

Czech
Chemical
Society

Symposium
Series

2



Cena Karla Štulíka

31. ledna 2024

Praha, Česká republika

Ročník 22 - Czech Chemical Society Symposium Series 22 (2) 57–72 (2024)

ISSN 2336-7202 <http://www.ccsss.cz>



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2024“

31. ledna 2024

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

Partneři soutěže O cenu Karla Šulíka 2024:



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



analytika®
Výrobce referenčních materiálů



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
Univerzita Karlova

MERCK

Metrohm

MUNI Masarykova
univerzita

NICOLET CZ
MOLECULAR SPECTROSCOPY

Mendelova
univerzita
v Brně

Skalar

STU
SLOVENSKÁ TECHNICKÁ
UNIVERZITA V BRATISLAVE

Waters
THE SCIENCE OF
WHAT'S POSSIBLE.®



27. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie „O cenu Karla Štulíka 2024“

Již 27. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie **O cenu Karla Štulíka 2024** úspěšně proběhl 31. ledna 2024 na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze na Albertově pod záštitou děkana PíF UK prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. Považuji za svou milou povinnost nejprve poděkovat kolegům z katedry (jmenovitě prof. RNDr. V. Vyskočilovi, Ph.D., doc. RNDr. K. Nesměrákovi, Ph.D., RNDr. J. Sobotníkové, Ph.D., RNDr. J. Fischerovi, Ph.D. a paní Marii Datkové a paní Janě Povýšilové) za dokonalou organizaci soutěže a vytvoření tradiční přátelské a tvůrčí atmosféry, kterou si tato soutěž určitě zaslouží. I letos se sešla řada kvalitních příspěvků (celkem 13 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 Univerzitě Palackého v Olomouci). Náš dík patří pochopitelně i těmto univerzitám za kvalitní výchovu studentů analytické chemie a podporu jejich účasti na naší soutěži. Nakonec právě výchova kvalitních absolventů analytické chemie by měla být hlavním cílem příslušných kateder analytické chemie a škol i v době rostoucího ekonomického tlaku na upřednostňování vědecké práce před pedagogickou. Dle nepsaných pravidel odborná porota reprezentovala všechny zúčastněné vysoké školy, takže letos pracovala ve složení prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (předseda), doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D., doc. Ing. Katarína Hroboňová, Ph.D., prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D., RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D., Ing. Radmila Řápková a prof. RNDr. David Sýkora, Ph.D. Všem jejím členům rovněž patří mé poděkování za obětavou práci. Můj největší dík však patří soutěžícím studentům reprezentujícím v tom nejlepším slova smyslu „rising stars in analytical chemistry“, za příkladnou práci ve prospěch české analytické chemie. Je to jistě příjemné zjištění, že u nás vyrůstají mladí talentovaní analytičtí chemici schopní produkovat excelentní vědecké výsledky.



1. místo získala

Bc. Dominika Bezdeková (Ústav chemie PíF MU Brno) za práci *MALDI-2 MS zobrazovanie izomérov lipidov líšiacich sa polohou dvojitej väzby v biologických vzorkách tkanív.*



2. místo získal

Mykyta Starovoit (Katedra analytické chemie FaF UK v Hradci Králové) za práci *Vysokoteplotní LC-MS metoda pro bottom-up proteomické analýzy se sníženým výskytem artefaktů.*



3. místo získali

Bc. Jakub Harvalík (Ústav analytické chemie VŠCHT Praha) za práci *Reduktivní elektrochemické štěpení sulfonimidů jako přímá cesta k sulfonamidům.*



Bc. Aryna Paulenka (Ústav chemie PíF MU Brno) za práci *Využití monolitického enzymatického reaktoru v dvourozměrné chromatografii.*



Bc. Kateřina Pražáková (Ústav analytické chemie VŠCHT Praha) za práci *Lipidomická analýza makrofágů pomocí LC-MS.*

Zvláštní cenu poroty pro studenty bakalářského studia získali



Marek Beneš (Ústav analytické chemie VŠCHT Praha) za práci *Studium degradace nové psychoaktivní látky pomocí elektrochemických a spektroskopických metod.*



Tereza Polášková (Katedra analytické chemie PrF UP Olomouc) za práci *Stanovení prvkových nečistot v bylinných přípravcích*.

Zvláštní cenu firmy Metrohm ČR za nejlepší práci v oblasti elektroanalytické chemie získala



Bc. Johanka Jarošová (Katedra analytické chemie PrF UK Praha) za práci *Pevná bismutová kapková elektroda – nový nástroj pro voltametrické stanovení elektrochemicky redukovatelných organických sloučenin*.

Zvláštní cenu firmy Nicolet CZ za nejlepší práci v oblasti molekulární spektroskopie získal



Matyáš Garnol (Ústav fyzikální chemie VŠCHT Praha) za práci *SERS studie chloramfenikolu adsorbovaném na stříbrném povrchu*.

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

A na závěr velké poděkování Ing. Radmile Řápkové, technické redaktorce časopisu *Chemické listy*, a prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., vedoucímu redak-



Foto: Ocenění letošní soutěže O cenu Karla Štulika 2024. Zleva: Mykyta Starovoit, Dominika Bezdeková, Aryna Paulenka, Kateřina Pražáková a Jakub Harvalík

toru našeho časopisu, za přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Czech Chemical Society Symposium Series (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného letošnímu ročníku této soutěže. A pochopitelně poděkování všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga jsou uvedena v záhlaví tohoto článku, za jejich podporu, bez které by tato bezesporu zajímavá a pro analytickou chemii nesmírně užitečná soutěž nemohla proběhnout.

