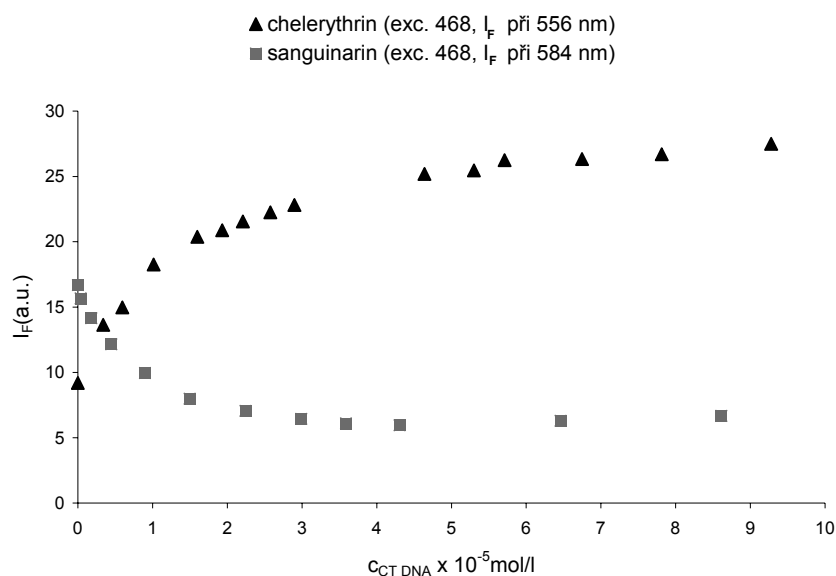
Alkaloid	$\log K_{11}$
Sanguinarin	$5,39 \pm 0,03^a$ ( $6,0 \pm 0,1$ ) <sup>b</sup>
Sanguilutin	$4,52 \pm 0,02^a$
Sanguirubin	$4,60 \pm 0,06^a$
Chelirubin	$5,19 \pm 0,02^a$
Chelerythrin	$4,827 \pm 0,009^a$
Chelilutin	$4,50 \pm 0,03^a$
Makarpin	$4,48 \pm 0,02^a$

<sup>a</sup> Výpočet pro komplex KBA:DNA 1:1, <sup>b</sup> hodnota uváděná v literatuře<sup>9</sup>

sledků můžeme říci, že kvartérní benzo(c)fenantridinové alkaloidy jeví silnou interakci s DNA, nejsilnější interakce je u sanguinarinu a chelirubinu. Vypočítané asociační konstanty pro ostatní alkaloidy (chelerythrin, sanguirubin, chelilutin, sanguilutin, makarpin) jsou téměř stejné a ukazují na neselektivitu při interakci těchto alkaloidů s CT DNA.

## Závěr

Pomocí fluorescenční a UV-VIS spektroskopie bylo studováno sedm kvartérních benzo(c)fenantridinových alkaloidů (sanguinarin, chelerythrin, chelirubin, sanguirubin, chelilutin, sanguilutin a makarpin). Byly popsány



Obr. 5. Závislost intenzity fluorescence sanguilutinu a chelerythrinu na koncentraci CT DNA

a porovnány jejich fluorescenční vlastnosti a jejich rozdílné chování v přítomnosti CT DNA. Pro využití jako fluorescenční sondy se nejslibněji jeví makarpin a sanguirubin, u kterých se intenzita v přítomnosti CT DNA mnohonásobně zvyšuje. Jako další předmět studie bude předpokládána sekvence DNA selektivita KBA, která byla doposud prostudována pouze u sanguinarinu a chelerythrinu.

*Tato práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt GACR 525/08/0819).*

#### LITERATURA

1. Urbanová J., Lubal P., Slaninová I., Táborská E., Táborský P.: Anal. Bioanal. Chem. (2009), přijato do tisku.
2. Slaninova I., Slanina J., Taborska E.: Chem. Listy 102, 427 (2008).
3. Dostál J., Slavík J.: Chem. Listy 94, 15 (2000).
4. Slaninova I., Slanina J., Taborska E.: Cytometry 71A, 700 (2007).
5. Eaton D. F.: Pure Appl. Chem. 60, 1107 (1988).
6. Kellogg R. E., Bennett R. G.: Chem. Phys. 41, 3042 (1964).
7. Maiti M., Kumar G. S.: Med. Research Rev. 27, 649 (2007).
8. Kyvala M., Lubal P., Lukes I.: *Determination of Equilibrium Constants with the OPIUM Computer Program, IX Spanish-Italian and Mediterranean Congress on Thermodynamics of Metal Complexes SIMEC'98, Girona, Spain, June 2-5, 1998*; <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html> (1998).
9. Bai L. P., Zhao Z. Z., Cai Z. W., Jiang Z. H.: Bioorg. Med. Chem. 14, 5439 (2006).

## VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-NITROPYRENU A 1-AMINOPYRENU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

OKSANA YOSYPCHUK a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
oksana.yosypchuk@seznam.cz

### Úvod

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH), mezi které patří jedna ze stanovovaných látek 1-nitropyren, jsou významnou skupinou toxických a karcinogenních kontaminantů životního prostředí, a představují značný rizikový faktor pro zdraví člověka. Již od konce 70. let je zřejmé, že jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí, do něhož pronikají jako důsledek spalovacích procesů<sup>1</sup>. Jsou významnou součástí výfukových plynů naftových i benzinových motorů. Ve vzorcích částic, které jsou emitovány naftovými motory, bylo určeno více než padesát různých NPAH, přičemž převládající sloučeninou je 1-nitropyren<sup>2</sup>.

Druhou stanovovanou látkou je 1-aminopyren (1-AP), který patří do skupiny amino derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH). APAH jsou také známé svými karcinogenními účinky, hojným výskytem v životním prostředí a navíc jsou metabolity příslušných NPAH<sup>3</sup>. Konkrétně 1-AP je jedním z produktů přeměny 1-NP v savcích organismech a byl nalezen v moči, stolici, krvi, ledvinách, játrech a plicích laboratorních zvířat<sup>4</sup>.

Vzhledem k tomu, že nitroskupina a aminoskupina jsou elektrochemicky aktivní, je možno k jejich stanovení použít moderní voltametrické metody. Pro tyto účely se používají rtuťové, amalgámové, uhlíkové a další stacionární pracovní elektrody. Borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDE) patří mezi nejnovější typy elektrod odpovídající konceptu tzv. zelené analytické chemie. Kvůli svým vhodným mechanickým a elektrochemickým vlastnostem se používá i pro stanovení NPAH<sup>5</sup> a APAH<sup>6</sup>. Vzhledem k tomu, že v literatuře doposud nebyla nalezena zmínka o stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na BDDE, byla předpokládáné studii věnována pozornost.

Cílem této práce je na základě studia elektrochemického chování roztoků 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu ve vodně-methanolickém prostředí nalézt optimální podmínky pro jejich stanovení metodou diferenční pulsní voltametrie na borem dopované diamantové filmové elektrodě.

### Experimentální část

#### Reagencie

*Studované látky:* zásobní roztok 1-NP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$

$\text{mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02473 g 1-NP v methanolu (čistota p. a., 99,8%, Penta, ČR) za pomoci ultrazvuku a doplněním na celkový objem 100 ml.

Zásobní roztok 1-AP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$   $\text{mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02171 g 1-AP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml.

Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků. Všechny roztoky studovaných látek byly skladovány ve skleněných nádobách ve tmě za laboratorní teploty.

*Další použité chemikálie:* 2-propanol pro spektrofotometrii (Merck, Německo), kyselina boritá (čistota p. a., Lachema, Brno), kyselina orthofosforečná (čistota p. a., 85%, Lach-Ner, ČR), octová kyselina (čistota p. a., 99,8%, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný (čistota p. a., Lach-Ner, ČR), deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Britton-Robinsonův pufr (dále BR pufr) o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselých složky (obsahující kyselinu boritou, octovou kyselinu a kyselinu fosforečnou o koncentraci 0,04  $\text{mol dm}^{-3}$ ) a složky zásadité obsahující 0,2  $\text{mol dm}^{-3}$  NaOH.

#### Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna s využitím počítačového Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) v programu PolarPro verze 5. Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení.

*referenční elektroda:* argentchloridová (3  $\text{mol dm}^{-3}$  KCl, Monokrystaly, Turnov, ČR)

*pomocná elektroda:* platinový plíšek (Monokrystaly, Turnov, ČR)

*pracovní elektroda:* borem dopovaná diamantová filmová elektroda (Windsor Scientific Ltd, Velká Británie)

*digitální pH-metr:* Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou

*ultrazvuková lázeň:* PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner

#### Pracovní postupy

Pro dosažení stanovených cílů byla použita diferenční pulsní voltametrie (DPV) s následujícími parametry:

polarizační rychlost 20  $\text{mV s}^{-1}$

pulsy o šířce 80 ms

modulační amplituda  $-50 \text{ mV}$  pro měření 1-NP a  $+50 \text{ mV}$  pro měření 1-AP

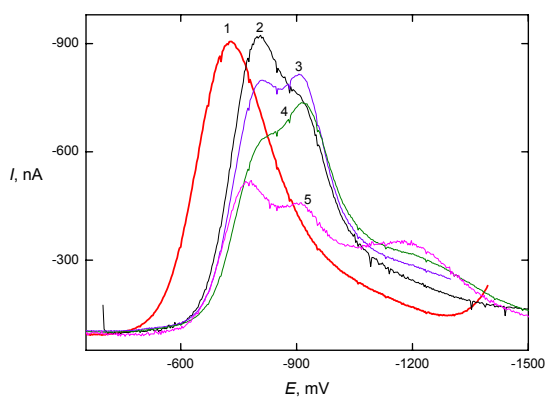
Elektrochemická regenerace BDDE byla prováděna před každým měřením 1-NP pomocí padesáti potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . Při měření 1-AP se regenerace neprováděla. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávána v deionizované vodě.



