

Czech
Chemical
Society

Symposium
Series

6



Cena Karla Štulíka

8. února 2023

Ostrava, Česká republika

Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2023“

8. února 2023

Ostravská univerzita



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

Partneři soutěže O cenu Karla Šulíka 2023:



26. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie „O cenu Karla Štulíka 2023“

26. ročník soutěže **O cenu Karla Štulíka 2023** za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie proběhl dne 8. února 2023 na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity (OU) v Ostravě pod záštitou děkana Přírodovědecké fakulty OU doc. RNDr. Jana Hradeckého, Ph.D. (viz <https://osanal.csch.cz/o-cenu-karla-stulika-2023/>).

Nejprve bych rád poděkoval místnímu organizačnímu výboru vedenému doc. Ing. Zuzanou Navrátilovou, CSc. a Mgr. Martinem Muchou, Ph.D. za dokonalou organizaci a vytvoření již tradiční přátelské a tvůrčí atmosféry. I přes doznívající problémy s pandemií se sešlo 14 kvalitních soutěžních prací z nejrůznějších oblastí moderních analytických metod reprezentujících kvalitní pedagogickou a vědecko-výzkumnou práci v oblasti analytické chemie na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Univerzitě Karlově, Masarykově univerzitě v Brně a Slovenské technické univerzitě v Bratislavě. Můj vřelý dík patří i těmto institucím za příkladnou péči o svoje studenty analytické chemie umožňující vznik bezesporu kvalitních soutěžních prací. A můj dík je o to větší, že se tak děje v době, kdy práce se studenty není příliš zohledňována při současném scientometrickém hodnocení vysokoškolských učitelů. Stejně jako v předchozích 25 letech odborná porota reprezentovala všechny zúčastněné vysoké školy, takže letos pracovala ve složení doc. Ing. Zuzana Navrátilová, CSc. (předsedkyně), prof. RNDr. Jiří Berek, CSc., prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D., Ing. Radmila Řápková, RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D., Ing. Agneša Szarka, Ph.D. a doc. RNDr. Dr. David Sýkora, Ph.D. a všem jejím členům rovněž patří mé poděkování za obětavou práci. Můj největší dík však patří soutěžícím studentům za odvedenou práci a za ochotu odvést více práce ve prospěch naší analytické chemie. A obětovat jí i spoustu svého volného času. Mám opravdovou radost, že i u nás vyrůstají mladí talentovaní analytičtí chemici schopní konkurence na mezinárodním fóru, což jasně dokumentují následující oceněné práce.



1. místo získala
Dorota Sklenářová (Ústav biochemie, PřF MU Brno) za práci *Imunomagnetické stanovení s využitím foton-upkonverzních nanočástic pro detekci rakovinných biomarkerů*



2. místo získala
Livia Rigasová (Ústav chemie, PřF MU Brno) za práci *Nástroje pro rozpoznávání biomolekul*



3. místo získal
Vojtěch Bičák (Ústav chemického inženýrství, FCHI VŠCHT Praha) za práci *Stereochemie tetranitrokalix[4]arenů*



Zvláštní cenu poroty za vynikající práci z oblasti separačních metod analýzy získala
Anna Amirianová (Ústav analytické chemie, FCHI VŠCHT Praha) za práci *Vývoj LC-MS metody pro analýzu metabolitů mykobakterií*



Zvláštní cenu poroty za vynikající práci z oblasti environmentální analýzy získal
Jan Hrouzek (FCHPT STU Bratislava) za práci *Štúdium vybraných parametrov analytických metod na kontrolu kontaminácie propolisu a iných včelích produktov*



Zvláštní cenu poroty za vynikající práci z oblasti separačních metod analýzy získala
Barbora Mudrová (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha) za práci *Studium farmakokinetiky protinádorového léčiva topotekanu při jeho periokulární aplikaci pomocí hydrogelového nosiče*



Zvláštní cenu poroty za vynikající práci z oblasti farmaceutické analýzy získal

Tomáš Lener (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha) za práci *Analýza historického farmaceutického přípravku s obsahem čekanky z 18. století*



Zvláštní cenu poroty za vynikající práci z oblasti elektrochemické analýzy sponzorovanou firmou Metrohm ČR získala

Kristína Štafurová (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha) za práci *Vývoj metod pre elektrochemické stanovenie chloramfenikolu a dinitraminu na amalgámových elektrodách*

Jsem rád, že stejně jako loni jsou v poli vítězů důstojně zastoupeny studentky našich škol, což odráží jejich rostoucí význam v oblasti moderní analytické chemie.

Považuji za svou milou povinnost poděkovat na tomto místě Ing. Radmile Řápkové, technické redaktorce časopisu *Chemické listy*, a prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., vedoucímu redaktoru našeho časopisu, za přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu *Czech Chemical Society Symposium Series* (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného letošnímu ročníku této soutěže. A pochopitelně srdečně děkuji všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga jsou uvedena v záhlaví tohoto článku, za jejich podporu, bez které by tato bezesporu zajímavá a užitečná soutěž nemohla proběhnout.

A na závěr bych rád oznámil, že v příštím roce proběhne tato soutěž 31. ledna 2024 na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

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

STANOVENÍ TĚKAVÝCH A NETĚKAVÝCH PRODUKTŮ DUSITANU V UZENINÁCH

JAN HLÁVKA^a, TOMÁŠ VRZAL^b
a JANA SOBOTNÍKOVÁ^a

^a Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 00 Praha 2, ^b Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lipová 511/15, 120 00 Praha 2, Česká republika
jan.hlavka@natur.cuni.cz

Klíčová slova: dusitan sodný, nitrososloučeniny, kyanosloučeniny, extrakce, plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20230261>

Úvod

Při výrobě uzenářských výrobků, především při jejich zpracování, se velice často přidávají aditiva mající za úkol určitým způsobem zlepšit vlastnosti daného produktu¹. Často používaným aditivem je dusitan sodný (E 250) či draselný (E 249)². Dusitan je vědomě využíván již od počátku 20. století a slouží jako látka schopná vytvořit požadovaný vzhled a chuť uzenářského výrobku, či pro jeho konzervační a antimikrobiální účinky³. Jde o účinný inhibitor růstu anaerobních bakterií, především bakterie *Clostridium botulinum*, čímž snižuje riziko tvorby toxinů a tepelně odolných spor, což má významný vliv na výslednou trvanlivost⁴. Dále je také dusitan využíván pro svou schopnost vytváření růžovočerveného zbarvení uzenin. V přítomnosti dusitanu vzniká v mase nitrosylmyoglobin, který se při tepelném zpracování degraduje na nitroso-myochromogen, což je stabilní červený protein, který vytváří právě růžovočervené zbarvení. Pokud je však tento protein vystaven UV záření či přítomnosti bakterií, červené zbarvení uzeniny mizí. Samotný dusitan tedy není zodpovědný za barvu masa, jak by se na první pohled mohlo zdát^{4,5}. Využívány jsou také jeho antioxidační vlastnosti. Dusitan se v mase rozkládá za vzniku oxidu dusnatého, který se váže na železnaté ionty v hemu, čímž zpomaluje proces peroxidace lipidů⁵.

