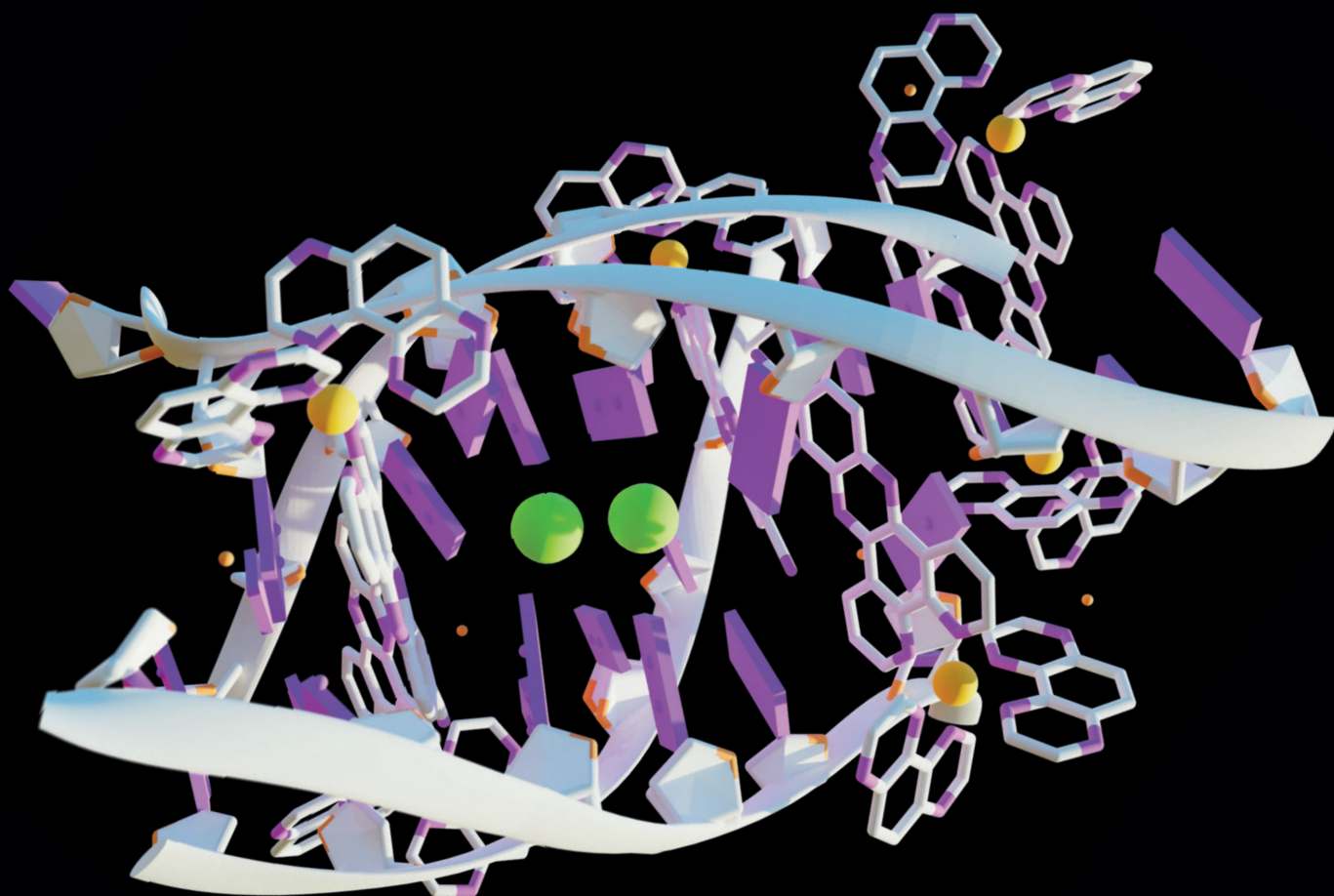


Chemické Listy

11

ročník • 118



Elektromigrační metody v ÚOCHB

Olfaktronika

Referenční elektroda pro neideální prostředí

Pevná bismutová kapková elektroda



Jsme Teva, Vaše jistota, Vaše místo k růstu.

PŘIDEJ SE K NÁM!

Jsme jedna z nejmodernějších farmaceutických firem v Evropě

- Vlastní vývojové centrum na účinné farmaceutické látky
- Laboratoře se špičkovými technologiemi
- Výzkumné projekty, zahraniční workshopy a stáže
- Bakalářské a diplomové práce
- Placený trainee program

DO OPAVSKÉHO ZÁVODU HLEDÁME:

- Absolventy oboru chemie farmacie nebo přírodních věd
- Nabízíme uplatnění ve farmaceutické a v chemické výrobě, v R&D, laboratořích, kvalitě a dalších oborech

NABÍZÍME:

- Trainee program
- Zaškolení, šance rychlého růstu – kariérní postup s jasně danými pravidly
- Roční bonus a každoroční navýšení mzdy
- Moderní technologie
- Spousta benefitů + Cafeterie 17 000 Kč ročně
- Skvělá dostupnost – vlak, autobus

T: 553 642 424 | nabory@tevapharm.cz | www.teva.jobs.cz

76. sjezd chemických společností

Jak lze snadno v kalendáři zjistit, letošní rok je sudý a to značí, že tradiční Sjezd chemiků se konal v České republice. V pořadí již 76. konference nesoucí toto prestižní označení byla uspořádána společně Českou společností chemickou (ČSCH) a Slovenskou chemickou spoločnosťou (SCHS) ve spolupráci s Českou společností průmyslové chemie ve dnech 26. až 29. srpna 2024 v prostorách Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava (VŠB-TUO). Tento významný vědecký kongres se konal pod záštitou vážených osobností, a to prorektorky pro vědu a výzkum VŠB-TUO, paní prof. Mgr. Jany Kukutschové, Ph.D., náměstkyně hejtmána Moravskoslezského kraje pro školství, mládež a sport, pana Mgr. Stanislava Folwarczného, a náměstkyně primátora statutárního města Ostravy pro školství, paní Mgr. Andrey Hoffmannové, Ph.D.