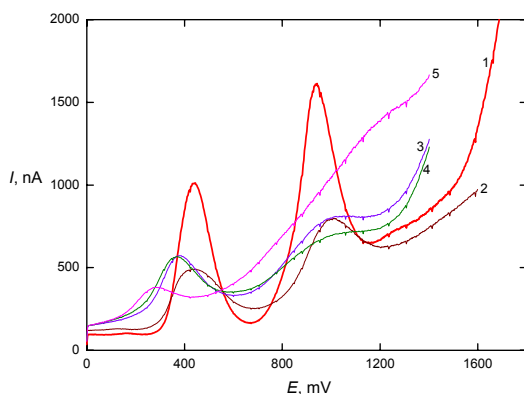
Při přípravě roztoku 1-NP a 1-AP pro voltametrické měření se postupovalo následujícím způsobem: do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno dané množství roztoku 1-NP nebo 1-AP v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 7 ml a roztok byl doplněn po značku BR pufrům o daném pH. Vzdušný kyslík byl z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě.

Výška píků obou sledovaných látek při diferenční pulsní voltametii byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem.

Mez detekce (LOD) byla počítána jako trojnásobek směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti a mez stanovitelnosti (LOQ) jako desetinásobek této směrodatné odchylky.



Obr. 1. Voltamogramy 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufru (7:3), pH BR pufru 3,0 (1), 6,0 (2), 7,0 (3), 9,0 (4) a 12,0 (5). Měřeno metodou DPV na BDDE

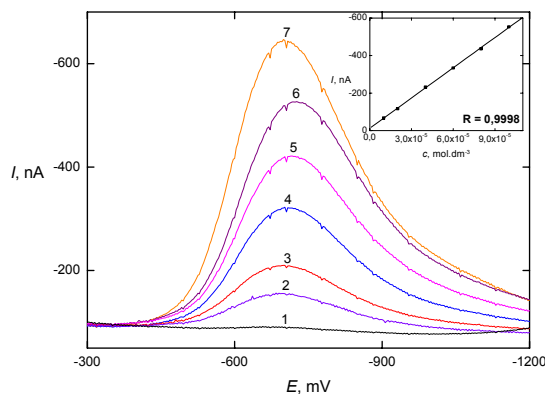


Obr. 2. Voltamogramy 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufru (7:3), pH BR pufru 3,0 (1), 4,0 (2), 7,0 (3), 9,0 (4) a 12,0 (5). Měřeno metodou DPV na BDDE

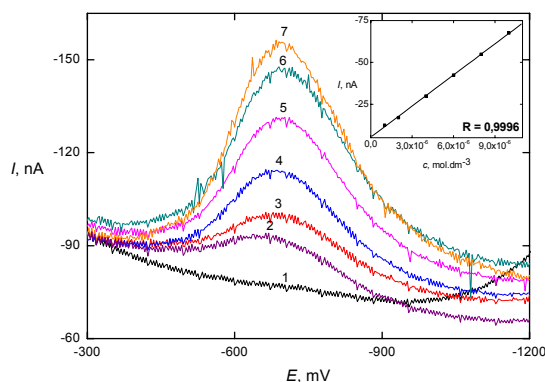
## Výsledky a diskuse

Nejdříve byl sledován vliv pH na chování 1-NP a 1-AP v prostředí methanol-BR pufrů o pH 2 až 12 (7:3) metodou diferenční pulsní voltametrie (obr. 1 a 2). Za optimální bylo pro obě látky zvoleno prostředí methanol-BR pufrů o pH 3,0 (výsledné pH vodně-methanolickeho roztoku 4,5), kde byly získány nejvyšší a nejsnáze vyhodnotitelné píky.

Koncentrační závislost 1-NP a 1-AP byla proměřena v tomto prostředí v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  u 1-NP (obr. 3 a 4) a  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  u 1-AP (obr. 5–7). Parametry kalibračních přímek obou



Obr. 3. Voltamogramy 1-NP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufru (7:3), pH BR pufru 3,0. Koncentrace 1-NP: 0 (1)  $1 \cdot 10^{-5}$  (2),  $2 \cdot 10^{-5}$  (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  (4),  $6 \cdot 10^{-5}$  (5),  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (7)

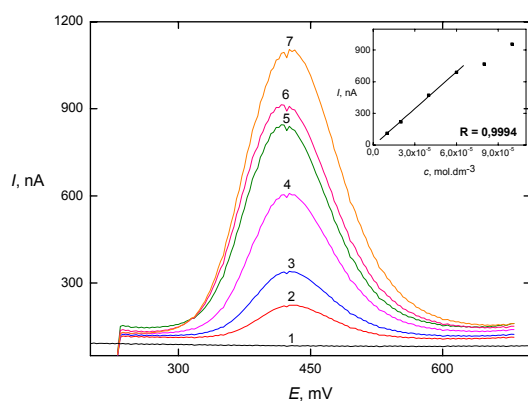


Obr. 4. Voltamogramy 1-NP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufru (7:3), pH BR pufru 3,0. Koncentrace 1-NP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5)  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (6)

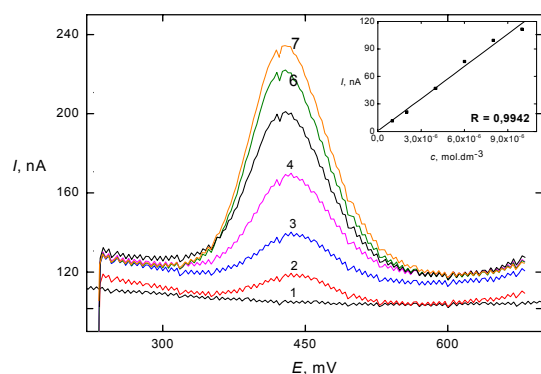
Tabulka I

Parametry kalibračních přímk stanovení 1-NP a 1-AP. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,00

Látka	$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	Směrnice [nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> ]	Úsek [nA]	R	LOD [mol dm <sup>-3</sup> ]	LOQ [mol dm <sup>-3</sup> ]
1-NP	$1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$	$-5,39 \cdot 10^6$	-9,95	0,9998	$3 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$
1-AP	$1 \cdot 10^{-7}$ – $6 \cdot 10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^7$	0,32	0,9996	$6 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$

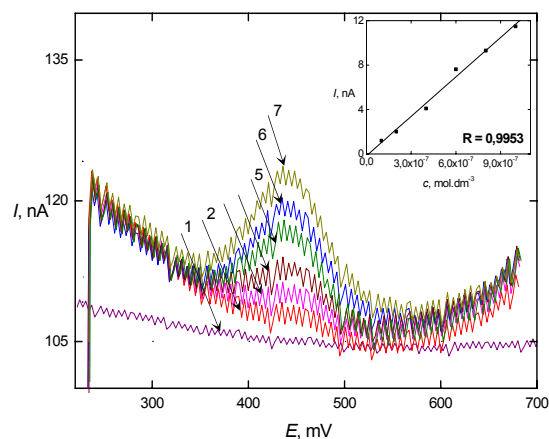


Obr. 5. Voltamogramy 1-AP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0. Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-5}$  (2),  $2 \cdot 10^{-5}$  (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  (4),  $6 \cdot 10^{-5}$  (5),  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> (7)



Obr. 6. Voltamogramy 1-AP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0. Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $4 \cdot 10^{-6}$  (4),  $6 \cdot 10^{-6}$  (5),  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (7)

látek jsou uvedeny v tab. I. Hodnota korelačního koeficientu 1-NP ( $R = 0,9998$ ) ukazuje vysokou linearitu v celém koncentračním rozsahu. U 1-AP je tomu obdobně ( $R = 0,9996$ ) v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Odchýlení od linearity v úseku  $6 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> může souviset s



Obr. 7. Voltamogramy 1-AP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Měřeno metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0. Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (7)

adsorpcí 1-AP na povrchu elektrody nebo s její pasivací. Na druhou stranu se u 1-AP podařilo dosáhnout poměrně nízké meze detekce  $4 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>, zatímco u 1-NP je to  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> a jejímu další snížení bude věnována pozornost při dalším výzkumu.

## Závěr

Na základě provedeného výzkumu elektrochemického chování roztoků 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu ve vodně-methanolicém prostředí na borem dopované diamantové filmové elektrodě metodou diferenční pulsní voltametrie byly vyvozeny následující závěry:

1. Optimální podmínky pro DPV stanovení studovaných látek na BDDE jsou následující: prostředí methanol: BR pufr o pH 3,0 (7:3) (výsledné pH vodně-methanolickeho roztoku 4,5).
2. Koncentrační závislost 1-NP proměřená v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> je lineární v celém rozsahu s  $R = 0,9998$ . Dosažená mez detekce je  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> a mez stanovitelnosti  $8 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> (stanoveno z 11

paralelních měření roztoku 1-nitropyrenu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>).

3. Koncentrační závislost 1-AP proměřená v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> je lineární v úseku  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> s  $R = 0,9996$ . Dosažená mez detekce je  $6 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> a mez stanovitelnosti  $2 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> (stanoveno z 11 paralelních měření roztoku 1-aminopyrenu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>).
4. Z provedené studie plyne, že za stanovených podmínek lze na borem dopované diamantové filmové elektrodě provést voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu s dostatečnou citlivostí a přesností.

*Tato práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, dále byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC 06035) a Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR 203/07/P261).*

#### LITERATURA

1. Barek J., Cvačka J., Moreira J.C., Zima J.: Chem. Listy 90, 805 (1996).
2. Barek J., Bencko V., Cvačka J., Šuta M.: Chem. Listy 92, 794 (1998).
3. Moreira J. C., Barek J.: Quimica Nova 18, 362 (1995).
4. Kielhorn J., Wahnschaffe U., Mangelsdorf I.: *Environmental Health Criteria 229: Selected Nitro-Oxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. World Health Organization, Geneva 2003.
5. Čížek K.: *Disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
6. Jandová K.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007.