A na závěr bych rád oznámil, že v příštím roce proběhne tato soutěž ve středu 29. ledna 2025 opět na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze na Albertově v souvislosti s oslavami 100. výročí založení této naší nejstarší katedry analytické chemie na našem území.

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

PEVNÁ BISMUTOVÁ KAPKOVÁ ELEKTRODA – NOVÝ NÁSTROJ PRO VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ ELEKTROCHEMICKY REDUKOVATELNÝCH ORGANICKÝCH SLOUČENIN

JOHANKA JAROŠOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí,
Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Česká republika
johanka.jarosova@natur.cuni.cz

Klíčová slova: metronidazol, antibiotika, analýza léčiv, elektrochemie, diferenční pulzní voltametrie, pevná bismutová kapková elektroda

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20240061>

Úvod

Pevná bismutová kapková elektroda (SBI_{DE}, z angl. solid bismuth drop electrode) je nová pracovní elektroda komerčně dodávaná na český trh společností Metrohm od roku 2020. Dle výrobce lze tuto elektrodu použít pro stanovení nízkých koncentrací těžkých kovů v jezerech, řekách, podzemních vodách a především v kontaminované pitné vodě. Lze stanovovat nízké koncentrace od jednotek $\mu\text{g l}^{-1}$, někdy je však možné stanovit koncentraci již od jednotek ng l^{-1} . Elektroda je vhodná pro stopovou analýzu iontů těžkých kovů, jako jsou Cd, Pb, Ni, Co i Fe, proto dokáže v těchto stanoveních zcela nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu^{1,2}.

Metronidazol, neboli 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol, je bílý, popřípadě nažloutlý krystalický prášek omezeně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, ethanolu, dichlormethanu a v etheru. Jedná se o antibiotikum, vyvinuté v roce 1960, používané pro léčbu onemocnění způsobených gram-pozitivními a gram-negativními anaerobními bakteriemi (především *Bacteroides fragilis*)^{3–6}.

Metronidazol byl v tomto výzkumu zvolen jako modelové léčivo reprezentující elektrochemicky redukovatelné biologicky aktivní látky. Cílem této práce bylo ověření využitelnosti nového typu komerčně dodávané bismutové pracovní elektrody (SBI_{DE}) při voltametrickém stanovení modelové organické látky, přičemž dle dostupných informací se jedná o zcela první ve světě publikovanou práci na toto téma. Nově vyvinutá diferenčně pulzně voltametrická metoda byla rovněž úspěšně aplikována při stanovení metronidazolu v různých lékových formách.

Experimentální část

Chemikálie a vzorky

Zásobní roztok metronidazolu (p.a., Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Německo) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven v deionizované vodě. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův (BR) pufr připravený smícháním zásadité složky (NaOH o koncentraci $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ (p.a., Penta, Praha, ČR)) s kyselou složkou ($85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$, H_3BO_3 (p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a $99,8\% \text{ CH}_3\text{COOH}$ (p.a., Penta, Praha, ČR)) o koncentraci všech kyselin $0,04 \text{ mol l}^{-1}$.

Léčiva, infuzní roztok Efloran 500 mg/100 ml (KRKA, Slovinsko), tableta Entizol 250 mg (Polpharma, Polsko), vaginální tableta Entizol 500 mg (Polpharma, Polsko) a infuzní roztok Noridem 500 mg/100 ml (Noridem Enterprises Limited, Kypr), byla použita pro voltametrické a srovnávací spektrofotometrické stanovení obsahu metronidazolu v lékových formách.

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru Eco-Tribo Polarograf ovládaného programem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Pro měření bylo použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita SBI_{DE} (typ 6.0346.000, Metrohm, Herisau, Švýcarsko), jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda (typ 10-20+polara Ag 10 10-2014-3, $3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Byla použita technika diferenční pulzní voltametrie (DPV) s parametry: šířka pulzu 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), perioda pulzu 150 ms a výška pulzu -50 mV . Ve voltametrické nádobce byly analyzované vzorky o celkovém objemu 20 ml.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 v programu UV-Visible ChemStation verze 9.01 (obojí Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Měřeno bylo v kremenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm proti vodnému roztoku BR pufru o daném pH. Absorbance připravených roztoků byla měřena v rozmezí vlnových délek 200–1100 nm.

Pomocí digitálního pH metru Jenway 3510 (Jenway, Felsted, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou byly připraveny vodné roztoky BR pufru o různém pH.