Letošní sjezd se konal v době, kdy chemie jako vědní obor čelí mnoha novým výzvám a příležitostem. Doufáme, že jak organizátoři, tak i účastníci dospěli k přesvědčení, že tato akce poskytla jedinečnou platformu pro setkání špičkových odborníků, vědců a studentů, kteří mohli sdílet své poznatky, diskutovat o nejnovějších trendech a navázat nové spolupráce. Program sjezdu byl velmi pestrý a doufáme, že si každý z účastníků našel v bohaté nabídce přednášek, posterů, diskuzí a workshopů to své.

Velké pozornosti účastníků se těšily všechny plenární přednášky, ať už se jednalo o „mírně depresivní“ přednášku MUDr. Koukolíka o současnosti a možné budoucnosti

umělé inteligence, velmi zajímavou přednášku Dr. Drábové na téma jaderné technologie v našich službách, doc. Jerigové o aplikaci hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů, prof. Strause, který nás obohatil o nejnovější poznatky z oboru daktyloskopie, přednášku mjr. Trefilíka, který se v jejím průběhu dostal od šipového jedu až k Novičoku, nebo o přednášku doc. Kuchaře o léčbě duševních chorob psychedelickými látkami. Při psaní uvedené plejády prezentací docházíme k závěru, že by se za ni nemusel stydět ani leckterý kongres kriminalistů, nebo naopak, kongres pro vzdělávání nekalých žvlů.

V rámci sjezdu jsme přistoupili k experimentu, jehož výsledky sice musí zhodnotit nejlépe účastníci, ale podle dosavadních ohlasů se domníváme, že byl úspěšný. Místo mnoha sekcí, jejichž obsazení by bylo pravděpodobně nevyvážené, s mnoha překryvy a přesuny, byly příspěvky, ať již ve formě přednášek, či posterů uspořádány do 6 základních sekcí, jež dokonale pokryly všechny oblasti odpovídající náplni činnosti všech odborných skupin ČSCH: Analytická chemie, chemie životního prostředí a příbuzné obory (garant bloku: prof. Ing. Tomáš Navrátil, Ph.D.); Organická, bioorganická a farmaceutická chemie (garant bloku: doc. Ing. Jan Kyselka, Ph.D.); Anorganická a bioanorganická chemie (garanti bloku: prof. RNDr. Ivan Němec, Ph.D., a doc. RNDr. Václav Slovák, Ph.D.); Materiálová chemie (garantka bloku: prof. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.); Chemické vzdělávání a historie chemie (garantka bloku: prof. RNDr. Hana Čtrnáctová, CSc.) a Průmyslová chemie (garant bloku: doc. Ing. Jaromír Lederer, CSc.).



Pořadatele určitě musíme pochválit za velmi vhodně a atraktivně zvolený doprovodný program sestávající jednak z návštěvy Dolní oblasti Vítkovice, kde byla uspořádána i posterová sekce, jednak z konferenčního večírku, v jehož rámci vystoupila muzikálová hvězda Bohouš Josef a následovala k poslechu i tanci produkce skupiny Banda del Caffè.

Vrátme se ještě k posterové sekci, v jejímž rámci bylo uspořádáno několik soutěží studentů a mladých vědeckých pracovníků do 35 let. Cenu České společnosti chemické za nejlepší poster si odnesla studentka Oleksandra Labzova a 1. cenu Pobočky Ostrava České společnosti chemické student David Gabaj, oba z Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského v Praze.

Rádi bychom vyjádřili vděčnost všem našim partnerům a sponzorům, bez jejichž podpory by nebylo možné tuto akci uskutečnit. Mezi hlavní partnery patřili společnost Metrohm Česká Republika, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Moravskoslezský kraj a další významní přispěvatelé, kteří se významně podíleli na úspěchu tohoto sjezdu. Je nám líto, že vzhledem k omezenému rozsahu tohoto úvodníku nemůžeme vyjme-

novat všechny partnery, ale jejich jména spolu s krátkým představením firem jsou uvedena ve sborníku (<http://www.ccsss.cz/index.php/ccsss/issue/view/47>) a my jim všem ještě jednou děkujeme.

Rádi bychom touto cestou poděkovali všem, kdo se podíleli na přípravě, realizaci a organizaci 76. sjezdu chemiků. Určitě nás napadá řada jmen, která bychom mohli uvést, ale byli bychom nespravedliví, kdybychom někoho nikoliv ve zlé vůli vynechali. Poděkujme tedy celému kolektivu pořadatelů. Dobrá práce! Děkujeme! (Třeba za 10 let znovu?)

Letošní, 76. sjezd chemiků byl úspěšně zakončen, účastníci se rozjeli do svých domovů a pracovišť. Organizátoři určitě nastavili svým následovníkům velmi vysokou laťku. Příští rok se sejdeme na 77. sjezdu chemiků, jako již po mnoho let, kde jinde než ve Starém Smokovci v hotelu Bellevue. O vysoké kvalitě organizace nemáme nejmenší pochybnosti. Těšíme se na bohatou účast členů i nečlenů ČSCH i SCHS.

Kamila Kočí a Tomáš Navrátil
Česká společnost chemická



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

VÝVOJ A VYUŽITÍ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD V ÚSTAVU ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Článek je dodatečně věnován 70. výročí založení Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v Praze a aktuálně 100. výročí založení Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a významnému životnímu jubileu profesora Jiřího Barka.

VÁCLAV KAŠIČKA

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 542/2, 160 00 Praha 6, Česká republika
vaclav.kasicka@uochb.cas.cz*

Došlo 15.8.24, přijato 27.9.24.

Tento článek shrnuje vývoj a využití elektromigračních metod v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky v Praze (ÚOCHB AV ČR) od jeho založení až po současnost. Popisuje vývoj instrumentace, metodiky a využití následujících metod: a) nechlazená a chlazená papírová elektroforéza pro analytické i semipreparativní separace aminokyselin a peptidů při určování primární struktury bílkovin, b) kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku (FFE) pro čištění biologicky aktivních peptidů, zejména peptidových hormonů, s preparativní kapacitou 50–100 mg h⁻¹, c) kapilární izotachoforéza (CITP) pro kontrolu čistoty (kvality) synteticky připravených nebo z přírodního materiálu izolovaných biologicky aktivních peptidů a pro stanovení jejich protiiontů; d) vysokoučinné kapilární elektromigrační metody (HPCE) zahrnující zónovou elektroforézu, izotachoforézu, izoelektrickou fokusaci, afinitní elektroforézu, elektrokinetickou chromatografii a elektrochromatografii, a využití těchto metod pro separace, analýzy a fyzikálně-chemické a biochemické charakterizace širokého spektra (bio)molekul izolovaných, (bio)syntetizovaných a studovaných v ÚOCHB AV ČR, např. aminokyselin, peptidů, bílkovin, nukleosidů, nukleotidů, fragmentů nukleových kyselin, steroidů, katecholaminů a různých funkčních organických molekul, např. azahelicenů, helquatů a diquatů.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, izotachoforéza, izoelektrická fokusace, afinitní elektroforéza, elektrokinetická chromatografie, elektrochromatografie