## ELEKTROCHEMIE JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM INTERAKCE MATRIXOVÉ METALOPROTEINASY-9 A KOLAGENU

ONDŘEJ ZÍTKA<sup>a,b</sup>, DALIBOR HÚSKA<sup>b</sup>,  
VOJTĚCH ADAM<sup>b,c</sup>, LIBUŠE TRNKOVÁ<sup>d</sup>  
a RENÉ KIZEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>c</sup> Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>d</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
kizek@sci.muni.cz

### Abstrakt

Studium protein-protein interakcí v *in vitro* podmínkách je velmi zajímavé a přináší řadu unikátních výsledků. Hlavním cílem naší práce bylo studovat matrixovou metaloproteinasy 9 (MMP-9) a její interakce s kolagenem. Primárně jsme se zaměřili na optimalizaci chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy pro detekci MMP-9 a interakce s kolagenem. Za optimálních podmínek (čas akumulace 90 s, základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr pH 5, rozpouštěcí proud 1  $\mu$ A) byl stanoven detekční limit pro MMP-9 jako 100 pM. Kolagen o koncentraci 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> byl akumulován po dobu 90 s na povrch rtuťové kapkové elektrody (HMDE). Poté byla modifikovaná HMDE omyta ve vodě a ponořena do roztoku MMP-9 (5  $\mu$ l) o koncentraci 1 ng ml<sup>-1</sup> po dobu 90 s. Zjistili jsme, že po aplikaci MMP-9 na kolagen se signál kolagenu zvýšil přibližně dvakrát a pozice se posunula na -1,63 V oproti detekci samotného kolagenu a MMP-9 (-1,4 V). Lze usuzovat, že vzrůst signálu kolagenu ovlivňuje MMP-9 tím, že kolagen je štěpen na menší fragmenty, které jsou lépe přístupné na povrch HMDE a dávají vyšší signál. Výsledky byly ověřeny pomocí gelové chipové elektroforézy. Dále jsme použili diferenční pulsní voltametrii Brdičkovu reakci pro studium ovlivnění aktivity MMP-9 zvýšenou teplotou a koncentrací zinečnatých iontů, jako kofaktoru pro tyto enzymy. Aktivita MMP-9 v prostředí zinečnatých iontů je vyšší v porovnání s experimentem kolagen-MMP-9 bez jejich přítomnosti.

### Úvod

Matrixové metaloproteinasy (MMP) jsou početnou skupinou zinek-dependentních proteinů, které mají za úkol štěpení a přestavování jednotlivých součástí pojivové tkáně (kolagen, elastin, želatina a kasein). Degradace pojivové tkáně je děj, který probíhá při ontogenetických změnách

v organismu, jako je například růst, morfogeneze, ale také hojení ran a poškození tkání. S tím také souvisí aktivita MMP při onemocnění a patologických procesech (záněty, kožní či nádorová onemocnění). Skupina těchto enzymů hraje důležitou roli v řadě procesů a proto není divu, že se v organismu vyskytují ve více formách. Je známo kolem 20-ti typů MMP podle presyntetického úseku na chromosomech a specifitou k substrátu<sup>1</sup>. Díky metodám rentgenové krystalografie a nukleární magnetické rezonance je dnes známá struktura mnoha MMP<sup>2,3</sup>.

Většina těchto enzymů (kromě membránových MMP) je z buňky sekretována ve formě proenzymu, který je podle potřeby pro samotné štěpení aktivován ionty zinku. Můžeme se tedy domnívat, že by zde mohl existovat typ transportu iontů zinku a to na bázi transportního proteinu, který by mohl doposud neznámým způsobem přenášet zinek pro aktivní štěpení tkáně metaloproteinasy. Jedním z takových přenašečů je nízkomolekulární protein metalothionein<sup>4,5</sup>.

Studium protein-protein interakcí v *in vitro* podmínkách je v době, kdy se pozornost mnoha vědeckých skupin po celém světě obrací směrem k proteomu, velmi zajímavé a přináší řadu unikátních výsledků. Primárně jsme se zaměřili na optimalizaci chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy pro detekci MMP-9 a interakcí s kolagenem. Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza byla použita pro detekci několika biologicky důležitých peptidů<sup>6,7</sup> a proteinů jako metalothionein<sup>8-14</sup>, alpha-synuclein<sup>15</sup>, MutS protein<sup>16</sup>, glutathion-S-transferasa<sup>17</sup>, thrombin<sup>18</sup>. Navíc, Ostatná a spol. prokázala, že lze tuto elektrochemickou metodu použít pro studium strukturních změn bovinního sérového albuminu<sup>19,20</sup>. Dále naše pozornost směřovala na studium různých způsobů aktivace MMP-9. Výsledky byly ověřeny pomocí gelové chipové elektroforézy<sup>21</sup>. Hlavním cílem této práce je ukázat, že aplikace moderních elektrochemických metod v kombinaci s klasickými molekulárně-biologickými technikami při řešení určitých problémů v biologii může být velmi výhodná.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Lidská MMP-9 byla dodána od firmy Chemicon International (Temecula, USA). Lyofilizovaný kolagen byl získán od Výzkumného ústavu pletářského (Brno, Česká republika). Ostatní použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v ACS čistotě, pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) byly připraveny ve vodě ACS čistoty (Sigma-Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při teplotě -20 °C. Pracovní

roztok byl připravován denně ředěním zásobních roztoků. Hodnoty pH byly měřeny s použitím WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), spojeným s osobním počítačem (Weilheim). pH-elektroda (SenTix-H) byla pravidelně kalibrována souborem WTW pufrů. Všechny roztoky byly před analýzou filtrovány přes teflonový filtr 0,45  $\mu\text{m}$  (MetaChem, Torrance, CA, USA). Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěna pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 M $\Omega$ ).

Adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza

Elektrochemické analýzy byly prováděny na AUTOLABu (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z visící rtuťové kapkové elektrody jako pracovní elektrody s plochou 0,4 mm<sup>2</sup>, argentochloridové elektrody (Ag/AgCl/3 M-KCl) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Analyzované vzorky byly před detekcí deoxygenovány probubláním argonem (99,999%), saturovaným ve vodě po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Software GPES 4.9 (EcoChemie) byl použit pro zpracování hrubých dat (vyhlazování, korekce na základní hladinu). Experimentální podmínky pro detekci MMP pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí (AdTS) techniky chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA) byly optimalizovány.

Diferenční pulsní voltametrie Brdičkova reakce

Elektrochemické analýzy byly prováděny na přístroji  $\mu$ AUTOLAB III (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z visící rtuťové kapkové elek-

trody jako pracovní elektrody s plochou 0,4 mm<sup>2</sup>, argentochloridové elektrody (Ag/AgCl/3 M-KCl) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Základní elektrolyt (1 mM Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> a 1 M amonný pufr; NH<sub>3</sub>(aq) + NH<sub>4</sub>Cl, pH 9,6). Parametry diferenční pulsní voltametrie byly následující: počáteční potenciál –0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1 mV, modulační amplituda 250 mV, teplota 37 °C, která byla udržována pomocí průtokového přístroje JULABO F12/ED (Labortechnik GmbH, Německo).

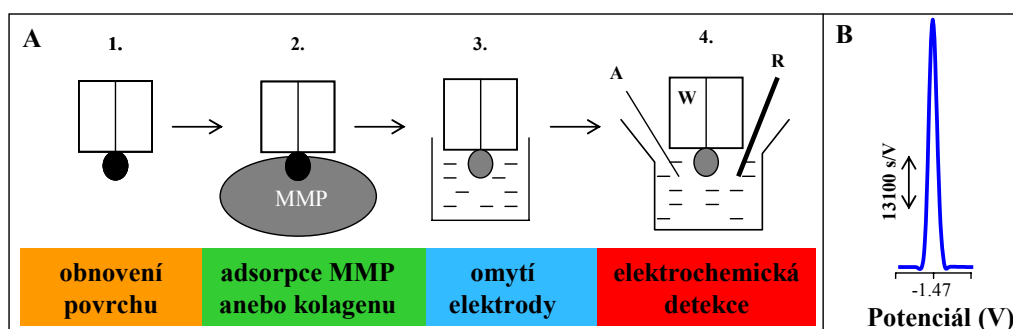
Chipová gelová elektroforéza – Experion

Analýzy byly prováděny na chipové gelové elektroforéze Experion (Bio-Rad, USA). Všechny analyzované vzorky byly ředěny tak, aby koncentrace proteinů nepřesáhla 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Následně byly 4  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku smíchány s 2  $\mu\text{l}$  redukčního pufru (systémový pufr ve směsi s merkaptoethanolem (100%) v poměru 30:1 (v/v)). Tato směs byla ponechána 4 min při 100 °C a poté bylo přidáno 84  $\mu\text{l}$  vody (ACS). Po naplnění chipu gelem a přípravě barvicího roztoku byla zředěná směs vzorku, redukčního pufru a vody (6  $\mu\text{l}$ ) dávkována do systému. Jako standard byl použit Pro260 Ladder (Bio-Rad). Pro inkubaci vzorků před analýzou byl použit thermomixer (Eppendorf 5430, USA).

## Výsledky a diskuse

Detekce matrixové metaloproteinasy 9

Navrhli jsme elektrochemickou metodu založenou na katalytickém vylučování vodíku, označovanou jako pík H, za které jsou odpovědné –SH a NH<sub>2</sub> skupiny MMP. Detekce probíhala pomocí adsorptivní přenosové techniky (obr. 1A). Nejdříve jsme hledali elektrochemické parametry pro analýzu metaloproteinasy. Prvním parametrem, jenž



Obr. 1. (A) Schéma adsorptivní rozpouštěcí přenosové techniky (AdTS) použité pro detekci metalothioneinu; (1.) obnova povrchu visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE); (2.) adsorpce MMP resp. Kolagenu v kapce roztoku na povrch HMDE při otevřeném potenciálu; (3.) omytí elektrody v deionizované vodě; (4.) analýza MMP anebo kolagenu metodou CPSA při zapojení elektrod A-pomocná (uhlíková tyčka); W-pracovní (HMDE); R-referentní (Ag/AgCl/KCl). (B) CPSA voltamogram MMP. Základním elektrolytem byl acetátový pufr (pH 4,6). AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál –1,85 V, teplota 20 °C, doba akumulace 90 s

byl optimalizován, byla doba akumulace metaloproteinasy na rtuťové elektrodě. Základní koncentrace metaloproteinasy byla velmi nízká ( $0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ) a detekce probíhala v borátovém pufru pH 7,6. Jednotlivé časy akumulace byly určeny na 30, 60, 90, 120, 150 a 180 s. Zjistili jsme, že s dobou akumulace roste i výška píku až do 90 s, kde dosahuje svého maxima, poté výška píku klesá.

