



Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2016“

3. a 4. února 2016

Ústí nad Labem



Editoři sborníku:

Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil
Zdeňka Kolská

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



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



MERCK



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

Vážení čtenáři,

již několik let, vždy na počátku února, mám tu čest sedět v hodnotící komisi soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie. S velkým zájmem sleduji a užívám si, jak narůstá počet i kvalita soutěžících a jejich příspěvků. Je to soutěž „putovní“ a již téměř 20 let putuje po českých vysokých školách a k radosti nás starších, co se nám občas zasteskne po slovenštině, se z ní poslední roky díky narůstajícímu počtu slovenských účastníků stává mezinárodní akce.

Organizace letošního, již 19. ročníku soutěže se ujalo Ústecké materiálové centrum a katedra fyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické. Akce proběhla na půdě UJEP ve dnech 3. a 4. února 2016 a záštitu nad ní převzal doc. RNDr. Jaroslav Pavlík, CSc., děkan PŘF UJEP. Soutěž nesla do roku 2014 název „O cenu firmy MERCK“, která dlouhá léta tuto akci sponzorovala, nyní se koná za podpory mnoha partnerů, jejichž loga jsou součástí úvodní stránky tohoto Sborníku. Od roku 2015 je pořádána pod novým názvem „CENA KARLA ŠTULÍKA“, protože prof. Ing. Karel Štulík, DrSc. byl dlouholetým předsedou Odborné skupiny analytické chemie, mezinárodně uznávaným odborníkem v analytické chemii, ale především vynikajícím člověkem, který měl rád analytickou chemii, a který měl vzácně lidský vztah i k studentům. Především však díky nadšení a obětavosti členů výboru Odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické, zejména prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc., a spolupráci různých kateder českých a slovenských vysokých škol, se soutěž koná již téměř 20 let.

Letošní ročník se uskutečnil v nových prostorách Multifunkčního centra Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, v Zelené aule v kampusu UJEP, a do soutěže se přihlásilo 25 účastníků ze sedmi českých a jedné slovenské vysoké školy. Některé ze škol měly zastoupení i několika fakult. Na průběh soutěže a výběr nejlepších dohlížela hodnotící komise skládající se z profesorů, docentů a odborníků českých a slovenských vysokých škol reprezentují-

cí prakticky všechna zúčastněná pracoviště, ve složení doc. Ing. Martin Adam, Ph.D., prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., doc. Ing. Zdeňka Kolská, Ph.D., doc. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D., Ing. David Milde, Ph.D., doc. Ing. Zuzana Navrátilová, CSc., Ing. Radmila Řápková, doc. Ing. Lubomír Švorc, Ph.D., prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. a doc. Ing. Kamil Záruba, CSc., která měla přetěžký úkol vybrat vítěze mezi tak kvalitními soutěžícími.

A jako každý rok jsem si po celé 2 soutěžní dny říkala, že chemie, ani nadšení mladých pro chemii, snad nemá před sebou žádnou černou budoucnost, která je jí občas předpovídána, že zájem o tento úžasný vědní obor možná malinko klesá, ale na druhé straně jsou na našich školách přeci jen nadějní, nadšení studenti, kteří měli to štěstí, že někde na jejich cestě po základních, středních, či vysokých školách padli do rukou některému z úžasných kantorů, kteří je přivedli právě k chemii, či dokonce analytické chemii. Velmi si vážím(e) všech odvážných studentů, kteří se každý rok do soutěže přihlásí. Je úžasné pozorovat, že i v dnešní hektické době, protkané spoustou možností, jak trávit čas, jim nevádí obětovat dlouhé měsíce každodenní piplavé práce v laboratořích, psaní článků, kreslení grafů, přípravě prezentací a dokonce je to i baví. Velmi děkuji (eme) všem učitelům a školitelům, kteří se těmto mladým věnují, nadchnou je pro svůj obor, vedou je v jejich práci. A to vše nad rámec pouhých povinností, které musí jak školitel, tak student plnit. Je to (snad) známka toho, že chemie je přeci jen v očích, i mnoha mladých, stále ještě atraktivní obor. Počet přihlášek každý rok stoupá a kvalita prací je velmi vysoká a bývá čím dál obtížnější vybrat ty nejlepší.

Velmi také děkujeme všem partnerům, kteří tuto akci pro mladé finančně letos podpořili, firmám, fakultám a vysokým školám za jejich finanční, materiální i morální podporu, a jejichž výčet a loga jsou uvedeny na jiném místě sborníku.

Ať se analytické chemii, ale raději celé CHEMII, takto daří i nadále.

Zdeňka Kolská

Dne 13. 2. 2016 by se dožil 75 let prof. Ing. Karel Štulík, DrSc., významný představitel české analytické chemie a dlouholetý předseda odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické. Jistě důstojným uctěním památky tohoto vynikajícího vědce, pedagoga i člověka byl zdárný průběh soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie, která nese od loňského roku jeho jméno. Jméno, které je, alespoň v mých očích, synonymem příkladného, lidského, přátelského a přitom odborně náročného vztahu ke studentům. Letos tato soutěž o Cenu Karla Štulíka proběhla díky nadšení a obětavosti našich ústeckých kolegů z Ústeckého materiálového centra a katedry fyziky v moderním a příjemném prostředí Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem. Zástitou nad akcí převzal děkan Přírodovědecké fakulty UJEP doc. RNDr. Jaroslav Pavlík, CSc. Zúčastnilo se jí 25 účastníků z jedné slovenské a sedmi českých vysokých škol, jejichž seznam lze nalézt na webovských stránkách této soutěže (<http://umc.ujep.cz/stulik-2016.html>). Zcela bezchybně se své role zhostil organizační výbor ve složení doc. Ing. Zdeňka Kolská, PhD., Mgr. Jana Marešová, Lýdie Kováčová, Mgr. Monika Benkocká, Bc. Simona Lupínková, Bc. Klára Jirouňková, Zdeňka Kolská ml. a Martina Kolská, který zvládl všechny úkoly s takovým přehledem, elegancí a taktem, že si rozhodně zaslouží mé nejvyšší poděkování.

Složení organizačního výboru do jisté míry odráželo i složení soutěžících, v němž také dominovaly představitelky něžného pohlaví. Bez ohledu na konečné umístění je nutné vyzdvihnout vynikající výkony a odvedenou práci všech soutěžících. Jejich vystoupení byla více než důstojnou reprezentací jejich mateřských pracovišť a snesla i náročné mezinárodní měřítko.

Porota dospěla k následujícímu výroku:

1. místo získal **Bc. Filip Smrčka**, Ústav chemie, PřF, **Masarykova univerzita v Brně** a Středoevropský technologický institut (CEITEC), za práci *Duální senzor na bázi Eu(III) komplexu*.

2. místo získala **Petra Komenská**, Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Katedra analytické chemie, PřF, **Univerzita Palackého v Olomouci**, za práci *Příprava a testování tříenzymového biosenzoru pro stanovení laktózy*.

3. místo získal **Bc. et Bc. Jiří Trousil**, Ústav analytické chemie, FCHI, **VŠCHT Praha**, ÚMCH AV ČR Praha a Ústav buněčné biologie a patologie, I. Lékařská fakulta UK Praha, za práci *Nanočástice rifampicinu pro léčbu tuberkulózy: příprava a fyzikálně-chemická charakterizace*.

Vzhledem k mimořádné kvalitě přednesených prací se porota rozhodla udělit tři zvláštní ceny poroty následujícím soutěžícím: **Bc. Simoně Lupínkové**, Katedra fyziky a Ústecké materiálové centrum, **PřF UJEP v Ústí nad Labem**, za práci *Analýza chemicky modifikovaných polymerních povrchů*; **Bc. Haně Mackové**, Ústav analytické chemie, Fakulta chemické a potravinářské technologie, **Slovenská technická univerzita Bratislava**, za práci *DNA biosenzory s ochrannými membránami na detekci interakcí DNA v složitých biologických maticích*; **Kristině Matějkové**, Ústav analytické chemie, FCHI, **VŠCHT Praha**, za práci *Stanovení stopových prvků ve vzorcích českého medu*.

Všem oceněným patří naše srdečné blahopřání a všem soutěžícím náš velký dík za odvedenou práci, hluboký zájem o analytickou chemii a dokonalé prezentace. Poděkování patří též všem školitelům, kteří se těmto nadšeným studentům věnují a dokáží v nich vzbudit zájem tak, že svým pracím věnují mnohem více času, než si žádá pouze strohé plnění jejich studijních povinností. Rád bych zde poděkoval i Ing. Radmile Řápkové, výkonné redaktorce časopisu *Chemické listy*, a doc. RNDr. Vlastimilu Vysokčilovi, PhD. za pečlivou přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu *Czech Chemical Society Symposium Series* (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného této soutěži.

Závěrem bych chtěl poděkovat všem sponzorům této soutěže, jmenovitě firmám Carbon Instruments spol. s r.o. Praha, Maneko, spol. s r.o., Praha, Merck Česká republika spol. s r.o., Praha, Metrohm, Česká republika spol. s r.o., Praha, Nicolet CZ spol. s r.o., Spectro CS, spol. s r.o. Ostrava-Zábřeh, Waters Gessellschaft m.b.H., bez jejichž pomoci by se tato akce nemohla uskutečnit. A můj velký dík patří i děkanům a vedení následujících fakult a univerzit za jejich materiální i morální podporu: Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta; Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta; Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická; Univerzita Karlova v Praze, Fakulta přírodovědecká a Farmaceutická fakulta v Hradci Králové; Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta; Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie a Fakulta chemicko-inženýrská; a Mendelova univerzita v Brně. Je dobře, že si tyto renomované vysoké školy uvědomují význam podobných akcí pro přípravu nových odborníků v tak důležité oblasti, jakou je analytická chemie.

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

VOLTAMETRICKÉ STANOVENIE KLINICKÝCH MARKEROV KYSELINY VANILMANDĽOVEJ A HOMO VANILOVEJ NA BÓROM DOPOVANEJ DIAMANTOVEJ ELEKTRÓDE

SIMONA BALUCHOVÁ
a KAROLINA SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ

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

Kľúčové slová: bórom dopovaná diamantová elektróda, homovanilová kyselina, vanilmandľová kyselina, voltametria

Úvod

Kyselina vanilmandľová (VMA) a kyselina homovanilová (HVA), štruktúrne veľmi blízke látky (obr. 1), sú hlavné konečné produkty metabolizmu katecholamínov¹. Najdôležitejšie endogénne katecholamíny sú epinefrín a norepinefrín, ktoré sa prevažne metabolizujú na vanilmandľovú kyselinu, a dopamín, ktorého majoritný metabolit je kyselina homovanilová. Kvantifikácia katecholamínov a ich metabolitov vo fyziologických tekutinách je dôležitá predovšetkým v klinickej chémii, keďže tieto zlúčeniny slúžia ako diagnostické markery pre rôznorodé metabolické² a neurologické poruchy³, vrátane nádorov drene nadobličiek, neuroblastomy⁴ a feochromocytomy⁵. Často je ako diagnostický marker jednotlivých ochorení využívaný i pomer koncentrácií VMA:HVA⁶.

VMA a HVA sú elektroaktívne látky odvodené od fenolu, a preto použitie elektroanalytických metód sa javí ako veľmi vhodné pre ich detekciu a kvantifikáciu. Pre stanovenie VMA a HVA sa využívajú elektródy na báze uhlíka, či už pyrolytický grafit⁶, sklenený uhlík⁷ alebo kompozitné grafitové elektródy⁸, veľmi častá je aj modifikácia elektródového povrchu depozíciou vhodného kovového filmu⁹ alebo organickými látkami pomocou ich elektropolymerizácie^{10,11} či adsorpcie¹², čo môže viesť k zvýšeniu selektivity a citlivosti metódy. Taktiež boli pripravené voltametrické senzory založené na elektróde zo skleneného uhlíku pokryté vrstvou molekulárne vtlačeného polyméru pre vysoko selektívne stanovenie VMA¹³ a HVA⁷.

Táto práca sa zaoberá možnosťami využitia anodicky oxidovanej bórom dopovanej diamantovej (BDD) elektródy¹⁴ pre elektrochemickú oxidáciu VMA a HVA za účelom ich stanovenia pomocou moderných voltametrických techník.

Experimentálna časť

Všetky chemikálie boli kvality p.a. a boli použité bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia: kyselina vanilmandľová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), kyselina homovanilová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), chlorid draselný (Lachema, Brno, ČR), trihydrát hexakvanoželeznatanu draselného (Lachema, Brno, ČR), hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR), kyselina boritá (Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyselina trihydrogénfosforečná (85%, Penta, Chrudim, ČR), kyselina octová (99%, Lachema, Brno, ČR), oxid hlinitý (veľkosť častíc 0,3 μm, Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).

Všetky vodné roztoky boli pripravené za použitia deionizovanej vody (Millipore Mili plus Q systém, Billerica, USA), ktorej odpor nebol menší než 18,2 MΩ.

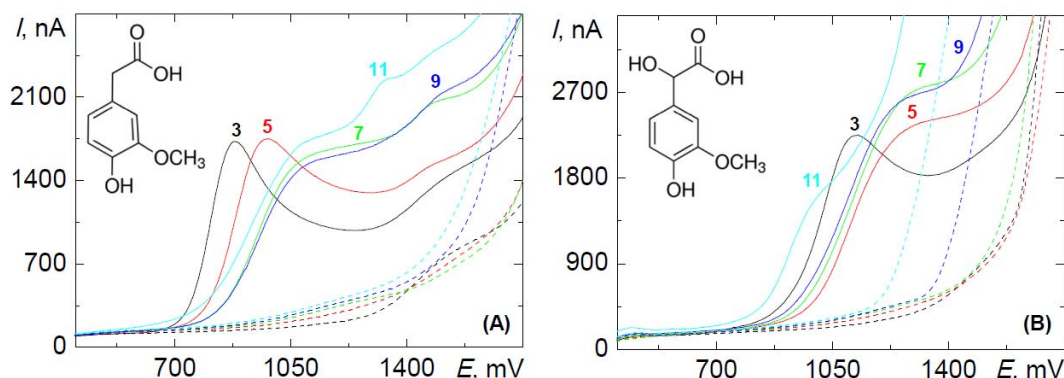
Pre voltametrické merania boli použité prístroje Eco-Tribo Polarograf ovládaný programom PolarPro 5.1 (obe Eco-Trend Plus, Praha, ČR) a PalmSens riadený programom PSTrace 4.5 (obe Palm Instruments, Houten, Holandsko).

Bolo využívané konvenčné trojelektrodové usporiadanie s referenčnou argenticchloridovou elektródou (Ag | AgCl | 3 mol l⁻¹ KCl), pomocnou platinovou elektródou (obe Elektrochemické detektory, Turnov, ČR), a ako pracovná elektróda bola použitá bórom dopovaná diamantová elektróda o priemere 3 mm a ploche 7,1 mm² (Windsor Scientific, Slough Berkshire, UK). Jej elektrochemická aktivita bola testovaná pomocou redoxného systému 1 mmol l⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} v 1 mol l⁻¹ KCl, kedy rozdiel potenciálov anodického a katodického píku pri cyklickej voltametrii (ν = 100 mV s⁻¹) dosahoval po mechanickej aktivácii v podobe leštenia na alumine maximálnu hodnotu 180 mV.

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

Výsledky a diskusia

Merania boli prevedené na komerčne dostupnej diskovovej BDD elektróde, ktorá umožňuje, v prípade jej pasivácie, jednoduché leštenie elektródového povrchu pomocou aluminy. Okrem tohto postupu bola testovaná aj možnosť katodickej a anodickej elektrochemickej aktivácie *in-situ*, keďže elektrooxidácia oboch študovaných látok spôsobuje pasiváciu elektródového povrchu. Jej príčinou je adsorpcia pri oxidácii vzniknutých medziproduktov, dimérov či polymérov, na povrch elektródy. Tieto medzi produkty vznikajú následnými reakciami fenoxyradikálu, prvého medzi produktu oxidácie HVA a VMA. Optimalizá-



Obr. 1. DC voltamogramy (A) HVA a (B) VMA (obe o $c = 0,1 \text{ mmol l}^{-1}$) v BR pufrí, jednotlivé krivky označené podľa pH základného elektrolytu, v ktorom boli zmerané. Na vložených obrázkoch sú znázornené chemické štruktúry študovaných biomarkerov

cia aktivácie medzi jednotlivými scanmi dokázala, že reprodukovateľné výšky signálov pre metódy „direct-current“ (DC) a diferenčnej pulznej (DP) voltametrie je možné dosiahnuť pri použití elektrochemickej anodickej aktivácie, ktorá spočívala vo vložení vysokého kladného potenciálu o hodnote +2400 mV (t.j. v oblasti anodického rozkladu vody) na elektródu po dobu 30 sekúnd za súčasného miešania roztoku.

Elektrochemické správanie oboch látok výrazne závisí na pH hodnotách základného elektrolytu, čo pravdepodobne súvisí s odlišným mechanizmom oxidácie v závislosti na pK_a hodnotách¹⁵ disociácie karboxylovej skupiny (4,35 pre HVA a 3,44 pre VMA) a hydroxylovej skupiny na aromatickom skelete (10,34 v prípade HVA a 9,93 pre VMA). DC voltamogramy v rozmedzí pH 2,0–12,0 sú zaznamenané na obr. 1. Anodický pík sa v prípade HVA vyskytuje v oblasti relatívne vysokých potenciálov +800 až +1100 mV, u VMA v rozsahu potenciálov +870 až +1300 mV. Kyslé prostredie o pH 2,0 a 3,0, kedy je potlačená disociácia oboch kyslých funkčných skupín, je pre ich stanovenie najvhodnejšie, pretože poskytujú jediný výrazný a dobre spracovateľný analytický signál. S rastúcou hodnotou pH sa charakter nameraných voltametrických kriviek zhoršuje. Ako základný elektrolyt pre ich analýzu bol preto zvolený $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 3,0 a boli optimalizované podmienky ich stanovenia.

Kalibračné závislosti oboch skúmaných látok sú lineárne v rozsahu koncentrácií 4 až $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Metódou DCV boli zistené hodnoty medzi detekcie pre HVA $0,99 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, a pre VMA $0,67 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, technikou DPV sa podarilo namerať nižšie hodnoty príslušných limitov pre HVA $0,57 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, a pre VMA $0,41 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Zistené hodnoty limitov detekcie i kvantifikácie sú postačujúce pre odhalenie a stanovenie oboch markerov v moči, kde sa ich kon-

centrácia spravidla pohybuje v rozmedzí $8,2\text{--}41,0 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ v prípade HVA a $11,6\text{--}28,7 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ u VMA¹⁶.

Mechanizmus oxidácií VMA a HVA na BDD elektróde bol študovaný použitím techniky cyklickej voltametrie, po premeraní ich roztokov pri rôznej rýchlosti polarizácie povrchu elektródy a spracovaní príslušných závislostí bolo zistené, že v prípade oboch látok, je ich anodická oxidácia na povrchu BDD elektródy riadený dej.

Taktiež bola overená možnosť súčasnej detekcie HVA a VMA v zmesi, kedy pri rozdielne potenciálov o hodnote približne 220 mV, ktorý je dosahovaný v prostredí o pH 3,0, je BDD elektróda schopná použitím DCV i DPV metódy odlišiť odozvy jednotlivých kyselín, avšak dochádza k čiastočnému prekrytiu ich signálov. Toto prekrytie je zjavné i pri použití „square-wave“ (SW) voltametrie, ktorá bola taktiež optimalizovaná pre stanovenie oboch analytov.

Metóda DPV bola priamo aplikovaná na reálnu vzorku moču, päťkrát zriedenú $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátovým pufr o pH 3,0, ale nepodarilo sa odlišiť signály jednotlivých kyselín v tejto komplexnejšom matrici.

Záver

Bórom dopovaný diamant sa javí ako vhodný elektródový materiál pre vývoj senzora, ktorý by bol za optimalizovaných podmienok schopný stanoviť VMA a HVA v reálnych biologických matriciach, a to predovšetkým v moči. Bolo však zistené, že BDD elektróda neumožňuje súčasne priame stanovenie týchto dvoch významných diagnostických markerov. Preto je nutné ďalší výskum zamerať na možnosť využitia predbežnej separácie a zvýšenie selektivity senzora na báze BDD.

Táto práca bola finančne podporená grantom Grantovej agentúry Českej republiky (projekt GAČR P206/15/02815S).

LITERATÚRA

- Eisenhofer G., Kopin I. J., Goldstein D. S.: *Pharmacol. Rev.* 56, 331 (2004).
- Matsuo M., Tasaki R., Kodama H., Hamasaki Y.: *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 89 (2005).
- Barco S., Gennai I., Reggiardo G., Galleni B., Barbagallo L., Maffia A., Viscardi E., De Leonardi F., Ceginati V., Sorrentino S., Garaventa A., Conte M., Cangelosi G.: *Clin. Biochem.* 47, 848 (2014).
- Monsaingeon M., Perel Y., Simonnet G., Corcuff J. B.: *Eur. J. Pediatr.* 162, 397 (2003).
- Rosano T. G., Swift T. A., Hayes L. W.: *Clin. Chem.* 37, 1854 (1991).
- Li Q. A., Batchelor-McAuley C., Compton R. G.: *J. Phys. Chem. B* 114, 9713 (2010).
- 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).
- Libansky M., Zima J., Berek J., Dejmekova H.: *Mon. Chem.* 147, 89 (2016).
- Selvaraju T., Ramaraj R.: *Electrochim. Acta* 52, 2998 (2007).
- Revin S. B., John S. A.: *Anal. Methods* 4, 348 (2012).
- Hatefi-Mehrjardi A., Ghaemi N., Karimi M. A., Ghassemi M., Islami-Ramchahi S.: *Electroanalysis* 26, 2491 (2014).
- Al Mulla I., Lowry J. P., Serra P. A., O'Neill R. D.: *Analyst* 134, 893 (2009).
- Blanco-Lopez M. C., Lobo-Castanon M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tunon-Blanco P.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 353 (2003).
- Peckova K., Musilova J., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
- Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcao A.: *Anal. Chim. Acta* 768, 12 (2013).
- Garcia A., Heinanen M., Jimenez L. M., Barbas C.: *J. Chromatogr. A* 871, 341 (2000).

S. Baluchová and K. Schwarzová-Pecková (*Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry*): **Voltammetric Determination of Vanillylmandelic and Homovanillic Acid at Boron Doped Diamond Electrode**

The electrochemical oxidation of two main catecholamine metabolites vanillylmandelic acid and homovanillic acid at anodically oxidized boron-doped diamond electrode using voltammetric techniques was investigated. Their behavior in aqueous media depends significantly on pH; the highest and best developed voltammetric signals were obtained in an acidic medium when both organic compounds occur in their non-ionized form. Calibration dependences are linear for both studied compounds in phosphate buffer pH 3.0 in the concentration range from 4 to 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Using differential pulse voltammetry limits of detection for homovanillic acid (LOD = 0.57 $\mu\text{mol l}^{-1}$) and for vanillylmandelic acid (LOD = 0.41 $\mu\text{mol l}^{-1}$) were achieved. The possibility of their simultaneous determination at boron-doped diamond was also verified.

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

APLIKACE POVRCHEM ZESÍLENÉ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI KYSELINY GALLOVÉ

ŠÁRKA HAVLOVÁ a VADYM PROKOPEC

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

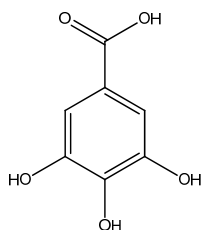
Klíčová slova: povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, kyselina gallová, zlato, stříbro, substrát

Úvod

Kyselina gallová (GA) je přirozeně se vyskytující fenolová kyselina, která je zastoupena v mnoha rostlinách – např. v rostlinách rodu Škumpa (*Rhus*), Vilín (*Hamamelis*) nebo Rosnatka (*Drosera*), nalezneme ji také v Hřebíčkovci kořením (*Syzygium aromaticum*), v dubové kůře, duběnkách nebo v čajových listech. Je obsažena v ovoci (např. v ostružinách, indickém angreštu, hroznovém vínu, vlašském ořechu) a zelenině, v čokoládě, zeleném či bílém čaji nebo také v červeném víně¹.

Kyselina gallová se v rostlinných tkáních nejčastěji vyskytuje ve formě alkyl esterů (tzv. galláty) anebo se váže pomocí esterové vazby na sacharid (především glukózu), čímž vytváří hydrolyzované taniny². Takové gallotaniiny se kyselou nebo bazickou hydrolyzou opětovně štěpí za vzniku kyseliny gallové a glukózy. Kyselina gallová také vzniká katalytickým působením mikrobiálního enzymu tanasy^{1, 3}.

