



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



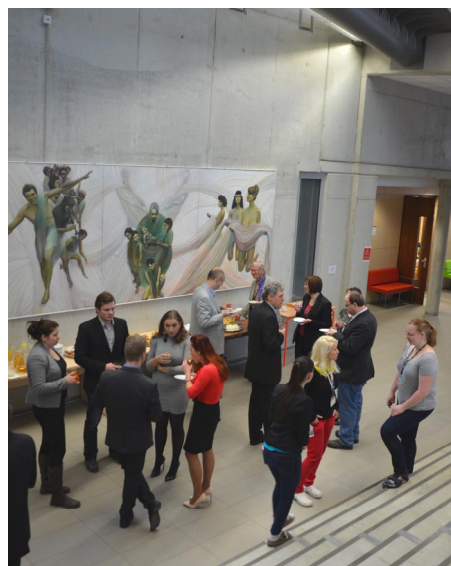
Sborník vybraných příspěvků

20. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2017“

8. a 9. února 2017

České Budějovice



Editoři sborníku:

Jiří Barek

Vlastimil Vyskočil

Soutěž je organizována pod záštitou a s finanční podporou následujících partnerů:



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



MERCK



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



OSTRAVSKÁ
UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



Univerzita
Pardubice
Fakulta
chemicko-technologická



UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM

Přírodovědecká fakulta



FAKULTA
CHEMICKO-INŽENÝRSKÁ
VŠCHT PRAHA



FAKULTA
CHEMICKÉ TECHNOLOGIE
VŠCHT PRAHA



FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
Univerzita Karlova

MANEKO

LABORATORNÍ POTŘEBY A TECHNIKA



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE®

Metrohm
Česká republika

SPECTRO CS

20. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2017“ úspěšně proběhl na Ústavu chemie a biochemie Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity ve dnech 8. a 9. února 2017

Jubilejní 20. ročník této soutěže, která od roku 2015 nese jméno profesora Štulíka, byl jistě důstojným uctěním památky tohoto významného analytického chemika, vysokoškolského pedagoga a zejména vynikajícího člověka. Díky bezchybné práci organizačního výboru z PřF JČU ve složení RNDr. Ján Štěrba, Ph.D., prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., RNDr. Pavlína Věchtová, Bc. Pavlína Kočová, Mgr. Zuzana Vavrušková, Bc. Hana Mašková, Radomír Vokurka a Kateřina Vančurová, jemuž nepochybně patří srdečný dík všech účastníků soutěže, vše proběhlo v příjemné a přátelské atmosféře výše uvedeného jihočeského pracoviště. Soutěže se letos zúčastnilo celkem 21 studentů z 8 českých vysokých škol uvedených na stránkách soutěže (<http://www.prf.jcu.cz/uchbch/konference-a-workshop/o-cenu-karla-stulika2017.html>).

Vysoká úroveň přihlášených studentských prací a jejich profesionálně dokonalé prezentace si zaslouží poděkování všem soutěžícím bez ohledu na jejich konečné umístění, ale i jejich mateřským pracovištím, která bezesporu výrazným způsobem přispěla k vysoké kvalitě soutěže. Porota reprezentující prakticky všechna zúčastněná pracoviště, ve složení doc. Ing. Martin Adam, Ph.D., prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., doc. Ing. Zdeňka Kolská, Ph.D., doc. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D., doc. Ing. David Milde, PhD., Ing. Radmila Řápková, doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D., prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. a doc. Ing. Kamil Záruba, PhD., tak neměla jednoduchý úkol.

Na prvních třech příčkách se umístili:

- 1. místo: Bc. Adam Pruška** (Ústav chemie, Masarykova univerzita) za práci s názvem Studium fundamentálních parametrů nanášení matrice pro zobrazovací MALDI MS biologických vzorků s vysokým rozlišením.
- 2. místo: Bc. Barbora Boráňová** (Přírodovědecká fakulta, RCPTM, Univerzita Palackého v Olomouci) za práci s názvem Toxikologická a forenzní analýza "new designer" benzodiazepinů kapilární elektroforézou s hmotnostní spektrometrií.
- 3. místo: Bc. Dušan Palacka** (Ústav analytické chemie, Fakulta chemické a potravinářské technologie) za práci

s názvem Simple and rapid method utilizing dispersive liquid-liquid microextraction for alcohol-content samples analysis.

Vzhledem k mimořádné kvalitě prezentovaných prací se porota rozhodla udělit Zvláštní cenu poroty následujícím soutěžícím:

Patriku Faganovi (Ústav analytické chemie, VŠCHT) za práci Studium struktury heroínu v roztoku spektroskopickými metodami.

Karlu Hořejšímu (Ústav chemie a biochemie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita) za práci Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě pomocí LC/MS.

Kateřině Krčové (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého) za práci Uhlíkové mikroelektrody modifikované slitinou mědi a niklu ke stanovení glukosy.

Markétě Kučerové (Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice) za práci Voltametrické stanovení dantrólu s využitím borem dopované diamantové elektrody.

Bc. Evě Martínkové (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UK) za práci Studie interakce protaminu s heparinem a její využitelnosti v kapilární elektroforéze.

Ze srdce blahopřeji všem oceněným k mimořádným odvedeným výkonům. Na místě je však i vřelé poděkování všem soutěžícím za jejich kvalitní práce a nadstandardní výkony při jejich prezentaci. Za to si zaslouží obdiv a úctu rozsáhlé české analytické komunity. Rád bych zde poděkoval i Ing. Radmile Řápkové, výkonné redaktorce časopisu Chemické listy, a RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, PhD. za pečlivou přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Czech Chemical Society Symposium Series (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného této soutěži.

A na závěr s potěšením oznamuji naší odborné veřejnosti, že nelehkého úkolu zorganizovat další kolo soutěže o Cenu Karla Štulíka ve dnech 7. a 8. února 2018 se ujal tým kolegů z Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské VŠCHT v Praze pod vedením doc. Ing. Kamila Záruby, PhD.

*Jiří Barek
předseda odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické*

KYSELINA VANILMANDĽOVÁ A HOMOVANILOVÁ: ELEKTROANALÝZA NA ELEKTRODACH NA BÁZE UHLÍKU

SIMONA BALUCHOVÁ a KAROLINA SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ

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

Klíčové slová: bórom dopovaná diamantová elektroda, elektroda zo skleneného uhlíka, homovanilová kyselina, vanilmandľová kyselina, voltametria

Úvod

Klinická chémia využíva ako diagnostické markery pre rôznorodé metabolické¹ a neurologické² poruchy, vrátane tumorov drene nadobličiek, neuroblastomy³ a feochromocytomy⁴, konečné metabolity katecholamínov, kyselinu vanilmandľovú (VMA) a kyselinu homovanilovú (HVA). Pomer ich koncentrácií⁵ vo fyziologických tekutinách môže byť taktiež využitý k diagnostike jednotlivých ochorení. Ide o elektroaktívne, štruktúrou veľmi obdobné, fenolické karboxylové kyseliny (obr. 1), ktorých kvantifikáciu je možné previesť elektroanalytickými technikami využívajúc pracovné elektródy na báze uhlíku, ako je pyrolytický grafit⁵, sklenený uhlík⁶, kompozitné grafitové⁷ či screen-printed uhlíkové elektródy⁸. Depozícia vhodného kovového filmu⁹, elektropolymerizácia^{10,11} či adsorpcia¹² organických látok sú použité modifikácie elektródových povrchov slúžiace k zvýšeniu selektivity a citlivosti stanovenia VMA a HVA, za rovnakým účelom boli pripravené aj senzory založené na elektróde zo skleneného uhlíku pokryté vrstvou molekulárne vtláčeného polyméru^{6,13}.

Elektródy zo skleneného uhlíku (glassy carbon, GC) sú najbežnejšie používané uhlíkové elektródy vďaka ich výborným mechanickým a elektrickým vlastnostiam, pomerne širokému rozsahu potenciálového okna, chemicky inertej povahe, nepriepustnosti pre plyny a kompatibilitu so všetkými bežnými rozpúšťadlami¹⁴. Vysoká chemická a mechanická stabilita, dokonca i v korozívnych prostrediach, inertný povrch prejavujúci sa nízkou adsorpciou, relatívna necitlivosť k vývoju kyslíka, extrémne široké potenciálové okno a nízke prúdy pozadia sú považované za vlastnosti, ktoré odlišujú bórom dopované diamantové (BDD) elektródy od konvenčných elektród, akou je aj GC elektroda^{14,15}. Výhodou BDD elektródy je i možnosť elektrochemickej aktivácie *in-situ* v anodickom režime pri kladných potenciáloch, kedy dochádza k rozkladu vody za vzniku •OH radikálov, či v katodickom režime pri zápor-

ných potenciáloch iniciujúcich vývoj vodíku^{16,17}. Možná je i mechanická aktivácia BDD povrchu leštením^{16,18}.

Cieľom tejto práce bolo preskúmať elektrochemické správanie oxidovateľných látok VMA a HVA na BDD a GC elektródach, a využiť ich pre vývoj voltametrických metód pre stanovenie uvedených markerov.

Experimentálna časť

Všetky chemikálie boli kvality p.a.: kyselina vanilmandľová, kyselina homovanilová (obe Sigma-Aldrich, USA), chlorid draselný, trihydrát hexakvanoželeznatane draselného, kyselina octová (99 %), kyselina mravčia (98 %) (všetko Lachema, ČR), hydroxid sodný, kyselina trihydrogénfosforečná (85 %), metanol (všetko Penta, ČR), amoniakálny roztok (25 %), kyselina boritá (obe Lach-Ner, ČR), diamantový sprej (veľkosť častíc 3 µm a 1 µm, Kemet International, UK), oxid hlinitý (veľkosť častíc 0,3 µm, Elektrochemické detektory, Turnov, ČR; veľkosť častíc 0,05 µm, BDH Chemicals, UK).

Deionizovaná voda (Millipore Mili plus Q systém, USA), ktorej odpor nebol menší než 18,2 MΩ, bola použitá k príprave všetkých vodných roztokov.

Pre extrakciu na tuhej fáze boli použité kolónky Chromabond HR-XA (60 mg, 3 ml, Macherey-Nagel, Nemecko) a nasledujúci postup¹⁹. Kolónky boli aktivované pomocou 3 ml CH₃OH a 3 ml deionizovanej vody. Nasledovala aplikácia prefiltrovaného moču, nariadeného 5% NH₄OH k zaisteniu ionizovanej podoby analytov, o objeme 15 ml. Po premývaní 2 × 2 ml 5% NH₄OH došlo k sušeniu kolónky za zvýšeného tlaku po dobu 1 min, elúcia analytov bola prevedená 2 × 1 ml 10% HCOOH v CH₃OH a nasledovalo opäť 1 min sušenie kolónky. Zachytený eluát bol doplnený do 5 ml 0,1 mol l⁻¹ fosfátovým puffom o pH 3,0.

Pre voltametrické merania boli použité prístroje Eco-Tribo Polarograf ovládaný programom PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, ČR) a IviumStat riadený softwarom IviumSoft verzia 2.024 (Ivium Technologies, Holandsko).

Bolo využívané štandardné trojelektrodové usporiadanie s referenčnou argentschloridovou elektródou (Ag | AgCl | 3 mol l⁻¹ KCl), pomocnou platinovou elektródou, (obe Elektrochemické detektory, ČR), a ako pracovné elektródy boli použité BDD elektroda o priemere 3 mm, ploche 7,1 mm² a s úrovňou dopovania bórom ~0,1 % (Windsor Scientific, UK), ktorá bola anodicky aktivovaná, pokiaľ nie je uvedené inak, a GC elektroda s priemerom 1 mm a plochou 0,785 mm² (Bio-Logic Science Instruments, Francúzsko).

Merania pH hodnôt boli prevádzané na digitálnom pH-metri s kombinovanou sklenenou elektródou (Jenway, UK).

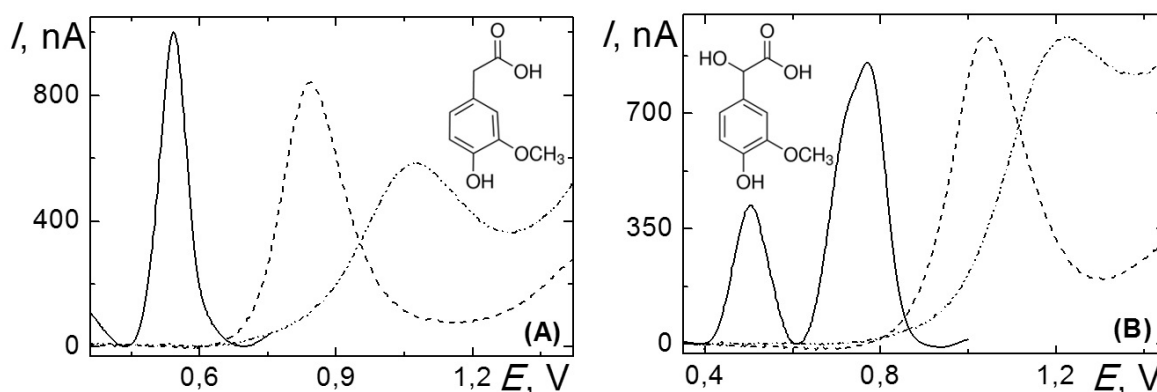
Výsledky a diskusia

Elektrochemická charakterizácia GC a BDD elektród bola prevedená využitím cyklickej voltametrie a k stavu povrchu senzitivného redoxného činidla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Pri použití rýchlosti scanu $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ sú hodnoty rozdielu potenciálu anodického a katodického píku ΔE_p 125 mV pre GC a 86 mV pre novú, ešte žiadnym spôsobom neaktivovanú BDD elektródu, ktorej povrch je hydrogenovaný¹⁶. Voltametrická odozva BDD elektródy sa však výrazne mení s úpravou jej povrchu, najčastejšie sa využíva konverzia na oxidovaný povrch, čo je možné dosiahnuť anodickou polarizáciou povrchu¹⁶. Anodická aktivácia BDD elektródy (0,1 mol Γ^{-1} H_2SO_4 , potenciál aktivácie $E_a = +2,4 \text{ V}$, 20 min) mala dramatický efekt na redoxné správanie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, hodnota ΔE_p sa výrazne zvýšila na 340 mV, čo je pravdepodobne následkom odpudzovania medzi negatívnymi nábojmi kyslíkových funkčných skupín a použitého redoxného páru. Ďalšou možnosťou aktivácie je leštenie na alumine, ktoré viedlo k opätovnému zníženiu hodnoty ΔE_p na 116 mV.

Elektrooxidácia oboch študovaných látok spôsobuje pasiváciu GC i BDD elektródy. V priebehu dvojelektrónového oxidačného procesu vzniká najprv fenoxylradikál a následne karbokatión na aromatickom kruhu, ktorý je napadaný molekulou vody vystupujúcou ako nukleofil. V dôsledku toho dochádza k strate metoxy skupiny za vzniku odpovedajúcich *o*-chinónov²⁰. V priebehu reakcie môže dochádzať k stabilizácii radikálu reakciou s „rodičovskou“ zlúčeninou za vzniku diméru či polyméru, ktoré sa môžu prirodzene adsorbovať a spôsobovať pasiváciu elektród. Boli skúmané rôzne spôsoby zamedzenia tohto nežiaduceho deja. V prípade GC elektródy sa ako jediný vhodný spôsob zaistenia reprodukovateľnosti signálov preukázalo mechanické leštenie povrchu na postupne menších časticiach diamantového spreju (3 μm a 1 μm) a aluminy (0,05 μm). BDD elektródu medzi následnými

scanmi je možné čistiť mechanicky leštením na alumine, i s využitím katodickej ($E_a = -2,4 \text{ V}$) a anodickej ($E_a = +2,4 \text{ V}$) elektrochemickej aktivácie *in-situ*, pričom najreprodukovateľnejšie a najväčšie výšky signálov boli dosiahnuté pri použití anodickej aktivácie po dobu 30 sekúnd za súčasného miešania roztoku. Výrazné rozdiely, nielen v poklese veľkosti prúdov píkov, ale i v posune potenciálov oxidačných píkov HVA a VMA smerom k pozitívnejším hodnotám, boli zistené pri použití mechanickej aktivácie, v porovnaní s anodickým spôsobom (obr. 1).

Brittonov-Robinsonov pufr v rozsahu pH 2,0–12,0 bol použitý k prešetreniu vplyvu pH na namerané diferenčné pulzné (DP) voltamogramy látok. Oxidácia študovaných metabolitov na BDD elektróde prebieha pri výrazne vyšších potenciáloch, v prípade HVA +805 až +1010 mV, u VMA +870 až +1120 mV, než na GC elektróde, kde sú tieto hodnoty pre HVA v rozmedzí +210 až +630 mV, a u VMA +530 až +800 mV. S nárastom pH sa v DP voltamogramoch HVA nameraných na BDD elektróde postupne objavujú aj ďalšie píky. Na GC elektróde v celom skúmanom rozsahu pH poskytuje HVA len jeden pík, čo je v zhode so správaním danej kyseliny aj na kompozitných uhlíkových filmoch⁷. Naopak, pri oxidácii VMA na GC elektróde sa v rozmedzí pH 2,0–4,0 objavujú píky dva, posunom k vyšším hodnotám pH sa počet znižuje na jeden pík, na uhlíkovom kompozitnom filme VMA poskytuje dva píky až do pH 11,0 (cit.⁷). Na BDD elektróde sa oxidácia VMA prejavuje jedným píkom, len v rozmedzí pH 10,0 až 12,0 sa v DP voltamogramoch zaznamenali nepatrné, ťažko kvantifikovateľné druhé píky. Z tohto vyplýva, že elektrochemické správanie oboch látok výrazne závisí na type elektródového materiálu i na pH hodnotách základného elektrolytu, čo pravdepodobne súvisí s odlišným mechanizmom oxidácie v závislosti na $\text{p}K_a$ hodnotách²¹ disociácie karboxylovej skupiny (4,35 pre HVA a 3,44 pre VMA) a hydroxylovej skupiny na aromatickom skelete



Obr. 1. DP voltamogramy (A) HVA a (B) VMA (obe o $c = 0,1 \text{ mmol } \Gamma^{-1}$) v $0,1 \text{ mol } \Gamma^{-1}$ fosfátovom puffri o pH 3,0 namerané na rôznych elektródach na báze uhlíka: (plnou čiarou) GC elektróda, (čiarkovane) anodicky aktivovaná BDD a (bodkočiarkovane) mechanicke leštená BDD elektróda

(10,34 v prípade HVA a 9,93 pre VMA). Kyslé prostredie o pH 2,0 a 3,0, kedy je potlačená disociácia oboch kyslých funkčných skupín, je v prípade BDD i GC elektródy pre ich stanovenie najvhodnejšie, pretože poskytujú výrazné a dobre spracovateľné analytické signály (obr. 1). Ako základný elektrolyt pre ich analýzu bol preto zvolený 0,1 mol l⁻¹ fosfátový pufoer o pH 3,0.

Závislosti výšky prúdu píku HVA a VMA na rýchlosti polarizácie pre obe elektródy preukázali, že anodická oxidácia HVA na BDD a GC elektróde a VMA na BDD elektróde sú deje kontrolované difúziou. Na GC elektróde je oxidácia VMA riadená adsorpciou.

Technika DPV bola použitá k zmeraniu kalibračných závislostí oboch skúmaných látok na GC a BDD elektróde. Linearita v rozsahu koncentrácií 2 až 100 μmol l⁻¹ pre HVA a 6 až 100 μmol l⁻¹ pre VMA, a limity stanovenia o hodnotách 3,0 μmol l⁻¹ pre HVA a 5,0 μmol l⁻¹ pre VMA boli namerané na GC elektróde. BDD elektróda poskytuje lineárnu závislosť v rozsahu koncentrácií 2 až 100 μmol l⁻¹ pre obe látky, a príslušné limity kvantifikácie pre HVA 1,9 μmol l⁻¹, a pre VMA 1,4 μmol l⁻¹, ktoré sú nižšie v porovnaní s GC elektródou. Zistené hodnoty limitov detekcie a kvantifikácie na daných druhoch elektród sú však postačujúce pre odhalenie a stanovenie oboch markerov v moči, kde sa ich fyziologická koncentrácia spravidla pohybuje v rozmedzí 8,2–41,0 μmol l⁻¹ v prípade HVA a 11,6–28,7 μmol l⁻¹ u VMA²².

Taktiež bola overená možnosť súčasnej detekcie HVA a VMA v zmesi DPV metódou, kedy anodicky aktivovaná BDD elektróda je schopná v prostredí o pH 3,0 odlišiť odozvy jednotlivých kyselín, avšak dochádza k čiastočnému prekrytiu ich signálov. Pre reálne vzorky moču však táto metóda neprinesla uspokojivé výsledky. Na GC elektróde v totožnom prostredí nie je možné odlišiť pík HVA a prvý oxidačný pík VMA.

Preto bol optimalizovaný proces extrakcie na tuhej fáze s použitím kolónky na báze silného anionového meniča pre HVA a VMA z deionizovanej vody, kde bola dosiahnutá výťažnosť viac než 90 % pre obe látky. Pri aplikácii tohto postupu na vzorky moču došlo síce k významnému zníženiu výšky širokého píku o vyše 70 % v oblasti potenciálov, kde sa oxiduje HVA a VMA, v porovnaní s neextrahovanou vzorkou moču, no i napriek tomu sa nepodarilo odlišiť signály jednotlivých kyselín v tejto komplexnejšej biologickej matrici.

Záver

V rámci tejto práce prebehlo vzájomné porovnanie použitých uhlíkových elektródových povrchov (GC elektróda, anodicky aktivovaná BDD a mechanicky leštením aktivovaná BDD elektróda) k preskúmaniu elektrochemického správania dvoch významných klinických markerov VMA a HVA a optimalizácia podmienok ich stanovenia pomocou voltametrických techník. Najlepšie výsledky poskytla anodicky aktivovaná BDD elektróda, ktorá bola aplikovaná aj na reálne vzorky moču priamo i po predchá-

dzajúcej extrakcii na tuhej fáze, ani jeden prístup však nevedol k metóde umožňujúcej spoľahlivé súčasné stanovenie oboch analytov. Ďalší výskum je preto nutné smerovať na obmedzenie vplyvu matrice, voľbou iného typu extrakčných kolóniek či separáciou v chromatografických systémoch. Zvýšenie citlivosti a selektivity je možné predpokladať i vďaka modifikácii elektródového povrchu.

SB ďakuje Grantovej agentúre Univerzity Karlovej (projekt GAUK 270316) a KS-P ďakuje Grantovej agentúre Českej republiky (projekt GAČR P206/15/02815S) za finančnú podporu tejto práce. Projekt vznikol v rámci programu Špecifického vysokoškolského výskumu vedeného pod číslom SVV 260440.

LITERATÚRA

1. Matsuo M., Tasaki R., Kodama H., Hamasaki Y.: *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 89 (2005).
2. Barco S., Gennai I., Reggiardo G., Galleni B., Barbagallo L., Maffia A., Viscardi E., De Leonardis F., Cecinati V., Sorrentino S., Garaventa A., Conte M., Cangemi G.: *Clin. Biochem.* 47, 848 (2014).
3. Monsaingeon M., Perel Y., Simonnet G., Corcuff J. B.: *Eur. J. Pediatr.* 162, 397 (2003).
4. Rosano T. G., Swift T. A., Hayes L. W.: *Clin. Chem.* 37, 1854 (1991).
5. Li Q. A., Batchelor-McAuley C., Compton R. G.: *J. Phys. Chem. B* 114, 9713 (2010).
6. Dineiro Y., Menendez M. I., Blanco-Lopez M. C., Lobo-Castanon M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tunon-Blanco P.: *Anal. Chem.* 77, 6741 (2005).
7. Libansky M., Zima J., Berek J., Dejmokova H.: *Monatsh. Chem.* 147, 89 (2016).
8. Makrlíková A., Ktena E., Economou A., Fischer J., Navrátil T., Berek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 29, 146 (2016).
9. Selvaraju T., Ramaraj R.: *Electrochim. Acta* 52, 2998 (2007).
10. Hatefi-Mehrjardi A., Ghaemi N., Karimi M. A., Ghasemi M., Islami-Ramchahi S.: *Electroanalysis* 26, 2491 (2014).
11. Revin S. B., John S. A.: *Anal. Methods* 4, 348 (2012).
12. Al Mulla I., Lowry J. P., Serra P. A., O'Neill R. D.: *Analyst* 134, 893 (2009).
13. Blanco-Lopez M. C., Lobo-Castanon M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tunon-Blanco P.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 353 (2003).
14. Uslu B., Ozkan S. A.: *Anal. Lett.* 40, 817 (2007).
15. Pedrosa V. A., Suffredini H. B., Codognoto L., Tanimoto S. T., Machado S. A. S., Avaca L. A.: *Anal. Lett.* 38, 1115 (2005).
16. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* 85, 7230 (2013).
17. Macpherson J. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 2935 (2015).

18. Zavazalova J., Prochazkova K., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Lett.* 49, 80 (2016).
19. <http://www.mn-net.com/tabid/11013/default.aspx>, stiahnuté 1. 6. 2016.
20. Blanco-Lopez M. C., Lobo-Castanon M. J., Ordieres A. J. M., Tunon-Blanco P.: *Electroanalysis* 19, 207 (2007).
21. Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcao A.: *Anal. Chim. Acta* 768, 12 (2013).
22. Garcia A., Heinanen M., Jimenez L. M., Barbas C.: *J. Chromatogr. A* 871, 341 (2000).

S. Baluchová and K. Schwarzová-Pecková (*Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry*): **Vanillylmandelic and Homovanillic Acid: Electroanalysis at Carbon-Based Electrodes**

The electrooxidation of two important diagnostic markers vanillylmandelic and homovanillic acid at boron-doped diamond (BDD) electrode and glassy carbon (GC)

electrode using voltammetric techniques was investigated. Their behavior in aqueous media depends significantly on pH and used electrode material; the highest and best developed voltammetric signals at both electrodes were obtained in an acidic medium when studied organic acids occur in their non-ionized form. Calibration dependences are linear for both compounds at both electrodes in phosphate buffer pH 3.0 in the concentration range from 2 to 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Using differential pulse voltammetry limits of detection for homovanillic acid 0.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ at BDD electrode and 0.9 $\mu\text{mol l}^{-1}$ at GC electrode, and for vanillylmandelic acid 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ and 1.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ at BDD and GC electrode, respectively, were achieved. The possibility of their simultaneous determination was also verified and anodically oxidized boron-doped diamond electrode was used for measurements in real urine samples directly and after solid phase extraction.