Dalším krokem bylo zjistit, jak se metaloproteinasa chová v různých pufrch. Byla vybrána následující pufrovaná prostředí: acetátový pufr (pH 4,6); Britton-Robinson pufr (pH 6,5), fosfátový pufr (pH 6,95) a borátový pufr (pH 7,6). V acetátovém pufru jsme pozorovali nejvyšší odezvu. Zároveň lze říci, že nižší pH je pro elektrochemickou analýzu metaloproteinasy vhodnější než pH vyšší. Každý pufr, tedy i různé pH, dává vznik signálu metaloproteinasy v mírně odlišném potenciálu. Acetátový pufr v  $-1,47 \text{ V}$  (obr. 1B); Britton-Robinson  $-1,62 \text{ V}$ , fosfátový pufr  $-1,71 \text{ V}$  a borátový pufr  $-1,74 \text{ V}$ . Za pozorované změny v potenciálech piků jsou pravděpodobně odpovědné rozdíly v průběhu elektroodové reakce. Dalším experimentem bylo sledování závislosti výšky píku metaloproteinasy o koncentraci  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  na různém pH acetátového pufru. Bylo zjištěno, že optimálním je pH 5. Odezvu signálu metaloproteinasy v acetátovém pufru pH 5 výrazně ovlivňuje aplikovaný rozpouštěcí proud. Byly sledovány tyto hodnoty rozpouštěcího proudu (1, 2, 4, 6, 8, 10 a  $12 \mu\text{A}$ ). S tím, jak roste hodnota rozpouštěcího proudu, klesá signál metaloproteinasy. Proto jsme zvolili hodnotu rozpouštěcího proudu  $1 \mu\text{A}$ . Limit detekce byl stanoven jako  $3 \times$  signál/šum dle Longa a Winefordnera<sup>22</sup> jako  $100 \text{ pM}$  (cit. <sup>23</sup>).

#### Příprava kolagenu

Samotná příprava roztoku kolagenu není příliš technologicky jednoduchou záležitostí. V případě rozpouštění kolagenu ve vodě jsme velice limitováni jeho omezenou rozpustností, za což je odpovědná jeho kompaktní struktura. Vlivem mechanického působení (třepání, míchání) lze dosáhnout omezeného rozpouštění kolagenu, ale pravděpodobně za poškození vyšších proteinových struktur. Zlepšení fyzikálních vlastností kolagenní hmoty je možné docílit působením sníženého tlaku. Bylo zjištěno, že v takové kolagenní hmotě vznikají nehomogenní shluky (není ukázáno). Určení koncentrace kolagenu spektrofotometricky je proto velmi obtížné. Alternativní metodou, jak zjistit koncentraci kolagenu, se zdá být elektrochemická detekce pomocí metody square wave voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě, kde je pozorován charakteristický voltametrický záznam. V experimentu byl kolagen rozpouštěn ve vodě, případně kyselině chlorovodíkové (9%). Suspenze byla třepána pomocí Vortex 2 (400 rpm) 15 minut. Kolagen se poměrně velmi dobře rozpouštěl v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Získaný signál kolagenu se zvyšoval v závislosti na jeho koncentraci. V případě, že byl kolagen rozpouštěn pouze v demineralizované vodě, byla jeho rychlost rozpouštění silně omezená.

V následujícím experimentu byl studován vliv různé koncentrace kyseliny chlorovodíkové na rozpustnost ko-

lagenu. Pro tento účel byly připraveny roztoky HCl (od 0,1 až po 10 %) a ke každému bylo naváženo 100 mg kolagenu. Takto připravený 1 ml roztoku byl umístěn na třepačku a po dobu 30 min intenzivně protřepáván (400 rpm). Poté byly vzorky analyzovány pomocí square wave voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě (doba akumulace 120 s, frekvence 200 Hz, základní elektrolyt: acetátový pufr pH 5, počáteční potenciál 0 V a konečný potenciál 1,5 V). Bylo možné pozorovat, že s narůstající koncentrací kyseliny chlorovodíkové dochází k nárůstu obsahu rozpuštěného kolagenu ve sledovaném vzorku. Na druhou stranu jsou roztoky obsahující kolagen velmi kyselé (pH 0,5 až 1,5), což může negativně ovlivňovat nativní strukturu proteinu. Do dalších experimentů jsme zvolili rozpouštění v prostředí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 9 % (m/m).

#### Interakce kolagenu s MMP-9

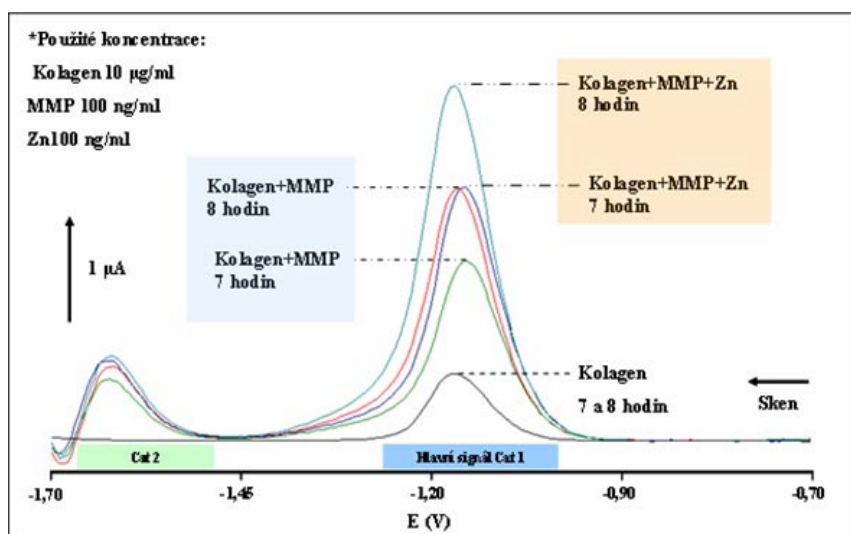
Jedním z hlavních cílů této práce bylo studovat aktivaci MMP-9. Kolagen patří mezi hlavní substráty MMP v organismu. Rozhodli jsme se přistoupit k optimalizaci a následně elektrochemické detekci interakce MMP-9 s kolagenem. Nejdříve jsme optimalizovali dobu akumulace kolagenu na rtuťovou elektrodu. Ostatní parametry byly pro analýzu kolagenu stejné jako u MMP-9. Nejvhodnější doba akumulace byla 90 s. Následně jsme mohli přistoupit ke studiu interakce MMP-9 a kolagenu. Nejvhodnější podmínky pro štěpení kolagenu MMP-9 ( $1 \text{ ng ml}^{-1}$ ) byly v prostředí 0,05 M-Tris-HCl pH 7,6 + 0,2 M-NaCl + 0,01 M- $\text{CaCl}_2$ .

Nyní jsme mohli provést analýzu vlastní interakce, která probíhala následovně. Použili jsme vzorek kolagenu o koncentraci  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  a akumulovali ho po dobu 90 s na HMDE. Po této době jsme HMDE omyli ve vodě o ACS čistotě a ponořili do kapky vzorku MMP-9 o koncentraci  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  a opět akumulovali 90 s. Po uplynutí této doby byla HMDE omyta a analýza mohla proběhnout. Zjistili jsme, že po aplikaci MMP-9 na kolagen se signál kolagenu zvýšil přibližně dvakrát a pozice se posunula na  $-1,63 \text{ V}$  oproti detekci samotného kolagenu a MMP-9 ( $-1,4 \text{ V}$ ). Pro ověření jsme snížili koncentrace obou látek o polovinu, tedy na  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  a změřili jsme samotný kolagen a poté po aplikaci  $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$  MMP-9. Vlivem toho signál poklesl oproti koncentracím  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  téměř o polovinu a rovněž tak i signál po interakci klesl o polovinu. Lze usuzovat, že vzrůst signálu kolagenu ovlivňuje MMP-9 tím, že byl kolagen štěpen na menší fragmenty, které jsou lépe přístupné k povrchu pracovní elektrody a poskytují tak vyšší signál. Výsledky byly potvrzeny pomocí gelové chropové elektroforézy (není ukázáno).

#### Brdičkova reakce jako další nástroj pro studium MMP-9

Jak bylo výše ukázáno, CPSA je vhodným nástrojem pro studium interakcí MMP-9 s kolagenem.