Dusitan je sice svou přítomností schopen vytvářet ideální podmínky pro dosažení požadované kvality masných výrobků, je však nutné brát také v úvahu, že jde o látku klasifikovanou jako látka toxická². Přílišná konzumace masných výrobků obsahující dusitany může být proto zdraví škodlivá. Přítomný dusitan může u člověka způsobovat methemoglobinémii, koronární ischemii či cévní mozkovou příhodu³. Bylo však také zjištěno, že velice nebezpečné mohou být produkty reakcí dusi-

tanu s látkami obsaženými v mase. Těmito produkty mohou být nitrososloučeniny, nitrososloučeniny nebo také kyanosloučeniny. Nejobávanějšími, a tedy nejvíce studovanými jsou nitrososloučeniny, a to kvůli možným karcinogenním či mutagenním účinkům, které mohou vyvolávat tvorbu nádorů v játrech, plicích, tlustém střevě nebo ve slinivce břišní. Z dosud asi 300 identifikovaných nitrososloučenin bylo více než 90 % označeno jako prokázané karcinogeny⁶. Není však vyloučeno, že zmíněné negativní účinky mohou mít i zbylé produkty dusitanu².

Ve většině výzkumů se cílí především na nitrososloučeniny. Skutečnost, že mohou vznikat i kyanosloučeniny, se většinou neuvádí. Důvodem je, že dosud bylo identifikováno jen velmi málo těchto sloučenin. Jejich vznik však potvrzuje studie, v níž jsou charakterizovány produkty reakce dusitanu sodného s látkami v pivu. Jako jeden z produktů byl nalezen 4-kyanofenol. V pivu s dusitanem reagují především přítomné aminokyseliny, fenoly, aminy či peptidy, což jsou látky, jež se mohou rovněž nacházet v mase. Přítomnost produktů dusitanu nalezených v pivu je tedy možná i v uzenářských výrobcích⁷.

Nitrososloučeniny jsou látky, které ve své struktuře obsahují kovalentně vázanou nitroso skupinu (–NO). Podle toho, na jaký atom je nitroso skupina navázána, je možné rozlišit C-, N-, O- a S- nitrososloučeniny¹. Tyto látky v mase vznikají působením nitrosačního činidla na příslušné prekurzory. Tímto nitrosačním činidlem jsou oxidy dusíku (NO a NO₂). Jde o substituci vodíkového atomu, navázaného na atom dusíku (uhlíku, kyslíku nebo síry), nitrososkupinou. Vznik oxidů dusíku z dusitanu však silně závisí na pH prostředí⁸. Další možností vzniku nitrososloučenin jsou také transnitrosační reakce, kdy dochází k přenosu nitroso skupiny z jedné molekuly na jinou. Touto reakcí mohou bohužel vznikat z netěkavých (nekarciogenních) nitrososloučenin těkavé (karcinogenní) nitrososloučeniny. Reakcí, kdy z nekarciogenní molekuly vzniká karcinogenní, je také například dekarboxylace některých netěkavých nitrososloučenin⁹.

Dle rozdílné tenze par je možné nitrososloučeniny rozdělit na těkavé, málo těkavé a netěkavé. Mezi těkavé nitrososloučeniny se řadí látky s kratšími uhlovodíkovými řetězci nebo jde o molekuly s jednoduchými nesubstituovanými heterocykly. Například *N*-nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-nitrosomorfolin (NMOR) nebo *N*-nitrosopiperidin (NPIP). Mezi málo těkavé nitrososloučeniny se řadí molekuly, jejichž jeden nebo dva řetězce jsou tvořeny fenylovou skupinou, jde například o *N*-nitrosomethylfenyloamin (NMPHA)¹. Netěkavé nitrososloučeniny často obsahují polární skupiny nebo delší alkylové řetězce. Jde o nitrosoaminokyseliny, nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny, nitrosoamidy či nitrosomočoviny, například *N*-nitrosoprolin (NPRO), *N*-nitrosomethylurea (NMU) nebo 4-nitrosifenol^{1,7}.

Míra toxicity nitrososloučenin závisí na struktuře dané molekuly, přičemž molekuly s kratšími uhlovodíkovými zbytky jsou toxičtější, oproti tomu přítomnost delších uhlovodíkových zbytků či polární skupiny toxicitu molekuly snižuje. Tato skutečnost potvrzuje tvrzení, že jsou těkavé nitrososloučeniny svou přítomností mnohem nebezpečnější než netěkavé nitrososloučeniny⁶. Právě netěkavé produkty dusitanu byly charakterizovány v článku s názvem Characterization of Nitrite-Related Reaction Products in Beer. Detegováno bylo 19 produktů dusitanu, kdy mnohé vznikly reakcí s tyrosinem. Identifikovány byly 4-kyanofenol, 4-nitrosfenol, ethylester *N*-nitrosoprolinu, *N*-nitrosoprolin, 2-nitroso-propanová kyselina, 2-methoxy-3-nitrosfenol a 2-methoxy-5-nitrosfenol⁷. Právě na tyto látky se zaměřuje prezentovaná práce.

Většina moderních analytických postupů využívá pro separaci produktů dusitanu plynovou chromatografii nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Koncentrace nitrososloučenin v potravinách je velmi nízká, v rozmezí $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) až mg kg^{-1} (ppm)¹⁰. Nejpožívanější metodou pro stanovení těkavých *N*-nitrososloučenin je plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí nebo hmotnostní detekcí¹. Aby bylo možné stanovit netěkavé nitrososloučeniny, je nutná jejich předchozí derivatizace. Stanovení netěkavých nitrososloučenin je momentálně možné pouze spolu s těkavými *N*-nitrososloučeninami, jelikož u většiny netěkavých nitrososloučenin doposud nebyla zjištěna struktura. Jde o tzv. ATNC (Apparent Total *N*-nitroso Compounds), tedy o celkovou sumu *N*-nitroso skupin vyjádřenou jako koncentrace v $\mu\text{g (N-NO)} \text{ l}^{-1}$ nebo také $\mu\text{g (N-NO)} \text{ kg}^{-1}$. Je však známo, že v pivu větší část z celkového ATNC tvoří netěkavé nitrososloučeniny¹.