Keywords: boron-doped diamond electrode, glassy carbon electrode, homovanillic acid, vanillylmandelic acid, voltammetry

TOXIKOLOGICKÁ A FORENZNÍ ANALÝZA "NEW DESIGNER" BENZODIAZEPINŮ KAPILÁRNÍ ELEKTROFOREZOU S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

BARBORA BORÁŇOVÁ, MARTIN ŠVIDRNOCH
a VÍTĚZSLAV MAIER

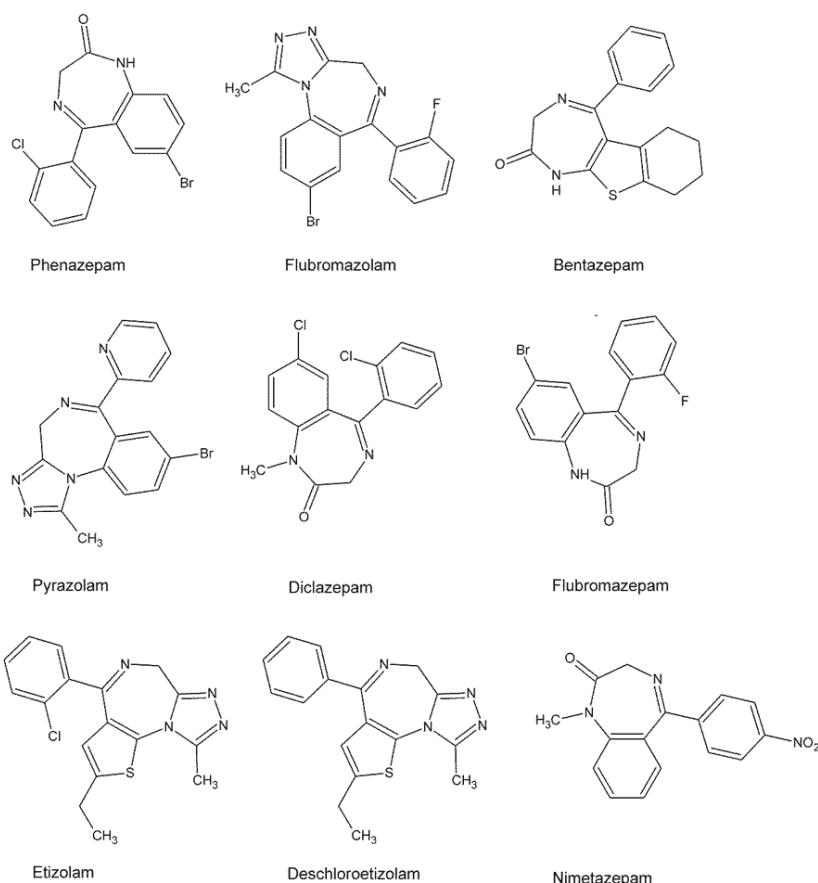
*Katedra analytické chemie, Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
boranova.barbora@email.cz*

Klíčová slova: new designer benzodiazepiny, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, toxikologická analýza, forenzní analýza

Úvod

Substance, které jsou souhrnně označovány jako “new designer drugs” (nové syntetické drogy), jsou svou strukturou i účinkem podobné známým nelegálním drogám. Nové syntetické drogy však na rozdíl od kontrolovaných drog, nejsou uvedeny v seznamu omamných a psychotropních látek. Mezi nové syntetické drogy, které jsou rozšířeny po celém světě, patří zejména syntetické katinony, fenylethylaminy, opiáty a syntetické kanabinoidy¹⁻³. V roce 2014 přibýly do této skupiny nových syntetických drog také nové syntetické benzodiazepiny^{4,5}.

Syntetické benzodiazepiny jsou strukturně velmi podobné benzodiazepinům, které jsou využívány jako léčiva, a také jsou nadužívány a zneužívány jako návykové látky. Ačkoli mají nové syntetické benzodiazepiny podobnou strukturu i fyziologické účinky jako benzodiazepiny kla-



Obr. 1. Chemické struktury studovaných syntetických benzodiazepinů

sické, nejsou využívány k terapeutickým účelům⁶. Naopak jsou na nelegální drogové scéně distribuovány jako nové drogy nebo náhražky běžně zneužívaných drog.

Analýza nových syntetických drog představuje obtížný úkol pro toxikologické a forenzní laboratoře zejména proto, že tyto laboratoře využívají zavedené rutinní postupy zaměřené na průkaz intoxikací látkami, které již jsou uvedeny na seznamu nelegálních látek. V řadě případů tak může dojít k falešně negativním závěrům, kdy není prokázána žádná nelegální látka či její metabolit v analyzovaných tělních tekutinách.

Doposud publikované práce popisují zejména charakterizaci jednotlivých nových syntetických benzodiazepinů (případně jejich metabolitů) pomocí několika analytických metod bez zaměření na screening všech syntetických benzodiazepinů v tělních tekutinách (zejména v krvi a v moči)^{7–10}. Pouze jediná práce se zabývá simultánní toxikologickou analýzou jedenácti syntetických benzodiazepinů v moči¹¹.

Alternativou k dnes již zavedeným chromatografickým metodám v toxikologické a forenzní analýze může být využití kapilárních elektromigračních metod ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií¹². Příspěvek popisuje vývoj metody separace vybraných nových syntetických benzodiazepinů (chemické struktury jsou zobrazeny na obr. 1) s pomocí kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-ESI-MS/MS). Vyvinutá metoda byla validována a aplikována na analýzu syntetických benzodiazepinů v séru.

Experimentální část

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií bylo realizováno s využitím kapilární elektroforézy (Agilent 7100, Waldbronn, Německo) a hmotnostním spektrometrem Agilent (Agilent 6460 Triple Quad, Singapur) s ionizací elektrosprejem. Pomocná sprejovací kapalina o složení methanol:voda:kyselina mravenčí (50 : 49,8 : 0,2, v/v/v) a průtoku 6 $\mu\text{l min}^{-1}$ byla dodávána pomocí pumpy Agilent (Agilent 1260 LC pump, Singapur). Separace byly prováděny v křemenných kapilárách délky 70 cm a vnitřním průměru 50 μm (MicroSolv Technologies, New Jersey, USA), které byly v laboratoři modifikovány vícenásobným iontovým pokrytím (SMIL – successe multiple ionic-polymer layer)^{13,14}. Separační elektrolyt měl složení 20 mM octan amonný v acetonitrilu s přidavkem 100 mM trifluorooctové kyseliny. Dávkování vzorku bylo provedeno tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Separační napětí bylo –20 kV. Parametry ionizace elektrosprejem byly následující: sprejovací napětí + 4,0 kV, průtok a tlak pomocného sprejovacího plynu (N_2) byl 10 $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$ a 6 psi. Teplota nebulizačního plynu byla nastavena na 250 °C. Data byla získána s využitím MRM (multiple reaction mode).

Standardy syntetických benzodiazepinů byly zakoupeny od firmy Chiron AS (Trondheim, Norsko). Deutero-

vané benzodiazepiny (diazepam-d5, etizolam-d3, phenazepam-d4) použité jako interní standardy (IS) byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ostatní chemikálie (rozpouštědla, složky pracovního elektrolytu, pomocné sprejovací kapaliny a chemikálie potřebné pro pokrytí kapilár) byly rovněž zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v čistotě p.a nebo vyšší.

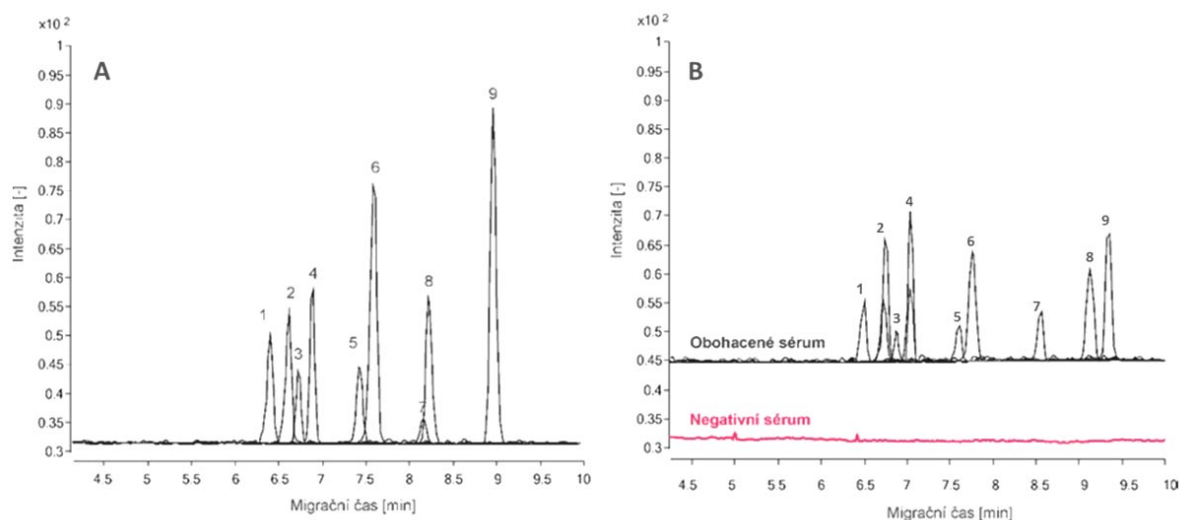
Biologický materiál

Plná krev byla centrifugována při 5000 ot./min a získané sérum bylo obohaceno přidavkem syntetických benzodiazepinů a IS. Extrakce analytů ze séra byla provedena následovně: ke 100 μl séra bylo přidáno 900 μl 50 mM Tris/Cl pufru o pH 9,0 a 1000 μl 1-chlorbutanu. Celá směs byla v plastové mikrozkušavce promíchána. Rozdělení organické vrstvy a vodné vrstvy bylo podpořeno centrifugací při 12 000 ot./min. Centrifugované vzorky byly uloženy po dobu 10 min do mrazicího boxu na – 80 °C, kde došlo ke zmrznutí vodné vrstvy. Vrchní organická vrstva byla odebrána a odpařena pod proudem dusíku při laboratorní teplotě. Odparek byl rekonstituován ve 100 μl acetonitrilu a dávkován do kapiláry.

Výsledky a diskuse

Syntetické benzodiazepiny se ve vodném prostředí chovají jako velmi slabé kyseliny, dosažení separace s dostatečným rozlišením ve vodných elektrolytech je bez použití aditiv, které negativně ovlivňují účinnost ionizace elektrosprejem, nemožné. Studovány tedy byly možnosti separace syntetických benzodiazepinů v nevodných elektrolytech. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo s využitím 20 mM octanu amonného v acetonitrilu s přidavkem 100 mM trifluorooctové kyseliny. V tomto prostředí benzodiazepiny migrují jako kationty. K dosažení požadovaného rozlišení benzodiazepinů byla separace uskutečněna v kapiláře, jejíž vnitřní povrch nese kladný náboj (výsledek SMIL pokrytí) a elektroosmotický tok směřuje od katody k anodě. Na straně ESI-MS/MS detekce byl studován vliv sprejovacího napětí, teploty, průtoku a tlaku pomocného sprejovacího plynu. Dále byl studován vliv složení pomocné sprejovací kapaliny a jejího průtoku na velikost odezvy jednotlivých separovaných syntetických benzodiazepinů. Cílem bylo dosažení co nejvyšší citlivosti. Pro identifikaci a kvantifikaci byla také optimalizována kolizní energie a nalezeny vhodné přechody pro identifikaci a kvantifikaci separovaných syntetických benzodiazepinů. Pro kvantifikaci byly použity deuterované IS. Rekonstruovaný MRM elektroferogram CE-ESI-MS/MS separace standardní směsi za optimálních podmínek (shrnutý v popisku obrázku) je zobrazen na obr. 2A.

Vyvinutá metoda byla dále použita pro účely separace, identifikace a kvantifikace syntetických benzodiazepinů v séru pro objektivní diagnostiku intoxikace studovanými benzodiazepiny. Syntetické benzodiazepiny (obdobně



Obr. 2. Rekonstruované MRM chromatogramy CE-ESI-MS/MS separace syntetických benzodiazepinů; A: separace standardů 50 ng ml⁻¹, B: separace extraktu séra obohaceného syntetickými benzodiazepiny 10 ng ml⁻¹ a extraktu slepého vzorku séra. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný v ACN s přidavkem 100 mM trifluoroctová kyselina, $U = -20$ kV, dávkování 50 mbar/5 s, $U_{ESI} = +4,0$ kV, $T = 250$ °C, průtok nebulizačního plynu 10 dm³ min⁻¹, tlak nebulizačního plynu 6 psi, pomocná sprejovací kapalina MeOH/voda/HCOOH (50:49,8:0,2, v/v/v), průtok sprejovací kapaliny 6 μl min⁻¹. 1 – diclazepam, 2 – phenazepam, 3 – flubromazolam, 4 – etizolam, 5 – flubromazepam, 6 – nimetazepam, 7 – pyrazolam, 8 – deschloroetizolam, 9 – bentazepam

jako klasické benzodiazepiny) vykazují silnou vazbu na proteiny krevního séra, takže pro jejich extrakci ze séra byla využita L-L extrakce do 1-chlorbutanu. Rekonstruovaný MRM elektroferogram CE-ESI-MS/MS separace extraktu séra a negativního séra za optimálních podmínek je zobrazen na obr. 2B.

Vyvinutá metoda CE-ESI-MS/MS separace, identifikace a kvantifikace byla validována dle požadavků kladečných na toxikologickou a forenzní analýzu¹⁵ z hlediska přesnosti, správnosti, linearitu kalibračních závislostí, výtěžnosti, limitů kvantifikace a detekce a matričních efektů. Vybrané výsledky přehledně shrnuje tabulka I.

Závěr

Vývoj nových analyticko-toxikologických metod pro nové syntetické drogy je nezbytný k jejich průkazu a záchytu při intoxikaci, neboť tyto látky pronikají na evropskou drogovou scénu. V tomto kontextu byla vyvinuta nová selektivní metoda pro separaci, identifikaci a kvantifikaci syntetických drog v séru s pomocí CE-ESI-MS/MS a jednoduché přípravy vzorku. Limity detekce jsou srovnatelné s LC-ESI-MS analýzou a prezentovaná metoda může tedy sloužit jako účinná alternativa pro toxikologickou a forenzní analýzu syntetických benzodiazepinů. Navíc

Tabulka I

Vybrané validační parametry metody stanovení syntetických benzodiazepinů ($n = 6$)

Syntetický benzodiazepin	Fragmentační přechod	Kolizní energie [eV]	Lineární dynamický rozsah [ng ml ⁻¹]	Koeficient determinace R^2 [-]	Limit detekce [ng ml ⁻¹]	Výtěžnost [%]
Nimetazepam	296,0 -> 250,1	25	5 – 600	0,9994	1,5	85,2
Bentazepam	297,0 -> 166,2	30	5 – 600	0,9999	1,5	87,9
Deschloroetizolam	309,0 -> 255,1	25	5 – 600	0,9996	1,5	87,3
Diclazepam	318,9 -> 227,0	30	5 – 600	0,9966	1,5	87,8
Flubromazepam	332,9 -> 226,0	30	10 – 600	0,9975	3,0	76,2
Etizolam	343,0 -> 313,9	20	5 – 600	0,9992	1,5	84,3
Phenazepam	350,9 -> 206,1	35	10 – 600	0,9999	3,0	84,9
Pyrazolam	353,9 -> 167,0	35	50 – 600	0,9985	15,0	75,6
Flubromazolam	370,9 -> 343,0	30	10 – 600	0,9993	1,5	77,7

metoda CE-ESI-MS/MS vykazuje lepší rozlišení pouze za cenu mírného prodloužení analýzy oproti LC-MS metodě.

Tato práce byla realizována za podpory grantu č. LO1035 Ministerstva školství, mládeže a sportu České republiky.

LITERATURA

- Abbott R., Smith D. E.: *J. Psychoactive Drugs* 47, 368 (2015).
- Baumann M. H., Solis E., Watterson L. R., Marusich J. A., Fantegrossi W. E., Wiley J. L.: *J. Neurosci.* 34, 15150 (2014).
- Elliott S., Evans J.: *Forensic Sci. Int.* 243, 55 (2014).
- Moosmann B., King L. A., Auwarter.: *World Psychiatry* 14, 248 (2015).
- Lukasik-Glebocka M., Sommerfeld K., Tezyk A., Zielinska-Psuja B., Panienski P., Zaba C.: *Clin. Toxicol.* 54, 66 (2016).
- Corkery J. M., Schifano F., Ghodse A. H.: *Hum. Psychopharmacol.* 27, 254 (2012).
- Moosmann B., Hutter M., Huppertz L. M., Ferlaino S., Redlinghofer L., Auwarter V.: *Forensic Toxicol.* 31, 263 (2013).
- Moosmann B., Huppertz L. M., Hutter M., Buchwald A., Ferlaino S., Auwarter V.: *J. Mass Spectrom.* 48, 1150 (2013).
- Huppertz L. M., Bisel P., Westphal F., Franz F., Auwarter V., Moosmann B.: *Forensic Toxicol.* 33, 388 (2015).
- Kriikku P., Wilhelm L., Rintatalo J., Hurme J., Kramer J., Ojanpera I.: *Forensic Sci. Int.* 220, 111 (2012).
- Bergstrand M. P., Helander A., Beck O.: *J. Chromatogr. B* 1035, 104 (2016).
- Porpiglia N., Giacomazzi E., Gottardo R., Tagliaro F., v knize: *Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications* (de Jong G., ed.), kap. 9. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2016.
- Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: *Anal. Chem.* 70, 5272 (1998).
- Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: *Anal. Chem.* 70, 2254 (1998).
- Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F.: *Forensic Sci. Int.* 165, 216 (2007).

B. Boráňová, M. Švidrnoch, and V. Maier
(*Department of Analytical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University Olomouc*): **Toxicological and Forensic Analysis of "New Designer" Benzodiazepines using Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry**

A new method of separation, identification and quantification of nine designer benzodiazepines was developed using nonaqueous capillary electrophoresis hyphenated with tandem mass spectrometry. Separation was done in 20 mM ammonium acetate electrolyte with addition of 100 mM trifluoroacetic acid at negative voltage polarity employing successive multiple ionic-polymer coated capillary with reversal electroosmotic flow. The developed method was validated for toxicological and forensic analysis of designer benzodiazepines in human serum after a simple liquid-liquid extraction. The method was compared with LC-MS method namely in terms of sensitivity. The obtained LODs of designer benzodiazepines for CE-ESI-MS/MS method were in the range from 1.5 ng mL⁻¹ to 15 ng mL⁻¹ which are comparable with LC-MS method.

Keywords: new designer benzodiazepines, capillary electrophoresis, mass spectrometry, toxicological analysis, forensic analysis

TESTOVANIE POLYMÉROV S ODTLAČKOM MOLEKULY KUMARÍNOV PRIPRAVENÝCH NA POVRCHU MAGNETICKÉHO NOSIČA

EVA BROKEŠOVÁ, ANDREA MACHYŇÁKOVÁ
a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita
v Bratislave, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slo-
venská Republika
katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: polyméry s odtlačkami molekúl na
povrchu magnetického nosiča, kumaríny, selektívna
extrakcia

Úvod

Pri úprave vzorky a HPLC separácií zložiek sa využí-
vajú materiály, vďaka ktorým možno dosiahnuť vysokú
selektivitu predseparačnej úpravy zložitých vzoriek
a separácie látok. Sorbenty na základe polymérov s odtlač-
kami molekúl (MIP, molecularly imprinted polymer) sú
schopné selektívne viazať cieľový analyt zo zmesi. Na
prípravu sa využívajú rôzne polymerizačné spôsoby
s cieľom získať MIP s definovanými vlastnosťami častíc.
Optimalizácia postupu prípravy, testovanie zloženia poly-
merizačnej zmesi a hodnotenie vlastností MIP je mnoho-
krát časovo náročné. Voľba spôsobu prípravy závisí od ich
zamýšľaného využitia. Pre prípravu SPE sorbentov sa pou-
žíva bloková polymerizácia, kým suspenznou alebo viac-
krokovou napučiacou polymerizáciou sa pripravujú sor-
benty pre stacionárne fázy v HPLC¹.

Polymerizácia na povrchu vhodného nosiča je inova-
tívny spôsob prípravy MIP. Nosičom môže byť napr. akti-
vovaný silikagél, magnetické nanočastice, chitozán, oxid
hlinitý a iné². Výhodou takto pripravených sorbentov,
v porovnaní s blokovou polymerizáciou, je rýchlejšia kine-
tika sorpcie, výrazne vyššia selektivita, väčší počet dostup-
ných interakčných miest a rovnomerná zrnitosť častíc.

Magnetické polyméry s odtlačkami molekúl (MMIP,
magnetic molecularly imprinted polymer) sú pripravované
na povrchu magnetických nanočastíc (napr. Fe₃O₄). Použi-
tie MMIP spája výhody selektívnej extrakcie látok
a jednoduchého oddelenia sorbentu od roztoku pomocou
externého magnetického poľa. Vyznačujú sa tiež vysokou
stabilitou a odolnosťou voči širokému rozmedziu pH
a rôznym rozpúšťadlám. Vďaka svojim vlastnostiam majú
veľkú perspektívu vo využití najmä ako selektívne sorben-
ty pri analýze zložitých vzoriek (vzorky životného prostre-
dia, potravín, telových tekutín a iné)^{3,4}.

Práca bola zameraná na prípravu MIP na povrchu
magnetických Fe₃O₄ nanočastíc a sledovanie vplyvu druhu
templátu pre molekulové odtlačkanie na sorpčné vlastnosti,
kinetiku sorpcie a selektivitu pripravených sorbentov. Pou-
žitelnosť MMIP bola testovaná pre extrakciu kumarínov
zo záparu levandule.

Experimentálna časť

Chemikálie na prípravu a testovanie vlastností poly-
mérych sorbentov, chloroform, etanol (čistota pre
HPLC), acetón, kyselina octová, 2,2'-azobisisobutyronitril
(AIBN), kyselina metakrylová (MAA), etylénglykol dime-
takrylát (EGDMA) (čistota p. a.) boli zaobstarané
od Merck (Nemecko). Kyselina olejová, FeCl₃ · 6 H₂O
(čistota > 99 %), FeCl₂ · 4 H₂O (čistota > 98 %), NaOH
(čistota p.a.) boli zaobstarané od CentralChem (SR). Poly-
vinylpyrolidón (PVP) (pre syntézu) bol zaobstaraný od
Alfa Aesar (SR) a dusík (99,9 %) od Messer (SR). Aceto-
nitril na prípravu mobilnej fázy (pre gradientovú HPLC)
pre HPLC separácie bol zaobstaraný z VWR (SR). V prá-
ci bola použitá deionizovaná voda Milli-Q (Millipore,
USA). Referenčné látky kumarínov (7-hydroxykumarín,
kumarín, 7-metoxykumarín, 7-hydroxy-4-metylkumarín,
4-hydroxykumarín; > 99 %) boli zaobstarané od Sigma-
Aldrich (Nemecko).

Vzorka sušenej liečivej rastliny (levandule) bola zís-
kaná z obchodnej siete a bola uchovávaná v laboratórnych
podmienkach.

Príprava záparu z rastlinnej vzorky: K 1,0 g sušenej
levandule sa pridalo 8 ml vody (75 °C) a zmes sa miešala
na laboratórnej miešačke počas 60 min pri teplote 22 °C.
Po centrifugácii (4000 rpm, 10 min) sa supernatant oddelil,
prefiltroval cez 0,45 µm nylonový striekačkový filter. Vý-
ťažnosť bola stanovená metódou štandardného prídavku na
troch koncentračných hladinách (8, 160, 400 µg kumarín-
u / g vzorky).

Postup prípravy magnetických polymérov s odtlačka-
mi molekúl zahrňoval tri kroky, I) príprava Fe₃O₄ magne-
tických nanočastíc⁵; II) modifikácia ich povrchu pomocou
kyseliny olejovej; a III) polymerizácia MIP pre templáty
kumarín a 7-hydroxykumarín na povrchu nosiča nekova-
lentným spôsobom. Fe₃O₄ (1 g) sa miešal s kyselinou ole-
jovou (1 ml) 10 min v inertnej atmosfére dusíka (zmes A).
MAA (8 mmol) a templát (7-hydroxykumarín alebo kuma-
rín) (1 mmol) sa rozpustili v chloroforme (20 ml) (zmes
B). Zmesi A a B sa zmiešali, pridal sa EGDMA (20 mmol)
a výsledná zmes sa miešala 30 min v inertnej atmosfére
dusíka (zmes C). PVP (0,4 g) sa rozpustil v etanole
(100 ml), roztok sa zahrial na 60 °C a zmiešal so zmesou C
a AIBN (0,1 g). Polymerizácia sa uskutočnila pri teplote
60 °C počas 24 h v inertnom prostredí dusíka. MMIP bol

oddelený od roztoku pomocou magnetu a premytý deionizovanou vodou (5×500 ml). Templát bol odstránený z polyméru extrakciou použitím zmesi metanol/kyselina octová (9/1, v/v; 100 ml).

Magnetický polymér bez odtlačku molekuly (MNIP) sa pripravil rovnakým spôsobom ako polymér s odtlačkom molekuly, ale bez pridania templátu do polymerizačnej zmesi.

Pre hodnotenie sorpčnej kapacity, selektivity a kinetiky sorpcie sa k 0,05 g MMIP alebo MNIP pridal roztok látky (7-hydroxykumarín, kumarín, 7-metoxykumarín, 7-hydroxy-4-metylkumarín, 4-hydroxykumarín) a zmes sa miešala 10, 15, 20, 30, 60 min, 6 h, a 20 h pri teplote $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrácia látky v roztoku bola $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ (roztok pripravený v metanol/voda 1/1, v/v). Pre MMIP-7-hydroxykumarín sa použilo 1,25 ml roztoku látky a pre MMIP-kumarín 3 ml roztoku látky. Množstvo nesorbovanej látky sa stanovilo metódou HPLC.

Na HPLC separáciu kumarínov sa použila stacionárna fáza LiChrosper 100 RP18 (4×250 mm I.D., $5\text{ }\mu\text{m}$). Mobilnou fázou bola zmes 0,3 % kyselina octová/acetónitril (9/1, v/v) (A) a 100 % acetónitril (B) s gradientovou elúciou: 0–22,5 min lineárny gradient B 0–36 %. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml min^{-1} , dávkovaný objem $20\text{ }\mu\text{l}$ a teplota kolóny $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na detekciu kumarínov sa použil detektor s diódovým poľom. Chromatogramy boli snímané pri vlnovej dĺžke 280 nm (cit.⁶).

Výsledky a diskusia

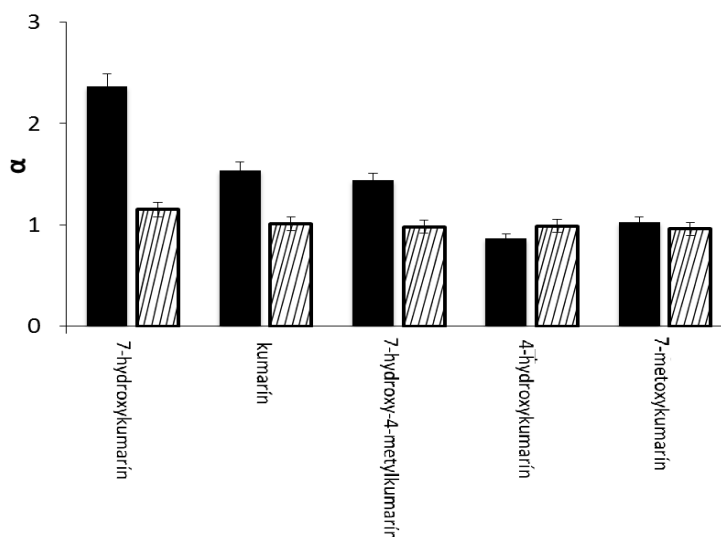
Polymérne sorbenty pre templáty kumarín a 7-hydroxykumarín boli pripravené viackrokovým postupom. Zloženie polymerizačnej zmesi (MAA ako funkčný monomér, chloroform ako porogém, EGDMA a AIBN ako sieťovacie

činiteľ a iniciátor polymerizácie) sa zvolilo na základe výsledkov v predošlej práci⁶.