Kyselina gallová je spojena s mnoha biologickými vlastnostmi, díky kterým je velmi prospěšná pro lidské zdraví. Vyznačuje se antioxidačním, protirakovinným, protizánětlivým nebo antimikrobiálním účinkem. Dále protivirovými a protialergenními účinky, působí také jako antimalarikum a chelatační činidlo^{1, 2, 4–7}. Chrání před neurodegenetivními⁸ a kardiovaskulárními⁹ onemocněními, aterosklerosou¹⁰ či před různými typy rakoviny^{11–15}.



Obr. 1. Kyselina gallová

V této práci byly pro zesílení signálu využity zlaté a stříbrné velkoplošné SERS-aktivní substráty, které byly připraveny dvěma odlišnými experimentálními postupy. Kyselina gallová byla sorbována na jejich povrch z roztoků o různých koncentracích a na základě porovnání povrchem zesílených spekter a nezesílených spekter čisté látky bylo studováno adsorpční chování včetně prostorové orientace molekuly vůči povrchu substrátu. Její strukturní vzorec je uveden na obr. 1.

Experimentální část

Zlaté a stříbrné substráty byly připravovány katodickou redukcí na platinových terčích. Zdrojem stejnosměrného elektrického proudu byl BS 525 (Tesla, ČSR). Obvodem procházející proud byl měřen digitálním multimetrem Davo 2. Zlatý drát nebo stříbrný plech byly připojeny ke kladnému pólu zdroje, platinový terč k zápornému pólu. Elektrochemická lázeň pro přípravu zlatých substrátů byla v laboratoři k dispozici ($K[Au(CN)_2]$). Stříbrná lázeň byla před každým pokovováním z důvodu její nestability připravována nová.

Při přípravě zlatých a stříbrných substrátů byly aplikovány proudové sekvence uvedené v tab. I a II. Zlatý substrát musel být ještě po skončení pokovování na 4 h umístěn do vroucího roztoku peroxodisíranu amonného v redestilované vodě, aby se odstranily kyanidové ionty, které se adsorbovaly na zlatý povrch během pokovování.

Tabulka I

Proudové sekvence použité při přípravě zlatých substrátů

Postup 1		Postup 2	
proud [mA]	čas [min]	proud [mA]	čas [min]
5	20	5	10
10	15	10	10
15	10	15	10

Tabulka II

Proudové sekvence použité při přípravě stříbrných substrátů

Postup 1		Postup 2	
proud [mA]	čas [min]	proud [mA]	čas [min]
5	5	5	10
15	10	10	10
–	–	15	10

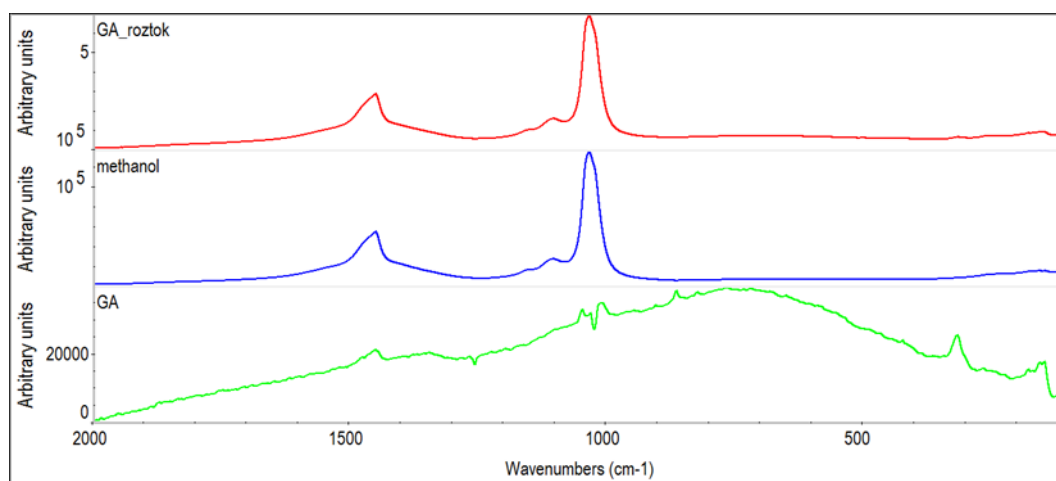
Připravený substrát byl umístěn do vialky s roztokem GA v methanolu o objemu 4 ml, uzavřen a ponechán ve tmě alespoň 20 h při laboratorní teplotě. Bylo studováno adsorpční chování kyseliny gallové s ohledem na její koncentraci. V případě zlata byly měřeny koncentrace roztoku v rozsahu $10^{-3} - 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, pro stříbrné substráty koncentrace $10^{-3} - 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Ramanova spektra byla měřena na disperzním Ramanově spektrometru Advantage NIR (DeltaNu, USA) vybaveném termoelektricky chlazeným diodovým laserem s excitační vlnovou délkou 785 nm. Měření byla provedena s různými výkony laseru (tj. nízký, střední a vysoký), různým integračním časem a po 3 akumulacích. Ramanova spektra byla také měřena FTIR spektrometrem Equinox 55/S (Bruker, SRN), který obsahuje Nd:YAG laser o excitační vlnové délce 1064 nm. Spektra byla zaznamenávána s rozlišením 4 cm^{-1} , 512 skeny a výkonem laseru 300 mW.

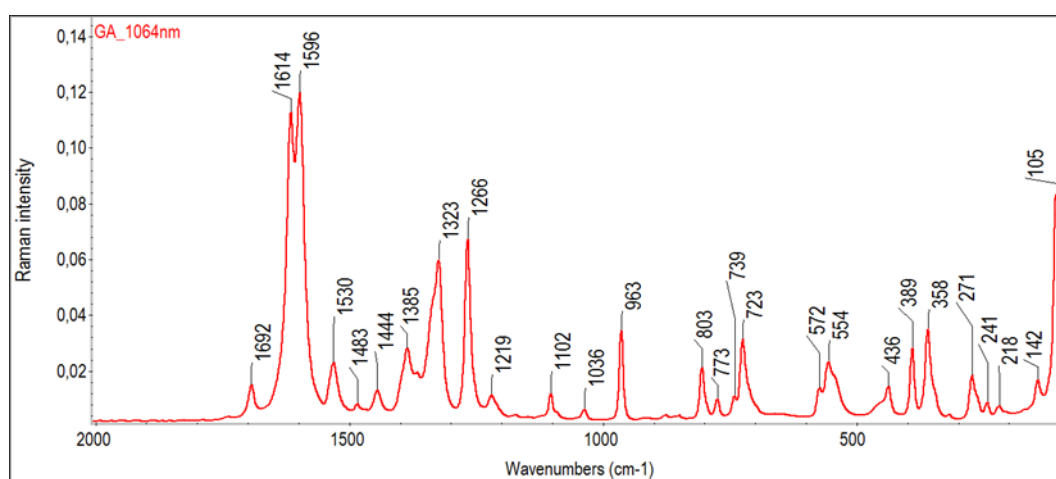
Výsledky a diskuse

Na obr. 2 je uvedeno Ramanovo spektrum roztoku kyseliny gallové v methanolu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, které bylo získáno odečtením příspěvku methanolu z naměřeného spektra. Ačkoli byla měřena nejvyšší koncentrace roztoku kyseliny gallové, ve spektru je pozorováno jen několik pásů náležících čisté látce s velmi nízkou hodnotou poměru signál/šum a v důsledku toho není možné výsledné spektrum použít k porovnání poloh charakteristických pásů v naměřených SERS spektrech. K tomu účelu byla využita Ramanova spektra čisté kyseliny gallové v pevném stavu změřená při excitačních vlnových délkách 785 nm a 1064 nm (obr. 3).

Tab. III shrnuje vybrané vlnočty charakteristických pásů, které se vyskytují ve spektrech pevné GA (jsou uvedeny jako průměr z hodnot vlnočtů polohy maxima při



Obr. 2. Ramanovo spektrum roztoku kyseliny gallové v methanolu ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) po odečtení methanolu



Obr. 3. Ramanovo spektrum kyseliny gallové v pevném stavu při excitační vlnové délce 1064 nm

Tabulka III

Přehled vybraných vlnočtů (cm^{-1}) ve spektru GA a jejich přiřazení k typu vibrace

Čistá GA [cm^{-1}]	Zlato [cm^{-1}]	Stříbro [cm^{-1}]	Přiřazení
1690	–	1698	valenční C=O
1612	–	1615	C-C valenční vibrace benzenového kruhu + deformační OH
1595	1595	1593	C-C valenční vibrace benzenového kruhu + deformační OH
1323	1332	1320	deformační OH + deformační CH
1218	1222	1225	rovinné C-H/X deformační vibrace benzenového kruhu + deformační OH
1101	1091	1100	deformační OH + deformační CH
1035	–	1032	rovinné C-H/X deformační vibrace benzenového kruhu + valenční O-C
962	957	963	C-H valenční vibrace benzenového kruhu + deformační OH
722	733	–	mimorovinné C-H/X vibrace benzenového kruhu + mimorovinné deformace karboxylové OH
572	570	566	rovinné deformace skeletálních atomů CCC
270	263	–	rovinné deformace skeletálních atomů CCO

obou excitací) a jejich přiřazení k jednotlivým vibračním módům studované molekuly. Vlnočty pro SERS jsou také průměrem ze všech hodnot změřených na zlatém resp. stříbrném substrátu.

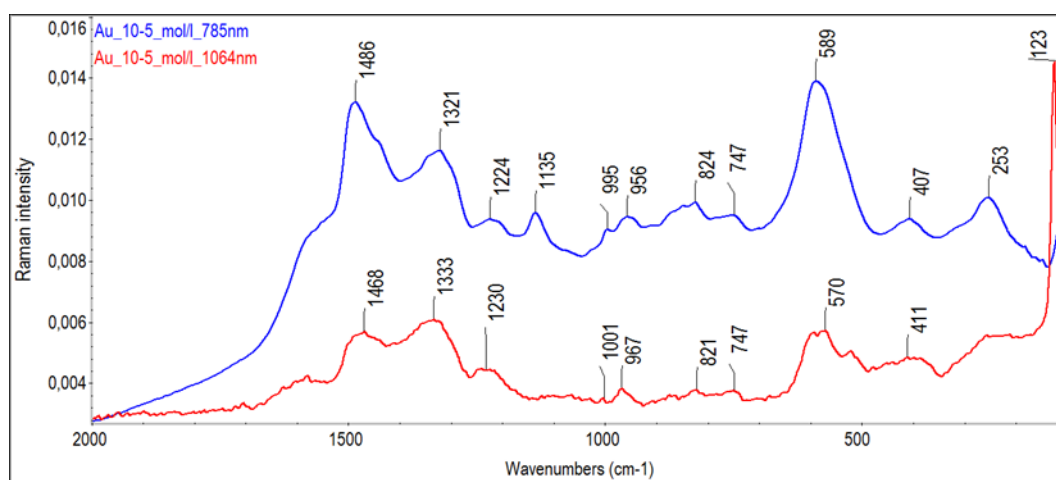
Vyhodnocení SERS spekter kyseliny gallové na zlatě bylo provedeno pro experimenty se zlatým substrátem připraveným dle postupu 2 uvedeného v tab. I. Pro ilustraci jsou uvedena naměřená spektra kyseliny gallové při koncentraci $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4).

Obecně lze pozorovat menší zesílení intenzity pásů, které odpovídají deformačním vibracím OH skupiny, deformačním vibracím CH a valenčním C-H vibracím aromatického jádra. Více zesíleny jsou naopak pásy, které

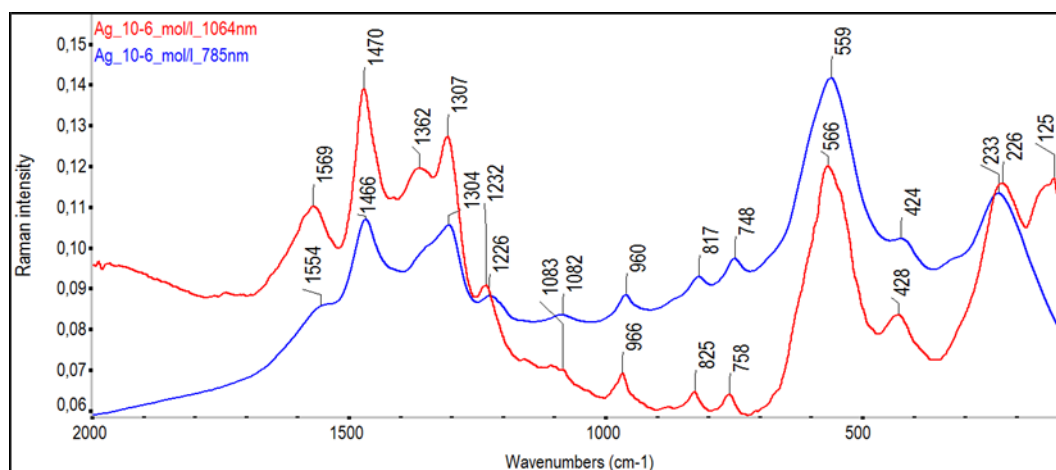
patří C-C valenčním vibracím benzenového kruhu a mimorovinným deformačním OH skupiny. Valenční vibrace karboxylové skupiny se vůbec neprojevuje.

Vyhodnocení SERS spekter kyseliny gallové na stříbre bylo provedeno pro experimenty se stříbrným substrátem připraveným dle postupu 1 uvedeného v tab. II. Pro ilustraci jsou uvedena naměřená spektra kyseliny gallové o koncentraci $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 5).

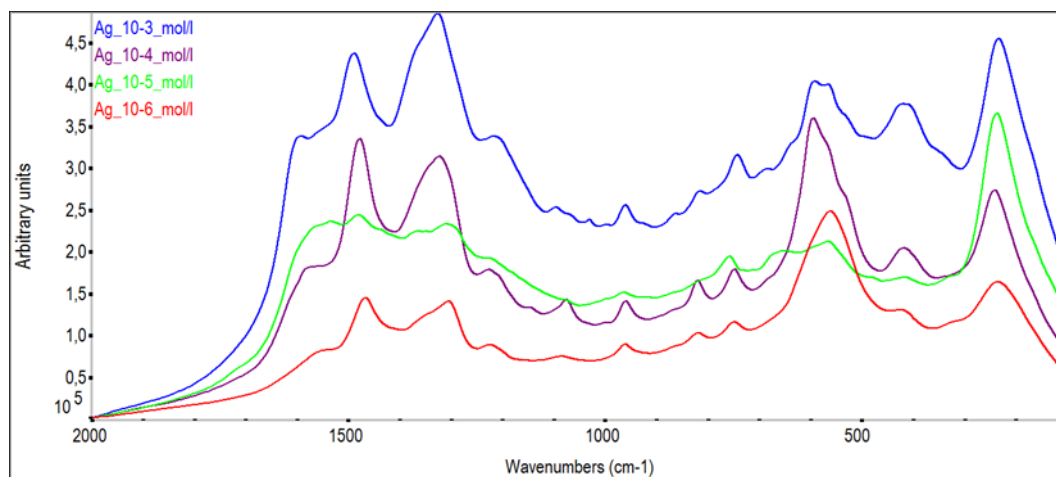
V případě stříbrných substrátů lze obecně říct, že ve spektrech jsou stejně jako v případě zlata méně povrchem zesíleny pásy, které odpovídají deformačním vibracím OH skupiny, deformačním vibracím CH a valenčním C-H vibracím benzenového kruhu. Větší povrchové zesílení pozoro-



Obr. 4. SERS spektra kyseliny gallové o koncentraci $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ na zlatém substrátu změřená při excitačních vlnových délkách 785 nm a 1064 nm



Obr. 5. SERS spektra kyseliny gallové o koncentraci 10^{-6} mol l^{-1} na stříbrném substrátu změřená při excitačních vlnových délkách 785 nm a 1064 nm



Obr. 6. SERS spektra kyseliny gallové o koncentracích 10^{-3} – 10^{-6} mol l^{-1} na stříbrném substrátu změřená při excitační vlnové délce 785 nm

rujeme u pásů, které patří C-C valenčním vibracím aromatického jádra. Valenční vibrace karbonylové skupiny se na rozdíl od zlata projevila.

Obr. 6 znázorňuje očekávaný trend při měření spekter kyseliny gallové při různých koncentracích. Celková spektrální intenzita pásů klesá s klesající koncentrací měřené látky. Spektrální profil kyseliny gallové při koncentraci 10^{-5} mol l^{-1} je výrazně odlišný od ostatních, je proto nezbytné experiment znovu zopakovat, aby bylo předejito chybné interpretaci výsledků.

Závěr

Jednoznačně byla potvrzena užitečnost povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie pro detekci a identifikaci kyseliny gallové. Ačkoli byla měřena nejvyšší koncentrace roztoku kyseliny gallové (10^{-3} mol l^{-1}), ve spektru bylo pozorováno jen několik pásů náležících této látce s velmi nízkou hodnotou poměru signál/šum. V přítomnosti SERS-aktivního substrátu se však podařilo docílit spektrální identifikace i při koncentraci 10^{-6} mol l^{-1} . Měření koncentračních řad také ukázalo očekávaný trend, že celková spektrální intenzita pásů klesá s klesající koncentrací měřené látky.

Další experimenty budou zaměřeny na zopakování měření kyseliny gallové na stříbrném substrátu o koncentraci 10^{-5} mol l⁻¹, jejíž spektrální profil byl výrazně odlišný od ostatních; dále pro stříbro rozšíření měření o koncentraci 10^{-7} mol l⁻¹ a také bude provedena detailnější interpretace spekter z hlediska prostorové orientace molekuly vůči povrchu substrátu.

LITERATURA

- Subramanian A. P., John A. A., Vellayappan M. V., Balaji A., Jaganathan S. K., Supriyanto E., Yusof M.: RSC Adv. 5, 35608 (2015).
- Badhani B., Sharma N., Kakkar R.: RSC Adv. 5, 27540 (2015).
- Lochab B., Shukla S., Varma I. K.: RSC Adv. 4, 21712 (2014).
- Liu C., Lin J.-J., Yang Z.-Y., Tsai C.-C., Hsu J.-L., Wu Y.-J.: J. Agr. Food Chem. 62, 11672 (2014).
- Verma S., Singh A., Mishra A.: Environ. Toxicol. Phar. 35, 473 (2013).
- Locatelli C., Filippin-Monteiro F. B., Creczynski-Pasa T. B.: Eur. J. Med. Chem. 60, 233 (2013).
- Yoon C.-H., Chung S.-J., Lee S.-W., Park Y.-B., Lee S.-K., Park M.-C.: Joint Bone Spine 80, 274 (2013).
- Lu Z., Nie G., Belton P. S., Tang H., Zhao B.: Neurochem. Int. 48, 263 (2006).
- Zanwar A. A., Badole S. L., Shende P. S., Hegde M. V., Bodhankar S. L., v knize: *Polyphenols in Human Health and Disease* (Watson R. R.; Preedy V. R.; Zibadi S., ed.), Academic Press, San Diego 2014.
- Ou T. T., Lin M. C., Wu C. H., Lin W. L., Wang C. J.: Curr. Med. Chem. 20, 3944 (2013).
- You B., Kim S., Kim S., Park W.: Mol. Cell. Biochem. 357, 295 (2011).
- Hsu J. D., Kao S. H., Ou T. T., Chen Y. J., Li Y. J., Wang C. J.: J. Agr. Food Chem. 59, 1996 (2011).
- Yoshioka K., Kataoka T., Hayashi T., Hasegawa M., Ishi Y., Hibasami H.: Oncol. Rep. 7, 1221 (2000).
- Zhao B., Hu M.: Oncol. Lett. 6, 1749 (2013).
- Madlener S., Illmer C., Horvath Z., Saiko P., Losert A., Herbacek I., Grusch M., Elford H. L., Krupitza G., Bernhaus A., Fritzer-Szekeres M., Szekeres T.: Cancer Lett. 245, 156 (2007).

Š. Havlová and V. Prokopec (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Application of Surface-enhanced Raman Spectroscopy for The Detection and Identification of Gallic Acid**

Gallic acid was analyzed using surface-enhanced Raman spectroscopy in presence of gold and silver large area SERS active substrates. For these metal substrates adsorption of gallic acid was studied at various concentrations and Raman spectra were measured at two excitation wavelengths (785 nm and 1064 nm) which are compared with each other for each concentration especially in terms of total surface enhancement, band positions and band shapes.

Keywords: surface-enhanced Raman spectroscopy, gallic acid, gold, silver, substrate

ANALÝZA HISTORICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ CHININU A THEOFYLINU

KAREL KUDLÁČEK^a, KAREL NESMĚRÁK^a
a JAN BABICA^b

^a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2,
^b České farmaceutické muzeum, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Kuks 81, 544 43 Kuks
k.kudlacek@seznam.cz

Klíčová slova: chinin, theofylin, dlouhodobá stabilita, degradace, RP-HPLC

Úvod

Analytická chemie hraje významnou roli při studiu složení materiálů používaných nebo vyráběných v minulosti. Výsledky takových analýz poskytují obraz o technologii, sociálních zvycích a jiná zajímavá zjištění v kontextu analyzovaného objektu, zároveň mohou být důležité pro případné restaurátorské a konzervátorské účely.

Jednou ze zajímavých oblastí aplikace analytické chemie na historické objekty je studium složení historických vzorků léčivých přípravků, ať již za účelem jejich identifikace (v případě, že není známo, o jaké léčivo se jedná), objasnění neznámé či nejasné receptury, získání informací o kvalitě použitých surovin či stanovení degradačních produktů stárnutí léčivých látek. Příkladem může být analýza léčivého přípravku z cínové pyxidy nalezené ve starověkém loďním vraku v zálivu Baratti, datované do let 140–130 př. Kr. Podle identifikovaných komponent (hydrozincit, smithonit, hematit, škrob, zvířecí a rostlinný tuk a směla z borovice) se jednalo pravděpodobně o oftalmologický preparát¹. Jinými příklady jsou analýza mastí ze 16. století² nebo pryskyřic a balzámů z 18. století³. V naší laboratoři jsme metodou HPLC-MS analyzovali degradační produkty heroinu a kokainu v hromadě vyráběných léčivých přípravcích ze 30. let 20. století⁴.

V této práci jsme pomocí HPLC s UV a fluorescenčním detektorem analyzovali změny složení dvou injekčních přípravků s chininem jako účinnou látkou a čípků s theofylinem jako účinnou látkou. Zaměřili jsme se na kvantifikaci účinné látky a nalezení jejich případných degradačních produktů.

Chinin [CAS 130-95-0] je alkaloid vyskytující se v kůře chinovníku⁵. Má především antipyretické, antimalarické, analgetické a protizánětlivé vlastnosti. Theofylin [CAS 58-55-9] je derivát xanthinu, přirozeně se vyskytující v kakaovníku. Uplatňuje se jako bronchodilatační látka v terapii zánětů dýchacích cest.

Experimentální část

Analyzované vzorky historických léčivých přípravků pocházely ze sbírek Českého farmaceutického muzea. Podmínky uskladnění vzorků nejsou přesně známy, předpokládá se uložení v temnu při teplotě místnosti.

Injekční roztok „Chinin-calcium“ (obr. 1a) byl vyroben okolo roku 1948 firmou Pragochemia. Nazhloutlý injekční roztok byl uchováván v zatavených ampulkách z hnědého skla, Deklarovaný obsah chininu (jako báze) byl 3 %, dále byl v roztoku deklarován 10% obsah glukonanu vápenatého [CAS 299-28-5].

Injekční roztok „Cardiazol-Chinin“ (obr. 1b) byl vyroben v roce 1944 firmou Sanomedia. Nahnědlý injekční roztok byl uchováván v zatavených ampulkách z čirého skla. V roztoku bylo deklarováno 0,25 g/ml laktátu chininu [CAS 749-49-5] a 0,1 g/ml pentamethylentetrazolu [CAS 54-95-5].

Čípky „Syntophyllin“ (obr. 1c) byly vyrobeny v roce 1948 firmou Spolek pro chemickou a hutní výrobu. Čípek žluté barvy byl zabalen do staniolové fólie. Deklarovaný obsah theofylin.EDTA [CAS 317-34-0] byl 0,35 g v jednom čípku.

Ke kvantifikaci účinných látek v analyzovaných vzorcích byly použity standardy: chinin hydrochlorid dihydrát (analytický standard, Sigma-Aldrich) a theofylin (> 99 %, Sigma-Aldrich). Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), octan amonný (Lach-ner), octová kyselina 99 % (Lach-ner). Chinotoxin [CAS 84-55-9] byl připraven v laboratoři metodou dle Biddleho⁶.

Chromatografická měření byla realizována na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu) s DAD a fluorescenčním detektorem. Jako kolona byla použita Zorbax Eclipse C18 (4,6×150 mm, 3,5 μm; Agilent).