I přes citlivost použité elektrochemické techniky není vhodná pro sériové analýzy a studium řady různých fakto-



Obr. 2. Typické voltamogramy kolagenu inkubovaného v prostředí MMP-9

rů, které mohou aktivitu MMP-9 ovlivnit. Proto nás zajímalo, jestli jsme schopni takové interakce studovat i pomocí další elektrochemické metody. Pro tento účel jsme zvolili metodu diferenční pulsní voltametrie v Brdičkově roztoku<sup>24</sup>. Byly použity roztoky o zásobní koncentraci: kolagen 1 mg ml<sup>-1</sup> (v 9% HCl), MMP-9 10 µg ml<sup>-1</sup>, ZnCl<sub>2</sub> 10 µg ml<sup>-1</sup>. Příprava pracovního elektrolytu probíhala tak, že nejprve byl do pracovní elektrochemické nádoby obsahující 2 ml Brdičkovy roztoku nadávkován zásobní roztok kolagenu v objemu 20 µl za odebrání ekvivalentního objemu Brdičkovy roztoku z nádoby. Výsledná koncentrace kolagenu v pracovním roztoku Brdičkovy roztoku tak činila 10 µg ml<sup>-1</sup>. Po přidání kolagenu byla teplota pracovního roztoku zvýšena z laboratorní na teplotu fyziologickou, tedy 37 °C pomocí průtokové nádoby připojené na termostat Julabo a byla přidána MMP-9. Dále následovaly tři varianty analýzy. První varianta byla detekce samotného kolagenu o množství 20 µg (obr. 2, modrá křivka). Druhá varianta byla detekce kolagenu (20 µg) s MMP-9 o množství 200 ng (obr. 2, zelená křivka). Třetí varianta analýzy probíhala ve směsi kolagen (20 µg), MMP-9 (200 ng) a ZnCl<sub>2</sub> o množství 200 ng (obr. 2, červená křivka). Roztoky byly utěsněny v nádobce parafilmem, aby nedocházelo k vypařování vzorků, které bylo během osmihodinové analýzy minimální (do pěti procent z celkového objemu).

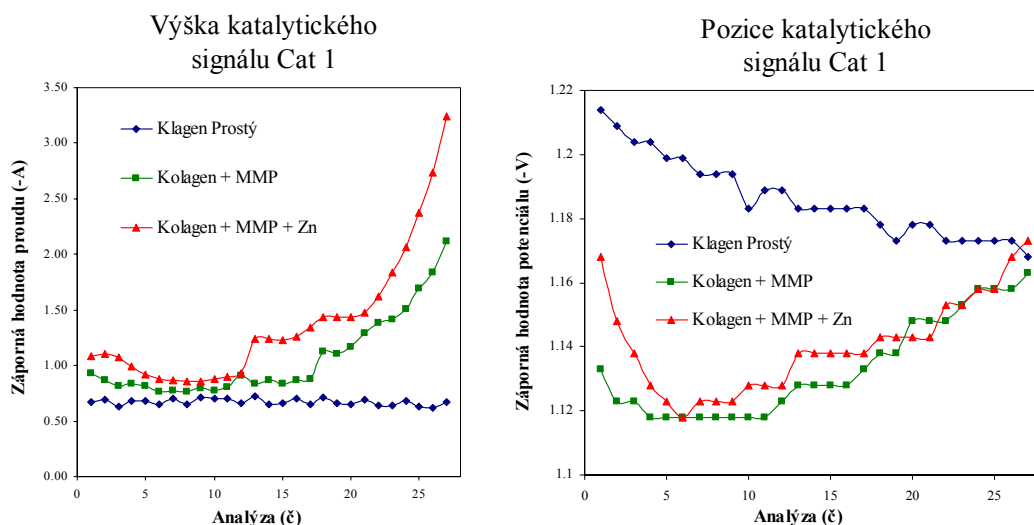
Interakce kolagenu s MMP-9 přinesla zajímavé výsledky. Pík, který zodpovídá za přístupnost elektroaktivních skupin proteinů (-SH, -NH<sub>2</sub>) s názvem Cat 1 se v průběhu inkubace těchto dvou proteinů postupně zvyšoval. Tento fakt je možné vysvětlit interakcí MMP-9 s kolagenem, kde docházelo k postupné degradaci kolagenu a tím se zvyšoval počet elektroaktivních skupin schopných elektrochemické přeměny na povrchu pracovní elektrody (obr. 2 a obr. 3, zelená křivka). Signál samotného kolagenu se během inkubace příliš neměnil (obr. 3, modrá

křivka).

Tyto proteiny ve své struktuře obsahují zinečnaté ionty, které je schopen transportovat protein metalothionein. Proto jsme celý experiment zjednodušili a analyzovali směs kolagenu, MMP-9 a zinečnatých iontů. Výsledek našich analýz je možné vidět na obr. 2 a 3, červená křivka. Elektrochemický signál Cat 1 se zvyšoval po celou dobu inkubace. Přibližně v 360. minutě došlo ke zlomu a signál vzrostl během následujících několika desítek minut téměř o padesát procent. Struktura kolagenu je kompaktní a je velmi pravděpodobné, že tento zlom značí štěpení této struktury na menší fragmenty. Nejzajímavějším výsledkem je, že aktivita MMP-9 v prostředí zinečnatých iontů (100 ng ml<sup>-1</sup>) je vyšší v porovnání s experimentem kolagen-MMP-9 bez přítomnosti těchto iontů (obr. 3).

## Závěr

V této práci se nám podařilo unikátní volbou metod pro analýzy prokázat možnost využití elektrochemických metod pro studium aktivity matrixové metaloproteinasy 9, která je hlavním prvkem v degradaci a přestavování živočišné extracelulární matrix. Nejprve byly optimalizovány postupy elektrochemické detekce pomocí chronopotentiometrické analýzy ve spojení s adsorpční přenosovou technikou. Následně byla touto metodou testována možnost elektrochemického monitorování změn při vazbě MMP na substrát kolagenu, jenž byl akumulován na povrchu pracovní elektrody. To vše nám dalo dostatek podkladů pro další práci, která se týkala ověření experimentálního schématu pomocí chipové elektroforézy. Tou bylo prokázáno, že zvýšená teplota může aktivovat u MMP-9 štěpení v přítomnosti substrátu kolagenu. S těmito výsledky jsme se opět vrátili k elektrochemické analýze. Zvolili jsme



Obr. 3. Závislost výšky a pozice signálu Cat 1 na délce interakce mezi MMP-9 a kolagenem. Časový rozestup mezi analýzami byl 17 minut

metodu diferenční pulsní voltametrie – Brdičkovy reakce. Tou jsme získali experimentální data, která svědčí o průběhu enzymatického působení MMP-9 na kolagen při fyziologické teplotě a o zvýšení aktivity v případě aplikování ekvimolárního množství zinkových iontů.

*Tento výzkum byl finančně podporován granty GA AV IAA401990701 a 2A-1591/122 - MPO.*

#### LITERATURA

- Puente X. S., Sanchez L. M., Overall C. M., Lopez-Otin C.: *Nat. Rev. Genet.* 4, 544 (2003).
- Bode W.: *Proteases and the Regulation of Biological Processes* 70, 1 (2003).
- Borkakoti N.: *J. Mol. Med.* 78, 261 (2000).
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R.: *Curr. Protein Pept. Sci.*, v tisku 2009.
- Hamer D. H.: *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913 (1986).
- Tomschik M., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Electroanalysis* 10, 403 (1998).
- Selesovska-Fadma R., Fojta M., Navratil T., Chylkova J.: *Anal. Chim. Acta* 582, 344 (2007).
- Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
- Petrova J., Krizkova S., Zitka O., Hubalek J., Prusa R., Adam V., Wang J., Beklova M., Sures B., Kizek R.: *Sens. Actuators, B* 127, 112 (2007).
- Sestakova I., Kopanica M., Havran L., Palecek E.: *Electroanalysis* 12, 100 (2000).
- Strouhal M., Kizek R., Vecek J., Trnkova L., Nemecek M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
- Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
- Krizkova S., Zitka O., Adam V., Beklova M., Horna A., Svobodova Z., Sures B., Trnkova L., Zeman L., Kizek R.: *Czech J. Anim. Sci.* 52, 143 (2007).
- Fabrik I., Krizkova S., Huska D., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Eckschlager T., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis* 20, 1521 (2008).
- Masarik M., Stobiecka A., Kizek R., Jelen F., Pechan Z., Hoyer W., Jovin T. M., Subramaniam V., Palecek E.: *Electroanalysis* 16, 1172 (2004).
- Palecek E., Masarik M., Kizek R., Kuhlmeier D., Hassmann J., Schulein J.: *Anal. Chem.* 76, 5930 (2004).
- Brazdova M., Kizek R., Havran L., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 115 (2002).
- Sanchez J. L. A., Baldrich E., Radi A. E. G., Dondapati S., Sanchez P. L., Katakis I., O'Sullivan C. K.: *Electroanalysis* 18, 1957 (2006).
- Ostatna V., Palecek E.: *Electrochim. Acta* 53, 4014 (2008).
- Ostatna V., Uslu B., Dogan B., Ozkan S., Palecek E.: *J. Electroanal. Chem.* 593, 172 (2006).
- Krizkova S., Hrdinova V., Adam V., Burgess E. P. J., Kramer K. J., Masarik M., Kizek R.: *Chromatographia* 67, S75 (2008).
- Long G. L., Winefordner J. D.: *Anal. Chem.* 55, A712 (1983).
- Huska D., Adam V., Zitka O., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis*, v tisku 2009.
- Petrova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).