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro semi-quantitativní stanovení netěkavých produktů dusitanu v uzenářských výrobcích, jež by měla být univerzální pro všechny druhy uzenin. Touto metodou by mělo být možné sledovat sloučeniny, jež byly identifikovány ve výše uvedeném článku⁷. Pro stanovení těchto analytů byla použita plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Experimentální část

Použité vzorky

Jako modelový vzorek byl pro vývoj metody zvolen Lovecký salám (Kmotr, Masna Kroměříž a.s.). Tento typ uzeniny byl použit z důvodu, že jde o masný výrobek s vyšším obsahem tuku (47 g/100 g), který by mohl vytvářet problémy při extrakci analytů. Dalším důvodem bylo také použití dusitanu sodného jakožto konzervantu.

Pro zjištění extrahovatelnosti analytů extrakční směsí byl připraven vlastní vzorek masa navážením 10 g roze-mleté vepřové krkovic, ke kterému bylo přidáno 5 g dusitanu sodného a 2,5 ml deionizované vody. Vzorek byl ponechán po dobu 24 h v lednici při 4 °C a poté byl tepelně zpracován při 70 °C ve vodní lázni po dobu 1 h. Cílem bylo vytvořit vzorek, ve kterém produkty dusitanu skutečně jsou ve vyšší koncentraci.

Postup přípravy vzorku před analýzou

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží přesně asi 3,5 g homogenizovaného vzorku uzeniny a přidá se 10,5 ml 1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Následuje 30minutová extrakce při laboratorní teplotě. Prvních 10 min je vzorek ručně protřepáván a poté je ponechán 20 min na třepačce s horizontálním pohybem (210 kmitů/min). Vzorek je následně odstředěn (4500 ot/min) a extrakt převeden do nové centrifugační zkumavky. Zbylé analyty jsou vymyty 1 ml acetonitrilu. Poté je extrakt ponechán v ledové lázni (methanol + suchý led) po dobu 10 min. Extrakt je následně odstředěn a převeden do 20ml skleněné vialky. Zbylé analyty jsou opět vymyty 1 ml acetonitrilu. Extrakční činidlo je odpařováno proudem dusíku na thermobloku při 70 °C do sucha. Ze vzniklého odparku jsou analyty vymyty celkem 1,5 ml acetonitrilu. Acetonitrilový extrakt je převeden do 2ml skleněné vialky a acetonitril se nechá odpařit do sucha proudem dusíku. Po odpaření se přidá 350 μl derivatizačního činidla *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamidu a nechá se v uzavřené vialce probíhat derivatizace po dobu 30 min při 70 °C. Následuje již samotné stanovení analytů pomocí plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Pro separaci analytů byla použita kapilární kolona HP-5MS UI (Agilent Technologies). Jako mobilní fáze bylo použito hélium. Nástřik vzorku byl proveden technikou split (5:1) s objemem nástřiku 2 μl a teplotou 250 °C. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na konstantní hodnotu 1 ml min⁻¹. Teplotní program při analýze byl následující: 50 °C (1,5 min) – 20 °C/min – 150 °C (5 min) – 10 °C/min – 210 °C (3 min) – 10 °C/min – 320 °C (5 min). Teplota rozhraní mezi chromatografem a hmotnostním detektorem měla hodnotu 270 °C. Pro fragmentaci analytů byla využita elektronová ionizace, kdy teplota v iontovém zdroji činila 230 °C a hodnota ionizační energie byla 70 eV. Pro analýzu analytů byl použit již vytvořený MRM mód, převzatý z již zmíněné studie⁷. Hodnoty retenčních časů a hmot prekurzorových a produktových iontů analytů jsou uvedeny právě v této studii.

Výsledky a diskuse

Úkolem bylo vyvinout extrakční postup, kterým bude možné analyty z matrice vzorku kvantitativně vyextrahovat a poté semi-quantitativně stanovit. Tím, že byly analyty spíše polární povahy, mající nižší těkavost, bylo tedy nutné při každém stanovení provést jejich derivatizaci. Při vývoji této metody byly dostupné pouze standardy *N*-nitrosoprolinu a 4-kyanofenolu, proto byl vývoj cílen především na tyto dva analyty. U zbylých analytů bylo pouze pozorováno, zda se ve vzorcích masa nacházejí či nikoliv.

Nejprve bylo nutné vybrat vhodné extrakční činidlo, schopné analyty extrahovat. Vybíráno bylo z následujících organických činidel: ethyl-acetát, acetonitril, methanol, pyridin a chloroform. Jednotlivými činidly, vždy 1 ml, byla provedena tříhodinová extrakce 0,24 g vzorku uzeni-

ny při 60 °C. Na základě velikostí ploch píků (*N*-nitrosoprolinu a 4-kyanofenolu) v jednotlivých chromatogramech bylo zjištěno, že nejvíce analytů extrahují acetonitril a methanol (viz obr. 1 a 2).

Současně bylo pozorováno, které činidlo extrahuje nejméně tuku. Z naměřených FTIR spekter extraktů jednotlivých činidel bylo zjištěno, že nejméně jej obsahuje methanolvý extrakt. Množství vyextrahovaného tuku bylo zjištěno z velikosti píku při vlnočetě 1750 cm⁻¹, což odpovídá odezvě karbonylu, který je součástí esteru. Z tohoto důvodu byl jako extrakční činidlo zvolen methanol.