Kvantifikace glukonanu vápenatého byla provedena pomocí atomové absorbní spektrometrie přístrojem ContrAA 700 (Analytik Jena). Absorbance byla měřena na spektrální čáře vápníku o vlnové délce 422,6728 nm, poměr acetyleny (palivo) a oxidu dusného (oxidant) byl 0,572. Jako standard vápníku byl použit CRM uhličitán vápenatý 99,995 % v matici 2% kyseliny dusičné (Analytika).

Výsledky a diskuse

Podmínky separace vzorků obsahujících chinin vycházely z dříve publikovaných prací^{7,8}, na jejichž základě byla po optimalizaci použita mobilní fáze obsahující 20 % acetonitrilu a 80 % acetátového pufru (0,02 mol dm⁻³, pH 4,00). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,00 ml min⁻¹. Vzorek injekčního roztoku „Chinin-calcium“ byl zředěn mo-



a



b

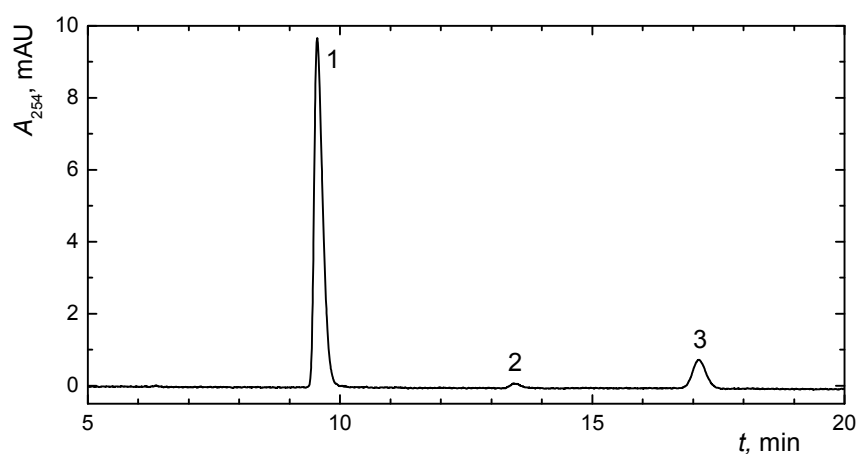


c

Obr. 1. Obaly analyzovaných vzorků historických léčivých přípravků (a) „Chinin-calcium“, (b) „Cardiazol-Chinin“, (c) „Syntophyllin“

bilní fázi v poměru 1:499, vzorek injekčního roztoku „Cardiazol-Chinin“ byl zředěn mobilní fází v poměru 1:4999. Obsah účinné látky byl stanovován metodou kalibrační přímkou. V přípravku „Chinin-calcium“ bylo stanoveno $92,0 \pm 1,8$ % deklarovaného obsahu chininu, obsah glukonanu vápenatého byl kvantifikován měřením obsahu vápníku metodou AAS a následným přepočtem jako

$97,6 \pm 0,1$ % deklarovaného obsahu. V přípravku „Cardiazol-Chinin“ bylo stanoveno $87,2 \pm 0,5$ % deklarovaného obsahu laktátu chininu. U obou přípravků byl nalezen jeden degradační produkt se stejným retenčním časem (obr. 2). Na základě literárních údajů^{9,10} byl tento produkt identifikován jako chinotoxin, což bylo následně potvrzeno měřením s v laboratoři syntetizovaným chinotoxinem.



Obr. 2. HPLC-UV chromatogram vzorku historického léčivého přípravku „Chinin-calcium“. Identifikace peaků: (1) chinin, (2) neidentifikovaná nečistota, (3) chinotoxin. Stacionární fáze: Zorbax Eclipse C18 (4,6×150 mm, 3,5 μm). Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % acetátový pufr (0,02 mol dm⁻³, pH 4,00)

Podmínky separace vzorku obsahujícího theofylin vycházely z literatury¹¹, po jejich optimalizaci byla k měření použita mobilní fáze obsahující 20 % acetonitrilu a 80 % acetátového pufru (0,02 mol dm⁻³, pH = 4,00) o průtokové rychlosti 0,50 ml min⁻¹. Vzorek čípku byl rozpuštěn v mobilní fázi a po filtraci ředěn v poměru 1:21. Kvantifikace obsahu theofylinu byla provedena metodou kalibrační přímky. V analyzovaném vzorku bylo stanoveno 104,9±0,3 % deklarovaného množství theofylinu.

Závěr

Byly navrženy a optimalizovány strategie a metody pro stanovení účinných látek ve třech historických léčivých přípravcích. U přípravků s obsahem chininu bylo zjištěno, že došlo ke snížení obsahu účinné látky o zhruba 10 % za vzniku chinotoxinu jako degradačního produktu. Přípravek s theofylinem jako účinnou látkou zůstal i po 67 letech, které od jeho výroby uplynuly, nezměněn.

LITERATURA

1. Giachi G., Pallecchi P., Romualdi A., Ribechini E., Lucejko J.J., Colombini M.P., Lippi M.M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110, 1193 (2013).
2. Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luybaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M.: *Microchem. J.* 95, 227 (2010).
3. Steigenberger G., Herm Ch.: *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1771 (2011).
4. Nesměrák K., Štícha M., Čvančarová M.: *Anal. Lett.* 43, 2572 (2010).
5. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.: *Basic & Clinical Pharmacology*. 11. vyd. McGraw-Hill, New York 2009.
6. Biddle H.C.: *J. Am. Chem. Soc.* 34, 500 (1912).
7. Samanidou V.F., Evaggelopoulos E.N., Papadoyannis I.N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 21 (2005).
8. Mirghani R.A., Ericsson O., Gustafsson L.L.: *J. Chromatogr. B* 708, 209 (1998).
9. Parrák V., Radějová E., Mohelská O.: *Čs. Farm.* 18, 309 (1969).
10. Talapatra S.K., Talapatra B.: *Chemistry of Plant Natural Products. Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*. Springer 2015.
11. Moffat A.C., Osselton D., Widdop B.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4. vyd. Pharmaceutical Press 2011.

K. Kudláček^a, K. Nesměrák^a, and J. Babica^b
^a*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague;* ^b*Czech Pharmaceutical Museum, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Kuks): Analysis of Historical Pharmaceutical Preparations of Quinine and Theophylline*

Pharmaceutical preparations of quinine (injection solutions) and theophylline (suppositories) about seventy years old were analyzed using RP-HPLC. The composition of mobile phase was optimized. The samples of quinine injection solutions consist of 92% or 87% of declared quinine content. Quinotoxine has been identified as the product of quinine degradation. The quantification of theophylline in suppositories did not show any degradation after more than 67 years from their manufacturing.

Key words: quinine, theophylline, long-term stability, degradation, RP-HPLC

TVORBA SPECIÁLNÍ KNIHOVNY SPEKTER PRO ANALÝZU PACHOVÝCH STOP

**NIKOLA LADISLAVOVÁ, OLDŘICH
VYHNÁLEK, ŠTĚPÁN URBAN, VERONIKA
ŠKEŘÍKOVÁ a PETRA CINKOVÁ**

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

Klíčová slova: lidský pach, speciální knihovna,
MS knihovna

Úvod

Z pohledu kriminalistického bádání je lidský pach zajímavým výzkumným artiklem, který se svým potenciálem může rovnat analýze DNA a v mnoha ohledech ji i předčit. Nicméně nejprve je nutné rozluštit kódování informací v rámci pachových stop, tj. které molekuly jsou zodpovědné za druhovou identifikaci například kuřáků, cukrovkářů a které jsou zodpovědné za individuální identifikaci, zda je to otázka kvalitativní diference či kvantitativní. Pro zodpovězení těchto otázek je ovšem třeba znát, které ze molekul se v pachu člověka vůbec vyskytují a vytvořit jejich databázi pro budoucí fáze výzkumu.

V rámci takto úzce specializovaných experimentů jsou univerzální GC/MS knihovny nedostačujícím nástrojem pro vyhodnocování naměřených spekter. Většina univerzálních knihoven schraňuje data naměřená na různých kolonách, přístrojích a za použití různých metod měření,

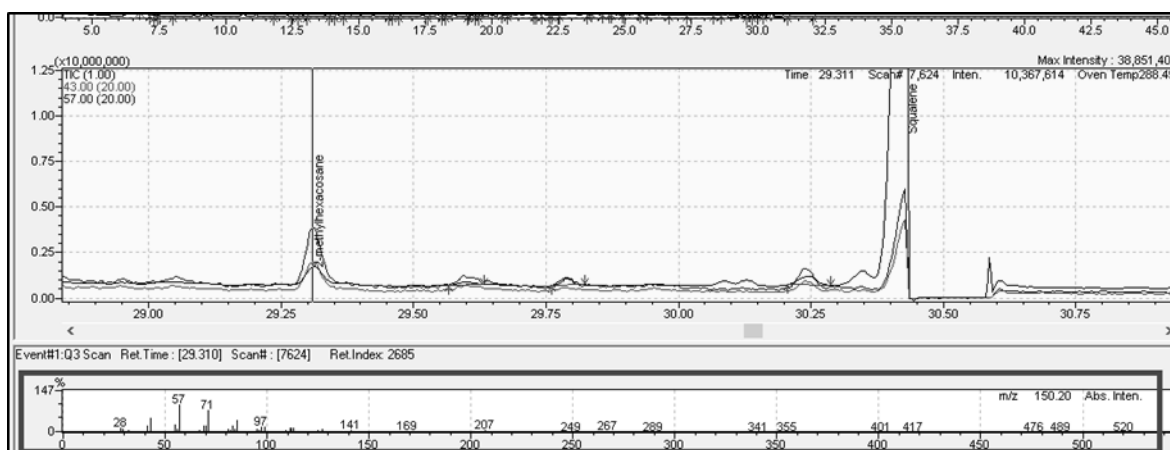
což způsobuje odchylky jak ve shodnosti spekter, tak v případě retenčních indexů. Nejvhodnější alternativou pro řešení těchto problémů je tvorba vlastní speciální knihovny spekter, kdy lze zaručit stejné podmínky a nároky měření, včetně registrace takových látek, které se v univerzálních knihovnách nevyskytují. V rámci této práce je nejčastěji porovnávána knihovna spekter NIST a uživatelská knihovna pachových molekul, která byla vytvořena pro potřeby analýzy lidského pachu. Tento projekt se zabývá problematikou vytváření specializovaných knihoven pro GC/MS, včetně jejich editací, aktualizací a přizpůsobování obsahu vůči nárokům vyplývajících z povahy výzkumu.

Experimentální část

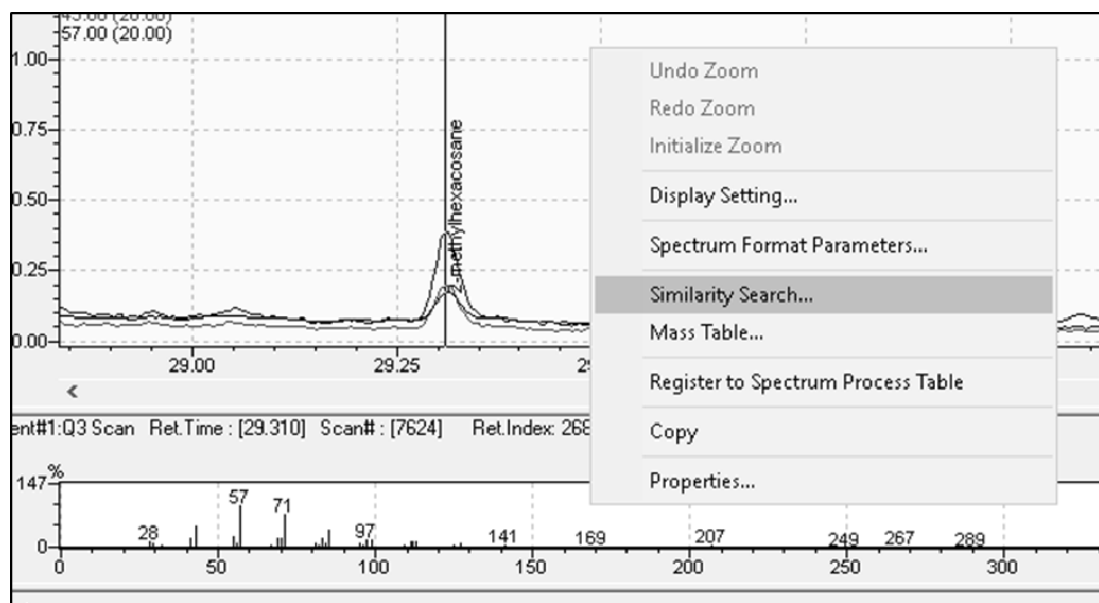
Celý proces získávání dat o složení pachových stop byl realizován na přístrojích Shimadzu GCMS-TQ8030 s kolonou SLB – 5ms a výsledná data se vyhodnocovala pomocí softwaru GC/MS Solutions¹, respektive v programu GC/MS Postrun Analysis, který je součástí softwarového balíčku. Pro samotnou správu a tvorbu knihoven se používá funkce Library Editor.

Identifikace látky v rámci programu GCMS Postrun Analysis

Primární vyhodnocovací úkony jsou prováděny v záložce Data Analysis, kdy po načtení chromatogramu můžeme sledovat spektra jednotlivých látek. Pro správnou extrakci spektra je nutné odečíst pozadí od spektra látky (obr. 1).



Obr. 1. Zobrazení chromatogramu a hmotnostního spektra (Postrun Analysis)



Obr. 2. Identifikace látky v programu GCMS Postrun Analysis

Takto vybrané spektrum podrobíme porovnání s již existující databází v rámci knihovny, což se provádí kliknutím pravého tlačítka myši do okna se zobrazeným spektrem a výběrem možnosti Similarity Search (obr. 2).

Software defaultně porovnává spektra v rámci původní NIST knihovny. Proto je nutné při prvním otevření každého chromatogramu změnit výchozí knihovnu, což se provádí pomocí záložky Qualitative (horní lišta) → Qualitative Parametrs → Similarity Search a nahráním správné verze „pachové knihovny“ (obr. 3).

Zobrazená tabulka obsahuje informace o zkoumané látce (pole Target: Ret.Index a horní spektrum) a o navrhovaných látkách (horní tabulka obsahuje seznam navrhovaných látek, procentuální shoda spekter a jejich retenční indexy, dolní spektrum potom odpovídá spektru zvýrazněné navrhované látky). Pokud žádná z nabízených látek v databázi neodpovídá zkoumané molekule, je nutné ji manuálně přidat do databáze pachových molekul.

Často dochází k tomu, že retenční indexy látky s největší procentuální shodou spekter neodpovídají, zatímco u méně shodné látky retenční čas sedí téměř přesně. Potom je potřeba porovnat spektra látek, u kterých je retenční index shodný, což se provádí kliknutím pravého tlačítka myši do okna spektra se zkoumanou látkou a volbou možnosti Subtract, kdy se ve spodní části okna objeví rozdíly v intenzitách jednotlivých hmot (Subtraction Result). V případě, že nesouhlasí spektrum, ani retenční indexy, s největší pravděpodobností se jedná o látky nezaznamenané v knihovně spekter.

Registrace látek do uživatelské knihovny

Registrace neznámé sloučeniny probíhá již výhradně v záložce Library Editor. Pro zobrazení spektra zkoumané

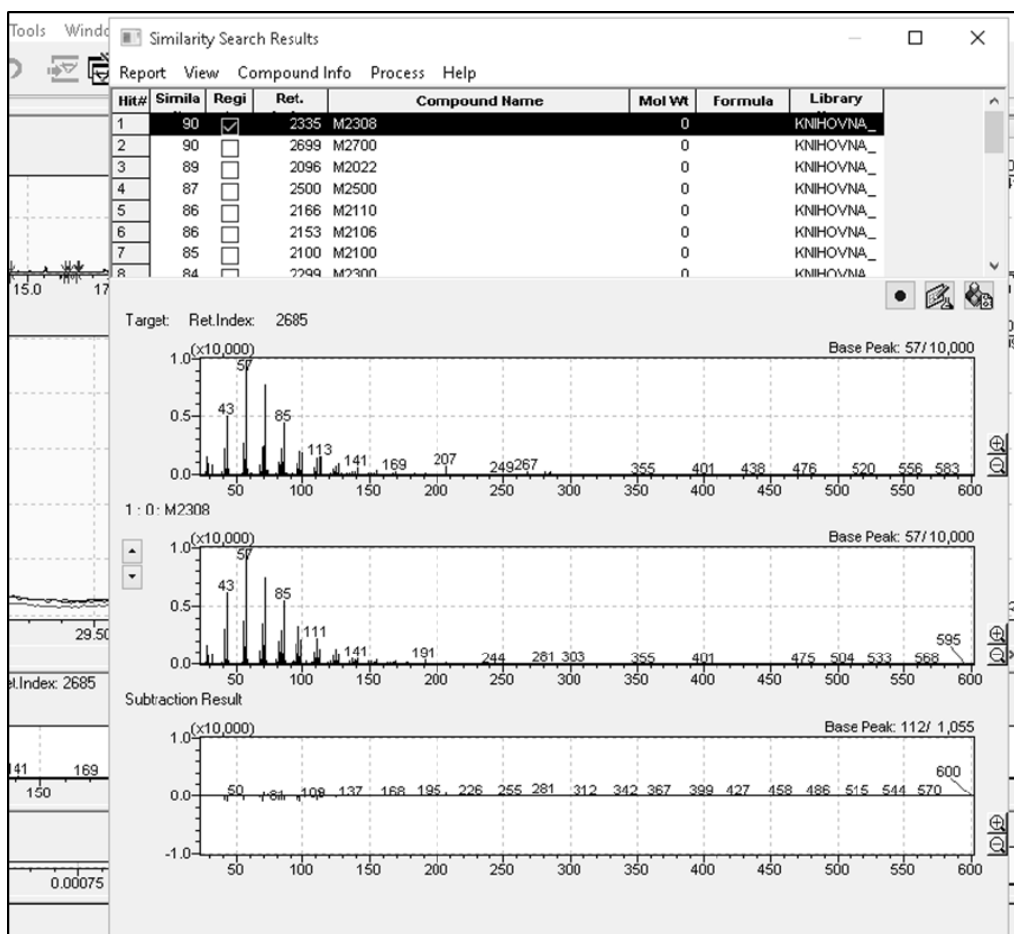
látky je nutné kliknout pravým tlačítkem myši do prázdného bílého pole a zvolit možnost Target mode, kdy se těsně pod seznamem registrovaných sloučenin objeví právě zkoumané spektrum. Pro přidání látky (spektra) do knihovny je třeba opět kliknout pravým tlačítkem myši na zkoumané spektrum a zvolit možnost Copy to Current Library. Uživatelské knihovny se často zaměřují pouze na určitý typ analyzovaných látek. Registrace látek patřících do skupiny siloxanů do pachové knihovny je nežádoucí.

Výsledky a diskuse

Aktuálně (k 1. 2. 2016) „pachová“ knihovna obsahuje 368 zájmových molekul v rozsahu od C9 až C40. Lze očekávat, že s přibývajícím daty (vyhodnocenými chromatogramy) dojde k markantnímu nárůstu záznamů. Variabilita molekul obsažených v pachových stopách je samozřejmě velmi vysoká. Stávající látky pocházejí z dat získaných z poměrně úzkého kruhu zkoumaných subjektů. Dalším limitujícím faktorem pro získání ucelenějších informací je teplotní strop kolon používaných při analýze pachových stop. Momentálně používané kolony typu SLB – 5ms od firmy Supelco vydrží teploty do 350 °C. Látky, které mají potenciál uvolňovat se ze vzorku za vyšších teplot, tedy nemohou být detekovány.

Závěr

Uživatelská knihovna, vytvořená pro potřeby analýzy lidských pachů, obsahuje látky, u kterých se předpokládá informační hodnota při výzkumu dané problematiky. Zároveň slouží jako zdroj vstupních dat pro speciální program



Obr. 3. Identifikační tabulka pro zkoumané látky

konvulačního charakteru, jehož výstupem bude přiřazení charakteristických molekul obsažených v pachu člověka k jednotlivým zájmovým skupinám, ať už jde o rozdělení dle věku, pohlaví či diagnostikovanému onemocnění.

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

LITERATURA

1. Shimadzu: *GCMSsolution Instruction Manual*. Japonsko 2012.

N. Ladislavová, O. Vyhnálek, Š. Urban, V. Škeříková, and P. Cinková (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Engineering, UCT Prague*): **Creation of Special MS Library for Human Odour Analysis**

Universal MS libraries commonly used for GC/MS analysis and experiments do not suffice for decoding of the patterns of human odour. First qualitative analysis of human odour samples revealed that critical amount of chemical compounds, which were found in odour samples, were not registered in commercial libraries. However, a specialized MS library is crucial for decoding human odour patterns for generic and individual identification. The main idea for identification is cross-correlation between characteristics of experimental subject (such as sex, health condition, smoker/non-smoker etc.) and qualitative and quantitative aspects of chemical compounds which are present in its odour sample, therefore compact and reliable spectra database is elemental tool for further experiments. Issues of creating user library are described in the text above.

Keywords: human odour, special MS libraries

ANALÝZA CHEMICKY MODIFIKOVANÝCH POLYMERNÍCH POVRCHŮ

**SIMONA LUPÍNKOVÁ^a, MONIKA BENKOCKÁ^a,
JAKUB BRABOREC^{a,b}, JINDŘICH MATOUŠEK^a,
KATEŘINA KOLÁŘOVÁ^c, MICHAEL G. S.
LONDESBOROUGH^b a ZDEŇKA KOLSKÁ^a**

^a Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, Ústecké materiálové centrum a katedra fyziky, České Mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem, ^b Ústav anorganické chemie AV ČR, v.v.i., Oddělení syntéz, 250 68 Husinec-Řež, ^c Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie, Ústav inženýrství pevných látek, Technická 5, 166 28 Praha
simona.lupinkova@email.cz

Klíčová slova: polymery, povrchové vlastnosti, borany, XPS, elektrokinetická analýza, kontaktní úhel, mikrobiální testy

Úvod

Polymerní materiály jsou vzhledem ke svým objemovým vlastnostem již mnoho let používány v mnoha oblastech průmyslu, medicíny, ale i každodenního života. Avšak použití polymerů v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství je omezeno jejich povrchovými vlastnostmi (povrchová chemie, polarita, povrchový náboj, drsnost a morfologie)^{1,2}.

Bylo vyvinuto mnoho metod modifikace za účelem zlepšit jejich povrchové vlastnosti a zároveň zachovat vlastnosti objemové. Vzhledem k nízké reaktivitě polymerů, jejich povrch musí být nejdříve aktivován za vzniku chemicky reaktivních míst. Jednou z metod aktivace povrchu polymeru je chemická úprava pomocí tzv. Piranha roztoků, která vede k rozštěpení polymerního řetězce. Takto aktivovaný povrch může být roubován různými chemickými sloučeninami, které zlepšují cytocompatibilitu povrchu^{1,3}.

V této práci byly studovány změny povrchových vlastností dvou polymerních folií modifikovaných v Piranha roztoku a následně roubovaných aminosloučeninami a borany. Smáčivost povrchu byla stanovena goniometricky měřením statického kontaktního úhlu. Povrchová chemie a povrchový náboj byly studovány pomocí elektrokinetické analýzy. Změny v chemickém složení byly charakterizovány pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). Na vybraných površích byly provedeny mikrobiální testy.

Experimentální část

Materiál

Pro testování byla použita polymerní folie polyethylentereftalát (PET, tloušťka 50 μm , GoodFellow, UK) a polyethylen s ultra vysokou molekulovou hmotností (UHMW PE, tloušťka 75 μm , GoodFellow, UK). Pro aktivaci polymerních povrchů byly použity Piranha roztoky o složení kyselina : peroxid vodíku v poměru 3 : 1. Použity byly kyseliny (i) octová (CH_3COOH , 99%, Lachema, ČR) a (ii) dusičná (HNO_3 , 65%, Penta, ČR) a peroxid vodíku (H_2O_2 , 30%, Lach-Ner, ČR). Na aktivovaný povrch byly roubovány: (i) cysteamin ($\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, 98%, Sigma Aldrich), (ii) ethylendiamin ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, Merck) a (iii) chitosan (85% deacetylated powder, Alfa Aesar), následně byly roubovány sloučeniny boru: (i) anti- $\text{B}_{18}\text{H}_{22}$, syntetizovaný dle postupu v literatuře⁴ a jeho derivát (ii) (4,4'-(SH)₂-anti- $\text{B}_{18}\text{H}_{20}$), připravený dle publikace⁵.

Aktivace povrchu a chemické roubování

Vzorky byly povrchově aktivovány při laboratorní teplotě v Piranha roztoku. Pro polymerní folii PET byl vybrán Piranha roztok z kyseliny octové, pro UHMW PE z kyseliny dusičné. Po uplynutí jedné hodiny byly vzorky omyty destilovanou vodou a vloženy do vodného roztoku (10 hm. %) cysteaminu, ethylendiaminu nebo chitosanu po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou, osušeny a vloženy do roztoků boranů v dichlorethanu po dobu 24 hodin.