Pripravené polyméry na povrchu magnetického Fe_3O_4 nosiča pre kumarín a 7-hydroxykumarín sa hodnotili na základe špecifickej sorpčnej kapacity, selektivity a kinetiky sorpcie. Špecifická sorpčná kapacita pripravených polymérov sa zisťovala vsádzkovým spôsobom a zodpovedala množstvu látky sorbovanej polymérom (uvádzané na 1 g sorbentu). Sorpčná kapacita MMIP-7-hydroxykumarín bola vyššia ako sorpčná kapacita MNIP v celom testovanom koncentračnom rozsahu ($0,5\text{--}100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Hodnota špecifickej sorpčnej kapacity (rozdiel sorpčnej kapacity MMIP a MNIP) bola $79,7\text{ }\mu\text{g}$ 7-hydroxykumarínu na 1 g polyméru. Pre MMIP-kumarín sa pozoroval opačný efekt. MNIP vykazoval vyššiu afinitu pre molekuly templátu ako MMIP, čo naznačilo dominantný vplyv nešpecifických interakcií.

Sledovanie kinetiky poskytlo informácie o procese sorpcie na MMIP. Účinnosť sorpcie bola prešetrovaná v časovom intervale od 5 min do 20 h. V prípade MMIP-7-hydroxykumarín sa adsorbované množstvo zvyšovalo počas prvých 15 min a rovnováha sa dosiahla po 30 min pre templát aj testované štruktúrne analógy (kumarín, 7-metoxykumarín, 7-hydroxy-4-metylkumarín, 4-hydroxykumarín). U MMIP-kumarínu sa dosiahla rovnováha po 60 min.

Hodnotením selektivity (obr. 1) sa zistilo, že pripravený polymér pre templát 7-hydroxykumarín bol vysoko selektívny pre jeho templát ($\alpha = 2,4$; selektivitný koeficient α – množstvo látky sorbované na MMIP / množstvo látky sorbované na MNIP) a bol selektívny aj pre študované analógy (kumarín, 7-metoxykumarín, 7-hydroxy-4-metylkumarín, 4-hydroxykumarín). Naopak, MMIP-kumarín mal nízku selektivitu pre študované látky vrátane templátu ($\alpha < 1$).



Obr. 1. Selektívne koeficienty (α) derivátov kumarínu zistené pre MMIP-7-hydroxykumarín (■) a MMIP-kumarín (▨)

Tabuľka I

Chromatografické charakteristiky (retenčný čas t_r , rozlišovací faktor R_{ij} , symetria píku S) pre HPLC separáciu kumarínov

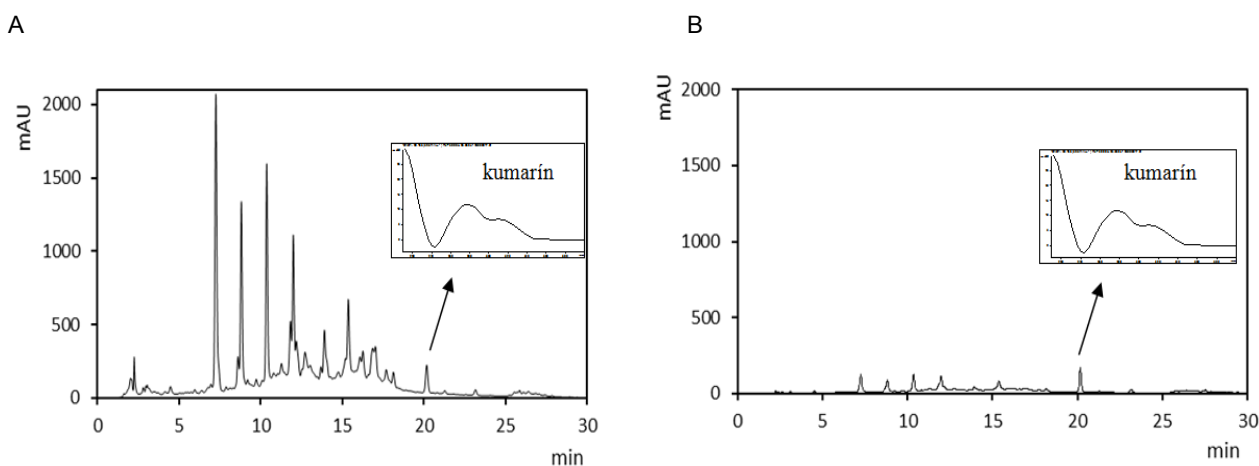
Kumaríny	t_r [min]	R_{ij}	S
7-Hydroxykumarín	13,64	13,6	0,98
7-Hydroxy-4-Metylkumarín	16,72	1,9	0,99
4-Hydroxykumarín	17,16	8,4	0,94
Kumarín	20,80	10,6	0,97
7-Metoxykumarín	22,94		0,98

 $n = 3$, RSD < 3 %, $t_M = 2,2$ min

Jedným z cieľov práce bolo testovať vhodnosť použitia MMIP na selektívnu extrakciu kumarínov zo záparu reálnej vzorky. V prvom kroku sa prešetril vplyv množstva MMIP-7-hydroxykumarín (0,1 g, 0,3 g, 0,5 g a 0,7 g) a času desorpcie na účinnosť extrakcie. Výťažnosť extrakcie sa zvyšovala s narastajúcim množstvom MMIP a uspokojivé výsledky (výťažnosť > 70 %) boli získané pre 0,5 g sorbentu. Ďalšie zvyšovanie množstva polyméru nemalo významný vplyv na výťažnosť. Desorpcia 7-hydroxykumarínu z MMIP bola testovaná v časovom intervale od 10 do 60 min. Zistilo sa, že 30 min je dostatočný čas na desorpciu látok.

Navrhovaný extrakčný postup bol nasledovný: MMIP-7-hydroxykumarín (0,5 g) sa premyl s 3 ml zmesi metanol/kyselina octová (9/1, v/v) a následne 5 ml vody. Supernatant bol oddelený od polyméru použitím externého magnetu. K MMIP sa pridalo 1,25 ml roztoku vzorky a zmes sa miešala 30 min pri teplote 22 °C. MMIP sa oddelil od roztoku pomocou magnetu, premyl s 2 ml vody po dobu

2 min a vysušil vákuom. Na elúciu analytov z MMIP sa použilo 1,25 ml zmesi metanol/kyselina octová (9/1, v/v) s dobou desorpcie 30 min. Eluent sa oddelil od MMIP pomocou magnetu a analyzoval HPLC metódou. HPLC-DAD metóda s MMIP-7-hydroxykumarín extrakciou sa použila na separáciu (tabuľka I) a stanovenie kumarínov a bola hodnotená z hľadiska linearitu, citlivosti, presnosti a výťažnosti. V testovanej vzorke sa, na základe porovnania retenčných faktorov a UV spektier (obr. 2) zložiek vzorky a referenčných látok, zistila prítomnosť kumarínu. Množstvo kumarínu bolo $0,13 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$. Matricová kalibračná závislosť bola lineárna ($r^2 = 0,9954$) v rozsahu koncentrácií od $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ do $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Medza detekcie (signál / šum = 3) kumarínu bola $1,04 \mu\text{g g}^{-1}$ a medza stanoviteľnosti (signál / šum = 10) bola $3,44 \mu\text{g g}^{-1}$. Vnútrodnová a medzidňová presnosť boli menej ako 6 % a 8 %. Výťažnosť MMIP extrakcie zisťovaná v koncentračnom rozsahu 8–400 $\mu\text{g g}^{-1}$ kumarínu bola v rozsahu 79–81 %. HPLC chromatografické záznamy záparu vzorky levandule



Obr. 2. Chromatografické záznamy HPLC separácie záparu levandule (A) a extraktu po magnetickej MIP-7-hydroxykumarín extrakcii (B). Stacionárna fáza: LiChrosper 100 RP18 (4 × 250 mm I.D., 5 μm), mobilná fáza: 0,3 % kyselina octová/acetónitril (9/1, v/v) (A) a 100 % acetónitril (B) s gradientovou elúciou (0–22,5 min 0–36 % B), prietok: 1 ml min^{-1} , dávkovaný objem: 20 μl , teplota kolóny: 22 °C, detekcia: UV (280 nm)

bez použitia a s použitím MMIP extrakcie (obr. 2) dokumentujú vhodnosť zvoleného extrakčného postupu pre magnetickú MIP extrakciu kumarínu.

Záver

MIP boli pripravené na povrchu Fe₃O₄ magnetických nanočastíc pre templáty zo skupiny kumarínov a testované z hľadiska sorpčnej kapacity, selektivity a kinetiky sorpcie. MMIP-7-hydroxykumarín vykazoval lepšie sorpčné vlastnosti ako MMIP-kumarín. Prešetrením selektivity sa zistilo, že MMIP-7-hydroxykumarín bol skupinovo-selektívny pre testovanú skupinu látok. Maximálna sorpcia molekúl templátu a štruktúrnych analógov sa dosiahla do 30 min sorpcie. MMIP-7-hydroxykumarín sa využil ako selektívny sorbent pre MIP extrakciu kumarínu zo záparu vzorky levandule. Výsledky prvej štúdie poukázali, že MMIP extrakcia je rýchly, pohodlný, efektívny a selektívny spôsob úpravy vzoriek, príp. aj skoncentrovania látok, pred HPLC analýzou.

LITERATÚRA

1. Machyňáková A., Hroboňová K.: Chem. Listy 110, 609 (2016).
2. Singh M., Kumar A., Tarannum N.: Anal. Bioanal. Chem. 405, 4245 (2013).
3. Kong X., Gao R., He X., Chen L., Zhang Y.: J. Chromatogr. A 1245, 8 (2012).
4. Singh M., Kumar A., Tarannum N.: Anal. Bioanal. Chem. 405, 4245 (2013).
5. He D., Zhang X., Gao B., Wang L., Zhao Q., Chen H., Wang H., Zao Ch.: Food Control 36, 36 (2014).
6. Spevak A., Hroboňová K.: Chem. Listy 108, 251 (2014).

Práca vznikla s finančnou podporou grantu č. 1/0133/17 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

E. Brokešová, A. Machyňáková, and K. Hroboňová (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic*): **Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers for Coumarins Prepared on The Magnetic Nanoparticles Support**

Molecularly imprinted polymers for templates coumarin and 7-hydroxycoumarin were synthesized by using surface molecular imprinting technique on Fe₃O₄ nanoparticles. Sorption capacity, sorption kinetics and selectivity of prepared sorbents were evaluated. Sorbent prepared for 7-hydroxycoumarin was applied for magnetic extraction of coumarins from lavender sample. Coumarin was determined by HPLC. Precision, recovery, LOD, LOQ, and linear working range of the method were determined.

Keywords: magnetic molecularly imprinted polymers, coumarins, selective extraction

STUDIUM STRUKTURY HEROINU V ROZTOKU SPEKTROSKOPICKÝMI METODAMI

PATRIK FAGAN^a, FRANTIŠEK KRÁLÍK^a,
MARTIN KUCHAR^b a VLADIMÍR SETNIČKA^a

^a Ústav analytické chemie, ^b Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek a Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Patrik.Fagan@vscht.cz

Klíčová slova: heroin, cirkulární dichroismus, *ab initio* výpočty, konformační analýza

Úvod

Heroin je krystalická látka nahořklé chuti, téměř bez zápachu. Jedná se o polosyntetický alkaloid patřící do skupiny derivátů morfinu. Velmi často bývá označován jako 3,6-diacetylmorfin¹. Základem pro jeho syntézu je morfin, který se získává izolací ze zaschlé mléčné šťávy (opia) vyměšované nezralými narušenými plody některých druhů máků, např. *Papaver somniferum Linné*². Nejvýznamnější část celosvětové produkce opia je lokalizována na území jihozápadní Asie (Afghánistán, Pákistán a Indie)³. Pro zjištění struktury molekul v pevné fázi, včetně těch přírodního charakteru, se nejčastěji využívá rentgenostrukturní (X-Ray) analýza⁴. Tato metoda má však několik úskalí. Jedním z nich je, že převedení analyzované látky do krystalu bývá velmi často časově i experimentálně náročné a ne všechny látky je možné do krystalické formy převést⁵. V případě biologicky aktivních látek, mezi které patří také heroin, bývá struktura získaná krystalografickou analýzou odlišná od struktury, kterou látka zaujímá v roztoku, tedy např. ve svém fyziologickém prostředí⁵. Jelikož heroin patří mezi chirální molekuly, lze pro jeho strukturní a konformační analýzu využít metod chiroptické spektroskopie. Ty jsou založeny na specifické interakci chirálních molekul s kruhově polarizovaným zářením⁶. Je-li tato interakce sledována v infračervené (IR) oblasti spektra, kde se projevují vibrační přechody molekul, je metoda nazývána vibrační cirkulární dichroismus (VCD). V ultrafialové a viditelné oblasti jsou sledovány elektronové přechody molekul a metoda je označována jako elektronový cirkulární dichroismus (ECD)⁶. Cílem této práce byla detailní konformační analýza molekuly heroinu v roztoku spojená s kvantově chemickými výpočty a simulacemi spekter ECD a VCD doplněných o konvenční IR spektra, což umožnilo popis struktury a konformerů molekuly heroinu na úrovni atomárního rozlišení.

Experimentální část

Standard heroinu ve formě volné báze o farmaceutické čistotě (>99 %) byl syntetizován z farmaceuticky čistého morfinu v laboratoři BAFA VŠCHT Praha. Pro analýzu probíhalo jeho rozpouštění v plně deuterovaném chloroformu (CDCl₃) tak, aby výsledná koncentrace v roztoku byla 20 g l⁻¹.

V této práci byl pro měření VCD a IR absorpčních spekter použit spektrometr s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo), který byl vybaven VCD/IRRAS modulem PMA 37 (Bruker, Německo)⁷. Měření vzorků bylo prováděno s rozlišením 4 cm⁻¹ ve skládané kyvetě typu A145 (Bruker, Německo) s okny z KBr a s distanční teflonovou fólií tloušťky 100 μm. K měření ECD byl použit spektrometr J-815 (Jasco, Japonsko). Vzorky byly měřeny ve křemenné kyvetě (Starna, Velká Británie) s optickou dráhou 10 μm.

Pro prvotní optimalizaci geometrie molekuly heroinu bylo využito metody molekulové mechaniky (MMFF94). Nalezené startovní geometrie byly následně optimalizovány na HF/6-31 úrovní se zahrnutím vlivu rozpouštědla (CDCl₃) prostřednictvím modelu polarizovatelného kontinua. Na základě výsledků byly určeny energeticky nejvýhodnější konformery a jejich struktury byly dále reoptimalizovány za pomoci DFT metody. Následně byla stejnou metodou simulována příslušná spektra VCD, ECD a IR, která jsou zde prezentována bez využití škálovacího faktoru. Výpočty byly prováděny sadou programů Gaussian 09 za pomoci virtuální organizace Metacentrum na počítačových clusterech v Brně a v Jihlavě a také na superpočítači Altix (VŠCHT Praha).

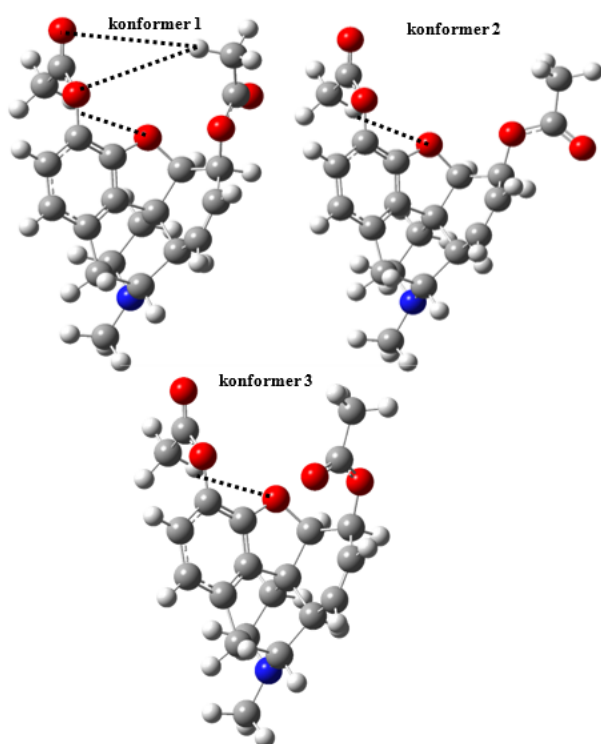
Výsledky a diskuse

Jako základní výchozí model struktury heroinu byla použita geometrie získaná z krystalografických studií⁸. Za pomoci molekulové mechaniky (MMFF94) byly nalezeny výchozí energeticky nejvýhodnější konformery, které byly následně reoptimalizovány na HF/6-31G úrovní pomocí balíku programů Gaussian 09. Při těchto výpočtech byl již zohledněn vliv rozpouštědla (CDCl₃) a to za použití modelu polarizovatelného kontinua. Byly nalezeny 3 energeticky nejvýhodnější konformery, na které byla následně aplikována metoda DFT. Pro závěrečnou optimalizaci geometrie byl zvolen funkcionál B3LYP a báze rozšířená o soubor polarizačních a difúzních funkcí 6-311++G**. Geometrie tří energeticky nejvýhodnějších konformerů jsou znázorněny na obr. 1 a jejich specifikace (relativní energie, odhad relativního zastoupení na základě Maxwellova-Boltzmannova rozdělení a velikosti význam-

Tabulka I

Relativní energie, relativní zastoupení jednotlivých konformerů a hodnoty významných dihedrálních úhlů pro tři konformery molekuly heroínu

Konformer	ΔE [kJ mol ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]	Relativní zastoupení [%]	Torzní úhel [°]			
				α_1	α_2	α_3	α_4
1	0	0	77	2	79	-71	178
2	9,2	3,0	22	2	80	-120	179
3	13,3	11,7	1	3	80	85	-174



Obr. 1. Nalezené energeticky nejvýhodnější konformery molekuly heroínu v CDCl₃ (B3LYP/6-311++G**). Přerušovanou čarou jsou znázorněny vodíkové interakce

ných dihedrálních úhlů) jsou shrnuty v tab. I.

Ze získaných výsledků plyne, že skeletální část molekuly heroínu tvořená cykly je dle předpokladů značně rigidní. Acetylová skupina lokalizovaná na benzenovém kruhu je v jednotlivých konformerech téměř vždy orientována stejným způsobem (v tab. I porovnání dihedrálních úhlů α_1 a α_2), což může být způsobeno slabou vodíkovou interakcí znázorněnou na obr. 1, kde vzdálenost vodíkového a kyslíkového atomu u všech tří konformerů je ~2,4 Å. Hlavním rozdílem, kterým se jednotlivé konformery liší, jsou dihedrální úhly druhé acetylové skupiny (α_3 a α_4),

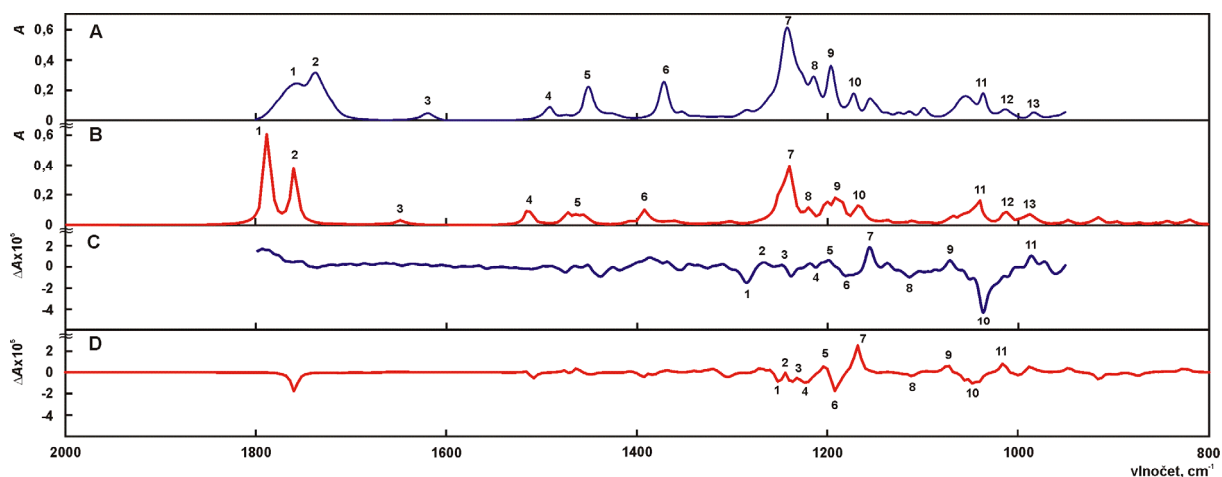
vázané na alifatické části molekuly (obr. 1). Na základě Gibbsových volných energií ΔG bylo vypočteno rovnovážné procentuální zastoupení konformerů (tab. I). Bylo zjištěno, že při teplotě 273 K je v roztoku nejvíce zastoupen konformer 1 (77 %). K jeho stabilitě pravděpodobně také přispívají slabé vodíkové interakce (obr. 1).

Pro všechny 3 nalezené konformery byla následně simulována spektra VCD a ECD, spolu s IR spektry pro snazší přiřazení jednotlivých pásů vibračním módům. Parametry pro simulaci byly zvoleny stejně jako při závěrečné optimalizaci geometrie. Ze spekter jednotlivých konformerů byl na základě odhadu jejich relativního zastoupení (tab. I) vypočítán vážený průměr, který představuje výsledné teoretické spektrum (obr. 2 a 3).

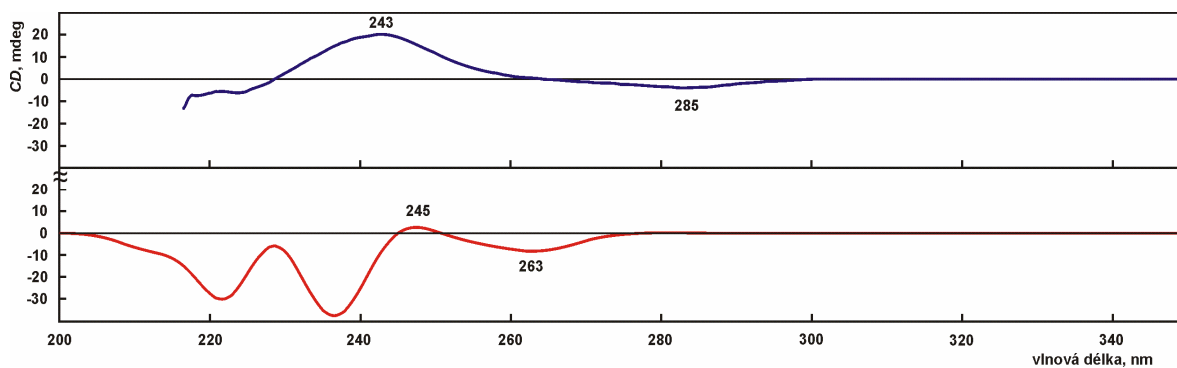
Pro vizualizaci IR spekter a spekter VCD byla dle zvyklosti využita Lorentzova funkce, pro spektra ECD pak funkce Gaussova. Výsledná průměrná spektra vykazují velmi dobrou shodu se spektry experimentálními (obr. 2 a 3), na jejímž základě bylo možno identifikovat většinu vibračních módů.

Závěr

Pomocí DFT výpočtů na úrovni B3LYP/6-311++G** byly nalezeny tři energeticky nejvýhodnější konformery molekuly heroínu, u kterých bylo na základě Maxwelllova-Boltzmannova rozdělení zjištěno jejich zastoupení: konformer 1–77 %, konformer 2–22 % a konformer 3–1 %. Bylo zjištěno, že část molekuly tvořená cykly je značně rigidní. Taktéž tomu bylo v případě acetylové skupiny připojené k aromatickému jádru. Značným rozdílem mezi jednotlivými konformery je však orientace acetylové skupiny vázané k alifatické části molekuly. Konformer 1 je energeticky nejvýhodnější pravděpodobně díky slabým interakcím přes vodíkovou vazbu. Porovnání simulovaných spekter se spektry experimentálními vykazuje velmi dobrou shodu a lze tvrdit, že s vysokou pravděpodobností došlo k nalezení všech konformerů, které se mohou v roztoku za dané teploty vyskytovat. Pokud je nám známo, jedná se o první studii, která se systematicky zabývá studiem konformačních vlastností molekuly heroínu v roztoku pomocí citlivých metod chiroptické spektroskopie. Díky DFT simulacím bylo též možné detailně interpretovat experimen-



Obr. 2. Porovnání experimentálního (A) a průměrného simulovaného (B) IR spektra a experimentálního (C) a průměrného simulovaného (D) spektra VCD molekuly heroínu



Obr. 3. Porovnání experimentálního (nahore) a průměrného simulovaného (dole) spektra ECD molekuly heroínu

tální spektra a popsat strukturu molekuly heroínu v roztoku na atomární úrovni, což může být velmi důležité pro následující studie zaměřené na vazebné možnosti, transport a distribuci této látky v organismu.

Tato práce byla realizována za účelové podpory projektu Ministerstva vnitra ČR (VI20172020056), částečně také „Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/24503 a CZ.2.16/3.1.00/21537), „Národního programu udržitelnosti I“ – NPU I (LO1601 – č.: MSMT-43760/2015 a LO1215 – č.: MSMT-34807/2013) a Specifického vysokoškolského výzkumu MŠMT č. 20-SVV/2017 (A1_FCHI_2017_003 a A2_FCHI_2017_026). Autoři děkují centru CERIT-SC za přístup k výpočetním a úložným zařízením, poskytovaných v rámci programu „Projekty Velký výzkum, vývoj a inovace infrastruktury“ (Cerit Scientific Cloud LM2015085).

LITERATURA

1. Staněk J.: *Alkaloidy*. Československá akademie věd, Praha 1957.
2. Riedl O., Vondráček V.: *Klinická toxikologie*. Avicenum Zdravotnické nakladatelství, Praha 1980.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.: *Evropská zpráva o drogách, trendy a vývoj*. Publications Office of the European Union, Lucembursko 2015. (ISBN: 978-92-9168-795-4).
4. Gabe E. J., Barnes W. H.: *Acta Cryst.* 16, 796 (1963).
5. Messerschmidt A.: *X-ray crystallography of biomacromolecules a practical guide*. Wiley, Weinheim 2007.
6. Setnička V., Urbanová M.: *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Brno 2010.

7. Urbanová M., Setnička V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
8. Ranjit P., Das T. P., Sahoo N., Ray S. N.: *J. Phys. Chem. A* 102, 3209 (1998).

P. Fagan^a, F. Králík^a, M. Kuchař^b and V. Setnička^a

(^a *Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague;* ^b *Department of Natural Compounds and Forensic Laboratory of Biologically Active Substances, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Structure of Heroin in Solution Studied by Chiroptical Methods**

Three most preferred conformations of a heroin molecule were found via the DFT calculations on B3LYP/6-311++G** level. Based on the Maxwell-Boltzmann distribution, the following probability of the conformers were found: conformer 1–77 %, conformer 2–22 % and conformer 3–1 %. A space orientation of the acetyl group makes a significant difference between these conformers. Because a good agreement between the DFT simulations and experiment was found, it was possible to describe the structure of heroin in solution on the atomic level which may be very important for another studies focused on bonding, transport and distribution of this substance in the organism.

Keywords: heroin, circular dichroism, *ab initio* calculation, conformational analysis

VÝVOJ, OPTIMALIZACE A VALIDACE ANALYTICKÉ METODY NA STANOVENÍ NEUROTOXINU β -*N*-METHYLAMINO-L-ALANINU VE VODĚ POMOCÍ LC/MS

KAREL HOŘEJŠÍ^a, DAVID KAHOUN^a
a TOMÁŠ HAUER^b

^a Ústav chemie a biochemie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice, ^b Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Na Zlaté stoce 1, 370 05 České Budějovice
Horejsi93@seznam.cz

Klíčová slova: β -*N*-methylamino-L-alanin, kapalinová chromatografie, validace, optimalizace, hmotnostní spektrometrie, neurodegenerativní onemocnění

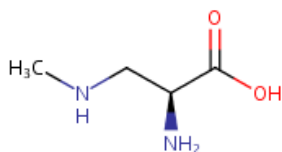
Úvod

β -*N*-Methylamino-L-alanin (BMAA) je neurotoxická aminokyselina neproteinogenního původu produkovaná několika skupinami fototrofních organismů (sinice, rozsivky a obrněnky), jež jsou běžnou součástí globálního ekosystému^{1–3}. V přírodě se vyskytuje ve dvou formách a to ve formě volné a vázané na proteiny^{1,4}.