Obsah

1. Úvod
2. Papírová elektroforéza
3. Kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku
4. Kapilární izotachoforéza
5. Vysokoučinné kapilární elektromigrační metody (HPCE)
 - 5.1. Vývoj instrumentace
 - 5.2. Metodický vývoj a analytické využití
 - 5.3. Fyzikálně chemická charakterizace (bio)molekul
6. Závěr a perspektivy dalšího rozvoje

1. Úvod

Hlavním předmětem základního výzkumu v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB) je (bio)syntéza, izolace, purifikace a charakterizace nových funkčních organických molekul

a biologicky aktivních látek a studium jejich vlastností a interakcí s jinými látkami v živých i neživých systémech. Studované látky se většinou vyskytují ve více či méně komplexních směsích, ze kterých je třeba tyto látky od ostatních nejprve oddělit, izolovat, purifikovat a analyzovat. K tomu slouží mnoho separačních, spektroskopických, elektrochemických a dalších analytických metod a jedněmi z těch, které jsou pro tyto potřeby v ÚOCHB vyvíjeny a využívány již od jeho založení, jsou elektromigrační metody.

Elektroforéza je velice účinná separační metoda založená na jednom z elektrokinetických jevů, tj. na pohybu elektricky nabitých částic (malých iontů, makroiontů (bio)polymerů a živých i neživých nano- a mikročástic) v kapalném prostředí působením elektrického pole. Jelikož se tyto částice liší velikostmi svých nábojů i svými rozměry a tvary, pohybují se ve stejnosměrném elektrickém poli různými rychlostmi a na tomto principu se od sebe oddělují. Probíhá-li tento proces dostatečně dlouhou dobu, dojde po určitém čase k úplnému oddělení jednotlivých

vých druhů částic do samostatných zón, ve kterých mohou být detegovány nebo ze kterých mohou být izolovány. Elektroforéza může být využita pro analytické i preparativní separace širokého spektra anorganických i organických (bio)molekul a (bio)částic.

Podle autorovi známých informací první elektroforetické experimenty v Československu byly shodou okolností provedeny právě v budově později založeného ÚOCHB již v letech 1948–1949 (cit.^{1,2}). Tehdy tam sídlilo Oddělení organické technologie Technické university v Praze, později přeměněné na Fakultu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické. Tehdejší průkopníci elektroforetických metod na tomto pracovišti si byli vědomi rušivých jevů termokonvekce a sedimentace v Tiseliově elektroforéze pohyblivého rozhraní prováděné ve volném roztoku ve vertikální U trubici³, a proto provedli elektroforetické separace krevních bílkovin a bílkovin vaječného bílku na laboratorně připraveném zařízení v agarovém želé umístěném na vodou chlazené skleněné desce. V tomto antikonvektivním a částečně síťovacím prostředí byli schopni oddělit krevní bílkoviny feritin a hemoglobin, hemocyanin a pepsin a částečně frakcionovat bílkoviny vaječného bílku a bílkoviny krevní plazmy^{1,2}. Toto pracoviště bylo v roce 1950 přeměněno na Ústřední ústav chemický a v roce 1953, po vzniku Československé akademie věd (ČSAV), zde začal působit Ústav organické chemie ČSAV, který byl od roku 1960 názvem i zaměřením rozšířen na Ústav organické chemie a biochemie ČSAV. Oba tyto ústavy vedl akademik F. Šorm, který si uvědomoval důležitost separačních metod pro organickou chemii a biochemii a podporoval zavádění tehdy nových chromatografických a elektroforetických metod do chemických a biochemických laboratoří.

2. Papírová elektroforéza

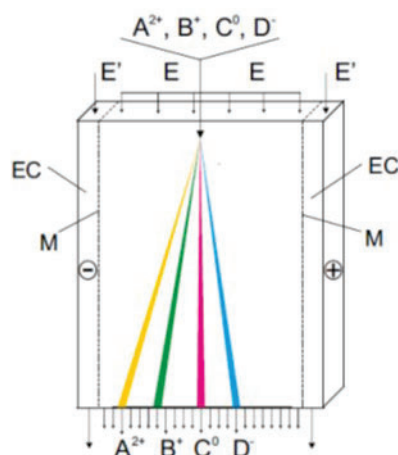
V padesátých letech minulého století bylo v ÚOCHB sestaveno několik typů tehdy nejrozšířenějšího instrumentálního formátu elektroforézy – papírové elektroforézy. Mezi nimi největšího využití dosáhla nechlazená nízkonapěťová tzv. sestupná papírová elektroforéza sestavená O. Mikešem⁴. V této aparatuře se vzorky (hydrolyzované proteiny, oligo- a polypeptidy) nanášely do středu svíse orientovaného chromatografického papíru naplněného separačním pufrem. Papír byl na obou koncích ponořen do elektrodových nádobek, dolní anodové a horní katodové, obou naplněných rovněž separačním pufrem. Elektrické napětí bylo na tuto sestavu přiváděno platinovými elektrodami. Výsledný pohyb peptidů byl kombinací jejich elektroforetické migrace, elektroosmotického toku a vztlínávacího toku pufru z obou elektrodových nádobek v pórovitém prostředí nosného papíru v důsledku odpařování pufru z papíru zahřívání procházejícím elektrickým proudem. Světově prioritní bylo využití této aparatury pro diagonální papírovou elektroforézu pro dvoudimenzionální separaci peptidů, které umožnilo identifikovat disulfidové můstky v molekulách bílkovin⁵.