Použité analytické metody

Povrchové vlastnosti všech vzorků (před modifikací, po aktivaci Piranha roztokem, po naroubování aminosloučenin i po následném naroubování boranů) byly stanoveny metodami: (i) elektrokinetická analýza, (ii) rentgenová fotoelektronová spektroskopie a (iii) goniometrie. Mikrobiální testy zahrnovaly testy na inhibici růstu řas a antibakteriální testy.

Elektrokinetická analýza (stanovení zeta potenciálu) vzorků byla provedena na přístroji SurPASS (Anton Paar, Rakousko). Měření probíhalo v cele s nastavitelnou štěrbinou určené pro planární vzorky (rozměr vzorků 2×1 cm, štěrbina nastavena na cca 100 μm), v elektrolytu KCl 0,001 mol dm⁻³ za pokojové teploty, atmosférického tlaku a konstantní hodnoty pH 6,5. Každý vzorek byl proměřen 4× s relativní odchylkou měření 5 %. Pro stanovení zeta potenciálu byly použity dvě metody, proudový potenciál a proud (streaming potential, streaming current) a pro výpočet zeta potenciálu byly použity rovnice Helmholtzova-

Smoluchowskiho (HS) a Fairbrotherova-Mastinsova (FM)⁶.

Zastoupení jednotlivých prvků na povrchu vzorků bylo stanoveno na základě fotoelektronových spekter získaných měřením XPS spektrometrem Omicron Nanotechnology ESCAProbeP.

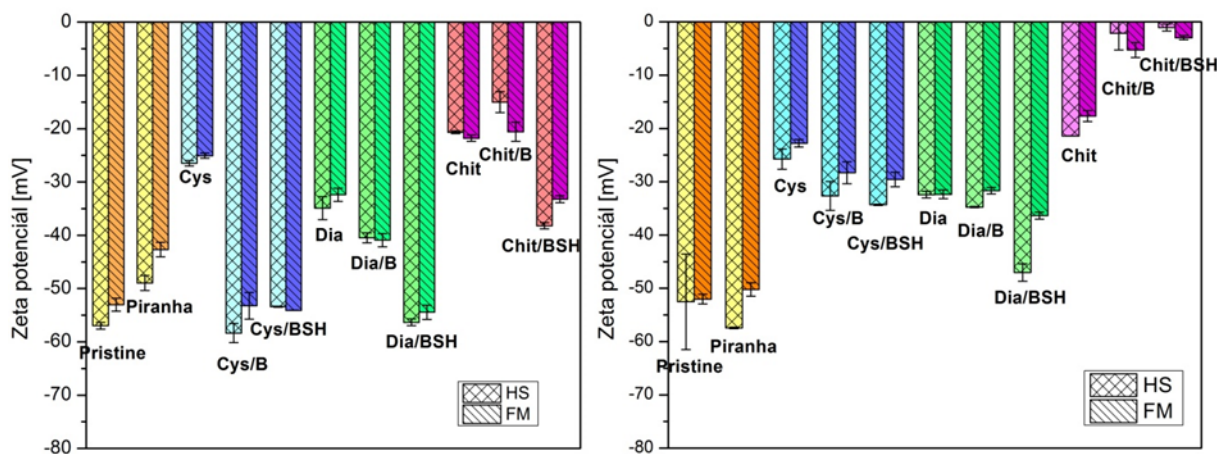
Na modifikovaných površích polymerní folie PET byly provedeny také testy toxicity. Na povrch vzorku byl nanesen 1 ml roztoku obsahujícího kmen řasy *Desmodemus Quadricauda*. Po 1 hodině, 3 dnech a 8 dnech byla odebrána kapka roztoku z povrchu a pod mikroskopem byly pozorovány změny v četnosti řas.

Na modifikovaném povrchu PET byly také provedeny mikrobiální testy, sledováním počtu kolonií bakterií *E. coli*, které byly provedeny podle postupu popsáno v článku⁷.

Výsledky a diskuse

Hodnoty zeta potenciálu získané pro jednotlivé vzorky jsou prezentovány na obr. 1. Jak je patrné z obr. 1, všechny kroky modifikace vedly ke změnám povrchové chemie a povrchového náboje.

Po působení Piranha roztoků (obr. 1, Piranha) dochází k rozštěpení polymerních řetězců a na povrchu vznikají reaktivní místa, což způsobuje změny v chemickém složení a polaritě povrchu a tedy změnu zeta potenciálu. Tyto změny jsou však malé v porovnání např. se změnami způsobenými působením plazmatu provedené v práci². Obecně vedou fyzikální metody modifikace povrchu k výraznějším změnám povrchových vlastností a nabízejí rovnoměrnou úpravu povrchu bez rizika zničení na rozdíl od chemických metod³. Přesto je aktivace pomocí Piranha roztoků účinná,



Obr. 1. Hodnoty zeta potenciálu pro PET (vlevo) a UHMW PE (vpravo) nemodifikovaných (Pristine), po aktivaci Piranha roztokem (Piranha), po naroubování aminosloučenin (Cys, Dia, Chit) a následně borany (B₁₈H₂₂ a B₁₈H₂₀(SH)₂)

Tabulka I

Koncentrace atomů stanovených XPS metodou na povrchu PET (Pristine), po aktivaci Piranha roztokem (Piranha), po naroubování aminosloučenin (Cys, Dia, Chit) a následně borany B₁₈H₂₂ a B₁₈H₂₀(SH)₂

Vzorek	C (1s)	O (1s)	N (1s)	B (1s)	S (2p)	I (3d5/2)	Si (2p)
Pristine	73,0	27,0	–	–	–	–	–
Piranha	71,0	29,0	–	–	–	–	–
Pir/Cys	73,0	24,0	1,1	1,3	0,6	–	–
Pir/Cys/B	70,0	15,0	1,6	9,4	1,5	0,7	1,7
Pir/Cys/BSH	84,0	7,0	0,5	4,9	1,4	–	2,4
Pir/Dia	70,0	27,0	1,5	1,0	0,1	–	0,6
Pir/Dia/B	59,0	18,0	2,5	17,4	0,4	1,0	1,8
Pir/Dia/BSH	88,0	5,0	0,3	3,3	0,9	–	2,2
Pir/Chit	73,0	25,0	1,6	0,3	–	–	0,2
Pir/Chit/B	63,0	20,0	1,5	13,1	0,2	0,5	2,0
Pir/Chit/BSH	75,0	12,0	1,2	8,8	2,4	–	0,8

Tabulka II

Hodnoty kontaktních úhlů PET a PE nemodifikovaných (Pristine), po aktivaci Piranha roztokem (Piranha), po naroubování aminosloučenin (Cys, Dia, Chit) a následně borany $B_{18}H_{22}$ a $B_{18}H_{20}(SH)_2$

Vzorek	Kontaktní úhel θ [°]	
	PET	UHMW PE
Pristine	72,9	70,5
Piranha	76,6	93,3
Pir/Cys	62,8	85,0
Pir/Cys/B	57,1	89,2
Pir/Cys/BSH	77,1	90,6
Pir/Dia	60,6	83,4
Pir/Dia/B	61,8	84,4
Pir/Dia/BSH	75,9	86,5
Pir/Chit	53,6	68,7
Pir/Chit/B	70,1	66,3
Pir/Chit/BSH	84,5	93,3

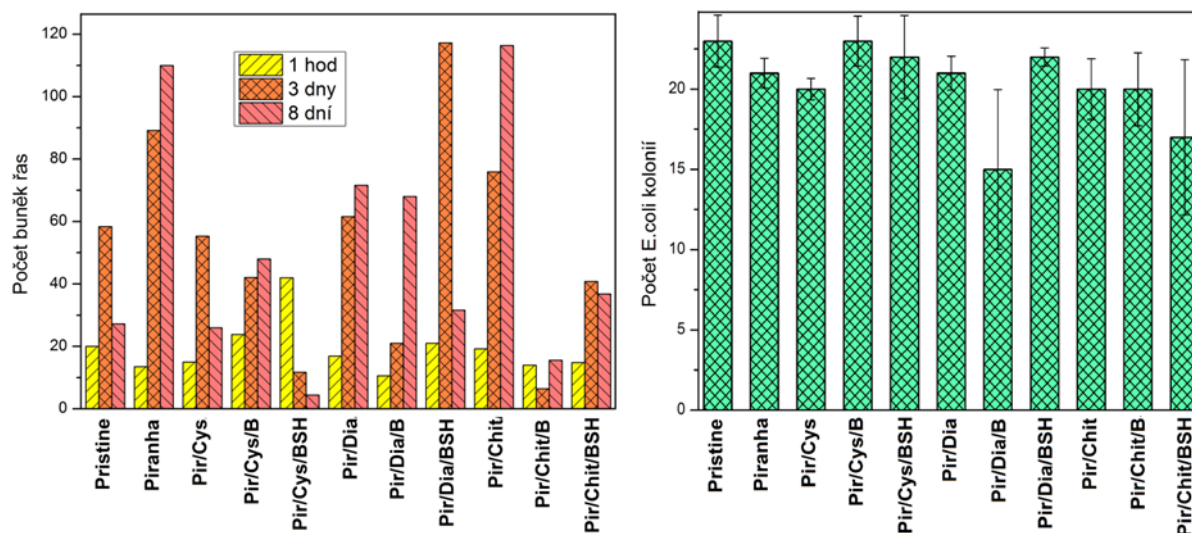
jelikož byly poté úspěšně naroubovány aminosloučeniny, což je patrné z obr. 1. Naroubování aminosloučenin způsobilo nárůst hodnoty zeta potenciálu, protože $-NH_2$ skupina vytváří na povrchu v přítomnosti elektrolytu pozitivní náboj^{1,2}. Nejvýraznější nárůst je pozorován u vzorků s naroubovaným chitosanem.

Výše uvedené výsledky dokazují úspěšné naroubování aminosloučenin na chemicky aktivovaný povrch PET a UHMW PE, což je též potvrzeno stanovením prvkového složení povrchu vzorků pomocí XPS. Úspěšné naroubování aminosloučenin dokazuje přítomnost dusíku, naroubo-

vání boranů přítomnost boru (u thiolovaného derivátu síra). Naměřené výsledky jsou uvedeny v tab. I.

Cytokompatibilní vlastnosti povrchu jsou ovlivněny nejenom chemickým složením povrchu vzorku a povrchovým nábojem, ale také smáčivostí povrchu². V tab. II jsou uvedeny hodnoty kontaktních úhlů povrchu vybraných vzorků.

Výsledky mikrobiálních testů jsou uvedeny na obr. 2. Vlevo jsou znázorněny změny v četnosti řas po 1 hodině, 3 dnech a 8 dnech. Výrazný pokles můžeme pozorovat na folii s naroubovaným cysteaminem a thiolovaným bora-



Obr. 2. Počet buněk řas (vlevo) a počet kolonií *E. coli* (vpravo) na vzorcích PET nemodifikovaných (Pristine), po aktivaci Piranha roztokem (Piranha), po naroubování aminosloučenin (Cys, Dia, Chit) a následně borany $B_{18}H_{22}$ (B) a $B_{18}H_{20}(SH)_2$ (BSH)

nem a také na folii s naroubovaným chitosanem a boranem.

Na obr. 2 vpravo je znázorněn počet kolonií *E. coli* na modifikovaných vzorcích PET po 3 hodinách. Z obr. 2 je patrné, že vzorek s naroubovaným ethylendiaminem a boranem (Pir/Dia/B) má největší antibakteriální účinek. Menší antibakteriální vlastnosti má vzorek s naroubovaným chitosanem a thiolovaným boranem (Pir/Chit/BSH).

Závěr

Použité analytické metody prokázaly úspěšnou aktivaci polymerních povrchů, úspěšné naroubování vybraných sloučenin na povrch materiálů a také potvrdily změny povrchových vlastností studovaných polymerů. Aktivace Piranha roztoky způsobuje vznik reaktivních míst na povrchu a změny povrchového náboje. Ačkoli je aktivace plazmatem mnohem účinnější metoda, chemické aktivace jsou dostupnější, méně náročné a pro účely roubování dalších sloučenin dostatečně účinné.

Práce byla realizována díky finanční podpoře projektů GAČR 13-06609S a Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky č. 15-33018A.

LITERATURA

1. Kolská Z., Řezničková A., Nagyová M., Slepíčková Kasálková N., Sajdl P., Slepíčka P., Švorčík V.: *Polym. Degrad. Stabil.* 101, 1 (2014).
2. Lupínková S., Výborný K., Benkocká M., Kolská Z., Slepíčková Kasálková N., Švorčík V.: *Chem. Listy* 108, 237 (2014).
3. Barish J. A., Goddard J. M.: *J. Appl. Polym. Sci.* 120, 2863 (2011).
4. Pitochelli A. R., Hawthorne M. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3218 (1962).
5. Sauri V., Oliva J. M., Hnyk D., Bould J., Braborec J., Merchán M., Kubát P., Císařová I., Lang K., Londesborough M. G. S.: *Inorg. Chem.* 52, 9266 (2013).
6. Kolská Z., Řezničková A., Švorčík V.: *e-Polymers* 83, 1 (2012).
7. Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Kolská Z., Švorčík V.: *RSC Adv.* 5, 17690 (2015).

S. Lupínková^a, M. Benkocká^a, J. Braborec^{a,b}, J. Matoušek^a, K. Kolářová^c, M. G. S. Londesborough^b, and Z. Kolská^a (^a *J. E. Purkyně University in Ústí nad Labem, Materials Centre and Department of Physics*, ^b *Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Inorganic Chemistry, Husinec-Řež*, ^c *University of Chemistry and Technology in Prague, Department of Solid State Engineering*): **Analysis of Chemically Modified Polymer Surfaces**

In this work we studied surface properties of different surface-modified polymers. Polymers were firstly activated by Piranha solutions. Activated polymer surfaces were grafted by amino-compounds and subsequently with borane compounds. Surface properties were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy, goniometry and electrokinetic analyses. Selected samples were tested for toxicity.

Keywords: polymers, surface properties, borane compounds, XPS, electrokinetic analysis, contact angle, microbial testing

STANOVENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ VE VZORCÍCH ČESKÉHO MEDU

**KRISTINA MATĚJKOVÁ, ANTONÍN KAŇA
a OTO MESTEK**

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

Klíčová slova: med, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, analýza hlavních komponent, původ medu

Úvod

Med je lidstvu znám odedávna. Zpočátku byl vybírán z hnízd divoče žijících včel, jak o tom svědčí asi 15 tisíc let staré malby v Pavoučí jeskyni ve Španělsku. Později člověk přešel od sběru k chovu. Nejstarší úly byly nalezeny na Blízkém východě¹. Na našem území pocházejí záznamy o chovu včel již z 9. století². Med byl vždy velice ceněn nejen pro svou sladkou chuť, ale i pro léčivé účinky¹. I v dnešní době je med oblíbený nejen jako sladidlo. Kromě sacharidů obsahuje další biologicky aktivní látky pocházející z nektaru rostlin (květový med) a ze mšic (medovicový med) a řadu metabolických produktů včel. Přibližně 75 % medu tvoří monosacharidy, 10–15 % disacharidy. Dále obsahuje proteiny ve variabilním množství od desetin po jednotky %. Významnými bílkovinami jsou enzymy ze třídy hydrolas, štěpící sacharidové řetězce, a enzymy s baktericidním účinkem. Obsaženy jsou i volné aminokyseliny a řada organických kyselin majících původ v nektaru, resp. vzniklých při enzymatických reakcích během zpracování nektaru na med. Obsahově malou, ale biologicky významnou složkou jsou minerály a stopové prvky. Jejich obsah je dán druhem medonosných rostlin i prostředím, kde žijí³. Pro své složení je med používán k posílení imunity, k podpoře organismu při nachlazení či jiném oslabení. Může obsahovat i složky nežádoucí, a to

jak látky organické (rezidua pesticidů, apod.), tak i těžké kovy^{3,4}. Na sledování výskytu vybraných stopových prvků, včetně některých těžkých kovů, byla zaměřena tato práce. Cílem bylo hodnotit obsah vybraných prvků v českém medu s ohledem na zdravotní rizika a pokusit se najít souvislosti mezi složením a geografickým původem. Ve výzkumu bylo použito 44 vzorků medu z různých lokalit v České republice a několika míst na Slovensku. Byl sledován obsah 11 prvků – hliníku, kadmia, kobaltu, mědi, manganu, niklu, zinku, olova, thallia, chromu a železa. Z nich Fe, Mn, Zn, Cu, Cr a Co jsou dle prací^{5,6} ve stopovém množství biogenní, naproti tomu Pb, Cd a Tl jsou považovány za silně toxické. I stopově biogenní prvky však mohou být ve vyšších dávkách nebezpečné.

Experimentální část

V práci byla použita demineralizovaná voda Milli-Q (Millipore, USA); HNO₃ 65% Suprapur® (Merck, SRN); standardní roztoky Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Zn, Pb, Tl, Cr, Fe, Bi, Rh, o koncentraci 1,000 ± 0,002 g l⁻¹ (20 °C) (Analytika, ČR); Ar technický 4.6 a CH₄ 5.5 (Siad, ČR).

Vzorky medů byly získány přímo od včelařů během sezony roku 2015. Mezi chovatele byly distribuovány plastové vzorkovnice vyloužené v HNO₃ a pokyny pro odběr. Medy byly odebírány při stáčení, odkapáním z plástů, stočením z výpusti medometu nebo z konve se síty. Z každého vzorku byly připraveny dvě navážky, rozkládané v mikrovlnném rozkladném zařízení Speedwave4 (Berghof Products + Instruments, SRN). Do rozkladné nádoby byl přesně navážen přibližně 1 g medu. K navážce byly přidány 3 ml vody a 1 ml HNO₃. Vzorek rozložený dle programu (tab. I) byl kvantitativně převeden do 50 ml plastové odměrné baňky. Byl přidán 1 ml roztoku vnitřního standardu (IS) a doplněna voda. Příprava slepých pokusů probíhala stejně jako příprava vzorků, pouze do rozkladných nádobek nebyl navažován med.

Prvky byly stanoveny metodou kalibrační závislosti. K potlačení vlivu matrice bylo využito IS – pro stanovení Pb a Tl byl použit Bi, pro ostatní prvky Rh. Měření probí-

Tabulka I

Parametry rozkladu vzorků. Výkon uveden v % z maximálního výkonu zařízení

Etapa	Teplota [°C]	Tlak [bar]	Doba trvání [min]	Výkon [%]
1	130	30	2	60
2	180	60	2	70
3	240	100	7	90
4	50	60	48	0

Tabulka II
Parametry měření stopových prvků pomocí ICP-MS

Parametr	Hodnota	
	1. bez reakčního plynu	2. s reakčním plynem
Etapa		
Příkon do plazmatu	1100 W	1100 W
Průtok Ar zmlžovačem	0,7 l min ⁻¹	0,7 l min ⁻¹
Průtok pomocného Ar	1 l min ⁻¹	1 l min ⁻¹
Průtok plazmového Ar	11 l min ⁻¹	11 l min ⁻¹
RPQ	–	0,8
Průtok methanu	–	0,7 ml min ⁻¹
Měřené isotopy	analyty: ²⁷ Al, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁶⁵ Cu, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ⁶⁶ Zn, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁵ Tl vnitřní standard: ²⁰⁹ Bi, ¹⁰³ Rh	analyty: ⁵² Cr, ⁵⁶ Fe vnitřní standard: ¹⁰³ Rh
Doba odečtu	50 ms na isotop	50 ms na isotop
Počet odečtů na opakování	10	10
Počet opakování na repliku	1	1
Počet replik	10	20

hala na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Kanada) ovládaném softwarem ELAN ICP-MS Instrument Control Version 3.4 (Perkin Elmer, Kanada). Všechna měření probíhala ve dvou etapách (tab. II), tj. bez použití reakčního plynu a s ním. Ke stanovení meze detekce (LOD) byly spočteny průměrné hodnoty obsahu stanovovaných prvků v 11 slepých pokusech a příslušné výběrové směrodatné odchylky. Ke stanovení opakovatelnosti byly pro každý prvek využity všechny dvojice koncentrací nad LOD. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen certifikovaný referenční materiál medu, byla výtěžnost stanovena metodou standardního přídatku. Data byla zpracována v MS Office 2010 (Microsoft, USA). Analýza hlavních komponent (PCA) byla provedena v programu The Unscrambler 10.2 (Camo, Norsko).

Výsledky a diskuse

Byly spočteny hodnoty LOD, relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti a výtěžnost metody (tab. III). Nejvyšší LOD má Al, což je způsobeno jeho vysokým přirozeným pozadím. Obecně je patrné, že hodnoty LOD pro jednotlivé prvky se odvíjí mimo jiné od jejich výskytu v pracovním prostředí.

Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti je pro některé prvky (zvláště Pb) poměrně velká. Pravděpodobným vysvětlením je nehomogenita vzorků. Z analýzy použitou metodou získáváme informace o celkovém obsahu prvků ve vzorcích (resp. v navážkách) a nikoli o jejich formě. Právě na ní však může záviset rovnoměrnost rozlo-

žení prvku ve vzorku. Takto si lze vysvětlit nízkou opakovatelnost u Pb, kde se předpokládá, že se vyskytuje adsorbované na prachových částicích, hlavně jako pozůstatek z aditiv do benzínu. Výtěžnost pro většinu prvků je velmi dobrá. Nejhorší (93,6 %) je u Al, který má však také ze všech sledovaných prvků nejvyšší LOD. Vzhledem k tomu považujeme výtěžnost i u Al za uspokojivou.

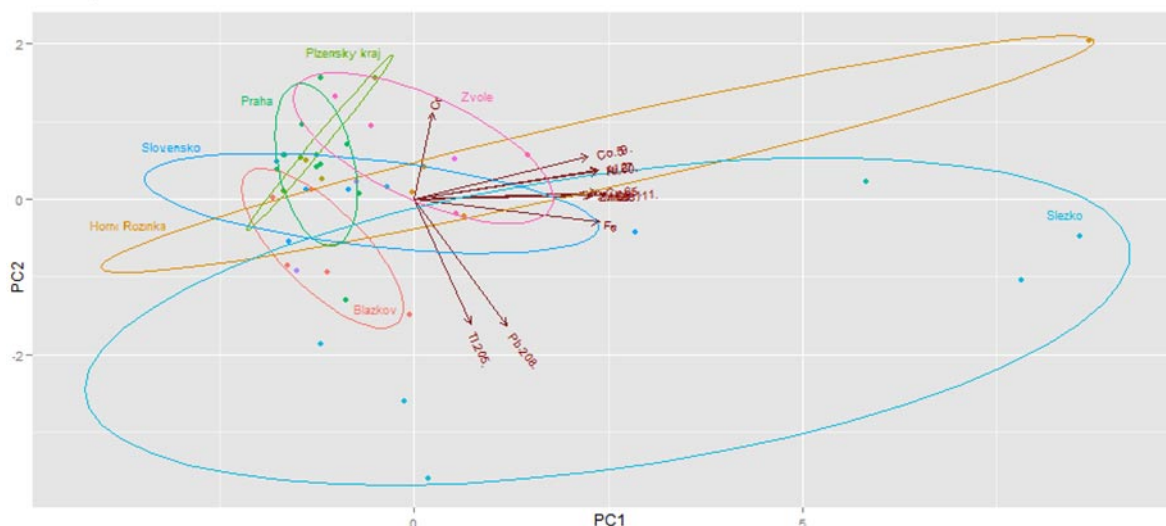
Ze stanovovaných prvků je mezinárodně v potravinách nejvíce kontrolován obsah Pb a Cd. Pro posouzení rizikovitosti obsahu těchto prvků v medu byl využit text nařízení Evropské komise⁷ vycházející z údajů Světové zdravotnické organizace (WHO). Dle textu⁷ byly v roce 1992 Vědeckým výborem schváleny tolerovatelné týdenní příjmy Pb 25 a Cd 7 µg kg⁻¹ tělesné hmotnosti. Text⁷ uvádí maximální přípustné limity koncentrací pro různé druhy potravin. Údaje pro med k dispozici nejsou, hodnoty pro Pb se pohybují (v mg kg⁻¹ čerstvé suroviny) od 0,020 pro mléko a kojeneckou výživu až po 1,5 pro mlže. Limity pro Cd (v mg kg⁻¹ čerstvé suroviny) se pohybují od 0,050 pro maso, ovoce a zeleninu až po 1,0 pro mlže a hlavonožce.⁷ Srovnáním těchto hodnot s naměřenými daty pro vzorky medu je zřejmé, že obsah Pb je pro dospělou populaci bezproblémový, avšak 4 vzorky (z 6) z Moravskoslezského kraje by neprošly přísnými limity pro kojeneckou výživu stejně jako 1 vzorek (z 10) z Prahy a po jednom také z Českomoravské vrchoviny (z 12) a ze Slovenska (z 5). Srovnáme-li nejpřísnější nalezený limit pro Cd (50 µg kg⁻¹), zjistíme, že všechny zkoumané vzorky se nacházejí pod úrovní tohoto limitu.