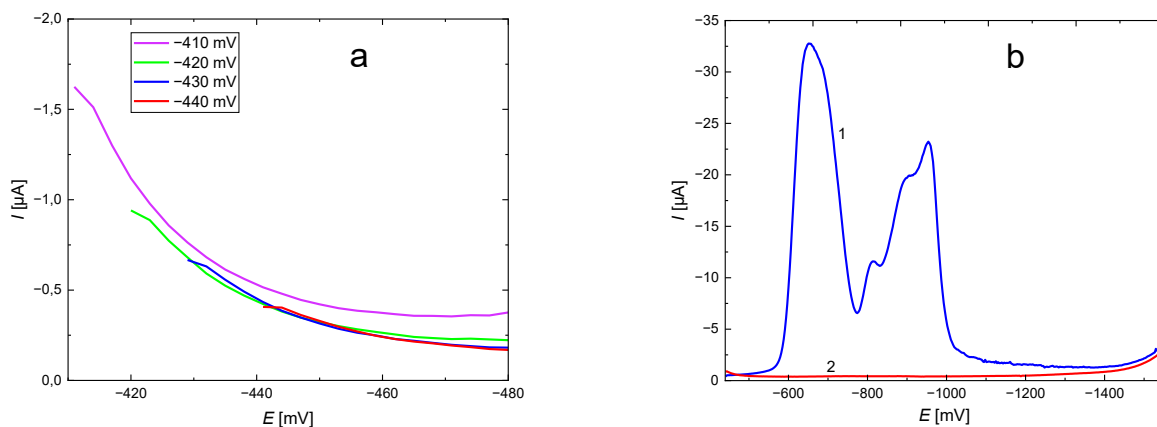
Výsledky a diskuse

Prvním krokem bylo nalezení vhodného počátku potenciálového okna (E_{in}) tak, aby naměřený pík analytu byl co nejlépe vyvinutý, vyhodnotitelný a voltamogramy základního elektrolytu vykazovaly co nejnižší proud pozadí (obr. 1a). SBiDE je velmi citlivá na použití potenciálů, při kterých dochází k tvorbě oxidů bismutu anebo rozpouštění bismutu samotného. Pokud byla bismutová elektroda ponechána v pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, bismut začal oxidovat a vzniklé oxidy byly následně při prvním voltametričtém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou (obr. 1b).

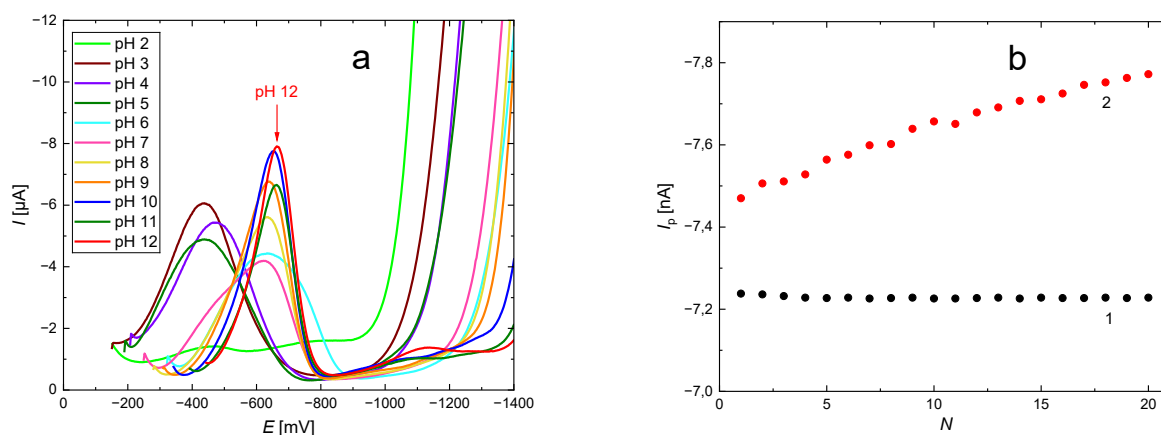
Dalším krokem při vývoji DPV metody bylo nalezení vhodného základního elektrolytu. Chování metronidazolu bylo zkoumáno ve vodném prostředí BR pufru

o pH 2,0–12,0. Z obr. 2a je patrné, že metronidazol ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 3,0–12,0 poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, který odpovídá čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na odpovídající hydroxylamin⁵. Jako optimální prostředí pro další měření byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12, pro dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu analytu.

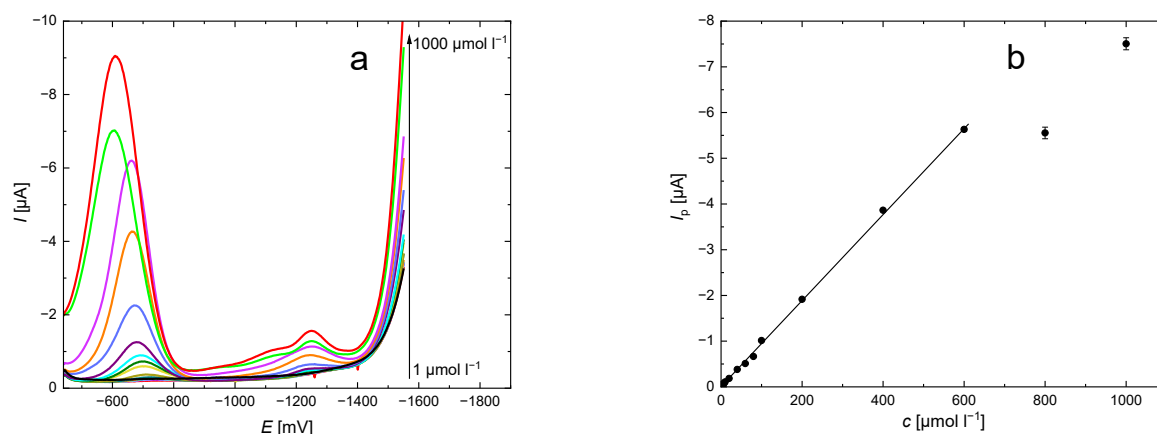
Dále bylo zjišťováno, zda je zapotřebí zakomponovat elektrochemickou regeneraci při opakovaných DPV stanoveních metronidazolu na SBiDE, aby nedocházelo k pasivaci pracovní elektrody a stanovení vykazovala dobrou opakovatelnost. Regenerační potenciály⁷ $E_{in,r} = -490$ mV a $E_{fin,r} = -1500$ mV byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech). Aplikované regenerační potenciály mírně zvýšily proudovou odezvu metronidazolu, avšak zhoršily opakovatelnost (docházelo k postupnému nárůstu výšky