## STUDIUM POVRCHOVÉ MODIFIKACE STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC A JEJICH MOŽNÉ VYUŽITÍ V ANALYTICKÉ CHEMII

PAVEL ŽVÁTORA, KAMIL ZÁRUBA,  
PAVEL ŘEZANKA a VLADIMÍR KRÁL

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

### Úvod

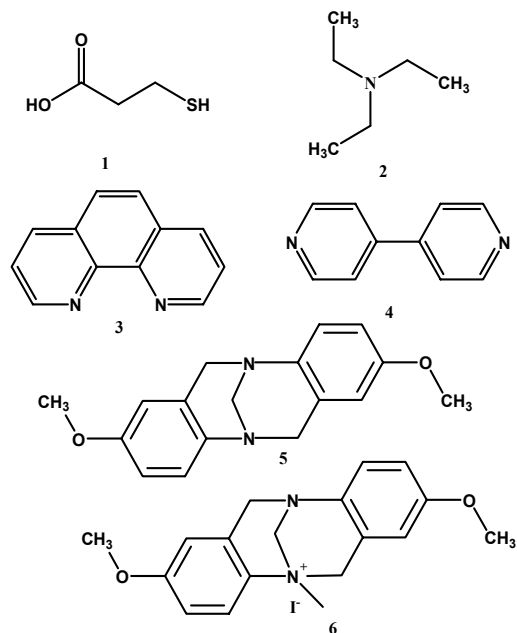
Rigidní konformace Trögerovy báze představuje zajímavý strukturální motiv umožňující preorganizaci funkčních skupin potřebných pro získání látky schopné selektivních interakcí. Imobilizace těchto látek na nanočástice by umožnila sledovat jejich interakce s analyty např. pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Molekulární design látek (5) a (6) dovoluje pomocí  $\pi$ - $\pi$  vazeb vázat elektronově deficitní systémy jako např. areny<sup>5</sup>. Tato vlastnost již sama o sobě činí z Trögerových bází potencionálně zajímavé medicínální a analytické nástroje. Nanočástice by také mohly dovolit snadnou separaci Trögerových bází po komplexaci se zvoleným analytem z roztoku na základě centrifugace, což by jistě vedlo k úspoře času a finančních prostředků například v případě složitých matic a vzorků, kdy by jinak musela být tato separace prováděna pomocí chromatografických metod.

V této práci byl sledován vliv způsobu přípravy<sup>1–3</sup> a iontové síly<sup>4</sup> roztoku na kvalitu SERS spekter nanočástic stříbra. Připravené nanočástice byly charakterizovány pomocí absorpční spektroskopie ve viditelné oblasti spektra. SERS aktivní vlastnosti byly ověřovány povrchem zesílenou Ramanovou spektroskopií po imobilizaci 3-merkaptopropanové kyseliny (1) na povrchu nanočástic. Dále byl studován způsob imobilizace látek vázajících se na stříbrný povrch přes dusíkový atom, jako modelové látky byly v tomto případě zvoleny triethylamin (2), 1,10-fenantrolin (3) a 4,4'-bipyridin (4), pomocí kterých byl hledán vhodný způsob přípravy nanočástic pro imobilizaci derivátů Trögerových bází (5) a (6) (struktury látek viz obr. 1).

### Experimentální část

#### Chemikálie a zařízení

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Pro přípravu nanočástic byla použita deionizovaná voda, která byla získána pomocí iontoměničů ( $R \approx 10 \text{ M}\Omega$ ). Absorpční spektra byla měřena na přístroji Varian Cary 400 SCAN. Měření bylo prováděno ve skleněné kyvetě o tloušťce 1 cm v rozsahu 300 až 800 nm s krokem 1 nm. Ramanova spektra (SERS spektra) byla měřena pomocí Ramanova



Obr. 1. Struktury látek použitých v této práci: (1) 3-merkaptopropanová kyselina; (2) triethylamin; (3) 1,10-fenantrolin, (4) 4,4'-bipyridin, (5) methoxy derivát Trögerovy báze 3A; (6) kvarternizovaná forma methoxy derivátu Trögerovy báze 3A

spektrometru NIR Advantage s měřícím rozsahem 100–2000  $\text{cm}^{-1}$  a s vlnovou délkou excitačního zdroje byla 785 nm.

Centrifugace byly prováděny v umělohmotných zkuševkách o objemu 2 ml na centrifuze Eppendorf CENTRIFUGE 5418. Vzorky byly odstředěny při 13 000 otáčkách za minutu (odstředivé zrychlení 92 665  $\text{m s}^{-2}$ ) po dobu 10 min.

Sonifikace byla prováděna v ultrazvukové lázni TRANSSONIC 570 při 35 kHz.

#### Příprava nanočástic

##### a) redukce citrátem sodným

Roztok  $\text{AgNO}_3$  byl připraven rozpuštěním 9 mg  $\text{AgNO}_3$  v 1 ml vody ( $c(\text{AgNO}_3) = 5,33 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ). Roztok citrátu sodného (1% (m/m)) ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) byl připraven navážením 250 mg  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  do 25 ml odměrné baňky ( $c(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}) = 3,4 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ).

Do dvouhrdlé baňky 100 ml bylo nalito 50 ml vody a vloženo míchadlo. Baňka byla opatřena zpětným chladičem a tato aparatura byla umístěna do olejové lázně. Voda byla přivedena k varu, poté byl přidán roztok  $\text{AgNO}_3$  a 1 ml roztoku citrátu. Reakční směs se za stálého míchání vařila 15 min.

b) redukce pomocí  $\text{NaBH}_4$ 

Roztok  $\text{AgNO}_3$  byl připraven rozpuštěním 3,36 mg  $\text{AgNO}_3$  v 9 ml vody ( $c(\text{AgNO}_3) = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ). Dále byl připraven roztok  $\text{NaBH}_4$  rozpuštěním 3,5 mg  $\text{NaBH}_4$  v 75 ml vody ( $c(\text{NaBH}_4) = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ). Vzniklé roztoky byly chlazeny ve vodní lázni s ledem. K roztoku  $\text{NaBH}_4$  v 100 ml baňce bylo vloženo magnetické míchadlo a za stálého míchání byl po kapkách přidán roztok  $\text{AgNO}_3$ . Míchání poté pokračovalo bez přerušení dalších 45 min až do doby, než se rozložil nadbytečný  $\text{NaBH}_4$  a ustálila se laboratorní teplota roztoku.

## c) redukce pomocí Chelatonu III

Byl připraven zásobní roztok Chelatonu III rozpuštěním 22,8 mg látky v 2 ml vody, roztok  $\text{NaOH}$  rozpuštěním 180,9 mg  $\text{NaOH}$  ve 2 ml vody a roztok  $\text{AgNO}_3$  rozpuštěním 9,10 mg  $\text{AgNO}_3$  v 0,5 ml vody.

Do dvouhrdlé baňky o objemu 100 ml bylo odpipetováno 268  $\mu\text{l}$  roztoku Chelatonu III ( $c(\text{Chelaton III}) = 1,64 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a 88  $\mu\text{l}$   $\text{NaOH}$  ( $c(\text{NaOH}) = 1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ ). Dále bylo vloženo míchadlo. Baňka se zpětným chladičem byla umístěna do olejové lázně a roztok byl přiveden k varu. Poté byl přidán roztok  $\text{AgNO}_3$  485  $\mu\text{l}$  ( $c(\text{AgNO}_3) = 2,60 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ) a reakční směs se vařila 15 min.

## Charakterizace nanočástic

Roztoky byly po přípravě ponechány jeden den v temnu a poté byly charakterizovány pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie a Ramanovy spektroskopie.

## Modifikace nanočástic

Ke 2 ml roztoku nanočástic byl přidán vodný roztok modelových látek (1), (2), (3), (4) a roztok látek (5) a (6) v rozpouštědle (DMSO). Koncentrace přidané látky byla v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ . Po přidavku modelové látky byl roztok ponechán dalších 24 hodin v temnu. Vliv modifikace byl sledován pomocí Ramanovy spektroskopie.

## Cílená agregace nanočástic

Z důvodu ověření vlivu agregace nanočástic na intenzitu povrchem zesíleného signálu v Ramanově spektroskopii byl k roztokům nanočástic modifikovaných vybranými látkami přidáván 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  roztok  $\text{KCl}$ . Přidávky  $\text{KCl}$  byly realizovány v rozsahu 20–200  $\mu\text{l}$ , s krokem 20  $\mu\text{l}$  a 200–300  $\mu\text{l}$  s krokem 50  $\mu\text{l}$ . Vliv zvyšování iontové síly byl sledován pomocí Ramanovy spektroskopie a pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie.

## Výsledky a diskuse

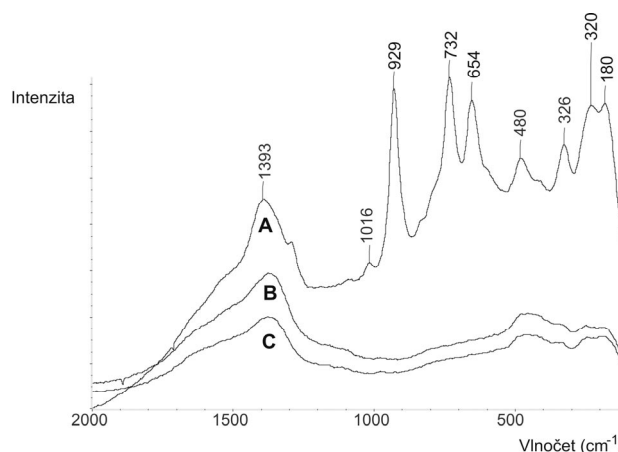
## Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice byly připraveny redukcí  $\text{AgNO}_3$  různými redukčními činidly<sup>1–3</sup>. Takto připravené nanočástice byly

## Tabulka I

Vlnové délky absorpčních maxim hlavních absorpčních pásů roztoků nanočástic stříbra v závislosti na použitém redukčním činidle

Redukční činidlo	Max. absorpce [nm]	Velikost [nm]
A) citrát sodný	430	≈ 45
B) borohydrid sodný	392	≈ 20
C) chelaton III	414	≈ 30



Obr. 2. SERS spektra imobilizované látky (1) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Roztoky nanočástic byly připraveny redukcí (A) citrátem sodným, (B) borohydridem sodným, (C) chelatonem III

charakterizovány pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Velikost nanočástic v jednotlivých roztocích lze přibližně odhadnout z polohy maxima absorpce těchto roztoků naměřených pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie<sup>6</sup>. Jednotlivá maxima se pohybovala v rozmezí od 392 do 430 nm. Přibližná velikost nanočástic je uvedena v tab. I.

Další charakterizace připravených nanočástic probíhala pomocí Ramanovy spektroskopie, kdy jednotlivé roztoky poskytovaly různou intenzitu signálu v SERS spektrech (obr. 2).