Z chemického hlediska se jedná o vysoce polární aminokyselinu, která by se pravděpodobně neměla bioakumulovat v tukových tkáních, což však nebylo dosud předmětem výzkumu^{4,6}. Strukturální vzorec této látky je uveden na obr. 1.

Počátky zkoumání neurotoxinu BMAA jsou spojeny s extrémním výskytem neurodegenerativních onemocnění, zejména amyotrofické laterální sklerózy (ALS) u domorodých obyvatel Chamorro na ostrově Guam, která jsou až do současné doby stále nevyléčitelná. Průzkumy vědců ze Spojených států roku 1954 odhadly incidenci ALS na ostrově Guam 50× až 100× vyšší než kdekoliv jinde na světě⁷. Samotný neurotoxin byl poprvé objeven a izolován roku 1967 ze semen cykasu *Cycas micronesica*³.

Testy *in vivo* a *in vitro* prokázaly, že již v malých koncentracích (desítky $\mu\text{mol l}^{-1}$) vykazuje BMAA toxické účinky na motorické neurony, a to i ve smíšených míšních kulturách⁵. Kromě toho byla prokázána jeho schopnost



Obr. 1. Strukturální vzorec BMAA

bioakumulace napříč potravním řetězcem, přičemž zjištěné koncentrace se pohybovaly v rozmezí několika stovek až tisíců $\mu\text{g g}^{-1}$ (cit.^{5,7}).

Výzkum BMAA však stále není jednotvárný, neboť jsou zjišťovány rozporuplné výsledky, jež jsou získávány za pomoci různých analytických postupů a předúprav vzorků³.

Experimentální část

K přípravě zásobních roztoků byl použit standard β -*N*-methylamino-L-alanin hydrochlorid (BMAA, čistota $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich) a vnitřní standard DL-2,4-diaminomáslná-3,3,4,4-d₄ kyselina dihydrochlorid (D₄-DAB, čistota $\approx 98\%$, Sigma-Aldrich). Jako mobilní fáze byla použita deionizovaná voda a acetonitril, obě složky obohacené 0,1 % HCOOH (čistota $\approx 98\%$).

Zásobní roztoky byly připraveny v mobilní fázi a uchovávaly v mrazáku při teplotě $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní a kalibrační roztoky byly připraveny vždy čerstvé, a to ředěním příslušných zásobních roztoků do požadovaných koncentrací dle potřeb. Obohacené vzorky byly připraveny pro koncentrační úrovně 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 1,0 $\mu\text{g l}^{-1}$. Jejich příprava byla provedena tak, aby bylo dosaženo stejného složení vzorku jako použité mobilní fáze voda-acetonitril (40/60, v/v). Spikované vzorky byly připraveny v celkovém objemu 5 ml, zahrnující i přídavek standardu a vnitřního standardu, přičemž každý spikovaný vzorek byl nasát do injekční stříkačky a následně filtrován na filtru Titan3 42213NP (PTFE membrána). Prvních cca 4000 μl filtrátu bylo odpuštěno do odpadu a zbylých cca 1000 μl filtrátu bylo nadávkováno do vialky o objemu 1,8 ml a vialka byla uzavřena. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků a přístroje byla provedena také analýza slepého vzorku.

Reálné vzorky získané z třeboňské sbírky autotrofních organismů (CCALA) byly připraveny obdobným způsobem jako spikované vzorky s tím rozdílem, že zde byla přidána mobilní fáze místo pracovního roztoku standardu.

Chromatografická separace byla provedena na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 (Thermo). Použita byla chromatografická kolona ZIC-HILIC (150 mm; 2,1 mm; 3,5 μm ; Merck) a předkolona ZIC-HILIC (20 mm; 2,1 mm; 5,0 μm ; Merck).

Detekce analytu BMAA, jeho vnitřního standardu D₄-DAB a příslušných fragmentů byla provedena na hmotnostním spektrometru VelosPro (Thermo). Jako kolizní plyn bylo použito helium o čistotě 99,99 % obj. (Linde). Jako „sheath gas“ a „auxiliary gas“ byl použit dusík o čistotě $\geq 99,5\%$ obj. generovaný systémem Genius 1022 (Thermo). K vyhodnocení výsledků a kvantifikaci byly použity programy Chromeleon, Tune plus, Xcalibur a EffiValidation 3.0.

Výsledky a diskuse

Testovací analýza

Za účelem identifikace sloučenin byla provedena testovací analýza směsného pracovního roztoku standardu a vnitřního standardu o koncentraci 1 mg l⁻¹. Píky byly identifikovány a byly jim přiřazeny hodnoty retenčních časů. Východní podmínky separace byly převzaty z publikace⁸.

Vzhledem k příliš dlouhé době analýzy a velké hodnotě rozlišení byla provedena základní optimalizace chromatografické separace a poté hmotnostní detekce.

Optimalizace chromatografické separace

V první fázi byla provedena optimalizace separace chromatografu, jejímž cílem bylo zvolit takové složení a průtok mobilní fáze, které umožní dostatečné rozdělení separovaných analytů v co nejpříjemnějším čase. Míra kvality separace byla posuzována objektivně na základě hodnot rozlišení a asymetrie píku. Shrnutí výsledků optimalizace složení a průtoku mobilní fáze je uvedeno v tabulce I.

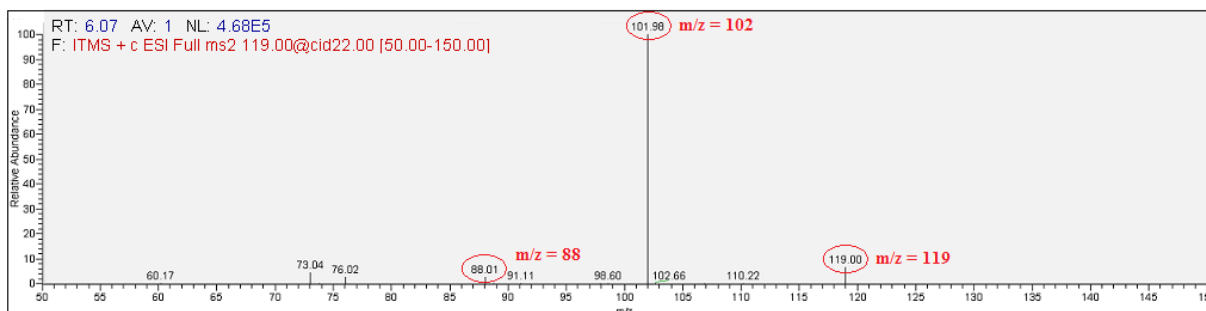
Dále byl také optimalizován objem nástřiku vzorku. Objem nástřiku vzorku byl testován v celém rozsahu au-

tosampleru vybaveného mikrostríkačkou Hamilton (1 až 100 µl) s cílem dosáhnout co možná nejvyššího objemu nástřiku za účelem získání co nejnižší instrumentální meze detekce při současném dodržení dostatečné symetrie píku. Hodnotícím kritériem byl faktor asymetrie píku, který se v uvedeném rozsahu pohyboval v rozmezí 1,07–1,38 (pro BMAA) a 1,07–1,26 (pro D₄-DAB). Bylo zjištěno, že v celém testovaném rozsahu autosampleru vyhovuje faktor asymetrie píku požadovanému kritériu přijatelnosti (faktor asymetrie píku v rozmezí 0,8–1,5).

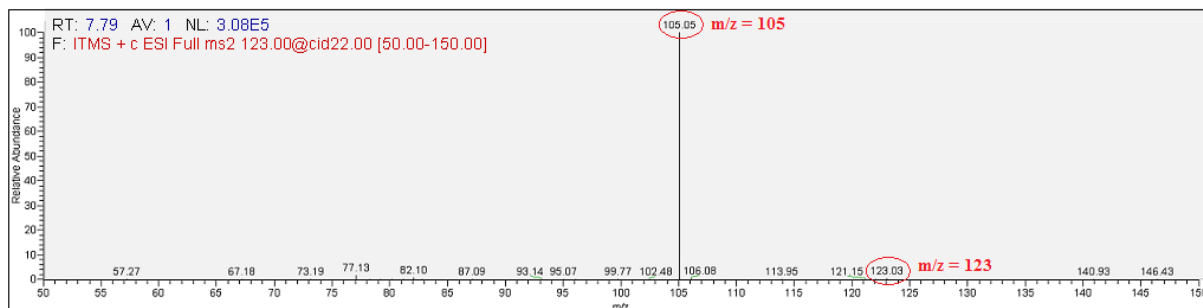
Optimalizace hmotnostní detekce

Pro detekci a kvantifikaci standardu (BMAA) a jeho fragmentů byl zvolen přechod 119 → 102 (*m/z*) a přechod 119 → 88 (*m/z*) k jeho ověření. Pro detekci a kvantifikaci vnitřního standardu (D₄-DAB) a jeho fragmentů byl zvolen přechod 123 → 105 (*m/z*). Na obr. 2 a 3 jsou zobrazena hmotnostní spektra s příslušnými MRM přechody.

Následně byla provedena optimalizace podmínek elektrospreje (teplota transferové trubice, teplota kapiláry, průtok plynu), iontové optiky (S-čochky, F-čochky) a kolizní energie. Cílem této optimalizace bylo dosáhnout co nejvyšší plochy píku standardu při dostatečné stabilitě iontového zdroje. Průtok plynu byl testován jako poměr S/A (sheath gas/auxiliary gas). Napětí na kapiláře bylo zvoleno



Obr. 2. Hmotnostní spektrum BMAA s vyznačenými příslušnými MRM přechody



Obr. 3. Hmotnostní spektrum D₄-DAB s vyznačenými příslušnými MRM přechody

Tabulka I
Výsledky optimalizace složení a průtoku mobilní fáze

Parametr	Mobilní fáze: voda/acetonitril (s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí)				
	50/50 (v/v)		40/60 (v/v)		
Průtok mobilní fáze [ml min ⁻¹]	0,2	0,4	0,2	0,4	
Doba analýzy [min]	9,5	5,5	18	9	
R _{ST,VS} [1]	4,9	2,4	7,2	6,8	
A _F [1]	BMAA	1,3	1,9	1,1	1,1
	D ₄ -DAB	1,2	1,5	1,1	1,2

Tabulka II
Souhrn optimalizace hmotnostní detekce včetně podrobností o příslušných skenech

Optimalizovaný parametr	Testované hodnoty		Zvolená hodnota		
Teplota transferové trubice	250 °C – 300 °C – 350 °C		250 °C		
Teplota kapiláry	250 °C – 300 °C – 350 °C		250 °C		
Poměr průtoku plynu (S/A)	30/10 – 45/15 – 60/20 – 35/10		30/10 Arb.		
Potenciál na F-čočkách	rozmezí –30 až –4 V		– 8,5 V		
Potenciál na S-čočkách	rozmezí 0 až 70 V		65 V		
Napětí na kapiláře	–		3,0 kV		
BMAA:	kolizní energie	22 %	D ₄ -DAB:	kolizní energie	22 %
	typ skenu	full MS/MS (50–150 m/z)		typ skenu	full MS/MS (50–150 m/z)
	doba plnění pasti	100 ms		doba plnění pasti	100 ms
	počet mikroskenů	1		počet mikroskenů	1

3,0 kV dle publikace⁸. Kolizní energie byla optimalizována jako normalizována v rozmezí 0–100 %, a to pro všechny tři výše zmíněné přechody. Souhrn optimalizačních podmínek hmotnostní detekce včetně testovaných hodnot a typů skenů je uveden v tab. II.

Validace

Po provedené optimalizaci metody byla provedena její základní validace. Účelem validace bylo prokázat vhodnost vyvinuté metody pro zamýšlenou kvantitativní analýzu neurotoxinu BMAA ve vodě.

Vyvinutá analytická metoda byla validována na modelu kalibrační křivky v rozsahu 0,1 µg l⁻¹ až 100 µg l⁻¹. Vzhledem ke skutečnosti, že přímka jako kalibrační model v uvedeném rozmezí koncentrací nevyhovovala z důvodu nepřijatelných hodnot QC koeficientu, správnosti a přesnosti, bylo využito modelu segmentované lineární regrese. Základními hodnocenými validačními parametry byly linearita (korelační koeficient a QC koeficient), přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost), správnost (vyjádřená jako

výtěžnost), rozsah, instrumentální mez detekce a instrumentální mez stanovitelnosti (vyjádřené jako poměr signálu k šumu). Kompletní souhrn výsledků validace je shrnut v tab. III.

V rámci validace metody bylo zjištěno, že všechny uvedené parametry splňují příslušná kritéria přijatelnosti. Na základě výsledků validace bylo potvrzeno, že vyvinutá analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností v rozsahu koncentrací 0,1–100 µg l⁻¹.

Testování reálných vzorků

Vzhledem k zamýšlenému použití metody pro kvantitativní stanovení neurotoxinu BMAA v reálných vzorcích bylo zcela nezbytné provést i hodnocení správnosti, přesnosti, meze detekce metody a meze kvantifikace metody, které zahrnuje vliv matrice vzorku a postupu přípravy vzorku k analýze. Za tímto účelem byly připraveny tzv. spikované vzorky.

Tabulka III
Souhrn výsledků validace metody

Koncentrační úroveň [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Korelační koef.	Korelační koef. kritérium přijatelnosti	QC koef. [%]	QC koef. [%] kritérium přijatelnosti	Experimentálně zjištěné hodnoty			
					správnost [%]	kritérium [%]	přesnost [%]	kritérium [%]
0,10					92		5,2	
0,20					96		2,8	
0,50	0,9986	$\geq 0,9950$	3,14	$\leq 5,00$	100	40–120	5,8	≤ 30
0,75					99		0,4	
1,0					99		3,6	
1,0					112		1,9	
2,0					102		3,4	
5,0	0,9984	$\geq 0,9950$	4,24	$\leq 5,00$	94	60–115	1,5	≤ 21
7,5					98		3,2	
10					101		0,4	
10					106		0,3	
20					100		1,2	
50	0,9993	$\geq 0,9950$	2,63	$\leq 5,00$	98	80–110	2,8	≤ 15
75					101		2,7	
100					100		1,4	
Instrumentální mez detekce (IDL)			10 ng l^{-1}		Podmínka: $S/N \geq 3$			
Instrumentální mez stanovitelnosti (IQL)			30 ng l^{-1}		Podmínka: $S/N \geq 10$			

Analýzou spikovaných vzorků bylo zjištěno, že správnost metody se pohybuje v rozmezí 76–116 % a přesnost metody v rozmezí 1,4–1,5 %, přičemž ve všech případech byla splněna kritéria přijatelnosti (viz kapitola validace). Mez detekce metody, resp. mez stanovitelnosti metody byla 82 ng l^{-1} , resp. 270 ng l^{-1} .

Byla prokázána vhodnost metody pro zamýšlené použití, tudíž byla provedena analýza reálných vzorků. Pro testování metody na reálném vzorku vody byly použity vzorky vodného živného média, v němž byly kultivovány sinice z třeboňské sbírky autotrofních organismů. Analýza reálných vzorků byla provedena bezprostředně po předání, a to vždy ve třech nezávislých opakováních. Seznam vzorků včetně charakterizace a stanovené koncentrace je uveden v tab. IV.

Bylo zjištěno, že vzorky BG 8, BG 989 a K4 obsahují stopová množství BMAA. Konkrétní hodnoty však nemohly být uvedeny, neboť výsledky se pohybovaly v oblasti mezi MDL a MQL. Koncentrace BMAA v ostatních vzorcích se pohybovaly pod mezí detekce metody.

Závěr

V rámci tohoto projektu byla vyvinuta vhodná analytická metoda LC/MS pro kvantitativní analýzu neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě, včetně provedení základní optimalizace a validace. Bylo zjištěno, že vyvinutá analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností v rozsahu koncentrací 0,1–100 $\mu\text{g l}^{-1}$. Instrumentální mez detekce byla 10 ng l^{-1} a instrumentální mez stanovitelnosti 30 ng l^{-1} .

Vyvinutá metoda byla aplikována na reálné vzorky vodných živných médií z třeboňské sbírky autotrofních organismů a bylo provedeno testování spikovaných vzorků. Mez detekce metody, resp. mez stanovitelnosti metody byla 82 ng l^{-1} , resp. 270 ng l^{-1} .

Analýzou bylo zjištěno, že 3 z 6 testovaných vzorků obsahovaly stopová množství BMAA a koncentrace ve zbylých 3 vzorcích se pohybovaly pod mezí detekce metody.

Další projekt bude zaměřen na využití této metody pro stanovení neurotoxinu BMAA v sinicích a jiných planktonních organismech spolu s vyvinutím, optimalizací a validací příslušné extrakční techniky.

Tabulka IV

Seznam a zjištění koncentrace reálných vzorků vodného živného média (BG a Z označují typy kultivačních médií)

Vzorek	Kmen/Zdroj	Sinice (rod + druh)	Koncentrace [$\mu\text{g l}^{-1}$]
BG 8	CCALA 008	<i>Aphanizomenon gracile</i>	< MQL
BG 114	CCALA 989	<i>Cylindrospermum pellucidum</i>	< MDL
BG 989	CCALA 989	<i>Nodularis sphaerocarpa</i>	< MQL
BG 943	CCALA 943	<i>Nostoc linckia</i>	< MDL
Z 796	CCALA 796	<i>Microcystis aeruginosa</i>	< MDL
K4	rybník Svět (Třeboň)	–	< MQL

LITERATURA

- Pablo J., Banack S. A., Cox P. A., Johnson T. E., Pappetropoulos S., Bradley W. G., Buck A., Mash D. C.: *Acta Neurol. Scand.* 120, 216 (2009).
- Cox P. A., Banack S. A., Murch S. J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R. R., Metcalf J. S., Morrison L. F., Cod G. A., Bergmann B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5074 (2005).
- Jiang L., Eriksson J., Lage S., Jonasson S., Shams S., Mehine M., Ilag L. L., Rasmussen U.: *PLoS One* 9, e84578 (2014).
- Lobner D., Piana P. M. T., Salous A. K., Peoples R. W.: *Neurobiol. Dis.* 25, 360 (2007).
- Jiang L., Kiselova N., Rosén J., Ilag L. L.: *Sci. Rep.* 4, 6931 (2014).
- Murch S., Cox P. A., Banack S. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12228 (2004).
- Banack S. A., Caller T. A., Stommel E. W.: *Toxins* 2, 2837 (2010).
- Combes A., Abdellaoui E. S., Sarazin C., Vial J., Mejean A., Ploux O., Pichon V.: *Anal. Chim. Acta* 771, 42 (2013).

K. Hořejší^a, D. Kahoun^a, and T. Hauer^b (^a *Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice*, ^b *Department of Botany, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice*): **Development, Optimization and Validation of an Analytical Method for Determination of the Neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in Water Using LC/MS**

This work deals with the development, optimization and validation of an analytical method for determination of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in water using LC/MS. Firstly, the development and optimization of the analytical method was performed. For the optimization of the analytical method following parameters were selected: temperature of HESI and MS capillary, gases flow rate, voltage on S-lens, F-lens and capillary, collision energy. In addition, mobile phase composition, flow rate of mobile phase and injection volume of sample were optimized too. Then, the analytical method was successfully validated. Finally, the method was applied to the analysis of real samples of surface water.

Keywords: β -N-methylamino-L-alanine, neurodegenerative disease, liquid chromatography, validation, optimization, mass spectrometry

SROVNÁNÍ CITLIVOSTI FID A MS DETEKTORŮ V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII

VERONIKA KOHUTOVÁ, VERONIKA
ŠKEŘÍKOVÁ, PETRA CINKOVÁ a ŠTĚPÁN
URBAN

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

Klíčová slova: lidský pach, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, plamenově ionizační detektor, těkavé organické sloučeniny

Úvod

V této práci je řešena problematika výzkumu molekulového složení lidského pachu a instrumentace využitelné pro tento účel. Cílem je porovnání citlivosti plamenově ionizačního detektoru (FID) a hmotnostního detektoru (MS). Oba detektory jsou používány k detekci látek obsažených v lidském pachu po jejich rozdělení metodou plynové chromatografie^{1,2}.

Podstata MS spočívá ve vytvoření iontů z organických nebo anorganických látek vhodnou metodou, jejich následné separace na základě poměru hmotnosti a náboje nabitých částic (m/z) a nakonec jejich detekce³. Výhodou MS je jeho schopnost získání informace o struktuře látky, což umožňuje potvrzení identity cílového analytu nebo identifikaci neznámé sloučeniny¹. Princip FID spočívá v měření změny elektrické vodivosti vodíkového plamene způsobené přítomností eluované organické látky⁴. K přednostem FID patří jeho vysoká citlivost vůči téměř všem organickým látkám, dobrá linearita a velký lineární dynamický rozsah⁵.

Za nejvýznamnější zdroj lidského pachu je považována kůže, z níž se uvolňují těkavé organické sloučeniny, které určují pach konkrétního člověka^{6–8}. Mezi faktory ovlivňující pach osoby můžeme zařadit rozdílnost pohlaví a věku, etnickou příslušnost, přijímanou potravu, prodělané nemoci, používané léky, aj.⁶. Doposud bylo v pachových vzorcích osob detegováno více jak 900 látek, identifikováno však pouze 305 látek^{1,6,9,10}. Podle typu se jedná o uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, aldehydy, ketony, alkoholy, ethery, kyseliny, estery, amidy, aminy a jiné látky.

Experimentální část

Metody a vybavení

K přípravě roztoků byly použity standardy aldehydů, ketonů, esterů, kyselin a *n*-alkanů o čistotě 99,5 % a hexan (čistota ≥ 99 % pro GC), vše od Sigma-Aldrich.

Roztoky byly měřeny na plynovém chromatografu Thermo TRACE 1310 Gas Chromatograph, který je vybaven hmotnostním detektorem TSQ QUANTUM XLS ULTRA a také plamenově ionizačním detektorem (FID). Naměřené chromatogramy se vyhodnocovaly softwarem Xcalibur a jednotlivé látky byly identifikovány pomocí retenčních indexů a na základě shody hmotnostních spekter se spektry uvedenými v knihovně spekter NIST. Pro separaci látek byla použita kapilární kolona SLBTH-5 ms o délce 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a filmem 0,25 μm , nosným plynem bylo helium.

GC-MS

Dávkování roztoků do přístroje bylo prováděno technikou horké jehly, kdy do skleněné dávkovací stříkačky Hamilton byly nataženy 2 μl roztoku a k nim bylo nabráno 0,5 μl vzduchu. Takto připravená stříkačka byla zavedena do dávkovače vyhřátého na 250 °C a 5 s temperována na jeho teplotu. Po uplynutí této doby byl vzorek převeden do nástřikového prostoru. Vzorek byl na kolonu dávkován za konstantního tlaku 100 kPa v módu splitless.

Teplota kolony na počátku měření byla 50 °C po dobu 2 min. Poté začala postupně narůstat rychlostí 5 °C/min na teplotu 150 °C. Tato teplota byla držena po dobu 5 min. Pak došlo opět k nárůstu teploty na 220 °C rychlostí 8 °C/min a tato teplota byla držena 5 min. Poslední nárůst teploty byl na 320 °C, opět rychlostí 8 °C/min. Tato teplota byla udržována 16,75 min. Celková doba analýzy byla 70 min.

Interface, spojující kolonu s detektorem, měl teplotu 280 °C, iontový zdroj byl vyhříván na teplotu 220 °C. Vlákno bylo žhaveno na 70 eV. Rychlost skenování byla 3333, skenováno bylo v rozsahu hmot od $m/z = 25$ do $m/z = 600$.

GC-FID

Dávkování roztoků do přístroje bylo prováděno pomocí teplotně programovatelného dávkovače (PTV), který byl naprogramován na konstantní teplotu a splitless mód (CT splitless). Skleněnou stříkačkou Hamilton byly dávkovány 2 μl roztoku technikou horké jehly. Liner dávkovače byl vyhříván na 250 °C. Vzorek byl na kolonu dávkován za konstantního tlaku 100 kPa.

Teplotní program na koloně byl téměř totožný s teplotním programem kolony spojené s hmotnostním detektorem. Lišil se pouze poslední izotermický krok, kdy

teplota 320 °C byla udržována 36,75 min. Celková doba analýzy tak byla 90 min.

Detektor byl vyhříván na teplotu 300 °C. Hodnoty průtoků přiváděných plynů byly nastaveny na 350 ml min⁻¹ pro vzduch, 35 ml min⁻¹ pro vodík.

Modelová směs

Byly připraveny zásobní směsi 56 standardů o koncentraci 2 mg ml⁻¹ každé složky (směs ketonů, kyselin, butyl esterů kyselin, skvalen) a o koncentraci 1 mg ml⁻¹ (směs aldehydů a směs *n*-alkanů). Jejich smísením byl připraven pracovní roztok základní modelové směsi o koncentraci 100 µg každé složky v 1 ml hexanu.

Dalším ředěním pracovního roztoku základní modelové směsi byla připravena kalibrační řada, která zahrnovala celkem šest roztoků o koncentraci 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 a 50,0 µg každé složky v 1 ml hexanu.

Výsledky a diskuse

Optimalizace metody pro MS detekci

Na základě předchozích experimentů¹¹ byl jako počáteční gradient použit lineární gradient s nárůstem teploty ze 60 na 300 °C rychlostí 10 °C/min. Konečná teplota byla držena po dobu 5,5 min. Celková doba analýzy byla 33,5 min. Separace všech složek modelové směsi ale nebyla dostatečná a docházelo k jejich koeluci. Největší problémy byly v 11. a 16. minutě, a dále za 20. minutou, kde docházelo ke koeluci několika látek.

Vzhledem ke špatnému rozdělení sledovaných látek a jejich koeluci byl teplotní program upraven. Byly zavedeny tři teplotní rampy a čtyři izotermické kroky. Počáteční teplota na koloně byla snížena na 50 °C. Toto snížení teploty mělo pomoci lépe oddělit nejvíce těkavé látky od piku rozpouštědla. Snížení strmosti teplotní rampy a zave-

dení dvou izotermických kroků (cca 22.–27. min, 36.–41. min) pomohlo ke zlepšení rozlišení sledovaných látek. Zvýšení konečné teploty na 320 °C umožňovalo eluci posledních, nejméně těkavých *n*-alkanů. Tato teplota byla udržována 16,75 min. Celková doba analýzy tak byla 70 min.

Optimalizace metody pro FID detektor

Metoda optimalizovaná pro spojení GC-MS byla následně aplikována i na spojení plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Tedy metoda, která sestávala ze tří teplotních ramp a čtyř izotermických kroků. Celková doba analýzy byla 70 min.

Ve spojení s plamenově ionizačním detektorem a při celkové době analýzy 70 min však byl posledním eluovaným píkem oktatriakontan (C₃₈H₇₈). Modelová směs však obsahovala *n*-alkany až do tetrakontanu (C₄₀H₈₂). Doba analýzy tedy nebyla dostatečná pro eluci všech složek separované směsi. Vzhledem k teplotní stabilitě kolony, která je udána výrobcem (maximální teplota 360 °C), bylo zvoleno jako vhodnější prodloužení posledního izotermického kroku namísto zvýšení konečné teploty. Prodloužení posledního izotermického kroku o 20 min pak umožnilo eluci všech *n*-alkanů až po tetrakontan. Celková doba analýzy byla prodloužena na 90 min.