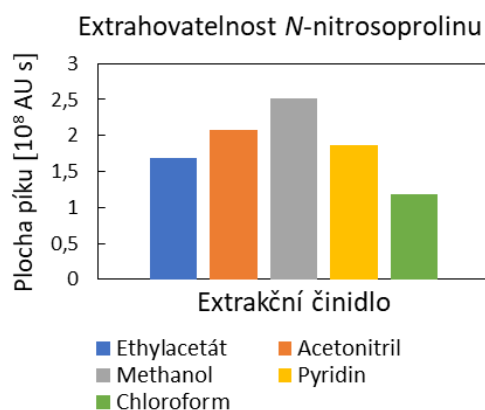
Pro základní odhad extrahovatelnosti analytů zvoleným činidlem byl využit uměle připravený vzorek masa. Nejprve byla provedena dvojnásobná extrakce a poté stejným způsobem reextrakce. Extrahovatelnost byla vypočtena jako podíl plochy píku analytu při extrakci a součtu ploch píků analytu při extrakci a reextrakci. Extrahovatelnost *N*-nitrosoprolinu činila cca 70 % a 4-kyanofenolu cca 80 %. Zkoušeny byly také extrakce analytů methanolem v různém poměru s acetonitrem. S rostoucím podílem acetonitrilu v extrakční směsi byla zaznamenána vyšší extrakční účinnost pro sledované analyty. Nejlepší výsledky poskytovala extrakční směs methanol/acetonitril (1:1). Porovnáním extrakcí pouhým methanolem a při použití extrakční směsi bylo zjištěno, že plochy píků jednotlivých analytů vzrostly přibližně o 50 %.

Aby bylo možné analyty stanovit, bylo nutné odstranit nežádoucí vyextrahované složky pocházející z matrice vzorku uzeniny. Zjistilo se, že zvolená extrakční směs extrahuje určité procento bílkovin, jež jsou obsaženy v masě. Bílkoviny byly z extraktu odstraněny centrifugací po přidavku ledového acetonu a vymražení v ledové lázni (methanol + suchý led). Pro zabránění přítomnosti případných mechanických nečistot v extraktu bylo využito PTFE filtrů o velikosti pórů 0,2 μm. Další nežádoucí vyextrahovanou složkou byla voda, která způsobovala zdlouhavá

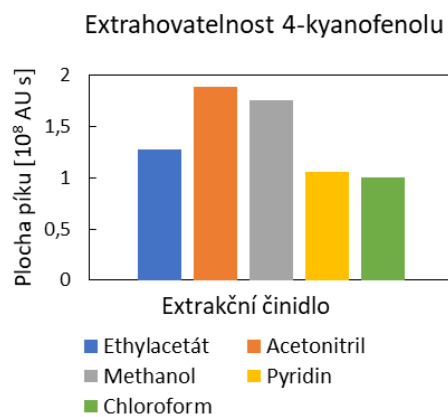
odpařování. Vodu z extraktu se podařilo odstranit odparem za pomoci dichlormethanu. Poslední nežádoucí vyextrahovanou složkou byl tuk, kdy pro jeho odstranění byla testována extrakce hexanem. Po provedení mnoha experimentů, ve kterých byly porovnávány extrakční schopnosti tuku hexanem vzhledem k jeho objemu, bylo zjištěno, že je třeba provést dvojnásobnou extrakci 12 ml hexanu, vždy po dobu 20 min, a nakonec zbylý hexan ze vzorku odpařit proudem dusíku.

Při kontrole, zda v některém z kroků postupu extrakce nedochází ke ztrátám analytů, bylo však bohužel zjištěno, že hexan silně extrahuje 4-kyanofenol. Zřejmě je to z důvodu nižší polaritě oproti *N*-nitrosoprolinu. Na základě získaných dat bylo současně pozorováno, že opakovatelnost tohoto extrakčního postupu činí 35 %. Vzhledem k takovýmto výsledkům bylo tedy zřejmé, že tento extrakční postup pro extrakci analytů není možné použít.

Vyvinutý postup byl porovnáván s extrakčním postupem uvedeným ve studii vydané Národním potravinářským ústavem technické univerzity v Dánsku, zabývající se rovněž problematikou stanovení netěkavých produktů dusitanu (*N*-nitrosoprolinu, *N*-nitrosohydroxyprolinu, *N*-nitrososarkosinu, *N*-nitroso-2-methyl-thiazolidin-4-karboxylové kyseliny a *N*-nitrosothiazolidin-4-karboxylové kyseliny) v uzeninách¹¹. V této studii byl pro extrakci analytů použit 1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Tento extrakční postup byl zkoušen kvůli schopnosti extrakce *N*-nitrosoprolinu, který byl v této studii rovněž jedním z analytů, tak jako je tomu v této práci. Testovaný postup extrakce musel být však rozšířen o odpaření extrakčního činidla a derivatizaci analytů, jelikož pro stanovení analytů byla v původní studii použita nikoliv plynová chromatografie, ale vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Při provedení první extrakce tímto postupem bylo sledováno, jaké množství bílkovin, tuku a vody je při použití 1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu extrahováno. Pozoro-



Obr. 1. Extrahovatelnost *N*-nitrosoprolinu ze vzorku uzeniny jednotlivými extrakčními činidly



Obr. 2. Extrahovatelnost 4-kyanofenolu ze vzorku uzeniny jednotlivými extrakčními činidly

váno bylo pouze velmi malé množství vyextrahovaných bílkovin, jež jsou zcela odstraněny vymražením v ledové lázni a následným odstředěním. Použití ledového acetonu pro vysrážení bílkovin bylo tedy možné z původního postupu vypustit. Množství vyextrahovaného tuku a vody bylo rovněž velmi malé. Voda zřejmě extrakčním činidlem nebyla extrahována vůbec, nebo jen ve velmi malé míře. Vzhledem k takovýmto výsledkům bylo možné vypustit také extrakci tuku hexanem, filtraci přes PTFE filtry i přísadku dichlormethanu. Celkový čas odpařování extrakčního činidla se, při porovnání s předchozím postupem extrakce, snížil přibližně na jednu třetinu (cca 50 min). Extrakční směs methanol/acetonitril (1:1) byla proto nahrazena 1% kyselinou mravenčí v acetonitrilu. Bylo však nutné prodloužit dobu extrakce z původních 10 min na 30 min. Důvodem byla nízká extrahovatelnost analytů (50 %), kterou se tímto podařilo navýšit na cca 90 %. V původním postupu extrakce činí doba vymrazování 15 min, ta byla však, vzhledem k velmi malému množství vyextrahovaných bílkovin, zkrácena na 10 min. Dále byla zvýšena navážka vzorku z původních 2,5 g na 3,5 g, s čímž souviselo také navýšení objemu extrakčního činidla z původních 7,5 ml na 10,5 ml. Navýšením navážky bylo dosaženo vyšší citlivosti stanovení.

Výsledná hodnota opakovatelnosti stanovení, při použití tohoto postupu extrakce, byla pro oba analyty 7 %. Tento extrakční postup nakonec pro semi-kvantitativní stanovení analytů použit nebyl. V závěru této práce byla, pro orientační odhad koncentrací analytů ve vzorcích uzenin, na vyvinutou metodu aplikována metoda přísadku standardu. Tato metoda kvantifikace byla použita z důvodu matričního efektu, jež silně ovlivňoval stanovení analytů.