Vyšší separační účinnosti a rychlejší separace než v této aparatuře byly dosaženy ve vysokonapěťové papírové elektroforéze chlazené pomocí elektricky izolovaného vodou chlazeného kovového výměníku tepla, kterou vyvinuli Z. Prusík a B. Keil⁶. Účinné chlazení umožnilo provádět elektroforézu při vysokých napětích (až 5 000 V) a dovolilo dokonalejší oddělení analyzovaných látek. Oba typy těchto papírových elektroforéz byly široce využívány pro analytické i semipreparativní separace aminokyselin, peptidů a peptidových fragmentů bílkovin po jejich předchozím chemickém a enzymovém štěpení. Z těchto tak zvaných peptidových map byly určovány primární struktury bílkovin, tj. sekvence aminokyselin v jednotlivých řetězcích bílkovin včetně určení míst intra- i interřetězcových disulfidových můstků v jejich molekulách.

3. Kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku

Dalším významným mezníkem v historii elektromiografických metod v ÚOCHB byl vývoj aparatury pro kontinuální beznosičovou elektroforézu ve volném roztoku v průtokové elektroforetické komoře týmem vedeným Z. Prusíkem⁷. Separační komora se skládala ze dvou rovnoběžných skleněných desek o rozměrech 500×500×4 mm, mezi kterými byla tenká štěrbinová (0,5 mm). Touto štěrbinou kontinuálně proudil laminárním tokem základní (nosný) elektrolyt, do kterého byl ve středu vstupní strany komory tenkým proudem zaváděn roztok vzorku, viz obr. 1. Komoře byla oboustranně chlazená na 4 °C rychle proudícím vzduchem. Ve směru kolmém na hydrodynamický tok základního elektrolytu i vzorku bylo aplikováno separační napětí (2 500–3 000 V), které během průtoku nosného elektrolytu a vzorku komorou (20–40 minut) vychylovalo kladně nabitě látky ke katodě a záporně nabitě látky k anodě. Katoda a anoda ve formě platinových vodičů byly umístěny v postranních elektrodových komůrkách oddělených od separační komory iontoměničovými membránami. Elektroneutrální látky byly hydrodynamickým tokem unášeny v přímém směru. Na výstupní straně byla komora rozdělena do 48 komůrek, ze kterých byly více či méně oddělené složky vzorku v pravidelných intervalech odsávány tenkými hadičkami do sběrače frakcí se 48 nádobkami. Tato unikátní aparatura byla hojně využívána pro izolaci a purifikaci biologicky aktivních peptidů a bílkovin, zejména peptidových a proteinových hormonů a enzymů. Preparativní kapacita dosahovala 50–100 mg peptidů či bílkovin za hodinu. Schéma komory a princip kontinuální průtokové separace jsou ukázány na obr. 1 a fotografie této aparatury je na obr. 2.

Na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let minulého století byl další vývoj této metody dokonce zařazen do programu Interkosmos. V jeho rámci, již s účastí autora tohoto článku, bylo vyvíjeno zařízení pro kontinuální průtokovou izotachoforézu ve volném roztoku⁸. V něm měla být ověřena hypotéza, zda v podmínkách mikrogravitace, kdy nebude docházet k termokonvekci a sedimentaci mak-



Obr. 1. Schéma separační komory a princip kontinuální průtokové elektroforézy. A^{2+} , B^+ , C^0 a D^- , složky vzorku zaváděné tenkým proudem do středu komory; E, základní elektrolyt laminárně proudící separační komorou; E', základní elektrolyt turbulentně proudící elektrodoovými komůrkami (EC) oddělenými iontoměničovými membránami (M) od separační komory



Obr. 2. Aparatura pro kontinuální průtokovou elektroforézu

romolekul bílkovin v separační komoře, bude možné zvýšit preparativní kapacitu této metody a v budoucnosti ji dokonce využívat k přípravě superčistých proteinových léčiv v kosmickém prostoru. Prototyp „kosmické izotachoforézy“ byl tehdy intenzivně vyvíjen ve spolupráci s Vývojovými dílnami ČSAV, ale ke hvězdám nakonec neletěl. Kvůli nedostatku financí byl projekt předčasně ukončen.

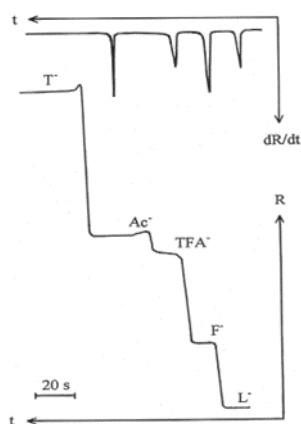
4. Kapilární izotachoforéza

Novým impulzem pro další rozvoj elektromigračních metod v Československu včetně ÚOCHB byl vývoj nové metody, kapilární izotachoforézy (CITP), skupinou F. Everaertse na Technické univerzitě v Eindhoven⁹. Díky koncentračnímu a samozaostřujícímu efektu diskontinuálního elektrolytového systému složeného z vedoucího a koncového elektrolytu byly dosaženy velmi rychlé separace a vysoce citlivé analýzy kationických nebo anionických analytů. CITP byla považována za velmi perspektivní analytickou metodu s širokým uplatněním pro analýzu ve vodě rozpustných ionogenních látek. Již v roce 1970 se na trhu objevil první komerční CITP analyzátor Tachophor vyráběný švédskou firmou LKB.

Z důvodu omezených devizových prostředků však nebylo možné tento přístroj v ÚOCHB ani na jiných pracovištích v tehdejší ČSSR získat. Proto čeští a slovenští vědci, aby mohli tuto metodu využívat a dále rozvíjet, si nejdříve museli příslušné zařízení sami vyrobit. Zpočátku to byla nevýhoda, ale nakonec se to projevilo jako výhoda, neboť čeští a slovenští badatelé hlouběji pronikli nejen do teoretických, ale i praktických základů této metody a patří-

li a stále patří k předním mezinárodně uznávaným odborníkům na tuto metodu a později i na další kapilární elektromigrační metody. Čeští a slovenští specialisté zkonstruovali řadu unikátních zařízení pro CITP. Výzkum této metody a vývoj instrumentace probíhal v několika výzkumných institucích^{10,11}. Jednou z nich byl i ÚOCHB, dalšími takovými pracovišti byly Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Ústav analytické chemie ČSAV v Brně¹², Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Přírodovědecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě.