Vyhodnocení meze detekce a meze stanovitelnosti

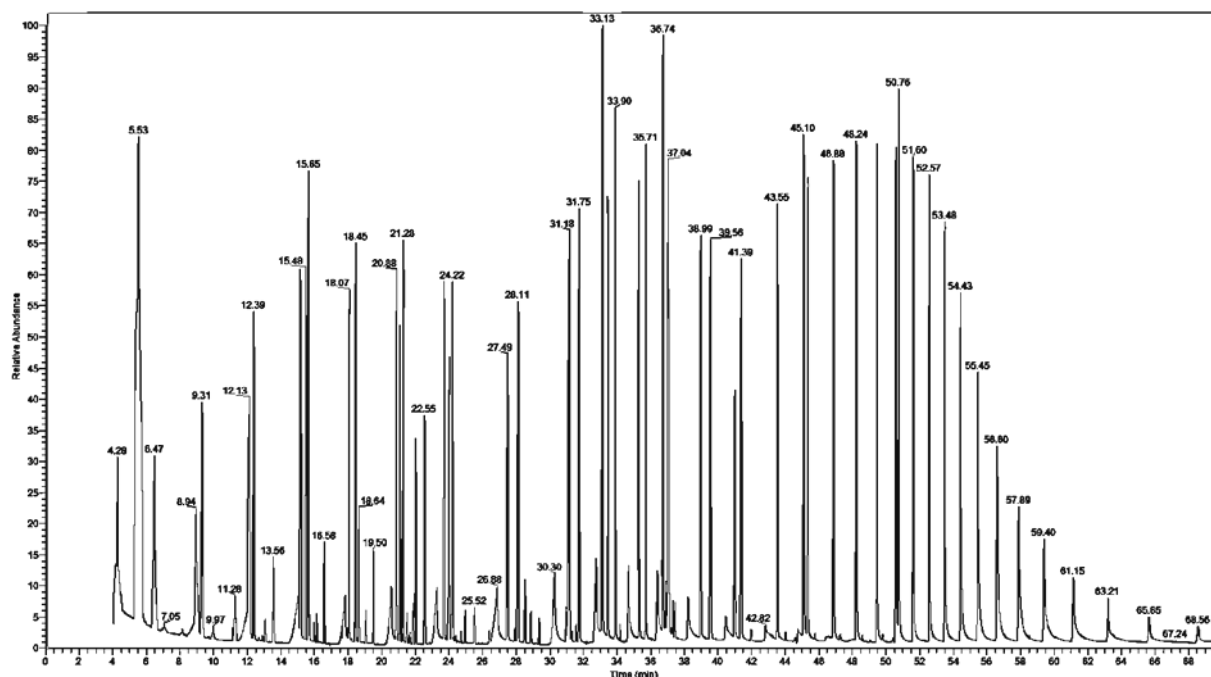
Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny z rovnic přímek na základě velikosti šumu¹². Mez detekce byla vypočítána z trojnásobku šumu a mez stanovitelnosti z jeho desetinásobku. Hodnota šumu byla vždy odečítána v okolí píku. Koncentrace odpovídající LOD a LOQ pro devět vybraných látek jsou uvedeny v tabulce I.

Ze získaných hodnot je vidět, že u většiny látek poskytuje technika GC-MS nižší mez detekce a mez stanovi-

Tabulka I

Odhad meze detekce (LOD) a stavitelnosti (LOQ) pro vybrané látky modelové směsi, vypočteno z hodnoty šumu (LOD – z trojnásobku šumu, LOQ – z 10-ti násobku šumu) a kalibrační závislosti $y = kx + q$ (cit.¹²)

Látka	Hmotnostní detektor		Plamenově ionizační detektor	
	LOD [µg ml ⁻¹]	LOQ [µg ml ⁻¹]	LOD [µg ml ⁻¹]	LOQ [µg ml ⁻¹]
Kyselina dekanová	1,569 ± 0,049	5,178 ± 0,162	1,523 ± 0,042	5,026 ± 0,139
Butyl kaprylát	0,528 ± 0,013	1,742 ± 0,043	0,891 ± 0,023	2,940 ± 0,076
2-Dodekanon	0,203 ± 0,006	0,670 ± 0,020	2,271 ± 0,067	7,494 ± 0,221
Tetradekan	0,045 ± 0,001	0,149 ± 0,003	0,866 ± 0,026	2,868 ± 0,086
Dodekanal	1,112 ± 0,034	3,670 ± 0,112	0,126 ± 0,004	0,416 ± 0,013
6,10-Dimethyl-5,9-undekadien-2-on	0,370 ± 0,010	1,221 ± 0,033	2,331 ± 0,069	7,692 ± 0,228
(<i>E</i>)-6,10-Dimethyl-5,9-undekadien-2-on	0,245 ± 0,008	0,806 ± 0,026	2,311 ± 0,069	7,626 ± 0,228
Kyselina undekanová	2,997 ± 0,089	9,890 ± 0,294	1,899 ± 0,055	6,267 ± 0,182
Butyl ester kys. nonanové	0,121 ± 0,004	0,399 ± 0,013	1,840 ± 0,053	6,072 ± 0,175



Obr. 1. Chromatogram modelové směsi o koncentraci $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ jednotlivé složky, měření na plynovém chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem. Osa x – čas (min), osa y – relativní intenzita (a.u.)

telnosti než technika GC-FID. Našlo se však 13 látek z modelové směsi, které mají nižší hodnoty LOD a LOQ v případě GC-FID. Konkrétně se jedná o nonan, 2-oktanon, dekan, undekanal, kyselinu dekanovou, kyselinu undekánovou, kyselinu dodekanovou, tetradekanal, hexatriakontan, heptatriakontan, oktatriakontan, nonatriakontan a tetrakontan. Obecně nelze říci, pro které skupiny látek je plamenově detektor citlivější, neboť uvedené látky mají různou polaritu i těkavost.

Citlivost plamenově ionizačního detektoru by mohla být dále zlepšena optimalizací složení plamene a tím i teploty plamene. Citlivost hmotnostního detektoru by se mohla zvýšit vyhodnocováním ploch píků pouze při vybraných hmotách (tzv. „base peak“ – nejintenzivnější pás spektra), což by současně umožnilo snížit vliv případných nečistot.

Závěr

Byla vytvořena a optimalizována metoda pro separaci modelové směsi 56 látek přítomných ve vzorcích lidského pachu plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem a plamenově hmotnostním detektorem. Vzhledem k rozdílům v konstrukci detektorů, bylo složité dosáhnout na obou detektorech stejného průtoku nosného plynu. To se projevilo hlavně u plamenově ionizačního detektoru, kde bylo nutné, při zachování stejného teplotního progra-

mu, prodloužit dobu analýzy. Prodloužení posledního teplotního kroku pak umožnilo eluci všech *n*-alkanů až po tetrakontan.

Optimalizované podmínky separace byly použity pro proměření řady kalibračních roztoků modelové směsi. Po vyhodnocení chromatogramů byly vytvořeny kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci. Dále byly vypočítány meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé látky. Ze získaných výsledků je vidět, že hmotnostní detektor vykazuje pro většinu látek vyšší citlivost než plamenově ionizační detektor.

Tato práce byla realizována za podpory projektu Ministerstva vnitra ČR VF20142015036.

LITERATURA

1. Cinková P.: *Diplomová práce*, VŠCHT, Praha 2015.
2. Bernier U. R., Booth M. M., Yost R. A.: *Anal. Chem.* 71, 1 (1999).
3. Zachař P., Sýkora D.: *Hmotnostní spektrometrie*, VŠCHT, Praha 2015.
4. Zachař P., Sýkora D.: *Plynová chromatografie*. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>, staženo 22.3.2016
5. Řezanka P.: *Plynová chromatografie*, VŠCHT, Praha 2015.
6. Straus J., Kloubek M.: *Kriminalistická odorologie*.

- Aleš Čeněk, Plzeň 2010.
- Gallagher M., Wysocki C. J., Leyden J. J., Spielman A. I., Sun X., Preti G.: *Br. J. Dermatol.* 159, 780 (2008).
 - Vyhnálek O.: *Aktivní pachová signatura*, VŠCHT, Praha 2015.
 - Vítková J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007.
 - Sunil K. J., Kenshi H.: *Sens. Actuators, B* 206, 481 (2015).
 - Paroulková K.: *Diplomová práce*, VŠCHT, Praha 2016.
 - Záruba K., Suchánek M.: *Statistické vyhodnocení experimentálních dat a odhad nejistoty výsledku analýzy*: VŠCHT Praha.

V. Kohutová, V. Škeříková, P. Cinková, and Š. Urban (*University of Chemistry and Technology in Prague, Faculty of Chemical Engineering, Department of Analytical Chemistry, Prague*): **Comparison of the Sensitivity of FID and MS Detectors in Gas Chromatography**

The aim of this study is comparison of the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the

flame ionization detector (FID) and mass spectrometer (MS) in connection with gas chromatography (GC). Both detectors were used for detection of compounds presented in human body scent. Human body scent is a very complex mixture of polar and nonpolar, volatile and less volatile organic compounds. Nowadays, only the main components from thousands presented were successfully described. The human scent contains alkanes, aldehydes, ketones, amines, alcohols, amides, fatty acids and their esters whereas concentrations of these compounds alternate by many orders of magnitudes. Based on the previous experiments, a standard mixture of compounds presented in human body scent was prepared. This standard mixture was used for preparation of solutions with concentration in the range $0.5\text{--}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound in hexane. Calibration curves were created on the base of peak area and LOD and LOQ were calculated based on the signal of noise. Each molecule shows different behavior on individual detector, nevertheless mass detector has lower LOD for almost 80 % of compounds and flame ionization detector has better linear range for the most compounds.

Keywords: human odour, gas chromatography, mass spectrometry, flame ionization detector, volatile organic compounds

SORPCE VYBRANÝCH KATIONTŮ KOVŮ NA CHELATAČNÍM SORBENTU IONTOSORB

DOMINIK LÁCHA a PAVEL JANOŠ

*Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Králova Výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem
dominik.lacha@gmail.com*

Klíčová slova: chelatační sorbent, iontosorb, sorpce kovů, celulóza, perlová celulóza, těžké kovy

Úvod

Sorbenty na bázi makroporézní perlové celulosy se (na rozdíl od přírodních materiálů obdobného složení) vyznačují nejen dobře definovanou strukturou, zrnitostí a porozitou, ale i dostatečnou mechanickou stabilitou, díky čemuž nacházejí rozmanité využití v preparativní i analytické chemii, v biotechnologii, farmacii a dalších odvětvích. K nejznámějším sorbentům tohoto typu, zejména v České republice, patří sorbenty řady Iontosorb, jejichž základem je viskózní perlová celulóza vyráběná postupem vyvinutým v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR firmou Perloza, sorbenty Intosorb pak vyrábí stejnojmenná firma navazující na tradici výroby ionexů v Ústí nad Labem.

Celulosaová matrice sorbentů Iontosorb umožňuje snadné chemické modifikace a derivatizace. Díky tomu jsou tyto sorbenty dostupné v různých formách lišících se hydrofobicitou či hydrofilitou (typicky se používají vysoce hydrofilní sorbenty), kapacitou i selektivitou. Zavedením různých chelatačních skupin byla připravena řada sorbentů se zvýšenou selektivitou vůči iontům kovů, které jsou využívány v analytické chemii např. pro odstranění rušivých vlivů mědi při stanovení niklu ve vlasech¹, při frakcionaci hliníku² nebo pro akumulaci rtuti při její speciální technikou difuzního gradientu³.

Poměrně široké využití nejen v analytické chemii mají chelatační sorbenty obsahující hydroxamovou funkční skupinu, které byly v poslední době použity k izolaci uranu⁴, nebo separaci směsi Zr, Y a Sr (cit.⁵), ovšem lze je použít i k separaci běžných divalentních kationtů těžkých kovů^{6,7}. Ve zmíněných případech byl sorbent tvořen maticí na bázi polyakrylamidu⁵ nebo jeho kopolymeru s divinylbenzenem⁷, případně modifikovaného zeolitu⁶, v nedávné době byla popsána i separace těžkých kovů pomocí sorbentu na bázi přírodní celulosy (tapioka) s vázanou hydroxamovou skupinou⁸. Sorbent na bázi perlové celulosy s vázanou hydroxamovou skupinou vyvinula i firma Iontosorb, modifikací karboxylové skupiny zabudované na celulosové matici s vyšším zesílením než je obvyklé pro klasické slabě kyselé katexy. Tato karboxylo-

vá skupina byla hydroxylaminem převedena na hydroxamovou. Množství hydroxamových skupin na celulóze je tedy dáno obsahem karboxylových skupin v celulosové matici⁹.

Cílem této práce bylo studium sorpčních vlastností nově vyvinutého sorbentu Iontosorb HX, zejména sorpční kapacity pro vybrané kationty těžkých kovů a vlivu pH na sorpční účinnost.

Experimentální část

Sorbent Iontosorb HX

Sorbent byl připraven firmou Iontosorb. Jako základní matrice byl použit Iontosorb CM 100 (sorbent s karboxylovou funkční skupinou). Reakce, prováděná ve skleněném kotlíku PLZ 100, probíhala zprvu při 65 °C po dobu 5 hodin a následně při 25 °C po dobu 68 hodin. Došlo k navázání hydroxylaminu na celulózu a k vytvoření hydroxamové funkční skupiny⁹.

Experimentálním postupem byly zjištěny obsahy sušiny (4,4 %) a vody (95,6 %). Na jejich základě byla vypočítána porozita sorbentu (97 %). Společně s porozitou byla zjištěna i hodnota B.V. (bed volume), která činí 36,9 ml g⁻¹ sušiny.

Chemikálie

Dusičnan olovnatý, čistota p.a., dodavatel Penta, Praha; dusičnan kademnatý, čistota p.a., dodavatel Penta, Praha; dusičnan měďnatý, čistota p.a., dodavatel Sigma-Aldrich, Francie; Chelaton III, čistota p.a., dodavatel Penta, Praha; kyselina chlorovodíková, čistota 35 %, dodavatel Penta, Praha; kyselina dusičná, hydroxid draselný, hexamethylentetramin, čistota 99,7 %, dodavatel Lach:NER; hydroxid sodný; amonný pufr; octan sodný, čistota p.a., dodavatel Lachema, Brno; destilovaná voda

Pracovní postup

Kolona se sorbentem byla promývána roztokem dusičnanů kovů o koncentraci 0,05 mol dm⁻³, který byl pod kolonou odebírán po 20ml frakcích, jejichž pH bylo měřeno z důvodu zjištění, zda je sorbent zcela nasycen. pH bodu nasycení odpovídá pH 0,05 mol dm⁻³ roztoku dusičnanu kovu před sorpcí. Přebytečný roztok byl z kolony vymyt destilovanou vodou. Pro eluci kovu ze sorbentu se následně aplikovalo 75 ml 7% HCl. Roztok byl zachycován do 250ml odměrné baňky. Přebytečný roztok byl z kolony opět vymyt destilovanou vodou, kterou se doplnila odměrná baňka. Z baňky bylo pipetou odebráno 50 ml roztoku do titrační baňky.

Obsah kovů byl stanovován chelatometricky. K uvolněnému kadmii se do titrační baňky přidalo 30 ml 1 mol dm⁻³ NaOH a 4,5 ml amonného pufru a jako indikátor sloužila eriochromová čerň T. V případě olova se přidával hexamethylentetramin a jako indikátor xylenová oranž. K mědi se aplikovaly octan sodný a TAR (thiazolyazo-resorcinol). Vzniklé roztoky byly titrovány 0,05 mol dm⁻³ roztokem Chelatonu III. pH bylo upravováno roztoky 0,1 a 5 mol dm⁻³ roztoku HNO₃ a 0,01 a 0,1 mol dm⁻³ roztokem KOH.

Sorbent byl regenerován 50 ml 0,5 mol dm⁻³ NaOH, jehož zbytky byly vymyty destilovanou vodou.

Výsledky a diskuse

Postupem uvedeným v experimentální části byly změřeny sorpční kapacity sorbentu Iontosorb HX pro vybrané kationty (Cu²⁺, Pb²⁺, ...). Výsledky jsou vedeny v tab. I.

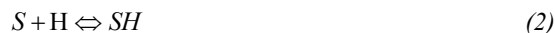
Pro kationty Cu²⁺, Cu²⁺ a Pb²⁺ byly změřeny závislosti sorbovaného množství na pH (viz obr. 1).

Z experimentálních závislostí je zřejmé, že s poklesem pH pod určitou hodnotu klesá sorpční účinnost sorbentu, což lze vysvětlit jako důsledek kompetice s ionty H⁺. Zjednodušeně lze rovnováhy na povrchu sorbentu popsat následujícími rovnicemi.

Sorpce kationtu kovu *M* na aktivním centru sorbentu *S* (náboje pro jednoduchost vynechány, uvažována nejjednodušší stechiometrie 1 : 1):



Protonace aktivního centra *S*:



S využitím bilančních rovnic a příslušných rovnovážných konstant lze po zobecnění na složitější stechiometrie rovnovážných reakcí odvodit zobecněnou Langmuirovu-Freundlichovu izotermu ve tvaru:

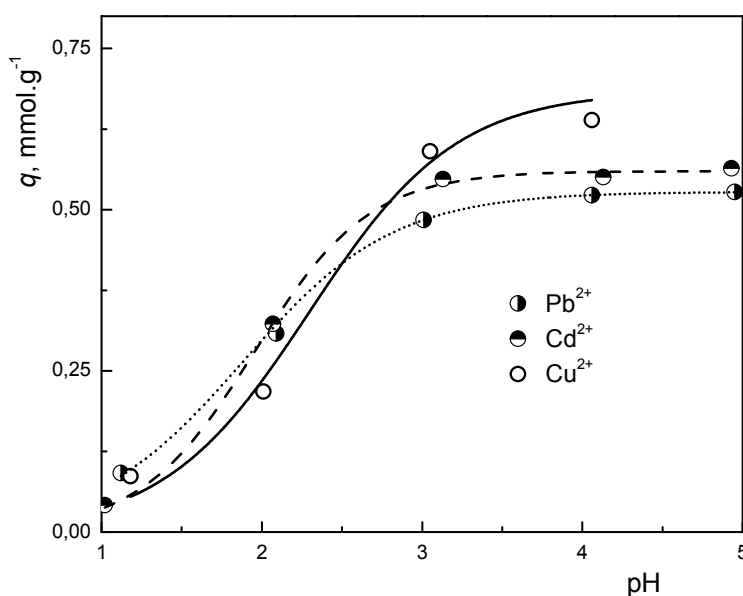
$$q = \frac{q_{\max} K_M c_M^q}{1 + K_M c_M^q + K_H [H]^p} \quad (3)$$

kde *q* je sorbované množství a *q*_{max} je maximální kapacita sorbentu (obojí v mmol g⁻¹). Pokud dále pro jednoduchost

Tabulka I

Kapacita sorbentu pro kovy Cu²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Cd²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺

Kov	Průměr kapacity sorbentu (mg/g)	SD
Cu ²⁺	45,5	0,25
Pb ²⁺	143,8	0,83
Co ²⁺	40,9	0,58
Ni ²⁺	40,0	0,58
Mg ²⁺	16,2	0
Cd ²⁺	70,1	0,82
Ca ²⁺	26,1	0,80
Zn ²⁺	40,9	0,26



Obr. 1. Závislost sorbovaného množství kationtů Cu²⁺, Cu²⁺ a Pb²⁺ na pH. Křivky byly vypočteny pomocí zobecněné Langmuirovy-Freundlichovy rovnice

uvažujeme koncentraci kationtu kovu za konstantní, vyhovuje uvedená rovnice velmi dobře experimentálními datům, jak lze vidět z obr. 1.

Závěr

Nově vyvinutý chelatační sorbent Iontosorb HX vykazuje dobrou sorpční účinnost vůči divalentním kationtům kovů. Sorpční schopnost je srovnatelná se sorbenty na bázi styren-DVB¹⁰ se sorpční kapacitou pro olovo 106,4 mg g⁻¹ a průmyslově vyráběným sorbentem DiaionTM CR20 od společnosti Mitsubishi chemical, na bázi polyamidů, jehož sorpční kapacita pro měď činí min. 25,4 mg ml⁻¹ (cit.¹¹). Nedosahuje však sorpční schopností polymerů na bázi glycidylmethakrylátu, kde sorpční kapacita pro měď dosahuje hodnot 124,02 mg g⁻¹ (cit.¹²). Jeho průmyslové využití komplikuje značná změna objemu během sorpce a regenerace.

Děkuji panu Oldřichu Tokarovi za poskytnutí sorbentu a informací o něm, paní Ing. Věře Pilařové za mentorování v laboratořích a panu Bc. Jiřímu Jirotkovi za poskytnutí údajů z měření sorbentu.

LITERATURA

1. Borosova D., Manova A., Mocak J., Beinrohr E.: *Anal. Methods* 2010, 1913.
2. Matuš P., Kubová J., Bujdoš M., Medved' J.: *Anal. Chim. Acta* 540, 33 (2005).
3. Diviš P., Szkandera R., Dočekalová H.: *Open Chem.* 8, 1105 (2010).
4. Satpati K. S., Pal S., Roy S. B., Tewari P. K.: *J. Environ. Chem. Eng.* 2, 1343 (2014).
5. Hassan K. F., Kandil S. A., Abdel-Aziz H. M., Siyam T.: *Chromatogr. Res. Int.* 2011, 6.
6. Haron M. J., Shafie N. A., Yusof N. A., Kassim A., Yunus W. M. Z. W., Talebi S. M.: *Malaysian J. Anal. Sci.* 13, 52 (2009).
7. Khodadadi R., Fakhri S. A., Entezami A. A.: *Iran. J. Polym. Sci. Technol.* 4, 248 (1995).
8. Rahman M. L., Mandal H. B., Sarkar S. M., Kabir M. N., Farid E. M., Arshad S. E., Musta B.: *J. Macromol. Sci., Part A* 53, 515 (2016).
9. Tokar O.: *Výzkumná zpráva č. 2/469. IONTOSORB, Ústí nad Labem* 2014.
10. Dinu M. V., Dragan E. S., Trochimczuk A.: XXIII ARS SEAP ARATORIA, Toruń, Poland, July 6-9 2008, (Koter S., Koter I.), str. 61.
11. Mitsubishi chemical: Product data sheet DIAION CR20, str. 1, <http://www.lenntech.com/Data-sheets/Mitsubishi-CR20-L.pdf>, staženo 14. ledna 2017.
12. Donia A., Atia A. A., Rashad R. T.: *Desalin. Water Treat.* 30, 254 (2011).

D. Lácha and P. Janoš (*College of Enviroment, University of J. E. Purkyně in Ústí nad Labem*): **Sorption of Selected Cations of Metals by Chelating Sorbent IONTOSORB**

In this work we specified sorption capacity of macroporous pearl cellulose based sorbent with hydroxamic functional group, produced by company Iontosorb, for metals Cu²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Cd²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ and how sorption capacity will change in different pH of solution. Concentration of metal ions was determined by chelatometry method. The results show lower sorption capacity of sorbent in lower pH of solution and it's grown with higher level of pH.

Keywords: chelating sorbent, iontosorb, sorption of metal, cellulose, pearl cellulose, heavy metal

ANALÝZA NANOČÁSTIC METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

MARTIN LOULA, ANTONÍN KAŇA a OTO MESTEK

*Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
martin.loula@seznam.cz*

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, nanočástice

Úvod

Nanočástice (NP) jsou fenoménem dnešní doby. Jsou využívány v mnoha oblastech průmyslu, ale můžeme se s nimi setkat i v našem každodenním životě, jsou běžnou součástí například textilu a kosmetických přípravků^{1,2}. Nadějnou metodou pro analýzu, stanovení a charakterizaci anorganických nanočástic je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) v módu analýzy jednotlivých částic (sp-ICP-MS). Měření spočívá v použití velmi rychlého vzorkování signálu; moderní spektrometry umožňují frekvenci snímání signálu až 10^5 Hz, tedy integrační časy až 10 μ s. Pokud je analyzovaný roztok NP dostatečně zředěný, vstupují do plazmatu NP odděleně a oproti klasické analýze roztoku iontů, kdy je detegován kontinuální signál, tak v případě sp-ICP-MS získáváme signál v podobě diskretních piků. Plocha těchto piků je úměrná velikosti NP, zatímco jejich frekvence je úměrná číselné koncentraci NP v analyzovaném roztoku³. Šířka jednoho píku je běžně 500 μ s, nejnovější spektrometry tak umožňují proměření profilu píku na více místech, díky čemuž je snazší odlišit signál nanočástic od pozadí způsobeného ionty v roztoku⁴.

Klíčovým parametrem pro měření je transportní účinnost, která je definována jako poměr hmotnosti vzorku dopraveného do plazmatu a celkové nasáté hmotnosti vzorku. Znalost transportní účinnosti je nezbytná pro výpočet číselné koncentrace NP ve vzorku a pokud je přístroj místo standardu NP kalibrován pomocí standardu obsahujícího rozpuštěnou formu sledovaného prvku, je nezbytná také pro určení velikosti nanočástic. Podle dostupných poznatků je transportní účinnost totožná pro rozpuštěné formy analytů i pro NP různých velikostí, u výrazně větších částic však postupně klesá⁵.

Cílem této práce je optimalizace parametrů vnášecího systému vzhledem k maximalizaci transportní účinnosti a intenzity signálu a studium dalších faktorů, které je ovlivňují. Rovněž budou nastíněny problémy spojené se stabilitou stříbrných NP.

Experimentální část

Chemikálie a instrumentace

Experimenty byly prováděny se standardy stříbrných NP o průměru 10, 20, 40, 60 a 100 nm (Sigma-Aldrich, Německo), každý o koncentraci 20 mg l^{-1} Ag. Standardy byly ředěny demineralizovanou vodou Milli-Q (Millipore, USA), pro studium stability také pufrům na bázi citronanu sodného. Pufr byl připraven rozpuštěním citronanu sodného (p.a., Penta, ČR) v demineralizované vodě a úpravou jeho pH na hodnotu 9,15 přidávkou hydroxidu sodného (Suprapur, Merck, SRN). Určení pH bylo provedeno na pH metru pH03 (Labio, ČR).

Veškerá měření byla provedena na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem NexION 350d (Perkin Elmer, Kanada), integrační čas při všech měřeních byl 0,1 ms a celková doba měření 120 s, všechna měření byla opakována třikrát, v případě výrazně vzájemně se lišících výsledků až pětkrát.

Maximalizace transportní účinnosti

V této části práce bylo studováno ovlivnění transportní účinnosti a intenzity signálu příkonem do plazmatu, průtokem argonu zmlžovačem, průtokem vzorku, velikostí NP a jejich číselnou koncentrací. Parametry byly optimalizovány ve výše uvedeném pořadí, po nalezení optimální hodnoty již probíhala další měření za využití této hodnoty. Analyzován byl roztok 60 nm NP v demineralizované vodě o číselné koncentraci $1,68 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$, při studiu vlivu velikosti a číselné koncentrace pak odděleně roztoky 10, 20, 40, 60 a 100 nm NP v demineralizované vodě o číselných koncentracích v rozmezí 10^4 až 10^6 ml^{-1} .