Pro ostatní prvky nebyly nalezeny limity stanovené Evropskou unií či WHO, jejich kontrola se řídí místní legislativou či u nich existují jen doporučené denní příjmy.

Tabulka III

Hodnoty LOD, relativní směrodatné odchytky opakovatelnosti s_r , a výtěžnosti v

	Al	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Zn	Pb	Tl	Cr	Fe
LOD ng/g vzorku	592	0,126	0,348	7,97	7,24	10,2	47,9	4,62	0,0199	7,88	168
s_r	6,0%	12,2%	2,0%	2,6%	1,1%	8,4%	6,7%	23,7%	2,1%	8,3%	5,1%
v	93,6%	98,5%	99,7%	97,2%	99,9%	97,7%	95,6%	101,2%	103,0%	105,2%	101,8%



Obr. 1. Grafický výstup rozložení vzorků podél PC1 a PC2 s elipsami vyjadřujícími 68% pravděpodobnost výskytu vzorku z dané lokality. Vektory znázorňují zátěže studovaných prvků

Například pro Tl nastává dle cit.⁸ zdravotní riziko při dlouhodobém příjmu nad 10 μg denně. Med s nejvyšším obsahem Tl (z Frýdku-Místku) obsahoval necelých 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, což znamená, že při běžné konzumaci otrava nehrozí. I výskyt ostatních prvků ve vzorcích by na základě údajů plynoucích z české legislativy neměl být rizikový. Je však nutné zmínit, že limity pro koncentraci prvků v medu neexistují, a tak byly naměřené údaje srovnávány s limity pro jiné potraviny.

Získaná data obsahů prvků ve vzorcích byla hodnocena analýzou hlavních komponent (PCA). Z výsledných grafů komponentního skóre a zátěží (např. obr. 1) je patrné, že výskyt studovaných prvků ve vzorcích souvisí s lokalitou původu. Je například vidět, že medy pocházející z Prahy jsou si až na jednu výjimku složením velice blízké, a pokud se podíváme na vektory zátěží, vidíme, že se spojuje relativně nízký obsah prakticky všech stanovovaných prvků. Naopak vzorky ze Slezska se vzájemně zřetelně liší, z vektorů zátěží a polohy vzorků v rovině PC1 a PC2 je zřejmé, že jsou mezi nimi více zastoupeny vzorky bohatší na stopové prvky, zvláště Tl či Pb. Ačkoli je závislost obsahu studovaných prvků na lokalitě zřejmá, není možné pouze na základě výskytu studovaných prvků zpětně jednoznačně určit geografický původ.

Závěr

Byly proměřeny obsahy 11 vybraných prvků ve vzorcích medů z České a Slovenské republiky. U většiny prvků se použitá metoda ukázala být dostatečně citlivou pro stanovení koncentrací ve všech zkoumaných vzorcích. Z hlediska zdravotního nebyla zjištěna rizika pro dospělou populaci. Ukázalo se, že rozdíly ve složení mezi jednotlivými lokalitami jsou patrné. Do budoucna je cílem výzkumu prozkoumat další aspekty ovlivňující složení medu, zvláště vliv zpracování a balení. Cenné výsledky by mohlo přinést studium vlivu druhu medonosných rostlin.

LITERATURA

1. <http://vcelarske-potreby.on-line-obchod.cz/historie-medu> (staženo 31. října 2015).
2. Semerádová N.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita v Brně, Brno 2013.
3. Da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Costa A. C. O., Fett R.: *Food Chem.* 196, 309 (2016).
4. Dorne J. L. C. M., Fink-Gremmels J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270 (3), 187 (2013).
5. <http://tresen.vscht.cz/kot/wp-content/>

- uploads/5_inorganic.pdf (staženo 1. listopadu 2015).
6. Benda V., Babůrek I., Kotrba P. *Základy biologie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006.
 7. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úř. věst. L 364, 20.12.2006, s. 5.
 8. <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92211.aspx> (staženo 1. listopadu 2015).

K. Matějková, A. Kaňa, and O. Mestek
(*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Determination of Trace Elements in Czech Honey**

Honey is generally considered as nutritionally valuable food. The aim of this study was (a) determination of the content of selected (both essential and toxic) metal elements in the Czech honey samples using the inductively coupled plasma – mass spectrometric method, (b) evaluation of the data obtained considering the influence on human health and (c) elucidation of the relationship between the elements contents and geographic origin of the honey employing the principal component analysis. The results show that the contents of elements do not represent any health risks for adults. The geographic source is somewhat reflected in the honey composition but the relationships are too complex to allow us the determination of the honey origin based on the information about metal elements contents.

Keywords: honey, inductively coupled plasma – mass spectrometry, principal component analysis, honey origin

ROZPUSTNOST PACHOVÝCH MOLEKUL

KAROLÍNA PAROULKOVÁ, VERONIKA ŠKEŘÍKOVÁ a PETRA CINKOVÁ

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

Klíčová slova: lidský pach, mastné kyseliny, estery
mastných kyselin, GC-MS

Úvod

Pachová signatura člověka patří do skupiny kriminálních stop. Zatím je jen podpůrným důkazem, ovšem jsou zde snahy zařadit ji mezi důkazy přímé. K tomu napomáhá analýza pachu. Výzkumy zaměřené na detekování složení pachu mají za cíl dospět až do fáze, kdy bude možné propojit nalezený pach s konkrétní osobou.

Pach člověka se člení na tři možné kategorie. Pach individuální (primární) je po celou dobu života stálý, protože je spojen s genetickou informací. Druhový pach (sekundární) je ovlivnitelný (stravou, léky, nemocí) a napomáhá dotyčnou osobu zařadit do určité skupiny, čímž se miní rozlišení pohlaví, etnika, chorob a dalších. Pachy přidružené (terciární) nemají spojitost s lidským organismem. Jsou vytvářeny okolím, ve kterém se člověk pohybuje a používanou kosmetikou^{1,3}.

Lidský pach je pro každého člověka jedinečný a nezměnitelný. Jde o látku složenou z velkého množství různých komponent, kam lze zařadit mastné kyseliny a jejich estery, thiole, steroidy, aldehydy, aminy, ketony, alkoholy a mnohé další. Mezi charakteristické vlastnosti látek tvořících pach patří jejich dobrá rozpustnost v tucích, těkavost a nízká molekulová hmotnost¹⁻³.

Mastné kyseliny a jejich estery jsou jedním z hlavních nositelů pachové signatury. Lidský organismus je schopen si v malé míře syntetizovat mastné kyseliny sám, ovšem většina mastných kyselin se do organismu dostává v potravě. Jejich hlavním zdrojem jsou oleje a maso. Živočišná strava je bohatá na nasycené kyseliny s dlouhým řetězcem, zatímco u rostlinné převládají mononenasycené a polynenasycené kyseliny s dlouhým řetězcem⁴.

V těle se vyskytují volně nebo vázané v triacylglycerolech, popřípadě v jiných lipidech. Aby byl organismus schopen si kyseliny syntetizovat, potřebuje k tomu neustálou dostupnost Acetylkoenzymu A. Ten napomáhá prodlužovat uhlíkatý řetězec vždy o dva uhlíky. Organismus dokáže nejen prodloužit řetězec mastných

kyselin, ale je rovněž uzpůsoben k jejich zkracování, k čemuž dochází prostřednictvím β -oxidace. Řetězce jsou zkracovány o dva uhlíky až na výchozí Acetylkoenzym A. Veškeré reakce probíhají na třetím atomu uhlíku, tzv. β uhlíku⁵.

Problematika esterů mastných kyselin není samostatně zcela prozkoumána. Jsou rovněž součástí biotransformačních procesů. Dají se detekovat v lidském těle, například ve formě FAEE (ethylestery mastných kyselin), ale lze je nalézt i v externích zdrojích, jako jsou oleje⁶.

Ethyl estery vyšších mastných kyselin jsou metabolitem ethanolu. V krvi je lze detekovat během 24 hodin po požití alkoholu. Ale ani poté se FAEE z těla zcela neztratí, ukládají se v tukové tkáni a část z nich přechází i do vlasů. V nich se dají detekovat po velmi dlouhé časové období. Prakticky se dá říct, že ve vlasech FAEE zůstávají až do chvíle, než vlasy odrostou a ostříhají se.⁷

Experimentální část

K přípravě roztoků byly použity standardy aldehydů, ketonů, esterů, kyselin, n-alkanů a skvalenu od firmy Sigma-Aldrich o čistotě 99,5 %. Následující tři rozpouštědla byla použita k rozpuštění standardů: Hexan od Sigma-Aldrich (čistota $\geq 99\%$ pro GC), Ethanol od VWR Chemicals (čistota $> 99,7\%$) a Acetonitril od Fluka (čistota $\geq 99,9\%$ pro LC-MS).

Modelová směs byla připravena navážením standardů, která byla převedena do 10 ml odměrné baňky, a to tak aby výsledná koncentrace byla 1 mg ml^{-1} . Vše bylo rozpuštěno v hexanu. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Dalším ředěním pracovního roztoku byla připravena kalibrační řada, která zahrnovala celkem sedm roztoků v koncentracích od $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ do $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

Bylo vytvořeno celkem devět modelových vzorků a tři vzorky slepé. Příprava spočívala v nanesení $20 \text{ } \mu\text{l}$ modelového roztoku o koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ na sorbent (skleněné kuličky) umístěný v čistých vialkách. Po odpaření rozpouštědla (hexan) byly kuličky převrstveny 10 ml rozpouštědla (hexan, acetonitril nebo ethanol). Vialky byly umístěny do ultrazvukové lázně a látky byly extrahovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. 5 ml extraktu bylo postupně převedeno do vialek s kónickým dnem, extrakční rozpouštědlo bylo odstraněno volným odparem do sucha. Odparek byl následně rozpuštěn v $50 \text{ } \mu\text{l}$ hexanu. Pro každé rozpouštědlo byly připraveny tři modelové vzorky a jeden slepý vzorek, kde byly oplachovány kuličky bez aplikované modelové směsi.

Skleněné kuličky se před každým použitím čistí standardizovaným postupem. Kuličky se nechají minimálně

24 hodin stát v kyselině chromsírové. Po slítí kyseliny jsou kuličky opláchnuty v 30 % peroxidu vodíku. Následuje dvojnásobné promytí v superčisté vodě, hexanu a ethanolu. Takto vyčištěné kuličky jsou napočítány po čtyřiceti do kádinek a vysušeny v sušárně, kde se nechají tři hodiny při teplotě 230 °C. Po vyjmutí ze sušárny jsou uchovávány v exikátoru, a to maximálně po dobu 7 dnů.

Kalibrační řada i vzorky byly proměřovány na přístroji Shimadzu GC-MS – QP 2010 SE. Výsledné chromatogramy se vyhodnocovaly softwarem GCMS-Solution a jednotlivé látky v chromatogramech 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-5ms o délce 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a filmem 0,25 μm.

Dávkování roztoků do přístroje bylo prováděno horkou jehlou, kdy do skleněné dávkovací stříkačky Hamilton byl natažen 1 μl roztoku. K němu byl nabraán 0,5 μl vzduchu. Takto připravená stříkačka byla zavedena do dávkovače a 5 s temperována na teplotu dávkovače. Po uplynutí této doby byl vzorek převeden do nástřikového prostoru dávkovače. Liner dávkovače byl vyhříván na 280 °C. Vzorek byl na kolonu dávkován za tlaku 200 kPa (udržován po dobu 1 min) v módu *splitless*.

Optimální teplotní gradient obsahoval tři rampy a čtyři izokratické kroky. Teplota kolony na začátku měření byla 50 °C po dobu dvou minut. Poté začala postupně narůstat rychlostí 5 °C min⁻¹ na teplotu 150 °C. Tato teplota byla isokraticky držena po dobu pěti minut. Pak došlo znova k nárůstu teploty na 220 °C rychlostí 8 °C min⁻¹ (opět isokraticky ustáleno na 5 minut). Poslední nárůst teploty byl na 320 °C, opět 8 °C min⁻¹. Tato teplota byla udržována 16,75 minut. Celková doba analýzy byla 70 minut.

Výsledky a diskuse

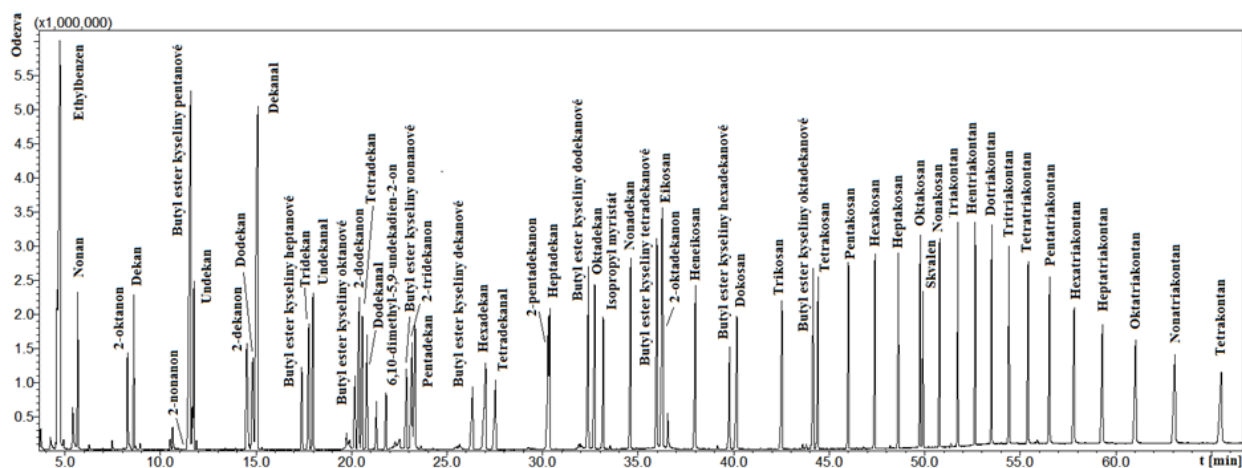
První měření proběhly podle předchozích experimentů, kde byl jako počáteční gradient použit lineární gradient s nárůstem teploty 50 – 300 °C rychlostí 8 °C min⁻¹, a 15 minutovým izotermickým krokem při 300 °C. Separace všech složek modelové směsi ale nebyla dostatečná. Největší problémy byly v jedenácté a šestnácté minutě, a dále za dvacátou minutou, kde docházelo ke koeluci několika látek. Při 300 °C byl posledním eluovaným píkem tetratriakontan (C34), přičemž modelová směs obsahovala n-alkany až do tetrakontanu (C40).

Pro odstranění těchto nedostatků byla nastavena nová metoda, která kombinovala snížení strmosti nárůstu teploty s přidáním tří teplotních plat. Toto řešení se ukázalo jako velice efektivní, protože v kritických místech došlo k separaci látek. Snížení strmosti teplotního gradientu umožnilo oddělit nonan od eluční zóny rozpouštědla. Zvýšení koncové teploty na 320 °C pak umožnilo eluci všech n-alkanů až po tetrakontan.

Na obr. 1 je vidět chromatogram modelové směsi o koncentraci 50 μg ml⁻¹. Tento vzorek byl proměřován optimalizovanou metodou.

V experimentu byla porovnávána tři rozpouštědla: hexan, ethanol a acetonitril. Ačkoliv se jedná o rozpouštědla určená pro chromatografii, nebo přímo pro hmotnostní spektrometrii (acetonitril), při odpařování do sucha u nich došlo k zakoncentrování nečistot. V hexanu zůstávají nepolární látky, jako jsou n-alkany. V ethanolu a acetonitrilu se naopak vyskytují látky polárního charakteru (alkoholy, aldehydy, estery mastných kyselin). Ethanol, na rozdíl od acetonitrilu, vykazoval dobrou odezvu i pro nepolární látky. Důvodem je nižší polarita, než u acetonitrilu.

V experimentu byla pozornost věnována nejen kvalitativnímu složení extraktu, ale i kvantitativnímu obsahu látek. Obsah jednotlivých látek byl určen metodou kalibrační křivky, která byla získána proměřením 7 kalibračních



Obr. 1. Chromatogram vzorku o koncentraci 50 μg ml⁻¹

roztoků v rozmezí koncentrací 0,5–50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Modelový vzorek byl připraven z 20 μl modelové směsi. Postupným ředěním, zakoncentrováním volným odparem a znovurozpuštěním odparu v 50 μl hexanu, byl připraven roztok o teoretické koncentraci 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Ze zjištěných reálných koncentrací a znalosti teoretické koncentrace jednotlivých látek v modelovém vzorku byla vypočítána výtěžnost extrakce.

Závěr

Byla vytvořena metoda pro separaci modelové směsi látek přítomných ve vzorcích lidského pachu. I tak se ovšem v chromatogramu vyskytují oblasti, které je stále zapotřebí podrobit optimalizaci. Úpravy teploty v už optimalizované metodě nevedly k požadovanému výsledku, tím pádem bude v dalším kroku optimalizace pozornost zaměřena na úpravu tlaku, popřípadě na úpravu průtoku.

V rámci porovnání rozpouštědel se jako nejlepší jevil ethanol, ve kterém vidíme jak látky polární, tak i nepolární. V jeho neprospěch vypovídá vyšší cena a nízká těkavost mající za následek zdlouhavou přípravu vzorku. Otázkou zůstává, jestli bychom neztratili část látek ze vzorku, pokud bychom odtěkání rozpouštědla napomohli např. snížením tlaku. Jistým kompromisem se tak jeví použití acetonitrilu.

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

LITERATURA

1. Strauss J., Kloubek M.: *Kriminalistická odorologie*. Aleš Čeněk s.r.o., Plzeň 2010.
2. Vítková J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2007.

3. Sunil K. J., Kenshi H.: *Sens. Actuators, B* 206, 471 (2015).
4. Dostál J. a spol.: *Lékařská chemie II - Bioorganická chemie, 2. vydání*. Masarykova univerzita, Brno 2009.
5. Duška F., Trnka J.: *Biochemie v souvislostech, díl I. – Základy energetického metabolismu, 1. vydání*. Univerzita Karlova, Praha 2006.
6. Politi L., Mari F., Furlanetto S., Del Bravo E., Bertol E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 1192 (2011).
7. Kulig C. C., Beresford T. P., Everson G. T.: *J. Lab. Clin. Med.* 147, 133 (2006).

K. Paroulková, V. Škeříková, and P. Cinková
(*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Engineering, UCT Prague*): **The Solubility of Odorous Molecules**

Human odour is a very complex chemical mixture; however main components were successfully described. Human odour contains fatty acids and their esters, therefore is rather lipophilic and less volatile. Based on the previous experiment, standard mixture, which consists of Fatty acids and their esters, Aldehydes, Ketones, n-Alkanes and Squalene, was prepared. Three solvents with various polarities were used for extraction of target compounds from glass beads. The main goal of this experiment was to determine differences in the extraction selectivity of solvents used in the GC-MS analysis of the human odour – acetonitrile, ethanol and hexane.

Keywords: human odour, fatty acids, esters, GC-MS

STUDIUM KINETIKY ROZKLADU TOXICKÝCH ORGANOFOSFÁTŮ ZA PŘÍTOMNOSTI NANOKRYSTALICKÝCH OXIDŮ KOVŮ

MARTIN PŠENIČKA a PAVEL KURÁŇ

Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Králova Výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem
Psenickamartin@seznam.cz

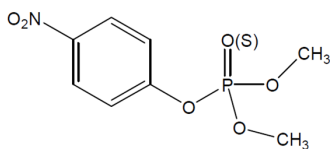
Klíčová slova: degradace, reaktivní sorbenty, parathion methyl

Úvod

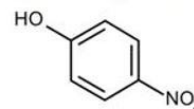
Cílem práce je přinést nové znalosti a praktické zkušenosti v oblasti degradace organofosfátů na reaktivních sorbentech s orientací na vývoj a testování nových, účinných nanokrystalických sorbentů na bázi oxidů kovů s jejich následnou aplikací na odstraňování organofosforečných pesticidů z životního prostředí^{1,2}. Tyto poznatky mohou být do značné míry aplikovány i na degradaci bojových otravných látek. Jako představitel organofosfátů byl testován parathion methyl a jeho hlavní degradační produkt 4-nitrofenol (obr. 1, 2).

Parathion methyl je organofosforečný vysoce toxický akaricid a insekticid, který je často používán k hubení hmyzích škůdců a při ochraně zemědělských plodin, zejména rýžových a bavlněných polí³. V životním prostředí dochází k jeho distribuci jak v atmosféře, půdě, tak i ve vodním prostředí a snadno tak proniká do potravního řetězce. Jeho absorpce do těla je velmi snadná a během procesů biotransformace pesticidu v játrech, mohou vzniklé oxony inhibovat acetylcholinesterázu. Ta již není schopna rozkládat acetylcholin, (důležitý neurotransmitter)⁴. Může tak dojít k trvalé poruše nervové soustavy, která může vést až ke smrti udušením. Předpokládaný mechanismus degradace parathion methylu na povrchu reaktivních sorbentů² je schématicky znázorněn na obr. 3.

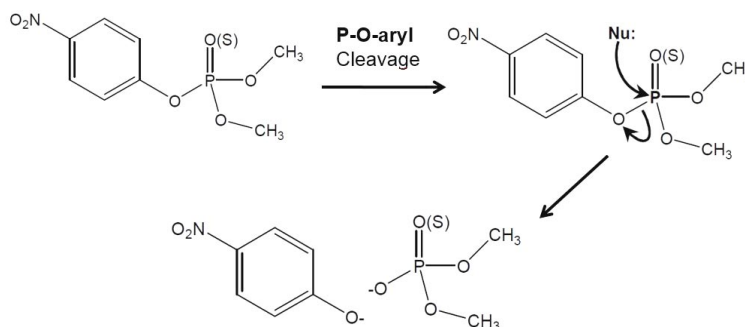
Zkoumané sorbenty byly připraveny různými metodami (metoda sol-gel⁵, srážení atd.) jak na pracovištích fakulty životního prostředí UJEP, tak i ve spolupráci s výzkumným ústavem anorganické chemie v Řeži (ÚACH Řež). Proběhlo testování nanokrystalických oxidů kovů TiO₂, ZrO₂, CeO₂ a jejich směsí v různých molárních poměrech jednotlivých kovů (např. 2Ti.8Ce představuje směs TiO₂ a CeO₂ s molárním zastoupením prvků Ti a Ce v poměru 2:8)



Obr. 1. Strukturální vzorec parathion methylu



Obr. 2. Strukturální vzorec 4-nitrofenolu



Obr. 3. Schéma předpokládaného mechanismu degradace parathion methylu na povrchu reaktivních sorbentů na hlavní degradační produkt 4-nitrofenol, kdy dochází ke štěpení P-O vazby

Experimentální část

Pro testování připravených sorbentů se použil roztok vybraného pesticidu parathion methylu v heptanu o koncentraci 0,035 M. Do sedmi 4 ml vialek SUPELCO se navážilo 50 mg příslušného práškového sorbentu. Poté se přidalo 0,4 ml rozpouštědla a nadávkovalo se 100 μ l zásobního roztoku pesticidu, čímž se zahájila rozkladná reakce. Doba reakce byla volena v časové řadě 0,5, 8, 16, 32, 64, 96 a 128 minut. Po uplynutí reakční doby se ke směsi přidal 4 ml methanolu, čímž se reakce zastavila. Vialka se poté odstředovala po dobu 4 minut při 4000 otáček/minutu a odstředěný supernatant se převedl do odměrné baňky. K odstředěnému zbytku se přidaly další 4 ml methanolu a znovu se odstředilo. Extrakce se takto provedla celkem 4 krát. Baňka se doplnila methanolem po rysku a vzorek byl analyzován metodou HPLC na kapalinovém chromatografu Merck Hitachi L-7000, vybaveným detektorem s diodovým polem L-74501 a kolonou SXG NH₂ 5 μ m (Tessek). Průtok mobilní fáze (100 % metanol) byl 0,3 ml/min. Monitorovací vlnová délka pro detekci parathion methylu a degradačních produktů byla 230 nm.