Obr. 1. (a) Stanovení počátku potenciálového okna vodného roztoku BR pufru o pH 12 na SBiDE technikou DPV. (b) Příklad prvního (1) a druhého (2) měření ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 na SBiDE technikou DPV při $E_{in} = -440$ mV



Obr. 2. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE ve vodných roztocích BR pufru o pH 2–12. (b) Závislost proudové odezvy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) na pořadovém čísle měření (N) ($n = 20$), měřeno na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 technikou DPV bez použití regeneračních potenciálů (1) a s regeneračními potenciály $E_{in,r} = -490$ mV, $E_{fin,r} = -1500$ mV (2)



Obr. 3. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1\text{--}1000 \mu\text{mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1\text{--}1000 \mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: $I_p [\text{nA}] = -9,47c [\mu\text{mol l}^{-1}] - 0,585$; $r^2 = 0,9993$

Tabulka I

Parametry kalibračních přímk metronidazolu pro techniku DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12

$c [\mu\text{mol l}^{-1}]$	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	r^2
1–10	–10,2	–2,62	0,9963
10–100	–9,43	10,2	0,9723
100–600	–9,30	–84,8	0,9976

píku), proto byla následující měření technikou DPV prováděna bez vkládání těchto regeneračních potenciálů (obr. 2b).

Kalibrační závislosti metronidazolu byly měřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Kalibrace byla proměřena kromě optimálního prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 také v prostředích o pH 3 a 7. Jevilo se jako zajímavé zjistit, jaký průběh bude mít koncentrační závislost metronidazolu v prostředích odpovídajících kyselému a neutrálnímu charakteru, avšak pro stanovení metronidazolu je kyselé i neutrální prostředí nevyhovující. Kalibrační závislost v prostředí BR pufru o pH 12 je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu $1 \cdot 10^{-6}$ – $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Mez stanovitelnosti (L_Q ; $10\sigma/k$) činila $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a mez detekce (L_D ; $3\sigma/k$) tedy

$4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Na obr. 3a jsou znázorněny voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí BR pufru o pH 12. Na obr. 3b je zobrazena odpovídající kalibrační závislost velikosti píku metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). V tabulce I jsou uvedeny parametry jednotlivých kalibračních přímk.

Voltametrické stanovení množství metronidazolu v léčivech bylo prováděno metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, v tabletech Entizol 250 mg, vaginální tabletech Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml. Pro měření metodou DPV byly připraveny 20ml roztoky BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200 μl zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 50 μl zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$), jehož

Tabulka II

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidávaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12

Léčivo	$c_{\text{standard metronidazolu}} [\mu\text{mol l}^{-1}]$	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	r^2
Infuzní roztok Efloran	0–400	–7,31	–132	0,9961
Tableta Entizol 250 mg	0–600	–7,08	–775	0,9982
Tableta Entizol 500 mg	0–600	–4,80	–466	0,9944
Infuzní roztok Noridem	0–600	–7,42	–580	0,9991

Tabulka III

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí UV-Vis spektrometrie zaznamenané v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12 v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm

Léčivo	$c_{\text{standard metronidazolu}}$ [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Směrnice [l mol^{-1}]	Úsek	r^2
Infuzní roztok Efloran	0–60	$7,96 \cdot 10^3$	0,256	0,9999
Tableta Entizol 250 mg	0–80	$7,76 \cdot 10^3$	0,167	0,9957
Tableta Entizol 500 mg	0–80	$7,60 \cdot 10^3$	0,131	0,9940
Infuzní roztok Noridem	0–80	$7,94 \cdot 10^3$	0,167	0,9995

Tabulka IV

Hodnoty spočteného množství metronidazolu v léčivech vztažené k deklarovanému množství metronidazolu na obalech léčiv získané pomocí nově vyvinuté metody ($w_{\text{voltametrie}}$) a srovnávací analytické metody ($w_{\text{spektrometrie}}$). Poměr výše uvedených hodnot $w_{\text{voltametrie}} / w_{\text{spektrometrie}}$ pak udává skutečnou výtěžnost metody DPV na SBiDE vůči analytické srovnávací metodě

Léčivo	$w_{\text{voltametrie}}$ [%]	$w_{\text{spektrometrie}}$ [%]	$w_{\text{voltametrie}} / w_{\text{spektrometrie}}$ [%]
Infuzní roztok Efloran	180	161	112
Tableta Entizol 250 mg	127	131	97
Tableta Entizol 500 mg	134	119	113
Infuzní roztok Noridem	78	106	74

objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 50 μl . Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5}$ – $6 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . V tabulce II jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech.

Jako srovnávací metoda k voltametričkému stanovení metronidazolu v léčivech metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek byla použita UV-Vis absorpční spektrometrie. Pro měření metodou přidavku standardu byly připraveny 10ml roztoky BR pufru o pH 12, které obsahovaly 200 μl zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 100 μl zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 μl . Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $6 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} . Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $8 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} . V tabulce III jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tabulce IV jsou porovnané výsledky získané pomocí DPV na SBiDE a UV-Vis spektrometrie.

Závěr

V této práci byla studována nová komerčně dostupná pracovní elektroda – pevná kapková bismutová elektroda (SBiDE) – a její využití pro voltametričké stanovení léčiva metronidazolu technikou diferenční pulzní voltametrie (DPV). Za optimálních podmínek bylo v prostředí BR pufru o pH 12,0 dosaženo $L_D = 4,1 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1} a $L_Q = 1,4 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} .