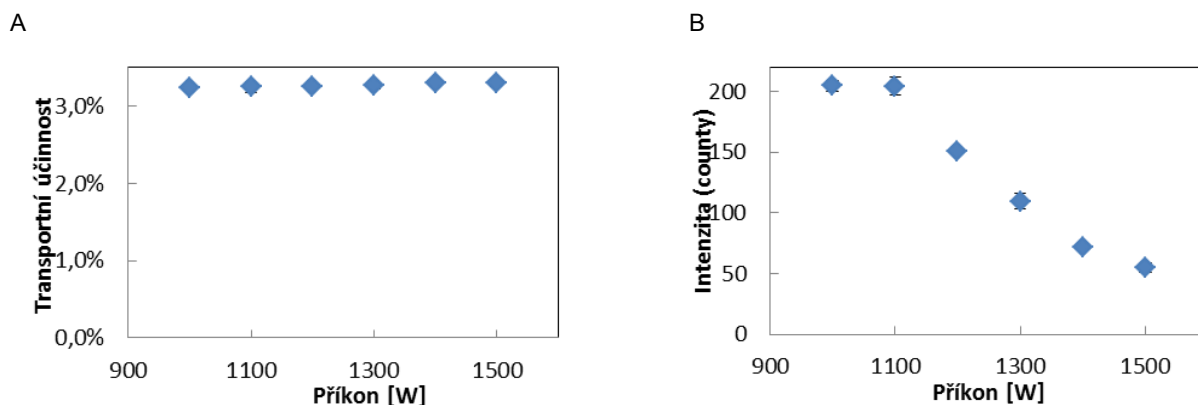
Studium stability Ag NP

Připraveny byly tři roztoky 60 nm Ag NP o číselné koncentraci $1,68 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$, a to v pufru na bázi citronanu sodného o koncentraci 1 mmol l^{-1} , v pufru na bázi citronanu sodného o koncentraci 10 mmol l^{-1} a v demineralizované vodě. Poté byly po dobu 7 hodin roztoky střídatě analyzovány.

Výsledky a diskuse

V souladu s teorií³ se na základě naměřených dat (viz obr. 1) jeví transportní účinnost nezávislá na příkonu do plazmatu. Při příkonu vyšším než 1100 W klesá intenzita signálu, jako optimální proto byl zvolen příkon 1100 W.

Průtok argonu zmlžovačem výrazně ovlivňuje trans-

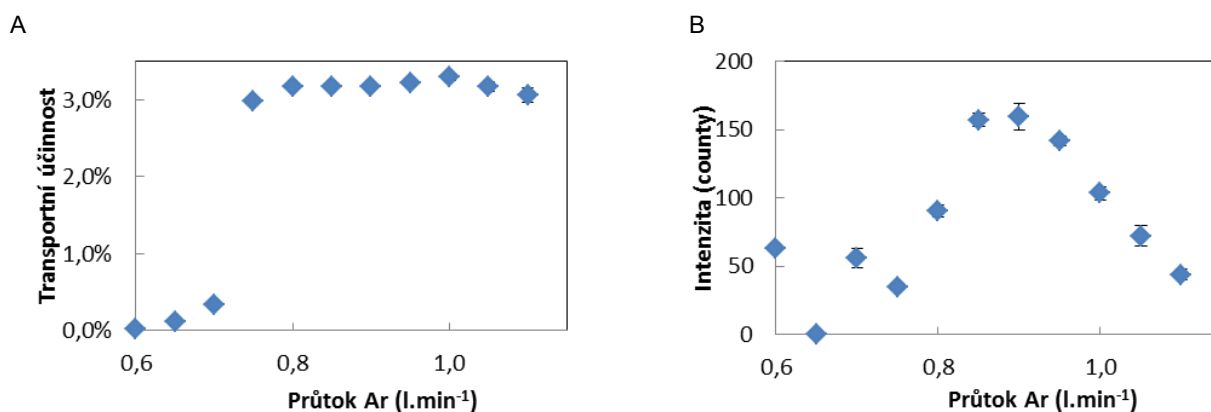


Obr. 1. Závislost transportní účinnosti (A) a nejčtetnější intenzity signálu jedné NP (B) na příkonu do plazmatu

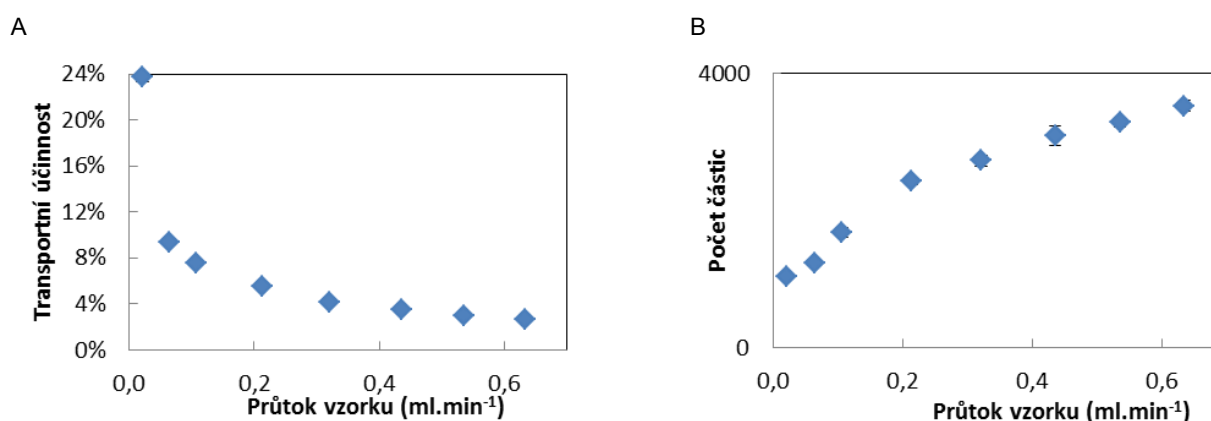
portní účinnost (viz obr. 2). Při průtoku menším než $0,75 \text{ l min}^{-1}$ je úspěšně zmlžována jen velmi malá část vzorku a počet detegovaných NP je velmi malý. Závislost intenzity signálu na průtoku argonu zmlžovačem má tvar

známý z běžného ICP-MS. Jako optimální průtok argonu zmlžovačem bylo zvoleno $0,9 \text{ l min}^{-1}$.

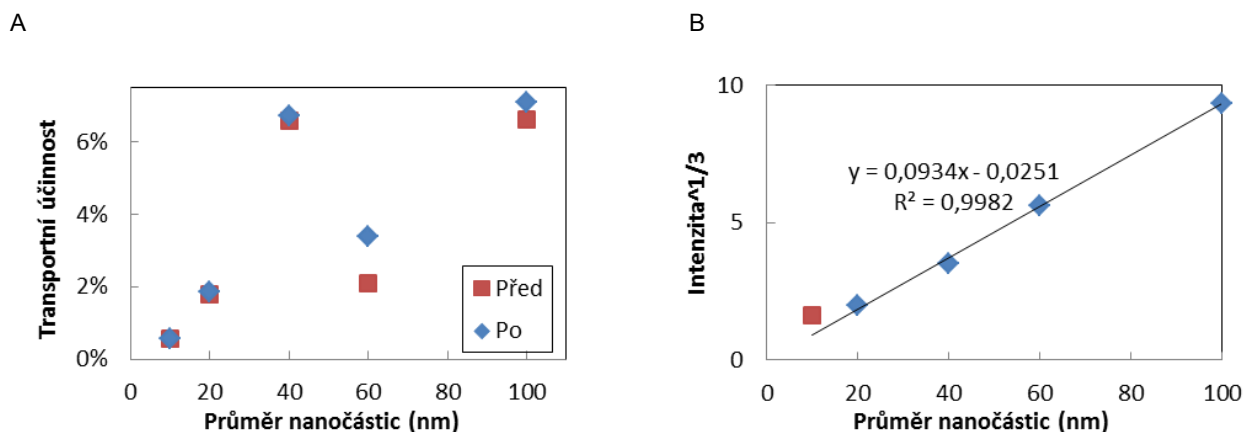
Naměřená data ukazují, že nejvyšší transportní účinnosti je dosaženo při velmi malých průtocích vzorku, při



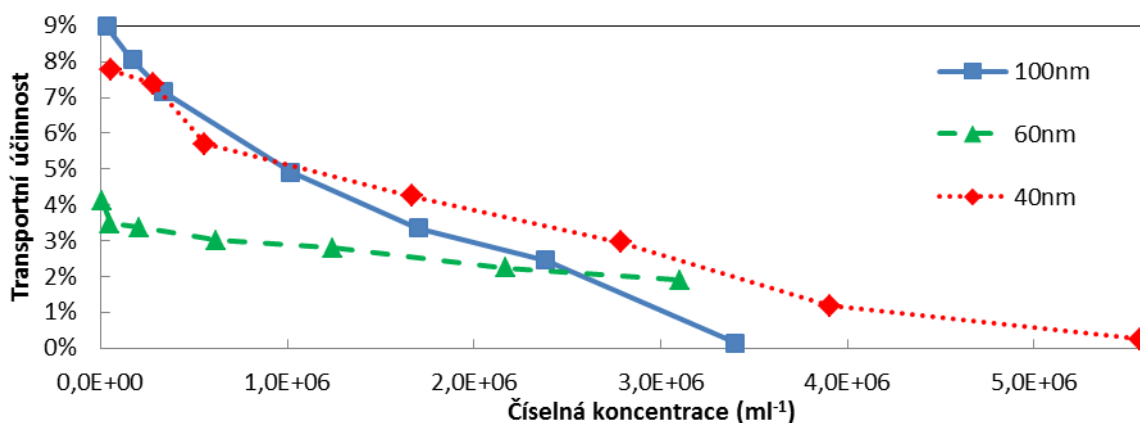
Obr. 2. Závislost transportní účinnosti (A) a nejčtetnější intenzity signálu jedné NP (B) na průtoku argonu zmlžovačem



Obr. 3. Závislost transportní účinnosti (A) a celkového počtu detegovaných NP (B) na průtoku vzorku



Obr. 4. Závislost transportní účinnosti (A) před korekci (červená) a po korekci (modrá) a třetí odmocniny nejčtenější intenzity signálu (B) na průměru NP



Obr. 5. Závislost měřené transportní účinnosti na číselné koncentraci Ag NP o průměru 40 nm, 60 nm a 100 nm

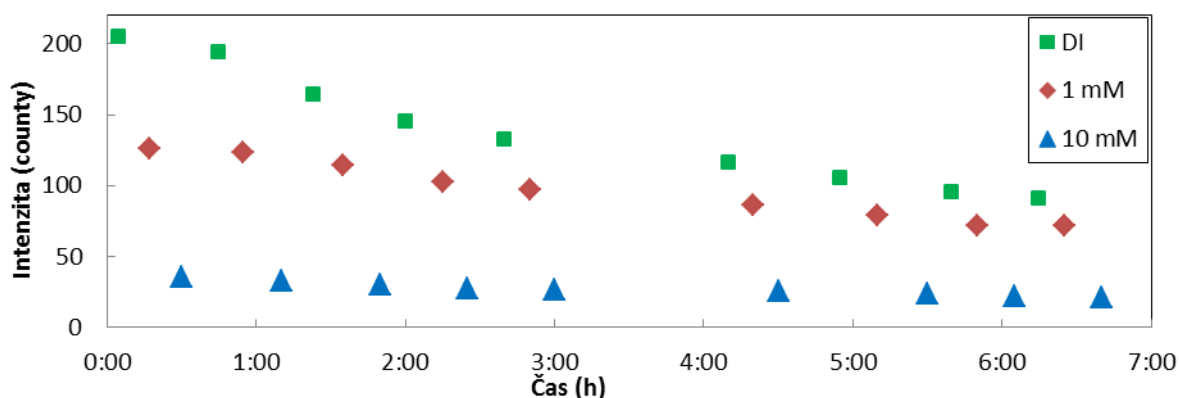
malém průtoku vzorku je však i přes vysokou transportní účinnost celkový počet detegovaných NP poměrně nízký (viz obr. 3). Jako kompromis mezi transportní účinností, celkovým počtem detegovaných částic a spotřebou vzorku tak byl za optimální zvolen průtok $0,321 \text{ ml min}^{-1}$.

Jak již bylo zmíněno, transportní účinnost má být nezávislá na velikosti NP (cit.⁵). To je v ostrém kontrastu s naměřenými daty (viz obr. 4). Možnou příčinou poklesu transportní účinnosti pro 10 a 20 nm NP je špatné odlišení jejich signálů od pozadí v důsledku nízké intenzity. Mnoho těchto NP je tak softwarem označeno za pozadí, čímž zdánlivě klesá transportní účinnost. Při pokusu vysvětlit pokles i pro 60 nm NP byla nalezena nepřesnost v používaných standardech: kontrolní analýzy celkové koncentrace stříbra našly hodnoty značně odlišné od deklarovaných hodnot. Pro všechny používané standardy byla proto provedena následná korekce všech dat na skutečné koncentrace. Ani to však nedokáže vysvětlit odlišné chování 60 nm nanočástic, snaha o vysvětlení tak bude

předmětem dalšího výzkumu.

Intenzita signálu je teoreticky přímo úměrná hmotnosti NP (cit.³), třetí odmocnina intenzity je tedy přímo úměrná průměru NP. Získaná data (viz obr. 4) této závislosti kromě 10 nm NP velmi dobře odpovídají. Odchylna u 10 nm NP opět souvisí s nízkou intenzitou jejich signálu – tyto NP pravděpodobně leží pod mezí detekce.

S rostoucí číselnou koncentrací NP postupně klesá zdánlivá transportní účinnost až téměř k nulové hodnotě (viz obr. 5). Termín „zdánlivá“ byl použit, protože významný pokles skutečné transportní účinnosti s rostoucí číselnou koncentrací neodpovídá teorii. Ve skutečnosti s rostoucí číselnou koncentrací roste rovněž pravděpodobnost změření více nanočástic zároveň, možná je rovněž zvýšená míra aglomerace nanočástic do větších celků. V důsledku toho klesá počet detegovaných událostí a narůstá intenzita měřených signálů, výsledkem je nadhodnocená velikost NP a podhodnocená transportní účinnost.



Obr. 6. Závislost nejčtetnější intenzity signálu jedné NP pro 60 nm Ag NP na stáří roztoku v demineralizované vodě (DI) a 1–10 mmol l⁻¹ pufru na bázi citronanu sodného (1 mM a 10 mM)

V průběhu těchto experimentů se ukázalo, že v demineralizované vodě dochází k rozpouštění Ag NP, proto byl jako možné stabilizační činidlo testován pufr na bázi citronanu sodného. Jak je vidět na obr. 6, tento pufr rozpouštění Ag NP zpomalil, ale zcela nezastavil. Za sledovanou dobu se nejčtetnější intenzita signálu NP v demineralizované vodě snížila na 44 %, v pufru o koncentraci 1 mmol l⁻¹ na 57 % a v pufru o koncentraci 10 mmol l⁻¹ na 60 % původní hodnoty. Stabilita stříbrných nanočástic tak sice byla zvýšena, je však stále daleko od ideálního stavu. S rostoucí koncentrací pufru však v důsledku nespektrálních interferencí sodíku klesá intenzita signálu stříbra, pufr je tak ve vyšších koncentracích, které by mohly NP lépe stabilizovat, pro analýzu pomocí ICP-MS nepoužitelný.

Závěr

První pokusy prokázaly použitelnost metody sp-ICP-MS pro stanovení a charakterizaci NP, zároveň však poukázaly na řadu problémů, které je před analýzou reálných vzorků potřeba vyřešit. Předmětem další práce tak bude určení meze detekce a meze stanovitelnosti, vysvětlení odlišného chování NP o průměru 60 nm a hledání vhodného stabilizačního činidla pro zamezení rozpouštění Ag NP.

Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury České republiky 17-00291S a Národním programem udržitelnosti (NPU I LO1613) MSMT-43760/2015.

LITERATURA

1. Verleysen E., Van Doren E., Waegeneers N., De Temmerman P. J., Abi Daoud Francisco M., Mast J.: *J. Agr. Food Chem.* 63, 3570 (2015).
2. Soto-Alvaredo J., Montes-Bayón M., Bettmer J.: *Anal. Chem.* 85, 1316 (2013).
3. Mitrano D. M., Leshner E. K., Bednar A., Monserud J., Higgins C. P., Ranville J. F.: *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 115 (2012).
4. Hineman A., Stephan C.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* 29, 1252 (2014).
5. Dan Y., Shi H., Stephan Ch., Liang X.: *Microchem. J.* 122, 119 (2015).

M. Loula, A. Kaňa, and O. Mestek (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Analysis of Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**

Nanoparticles have become part of our everyday lives. Promising method for analysis, determination and characterization of inorganic nanoparticles is inductively coupled plasma mass spectrometry in single particle mode (sp-ICP-MS). This paper describes effects of ICP power, introduction system parameters, nanoparticle size and number concentration on nanoparticle transport efficiency and signal intensity in sp-ICP-MS. In the last part of this paper problems with stability of silver nanoparticles in deionized water are described and possible stabilizer is studied.

Keywords: inductively coupled plasma mass spectrometry, nanoparticles

TESTOVANIE VPLYVU KVANTOVÝCH BODIEK CdS NA POŠKODENIE DNA PRI UV OŽIARENÍ POMOCOU DNA BIOSENZORA

KATARÍNA NEMČEKOVÁ, JANA
BLAŠKOVIČOVÁ a JÁN LABUDA

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita
v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slo-
venská Republika
nemcekova.katarina@hotmail.com

Kľúčové slová: kvantové bodky CdS, degradácia DNA,
UV žiarenie, biosenzor, voltampérometria

Úvod

Kvantové bodky predstavujú polovodičové nanokryš-
tály s veľkosťou 2–100 nm a priemerom 2–20 nm (10–50
atómov). Majú jedinečné fyzikálne a chemické vlastnosti,
medzi ktoré patria špecifické optické a elektrické vlastnos-
ti. Dôležitou vlastnosťou je ich schopnosť fluorescencie,
ktorej vlnová dĺžka emitovaného žiarenia je úmerná veľko-
sti kvantových bodiek¹. Nanočastice nachádzajú čoraz
väčšie uplatnenie v oblasti biomedicíny (diagnostické či-
nidlá), v kozmetických výrobkoch, potravinárskom prie-
mysle, inžinierskych výrobách a inde². Charakterizuje ich
prítomnosť malého počtu voľných elektrónov, ktoré môžu
interagovať s kyslíkom a inými molekulami. V aeróbnom
prostredí nanočastice iniciované žiarením prenášajú ener-
giu na molekulový kyslík za vzniku singletového kyslíka,
ktorý následne produkuje reaktívne formy (ROS) ako su-
peroxidový anión, hydroxylový radikál a peroxid vodíka.

Odpoveď biomolekúl na zvýšenú prítomnosť týchto
reaktívnych foriem sa považuje za jeden z kľúčových me-
chanizmov prejavu ich toxicity³. Medzi najviac ohrozené
látky patrí molekula DNA, ktorá podlieha nevratným oxi-
dačným zmenám v jej štruktúre. Na hodnotenie miery po-
škodenia DNA sa využívajú viaceré metódy ako kométové
skúšky, gélová elektroforéza na agarózovom géli, plynová
alebo kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou
spektrometriou (GC-MS, LC-MS)^{4,5}. Jednou z efektívnych
technik testovania toxicity kvantových bodiek je detekcia
pomocou biosenzora s biozložkou na báze DNA, ktorý
predstavuje vhodný a pomerne lacný nástroj na skúmanie
DNA imobilizovanej na elektróde⁶. Táto štúdia skúma
účink kvantových bodiek CdS rôznej veľkosti a intenzity
fluorescencie na integritu dvojvláknovej DNA zo spermií
lososa pri vystavení UV-C žiareniu.

Experimentálna časť

Zásobný roztok dvojvláknovej DNA zo spermií loso-
sa (Sigma-Aldrich, Nemecko) s koncentráciou 0,1 a 0,2
mg ml⁻¹ sa pripravil v 0,1 mol dm⁻³ fosfátovom tlmivom
roztoku (PB) obsahujúcom 10 mmol dm⁻³ KCl s hodnotou
pH 7,4 a uskladňoval sa pri 4 °C. Experiment sa vykonal
pomocou elektrochemického biosenzora na báze DNA
imobilizovanej na elektróde zo sklovitého uhlíka. Povrch
elektródy sa najskôr vyčistil mechanicky použitím 0,3 μm
pasty oxidu hlinitého a následne elektrochemicky apliko-
vaním potenciálu +1,6 V na 300 s v PB (pH 7,4) a skenu
cyklickej voltampérometrie (CV) v potenciálovom rozsahu
–0,8 V až 1,0 V v PB roztoku 1 mmol dm⁻³ [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.
Povrch elektródy sa modifikoval vrstvou dsDNA pomocou
potenciálom stimulovanej depozície DNA pri 0,5 V.

Povrch biosenzora sa na čas rôznych časových inter-
valov vystavil UV-C žiareniu vlnovej dĺžky 254 nm vo
vzdialenosti 15 cm od zdroja žiarenia a následne opláchol
ultračistou vodou. Zaznamenal sa CV redoxného indikáto-
ra 1 mmol dm⁻³ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} v PB v rozsahu –0,15 V až
+0,55 V pri rýchlosti skenu 0,1 mV s⁻¹ a potenciálovom
kroku 2 mV a následne v prostredí PB signály zvyškov báz
DNA pomocou štvorcovovlnovej voltampérometrie
(SWV) s amplitúdou pulzu 40 mV, frekvenciou 100 Hz,
rýchlosťou skenu 1,5 V s⁻¹ a potenciálového kroku 15 mV.

Testoval sa účinok kvantových bodiek CdS rôznej
veľkosti (typ 80-1 s priemernou veľkosťou 4,0 nm, 100-1
s veľkosťou 5,5 nm a 120-1 s veľkosťou 10,5 nm) a rôznej
intenzity fluorescencie nanosením 10 μl 2 mmol dm⁻³ zá-
sobného roztoku kvantových bodiek CdS na povrch bio-
senzora a vystavením UV-C žiareniu počas zvoleného
časového intervalu. Ako analytický signál sa použil prúd
CV píku redoxného indikačného systému s [Fe(CN)₆]^{3-/4-}
a prúd SWV píku zvyškov guanínu a adenínu.

Pre verifikáciu výsledkov sa použili skúšky technikou
„biosenzing“, pri ktorej sa zmiešalo 15 μl zásobného roz-
toku DNA s koncentráciou 0,2 mg ml⁻¹ a 15 μl PB bez a s
prítomnosťou kvantových bodiek CdS (3 μl CdS v 12 μl
PB). Takto pripravená zmes sa vystavila UV-C žiareniu na
určitý časový interval. Následne sa odobral objem 10 μl,
ktorý sa aplikoval na vopred vyčistený povrch elektródy.
Miera poškodenia DNA sa testovala za rovnakých podmie-
nok ako v prípade skúšky s biosenzorom.

Výsledky a diskusia

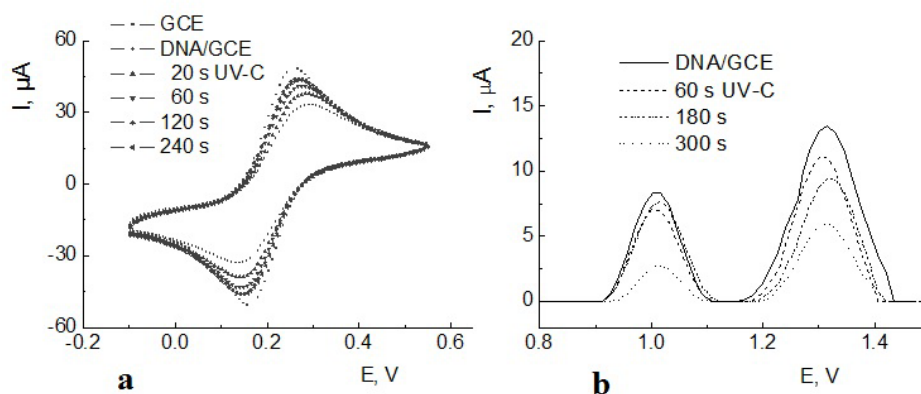
Prítomnosť DNA imobilizovanej na elektróde a jej
postupná degradácia sa sledovala odozvou redoxného indi-
kátora [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Kým adsorpcia DNA na povrch
elektródy vedie k poklesu hodnoty maximálneho prúdu
anodického píku negatívne nabitých častíc indikátora,

vplyvom UV-C žiarenia na biosenzor so zvyšovaním času expozície hodnota maximálneho prúdu anodického píku stúpa, čo naznačuje hlbokú degradáciu DNA a postupné uvoľňovanie fragmentov DNA z povrchu elektródy. Denne svetlo malo len zanedbateľný vplyv na signály DNA biosenzora bez aj s prítomnosťou kvantových bodiek CdS, a teda na štruktúru DNA. Samotné kvantové body teda výraznejšie neovplyvňujú DNA. Na druhej strane UV-C žiarenie malo istý deštruktívny účinok na DNA už bez prítomnosti kvantových bodiek CdS.

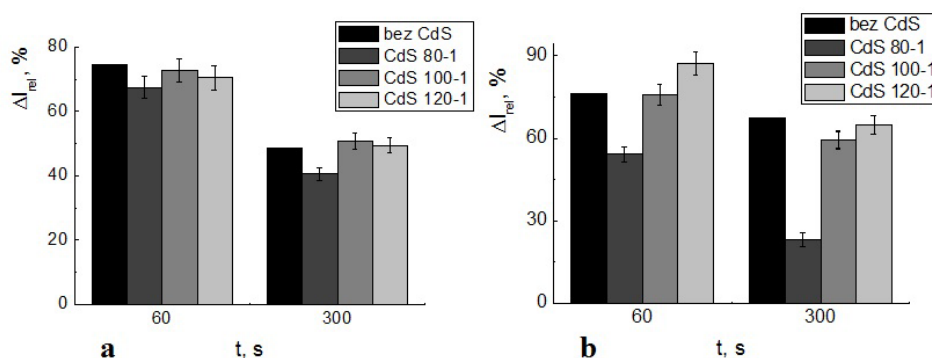
Následne sa DNA biosenzor vystavil UV-C žiareniu na určitý časový interval v prítomnosti jednotlivých typov nanočastíc CdS. Zvyšovaním času expozície dochádza k zvyšovaniu hodnoty maximálneho prúdu anodického CV píku indikátora a rovnako SWV záznamy indikujú pokles signálov báz pri dlhšom čase ožarovania čo znamená, že dochádza k hlbokšej degradácii DNA a postupnému uvoľ-

ňovaní jednotlivých fragmentov z povrchu elektródy (obr. 1).