Vyvinutá metoda byla následně aplikována na vybrané druhy uzenin (vepřová šunka, šunkový salám, anglická slanina, vepřové párky a kuřecí salám), u nichž byly porovnávány koncentrace 4-kyanofenolu a *N*-nitrosoprolinu vzhledem k obsahu masa použitého při jejich výrobě. Od každého druhu uzeniny byly zakoupeny vždy dva vý-

robky, jeden s nízkým a druhý s co nejvyšším obsahem masa. Stanovené koncentrace 4-kyanofenolu a *N*-nitrosoprolinu jsou uvedeny v tab. I. Při stanovení 4-kyanofenolu byla v prvních třech druzích uzenářských výrobků zjištěna vyšší koncentrace u výrobků s vyšším obsahem masa. Důvodem této skutečnosti byl nejspíše samotný obsah masa, s čímž souviselo i množství tyrosinu obsaženého v něm. Právě tyrosin vystupuje jako prekurzor pro vznik 4-kyanofenolu. U obou vzorků vepřových párek byly koncentrace tohoto analytu stejné. Oproti tomu u vzorků kuřecího salámu byla koncentrace vyšší u méně kvalitního výrobku. Stanovené koncentrace 4-kyanofenolu se u všech těchto vzorků nacházely řádově v desetinách či jednotkách μg na kilogram vzorku.

Obsah *N*-nitrosoprolinu bohužel nebylo možné u jednotlivých výrobků porovnat, jelikož se u některých uzenin vyskytly problémy při jeho stanovení. Velikosti ploch pík analytu v jednotlivých kalibračních roztocích neměly očekávanou postupně rostoucí tendenci, kdy napříč plochami pík nebyla dodržena lineární závislost, což zřejmě zapříčinil vliv matričního efektu. Koncentrace tohoto analytu byla stanovena pouze u čtyř vzorků (viz tab. I), kdy hodnoty koncentrací byly řádově srovnatelné s koncentracemi 4-kyanofenolu. Ve vzorcích dušené šunky a Wellness šunkového salámu nebyl *N*-nitrosoprolin detegován vůbec.

Závěr

V této práci byla vyvinuta extrakční metoda pro stanovení 4-kyanofenolu a *N*-nitrosoprolinu plynovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí, jež pro kvantifikaci těchto analytů využívá metodu přísadku standardu. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na reálné vzorky uzenin. Přítomnost 4-kyanofenolu byla zjištěna ve všech vzorcích uzenářských výrobků. Vzhledem k tomu, že byl tento analyt přítomen, mohou být přítomny i jiné produkty tyrosinu, jež byly detegovány ve výše uvedené

Tabulka I

Výsledné hodnoty koncentrací 4-kyanofenolu a *N*-nitrosoprolinu ve vybraných vzorcích uzenářských výrobků

Název uzeniny	Druh masa	Obsah masa [%]	4-Kyanofenol		<i>N</i> -nitrosoprolin	
			$c_g [\mu\text{g kg}^{-1}]$			
Dušená šunka	vepřové	75	0,6		ND	
Vařená šunka	vepřové	95	1,3		1,7	
Šunkový salám	vepřové	69	0,9		0,2	
Wellness šunk. salám	vepřové	89	1,0		ND	
Anglická slanina	vepřové	85	1,3		0,9	
Anglická slanina	vepřové	94	2,3		*	
Párky BERLINKY	vepřové	71	0,8		*	
Ředitelské párky	vepřové	90	0,8		2,9	
Měkký salám	kuřecí	38	1,9		*	
Kuřecí šunka	kuřecí	92	0,1		*	

c_g – koncentrace analytu, ND – nebylo detegováno, *výslednou hodnotu koncentrace nebylo možné stanovit

studii⁷. V této práci jde nejspíše o první studii, jež se stanovením tohoto analytu v uzeninách zabývá.

Při stanovení *N*-nitrosoprolinu se u některých vzorků, z důvodu silného matričního efektu, vyskytly problémy znemožňující kvantifikaci analytu. Vliv tohoto nežádoucího efektu na stanovení *N*-nitrosoprolinu je prozatím předmětem výzkumu.

LITERATURA

1. Vrzal T., Olšovská J.: *Kvasný Průmysl* 62, 2 (2016).
2. Dusitany v českých uzeninách. INFORMAČNÍ CENTRUM BEZPEČENOSTI POTRAVIN. Praha 1, 110 00, Ministerstvo zemědělství, (2021). <https://bezpecnostpotravin.cz/dusitany-v-ceskych-uzeninach/>. Staženo 26. 12. 2022.
3. Cvetković D., Živković V., Lukić V., Nikolić S.: *Forensic Sci., Med., Pathol.* 15, 102 (2019).
4. Gassara F., Patricia Kouassi A., Kaur Brar S.: *Food Sci. Nutr.* 56, 2133 (2016).
5. Ferisiuk K. M., Wójciak K.: *Antioxidants* 9, 711 (2020).
6. Aliuska Morales H., González M. P., Cordiero Maria Natália D. S., Pérez M. Á. C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 189 (2007).
7. Malečková M., Vrzal T., Olšovská J., Sobotníková J.: *J. Agric. Food Chem.* 69, 11687 (2021).
8. Čulík J., Horák T., Jurková M., Čejka P.: *Kvasný Průmysl* 58, 26 (2012).
9. Wainright T.: *J. Inst. Brew* 92, 49 (1986).
10. Keller V., Čulík J., Basařová G.: *Kvasný Průmysl* 28, 99 (1982).
11. Herrmann SS., Duedahl-Olesen L., Granby K.: *J. Chromatogr A* 1330, 20 (2014).

J. Hlávka^a, T. Vrzal^b and J. Sobotníková^a (^a *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague and Research Institute of Brewing and Malting, Prague,* ^b *Research Institute of Brewing and Malting, Prague, Czech Republic*): **Determination of Volatile and Non-volatile Nitrite Products in Sausages**

This diploma thesis deals with the issue of nitrite products in sausages by gas chromatography. These products may have carcinogenic or mutagenic properties. In this thesis, method for determination of 4-cyanophenol and *N*-nitrosoprolin in sausages by gas chromatography with mass spectrometric detection was developed. A solution of formic acid in acetonitrile was used for analyte extraction. Prior to analysis, analytes must be derivatized by *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide. The developed method was applied to real sausages samples. The standard addition method is used for the quantification of analytes.