Nově vyvinutá DPV metoda byla využita za dříve získaných optimálních podmínek pro stanovení léčiva metronidazolu v lékových formách – v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablete Entizol 250 mg, vaginální tablete Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml.

Zvolená voltametričká metoda byla porovnána se srovnávací analytickou metodou (UV-Vis absorpční spektrometrie), přičemž stanovení probíhala v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12. U infuzního roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablety Entizol 250 mg a tablety Entizol 500 mg jsou hodnoty stanoveného množství léčiva metronidazolu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) za daných optimálních podmínek při použití DPV na SBiDE a UV-Vis spektrometrie srovnatelné. U infuzního roztoku Noridem bylo voltametričkou metodou stanoveno 78 % metronidazolu a spektrofotometričnou metodou bylo stanoveno 106 % metronidazolu. Z toho vyplývá, že DPV na SBiDE je vhodná pro stanovení metronidazolu

v následujících lékových formách: infuzní roztok Efloran 500 mg/100 ml, tableta Entizol 250 mg a vaginální tableta Entizol 500 mg.

LITERATURA

1. Metrohm: https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html, staženo 24. 4. 2023.
2. Švancara I., Prior C., Hočevar S. B., Wang J.: *Electroanalysis* 22, 1405 (2010).
3. Raether W., Hänel H.: *Parasitol. Res.* 90, S19 (2003).
4. Edwards D. I.: *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9 (1993).
5. Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C.: *Drugs* 54, 679 (1997).
6. Meenakshi S., Rama R., Pandian K., Gopinath S. C. B.: *Microchem. J.* 165, 1 (2021).
7. Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2957 (2011).

J. Jarošová and V. Vyskočil (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Solid Bismuth Drop Electrode – A New Tool for Voltammetric Determination of Electrochemically Reducible Organic Compounds**

Solid bismuth drop electrode (SbIDE) is a new working electrode commercially available on the Czech market from 2020 by the company Metrohm. The aim of this work was to verify the applicability of the SbIDE in the voltammetric determination of a model organic substance. According to the available information, this is the very first published work on this topic. Metronidazole (an antibiotic used to treat diseases caused by both Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria) was chosen in this study as a model drug representing electrochemically reducible biologically active compounds. Under optimum conditions (Britton-Robinson buffer of pH 12.0 used as the supporting electrolyte and no electrochemical regeneration of the working electrode surface), a linear calibration dependence of metronidazole was recorded in the concentration range from 1 to 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The newly developed differential pulse voltammetric (DPV) method has also been successfully applied in the determination of metronidazole in various dosage forms.

Keywords: metronidazole, antibiotics, drug analysis, electrochemistry, differential pulse voltammetry, solid bismuth drop electrode



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.

LIPIDOMICKÁ ANALÝZA MAKROFÁGŮ METODOU LC-MS

KATEŘINA PRAŽÁKOVÁ^{a,b}, VLADIMÍR VRKOSLAV^b, ŠTĚPÁN STRNAD^b, BARBORA MUFFOVÁ^c, SOŇA KAUEKOVÁ^c, JIŘÍ FRONĚK^c, IVANA KRÁLOVÁ LESNÁ^c, RUDOLF POLEDNEC^c a DAVID SÝKORA^a

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, ^c Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9 140 21 Praha 4, Česká republika
prazakoa@vscht.cz

Klíčová slova: makrofágy, lipidomika, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20240066>

Úvod

V současnosti je v populaci pozorována zvyšující se incidence kardiovaskulárních chorob. Významným faktorem přispívajícím k jejich rozvoji je obezita a s ní spojené prozánětlivé procesy probíhající v tukové tkáni. Těch se významně účastní makrofágy, buňky nespecifického imunitního systému, které se dále dělí na prozánětlivé a protizánětlivé¹. Pro lepší pochopení probíhajících dějů je potřebné zabývat se analýzou lipidomu makrofágů z těchto dvou zmíněných skupin. Předkládaná práce byla zaměřena na optimalizaci vybraných parametrů LC-MS metody pro analýzu 71 lipidů z 16 lipidových tříd. Dalším cílem práce byla detailní charakterizace retenčních závislostí pro jednotlivé třídy lipidů za optimalizovaných chromatografických podmínek. LC-MS metoda byla následně aplikována pro analýzu lipidomu reálných vzorků makrofágů izolovaných z tukové tkáně ledvin dárců při transplantaci.

Experimentální část

Pro optimalizaci LC-MS metody byl využit směsný roztok standardů lipidů připravený ze směsi lipidů UltimateSPLASH™ ONE, cholesterolu a 16:0 kardiolipinu (vše Avanti Polar Lipids, USA). Seznam tříd lipidů obsažených ve směsi včetně počtu zástupců z jednotlivých tříd uvádí tab. I. Analýza probíhala na hmotnostním spektrometru Orbitrap IQ-X Tribrid (Thermo Scientific, USA) spojeném s chromatografickým systémem tvořeným autosamplrem

TriPlus RSH Smart 850, kvartérním čerpadlem a kompartmentem na kolony z řady Vanquish (vše Thermo Scientific, USA). Optimalizace vycházela z již publikované LC-MS metody². Mobilní fáze se skládala ze dvou složek. Složkou A byla směs acetonitrilu a ultračisté vody (60:40 (V/V)). Složkou B byla směs propan-2-olu a acetonitrilu (90:10 (V/V)). Obě složky obsahovaly přísadek mravenčanu amonného (koncentrace 10 mmol l⁻¹) a mravenčí kyseliny (0,1 obj.%). Výchozí nastavení průběhu gradientové eluce bylo následující: 0 min (30 % B), 2 min (43 % B), 2,1 min (55 % B), 12 min (65 % B), 18 min (85 % B), 20 min (100 % B), 20–25 min (100 % B), 25,1 min (30 % B) a 25,1–30 min (30 % B). Nastříkáváno bylo 5 µl vzorku pro měření v pozitivním módu a 10 µl vzorku pro měření v negativním módu elektrosprejové ionizace. Parametry elektrospreje uvádí tab. II. Skenování probíhalo v rozsahu m/z 250 až 1600. Hmotnostní spektra byla měřena s rozlišením 120 000.