Výsledky a diskuse

Výsledky pokusů na připravených sorbentech prokázaly jejich schopnost odbourávání parathion methylu a vznik jeho degradačního produktu 4-nitrofenolu. Jako nejúčinnější byly vyhodnoceny sorbenty 2Ti.8Ce, 1Ti.1Ce, 0Ti.1Ce. Jako středně účinné se ukázaly sorbenty 1Ti.1Zr, 8Ti.2Ce, 8Ti.2Zr, 2Ti.8Zr. Nejméně účinné byly sorbenty TiO₂, ZrO₂, 1Ti.0Ce. Grafické znázornění kinetické závislosti degradace je uvedeno na obr. 4, kde je znázorněn úbytek parathion methylu a přírůstek 4-nitrofenolu na mě-

řených práškových reaktivních sorbentech. U žádného z testovaných sorbentů nedošlo k úplnému odstranění pesticidu (maximální konverze 66 % parathion methylu na 4-nitrofenol za 128 minut bylo dosaženo na sorbentu 2Ti.8Ce). Zůstává tedy prostor pro další úpravy vlastností testovaných sorbentů (derivatizace) a výběr nových funkčních sorbentů na bázi nanokrystalických oxidů kovů.

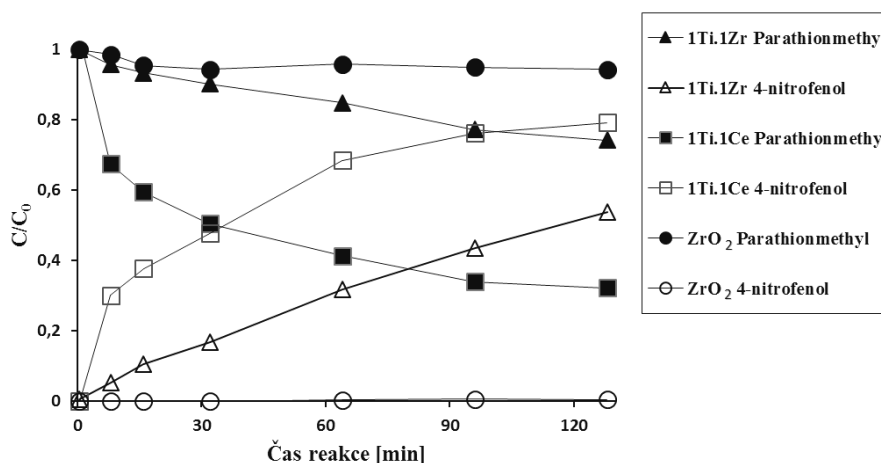
Závěr

Byly prokázány degradační vlastnosti některých připravených reaktivních sorbentů (2Ti.8Ce, 0Ti.1Ce,) z hlediska jejich aplikace pro bezpečnou a rychlou dekontaminaci ŽP od organofosforečného pesticidu parathion methylu. Tyto poznatky lze na základě identického mechanismu degradace ve značné míře využít i pro degradaci dalších organofosforečných pesticidů a také nebezpečných bojových chemických látek na bázi organofosforečných sloučenin (soman, sarin, VX, apod.). Dále bylo prokázáno, že pro stanovení organofosforečných pesticidů a jejich hlavních degradačních produktů je možné použití kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS detekcí pomocí detektoru s diodovým polem, která je dostatečně rychlá, robustní a citlivá.

Tento výzkum byl finančně podporován z projektu IGA – Reaktivní sorbenty -44201-15-0061-01.

LITERATURA

- Lucas E., Decker S., Khaleel A., et al.: Chem. Eur. J. 7, 2505 (2001).
- Šťastný M., Pelant O., Ederer J.: Chem. Listy 107, 273 (2013).



Obr. 4. Příklady kinetických závislostí degradace parathion-methylu na vybraných reaktivních sorbentech v heptanu

3. Gallo M. A., Lawryk N. J.: *Organic phosphorus pesticides*. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. (Hayes W. J., Jr. and Laws E. R., Jr., ed.), 5-3. Academic Press, New York 1991.
4. Goodman M. A., Aschmann S. M., Atkinson R., Winer A. M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 281 (1988).
5. Hench L. L., West J. K.: *Chem. Rev.* 90, 33 (1990).

M. Pšenička and P. Kuráň (*J. E. Purkyně University in Ústí nad Labem, Faculty of Environment*): **Study of Kinetics Degradation of Organophosphorus Pesticide Parathion Methyl on Nanocrystals Metals Oxides**

This work was focused on research of parathion methyl kinetics on nanocrystal of metals oxides. Some of prepared reactive sorbents have degradation properties, maximum conversion (66 %) of parathion methyl to 4-nitrophenol was reached within 128 minutes on sorbent 2Ti.8Ce. The use of HLPC-UV-Vis for determination of organophosphorus pesticides by means of quick, robust and sensitive diode array detector was shown to be possible.

Keywords: degradation, reactive sorbents, parathion methyl

DUÁLNÍ SENZOR NA BÁZI Eu(III) KOMPLEXU

FILIP SMRČKA^a, JAKUB VANĚK^{a,b}
a PŘEMYSL LUBAL^{a,b}

^a Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^b Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
filip.smrcka@gmail.com

Klíčová slova: makrocyclické ligandy, Eu(III) komplex, cyklická voltametrie, luminiscenční spektroskopie, anténový efekt

Úvod

Komplexy Ln(III) iontů jsou díky svým spektroskopickým, elektrochemickým a magnetickým vlastnostem^{1,2} využitelné v nejrůznějších chemických a biologických aplikacích, např. Ln(III) komplexy DOTA makrocyclického ligandu se používají v medicíně jako radiofarmaka^{3,4} nebo Gd(III) komplexy jako kontrastní látky pro diagnostické účely pomocí MRI (cit.^{1-3,5}). V biologických aplikacích jsou používány luminiscenční sondy na bázi Ln(III) komplexů díky jejich neobvyklému luminiscenčnímu chování vykazující vysoké Stokesovy posuny úzkých emisních pásů o pološifce 10–20 nm a výjimečně dlouhé poločasy vyhasínání, které dosahují až stovky μs (cit.^{1,2}). Makrocyclické hexadentátní (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctová kyselina, H₃DO2A) a heptadentátní (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, H₃DO3A) ligandy tvoří s Eu(III) iontem komplexy o vysoké termodynamické stabilitě a kinetické inertnosti^{6,7}, přičemž jsou schopny dále reagovat s dalšími mono- a bidentátními ligandy (např. F⁻, octan, uhličitan, hydrogenufosforečnan, aj.) za vzniku ternárních komplexů^{6,7}, čehož lze využít k jejich stanovení. Tato práce popisuje využití Eu(III) komplexů DO2A a DO3A makrocyclických ligandů pro voltametrické a luminiscenční stanovení vybraných analytů.

Experimentální část

Pro experimenty byly použity následující chemikálie: uhličitan sodný, kyselina pikolinová = PA, kyselina dipikolinová = DPA (všechny p. a. čistota) byly dodány firmou Sigma-Aldrich, USA), kdežto kyselina isochinolin-3-karboxylová = ICQA (p. a.) firmou Acros Organics (Belgie). Makrocyclické ligandy H₃DO3A a H₃DO2A

byly syntetizovány firmou CheMatech (Francie). Zásobní roztok EuCl₃ byl připraven rozpuštěním Eu₂O₃ (p. a., Alfa Aesar Německo) v malém množství kyseliny chlorovodíkové a jeho standardizace byla provedena chelatometrickou titrací. Iontová síla 0,1 mol dm⁻³ byla nastavena roztokem KCl. Měření bylo prováděno při 25,0 ± 0,5 °C.

Luminiscenční spektra byla změřena na spektrometru Aminco-Bowman Series 2 (Thermo-Spectronic, USA) s vlnovým rozsahem 200–800 nm, který používá jako zdroj kontinuální nebo pulsní Xe-lampu. Cyklicko-voltametrická (CV) měření byla provedena na potenciostatu Autolab PGSTAT 30 (Metrohm, Švýcarsko) ovládaný GPES 4.9 software s použitím tří-elektrodového uspořádání – visící rtuťová kapková elektroda (pracovní), platinová elektroda (pomocná) a argentochloridová elektroda (referentní), dále na potenciostatu Metrohm 910 PSTAT mini (Metrohm, Švýcarsko) za použití tištěných elektrod (tří-elektrodové zapojení, Au – pracovní, C – pomocná, Ag – referentní). Většina experimentů byla provedena s nastavenou rychlostí polarizace 50 mV s⁻¹, kdy na elektrodě probíhá redoxní proces řízený difúzí⁸. Roztok (*c*_{EuL} = 0,1 mM, pH 7,4 (fluorimetrie) nebo 0,5 mM, pH 7,0 (CV)) byl probubláván argonem za účelem odstranění rozpuštěného kyslíku z atmosféry.

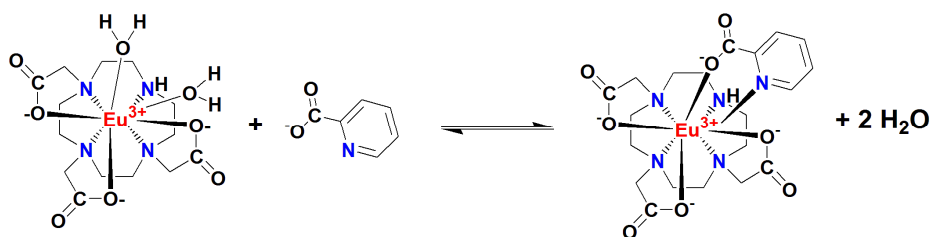
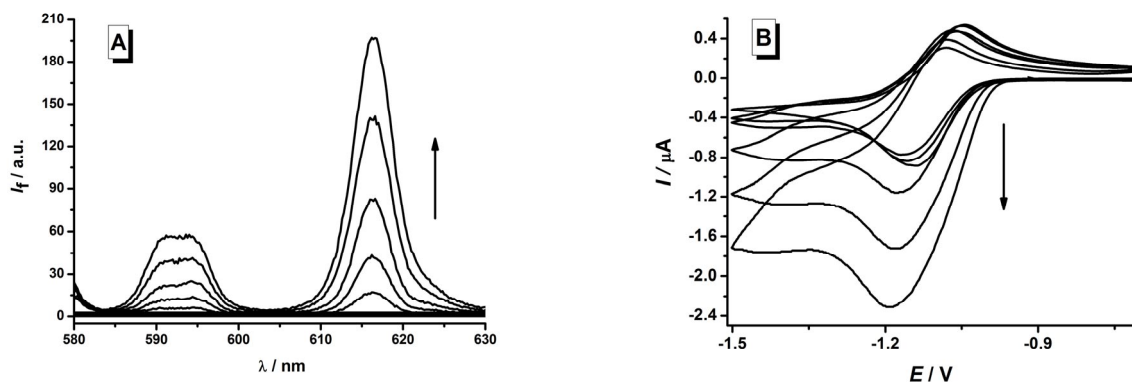
Výsledky a diskuse

Tvorba ternárního komplexu [Eu(DO3A)(PA)]⁻ (Schéma 1) byla studována pomocí luminiscenční spektroskopie a cyklické voltametrie (obr. 1). Po přidávku kyseliny pikolinové dochází k zvýšení intenzity luminiscenčních pásů při 594 a 618 nm (obr. 1A) v důsledku vytěsnění dvou molekul vody, které vykazují zhášecí efekt, z koordinační sféry Eu(III) komplexu. Kyselina pikolinová vykazuje tzv. anténový efekt, neboť v jeho důsledku dochází k asi 170-násobnému zvýšení intenzity fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 286 \text{ nm}$) ve srovnání se 7-násobným navýšením při přímé excitaci Eu(III) iontu ($\lambda_{\text{exc}} = 394 \text{ nm}$). Analogicky byl pozorován nárůst hodnoty katodického proudu (obr. 1B) při hodnotě $E_{1/2} \sim -1,18 \text{ V}$, který odpovídá jed-
noelektronovému redukčnímu ději $\text{EuL} + e^- \rightarrow \text{EuL}^-$.

Tvorba ternárních [Eu(DO3A)(CO₃)]²⁻ a [Eu(DO3A)(PA)]⁻ komplexů studována pomocí luminiscenční spektroskopie umožnila stanovit jejich rovnovážné konstanty, $\log K_{[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{CO}_3)]} = 4,6 \pm 0,1$ a analogicky $\log K_{[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]} = 2,84 \pm 0,06$.

Tyto výsledky ukazují, že substituční reakce (Schéma 2) je z termodynamického hlediska možná, a proto byla tato reakce dále studována.

Průběh substituční reakce komplexu [Eu(DO3A)(PA)]⁻ s uhličitanem je možné detekovat jak luminiscenčně, tak elektrochemicky. Přídavkem uhličitanu do roztoku

Schéma 1. Tvorba ternárního $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]^-$ komplexuObr. 1. Luminiscentní emisní spektra (A, $\lambda_{\text{exc}} = 286 \text{ nm}$) a CV záznam (B) $[\text{Eu}(\text{DO3A})]$ komplexu změřená v koncentračním rozmezí kyseliny pikolinové 0–2 mM

$[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]$ vzniká stabilnější komplex $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{CO}_3)]^{2-}$, což se projeví opětovným poklesem intenzity luminiscence (obr. 2A) a snížením katodického proudu (obr. 2B). Závislost obou analytických signálů lineárně závisí na koncentraci uhličitanu, a proto lze využít tohoto nepřímého způsobu detekce pro citlivé stanovení uhličitanu. Podobný přístup lze využít pro substituční reakci $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{ICQA})]^-$ komplexu s uhličitánem, kdy je k excitaci použito záření o vlnové délce 326 nm.

Další CV experimenty pak byly provedeny s potenciostatem Metrohm 910 PSTAT mini a tištěnou elektrodou kvůli miniaturizaci a zjednodušení měřicí aparatury. Jak je patrné (obr. 3 vs. obr. 1 a 2), tak došlo k deformaci záznamu, nicméně závislost katodického proudu na koncentraci kyseliny pikolinové a uhličitanu zůstává lineární.

Analogická reakce $[\text{Eu}(\text{DO2A})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplexu s kyselinou dipikolinovou je doprovázena změnou hodnoty jak katodického, tak anodického proudu (obr. 4). Po přidávku uhličitanu dochází k obnovení původního záznamu

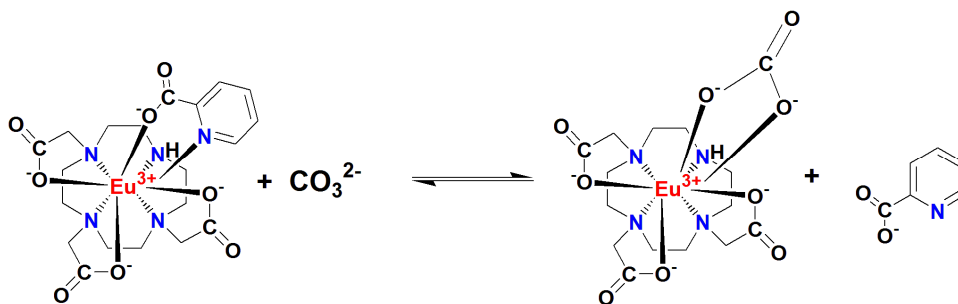
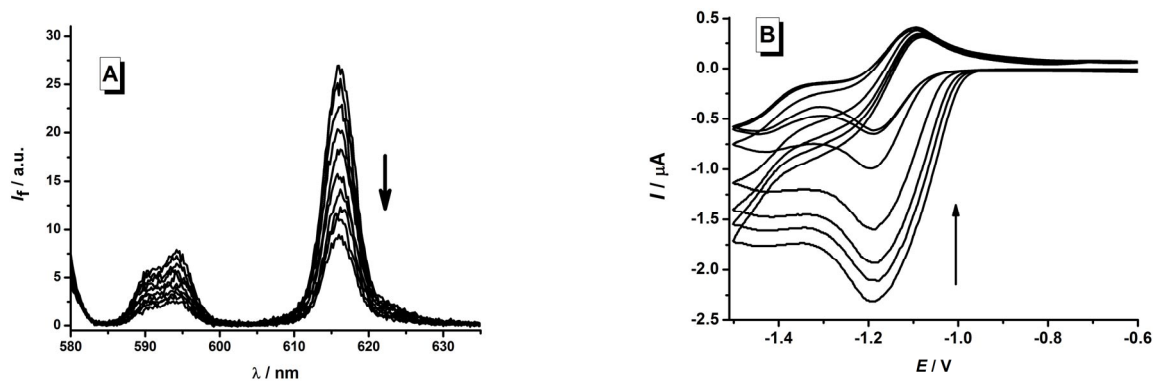
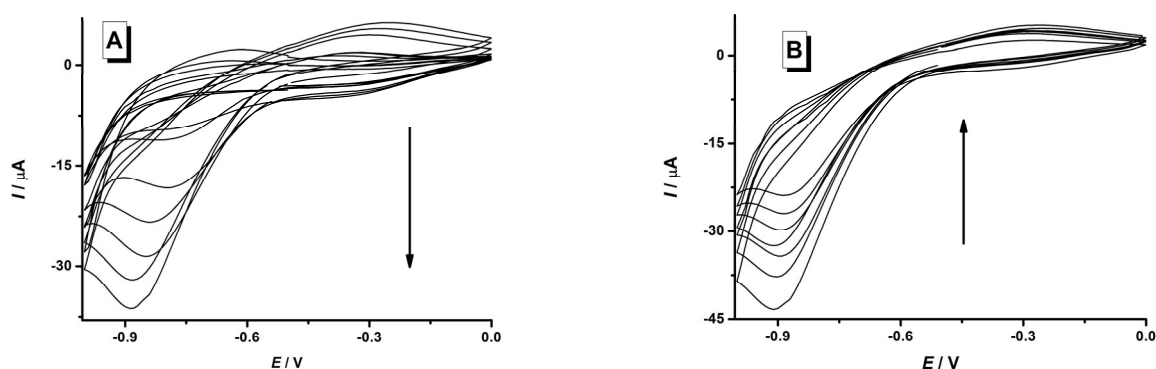


Schéma 2. Substituční reakce použitá pro nepřímou detekci uhličitanu



Obr. 2. Luminiscenční emisní spektra (A, $\lambda_{\text{exc}} = 286 \text{ nm}$) a CV záznam (B) $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]$ komplexu změřená v koncentračním rozmezí uhličitanu 0–6 mM (A) a 0–2 mM (B)



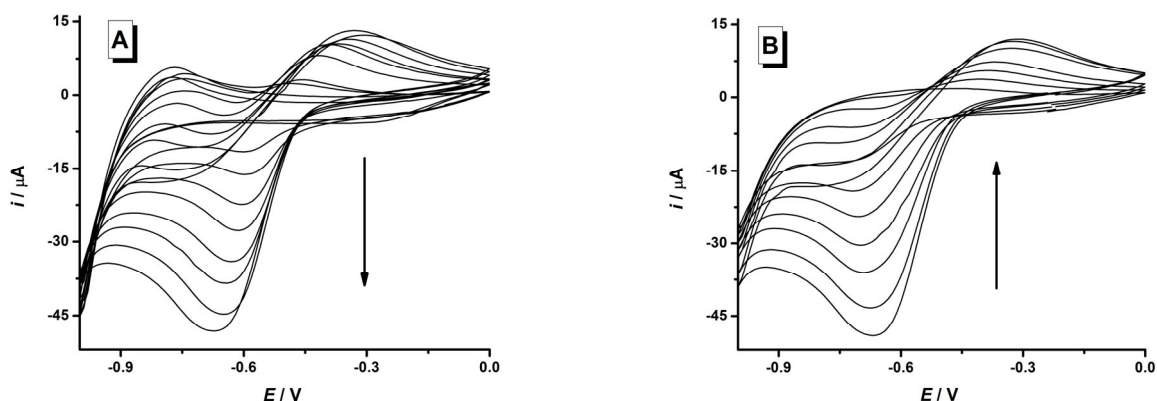
Obr. 3. CV záznam $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplexu (A) po přidavku kyseliny pikolinové (0–2,5 mM). CV záznam $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]^-$ komplexu (B) po přidavku uhličitanu (0–0,5 mM)

mu (obr. 3 vs. obr. 4), protože komplex $[\text{Eu}(\text{DO2A})(\text{CO}_3)]^-$ se tvoří kvantitativně. Ačkoliv pracovní koncentrační rozsah pro stanovení uhličitanů je užší při použití tiskových elektrod, citlivost stanovení a mez detekce jsou o řád vyšší, resp. nižší než při použití AUTOLAB aparatury.

Závěr

Substituční reakce komplexu $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DO3A})]$ s bidentátními ligandy (uhličitan, pikolinát) byla studována pomocí molekulové luminiscenční spektroskopie a cyklické voltametrie. Bylo zjištěno, že konstanta stability ternárního komplexu $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{CO}_3)]^{2-}$ je mnohem vyšší než $[\text{Eu}(\text{DO3A})(\text{PA})]^-$ komplexu, a proto lze použít substituční reakce k detekci organických látek (kyseliny

pikolinová a dipikolinová) a aniontů (uhličitan, štavelan). Obě navržené analytické metody (spektroskopická, elektroanalytická) mají podobné metrologické parametry (dynamický koncentrační rozsah 0–2 mM, mez detekce kolem 0,1 mM), a proto lze použít Eu(III) komplexy DO2A/DO3A makrocyclických ligandů jako duální (optický a voltametrický) senzor k možné detekci uhličitanu nebo některých organických sloučenin (např. kyselina dipikolinová jako marker anthraxového patogenu⁶). Z důvodu vysoké stability ternárních komplexů s uhličitanem neinterferují jiné anionty (např. citráty, šťavelany), proto navržená analytická metoda umožňuje jeho rychlé a selektivní stanovení, kdy lze použít přenosný potenciostat s tiskovými elektrodami pro analýzu vzorků životního prostředí v terénu.



Obr. 4. CV záznam $[\text{Eu}(\text{DO2A})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplexu (A) po přidavku kyseliny dipolinové (0–1,2 mM), CV záznam $[\text{Eu}(\text{DO2A})(\text{DPA})]^-$ komplexu (B) po přidavku uhličitanu (0–0,5 mM)

Tento výzkum byl finančně podporován Ministerstvem školství ČR (ME09065 a MUNI/A/1500/2015), Grantovou agenturou ČR (grant 13-08336S) a EU programy (projekt CEITEC 2020 LQ 1601, COST CM1006). Děkujeme Dr. I. Trískové a Doc. L. Trnkové za možnost provedení CV experimentů na přístroji AUTOLAB.

LITERATURA

1. Sastri V. R., Perumareddi J. R., Ramachandra R. V., Rayudu G.V. S., Bünzli J. C.: *Modern Aspects of Rare Earths and their Complexes*, Elsevier, Amsterdam 2003.
2. Bünzli J. C., Choppin G. R.: *Lanthanide Probes in Life, Chemical, and Earth Sciences: Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam 1989.
3. Kotek J., Lukeš I.: *Chem. Listy* 104, 1163 (2010).
4. Försterová M., Jandurová Z., Marques F., Gano L., Lubal P., Vaněk J., Hermann P., Santos I.: *J. Inorg. Biochem.* 102, 1531 (2008).
5. Hermann P., Kotek J., Kubiček V., Lukeš I.: *Dalton Trans* 23, 3027 (2008).
6. Kirby J. P., Cable M. L., Levine D. J., Manary M. J., Gray H. B., Ponce A.: *Anal. Chem.* 80, 5750 (2008).
7. Vaněk J., Lubal P., Hermann P., Anzenbacher P. Jr.: *J. Fluorescence* 23, 57 (2013).
8. Wang J.: *Analytical electrochemistry*, VCH-Wiley, Weinheim 2006.

F. Smrčka, J. Vaněk, and P. Lubal (Department of Chemistry&CEITEC, Masaryk University, Brno): **Dual Sensor based on Eu(III) Complex**

This paper describes the study of the formation of ternary Eu(III) complex with DO2A and DO3A macrocyclic ligands including the picolinate-like ligands serving as the antenna for luminescence spectroscopy. The luminescent and electrochemical properties of the ternary Eu(III) complex formed can be used for determination of bicarbonate ions and they can be utilized in order to develop a new dual sensor for bicarbonate anion analysis.

Keywords: makrocyclic ligands, Eu(III) complex, cyclic voltametry, luminescence spektroskopie, antenna effect

HMOTNOSTNĚ-SPEKTROMETRICKÉ ZOBRAZOVÁNÍ METFORMINU V ŘEZECH VYBRANÝCH TKÁNÍ

ŠTĚPÁN STRNAD^{a,b}, DAVID SÝKORA^a,
VLADIMÍR VRKOSLAV^b, JOSEF CVAČKA^b,
LENKA MALETÍNSKÁ^b a ZDENKO PIRNÍK^{b,c,d}

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 542/2, 166 10 Praha 6, ^c Ústav experimentálnej endokrinologie SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, ^d Ústav humánnej a klinickej farmakológie UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice
sstrnad@seznam.cz

Klíčová slova: hmotnostně spektrometrické zobrazování, metformin, MALDI, MALDI MSI

Úvod

Hmotnostně spektrometrické zobrazování (MSI) je účinným nástrojem pro lokalizaci analytů v biologických tkáních. Zpočátku bylo demonstrováno především pro zjišťování lokalizace peptidů a proteinů¹. Brzo byla tato metoda aplikována i pro nízkomolekulární látky a ve srovnání s tradičními metodami má několik výhod. Při výzkumu a vývoji léčiv je důležité znát distribuci léčiva a jeho metabolitů v organismu. Tradiční metody neposkytují dostatečnou prostorovou informaci (např. extrakce tkáně a následná analýza pomocí LC-MS) nebo mohou být málo specifické, např. nelze rozlišit léčivo a jeho metabolity (autoradiografie celého těla nebo orgánu)². MSI je citlivá metoda využívající „label-free“ přístup (nepoužívá se izotopové značení) vhodná k zobrazování léčiv i jejich metabolitů v tkáních.