Keywords: sodium nitrite, nitrosocompounds, cyanocompounds, extraction, gas chromatography with chemiluminescence detection, gas chromatography with mass spectrometric detection.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

IMUNOMAGNETICKÉ STANOVENIE S VYUŽITÍM FOTÓN-UPKONVERZNÝCH NANOČASTÍC PRE DETEKCIU RAKOVINNÝCH BIOMARKEROV

DOROTA SKLENÁROVÁ,
EKATERINA MAKHNEVA a ZDENĚK FARKA

Ústav biochémie, Prírodovedecká fakulta, Masarykova
univerzita, 625 00 Brno, Česká republika
sklenarova@mail.muni.cz

Kľúčové slová: fotón-upkonverzné nanočastice, UCNP,
imunostanovenie, prostatický špecifický antigén, ELISA,
ULISA, magnetické mikročastice

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20230266>

Úvod

Karcinóm prostaty je najrozšírenejšia forma rakoviny v celosvetovej populácii mužov. Pre včasnú diagnózu počiatočného štádia karcinómu prostaty je kľúčová včasná detekcia prostatického špecifického antigénu (PSA), ktorý je najdôležitejším biomarkerom tohto ochorenia. Koncentrácia PSA v krvnom sére zdravých mužov dosahuje hodnoty do 2,5 ng ml⁻¹; vyššie hodnoty sú považované za patologické¹. Keďže zmena hodnôt PSA v sére indikujúca rekurenciu ochorenia môže nastať aj vo veľmi úzkom rozmedzí (0,1–0,2 ng ml⁻¹), je nevyhnutné využívať extrémne citlivé analytické metódy².

Enzýmové imunostanovenie (ELISA) je považované za zlatý štandard medzi diagnostickými metódami. Táto technika využíva mikrotitračné doštičky ako pevnú fázu a značky na báze enzýmov. Po reakcii s vhodným chromogénnym substrátom poskytujú tieto značky farebný signál, ktorého intenzita je úmerná koncentrácii analytu. Enzýmové imunostanovenia na mikrotitračných doštičkách však často nie sú dostatočne citlivé pre včasnú detekciu subklinických koncentrácií analytov. Pre zlepšenie parametrov je možné zaviesť vhodné alternatívy pre pevnú fázu a značenie¹.

Magnetické mikročastice (MB) sú vhodnou alternatívou pre pevnú fázu, nakoľko ich väčší špecifický povrch umožňuje efektívnejšiu väzbu záchytovacej protilátky, rovnako ako prekoncentráciu analytu. Superparamagnetické vlastnosti MB vedú k jednoduchej magnetickej separácii vzniknutého imunokomplexu v roztoku¹.

Ako vhodná alternatíva pre značenie v imunostanoveniach sa ukazuje byť využitie nanomateriálov, ako sú fotón-upkonverzné nanočastice (UCNP). Jedná sa o nanokryštály na báze anorganickej matrice (najčastejšie NaYF₄) dopovanej lanthanoidovými iónmi. Vďaka svojej štruktúre sú schopné tzv. anti-Stokesovej luminiscencie, ktorá umožňuje detekciu bez interferencií optického poza-

dia. Pre využitie v imunostanoveniach je nutné povrch UCNP modifikovať a pripojiť k nim biorekogničný element. Biokonjugáty UCNP je možné použiť ako alternatívne značenie v upkonverznom imunostanovení (ULISA) a s ich pomocou dosiahnuť 10–100× citlivejšej detekcie než v prípade techniky ELISA (cit.³).

Cieľom našej práce bolo vyvinúť dosiaľ neexistujúce imunostanovenie využívajúce MB a UCNP pre detekciu PSA a výsledky porovnať s konvenčným ELISA a ULISA stanovením. V konečnej fáze bolo vyvinuté imunostanovenie s magnetickej separáciou, čo umožnilo prekoncentráciu analytu a ďalšie zlepšenie parametrov.

Experimentálna časť

Materiál

Hovädzie sérum a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín (TMB) boli dodané firmou Merck/Sigma-Aldrich (USA). PSA (ab78528), monoklonálna anti-PSA protilátka (ab403) a streptavidínom modifikované HRP (SA-HRP) boli z firmy Abcam (UK). Biotinylovaná anti-PSA protilátka (BAF1344) bola zakúpená od firmy R&D Systems (USA). MB nesúce tosylóve skupiny (Dynabeads MyOne, priemer 1 µm) pochádzali z firmy Thermo Fischer Scientific (USA). Všetky ostatné chemikálie pochádzali z firmami Carl Roth (Nemecko), alebo Penta (Česká republika). Tlmiivé roztoky použité v tejto práci boli fosfátový pufer (PB; 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; pH 7,4), a pufer pre priebeh imunostanovenia (AB; PB s prídavkom 10 % SuperBlock, 0,05 % NaN₃, 0,01 % Tween 20, 1 mM KF, 150 mM NaCl; pH 7,5). V ELISA experimentoch boli použité rovnaké pufrы, ale bez prídavku NaN₃.

Príprava biokonjugátov UCNP so streptavidínom

Syntéza UCNP: 250 mg zárodočných nanočastíc (NaYF₄ dopovaný 18 % Yb³⁺ a 2 % Tm³⁺) bolo rozpustených v 5,5 ml kyseliny olejovej a 17 ml oktadek-1-énu a zahriatych v dusíkovej atmosfére na 300 °C. Rast nanočastíc bol iniciovaný vstrekaním prekursorov trifluoroktánu do disperzie.

Príprava alkýn-PEG-Ner linkeru: Zmes 30 mg neridronátu v 1M NaOH (128 µl) v 368 µl PB pufru a alkýn-PEG-NHS v 500 µl PB pufru bola inkubovaná cez noc pri 4 °C. Následne bola zmes dialyzovaná proti destilovanej vode (dH₂O) pomocou Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 500–1000 Da, Carl Roth, Nemecko), lyofilizácia roztoku a uchovávanie pri 4 °C.

Príprava alkýn-PEG-Ner-UCNP: Zmiešanie 10 mg UCNP v cyklohexáne s 200 mM HCl v pomere 1:1 (v/v). Po sonikácii, odobraní hornej fázy, pridaní acetónu

a centrifugácii nasledovalo rozpustenie peletu v 500 μl dH_2O a zmiešanie s pripraveným linkerom. Zmes bola inkubovaná cez noc pri 38 °C a konjugát bol dialyzovaný proti dH_2O pomocou dialyzačného zariadenia Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 100 kDa) a uchovávaný pri 4 °C.