Optimalizace se postupně soustředila na výběr vhodné stacionární fáze (testování čtyř kolon), nastavení průtoku mobilní fáze (varianty 180 µl min⁻¹ a 300 µl min⁻¹), desolvační teploty elektrospreje (varianty 300 °C, 350 °C,

Tabulka I
Seznam lipidových tříd obsažených ve směsném vzorku

Třída lipidů	Zkratka	Počet lipidů
Triacylglyceroly	TG	9
Cholesterol a cholesterylestery	Chol	6
Ceramidy	Cer	5
Diacylglyceroly	DG	5
Fosfatidylethanolaminy	PE	5
Fosfatidylglyceroly	PG	5
Fosfatidylcholin	PC	5
Fosfatidylinositoly	PI	5
Fosfatidylseriny	PS	5
Sfingomyeliny	SM	5
Lysofosfatidylethanolaminy	LPE	3
Lysofosfatidylglyceroly	LPG	3
Lysofosfatidylcholin	LPC	3
Lysofosfatidylinositoly	LPI	3
Lysofosfatidylseriny	LPS	3
Kardiolipiny	CL	1

Tabulka II
Vybrané výchozí parametry iontového zdroje

Parametr	Hodnota
Napětí (pozitivní mód)	3500 V
Napětí (negativní mód)	2800 V
Sušicí plyn	40 Arb
Pomocný plyn 1	3 Arb
Pomocný plyn 2	2 Arb
Teplota kapiláry	320 °C
Desolvační teplota	300 °C

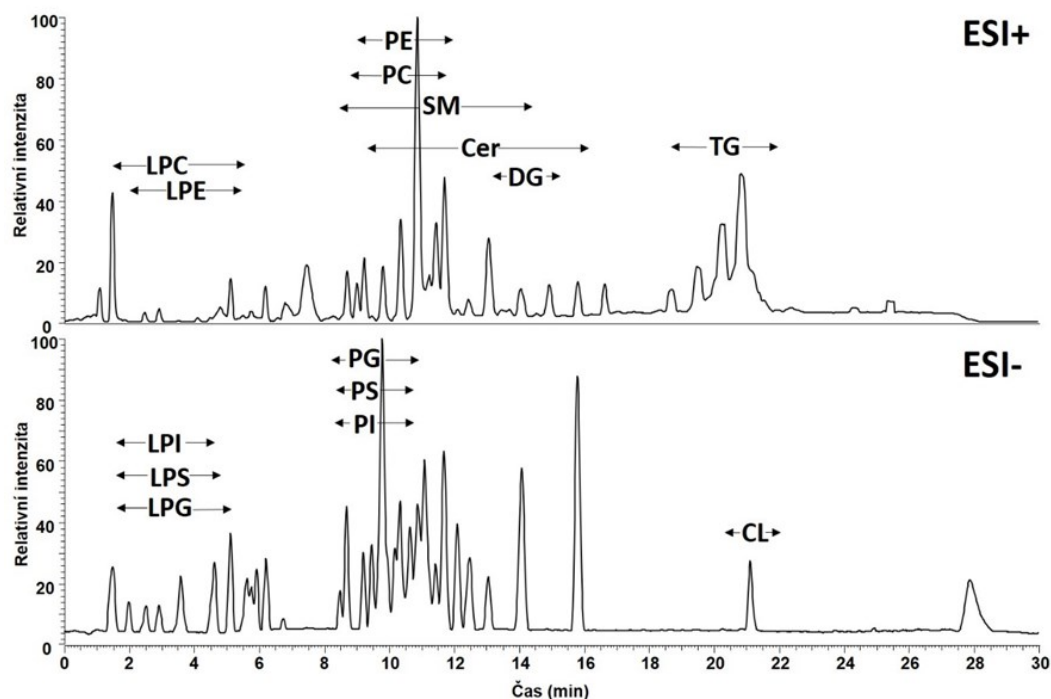
400 °C), počátečního bodu gradientové eluce (počátek na 30 % B a 0 % B) a teploty kolony (45 °C, 55 °C). K vyhodnocení byly využity programy Xcalibur™ (Thermo Scientific, USA) a MZmine 3 (cit.³). Volba optimálního nastavení parametrů metody proběhla na základě výpočtu a maximalizace píkových kapacit pro jednotlivé třídy, resp. zhodnocení intenzity signálu v případě výběru desolvační teploty. Důraz byl kladen rovněž na tvar píků, který byl zásadní pro správný odečet parametrů, jako je retenční čas a šířka píku v polovině jeho výšky.

Za výsledných optimalizovaných podmínek byla změněna směs standardů lipidů a pro každou třídu byly detailně zmapovány retenční závislosti. Následně byly provedeny pilotní experimenty se vzorky makrofágů od pěti dárců. Makrofágy od každého jedince byly rozděleny na prozá-

nětlivé (přítomnost charakteristických znaků CD14+, CD16+) a protizánětlivé (přítomnost znaků CD14+, CD16-) pomocí průtokové cytometrie. Izolované a rozříděné vzorky makrofágů dodal kolektiv pracoviště Centra experimentální medicíny na Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). Tyto vzorky byly podrobeny extrakci (postup adaptován dle cit.⁴) a analyzovány za optimalizovaných podmínek LC-MS metody. Pro vyhodnocení dat byl použit program Lipid-Search™ (Thermo Scientific, USA). Statistická analýza byla provedena pomocí MetaboAnalyst⁵.