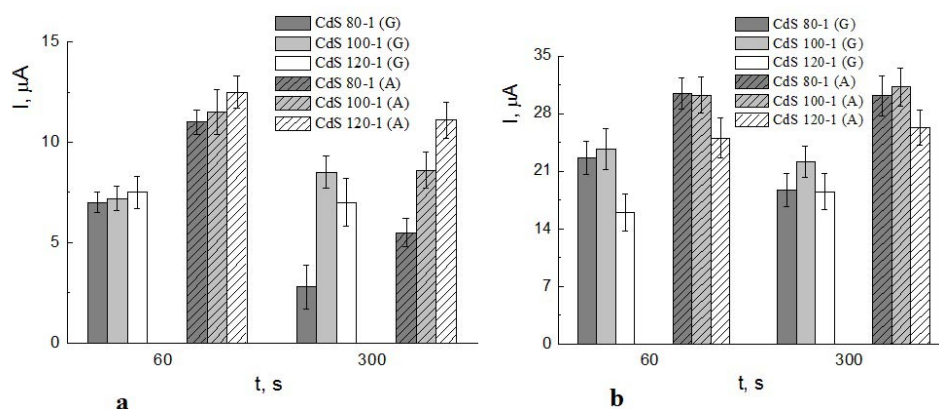
Pre porovnanie citlivosti DNA voči takto vyvolanej štruktúrnej zmene sa použila aj metóda biosenzingu, ktorá spočívala v UV-C ožarovaní zmesi DNA a QDs CdS v roztoku, následnej imobilizácii ostávajúcich zvyškov DNA na povrchu elektródy a vykonaní elektrochemických meraní rovnako ako v prípade DNA biosenzora. Z nameraných CV údajov pre obe techniky, biosenzor a biosenzingu, sa zostrojili stĺpcové diagramy predstavujúce podiel zachovanej DNA bez a v prítomnosti jednotlivých kvantových bodiek CdS (obr. 2). Je zrejmé, že tento podiel zachovanej DNA klesá výraznejšie v prítomnosti kvantových bodiek ako bez nich, teda poškodenie DNA indukované vplyvom UV-C žiarenia je výrazne väčšie. Najväčší účinok na degradáciu DNA majú kvantové body s najvyššou intenzitou fluorescence, typ CdS 80-1. Stĺpcové



Obr. 1. Cyklický voltampérogam v $1.10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pred a po UV-C ožiarení počas 20 s, 60 s, 120 s a 240 s (a) a SW voltampérogam dusíkatých báz guanínu a adenínu pred a po UV-C ožiarení počas 60 s, 180 s a 300 s získaných pre DNA/GCE biosenzor v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ PB (b), bez prítomnosti kvantových bodiek



Obr. 2. Porovnanie podielu zachovanej DNA na základe CV meraní signálu indikátora $1 \text{ mmol dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v PB po vystavení DNA UV-C žiareniu bez a v prítomnosti jednotlivých typov kvantových bodiek CdS pre biosenzor (a) a pre biosenzingu (b)



Obr. 3. Porovnanie SWV signálov zvyškov báz guanínu (G) a adenínu (A) po ožiarení UV-C DNA v prítomnosti jednotlivých typov kvantových bodiek CdS pre biosenzor (a) a pre biosenzing (b)

vé diagramy pre SWV prúdy zvyškov báz guanínu a adenínu (obr. 3) rovnako potvrdili najvýraznejší pokles DNA v prítomnosti kvantových bodiek typu CdS 80-1.

Na verifikáciu výsledkov získaných pomocou elektrochemických biosenzorov sa vykonala gélová elektroforéza na agarózovom géli. Získané výsledky poukazujú na výrazné poškodenie dsDNA vplyvom UV-C žiarenia v prítomnosti kvantových bodiek CdS, čo sa prejavuje postupným znižovaním intenzity jednotlivých bandov DNA. V prítomnosti kvantových bodiek typu 80-1 dochádza k degradácii DNA už po 60 s UV-C žiarenia, no najvýraznejší vplyv sa prejaví po 40 min, kedy intenzita bandu je takmer nulová.

Záver

Slnéčné žiarenie zapríčiňuje poškodenie DNA a nepriamo iniciuje mechanizmy, ktoré vyvolávajú oxidačné zmeny v jej štruktúre. Táto práca potvrdila účinnú možnosť sledovania takého poškodenia a vplyvu kvantových bodiek na UV-C indukované poškodenie DNA, a to použitím elektrochemických meraní s biosenzorom. Experiment sa vykonal použitím elektrochemického biosenzora na báze dsDNA, na povrchu ktorého sa situovala vrstva jednotlivých typov kvantových bodiek CdS. Miera poškodenia DNA sa analyzovala využitím elektrochemických metód: cyklickej voltampérometrie (CV) a square-wave voltampérometrie (SWV).

Testoval sa vplyv kvantových bodiek CdS s rôznou veľkosťou a rôznou hodnotou intenzity fluorescence pri vystavení do UV-C žiarenia vlnovej dĺžky 254 nm. Na základe vykonaných experimentov sa potvrdilo, že na degradáciu DNA vplyva prítomnosť kvantových bodiek a pôsobenie UV-C žiarenia vlnovej dĺžky blízkej absorpč-

nému maximu molekuly DNA. Príspevok kvantových bodiek na poškodenie DNA závisí od ich veľkosti, koncentrácie, intenzity fluorescence a času expozície UV-C žiarenia. Zistilo sa, že so zvyšujúcou sa hodnotou intenzity fluorescence kvantových bodiek CdS, sa zvyšuje štruktúrne poškodenie DNA, teda nanočastice CdS typu 80-1 s najmenším priemerom vykazujúce najvyššie hodnoty fluorescence sa podieľajú na degradácii DNA v najväčšej miere. Výsledky vedú k záveru, že použitie elektrochemického biosenzora predstavuje vhodnú metódu na skúmanie štruktúrnych zmien DNA a s ním súvisiacich vlastností nanočastíc.

Tento príspevok vznikol s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0797-11 a agentúry VEGA 1/0489/16.

LITERATÚRA

1. Etkimov A. I., Onushchenko A. A.: *JETP Lett.* 6, 363 (1981).
2. Medintz I. L., Uyeda T. H., Goldman E. R., Mattoussi H.: *Nature Mater.* 4, 435 (2005).
3. Hlavata L., Benikova K., Vyskocil V., Labuda J.: *Electrochim. Acta* 71, 134 (2012).
4. Petersen E. J., Nelson B. C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 613 (2012).
5. Labuda J., Brett A. M. O., Eytugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M.: *Pure Appl. Chem.* 82, 1161 (2010).
6. Kreysa G., Ota K., Savinell R. F. (ed.): *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*. Springer Nature, New York 2014.

K. Nemčková, J. Blaškovičová, and J. Labuda
(*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic*): **Investigation of the CdS Quantum Dot Influence on the Degradation of the DNA Exposed to UV Irradiation Using DNA Biosensor**

Nanotechnology represents an ensemble of materials and methods considering in nano dimensions. One of these materials are the quantum dots CdS which have various

specific chemical and physical properties. Despite their many positives they indicate a potential risk of toxicity caused by the oxidation DNA degradation under the UV irradiation. As the criterion of the DNA degradation analytical signals of a biosensor containing the DNA biocomponent were used. Biosensors represent an appropriate and relatively cheap toxicity testing tools for the nanoworld.

Keywords: CdS quantum dots, DNA degradation, UV radiation, biosensor, voltammetry

JEDNODUCHÁ A RÝCHLA METÓDA DISPERZNEJ MIKROEXTRAKCIE KVAPALINA-KVAPALINA NA ANALÝZU VZORIEK S OBSAHOM ETANOLU

DUŠAN PALACKA, ALEXANDRA SURANOVÁ,
SILVIA ZICHOVÁ a SVETLANA HROUZKOVÁ

*Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovenská republika
svetlana.hrouzkova@stuba.sk*

Kľúčové slová: disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina, plynová chromatografia, validácia, maticové vplyvy

Úvod

Konvenčné metódy úpravy vzorky sú spravidla zdĺhavé, časovo náročné a používajú veľké množstvá organických rozpúšťadiel. Uvedenie miniaturizovaných metód úpravy vzorky, ktoré používajú podstatne menšie objemy organických rozpúšťadiel, čiastočne odstraňuje spomínané nevýhody¹. V roku 2006 bola publikovaná disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (DLLME), ktorá sa vyvinula modifikáciou miniaturizovanej extrakcie kvapalina-kvapalina (LLE). Pri tejto technike sa relatívne malé množstvo extrakčného rozpúšťadla nemiešateľného s vodou zmieša s rozpúšťadlom, ktoré je s vodou miešateľné. Táto zmes sa rýchlo vstrekne do skúmanej vodnej vzorky, následkom čoho sa vytvoria mikrokvapky, do ktorých sa extrahujú cieľové analyty². DLLME sa aplikovala v kombinácii s QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) na stanovenie rezíduí pesticídov v pomarančoch³ a vo vzorkách s vysokým obsahom tukov⁴.

Cieľom práce je vývoj a validácia metódy s podrobným skúmaním maticových vplyvov pri analýze rezíduí pesticídov v slivovici s obsahom etanolu 40 %. Na analýzu sa použila DLLME ako technika na extrakciu vzoriek s určitým obsahom alkoholu v kombinácii s rýchlou plynovou chromatografiou (GC) a hmotnostnou spektrometriou (MS).

Experimentálna časť

Plynový chromatograf 6890N s automatickým dávkovačom 7683B a injektorom s programovanou teplotou vyparovania (PTV) pracoval v „solvent vent“ móde. Kapilárna kolóna s rozmermi 15 m × 0,15 mm I.D. (vnútorný priemer) × 0,15 µm hrúbkou filmu stacionárnej fázy

CP-Sil 8 CB (5 % difenyl a 95 % dimetylsiloxán). GC separácia prebehla za podmienok s programovateľnou teplotou. Ako nosný plyn sa použilo hélium.

Plynový chromatograf bol spojený s kvadrupólovým hmotnostným detektorom s elektrónovou ionizáciou. Hmotnostný spektrometer pracoval v dvoch módoch: „full scan“ (FS) a „selected ion monitoring“ (SIM). V SIM móde boli vybrané najmenej tri špecifické ióny pre každý pesticíd a následne boli rozdelené do skupín. Retenčné časy a snímané fragmentačné ióny sú uvedené v tab. I.

Na prípravu roztokov sa použili rozpúšťadlá etanol, tetrachlórétán a voda. Vnútorné štandardy a štandardy pesticídov mali minimálnu čistotu 96 %. Jednotlivé zásobné roztoky pesticídov boli pripravené v etanole alebo toluéne (difenyl, hexachlórbenzén, *p,p*-DDT) a zásobný zmesný roztok pesticídov v etanole a následne bol použitý na fortifikáciu vzoriek. Pripravené modelové a fortifikované reálne vzorky boli extrahované DLLME. Ako extrakčné rozpúšťadlo sa použil tetrachlórétán.

Výsledky a diskusia

Metóda analýzy rezíduí pesticídov DLLME GC-MS sa validovala, zistili sa parametre: presnosť, správnosť, linearita, medze detekcie (LOD), medze stanovenia (LOQ) a najnižšie kalibračné hladiny (LCL).

Správnosť metódy vyjadrená výťažnosťou sa určovala z analýzy modelových vzoriek fortifikovaných pred extrakciou a fortifikovaných extraktov vzoriek bez obsahu pesticídov, reálnych vzoriek fortifikovaných pred extrakciou a maticou značených štandardov na koncentračných hladinách 50, 100, 250 µg l⁻¹. Pre každú koncentračnú hladinu sa pripravila modelová vzorka s obsahom etanolu 35, 40, 45, 52 %. Uspokojivé hodnoty výťažností (v rozmedzí 70–120 %) sa získali pre viac ako 22 pesticídov. Metóda nebola validovaná pre hexachlórbenzén, pretože jeho výťažnosti sa pohybovali v rozmedzí 16–45 %.

Kalibrácia sa vykonala analýzou reálnych vzoriek fortifikovaných každým pesticídov na koncentračných hladinách v rozmedzí 0,05–500 µg l⁻¹. Lineárnou regresiou sa získali koeficienty determinácie (R²) v rozmedzí 0,9914 až 0,999, okrem bifentrínu (R² = 0,9883). LCL sa pohybovali v rozmedzí 0,1–10 µg l⁻¹.

Opakovateľnosť sa zisťovala analýzou 6 fortifikovaných reálnych vzoriek a je vyjadrená relatívnymi smerodajnými odchýlkami (RSD). Hodnoty RSD pesticídov sa zistili v rozmedzí 3–18 %. Podľa dokumentu SANTE by sa uspokojivé hodnoty RSD mali pohybovať pod 20 % (cit.⁵).

LOD a LOQ sa vypočítali s využitím pomeru signálu k šumu (S/N), ktorý sa získal na najnižších kalibračných hla-

Tabuľka I

Zoznam pesticídov s retenčným časom a fragmentačnými iónmi; (hrubovyznačené – kvantifikačné ióny)

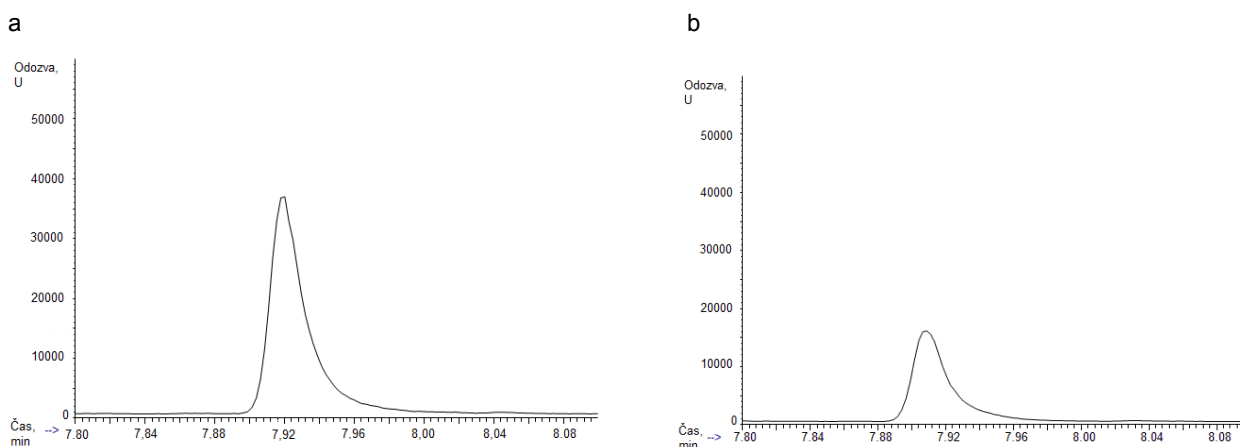
Číslo	Pesticíd	Retenčný čas [min]		Ióny [<i>m/z</i>]	
1	Difenyl	3,77	154	153	152
2	<i>o</i> -fenyľfenol	4,35	170	169	141
3	Difenyľamín	4,82	169	168	167
4	Trifluralín	4,88	306	264	307
5	Hexachlórobenzén	5,21	284	286	282
6	Diazinón	5,45	179	304	276
7	Lindán	5,47	181	183	109
8	Pirimikarb	5,70	166	72	238
9	Dimetachlór	5,88	134	179	210
10	Acetochlór	5,89	146	162	223
11	Chlórpyrifos-metyl	5,93	286	288	125
12	Vinclozolín	5,95	212	187	124
13	Alachlór	5,98	160	188	237
14	Paration-metyl	5,99	262	125	109
15	Heptachlór (I.S.)	6,08	272	100	274
16	Pirimifos-metyl	6,14	290	276	305
17	Fenitrothion	6,20	277	125	260
18	Malation	6,24	173	127	93
19	Chlórpyrifos	6,32	197	314	316
20	Procymidón	6,82	283	285	287
21	Bromofos-etyl	6,88	359	357	303
22	Flusilazol	7,27	233	315	206
23	Myklobutanil	7,27	179	245	288
24	Cyprokonazol	7,39	222	224	139
25	<i>o,p</i> -DDT	7,62	235	237	105
26	<i>p,p</i> -DDT	7,92	235	237	105
27	Tebukonazol	8,08	250	125	127
28	Trifenyľfosfát (I.S.)	8,08	326	325	215
29	Bifentrin	8,24	181	165	166
30	Mirex	8,87	272	274	270
31	Fenarimol	8,87	139	107	219
32	Prochloraz	8,89	308	310	266

dinách. Pre väčšinu pesticídov sa LOD pohybovali v rozmedzí 0,02–2,83 $\mu\text{g l}^{-1}$ a hodnoty LOQ 0,06 až 9,43 $\mu\text{g l}^{-1}$. Najnižšia hodnota LOD a LOQ sa získala pre trifluralín, najvyššie hodnoty vykazoval fenitrothion.

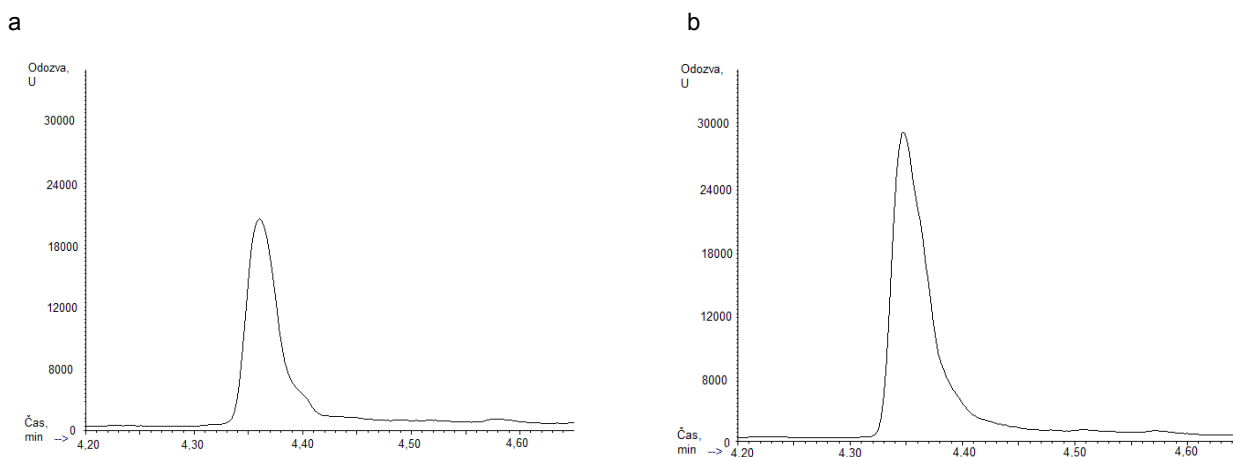
Na vyhodnotenie matricových vplyvov sa vypočítal matricový faktor (MF) pre každý pesticíd na základe analýzy modelovej vzorky a reálnej vzorky fortifikovanej pesticídmi na koncentračnej hladine 250 $\mu\text{g l}^{-1}$. Minimálne matricové vplyvy sa pozorovali pre 20 pesticídov s hodnotou matricového faktora od –20 % do 20 %. Negatívny

vplyv matrice sa pozoroval pre difenyl, *p,p*-DDT a fenarimol v MF od –37,3 do –53,4 %. Pozitívny matricový efekt s MF od 29,2 do 215,4 % sa pozoroval pre 9 pesticídov. Pre ilustráciu sú pozitívne a negatívne vplyvy matrice zobrazené na obr. 1 a 2.

Validovaná metóda sa použila na analýzu reziduí pesticídov v reálnej vzorke, kde sa pesticídy nad medzou stanovenia nepozorovali.



Obr. 1. Negatívny matricový efekt pre *p,p*-DDT, koncentračná hladina $250 \mu\text{g l}^{-1}$; a – modelová vzorka (40 % etanolu), b – reálna fortifikovaná vzorka



Obr. 2. Pozitívny matricový efekt pre *o*-fenyľfenol; koncentrácia $250 \mu\text{g l}^{-1}$; a – modelová vzorka (40 % etanolu), b – reálna fortifikovaná vzorka

Záver

Predložená štúdia sa zamerala na validáciu metódy na analýzu rezíduí pesticídov v modelových vzorkách s obsahom etanolu 35, 40, 45 a 52 % a v reálnej vzorke slivovice (40 % etanolu) s využitím DLLME v kombinácii s GC-MS. Ako extrakčné rozpúšťadlo sa použil tetrachlórretán. Získali sa uspokojivé validačné parametre ako je linearita, výťažnosť, presnosť, medze detekcie a stanovenia. Pri štúdiu matricových vplyvov sa zistil vplyv matrice na stanovenie pesticídov, ktorý sa navrhuje eliminovať použitím matricou značenými štandardmi. Metóda bola aplikovaná na analýzu reálnych vzoriek.

Autori si dovoľujú poďakovať Ústavu analytickej chémie, FCHPT STU v Bratislave za umožnenie realizácie výskumu. SZ ďakuje za finančnú podporu STU v Bratislave v rámci schémy grantov na podporu excelentných tímov mladých výskumníkov.

LITERATÚRA

1. Andraščíková M., Matisová E., Hrouzková S.: Sep. Purif. Reviews 44, 1 (2015).
2. Ramos L.: J. Chromatogr. A 1221, 84 (2012).
3. Andraščíková M., Hrouzková S., Cunha S. C.: Food Addit. Contam. A 30, 286 (2013).

4. Andraščíková M., Hrouzková S.: *Food Anal. Methods* 9, 2182 (2016).
5. SANTE-Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *11945*, (2015).

D. Palacka, A. Suranová, S. Zichová, and S. Hrouzková (*The Slovak University of Technology, Faculty of Food and Chemical Technology, Bratislava*): **Simple and Rapid Method Utilizing Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Ethanol Content Samples Analysis**

Nowadays, a trend in pesticide residues analysis is utilization of minimized sample preparation methods, which use significantly smaller volume of organic solvent.

The dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME), as a modification of the miniaturised liquid-liquid extraction (LLE), was successfully applied for determination of pesticide residues in alcohol content samples. The development and validation of the method including detailed matrix effects evaluation of the analysis of pesticides residues in the Slovak alcoholic beverage plum brandy with content of ethanol 40 % was performed. The method was validated, providing satisfactory linearity, recovery and precision. Furthermore, it was resulted, that matrix has strong influence to the quantification of pesticides and it can be limited by the use of matrix-matched standards. The developed methodology was applied to the analysis of real samples for testing the applicability of the method.

Keywords: dispersive liquid-liquid microextraction, gas chromatography, matrix effects, validation

VÝVOJ, OPTIMALIZACE A VALIDACE ANALYTICKÉ METODY NA STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ VE VODĚ POMOCÍ HPLC-PDA

PAVEL PILÍK^a, DAVID KAHOUN^a
a IVO ŠAFAŘÍK^b

^a Ústav chemie a biochemie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^b Oddělení nanobiotechnologie, Biologické centrum AV ČR., v.v.i., ÚPB, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice
pavelpilik@email.cz

Klíčová slova: polycyklické aromatické uhlovodíky, HPLC, extrakce na magnetické pevné fázi

Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou aromatické uhlovodíky tvořené dvěma a více kondenzovanými aromatickými jádry¹. Vyskytují se v atmosféře, vodě i půdě². Vznikají při nedokonalém spalování a pyrolyze fosilních paliv³. Polycyklické aromatické uhlovodíky patří mezi perzistentní organické látky, mají schopnost bioakumulace a mohou se vázat na pevné částice⁴. Mají karcinogenní a mutagenní účinky⁴, a proto je jejich výzkumu a monitoringu v životním prostředí věnována stále velká pozornost. Americká agentura na ochranu životního prostředí (US EPA) sestavila pro účely monitoringu seznam 16 prioritních PAU⁵, který obsahuje: naftalen, acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthren, pyren, benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b]fluoranthren, benzo[k]fluoranthren, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]anthracen, benzo[g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]pyren⁶. Rozpustnost těchto PAU ve vodě se pohybuje od 32 mg l⁻¹ (naftalen) do 0,00026 mg l⁻¹ (benzo[g,h,i]perylene)⁷.

Cílem této práce byl vývoj a optimalizace metody na stanovení PAU vysokoučinnou kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou detekcí s diodovým polem (HPLC-PDA), provedení validace metody a její použití pro testování sorpce PAU z vody využívající extrakci na magnetické pevné fázi (MSPE – Magnetic solid phase extraction)⁸.

Experimentální část

Analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu Thermo Scientific UltiMate 3000 (USA) s detekcí s diodovým polem. Na ovládání chromatografu a zpracování chromatogramů byl použit program Chromeleon

7.2.1.5537, validace metody byla provedena v programech EffiValidation 3.0 a Microsoft Excel 2013. Byly použity dvě mobilní fáze – mobilní fáze A, která byla složena z vody a acetonitrilu v poměru 1:1 (v/v) a mobilní fáze B, kterou tvořil pouze acetonitril. Chromatografická separace byla provedena na chromatografické koloně Waters PAH C18 o rozměrech 250 × 3,0 mm a velikosti částic náplně 5 μm. Objemy kapalných látek byly odměřovány automatickou pipetou BIOHIT PROLINE o objemu 1000 μl od firmy Sartorius (Německo) a skleněnými stříkačkami o objemech 5; 10; 25; 50; 100; 250 a 500 μl od firmy Hamilton (USA). Deionizovaná voda byla připravována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF od firmy Thermo Scientific (USA). Extrakce byla prováděna na horizontální třepače ORBIT 1000 od firmy Labnet (USA). Jako magnetický adsorbent byly použity mikročástice magnetického chitosanu (přípraven mikrovlnnou syntézou⁹) s kovalentně navázaným reaktivním barvivem Ostazinový tyrkys V-G (cit.¹⁰). Extrakce cílových analytů probíhala obdobně jak bylo popsáno dříve¹¹; po adsorpci byl magnetický materiál fixován pomocí silného NdFeB magnetu VMM7-N42 s remanencí 1,3 T od firmy MAGSY (Česká republika).

Během práce byly použity následující chemikálie: standard PAU MIX-9 od firmy Dr. Ehrenstorfer (Německo) o koncentraci 100 mg l⁻¹ obsahující 16 prioritních PAU podle US EPA, dále byl použit 9,10-difenylnanthracen od firmy Sigma-Aldrich (Německo), acetonitril a methanol gradient grade pro kapalinovou chromatografii od firmy Merck (Německo) a 28–30% vodný roztok hydroxidu amonného od téže firmy.

Výsledky a diskuse

Během optimalizace metody byly hledány takové podmínky analýzy, které umožní separaci PAU s dostatečným rozlišením v co nejkratším čase a s co nejnižší mezí detekce. Pro první analýzy, které byly provedeny za účelem identifikace píků sloučenin standardu a vnitřního standardu, byl použit vzorek obsahující 16 PAU podle US EPA a vnitřní standard, kterým byl 9,10-difenylnanthracen. Podmínky separace byly nastaveny podle doporučení výrobce kolony: teplota 30 °C, průtok mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹, objem nástřiku 10 μl, vlnová délka spektrofotometrické detekce 254 nm. Po provedení prvních analýz byla v retenčním čase 23 min zjištěna částečná koeluce vnitřního standardu s chrysenem. Byla proto navržena změna teploty z původních 30 °C na 25 °C a poté na 35 °C. Při teplotě 25 °C docházelo ke koeluci vnitřního standardu s benzo[a]anthracenem, ale při 35 °C již vnitřní standard nekoeluoval s žádnou sloučeninou. Za účelem zkrácení doby analýzy byla optimalizována rychlost průtoku mobilní fáze s ohledem na rozlišení kritického páru

benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren. Byly testovány hodnoty 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a 1,0 ml min⁻¹. V rámci optimalizace tohoto parametru bylo hodnoceno, zda nedochází ke zhoršení rozlišení piků, které musí mít minimální hodnotu 1,50. Ani při nejvyšším testovaném průtoku mobilní fáze (1 ml min⁻¹) však nedošlo k poklesu rozlišení kritického páru pod tuto hodnotu. Dalším optimalizovaným parametrem byl objem nástřiku vzorku. Zde byly testovány hodnoty 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 a 100 μ l. Bylo zjišťováno, zda nedochází ke zhoršení faktoru symetrie píku sloučeniny (pyren) vykazující nejhorší hodnotu tohoto parametru. I při hodnotě 100 μ l se však hodnota faktoru symetrie pyrenu nacházela v přijatelném rozmezí 0,8–1,5, konkrétně bylo dosaženo hodnoty 1,23. Jako optimální byla z důvodu robustnosti zvolena hodnota 90 μ l, protože 100 μ l je limitní objem autosampleru. Na závěr byl za účelem zkrácení doby analýzy při dostatečném rozlišení kritického páru benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren testován vliv doby kondicionace kolony. Z testovaných hodnot 2,5; 4,5 a 25 min byla zvolena jako optimální doba kondicionace 4,5 min. Na závěr byla optimalizována vlnová délka detekce jednotlivých sloučenin. Pro každý ze 17 analytů byla vybrána specifická vlnová délka podle jeho absorpčního maxima. Vzhledem k možnostem PDA detektoru, který umožňuje simultánní záznam pouze 8 vlnových délek, byly zvoleny kompromisní hodnoty vlnových délek, které jsou společné pro několik analytů.