Cílem této práce byla optimalizace metodiky přípravy vzorků pro zjištění distribuce léčiva metforminu, nejrozšířenějšího perorálního antidiabetika proti diabetu II typu, v tkáňových řezech ledvin technikou MSI MALDI-TOF. To zahrnovalo přípravu vzorků před nanesením MALDI matrice, testování matric z hlediska meze detekce a interferencí s analytem a samotnou optimalizací parametrů MSI analýzy.

Experimentální část

Pro výběr vhodné MALDI matrice byly připraveny zásobní roztoky metforminu s koncentrací 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ mg ml⁻¹ v 50 % acetonitrilu. Pro detekci léčiva metforminu byly zvoleny tři matrice: 2,5-di-

hydroxybenzoová kyselina (DHB), α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) a 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP). Dále byla testována možnost měření bez použití matrice (desorpce/ionizace laserem (LDI)). Zásobní roztoky matric o koncentraci 10 mg ml⁻¹ byly připraveny rozpouštěním v acetonitrilu. Jako kalibrant byl použit PEG (200, 400, 600, 1 000, 7,5 mM). Analýza probíhala v pozitivním módu na přístroji ultrafleXtreme™ (Bruker, Německo) s parametry měření uvedenými v tab. I. Nastavení intenzity laseru bylo optimalizováno vzhledem k intenzitě signálu, pozadí a rozlišení. Pro DHB byla použita relativní intenzita laseru 40 %, pro CHCA 25 %, pro THAP 45 % a pro techniku LDI 60 %.

Samcům myši C57 bylo perorálně podáno 100 mg kg⁻¹ metforminu. Následně byla sledována distribuce léčiva v tkáni ledvin 30 a 60 min po podání. Před odebráním tkáně byla provedena perfuze fyziologickým roztokem. Po sběru následovalo zabalení tkáně do hliníkové folie a zmrazení v isopentanu (v suchém ledu). Řezy tkání o tloušťce 12 μm z myších ledvin byly připraveny na mikrotomu. Poté byly umístěny na vodivá ITO sklička (Bruker).

Sublimační aparatura pro nanášení MALDI matrice byla vyrobena ve sklářských dílnách ÚOCHB AV ČR podle komerčně dostupné předlohy (Chemglass Life Science, Vineland, NJ). Sublimace optimální vrstvy matrice DHB probíhala při tlaku 0,4 mbar, teplotě 140 °C po dobu 4 min (cit.³).

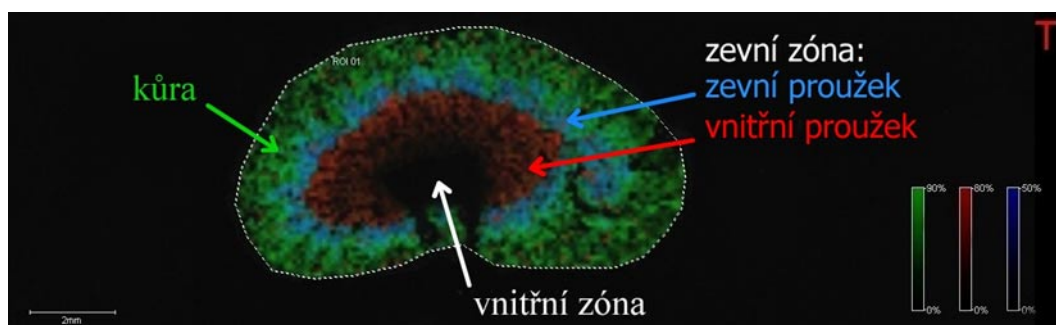
Samotná MALDI MSI analýza řezů tkáně probíhala při rozlišení 100 μm a intenzitě laseru 40 %. Získaná MSI data byla dále zpracovávána v programu flexImaging (Bruker).

Výsledky a diskuse

Prvním krokem byl výběr nejvhodnější MALDI matrice. Z naměřených intenzit iontů metforminu ([M+H]⁺;

Tabulka I
Parametry měření

Iontový zdroj	25,07 kV
Reflektronový mód	zapnutý
Polarita	pozitivní
Potlačení iontů matrice	vypnuto
Počet pulzů	1000
Použitá frekvence laseru	1000 Hz
Intenzita laseru	25–60 %
Hmotnostní rozsah	80–1000 Da



Obr. 1. MALDI MSI řezu ledviny – zobrazení fosfolipidů; zeleně – kůra [PC(38:4)+K]⁺; m/z 844,53; modře – zevní proužek zevní zóny [PC(40:6)+K]⁺; m/z 872,56; červeně – vnitřní proužek zevní zóny [PC(38:6)+K]⁺; m/z 848,56; nezobrazená část – vnitřní zóna; rozlišení 100 μm ; TIC normalizace

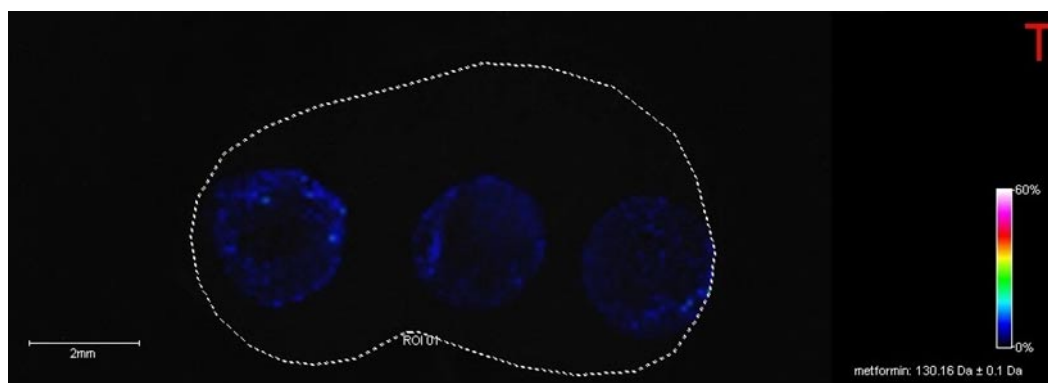
m/z 130,16) o různých koncentracích (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mg ml⁻¹) byl vytvořen graf závislosti intenzity signálu metforminu na jeho koncentraci. Bylo zjištěno, že citlivost meze detekce při použití matrice THAP a techniky LDI jsou příliš nízké. Matrice CHCA poskytovala nejlepší meze detekce, ale v hmotnostním spektru čisté matrice byla patrná výrazná interference v oblasti sledovaného iontu metforminu (m/z 130). Matrice DHB s metforminem neinterferovala, a proto byla dále použita pro navazující MSI experimenty.

Ledviny jsou významným orgánem pro eliminaci léčiv a dalších xenobiotik z těla. Ledvina myši se skládá z kůry (cortex) a dřeně (medulla). Dřeň ledviny lze rozdělit jednak na zevní zónu, která hraničí s kůrou a vnitřní zónu. Zevní zóna obsahuje zevní a vnitřní proužek a vnitřní zóna formuje papulu⁴. Obr. 1 ukazuje distribuci několika fosfolipidů v ledvině myši zjištěnou technikou MALDI MSI. Distribuce těchto fosfolipidů velmi dobře odpovídá jednotlivým výše zmíněným částem ledviny, které jsou podrobně popsány v práci⁵. Kůra je v obr. 2 zobrazena zeleně pomocí draslíkového aduktu fosfolipidu PC(38:4). Zevní proužek zevní zóny dřeně je zobrazen modře a odpovídá draslí-

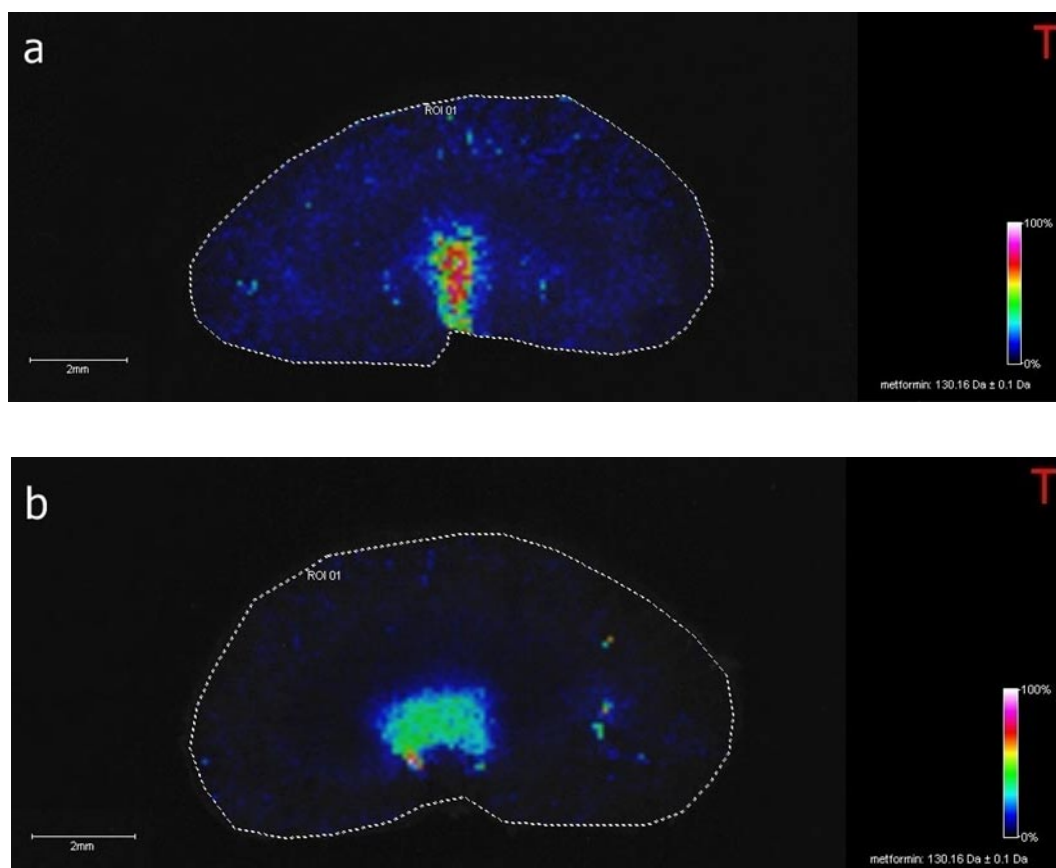
kovému aduktu fosfolipidu PC(40:6) a vnitřní proužek zevní zóny dřeně červeně, draslíkový adukt PC(38:6). Nezobrazená část uprostřed ledviny odpovídá vnitřní zóně dřeně.

Před měřením reálných vzorků řezů s obsahem metforminu bylo třeba zjistit, zda nedochází k prostorově závislému ovlivnění signálu analytu v rámci řezu. Proto byl na povrch řezu ledviny neobsahující metformin nadávkován standard metforminu o koncentraci 10^{-2} mg ml⁻¹ ve formě třech “spotů” a bylo sledováno případné potlačení intenzity signálu v různých částech řezu. Z obr. 2 je patrné, že spoty metforminu na řezu jsou vzájemně velmi podobné (intenzita signálu), z čehož plyne, že vliv pozadí je ve všech částech řezu srovnatelný.

Distribuce léčiva metforminu v ledvinách 30 a 60 min po orálním podání metforminu je ukázána na obr. 3. K zobrazení byl použit iont metforminu [M+H]⁺ (m/z 130,16). Je zřejmé, že vyšší relativní koncentrace metforminu je ve vnitřní zóně ledviny oproti ostatním jejím částem. Z obrázků je patrné, že 30 min po podání léčiva je jeho koncentrace vyšší, než 60 min po podání. Z toho lze usoudit, že již 60 min po podání začíná docházet



Obr. 2. MALDI MSI metforminem “spotovaného” řezu ledvin; metformin [M+H]⁺; m/z 130,16; rozlišení 100 μm ; TIC normalizace



Obr. 3. a) MALDI MSI řezu ledvin 30 min po podání léčiva; b) 60 min po podání léčiva; metformin $[M+H]^+$; m/z 130,16; rozlišení 100 μm ; TIC normalizace

k vylučování. Koncentrace metforminu se v daném časovém intervalu snižuje a začíná se soustřeďovat ve vnitřní zóně dřeně.

Závěr

Cílem této práce byla optimalizace postupu přípravy vzorku a následné hmotnostně spektrometrické zobrazení metforminu v tkáňových řezech ledvin. Byla nalezena vhodná matrice DHB, která poskytovala dostatečnou mez detekce, a zároveň nedocházelo k interferenci iontů analytu s matričními ionty. Tato matrice byla na řezy nanášena sublimací. Při MALDI MSI analýzách na reálných vzorcích myši, kterým byl perorálně podán metformin, bylo zjištěno, že v ledvinách byla nejvyšší relativní koncentrace metforminu ve vnitřní zóně dřeně 30 min po podání léčiva. Jednu hodinu po podání se již koncentrace metforminu začala snižovat.

Pro potvrzení těchto výsledků bude tato studie dále rozšířena o kvantifikaci metforminu v ledvinách, která bude provedena analýzou homogenátů tkání ledvin pomocí LC-MS.

Práce byla finančně podpořena projektem MSMT č. 20/2015 pro VŠCHT Praha a z projektu RVO 61388963.

LITERATURA

1. Caprioli R. M., Farmer T. B., Gile J.: *Anal. Chem.* **69**, 4751 (1997).
2. Prideaux B., Stoeckli M.: *J. Proteomics* **75**, 4999 (2012).
3. Jirásko R., Holčapek M., Kuneš M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 4601 (2014).
4. Krinke G. J., Weber K.: *The Laboratory Mouse*, str. 188. druhé vydání. Academic Press, Boston 2012.
5. Römpf A., Guenther S., Takats Z.: *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 65 (2011).

Š. Strnad^{a,b}, D. Sýkora^a, V. Vrkoslav^b, J. Cvačka^b, L. Maletínská^b, Z. Pirník^{b,c,d} (^a Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, ^c Institute of Experimental Endocrinology of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, ^d University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice): **Mass Spectrometry Imaging of Metformin in Tissue Sections**

Mass spectrometry imaging is a powerful technique suitable for visualization of the distribution of a wide variety of compounds within tissue sections. The main aim of the study was the development and optimization of a sample preparation procedure allowing determination of the

distribution of orally dosed metformin in mice kidney sections. Metformin is the first-line medication for the treatment of type 2 diabetes. The optimization of the sample preparation step before imaging experiments included the selection of a suitable matrix and the optimization of various parameters of MALDI analysis. 2,5-dihydroxybenzoic acid was identified as the best matrix providing highest sensitivity. A sublimation method was successfully used for the matrix deposition. The highest relative concentration of metformin was found in the inner zone of kidney 30 minutes after the drug administration.

Keywords: mass spectrometry imaging, metformin, MALDI, MALDI MSI

STANOVENÍ PRVKŮ V ROSTLINNÝCH MATERIÁLECH METODOU OPTICKÉ EMISNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM A ELEKTROTERMICKÝM ODPAŘOVÁNÍM

LUISA ŠERÁ^{a,b}, STANISLAVA
MATĚJKOVÁ^b a OTO MESTEK^a

^a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 542/2, 166 10 Praha 6
luisa.cernochova@seznam.cz

Klíčová slova: elektrotermické odpařování, optická emisní spektrometrie, indukčně vázané plazma, rostliny

Úvod

Použití elektrotermického odpařování (ETV) jako vnášecího systému do optického spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je vhodné i pro multielementární analýzu biologických vzorků¹. Tato metoda oproti ICP-OES analýze s klasickým vnášecím systémem (pomocí zmlžovače a mlžné komory) přináší řadu výhod. ETV nevyžaduje prakticky žádnou úpravu vzorku, čímž se zkracuje celkový čas analýzy a snižuje riziko kontaminace či ztrát těkavějších analytů. Touto metodou lze přímo analyzovat kapaliny a suspenze i pevné látky, přičemž díky vynechání zředovacího kroku a téměř kvantitativnímu převedení vzorku do plamene vede použití ETV ke snížení limitů detekce (LOD)². Díky tomu lze analyzovat i velmi malá množství vzorků, typicky jednotky mg (cit.³). Dále lze optimalizací teplotního programu použitého k vypařování vzorku zabránit vzájemným interferencím signálů analytů v ICP-OES (cit.⁴). K potlačení interferencí rovněž přispívá vhodná volba modifikátoru používaného k převádění méně těkavých forem analytů na formy snadněji odpařitelné. K dalším výhodám použité metody patří i vysoká časová stabilita⁴ metody, díky níž není nutná kompletní recalibrace před každým měřením.

Cílem mé práce bylo najít a optimalizovat podmínky metody ETV ICP-OES analýzy pro simultánní multielementární stanovení Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Na, Sr, Zn (mikrobiogenních prvků⁵) i Ca, K, Mg, P (makrobiogenních prvků⁵) v rostlinném materiálu, určit LOD, ověřit přesnost a preciznost této metody a posoudit vliv velikosti navážky na přesnost metody a kvalitu výsledků.

Experimentální část

Instrumentace

Všechna měření byla provedena na ICP-OES spektrometru Spectro Arcos s radiálním pohledem do plazmatu (Spectro A.I., Německo) s fixní optikou v Paschenově-Rungeově montáži a detekčním systémem umožňujícím plně simultánní snímání analytických čar prvků v rozsahu 130–770 nm a časově rozlišený záznam intenzit. Výkon generátoru byl nastaven na 1600 W, průtok chladicího plynu na 15 dm³ min⁻¹ a průtok plazmového plynu na 1,2 cm³ min⁻¹. Jako vnášecí systém do ICP-OES spektrometru bylo použito zařízení pro elektrotermické odpařování ETV 4000c (Spectral Systems, Německo). Toto zařízení umožňuje nastavení libovolného teplotního programu v peci, průběh teploty je elektronicky řízen a kontrolován vestavěným pyrometrem. Průtok nosného argonu byl nastaven na 0,140 dm³ min⁻¹, „bypass“ argonu na 0,380 dm³ min⁻¹ a modifikátoru na 2,0 cm³ min⁻¹.

Pro základní ovládání ICP-OES spektrometru byl použit software Smart Analyzer Vision a ke zpracování a vyhodnocení měření pomocí ETV modul Smart ChromPro.

K navážování vzorků byly použity mikrováhy MYA 5.3Y (Radwag, Polsko), standardní vodné roztoky byly před analýzou vysušeny na regulovatelné elektrické plošence (IKA, Německo).

Použité chemikálie

Demineralizovaná voda Milli-Q (Millipore, Bedford, Spojené státy americké)
Kyselina dusičná 65% Suprapur® (Merck, Darmstadt, Německo)
Argon čistoty 4.6 (Messer, Česká republika)
Freon R 12 (TEGA, Würzburg, Německo)

Certifikované referenční materiály:

RM P-ALFALFA Vojtěška (Institute of Radioecology and applied nuclear techniques, Česká republika)
NCS ZC73011 Sója, NCS ZC73016 Kuřecí maso (China National Analysis Centre for Iron and Steel, Čína)
BCR RM No. 482 Lišejník, BCR RM No. 101 Smrkové jehličí (Commission of the European Communities, Community bureau of references)
IAEA – 336 Lišejník (International Atomic Energy Agency, Analytical Quality Control Services)
SRM NIST 1575 Jehličí borovice pinie (U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and technology, Spojené státy americké)
INCT-TL-1 Čajové listy, INCT-OBTL-5 Tabákové listy

(Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polsko)
Jednoprvkové a směsné vodné standardy (Analytika, spol.
s r.o., Česká republika)

Výsledky a diskuse

Vývoj metody

Na základě studia literatury zabývající se stanovením obdobných prvků v organickém materiálu^{1,4}, doporučení výrobce zařízení a vzhledem k vybavení laboratoře byl jako modifikátor použit freon R12, vhodný pro stanovení většiny prvků¹, s průtokem 2 cm³ min⁻¹. Poměry průtoků nosného a „bypass“ argonu byly nastaveny podle doporučení výrobce.

Sledované spektrální čáry (tab. I) byly vybrány částečně dle literatury⁴, částečně vlastním experimentováním. Při analýze metodou ETV ICP-OES jsou v případě prvků s vyšším obsahem sledovány atypické, méně citlivé spektrální čáry, aby nedošlo k přehlcení detektoru příliš vyso-

kou intenzitou signálu. V našem případě se jednalo o prvky Ca, Mg, K a P, obsažené v rostlinných vzorcích na úrovni desetin až jednotek procent. Pomocí roztoků vodných standardů vnášených do ICP pomocí zmlžovače (Modified-Lichte) a cyklonické komory byla optimalizována poloha píku pro odečítání intenzit na vlnových délkách jednotlivých prvků a definováno pozadí pro jednotlivé čáry.

Optimalizace teplotního programu byla provedena porovnáním časových průběhů intenzity signálu na spektrální čáře Ar I 404,442 (monitorování stavu plazmatu) a intenzit spektrálních čar jednotlivých analytů při analýze miligramových navážek RM P-ALFALFA Vojtěšky za použití čtyř různých teplotních programů.

Teplotní program 25–300 °C/10 s, 300–600 °C/50 s, 600–800 °C/2 s, 800 °C/10 s, 800–1650 °C/6 s, 1650 °C/10 s, 1650–2000 °C/2 s, 2000–2500 °C/5 s, 2500–25 °C/15 s jako jediný z vyzkoušených umožnil kvantitativní přechod všech stanovovaných analytů do ICP. U tohoto programu nedocházelo k přesycení detektoru signálem u žádné ze sledovaných čar, ani u čar prvků, jejichž obsah v CRM

Tabulka I

Parametry kalibrace a výsledky ověřování přesnosti a preciznosti metody

<i>Makrobiogenní rostlinné prvky</i>							
Spektrální čára	LOD [ng]	Kalibrační rozsah [μg]	Kalibrační závislost	s_r [%]	Výtěžnost [%]	Nejistota výtěžnosti [%]	Přesnost
Ca II 155,318	180	0–50	nelineární	2,87	98,0	4,2	ověřena
Ca I 443,496	59	0–50	lineární	2,04	102,9	1,9	ověřena
K I 404,721	1 080	0–80	lineární	3,48	82,3	1,6	neověřena
Mg I 278,142	21	0–11	lineární	2,55	104,6	2,2	ověřena
P I 168,599	7,0	0–22	lineární	5,04	100,2	3,9	ověřena
P I 169,403	9,6	0–26	lineární	5,07	100,9	3,9	ověřena
<i>Mikrobiogenní rostlinné prvky</i>							
Spektrální čára	LOD [ng]	Kalibrační rozsah [ng]	Kalibrační závislost	s_r [%]	Výtěžnost [%]	Nejistota výtěžnosti [%]	Přesnost
Ba II 233,527	0,35	0–200	lineární	2,84	107,1	3,2	ověřena
Ba II 389,178	1,8	0–200	lineární	2,86	105,5	3,1	ověřena
Co II 228,616	0,29	0–100	nelineární	2,82	105	3,7	ověřena
Cu I 324,754	0,16	0–100	nelineární	1,74	111,9	3,1	neověřena
Cu I 327,396	0,44	0–200	lineární	5,35	111,9	3,0	neověřena
Fe I 218,720	25	0–2000	nelineární	3,57	101,1 ^a		
Fe I 373,486	1,1	0–2000	nelineární	3,15	105,4 ^a		
Mn I 403,076	1,4	0–1700	lineární	2,28	104,8	1,9	ověřena
Na I 330,237	24	0–6000	nelineární	6,16	145,8 ^a		
Sr II 215,284	0,44	0–1600	lineární	2,46	96,1	2,4	ověřena
Zn II 206,200	1,5	0–200	nelineární	2,01	107,8	2,0	neověřena
Zn I 213,856	0,074	0–150	nelineární	2,26	111,5	2,1	neověřena

^a V případě těchto analytů byla u CRM uvedena jen orientační hodnota hmotnostního zlomku.

dosahuje jednotek procent. Dále byl používán jen tento teplotní program.

Díky vhodně zvolenému teplotnímu programu, kdy při pomalé teplotní rampě na začátku analýzy dochází k pyrolyze a přechodu organické matrice do plazmatu před odpařením samotných analytů, bylo možno použít kombinovanou kalibraci pomocí různých materiálů. Byly změřeny kalibrační závislosti intenzit signálu na absolutním množství analytů obsažených v napipetovaných jednoprvkových i směsných vodných standardech a v různých velkých navážkách pevných CRM, jejichž výčet je uveden výše.