První funkční model CITP sestrojil Z. Prusík ve spolupráci s pracovníky Vývojových dílen ÚOCHB v roce 1976. V následujících letech byl přístroj zdokonalován a v letech 1978–1980 již s přispěním autora tohoto článku a ve spolupráci s VD ÚOCHB byl vyvinut CITP analyzátor, jenž byl svými parametry srovnatelný s výše uvedeným analyzátozem Tachophor. Separace probíhala v tenké teflonové kapiláře s vnitřním/vnější průměrem 0,45/0,70 mm, celkovou délkou 25–40 cm a efektivními délkami k univerzálnímu kontaktnímu vodivostnímu detektoru a UV-absorpčnímu detektoru) o 6 a 4 cm kratšími. Kapilára byla umístěna v nevodivé kapalině v uzavřené kazetě chlazené peltierovými termočlánky. Zdvojený kontaktní vodivostní detektor byl založen na měření rozdílu elektrického potenciálu v podélné ose kapiláry mezi dvěma platínovými mikroelektrodami o průměru 0,1 mm vzdálenými rovněž 0,1 mm. UV-absorpční detektor pracoval při vlnové délce 254 nm. Pro analýzu postačovalo několik málo mikrolitrů 10–100 μM roztoků analyzovaných látek a detekční limity dosahovaly úrovně 10–100 pikomolů. Tato aparatura byla často využívána pro kontrolu čistoty syntetických organických molekul i izolovaných či biosyntetizovaných biologicky aktivních látek, zejména peptidů a bílkovin purifikovaných chromatografickými metodami^{13,14}. Oblíbená byla zejména pro stanovení anionických protiiontů (fluoridů, acetátů a trifluoracetátů) bazic-



Obr. 3. CITP separace fluoridů (F^-), trifluoracetátů (TFA^-) a acetátů (Ac^-). Experimentální podmínky: teflonová kapilára: 270/230 mm celková/efektivní délka; 0,45/0,7 mm vnitřní/vnější průměr (id/od); L, vedoucí elektrolyt: 5 mM HCl, 10 mM histidin, pH 6,1; T, koncový elektrolyt: 10 mM glutamát sodný, pH 6,7; konstantní proud: 50 μ A; teplota: 20 $^{\circ}$ C; R, signál vodivostního detektoru; dR/dt , derivace signálu vodivostního detektoru; t, čas. Koncentrace analytů: 1 mM F^- , 1 mM TFA^- , 2 mM Ac^- ; dávkovaný objem: 2 μ l

kých peptidů, viz obr. 3. Tato stanovení byla v naší laboratoři prováděna i pro peptidové preparáty vyráběné firmou Léčiva Modřany.

Na počátku osmdesátých let byla tato aparatura modifikována vložením tzv. sorpčního elementu mezi dávkovací ventil vzorku a elektrodovou nádobku koncového elektrolytu a byla využita pro vývoj nové metody, desorpční izotachoforézy¹⁵. Sorpční element obsahoval imobilizovaný transferin, na kterém byly z ascitické tekutiny zachytávány monoklonální protilátky proti tomuto proteinu. Toto uspořádání představovalo světově prioritní online spojení extrakce tuhou fází s kapilárními elektromigračními metodami. V následném kroku byly monoklonální protilátky ze sorbentu uvolňovány elektrodosorpcí za mírných elučních podmínek zachovávajících jejich vazebnou aktivitu na rozdíl od jejich eluce skokovou změnou pH, při které se vazebná schopnost snižovala nebo dokonce ztrácela. Metoda rovněž umožňovala kvantitativní charakterizaci sorpční kapacity sorbentu a sorpčních a desorpčních podmínek v mikroměřítku¹⁶. Díky koncentračnímu efektu CITP byly desorbované protilátky online zkoncentrovány do relativně vysokých koncentrací v malém objemu. Konstrukce této sestavy ve větším měřítku pak umožnila izolaci čistých protilátek¹⁷ a jejich využití pro imunanalytické stanovení transferinu v různých vzorcích biologického původu.

5. Vysokoučinné kapilární elektromigrační metody (HPCE)

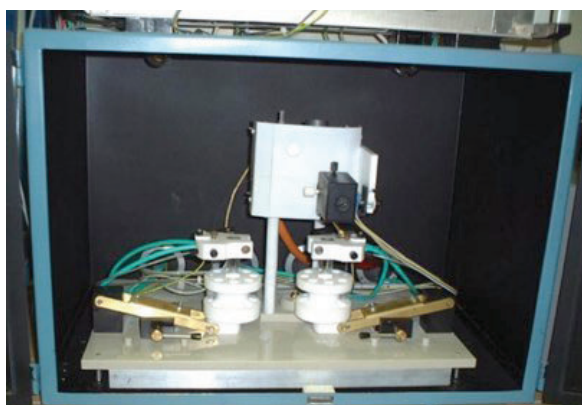
5.1. Vývoj instrumentace

V první polovině osmdesátých let minulého století se „horkým tématem“ v oblasti separačních metod stal vývoj vysokoúčinných kapilárních elektromigračních metod (HPCE). Průlomovými experimenty byly separace fluorescenčně značených aminokyselin, peptidů a aminů kapilární zónovou elektroforézou (CZE) provedené v letech 1981–1983 Jorgensonem a Lukacsovou^{18,19} a separace neutrálních organických molekul principiálně novou metodou, kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC), realizované Terabem a spol. v letech 1984–1985 (cit.^{20,21}). Obě tyto metody byly provedeny v tenkých skleněných nebo křemenných kapilárách o vnitřním/vnějším průměru 50–75/375–550 μ m. Výhodný poměr plochy a objemu separačního prostoru zajistil účinný odvod Jouleova tepla a umožnil použití vysokých separačních napětí (až 30 kV na 50–80 cm dlouhé kapiláře) při nízkých proudech v řádu desítek μ A. Bylo tak dosaženo vysoké separační účinnosti několika set tisíc pater v krátkém čase 10–30 min.