Click-konjugácia so streptavidínom: Ku 10 mg konjugátu UCNP v 1,4 ml dH_2O bolo pridaných 100 μl Tris pufru (375 mM, pH 7,5) a 20 μl vodného roztoku askorbátu sodného (20 mg ml^{-1}). Zmes bola prebublávaná argónom a nasledovalo pridanie 100 μl azidom modifikovaného streptavidínu v PB puFRE (1 mg ml^{-1}). Click-reakcia bola zahájená pridaním 10 μl vodného roztoku CuSO_4 (6,25 mM) a po prebublání argónom bolo pridaných ďalších 10 μl . Nakoniec prebehla dialýza proti dialyzačnému pufru (50 mM Tris, 0,05 % NaN_3 , 1 mM KF; pH 7,4).

Výsledky a diskusia

Porovnanie mikrotitračnej doštičky a MB pre ELISA stanovenie

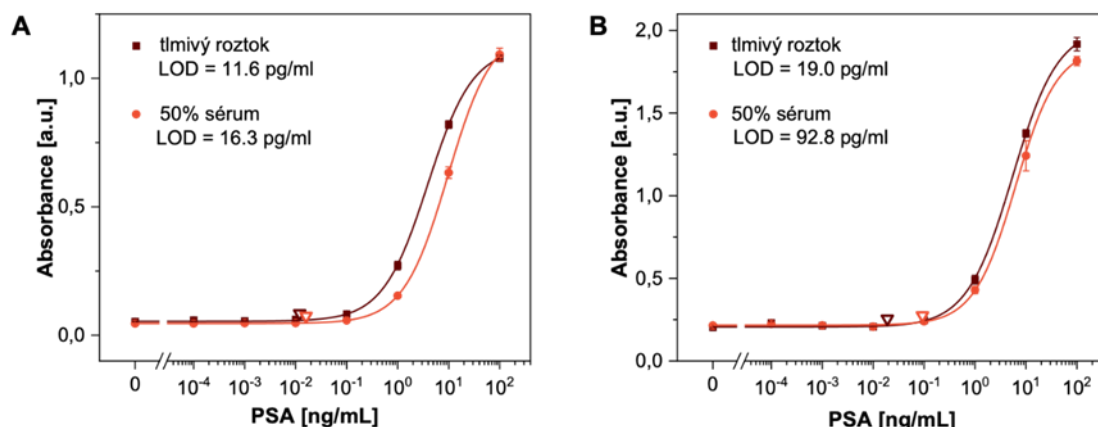
Nakoľko je ELISA najrozšírenejším formátom imunostanovení v klinickej analýze, bola táto technika vykonaná pre detekciu PSA v konvenčne používannej mikrotitračnej doštičke, rovnako ako s využitím MB ako pevnej fázy. ELISA na mikrotitračnej doštičke (obr. 1A) dosiahla limit detekcie (LOD) 11,6 pg ml^{-1} v AB a 16,3 pg ml^{-1} v 50% sére, s pracovným rozsahom (EC_{20} – EC_{80}) 0,95–15,9 ng ml^{-1} pre AB, a 2,40–38,8 ng ml^{-1} pre vzorky séra. V ďalšom kroku bola prevedená ELISA s využitím MB ako pevnej fázy (obr. 1B), ktorá dosiahla LOD 19,0 pg ml^{-1} v AB, a 92,8 pg ml^{-1} v sére. Pracovné rozmedzie bolo 1,29–22,6 ng ml^{-1} , resp. 1,69–38,8 ng ml^{-1} . Počas imunostanovenia na MB bolo nutné optimalizovať jeho priebeh, s cieľom dosiahnuť rovnomernú distribúciu MB na dne mikrotitračných doštičiek (pre účely premývania a odčítania signálu).

Porovnanie mikrotitračnej doštičky a MB pre ULISA stanovenie

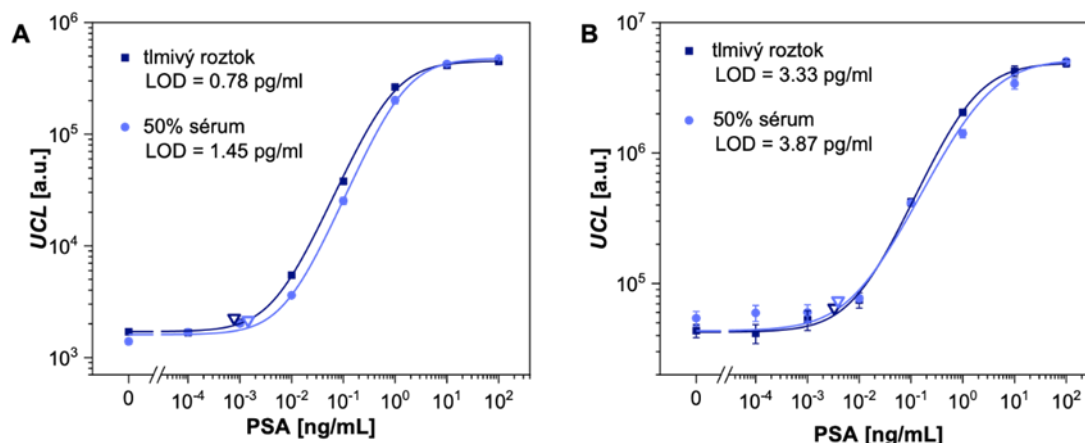
Imunostanovenia využívajúce UCNP ako značenie predstavujú alternatívne formáty imunostanovení s vyššou citlivosťou. ULISA stanovenie na mikrotitračnej doštičke (obr. 2A) dosiahlo LOD 0,78 pg ml^{-1} v AB, a 1,45 pg ml^{-1} v 50% sére, s pracovným rozmedzím 0,24–3,10 ng ml^{-1} v AB a 0,42–5,10 ng ml^{-1} v modelových reálnych vzorkách. Keďže MB-ULISA vyžadovala využitie magnetov pri premývaní, bolo nutné pred odčítaním signálu zaviesť resuspenziu MB v malom množstve AB pufru. Tento experiment (obr. 2B) dosiahol LOD 3,33 pg ml^{-1} v AB a 3,87 pg ml^{-1} v 50% sére, s pracovnými rozmedziami 0,33–6,07 ng ml^{-1} , resp. 0,50–13,0 ng ml^{-1} . ULISA s využitím MB teda vykazovala LOD porovnateľné s ULISA stanovením na mikrotitračnej doštičke, a širšie pracovné rozmedzia. Tieto experimenty demonštrovali signifikantné zlepšenie citlivosti oproti konvenčným ELISA stanoveniam.