V případě vodných standardů bylo do lodičky napipetováno 10 μ l roztoku (obvykle prostředí 2% w/w HNO_3) a před analýzou vysušeno na elektrické ploténce. Pevné CRM byly navažovány v množství 0,5–4 mg do lodičky, umístěny do autosampleru a analyzovány.

Pomocí Mandelova testu linearity byl pro většinu stanovovaných analytů ověřen lineární průběh kalibračních závislostí (tab. I). Tam, kde se linearita nepodařilo prokázat, byla pro další měření použita kvadratická kalibrační závislost.

Pro všechny sledované spektrální čáry byly rovněž pomocí analýz deseti prázdných grafitových lodiček jako slepých pokusů získány hodnoty LOD (tab. I).

Výzkum vlivu velikosti navážky na kvalitu výsledků

Vliv velikosti navážky na přesnost metody byl sledován pomocí CRM INCT-TL-1 Čajových listů (Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polsko). Vyvinutou metodou byly vždy zanalyzovány tři navážky CRM o hmotnosti kolem 0,5 mg, 1 mg, 2 mg a 3 mg. Naměřené obsahy jednotlivých analytů v replikách byly následně porovnány s certifikovanými hodnotami obsahů analytů.

U navážek kolem 0,5 mg docházelo k většímu rozptýlení naměřených hodnot hmotnostních zlomků v porovnání s vyššími navážkami, méně ovlivněnými nehomogenitou použitého referenčního materiálu.

U většiny sledovaných čar byly naměřené obsahy analytů na velikosti navážky téměř nezávislé nebo nevykazovaly žádný trend. U Mg a Ba se naměřené obsahy analytu s rostoucí navážkou snižovaly, pravděpodobně kvůli nekvantitativnímu převedení těchto analytů do ICP u vyšších navážek, protože byl použitý teplotní program optimalizovaný pro miligramové navážky RM P-ALFALFA Vojtěšky. I naměřený obsah Mn s rostoucí navážkou klesal, neboť došlo k přesycení detektoru signálem. Obsah Mn v CRM INCT-TL-1 Čajových listech je totiž padesátkrát vyšší než u RM P-ALFALFA Vojtěšky. Jen naměřený obsah Zn sledovaný na spektrální čáře Zn I 213,856 s rostoucí navážkou vzorku rostl, což mohlo být způsobeno interferencí s vyšším absolutním množstvím fosforu ve větších navážkách CRM INCT-TL-1 Čajových listů.

Ověření přesnosti a preciznosti metody

K určení přesnosti metody bylo analyzováno deset přibližně miligramových navážek CRM INCT-OBTL-5 Tabákových listů (Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polsko). Naměřené obsahy analytů byly porovnány s referenční hodnotou. Výpočtem výtěžnosti byla posouzena přesnost metody v závislosti na sledované spektrální čáře (tab. I). Pro posouzení preciznosti metody byla vypočtena i relativní směrodatná výběrová odchylka měření (s_r).

Ačkoli statistickým testem výtěžnosti nebyla potvrzena přesnost výsledků získaných na všech sledovaných spektrálních čarách, u většiny analytů se hodnota výtěžnosti pohybovala mezi 90 % a 110 %, což je srovnatelné s publikovanými výsledky ICP-OES analýz s ETV⁴. Rovněž hodnoty relativní výběrové směrodatné odchylky do sedmi procent jsou srovnatelné s publikovanými výsledky^{1,4} a svědčí o dobré preciznosti vyvinuté metody.

Závěr

Podařilo se vyvinout vhodnou analytickou metodu ICP-OES analýzy ve spojení s ETV pro rychlou kvantitativní analýzu rostlinných makro- i mikrobiogenních prvků. Pro tuto metodu byl zvolen plynný modifikátor, optimalizován teplotní program a zvoleny sledované spektrální čáry. U většiny těchto čar byla pomocí Mandelova testu linearity ověřena lineární kalibrační závislost intenzity signálu na množství analytu, u ostatních byla použita závislost kvadratická. Dále byly pro všechny spektrální čáry určeny LOD ze slepých pokusů. Také byl sledován vliv velikosti navážky vzorku na přesnost měření, kde optimální se jeví navážky mezi jedním a dvěma miligramy, v závislosti na očekávaném obsahu analytů ve vzorku.

Analýzou CRM INCT-OBTL-5 Tabákových listů byla u 7 ze 12 stanovovaných analytů testem výtěžnosti potvrzena přesnost vyvinuté metody. I tak byla u většiny analytů zjištěna odchylka mezi certifikovanou a naměřenou hodnotou obsahu analytu v CRM do deseti procent, což je srovnatelné s publikovanými výsledky a s požadavky běžně kladenými na použitou metodu.

Dalším cílem výzkumu bude posouzení vlivu průtoku nosného a „bypass“ plynu na průběh a přesnost analýzy. Dále se pokusíme vyzkoušet současné zapojení ETV a zmlžovače jako zdroje signálu interního standardu a posoudit vliv takového zapojení na průběh analýzy a její výsledky.

LITERATURA

1. Detcheva A., Barth P., Hassler J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1485 (2009).
2. Machát J.: *7. kurz ICP spektrometrie, Univerzitní kampus MU Brno – Bohunice*, 27. – 30. květen 2013 (Holá M., Vaculovič T.), str.1, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2013.

3. Asfaw A., Wibetoe G.: *Spectrochim. Acta Part B* 64, 363 (2009).
4. Vogt T., Bauer D., Neuroth M., Otto M.: *Fuel* 152, 96 (2015).
5. http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyzrost/6_Mineralni_vyziva.pdf, staženo dne 4.11.2015.

L. Šerá^{a,b}, S. Matějková^b, and O. Mestek^a (^a *Department of Analytical chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*, ^b *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, v.v.i., Prague*): **Quantification of Elements in Plant Materials by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**

This paper describes optimization and validation of operating conditions of electrothermal vaporization (ETV)

inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) method for quantification of Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr and Zn in plant materials. Besides the optimization of the temperature program, the selection of the gaseous modifier and the spectral wavelengths to be measured, it was studied how the sample quantity affects the result quality of the developed method. During the validation process, the accuracy and precision of the method were checked by analysis of a certified reference material. Limits of detection were estimated by analyses of blank samples. For almost all previously mentioned elements, the method meets requirements commonly applied on analyses by ETV combined with ICP-OES.

Keywords: electrothermal vaporization, optical emission spectrometry, inductively coupled plasma, plants

ANALÝZA SIRNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU S VYUŽITÍM MIKROEXTRAKCE NA MÍCHACÍ TYČINCE

DOMINIKA ŠUHAJOVÁ, MARTIN ADAM,
KAROLÍNA ADÁMKOVÁ, ALEŠ EISNER
a KAREL VENTURA

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická,
Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Par-
dubice
martin.adam@upce.cz

Klíčová slova: česnek, sirné těkavé sloučeniny, SBSE,
GC-ECD

Úvod

Česnek, cibule, pažitka a další druhy zeleniny mají charakteristickou chuť a vůni. Toto výrazné aroma je způsobené především těkavými látkami, které se z dané rostliny uvolňují po jejich desintegraci. Po mechanickém poškození buňky se spouští enzymatická reakce a vznikají organické sloučeniny, které se v nepoškozené buňce nevyskytují. Tyto metabolity, zodpovědné za charakteristický zápach, je možné analyzovat. U rostlin čeledi *Alliaceae* (česnekovité) mají největší význam organické sloučeniny obsahující síru. Z této čeledi je známých asi 30 rodů a asi 600 druhů, které jsou rozšířeny po celém světě. V ČR rostou pouze zástupci jediného rodu, a to česnek (*Allium*). Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) obsahuje celou řadu těkavých organických sloučenin. Na výsledném aromaprofilu a chuti se pak podílejí především sirné sloučeniny. Česnek má antimikrobiální, protinádorové, protizánětlivé, kardiovaskulární a další pozitivní účinky^{1,2}.

Pro izolaci nebo zakoncentrování těkavých sloučenin z rostlin je možné využít širokou škálu moderních extrakčních metod, které nahrazují dříve používanou metodu založenou na destilaci s vodní parou. Mezi tyto moderní metody patří například extrakce nadkritickou tekutinou (SFE – Supercritical Fluid Extraction), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE – Pressurised Fluid Extraction) nebo extrakce přehřátou vodou (PHWE – Pressurised Hot Water Extraction). V posledních letech se však stále častěji uplatňují metody mikroextrakční, jako jsou mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase Microextraction) nebo sorpční extrakce na míchadélku (SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction)³.

SBSE je založena na sorpci analytů ze vzorku na polymerní sorbent pokrývající magnetické míchadélko. Tuto sorpční tyčinku lze vložit jak do kapalného vzorku, čímž je současně zajištěno i jeho míchání během extrakce, tak i do prostoru nad vzorkem (tzv. headspace). V tomto případě je

metoda známější pod názvem HSSE – Headspace Sorptive Extraction. Zachycené sloučeniny lze z míchadélka uvolnit buď tepelnou desorpčí ve speciální termodesorpční jednotce nebo lze provést desorpčí rozpouštědlem. Ve srovnání s metodou SPME má tato metoda mnohem vyšší sorpční kapacitu vzhledem k většímu objemu polymerní stacionární fáze a díky tomu je i významně citlivější.

Cílem této práce byla optimalizace parametrů metody HSSE s ohledem na následnou GC analýzu získaných extraktů. Pro tuto optimalizaci bylo cílem určit, které z testovaných parametrů mají statistický vliv na extrakční účinnost a tyto parametry poté optimalizovat na základě principů plánování experimentu. Záměrem bylo nalézt podmínky, pomocí kterých by bylo možné identifikovat co nejvíce sloučenin podílejících se na celkovém aromaprofilu česneku.

Experimentální část

Pro extrakci těkavých látek ze vzorků česneku bylo použito míchadélko Twister o délce 10 mm a tloušťce sorpční vrstvy PDMS (Polydimethylsiloxan) 0,5 mm (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo). Míchadélko bylo aktivováno po dobu 60 min při teplotě 250 °C.

Analyzován byl česnek z oblasti Vysočina sklizený v roce 2015. Před analýzou byl vzorek očištěn, zbaven slupky, rozmělněn a pro potřeby optimalizace zhomogenizován.

Do 20ml skleněné vzorkovací nádoby (Supelco, Bellefonte, PA, USA) bylo naváženo 0,5 g vzorku česneku a do prostoru nad vzorkem umístěna sorpční tyčinka. Pro její uchycení byl využit drátek procházející skrz septum ve víčku vzorkovací nádoby. Celá nádoba byla vložena do vodní lázně (Julabo F12, Schwabach, Německo) vyhřáté na extrakční teplotu 80 °C tak, aby celá navážka česneku byla pod hladinou. Po 15 min extrakci byla míchací tyčinka vyjmuta a přemístěna do desorpční nádoby, kde byly zachycené sloučeniny desorbovány do 1,5 ml diethyletheru (čistota p. a., Penta, Chrudim, ČR) po dobu 1 min při 25 °C v termobloku (IKA Dry Block Heater 1, IKA-Werke, Staufen, Německo). Následně byl extrakt proudem dusíku odpařen, odparek převrstven 20 µl n-hexanu (Sigma Aldrich, Praha, ČR) a po promíchání podroben GC-ECD analýze.

Do plynového chromatografu GC 17A s detektorem elektronového záhytu ECD-17 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) byl dávkován 1 µl. Pro separaci byla použita kapilární kolona HP-5 o rozměrech 30 m × 0,32 mm s tloušťkou filmu 1 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Nosným plynem byl dusík při konstantním přetlaku 30 kPa. Teploty nástřiku i detektoru byly udržovány na 250 °C. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 55 °C po dobu

3 min, následoval lineární nárůst teploty rychlostí 6 °C/min do 250 °C, která byla udržována 10 min.

Výsledky a diskuse

Při optimalizaci podmínek extrakce je třeba nejprve vyhodnotit, které parametry mají statisticky významný vliv na účinnost extrakce a které mají vliv nevýznamný. Pro tento účel se dobře hodí třídící plán Plackett-Burmana, kdy lze o statistickém významu jednotlivých parametrů rozhodnout za pomoci relativně malého počtu experimentů. Mezi testované parametry patřily: navážka vzorku, teplota a doba extrakce, úprava iontové síly přidávkem NaCl, teplota a doba desorpce rozpouštědlem a objem desorpčního rozpouštědla. Pro těchto sedmero parametrů lze použít

Plackett-Burmanův návrh sestávající z celkem 8 experimentů (viz tab. I), avšak kvůli vyhodnocení statistické významnosti na úrovni $p = 0,05$ je třeba alespoň jeden z experimentů zopakovat. V tomto případě byl ještě 2× zopakován experiment vykazující největší odezvu při GC-ECD analýze.

Před optimalizací bylo třeba ještě pomoci tzv. předběžných experimentů zvolit systém rozpouštědel. Pro desorpci látek z míchadélka byl z testovaných rozpouštědel zvolen diethylether, který vykazoval dostatečnou rozpouštěcí kapacitu vůči studovaným látkám, čímž byla zajištěna účinná desorpce, a současně je dostatečně těkavý, aby mohlo dojít k jeho odpaření bez významné ztráty cílových sloučenin. Pro následnou GC-ECD analýzu se však tato těkavost ukázala být problematickou vzhledem k případné prodlevě mezi desorpcí a GC analýzou. Tento problém byl

Tabulka I
Plackett-Burmanův návrh

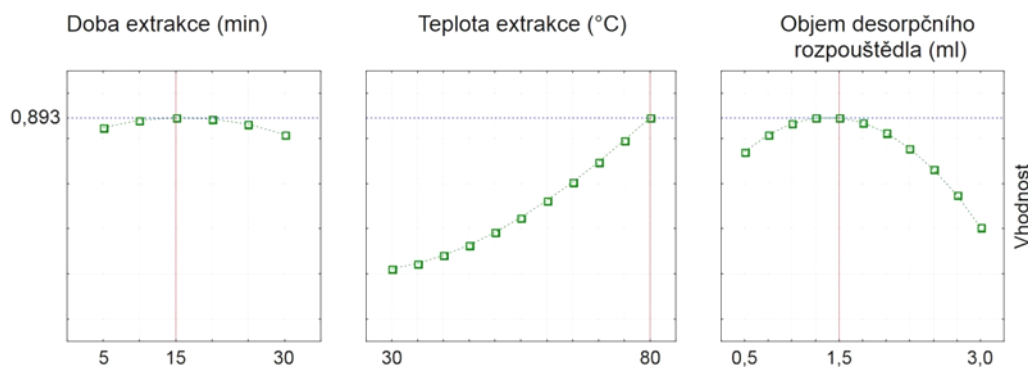
Pokus číslo	Navážka vzorku [g]	Hmotnost NaCl [g]	Teplota extrakce [°C]	Doba extrakce [min]	Teplota desorpce [°C]	Doba desorpce [min]	Objem rozpouštědla [ml]
1	0,5 (-1)	0 (-1)	30 (-1)	30 (+1)	25 (+1)	10 (+1)	1 (-1)
2	1,5 (+1)	0 (-1)	30 (-1)	5 (-1)	10 (-1)	10 (+1)	3 (+1)
3	0,5 (-1)	0,5 (+1)	30 (-1)	5 (-1)	25 (+1)	1 (-1)	3 (+1)
4	1,5 (+1)	0,5 (+1)	30 (-1)	30 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	1 (-1)
5	0,5 (-1)	0 (-1)	80 (+1)	30 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	3 (+1)
6	1,5 (+1)	0 (-1)	80 (+1)	5 (-1)	25 (+1)	1 (-1)	1 (-1)
7	0,5 (-1)	0,5 (+1)	80 (+1)	5 (-1)	10 (-1)	10 (+1)	1 (-1)
8	1,5 (+1)	0,5 (+1)	80 (+1)	30 (+1)	25 (+1)	10 (+1)	3 (+1)

Pozn.: Čísla v závorkách představují hodnoty kódované matice návrhu

Tabulka II
Centrálně kompozitní plán (pokusy označené tučně se shodují)

Pokus číslo	Doba extrakce [°C]	Teplota extrakce [min]	Objem rozpouštědla [ml]	Pokus číslo	Doba extrakce [°C]	Teplota extrakce [min]	Objem rozpouštědla [ml]
1	10,0 (-1)	40 (-1)	1,00 (-1)	11	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
2	10,0 (-1)	70 (+1)	2,50 (+1)	12	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
3	25,0 (+1)	40 (-1)	2,50 (+1)	13	5,0 (- α)	55 (0)	1,75 (0)
4	25,0 (+1)	70 (+1)	1,00 (-1)	14	30,0 (+ α)	55 (0)	1,75 (0)
5	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)	15	17,5 (0)	30 (- α)	1,75 (0)
6	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)	16	17,5 (0)	80 (+ α)	1,75 (0)
7	10,0 (-1)	40 (-1)	2,50 (+1)	17	17,5 (0)	55 (0)	0,50 (- α)
8	10,0 (-1)	70 (+1)	1,00 (-1)	18	17,5 (0)	55 (0)	3,00 (+ α)
9	25,0 (+1)	40 (-1)	1,00 (-1)	19	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)
10	25,0 (+1)	70 (+1)	2,50 (+1)	20	17,5 (0)	55 (0)	1,75 (0)

Pozn.: Čísla v závorkách představují hodnoty kódované matice návrhu



Obr. 1. Odezvové profily optimalizovaných parametrů

eliminován tím, že byl diethylether po desorpci zcela odpařen a odparek převrstven n-hexanem, který není tak těkavý jako diethylether. Navíc tato sloučenina není aktivní při použití ECD detektoru a neruší tak odezvu sledovaných sloučenin.

Na základě výsledků analýzy ve statistickém programu STATISTICA 12Cz (Dell Software, Praha, ČR) byly jako významné parametry určeny teplota extrakce, doba extrakce a objem desorpčního rozpouštědla. Tyto parametry byly dále optimalizovány dle principů centrálně kompozitního plánování experimentu (viz tab. II), který umožňuje lépe vyhodnotit vzájemnou korelaci testovaných parametrů. Ostatní parametry byly zvoleny následovně: navážka vzorku 0,5 g bez přídavku NaCl, desorpce diethyletherem při 25 °C po dobu 1 min. Po provedení všech 20 experimentů v náhodném pořadí byly počty piků a jejich celková plocha opět statisticky zpracovány.

Na základě odezvových profilů pro jednotlivé parametry (viz obr. 1) byly následně vyhodnoceny optimální podmínky pro aplikaci metody HSSE pro analýzu celkového aromaprofilu česneku.

Jako vhodná teplota extrakce byla určena teplota 80 °C. Je to nejvyšší testovaná teplota, avšak její další navýšení není vhodné s ohledem na zvyšující se riziko tepelné degradace. Při hodnocení doby extrakce bylo zjištěno, že při kratší době bylo zaznamenáno více piků, ale při delší době měly píky větší plochu. Bylo tedy vybráno 15 min, což představuje vhodný kompromis. Objem desorpčního rozpouštědla je 1,5 ml. Při vyšším množství je extrakt zbytečně zředěn, což představuje vyšší riziko ztráty analytů během odpařování diethyletheru. Při nižším objemu není míchací tyčinka zcela ponořena, čímž dochází k nedokonalé desorpci.

Závěr

Na základě principů plánování experimentu byly optimalizovány podmínky pro aplikaci metody HSSE při analýze aromaprofilu česneku, kde hrají významnou roli sirné sloučeniny. Vzhledem k tomu bylo možné pro analýzu těchto především sirných sloučenin s výhodou využít GC analýzu s detektorem elektronového záchytu, který je v tomto případě ještě citlivější než detektor hmotnostní.

Optimalizované podmínky byly aplikovány na extrakce reálných rostlinných vzorků česneku kuchyňského, přičemž v chromatogramu bylo nalezeno 50 piků, z toho se prozatím pouze dle retenčních indexů a literatury podařilo identifikovat 25 látek¹. Největší zastoupení měly dimetyl tetrasulfid, benzothiazol, propenyl propyl trisulfid a 2 fenetylisothiokyanát. Pro potvrzení správnosti identifikace a případně pro identifikaci další složek by bylo třeba metodu HSSE spojit s GC-MS analýzou, avšak v tomto případě je třeba eliminovat rušící vliv n-hexanu. Pro identifikaci látek s nižšími retenčními časy by bylo vhodné např. opakování experimentu za stejných podmínek s rozpouštědlem, jež poskytuje píky s vyšším retenčním časem a následné porovnání záznamů. Nabízí se také možnost využití termické desorpce, kde by byl vliv rozpouštědla na výslednou analýzu zcela eliminován.

LITERATURA

1. Block E.: *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2010.
2. Yang C., Wang J., Li D.: *Anal. Chem. Acta* 799, 8 (2013).
3. Laaks J., Jochmann M.A., Schmidt T.C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 565 (2012).
4. Kremr D., Bajeroová P., Bajer T., Eisner A., Adam M., Ventura K.: *J. Food Sci. Technol.* 52, 5727 (2015).

D. Šuhajová, M. Adam, K. Adámková, A. Eisner, and K. Ventura (*University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Pardubice*): **Analysis of Sulphur Compounds in Garlic Using Stir-Bar Sorptive Microextraction Method**

This study is focused on the optimisation of stir-bar sorptive extraction method for isolation of volatile sulphur

compounds of garlic followed by gas chromatography coupled with electron impact detector analysis. By the Plackett-Burmanův design the significant experimental parameters affecting the extraction process were evaluated and these parameters were then optimised by central composite design principles.

Keywords: garlic, volatile sulphur compounds, SBSE, GC-ECD

OBSAH

<i>S. Baluchová a K. Schwarzová-Pecková</i>	Voltametrické stanovenie klinických markerov kyseliny vanilmandľovej a homovanilovej na bórom dopovanej diamantovej elektróde	5
<i>Š. Havlová a V. Prokopec</i>	Aplikace povrchem zesílené ramanovy spektroskopie pro detekci a identifikaci kyseliny gallové	8
<i>K. Kudláček, K. Nesměrák a J. Babica</i>	Analyza historických léčivých přípravků chininu a theofylinu	13
<i>N. Ladislavová, O. Vyhnaněk, Š. Urban, V. Škeříková a P. Cinková</i>	Tvorba speciální knihovny spekter pro analýzu pachových stop	16
<i>S. Lupínková, M. Benkocká, J. Braborec, J. Matoušek, K. Kolářová, M. G. S. Londesborough a Z. Kolská</i>	Analyza chemicky modifikovaných polymerních povrchů	19
<i>K. Matějková, A. Kaňa a O. Mestek</i>	Stanovení stopových prvků ve vzorcích českého medu	23
<i>K. Paroulková, V. Škeříková a P. Cinková</i>	Rozpustnost pachových molekul	27
<i>M. Pšenička a P. Kuráň</i>	Studium kinetiky rozkladu toxických organofosfátů za přítomnosti nanokrystalických oxidů kovů	30
<i>F. Smrčka, J. Vaněk a P. Lubal</i>	duální senzor na bázi Eu(III) komplexu	33
<i>Š. Strnad, D. Sýkora, V. Vrkošlav, J. Cvačka, L. Maletínská a Z. Pirník</i>	Hmotnostně-spektrometrické zobrazování metforminu v řezech vybraných tkání	37
<i>L. Šerá, S. Matějková a O. Mestek</i>	Stanovení prvků v rostlinných materiálech metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a elektrotermickým odpařováním	41
<i>D. Šuhajová, M. Adam, K. Adámková, A. Eisner a K. Ventura</i>	Analyza sirných sloučenin v česneku s využitím mikroextrakce na míchací tyčince	45

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Adam M. 45
Adámková K. 45

Babica J. 13
Baluchová S. 5
Benkocká M. 19
Braborec J. 19

Cinková P. 16, 27
Cvačka J. 37

Eisner A. 45

Havlová Š. 8

Kaňa A. 23
Kolářová K. 19
Kolská Z. 19
Kudláček K. 13
Kuráň P. 30

Ladislavová N. 16
Londesborough M. G. S. 19
Lubal P. 33
Lupínková S. 19

Maletínská L. 37
Matějková K. 23
Matějková S. 41
Matoušek J. 19
Mestek O. 23, 41

Nesměrák K. 13

Paroulková K. 27
Pírník Z. 37
Prokopec V. 8
Pšenička M. 30

Schwarzová-Pecková K. 5

Smrčka F. 33
Strnad Š. 37
Sýkora D. 37

Šerá L. 41
Škeříková V. 16, 27
Šuhajová D. 45

Urban Š. 16

Vaněk J. 33
Ventura K. 45
Vrkoslav V. 37
Vyhnálek O. 16

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 14 (2016), čís./no. 1 • 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, P. Drašar, P. Holý, J. Horák, 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, Z. Kolská, 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, +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., Wolkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2016 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 22.3.2016.