## Modifikace nanočástic a jejich SERS aktivní vlastnosti

SERS aktivní vlastnosti jednotlivých roztoků nanočástic stříbra připravených redukcí  $\text{AgNO}_3$  různými redukčními činidly byly ověřeny pomocí přidavku látky (1), která obsahuje S/COOH funkční skupiny, protože thiohy ochotně interagují s povrchy stříbra<sup>7</sup>. Ramanova spektra jednotlivých roztoků nanočástic s přidavky látky (1) o koncentraci ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ) jsou znázorněna na obr. 2. Ze spekter je patrné, že SERS aktivní vlastnosti při

použité vlnové délce excitačního záření (785 nm) mají pouze nanočástice připravené redukcí  $\text{AgNO}_3$  citrátem sodným (**A**). V ostatních případech spektrum znázorňuje čisté rozpouštědlo (**B**) a (**C**) – voda).

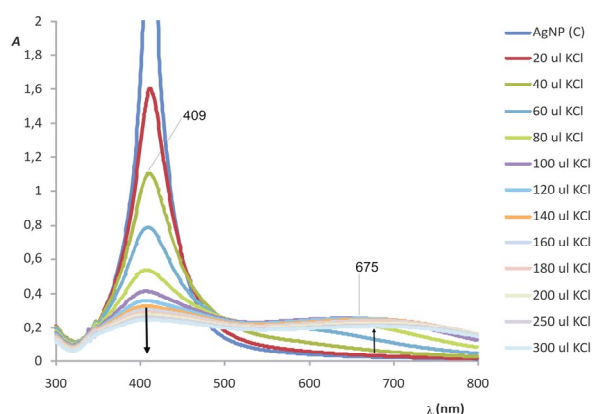
Dříve provedená studie nanočástic stříbra stabilizovaných citrátem (**A**) ukázala, že citrát se vyznačuje poměrně vysokou afinitou vůči stříbrnému povrchu a vytěsnit jej dovedou pouze trioly<sup>8</sup>. Interakce látek vázajících se přes dusík nebyla u takto stabilizovaných nanočástic příliš průkazná.

Z těchto důvodů se nanočástice stabilizované citrátem jeví jako nevhodné pro imobilizaci látek vázajících se přes atom dusíku. Z důvodu nedostatečné schopnosti ostatních koloidních roztoků (redukce borohydridem a chelatonem III) zesilovat signály v Ramanově spektroskopii, byly studovány postupy, jak intenzitu SERS signálů nanočástic podpořit pomocí cílené agregace<sup>6</sup>.

Vazba látky (**1**) přes atom síry byla v pozitivním případě potvrzena absencí valenčně vibračního pásu CS ( $670\text{ cm}^{-1}$ ), který se rozštěpil na dva nové pásy s vlnovými délkami  $732\text{ cm}^{-1}$  a  $654\text{ cm}^{-1}$ . Ty přísluší valenčním vibracím CS *trans* u  $732\text{ cm}^{-1}$  a CS *gauche* u  $654\text{ cm}^{-1}$  (cit.<sup>7</sup>) (obr. 2).

#### Cílená agregace nanočástic

K tomuto kroku bylo přistoupeno z důvodu, že koloidní roztoky (**B**) a (**C**) po přidání látky (**1**) neposkytovaly v Ramanově spektroskopii při dané vlnové délce excitačního laserového záření (785 nm) žádné zesílení. Agregace byla prováděna zvyšováním iontové síly vodného roztoku nanočástic modifikovaných látkou (**1**) o  $c = 7,33 \cdot 10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$  pomocí přidání  $1\text{ mol l}^{-1}$  roztoku KCl. Přidávky byly realizovány v následujících krocích 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250 a 300  $\mu\text{l}$  KCl ke 2 ml roztoku nanočástic.



Obr. 3. UV-VIS absorpční spektra roztoku nanočástic (**C**) modifikovaných látkou (**1**) s přidávkou  $1\text{ mol l}^{-1}$  roztoku KCl. Šipky znázorňují pokles hlavního absorpčního pásu u  $409\text{ nm}$  a vzrůst nového absorpčního pásu s maximem intenzity kolem  $700\text{ nm}$  v závislosti na vzrůstajícím množství přidaného KCl

Na obr. 3 jsou UV-VIS absorpční spektra roztoku nanočástic (**C**) s látkou (**1**) po přidání roztoku KCl. Výchozí roztok modifikovaných nanočástic byl před přidáním KCl naředěn vodou v poměru 1:3 (V:V), aby jeho absorbance byla přibližně 1. Při srovnání jednotlivých spekter je patrná změna intenzity hlavního absorpčního pásu u  $409\text{ nm}$  a vznik nového širokého absorpčního pásu s maximem kolem  $700\text{ nm}$ , který se s rostoucí koncentrací KCl posouvá k vyšší vlnové délce.

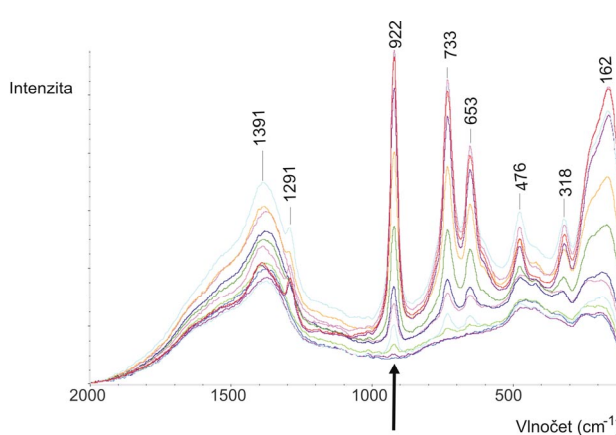
Na obr. 4 jsou Ramanova spektra roztoku nanočástic (**C**) s látkou (**1**) po přidání KCl. Z obrázku je patrné, že při zvyšování koncentrace KCl v roztoku dochází vlivem agregace nanočástic ke zvyšování intenzity signálu SERS spekter. Jednotlivé pásy odpovídají spektru látky (**1**) na povrchu nanočástic stříbra<sup>8</sup>.

#### Interakce látek obsahujících atom dusíku

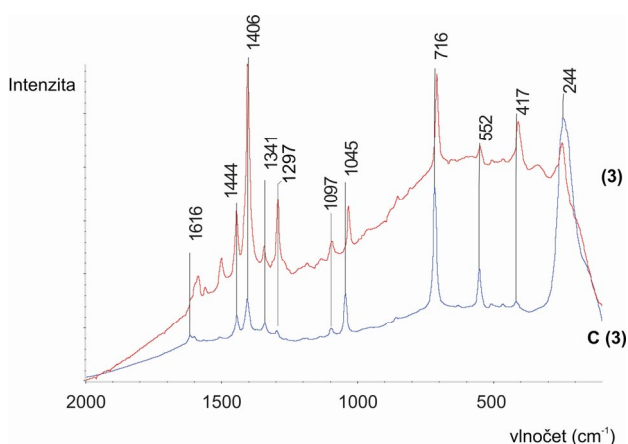
Z důvodu špatné rozpustnosti látek (**5**) a (**6**) ve vodě byl jako modelový systém pro vazbu látek obsahujících atom dusíku zvolen triethylamin (**2**), 1,10-fenantrolin (**3**) a 4,4'-bipyridin (**4**).

Dříve provedené práce<sup>8</sup> prokázaly velice slabou interakci látky (**2**) s citrátovým roztokem nanočástic (**A**). Slabá interakce této látky byla prokázána také v případě přidání látky (**2**) k nanočásticím (**C**) po zagregování roztoku. U roztoku (**B**) nebylo možné kvůli slabému zesílení intenzity Ramanových signálů interakci přidaných látek prokázat.

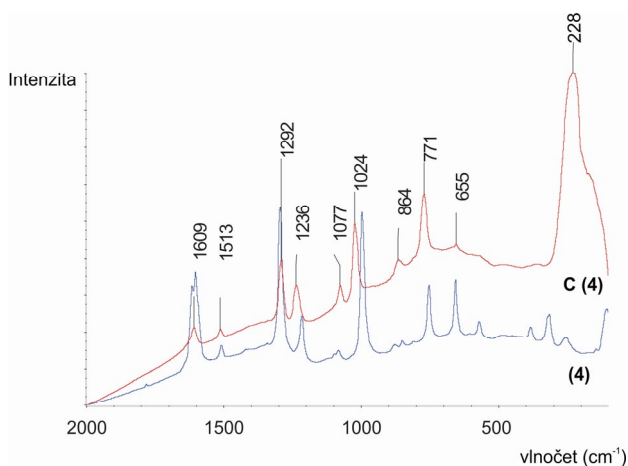
Na obr. 5 je znázorněno SERS spektrum nanočástic (**C**) s přidáním látky (**3**) o  $(c = 2,5 \cdot 10^{-5}\text{ mol l}^{-1})$  a dále pak Ramanovo spektrum čisté látky (**3**). Polohy hlavních pásů čisté látky (**3**) a přidání této látky k roztoku nanočástic (**C**) jsou shodné, nebo jsou jen lehce posunuty, z čehož se lze domnívat, že došlo spíše k fyzikální sorpci látky na povrch nanočástic.