V ÚOCHB jsme nemohli ve vývoji těchto metod zůstat stranou. První funkční model HPCE analyzátoru byl sestaven již v roce 1985. Separace probíhala v křemenných kapilárách s vnějším polymerním povlakem o vnitřním/vnějším průměru 50–75/200–300 μ m, které byly získány z Ústavu skelných a keramických materiálů ČSAV. Specifická byla konstrukce UV-absorpčního fotometrického detektoru při alternativně volených třech vlnových délkách, 206, 254 a 280 nm. Zdrojem záření pro vlnové délky 206 a 280 nm byla bezelektrodová vysokofrekvenčně buzená jodová výbojka; pro vlnovou délku 254 nm to byla výbojka stejného typu, ale rtuťová. Jako monochromátory sloužily interferenční filtry o výše uvedených vlnových délkách a detektorem záření byla fotodioda se zvýšenou citlivostí v hluboké UV oblasti záření. První výsledky dosažené na tomto přístroji jsme prezentovali na 5th International Symposium on Capillary Isotachopheresis, ITP 1986, v holandském Maastrichtu. Metodou CZE byly analyzovány elektricky nabitě látky, aminokyseliny, peptidy a bílkoviny, a metodou MEKC byly separovány elektroneutrální sloučeniny, např. alifatické a aromatické alkoholy²².

V pokročilejší verzi tohoto analyzátoru (viz obr. 4) bylo navíc možné ovlivňovat elektrokinetický potenciál na vnitřní stěně kapiláry vnějším příčným elektrickým polem a tímto způsobem potlačovat sorpci analytů na vnitřní stěnu kapiláry a regulovat směr a rychlost elektroosmotického toku a optimalizovat tak účinnost separace a dobu analýzy v závislosti na rozdílech elektroforetických pohyblivostí analyzovaných látek^{23,24}.

Na základě podobnosti kapilární zónové elektroforézy (CZE) a volné průtokové zónové elektroforézy (FFZE) byl vytvořen model korelace mezi těmito metodami, který byl využit k převodu analytických separací



Obr. 4. HPCE analyzátor s regulací elektroosmotického toku vnějším příčným elektrickým polem

metodou CZE na preparativní separace metodou FFZE s kapacitou $50\text{--}100\text{ mg h}^{-1}$ (cit.²⁵⁻²⁷). Metodou FFZE byly připraveny biologicky aktivních peptidy ve vysokém stupni čistoty.

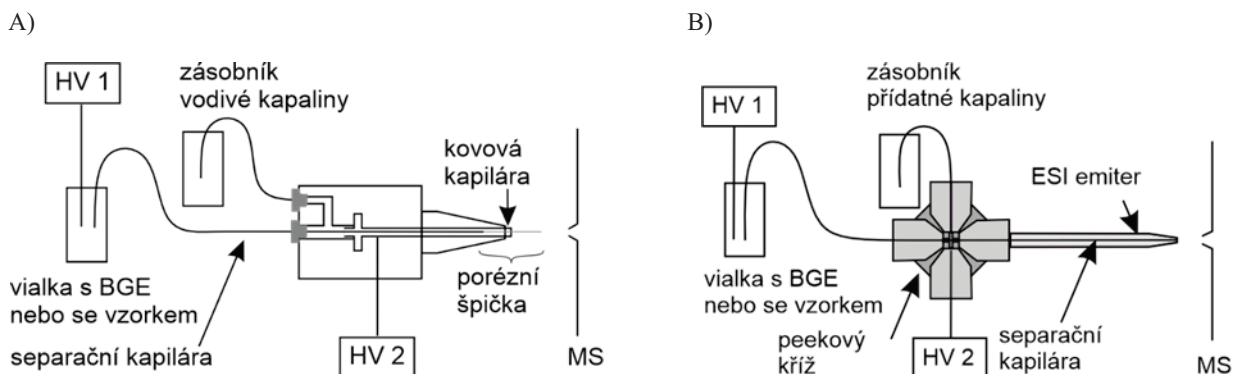
Vývoj dokonalejších zařízení pro kapilární elektromigrační metody pokračoval i v dalších letech. V letech 2006–2008 byl vyvinut univerzální HPCE analyzátor nové generace, který byl vybaven multidimenzionálním detekčním systémem. Tento systém obsahoval univerzální bezkontaktní vodivostní detektor, výše uvedený UV-absorpční detektor alternativně operující při vlnových délkách 206, 254 a 280 nm a fluorescenční detektor s laserem indukovanou fluorescencí při excitační vlnové délce 266 nm umožňující detekci na základě nativní fluorescence peptidů a bílkovin obsahujících aromatické aminokyseliny. Bylo tak možno separovat a detegovat nejen látky obsahující chromofor nebo fluorofor, ale i látky UV-transparentní a nefluoreskující. Detekční limity se pohybovaly v řádu subfemtomolů.

Toto zařízení představovalo univerzální kapilární elektrokinetický analyzátor, ve kterém bylo možné provádět všechny hlavní kapilární elektromigrační metody, a to jak elektroforetické techniky, CZE, CITP, izoelektrickou fokusaci (CIEF) a afinitní elektroforézu (ACE) pro analýzy elektricky nabitých látek, tak i kombinované elektrochromatografické metody, elektrokinetickou chromatografii (CEKC), zejména její micelární mód (MEKC) a elektrochromatografii (CEC), pro analýzu látek nabitých i elektroneutrálních²⁸.

Další významný pokrok v rozvoji instrumentace nastal v posledních letech, kdy se podařilo laboratorní CZE modul online spojit s hmotnostně spektrometrickou detekcí s ionizací elektrosprejem (ESI-MS). Tato současně univerzální i specifická a vysoce citlivá detekce umožňuje podstatně rozšířit aplikační možnosti HPCE metod. Pro toto spojení byly vyvinuty dva typy CE-ESI-MS rozhraní: a) s porézní špičkou separační kapiláry v kovové jehle a s vodivou kapalinou pro přívod sprejovacího napětí a b) se separační kapilárou ústící do skleněného emiteru s přídatnou kapalinou, která protéká emitrem nízkým nano-průtokem a na kterou je přiváděno sprejovací napětí^{29,30}, viz obr. 5. Obě rozhraní byla použitelná pro analýzu draselných komplexů 18-crown-6-etheru a jeho mono-dibenzoderivátů a řady dalších látek, ale rozhraní s emitrem bylo robustnější; udržovalo konstantní sprejovací napětí při různých separačních podmínkách.