Výsledky a diskuse

Prvním krokem optimalizace byl výběr vhodné kolony. Testovány byly čtyři kolony určené pro chromatografii na reverzních fázích: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm × 50 mm (Waters, USA), Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm × 100 mm (Waters, USA), Accura Triart C18, 1,9 μm, 2,1 mm × 50 mm (YMC, Japonsko) a Accura Triart C18 ExRS, 1,9 μm, 2,1 mm × 50 mm (YMC, Japonsko). Jako nejvhodnější byla experimentálně identifikována kolona Acquity UPLC BEH C18 o délce 100 mm. Ze všech testovaných kolon umožnila dosažení nejvyšší píkové kapacity pro 9 z 16 lipidových tříd a zároveň poskytla u všech lipidových tříd píky přijatelného tvaru. Zvýšení průtoku mobilní fáze na 300 μl min⁻¹ ukázalo výrazný vliv na navýšení píkové kapacity u 15 tříd

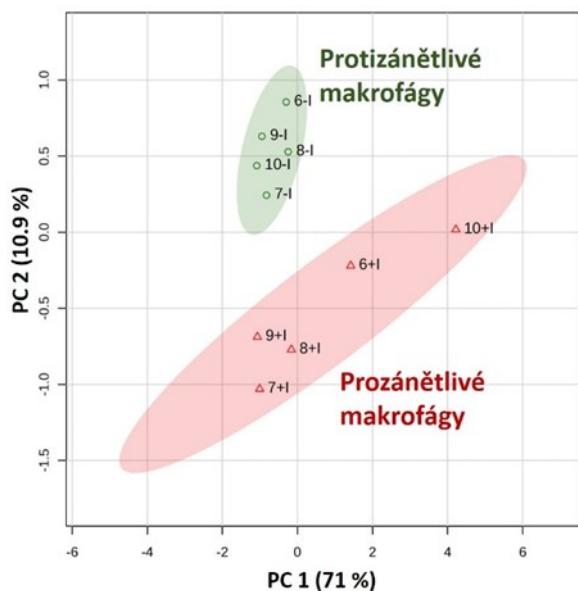


Obr. 1. LC-MS chromatogram pro měření v pozitivním (ESI+) a v negativním (ESI-) módu ionizace včetně vyznačení retenčních okén lipidových tříd; zkratky viz tab. I

z 16 (průměrně o 51 % oproti výchozímu nastavení $180 \mu\text{l min}^{-1}$). Optimální nastavení desolvační teploty bylo vyhodnoceno na základě porovnání intenzit signálů. Pro osm lipidových tříd bylo nejvyšších intenzit dosaženo při teplotě $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukázalo se, že snížení počátečního zastoupení složky B v mobilní fázi na 0 % zvýšilo píkove kapacity pro 11 lipidových tříd. Nejvýraznější nárůst byl pozorován u tříd LPC (zvýšení o 42,8 %) a LPE (zvýšení o 47,9 %). Posledním optimalizovaným parametrem byla teplota kolony. U 13 lipidových tříd bylo s teplotou kolony $55 \text{ }^\circ\text{C}$ dosaženo vyšších píkovek kapacit. Průměrně narostla píkova kapacita o 24,5 %. Obr. 1 ukazuje LC-MS chromatogram základního píku za optimalizovaných podmínek v pozitivním a v negativním módu ionizace. Vyznačena jsou retenční okna jednotlivých tříd lipidů.

Za optimalizovaných podmínek byly zjištěny retenční závislosti jednotlivých tříd lipidů, tj. závislosti retenčního času na parametru ECN (equivalent carbon number), který lze vypočítat jako $\text{ECN} = \text{HCN} - 2n$, kde HCN odpovídá počtu atomů uhlíku ve všech acylových řetězcích daného lipidu a n odpovídá počtu dvojných vazeb v těchto řetězcích⁶. Závislosti bylo možné vhodně proložit lineárním modelem (dosaženo $R^2 > 0,99$).

Rovněž byly provedeny první analýzy reálných vzorků makrofágů. Po zpracování naměřených dat v programu LipidSearchTM bylo pro další vyhodnocení využito 39 lipidů z osmi různých tříd (Cer, DG, PC, PE, SM, TG, PI, PS). Obr. 2 zobrazuje graf komponentního skóre získaný metodou hlavních komponent. Pomocí prvních dvou hlavních komponent bylo možno vysvětlit celkem 81,9 % rozptylu vstupních dat. Z grafu je patrné, že došlo k rozdělení vzorků prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů.