Po optimalizaci metody byla provedena její validace. Pro validaci byly použity kalibrační roztoky o koncentracích 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 a 500 μ g l⁻¹. Každá koncentrační úroveň byla analyzována ve třech nezávislých opakováních. Validačními parametry byly linearita, rozsah, přesnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti. Linearita byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu a QC koeficientu, přesnost byla vyjádřena jako opakovatelnost a mezioperační přesnost pomocí relativní směrodatné odchylky na koncentračních úrovních 2,5; 25 a 250 μ g l⁻¹, správnost byla vyjádřena jako výtěžnost na stejných koncentračních úrovních jako přesnost. Mez de-

tekce byla vyhodnocena jako trojnásobek poměru výšky píku k šumu, mez stanovitelnosti jako desetinásobek poměru výšky píku k šumu. Bylo zjištěno, že optimální koncentrační rozsah činí 2,5–250 μ g l⁻¹. V případě koncentrační úrovně 1 μ g l⁻¹ bylo překročeno kritérium přijatelnosti správnosti u acenaftylenu, fluorenu, fenantrenu, benzo[b]-fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu. Odezva na koncentrační úrovni 500 μ g l⁻¹ pak negativně ovlivňovala správnost na nejnižších koncentračních úrovních. V rozsahu 2,5–250 μ g l⁻¹ však všechny analyty vyhovovaly kritériím přijatelnosti podle *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*¹².

Optimalizovaná a validovaná metoda byla použita na hodnocení extrakce PAU z vody pomocí extrakce na magnetické pevné fázi, využívající magnetický chitosan s kovalentně navázaným ftalocyaninem mědi (Ostazinový tyrkys V-G) jako adsorbent. Uvnitř porézní polymerní struktury chitosanových mikročástic jsou uzavřeny nano- a mikročástice magnetických oxidů železa⁹. Ze zásobní lahve byly odpipetovány 2 ml suspenze magnetického sorbentu a 2 ml destilované vody do vialky o objemu 4 ml a tato směs byla ponechána usadit do druhého dne. Poté byl poměr sorbent:supernatant upraven na hodnotu 1:3. Dále bylo do čtyř srdcovitých baněk se zábrusem nadávkováno 100 ml vody, 500 μ l vnitřního standardu o koncentraci 50 mg l⁻¹, 250 μ l standardu PAU o koncentraci 100 mg l⁻¹ a 200 μ l suspenze magnetického sorbentu. Extrakce byla provedena za stálého míchání po dobu 480 min a poté byl sorbent odseparován pomocí silného permanentního magnetu. Sorpce analytů na magnetický sorbent byla vyhodnocena jako procentuální vyjádření plochy píku ve 480. minutě oproti ploše píku v 0. minutě (těsně před přidávkem magnetického sorbentu). Výsledky jsou uvedeny v tab. II. Analýzou slepého vzorku bylo prokázáno, že magnetický sorbent je ve vodném prostředí dostatečně stabilní a že v průběhu prací nedošlo k jakékoli kontaminaci.

Z tab. II vyplývá, že úplně sorbován byl pouze vnitřní standard (9,10-difenylnanthracen). Naopak naftalen, acenaftylen, acenaften a fluoren nebyly sorbovány téměř vůbec.

Tabulka I
Přehled validačních parametrů a jejich hodnot

Validační parametr	Hodnocená veličina		Kritérium přijatelnosti	Rozsah výsledných hodnot
Linearita	Korelační koeficient		$\geq 0,99000$	0,99998–1,00000
	QC koeficient		$\leq 5,00 \%$	0,40–0,93 %
Přesnost	RSD	2,5 μ g l ⁻¹	$\leq 30 \%$	0,33–7,3 %
		25 μ g l ⁻¹	$\leq 21 \%$	0,06–1,2 %
		250 μ g l ⁻¹	$\leq 15 \%$	0,20–0,44 %
Správnost	Výtěžnost	2,5 μ g l ⁻¹	40–120 %	85–118 %
		25 μ g l ⁻¹	60–115 %	99–102 %
		250 μ g l ⁻¹	80–110 %	101–102 %
Mez detekce	3 \times (S/N)		-----	0,22–0,82 μ g l ⁻¹
Mez stanovitelnosti	10 \times (S/N)		-----	0,68–2,5 μ g l ⁻¹

Tabulka II
Pokles plochy píku po 480 minutové extrakci

Analyt	Plocha píku ve 480. minutě [% původní plochy]	Analyt	Plocha píku ve 480. minutě [% původní plochy]
Naftalen	97	Chrysen	89
Acenaftylen	95	Vnitřní standard	0
Acenaften	96	Benzo[b]fluoranthen	46
Fluoren	95	Benzo[k]fluoranthen	83
Fenanthren	87	Benzo[a]pyren	71
Anthracen	61	Dibenzo[a,h]anthracen	91
Fluoranthen	59	Benzo[g,h,i]perylene	87
Pyren	48	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	63
Benzo[a]anthracen	68	–	–

Tato skutečnost však byla očekávaná, neboť barvivo založené na ftalocyaninu mědi sorbuje sloučeniny se třemi a více aromatickými jádry¹³. Testovaný magnetický sorbent má tedy shodné sorpční vlastnosti jako barvivo samotné, což prokazuje vhodnost podmínek procesu jeho přípravy. Kvůli velice rozdílné sorpci jednotlivých analytů a úplné sorpci vnitřního standardu však nelze tento magnetický sorbent za těchto podmínek použít pro kvantitativní stanovení všech 16 testovaných PAU ani nelze použít pouze 1 společný vnitřní standard. Sorbent by mohl být použit pouze pro stanovení vybraných PAU, které vykazují dostatečnou sorpci, což však vyžaduje provedení důkladné optimalizace extrakčního postupu, zejména množství vzorku, množství sorbentu, volbu vhodného/vhodných vnitřních standardů a hodnocení vlivu matrice. Další oblasti použití by mohly být nalezeny např. v oblasti dekontaminace vod obsahujících PAU se třemi a více jádry.

LITERATURA

- Dost K., Ideli C.: *Food Chem.* 133, 193 (2012).
- Fatemi M. H., Hadjmohammadi M. R., Shakeri P., Biparva P.: *J. Sep. Sci.* 35, 86 (2012).
- Oluseyi T., Olayinka K., Alo B., Smith R. M.: *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 5 (7), 482 (2011).
- Raclavská H., Kuchařová J., Plachá D.: *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Podklady k provádění Protokolu o PRTR - Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd.* Praha 2008.
- Pissinatti R., Nunes C. M., de Souza A. G., Junqueira R. G., de Souza S. V. C.: *Food Control.* 51, 140 (2015).
- Escarrone A. L. V., Caldas S. S., Furlong E. B., Meneghetti V. L., Fagundes C. A. A., Arias J. L. O., Primel E. G.: *Food Chem.* 146, 597 (2014).
- Manoli E., Samara C.: *Trends Anal. Chem.* 18 (6), 417 (1999).
- Šafaříková M., Šafařík I.: *J. Magn. Magn. Mater.* 194, 108 (1999).
- Pospiskova K., Safarik I.: *Carbohydr. Polym.* 96, 545 (2013).
- Šafařík I.: *Water Res.* 29, 101 (1995).
- Šafařík I., Šafaříková M.: *Water Res.* 36, 196 (2002).
- AOAC INTERNATIONAL: *AOAC Official Methods of Analysis. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F.* 2012. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf, staženo 15. 7. 2015.
- Ren H., Kawagoe T., Jia H., Endo H., Kitazawa A., Goto S., Hayashi T.: *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 86, 395 (2010).

P. Pilík, D. Kahoun, and I. Šafařík (*Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice; Department of Nanobiotechnology, Biology Centre, Academy of Sciences, ISB, České Budějovice*): **Development, Optimization and Validation of Analytical Method for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using HPLC-PDA**

This paper deals with the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using HPLC-PDA. Firstly the development and optimization of the analytical method was performed. The following parameters were chosen for optimization: column temperature, wavelength of ultraviolet detection, mobile phase flow rate and injection volume. Then the method was successfully validated and applied to the evaluation of the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from water using Magnetic solid phase extraction; magnetic chitosan microparticles with immobilized reactive copper phthalocyanine dye were used as a magnetic adsorbent.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, HPLC, Magnetic solid phase extraction

MULTIPRVKOVÁ ANALÝZA NÁHRADNÍ MLÉČNÉ KOJENECKÉ VÝŽIVY

JANA VENCLOVÁ, LENKA HUSÁKOVÁ,
TEREZA ŠÍDOVÁ a IVA URBANOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta Chemicko-
technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573 HB-
D, 532 10 Pardubice
jana.venclova@student.upce.cz*

Klíčová slova: prvková analýza, kojenecká výživa, statis-
tická analýza dat, AAS, ICP-MS

Úvod

Podle údajů světové zdravotnické organizace užívá v celosvětovém měřítku náhradní mléčnou výživu více než 60 % dětí a to již ve druhém měsíci života¹. Hlavním důvodem této skutečnosti je ztráta mateřského mléka ihned po porodu nejčastěji ze stresu, který je většinou po porodu způsoben. Kojenci konzumují výrazně vyšší množství stravy na jednotku tělesné hmotnosti než dospělí lidé, proto náhradní kojenecká výživa musí splňovat požadavky nejen na dovolené množství toxických prvků a kontaminantů, ale i nutričních prvků. Za využití atomové absorpční spektrometrie (AAS) a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS) bylo ve 21 vzorcích komerčně dostupné náhradní mléčné kojenecké výživy kvantifikováno 22 prvků (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd a Li). Analyzovány byly vzorky ze všech 4 kategorií (0 – mléčná výživa pro nedonošené děti, 1 – počáteční mléčná výživa, 2 – pokračovací mléčná výživa, 3 – mléčná výživa batolat), do nichž je umělá výživa do jednoho roku dítěte klasifikována¹. Za využití vybraných nástrojů jedno- a vícerozměrné statistické analýzy dat^{2–4} bylo cílem určit statistické charakteristiky analyzovaných výběrů dat a klasifikovat jednotlivé vzorky na základě podobnosti z hlediska dosažených hodnot analytických koncentrací.

Experimentální část

Stanovení Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe bylo provedeno pomocí atomového absorpčního spektrometru GBC Avanta P (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie). Rtuť byla stanovena na spektrometru AMA 254 (Altec, Česká republika). Pro analýzu ostatních prvků byl použit TOF-ICP-MS spektrometr Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Austrálie)⁵. Pro potřeby stanovení

Hg byly vzorky analyzovány přímo, v ostatních případech byly vzorky před analýzou mineralizovány v mikrovlnném zařízení SpeedwaveTMMWS-3⁺ (Berghof, Německo)⁵. Parametry nastavení pro každou z výše uvedených metod a podrobný postup přípravy vzorku jsou uvedeny v literatuře¹, podobně jako hodnoty dosažených analytických charakteristik, dokumentujících detekční schopnost zvolených metod pro stanovení vybraných elementů, či správnost, pro jejíž potvrzení bylo použito certifikovaných referenčních materiálů mléka: NCS ZC73015 Milk Powder (China National Analysis Center for Iron and Steel) a BCR 150 – Spiked Skim Milk Powder – Trace elements (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgie). Analyzováno bylo 21 komerčně dostupných vzorků náhradní mléčné kojenecké výživy producentů: Hipp (Chorvatsko, Německo), Nutricia (ČR, Německo), Dr. Max Pharma (Francie), Nestlé (ČR, Německo, Francie, Španělsko), Hero (Velká Británie), Rossmann (Německo), DM Drogerie Markt (Německo). Naměřená data byla vyhodnocena pomocí statistického programu QC-ExpertTM 2.9 (TriloByte Statistical software, s.r.o., ČR) a Statistica 12 (StatSoft, Inc., USA).

Výsledky a diskuse

Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kojenecké stravy

Pro zajištění nevychýlených a správných odhadů klasických výběrových parametrů je zapotřebí, aby data splňovala požadované vlastnosti, mezi které patří normalita, nezávislost a homogenita^{2,3}. Jelikož bylo pomocí dostupných nástrojů exploratorní analýzy dat^{2,3} zjištěno, že se rozdělení některých ze studovaných výběrů systematicky odlišují od rozdělení normálního, provedena byla matematická transformace dat^{2,3}, která vede ke stabilizaci rozptylu a zesymetričtění rozdělení. Ačkoli robustní odhady do značné míry eliminují problémy spojené s přítomností odlehlých bodů a asymetrií v datech, nemusí být tento postup vždy korektní, jelikož robustnost spočívá v přiblížení se k přijatému modelu měření bez ohledu na jeho platnost^{2,3}. Případnou asymetrii v datech není vhodné eliminovat odstraněním odlehlých bodů, jelikož jednotlivá data představují cenné informace, jejichž ztráta by v konečném důsledku mohla vést ke zcela chybné interpretaci výsledků. Statistické charakteristiky stanovení vybraných elementů ve vzorcích kojenecké výživy vypočtené programem QC-Expert shrnuje tab. I. V tabulce jsou rovněž uvedeny údaje týkající se počtu odlehlých bodů nalezených v každém z výběrů, které indikují vzorky se statisticky významným rozdílem v koncentraci daného analytu ve srovnání s ostatními vzorky. Všechny analyzované

Tabulka I

Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn (mg kg^{-1}), Hg, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd, Li ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ve vzorcích náhradní mléčné kojenecké stravy ($n = 21$)

	Počet OB	Minimum	Maximum	Průměr	Spodní mez IS	Horní mez IS	Průměr ^a	Spodní mez IS ^a	Horní mez IS ^a	Rozptyl	Směrodatná odchylka	Medián	Šikmost	Špičatost	p (test normality) ^b
Hg	1	0,35	4,33	1,48	0,92	2,03	1,00	0,71	1,44	1,47	1,21	1,12	0,97	2,87	0,132
Mg	0	309,1	607,3	447	413,6	480,3	445,6	412,6	479,2	5372	73,3	451	0,09	2,67	0,946
Fe	0	15,4	70,6	42,7	36,9	48,5	42,4	36,7	48,3	161,7	12,7	40,9	0,13	2,89	0,923
Na	3	141,4	2498	1408	1184	1631	1410	1186	1633	241667	491,6	1398	-0,06	4,55	0,962
Ca	1	2199	8641	4853	4235	5470	4736	4167	5356	1,84E+06	1357	4788	0,73	4,37	0,253
K	3	700	5977	4465	3993	4937	4645	4250	4968	1,08E+06	1037	4578	-2,31	9,61	0,004
Zn	1	9,42	53,6	38,4	33,3	43,5	39,9	34,8	44,4	125,7	11,2	38,02	-0,69	3,44	0,284
Mo	1	59,1	462,3	164,3	122,7	206	139,6	114,7	173,4	8368,5	91,5	130,6	1,72	6,34	0,018
Co	0	14,9	33	22,9	20,6	25,3	22,5	20,2	24,9	27,2	5,21	23,4	0,18	1,78	0,866
Cu	2	853,2	5422	2983	2550	3415	2977	2546	3411	9,03E+05	950,5	3116	0,06	4,22	0,961
Cs	0	4,2	22,3	10,4	8,0	12,8	8,90	7,24	11,1	28	5,3	8,4	0,82	2,58	0,200
Sr	0	1054	4095	2187	1819	2554	2001	1726	2351	6,52E+05	807,2	1869	0,8	2,66	0,213
Rb	0	269,6	6237	2263	1585	2940	2043	1459	2722	2,22E+06	1489	1987	0,72	3,48	0,261
U	0	1,02	13,23	5,56	3,74	7,38	4,38	3,16	6,04	15,96	4,0	4,61	0,77	2,31	0,229
As	2	2,11	39,96	12,76	7,62	17,89	9,26	6,92	12,6	127,1	11,27	9,19	1,99	6,34	0,009
Se	0	15,85	176,4	112,2	94,6	129,7	116,1	98,3	132,2	1490	38,6	118,8	-0,53	3,07	0,435
Pb	0	19,76	49,4	33,83	29,2	38,44	32,9	28,6	37,7	102,4	10,12	34,94	0,132	1,5	0,917
Sb	0	9,21	21,9	12,54	10,94	14,15	11,2	10,4	12,4	12,36	3,52	11,18	1,07	3,35	0,100
La	2	2,5	22,7	6,59	4,32	8,87	4,86	3,87	6,33	24,92	4,99	5,65	1,91	6,44	0,011
Ba	1	119,5	1029	373,2	273,6	472,9	312,8	248,8	399,1	47919	218,9	311,4	1,33	4,78	0,048
Cd	1	2,99	10,4	7,81	5,91	9,71	6,91	5,66	8,51	17,4	4,17	8,13	2,14	9,05	0,007
Li	0	0,81	39	15,61	10,86	20,4	14,06	9,91	18,88	108,7	10,43	12,76	0,48	2,35	0,490

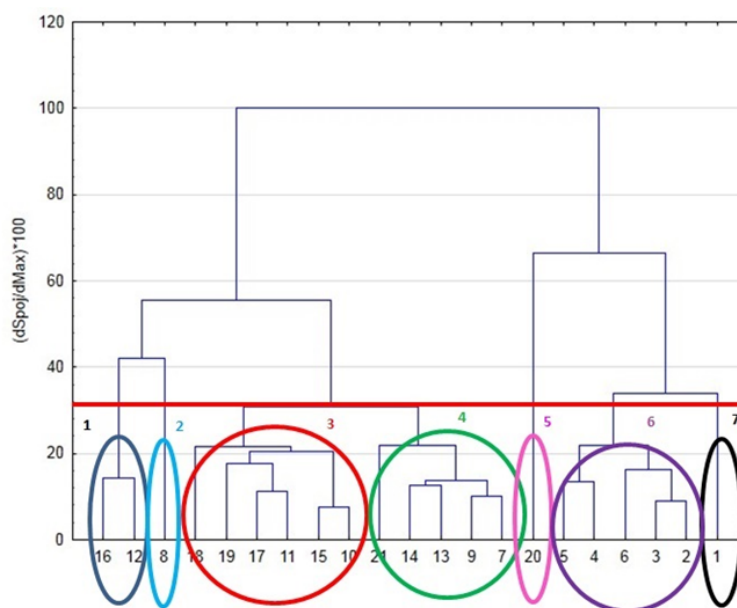
^a Odhad parametru získaný po exponencionální transformaci dat; ^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05 data nevykazují normální rozložení. OB odlehlý bod; IS interval spolehlivosti

vzorky kojenecké výživy splňovaly hodnoty obsahu vybraných prvků deklarovaných výrobcem. Žádný z prvků nepřesáhl hodnoty stanovené evropskou legislativou¹.

Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kojenecké stravy

Pro potřeby klasifikační analýzy vzorků byla použita metoda hlavních komponent, faktorová analýza a metoda shlukování¹⁻⁴. Data byla před vlastní analýzou standardizována.

Standardizací jsou odstraněny veškeré případné vlivy rozměru sledovaných znaků jednotlivých objektů. Zdrojová matice dat obsahovala 22 sloupců (znaků) a 21 řádků (objektů). V daném experimentálním uspořádání byly výsledky statistické analýzy zatíženy do značné míry šumem¹. Bylo nejprve nutné identifikovat tzv. diskriminující znaky, tj. proměnné, které vykazují nejvyšší variabilitu a pro klasifikaci přispívají nejvyšší vahou. Za využití nástrojů faktorové analýzy bylo určeno, že pro tento účel jsou vhodné zejména následující proměnné: Mg, Na, Ca,



Obr. 1. Dendrogram podobnosti vzorků náhradní mléčné kojenecké výživy

K, Zn, Mo, Co, Cs a Sb a La. Po redukci proměnných bylo s použitím 3 faktorů objasněno více než 80 % variability v datech. Podrobné výsledky analýzy jsou uvedeny v literatuře¹.

Pro klasifikaci objektů bylo dále použito metody hierarchického shlukování. Pro vlastní shlukování byla použita Wardova metoda²⁻⁴. Dendrogram podobnosti objektů je uveden na obr. 1. Z obrázku je zřejmé, že odlišné vlastnosti od skupiny analyzovaných vzorků vykazovaly zejména vzorky číslo 20, 21, 8 a 1. Vzorky číslo 20 a 1 (5. a 7. shluk) jsou vzorky kaší. Pro vzorek číslo 20 byly nalezeny výrazně vyšší koncentrace As a naopak významně nižší koncentrace Zn, Na či K. Vzorek číslo 1 rovněž vykazoval významně nižší koncentraci K (3100 mg kg⁻¹) oproti ostatním testovaným vzorkům (medián 4578 mg kg⁻¹).

Podobně jako u vzorku číslo 20, byla i ve vzorku číslo 1 nalezena výrazně vyšší koncentrace As (47 µg kg⁻¹) oproti hodnotě mediánu testované skupiny vzorků (9,19 µg kg⁻¹). V prvním shluku byly obsaženy vzorky, které spadají do 3. kategorie kojenecké výživy. Čtvrtý shluk obsahoval vzorky č. 21, 14, 13, 9, a 7, které patří do kategorie 1. Objekty ve 3. a 6. shluku, obsahují vzorky spadající do 1. i 2. kategorie náhradní mléčné výživy.

Závěr

Z výsledků statistické analýzy souboru dat koncentrací vybraných elementů v náhradní mléčné kojenecké výživě vyplývá, že z analyzovaných prvků jsou pro klasifikaci

vzorků nejvýznamnější Mg, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cs, La a Sb. Pro analýzu 21 vzorků spadajících do všech čtyř komerčně dostupných kategorií, za využití těchto diskriminujících proměnných, bylo s použitím faktorové analýzy vysvětleno více než 80 % variability v datech. Ačkoli vzorky mléčné výživy pro nedonošené děti (kategorie 0) byly od ostatních vzorků výrazně odlišeny, u ostatních kategorií tento trend nebyl již tak výrazný. Z hlediska obsahu analyzovaných prvků tak nelze jednoznačně prokázat rozdíly mezi danými kategoriemi. Tyto jsou pak spíše individuální, tedy závislé na konkrétním výrobku. Jelikož je v současné době prakticky nemožné v rámci zemí EU určit původ výrobku či suroviny pro jeho výrobu, není možné z výsledků analýzy usuzovat na možné souvislosti mezi obsahem vybraných analytů a zemí původu. Obsah prvků je navíc zřejmě dodatečně upravován výrobcí v souladu s požadavky výživy kojence.

Práce byla realizována díky finanční podpoře projektu SGSFChT 2016001 Univerzity Pardubice a projektu SVOČ-FChT 2016/2017 Univerzity Pardubice.

LITERATURA

1. Venclová J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2016.
2. Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*, vyd. 3., Karolinum, Praha 2012.
3. Meloun M., Militký J.: *Interaktivní statistická analýza dat*, vyd. 3., Karolinum, Praha 2012.

- Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza vícerozměrných dat v příkladech*, Učebnice s CD, vyd. 2., Academia, Praha 2012.
- Husáková L., Urbanová I., Šrámková J., Černohorský T., Krejčová A., Bednaříková M., Frýdová E., Nedělková I., Pilařová L.: *Food Chem.* 129, 1287 (2011).

J. Venclová, L. Husáková, T. Šídová, and I. Urbanová (*University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry*):
Elemental Analysis of Infant Formula

A statistical study of factorial, principal component and cluster analysis on the element composition of four different types of commercially available infant formula was carried out to establish the relationships between the element concentrations and, therefore, differentiate the

samples according to the type of milk. For this purpose the concentrations of 22 elements (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd and Li) in 21 infant formula samples were determined by AAS and ICP-MS. The correctness of the determination was verified on the basis of an analysis of two certified reference materials (NCS ZC73015 Milk Powder and BCR 150 – Spiked Skim Milk Powder – Trace elements). After the factorial analysis, the dimension space was reduced from 22 variables to three factors, accounting for ~ 80 % of the total variance. The representation of the dendrogram or scores makes it possible to separate samples from category 0, however for other categories this effect is less pronounced.

Keywords: elemental analysis, infant formula, statistical data analysis, AAS, ICP-MS

OBSAH

<i>S. Baluchová, K. Schwarzová-Pecková</i>	Kyselina vanilmandl'ová a homovanilová: elektroanalýza na elektródach na báze uhlíku	52
<i>B. Boráňová, M. Švidrnoch, V. Maier</i>	Toxikologická a forenzní analýza "new designer" benzodiazepinů kapilární elektroforezou s hmotnostní spektrometrií	56
<i>E. Brokešová, A. Machyňáková, K. Hroboňová</i>	Testovanie polymérov s odtlačkom molekuly kumarínov pripravených na povrchu magnetického nosiča	60
<i>P. Fagan, F. Králik, M. Kuchař, V. Setnička</i>	Studium struktury heroinu v roztoku spektroskopickými metodami	64
<i>K. Hořejší, D. Kahoun, T. Hauer</i>	Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě pomocí LC/MS	68
<i>V. Kohutová, V. Škeříková, P. Cínková, Š. Urban</i>	Srovnání citlivosti FID a MS detektorů v plynové chromatografii	73
<i>D. Lácha, P. Janoš</i>	Sorpce vybraných kationtů kovů na chelatačním sorbentu Iontosorb	77
<i>M. Loula, A. Kaňa, O. Mestek</i>	Analýza nanočástic metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	80
<i>K. Nemčeková, J. Blaškovičová, J. Labuda</i>	Testovanie vplyvu kvantových bodiek CdS na poškodenie DNA pri UV ožiarení pomocou DNA biosenzora	84
<i>D. Palacka, A. Suranová, S. Zichová, S. Hrouzková</i>	Jednoduchá a rychlá metoda disperznej mikroextrakcie kvapalina-kvapalina na analýzu vzoriek s obsahom etanolu	88
<i>P. Pilík, D. Kahoun, I. Šafařík</i>	Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků ve vodě pomocí HPLC-PDA	92
<i>J. Venclová, L. Husáková, T. Šídová, I. Urbanová</i>	Multiprvková analýza náhradní mléčné kojenecké výživy	95

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Baluchová S. 52
Blaškovičová J. 84
Boraňová B. 56
Brokešová E. 60

Cinková P. 73

Fagan P. 64

Hauer T. 68
Hořejší K. 68
Hroboňová K. 60
Hrouzková S. 88
Husáková L. 95

Janoš P. 77

Kahoun D. 92
Kahoun D. 68
Kaňa A. 80
Kohutová V. 73
Králík F. 64
Kuchař M. 64

Labuda J. 84
Lácha D. 77
Loula M. 80

Machyňáková A. 60
Maier V. 56
Mestek O. 80

Nemčerková K. 84

Palacka D. 88
Pílík P. 92

Setnička V. 64
Schwarzová-Pecková K. 52
Suranová A. 88

Šafařík I. 92
Šídová T. 95
Škeříková V. 73
Švidrnoch M. 56

Urban Š. 73
Urbanová I. 95

Venclová J. 95

Zichová S. 88

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 15 (2017), čís./no. 2 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) • evidenční číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Podešva, P. Rauch; Webové stránky: P. Zámotný • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚV-KŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2017 Czech Chemical Society Symposium Series/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.ccsss.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Molekulární námět na obálce: Vladimír Palivec • Dáno do tisku 22.5.2017.