5.2. Metodický vývoj a analytické využití

Kromě instrumentace byla rozvíjena i metodika HPCE technik. CZE byla prováděna v základních elektrolytech v širokém rozmezí pH, včetně silně kyselých a silně alkalických základních elektrolytů, a to nejen v klasických pufrach, ale i v tzv. izoelektrických pufrach obsahujících buď jednotlivé amfoterní látky (většinou aminokyseliny) při pH blízkém jejich izoelektrickému bodu³¹ nebo frakcionované směsné amfolity s úzkým rozsahem pH (cit.^{32,33}),



Obr. 5. Dva typy rozhraní pro spojení HPCE s ESI-MS. A) Rozhraní s porézní špičkou separační kapiláry bez přídatné kapaliny, B) Rozhraní se separační kapilárou ústící do skleněného emiteru s proudící přídatnou kapalinou. BGE, základní elektrolyt; ESI, elektrosprejová ionizace; HV 1, zdroj separačního napětí; HV 2, zdroj sprejovacího napětí

tj. při nízkých elektrických vodivostech těchto elektrolytů dovolujících použití vysokých intenzit elektrického pole (800–1000 V cm⁻¹) a dosažení vysokých separačních účinností a krátkých dob analýz peptidových hormonů. Ve vodě nerozpustné látky byly analyzovány v základních elektrolytech v nevodných^{34,35} nebo směsných hydroorganických rozpouštědlech^{36,37}.

Metodou CEKC s micelárními pseudofázemi tvořenými anionickými nebo kationickými detergenty (dodecyl síranem sodným nebo cetyltrimethylammonium bromidem) byly analyzovány elektroneutrální látky, např. peptidy se zablokovanými N-koncovými aminoskupinami a C-koncovými karboxylovými skupinami a neobsahující aminokyseliny s ionogenními skupinami v postranních řetězcích³⁸ a triazolové fungicidy v rajčatech³⁹.

CEKC metoda s monomolekulárními pseudofázemi cyklodextrinového typu, kterou lze též klasifikovat jako ACE s přidávkou cyklodextrinů (CD) jako afinitních ligandů do základního elektrolytu, byla široce využívána pro separaci enantiomerů a diastereomerů chirálních látek. Velmi účinná ACE metoda s β -CD jako chirálním selektorem⁴⁰ byla vypracována pro kontrolu enantiomerní čistoty významného anti-AIDS léčiva (9-(*R*)-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu ((*R*)-PMPA, tenofovir) vyvinutého v ÚOCHB ve skupině A. Holého⁴¹. Rychlá separace *R*- a *S*-enantiomerů tohoto preparátu byla dosažena v krátkém čase 5 minut v alkalickém BGE (50 mM borát sodný, pH 10,0), viz obr. 6. Dalšími příklady chirálních analýz jsou separace enantiomerů příbuzných antivirových acyklických nukleosid fosfonátů⁴², helquatů⁴³, diquatů⁴⁴ a difluorovaných alkoholů⁴⁵.

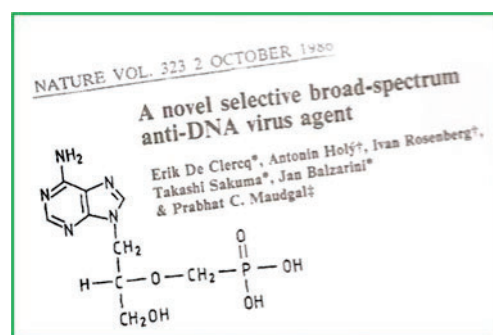
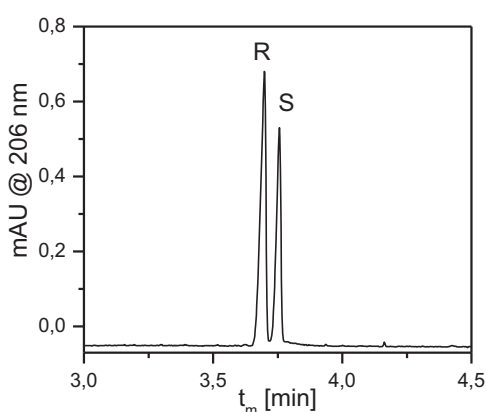
Speciální HPCE metody byly vyvinuty pro separace komplexních směsí peptidů a bílkovin, např. při peptidovém mapování bílkovin a při profilování peptidů a bílkovin v biologických tekutinách a tkáňových extraktech⁴⁶. Peptidové mapy získané CZE separací peptidových frag-

mentů enzymově štěpených vepřových a lidských pepsinů a pepsinogenů umožnily rozlišit jejich fosforylované a defosforylované formy^{47,48}. CZE profilování ve vodě rozpustných bílkovin extrahovaných z jemně rozemletých zrn nativních a geneticky modifikovaných druhů kukuřice⁴⁹ a peptidové mapování tryptických hydrolyzátů těchto bílkovin⁵⁰ umožnilo rozlišit tyto dvě kukuřičné odrůdy. Podobně, na základě CZE profilování peptidů vzniklých tryptickým štěpením bílkovin ve zdravých a zánětem postižených kostních tkáních bylo možné tyto dva druhy tkání jednoznačně odlišit⁵¹.

V poslední době byly vyvinuty nové typy kovalentně vázaných kationických⁵² i anionických⁵³ polymerních povlaků křemenných kapilár s různým stupněm náboje, které potlačují sorpci analytů se stejným typem náboje na vnitřní stěnu kapiláry a dovolují regulovat směr a rychlost elektroosmotického toku. Tím přispívají ke zvýšení separační účinnosti a optimalizaci doby HPCE analýz.

5.3. Fyzikálně chemické charakterizace (bio)molekul

HPCE metody jsou využívány hlavně pro analytické účely, ale velmi významné jsou jejich aplikace i pro fyzikálně chemické a biochemické charakterizace biologicky aktivních látek a funkčních organických molekul. V této oblasti jsme vypracovali postupy pro přesné měření efektivních elektroforetických pohyblivostí včetně jejich korekcí na konstantní iontovou sílu a konstantní teplotu základních elektrolytů^{54–56}, které umožnily stanovení důležitých parametrů ionogenních látek, konstant acidity (pK_a), aktuálních a limitních iontových pohyblivostí, izoelektrických bodů, efektivních nábojů a iontových poloměrů řady nově (bio)syntetizovaných či izolovaných biologicky aktivních látek, např. fosfinátových pseudopeptidů^{55,57,58}, peptidových hormonů a jejich fragmentů⁵⁹, hmyzích antimikrobiálních peptidů^{60,61}, antivirových léčiv na bázi



Obr. 6. HPCE separace *R*- a *S*-enantiomerů 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu. Experimentální podmínky: křemenná kapilára: 392/290 mm celková/efektivní délka, 50/375 μ m id/od; základní elektrolyt: 50 mM H₃BO₃, 45 mM NaOH, pH 10,0; chirální selektor: 20 mg ml⁻¹ β -CD; separační napětí: 15 kV; proud: 22,7 μ A; teplota: 25 °C; koncentrace vzorku: 200 μ M *R*-izomer, 100 μ M *S*-izomer; dávkovací tlak \times čas: 13,9 mbar \times 10 s

acyklických nukleosidů fosfonátů^{62,63}, cyklických dinukleotidů⁶⁴, nativních i syntetických (bio)polymerů^{65,66} a funkčních organických molekul, např. karboranových inhibitorů enzymů⁶⁷ a triazolových fungicidů⁶⁸ ve vodě a hydrofobních azahelicenů v methanolu^{69,70}.