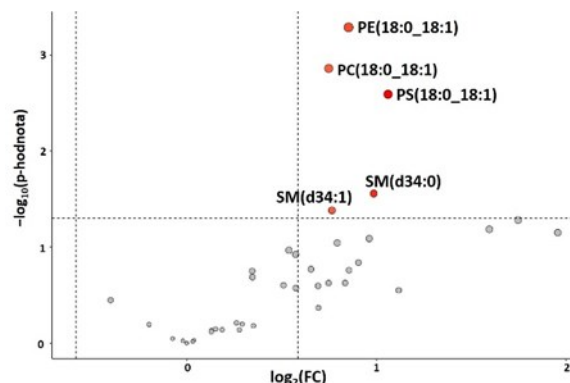
Obr. 2. Diagram komponentního skóre; analýza hlavních komponent pro sadu vzorků makrofágů

do dvou oddělených oblastí. Obr. 3 znázorňuje vulkánový graf. Prahová hodnota změny (fold change, FC) byla 1,5 a prahová p -hodnota byla nastavena na 0,05. Červeně je v grafu zvýrazněno pět lipidů, jejichž koncentrace byla u prozánětlivých makrofágů významně zvýšena (alespoň 1,5krát). Jednalo se o dva zástupce z třídy SM a fosfolipidy z tříd PE, PS, PC obsahující ve své struktuře acylové zbytky stearové kyseliny (18:0) a olejové kyseliny (18:1).

Závěr

V předkládané práci byla provedena optimalizace LC-MS metody pro analýzu 71 lipidů z 16 tříd. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při separaci na koloně Acquity UPLC BEH C18 o délce 100 mm při průtoku mobilní fáze $300 \mu\text{l min}^{-1}$, zastoupení 100 % složky A v mobilní fázi na počátku analýzy a teplotě kolony $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Desolvační teplota elektrospreje byla nastavena na $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Za optimalizovaných podmínek byly změřeny retenční závislosti pro jednotlivé třídy lipidů, které byly v následujících analýzách použity pro ověření správné identifikace lipidů. Proběhla pilotní měření vzorků makrofágů izolovaných z tukové tkáně. Analýza hlavních komponent poskytla pohled na shlukování vzorků prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů. Bylo zjištěno, že lipidomická analýza má potenciál rozlišit prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy. Vulkánový graf dále ukázal, že v případě prozánětlivých makrofágů byla významně zvýšena koncentrace u pěti lipidů. Pro potvrzení dosažených závěrů a další rozvoj metody bude ovšem třeba proměřit větší skupinu vzorků makrofágů.

Podpořeno projektem Národního institutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – financováno Evropskou unií – Next Generation EU.



Obr. 3. Vulkánový graf; červeně zvýrazněny lipidy s významně zvýšenou koncentrací u prozánětlivých makrofágů, prahová změna 1,5, prahová p -hodnota 0,05

LITERATURA

1. Liang W., Qi Y., Yi H., Mao C., Meng Q., Wang H., Zheng C.: *Front. Immunol.* *13*, 908749 (2022).
2. Mrázíková L., Hojná S., Vaculová P., Strnad Š., Vrkoslav V., Pelantová H., Kuzma M., Železná B., Kuneš J., Maletínská L.: *Nutrients* *15*, 280 (2023).
3. Schmid R. a 41 spoluautorů: *Nat. Biotechnol.* *41*, 447 (2023).
4. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T. V., Shevchenko A., Schwudke D.: *J. Lipid Res.* *49*, 1137 (2008).
5. <https://www.metaboanalyst.ca>, staženo 17. 1. 2024.
6. Lange M., Ni Z., Criscuolo A., Fedorova M.: *Chromatographia* *82*, 77 (2019).

K. Pražáková^{a,b}, V. Vrkoslav^b, Š. Strnad^b, B. Muffová^c, S. Kauerová^c, J. Froněk^c, I. K. Lesná^c, R. Poledne^c, and D. Sýkora^a (^a*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Prague*, ^b*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague*, ^c*Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic*):
LC-MS Lipidomic Analysis of Macrophages

Currently, an increasing incidence of cardiovascular diseases is observed in the population. Factors contributing to their development are obesity and pro-inflammatory processes occurring in the adipose tissue. Macrophages, cells of the non-specific immune system, which can be divided into pro-inflammatory and anti-inflammatory, play a significant role in these processes. For a better understanding of these phenomena, it is necessary to analyze the lipidome of macrophages of the two mentioned groups.

The presented work was focused on the optimization of selected parameters of the LC-MS method for the analysis of 71 lipids from 16 lipid classes. Best results were achieved with column Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) operating at the flow rate of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ and temperature of 55 $^{\circ}\text{C}$. The optimal desolvation temperature was 350 $^{\circ}\text{C}$ and the gradient elution started at 0 % of solvent B in the mobile phase. Retention dependencies were characterized for individual lipid classes. They were successfully fitted with a linear model ($R^2 > 0.99$) and subsequently used to confirm the accuracy of lipid identification. The optimized LC-MS method was also used to analyze the real samples of macrophages isolated from the adipose tissue of kidney donors. Samples were provided by Institute for Clinical and Experimental Medicine. The principal component analysis gave insight into the division of macrophages according to their type. The volcano plot showed a significant increase in the concentration of five lipids in the case of pro-inflammatory macrophages.

Keywords: macrophages, lipidomics, liquid chromatography, mass spectrometry

Acknowledgements

Supported by the project National Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease Research (EXCELES Program, ID: LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.



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. Jarošová, V. Vyskočil</i>	Pevná bismutová kapková elektroda – nový nástroj pro voltametrické stanovení elektrochemicky redukovatelných organických sloučenin	61
<i>K. Pražáková, V. Vrkošlav, Š. Strnad, B. Muffová, S. Kauerová, J. Froněk, I. Králová Lesná, R. Poledne, D. Sýkora</i>	Lipidomická analýza makrofágů pomocí LC-MS	66

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Froněk J. 66

Jarošová J. 61
Kauerová S. 66
Králová Lesná I. 66

Muffová B. 66

Poledne R. 66
Pražáková K. 66

Strnad Š. 66
Sýkora D. 66

Vrkoslav V. 66
Vyskočil V. 61

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 22 (2024), 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: 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 12.5.2024.