ULISA stanovenie s magnetickou prekoncentráciou

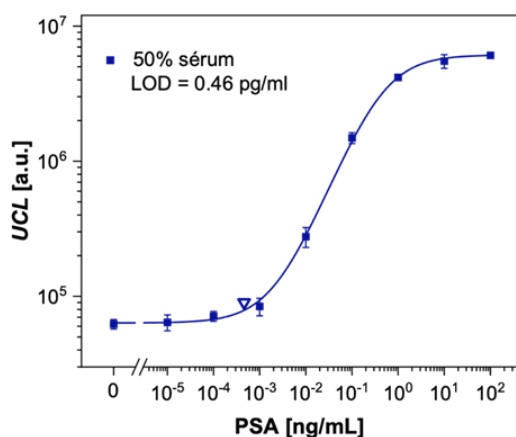
Pre ďalšie zlepšenie citlivosti detekcie PSA bolo prevedené ULISA stanovenie s dodatočnou prekoncentráciou analytu s využitím MB (obr. 3). Tento experiment bol prevedený v reálnych vzorkách 50% séra, ktoré boli prekoncentrované z objemu 4 ml na objem 0,5 ml (prekoncentračný faktor 8). Dosiahnuté pracovné rozmedzie bolo 0,08–2,06 ng ml^{-1} , s LOD 0,46 pg ml^{-1} . Použitie zvýšeného objemu roztoku PSA viedlo k efektívnejšiemu naviazaniu analytu na povrch magnetickej mikročastice konjugovanej s protilátkou. Výsledné 8,4-násobné zlepšenie LOD korešpondovalo s prekoncentračným faktorom a demonštrovalo potenciál tejto metódy.



Obr. 1. Výsledky ELISA stanovení s využitím mikrotitračnej doštičky (A) a MB (B) ako pevnej fázy



Obr. 2. Výsledky ULISA stanovení s využitím mikrotitračné doštičky (A) a MB (B) ako pevnej fázy



Obr. 3. Výsledky ULISA stanovenia s magnetickou prekoncentráciou

Záver

Využitie magnetických mikročastíc ako pevnej fázy a UCNP ako alternatívneho značenia bolo študované pre zvýšenie citlivosti imunostanovení pre detekciu PSA. Boli vyvinuté a optimalizované ELISA a ULISA stanovenia s využitím magnetických mikročastíc a ich parametre boli porovnané s imunostanoveniami využívajúcimi konvenčné mikrotitračné doštičky. Využitie UCNP v imunostanoveniach viedlo k významnému zlepšeniu LOD, a preto boli tieto stanovenia ďalej vyvíjané a optimalizované pre prevedenie ULISA stanovení s magnetickou prekoncentráciou, ktorá viedla k ďalšiemu 8,4-násobnému zlepšeniu LOD, čož korešpondovalo s teoretickým prekon-

centračným faktorom. Bol tak demonštrovaný potenciál využitia MB a UCNP pre významne zvýšenú citlivosť imunostanovení a detekciu nízkych koncentrácií PSA, ako aj iných rakovinných biomarkerov.

LITERATÚRA

1. Makhneva E., Sklenářová D., Brandmeier J. C., Hlaváček A., Gorris H. H., Skládal P., Farka Z.: *Anal. Chem.* 94, 16376 (2022).
2. Farka Z., Mickert M. J., Hlaváček A., Skládal P., Gorris H. H.: *Anal. Chem.* 89, 11825 (2017).
3. Peltomaa R., Farka Z., Mickert M. J., Brandmeier J. C., Pastucha M., Hlaváček A., Martínez-Orts M., Canales Á., Skládal P., Benito-Peña E., Moreno-Bondi M. C., Gorris H. H.: *Biosens. Bioelectron.* 170, 112683 (2020).

D. Sklenářová, E. Makhneva, and Z. Farka
(Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic): **Immunomagnetic Assay Using Photon-Upconversion Nanoparticles for the Detection of Cancer Biomarkers**

Prostatic carcinoma is the most frequently diagnosed type of cancer within the male population worldwide. The most important prostate cancer biomarker is the prostate-specific antigen (PSA). Changes in PSA concentration may occur in very narrow ranges, making ultrasensitive analytical methods necessary. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered the gold standard of analytical methods. It utilizes microtiter plates as solid phase and enzyme-based labels. However, ELISAs are often not sensitive enough for early-stage detection of subclinical levels of PSA. To enhance the sensitivity, it is

possible to introduce suitable alternatives for both the solid phase and the label.

Our work focuses on the use of magnetic microparticles (MBs) and photon-upconversion nanoparticles (UCNPs) as alternatives for solid phase and the label, respectively. The superparamagnetic properties and higher specific surface of MBs allows for analyte preconcentration and simple magnetic separation of the immunocomplex. UCNPs, on the other hand, are nanocrystals exhibiting anti-Stokes luminescence (converting light in the NIR region to visible light). After surface modification, it is possible to utilize UCNPs as labels in the upconversion-linked immunosorbent assay (ULISA), significantly enhancing the sensitivity. We have developed and optimized ELISA and ULISA assays for the detection of PSA and compared their parameters with the equivalent assays utilizing MBs as solid phase. Moreover, we have developed a novel ULISA method with an additional magnetic preconcentration step to further enhance sensitivity, providing a limit of detection of 0.46 pg mL^{-1} .

Keywords: photon-upconversion nanoparticles, UCNPs, immunoassay, prostate-specific antigen, ELISA, ULISA, magnetic microparticles



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

OBSAH

<i>J. Hlávka, T. Vrzal, J. Sobotníková</i>	Stanovení těkavých a netěkavých produktů dusitanu v uzeninách	261
<i>D. Sklenářová, E. Makhneva, Z. Farka</i>	Imunomagnetické stanovenie s využitím fotón-upkonverzných nano- častíc pre detekciu rakovinných biomarkerov	266

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Farka Z. 266

Hlávka J. 261

Makhneva E. 266

Sklenářová D. 266

Sobotníková J. 261

Vrzal T. 261

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 21 (2023), čís./no. 6 • 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: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal, F. Švec; Webové stránky: P. Drašar • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč • 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 22.10.2023.