Obr. 4. SERS spektra roztoku nanočástic (**C**) modifikovaných látkou (**1**) o  $c = 7,33 \cdot 10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$  s přidávkou  $1\text{ mol l}^{-1}$  roztoku KCl. Šipka znázorňuje vzrůst intenzity pásu u  $922\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční vibraci  $\text{C-COO}^-$  v závislosti na vzrůstajícím množství přidaného KCl



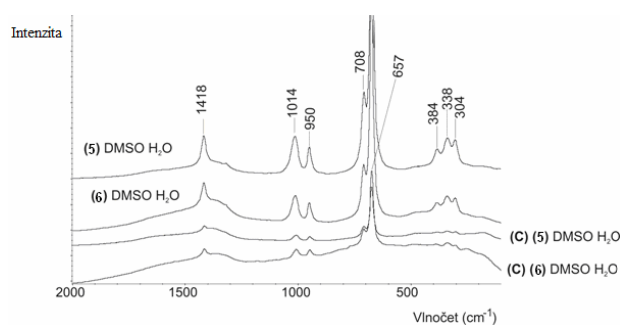
Obr. 5. SERS spektra roztoku nanočástic (C) modifikovaných látkou (3) o  $c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  a Ramanovo spektrum čisté látky (3)



Obr. 6. SERS spektra roztoku nanočástic (C) modifikovaných látkou (4) o  $c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  a Ramanovo spektrum čisté látky (4)

Na obr. 6 je znázorněno SERS spektrum nanočástic (C) s přidavkem látky (4) o ( $c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) a dále pak Ramanovo spektrum čisté látky (4). Polohy hlavních pásů čisté látky (4) a přidavků této látky k roztoku nanočástic (C) jsou lehce posunuty, z čehož se lze domnívat, že mezi povrchem nanočástic a látkou (4) došlo k chemisorpci (1236 a  $1024 \text{ cm}^{-1}$ ).

Na obr. 7 jsou znázorněny Ramanova spektra látek (5) a (6). Navážky těchto látek byly rozpuštěny v DMSO a příslušné množství bylo odpipetováno k roztoku nanočástic (C) vždy tak, aby výsledná koncentrace odpovídala ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ). Pro porovnání byl připraven slepý pokus, kdy byly připraveny roztoky stejným způsobem pouze s tím rozdílem, že místo roztoku nanočástic byla použita destilovaná voda. Protože pásy ve všech spektrech



Obr. 7. Ramanova spektra nanočástic (C) s přidavky látek (5) a (6) a spektra látek s DMSO o téže koncentraci bez nanočástic. Spektra byla pro větší přehlednost vzájemně posunuta pouze v ose y

na obr. 7 odpovídají DMSO ve vodě, k žádné interakci látek (5) a (6) s povrchem nanočástic stříbra nedošlo.

## Závěr

V této práci byly studovány metody přípravy SERS aktivních nanočástic stříbra, které by bylo možné modifikovat látkami vázajícími se na stříbrný povrch přes dusíkový atom. Nanočástice stříbra byly připraveny metodami redukce  $\text{AgNO}_3$  různými redukčními činidly (citrátem sodným (A), borohydridem sodným (B), chelatonem III (C)). SERS aktivní vlastnosti připravených nanočástic byly ověřovány pomocí imobilizace 3-merkaptopropanové kyseliny (1). Bylo zjištěno, že za daných podmínek měření jsou SERS po přípravě SERS aktivní pouze nanočástice připravené redukcí citrátem sodným (A). Z důvodu zesílení intenzity signálů v SERS spektrech byla vyzkoušena cílená agregace nanočástic zvyšováním iontové síly roztoku pomocí  $1 \text{ mol l}^{-1}$  roztoku KCl. Tento postup se ukázal být velice účinný v případě koloidního roztoku (C), kdy v důsledku cílené agregace došlo k výraznému zesílení signálů imobilizované látky (1). V případě ostatních roztoků nevedly přidávky KCl k výrazné změně SERS vlastností. Jak se ukázalo v případě roztoku (C), SERS aktivní vlastnosti souvisí s polohami maxim plasmonové absorpce. Při agregaci nanočástic vznikaly ve viditelné oblasti spektra další pásy a v případě, kdy maximum nově vzniklého pásu leželo v blízkosti vlnové délky excitačního laserového záření, docházelo k intenzivnímu zesílení těchto signálů (k tzv. SERS efektu).

Slabá interakce triethylaminu (2) byla pozorována s roztoky nanočástic (A) a (C). V ostatních případech se lze domnívat, že triethylamin s povrchy neinteraguje nebo že nedochází k dostatečnému zesílení signálů v SERS spektrech. Interakce 1,10-fenantrolinu (3) a 4,4'-bipyridinu (4) byla prokázána s roztokem nanočástic (C). Proto lze usuzovat, že podmínkou interakce látky se stříbrným povrchem přes atom dusíku je, že roztok nanočástic nesmí být stabilizován příliš silnými stabilizačními činidly. Toto

stabilizační činidlo by daná látka nebyla schopna vytěsnit. Atom dusíku by měl být rovněž zapojen do systému násobných vazeb tak, aby působil záporným indukčním efektem. Trögerovy báze (5) a (6) svou strukturou neodpovídají této představě a jejich interakce nebyly prokázány.

## LITERATURA

1. Shu-Yi L., Yi-Ting T., Chien-Chih C., Chia-Mei L., Chun-Hsien C.: *J. Phys. Chem.* 108, 2134 (2004).
2. Susanne M. H., Grieser F., Barraclough C. G.: *J. Coll. Sci. Imp. U. Tok.* 93, 545 (1983).
3. Čermáková K., Šesták O., Matějka P., Baumruk V., Vlčková B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58, 2682 (1993).
4. Canamares M. V., Garcia-Ramos J. V., Sanchez-Cortes S., Castillejo M., Oujja M.: *J. Colloid Interf. Sci.* 326, 103 (2008).
5. Havlík M., Král V., Kaplánek R., Dolenský B.: *Org. Letters* 10, 4767 (2008).
6. Turkevich J., Garton G., Stevenson P. C.: *J. Coll. Sci. Imp. U. Tok.* 26, 9 (1954).
7. Castro J. L., López-Ramírez M. R., Arenas J. F., Otero J. C.: *J. Raman Spectrosc.* 35, 997 (2004).
8. Žvátora P., Řezanka P., Záruba K., Král V.: Sledování způsobu vazby modelových látek na nanočástice stříbra, *Soutěž o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie o cenu firmy Merck, 2008*; strana 86.

---

**OBSAH PŘÍSPĚVKŮ**


---

<i>E. Bílková, M. Sedlák</i>	Využití analytických metod při syntéze a charakterizaci nového konjugátu amfotericinu B citlivého k $\beta$ -glukosidasám	s151
<i>E. Čáňová, M. Lisa, M. Holčapek</i>	Analýza lipidů v přírodních extraktech pomocí HPLC/MS	s154
<i>D. Dospívová, P. Lubal, M. Farková, L. Trnková</i>	Termodynamické studium interakcí fyziologicky významných derivátů purinu	s156
<i>M. Franc</i>	Příprava a testování náplňových kolon pro kapilární kapalinovou chromatografii	s160
<i>P. Greguš, L. Nováková</i>	Vývoj diagnostické metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu farnesolu a tyrosolu jako produktů metabolismu kvasinky <i>Candida albicans</i> v biologických vzorcích s využitím techniky UPLC/MS/MS	s164
<i>D. Hůska, V. Adam, P. Babula, R. Kizek</i>	Plně automatizovaná izolace celkové mRNA z <i>in vitro</i> kultivovaných rostlin ve spojení s elektrochemickou detekcí	s167
<i>H. Krätschmerová, P. Vyskočilová, T. Adam</i>	Screening dědičných metabolických poruch purinové <i>de novo</i> syntézy	s172
<i>L. Maixnerová, K. Pecková, J. Barek</i>	HPLC-ED aminobifenylů pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody	s175
<i>K. Mališová, O. Mestek</i>	Speciační analýza stopových prvků v listech vrby	s180
<i>K. Mičová, D. Friedecký, E. Faber, T. Adam</i>	Stanovení hladin imatinibu pomocí kapilární elektroforézy u pacientů s chronickou myeloidní leukémií	s185
<i>V. Mlejová, M. Adam, P. Dobiáš, P. Pavlíková, K. Ventura</i>	Aplikace vybraných mikroextrakčních technik při stanovení rostlinných silic	s189
<i>M. Nováčková, M. Holá, V. Kanický</i>	Laserová ablace s hmotnostní spektrometrií v indukčně vázaném plazmatu pro 2D mapování močových kamenů	s193
<i>P. Novotná, M. Urbanová</i>	Konformační studie poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu metodou vibračního cirkulárního dichroismu	s198
<i>R. Ševčík, P. Lubal</i>	Kinetické studium Ce(III) a Cu(II) komplexů cyklenových derivátů s pendantními skupinami obsahujícími fosfor	s203
<i>J. Urbanová, P. Lubal, E. Táborská, P. Táborský</i>	Interakce benzo(c)fenantridinových kvarterních alkaloidů s DNA	s207
<i>O. Yosypchuk, J. Barek</i>	Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě	s212
<i>O. Zítka, D. Hůska, V. Adam, L. Trnková, R. Kizek</i>	Elektrochemie jako nástroj pro studium interakce matrixové metaloproteinasy-9 a kolagenu	s216
<i>P. Žvátora, K. Záruba, P. Řezanka, V. Král</i>	Studium povrchové modifikace stříbrných nanočástic a jejich možné využití v analytické chemii	s221

---

**AUTORSKÝ REJSTŘÍK**

---

Adam M. s189  
Adam T. s172, s185  
Adam V. s167, s216

Babula P. s167  
Barek J. s175, s212  
Bílková E. s151

Čáňová E. s154

Dobiáš P. s189  
Dospivová D. s156

Faber E. s185  
Farková M. s156  
Franc M. s160  
Friedecký D. s185

Greguš P. s164

Holá M. s193  
Holčápek M. s154  
Húska D. s167, s216

Kanický V. s193  
Kizek R. s167, s216  
Král V. s221  
Krätschmerová H. s172

Lísa M. s154  
Lubal P. s156, s203, s207

Maixnerová L. s175  
Mališová K. s180  
Mestek O. s180  
Mičová K. s185  
Mlejová V. s189

Nováčková M. s193  
Nováková L. s164  
Novotná P. s198

Pavlíková P. s189  
Pecková K. s175

Řezanka P. s221  
Sedlák M. s151  
Ševčík R. s203

Táborská E. s207  
Táborský P. s207  
Trnková L. s156, s216

Urbanová J. s207  
Urbanová M. s198

Ventura K. s189  
Vyskočilová P. s172

Yosypchuk O. s212

Záruba K. s221  
Žitka O. s216

Žvátora P. s221