ACE s přídatkem afinitních ligandů na bázi nativních i derivatizovaných CD byla využita pro stanovení vazebných konstant komplexů těchto chirálních selektorů s enantiomery a diastereomery různých sloučenin, např. acyklických nukleosid fosfonátů s β -CD⁷¹, cyklického diadenosin difosforothiolátu a diastereomerů jeho difluorovaného derivátu s 2-hydroxypropyl- β -CD⁷², antimikrobiálního dipeptidu β -alanyl-D,L-tyrosinu a jeho derivátů s 2-hydroxypropyl- β -CD⁷³, diquatů s náhodně vysoce sulfatovanými CD⁷⁴ a komplexů D- a L-enantiomerů Ru(II) a Fe(II) polypyridylových asociátů se single-izomery 2,3-diacetylovaných-6-sulfatovaných α -, β - a γ -CD⁷⁵. Vazebné konstanty byly stanoveny i pro jiné typy molekulových komplexů, např. komplexů cyklických peptidů, valinomycinu³⁴ a [Gly⁶]-antamanidu³⁵ s ionty alkalických kovů v methanolu a komplexů benzo- a dibenzo-18-crown-6-etheru s ionty alkalických kovů ve směsných hydroorganických rozpouštědlech, ve vodě s methanolem, ethanolem nebo acetonitrilem^{36,37}.

Metodou ACE s částečným plněním (PF-ACE) byla studována specifita a síla interakcí DNA oligonukleotidu (Dickersonova dodekameru) s klasickým DNA interkalátorovým ligandem (ethidium bromidem) a s potenciálními novými DNA ligandy oligofenylenového typu⁷⁶ a komplexů helquatů s chirálními aromatickými léčivy a katalyzátory⁷⁷.

Tlakem-asistovaná PF-ACE byla využita ke studiu síly interakcí mezi lidským inzulinem (HI) a čtyřmi biologicky aktivními ligandy (dopaminem, serotoninem, argininem a fenolem) ve vodném slabě alkalickém prostředí⁷⁸. Vazebné konstanty komplexů HI-ligand byly určeny ze závislosti změny migračního času ligandů na délce zóny HI v základním elektrolytu. Silný kationický elektroosmotický tok byl snížen hydrodynamickým protiproudem vyvolaným externím tlakem na výstupním konci kapiláry. Tím bylo zabráněno vyputování zóny HI z kapiláry a bylo umožněno studovat jeho interakce s ligandy. Komplexy HI-ligand byly slabé až středně silné s vazebnými konstantami v rozsahu 385–1 314 l mol⁻¹ vzrůstajícími v pořadí HI-arginin < HI-serotonin < HI-dopamin < HI-fenol.

6. Závěr a perspektivy dalšího rozvoje

Elektromigrační metody byly po celou dobu 70 let existence ÚOCHB intenzivně rozvíjeny a široce a úspěšně využívány pro separaci, kvalitativní i kvantitativní analýzu, izolaci, purifikaci a fyzikálně chemickou a biochemickou charakterizaci (bio)molekul v ústavu izolovaných, (bio)syntetizovaných či studovaných. Na základě dosažených výsledků lze předpokládat, že tomu tak bude i nadále. Další vývoj bude zaměřen zejména na zdokonalování

vysokoučinných kapilárních elektromigračních metod (HPCE) s cílem zvýšit jejich separační účinnost, citlivost a rychlost. V oblasti instrumentace bude zdokonalováno on-line spojení HPCE s hmotnostně spektrometrickou detekcí s vysokým rozlišením (CE-HRMS) a bude vyvinuto on-line spojení HPCE modulu se sběračem mikrofrakcí pro nanášení elektroeluoovaných nanolitrových objemů analytů na membrány nebo destičky, na kterých budou následně analyzovány MS s maticí asistovanou laserovou desorpce/ionizací (MALDI-MS). Metodický rozvoj bude zahrnovat vývoj nových: a) elektrolytových systémů kompatibilních s MS detekcí, b) (pseudo)stacionárních fází pro separaci látek nabitých i elektroneutrálních, c) stereoselektorů pro separace a analýzy chirálních sloučenin a d) povlaků potlačujících sorpci analytů na vnitřní stěnu křemenných kapilár. Vyvinutá instrumentace a metodika budou široce využívány pro separace, analýzy, mikropreparace a charakterizace nově připravených funkčních organických molekul a biologicky aktivních látek a pro studium jejich interakcí s jinými (bio)molekulami a (bio)částicemi v živých i neživých systémech.

Práce byla podpořena Akademií věd České republiky, projekt č. RVO 61388963. Autor děkuje spolupracovníkům, kteří se podíleli na prezentovaných výsledcích: Z. Prusík, V. Lišková, P. Sázelová, D. Koval, V. Šolínová, S. Štěpánová, R. Konášová, M. Růžička, T. Tůmová, S. Pangavhane, D. Geffertová, J. Bílek, J. Jaklová-Dyrtová a I. Kovač.

LITERATURA

- Gordon A. H., Keil B., Šebesta K.: *Nature* 164, 498 (1949).
- Gordon A. H., Keil B., Šebesta K., Knessl O., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 15, 1 (1950).
- Tiselius A.: *Trans. Faraday Soc.* 33, 524 (1937).
- Mikeš O.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 22, 831 (1957).
- Mikeš O., Holeysovsky V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 23, 524 (1958).
- Prusík Z., Keil B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 2049 (1960).
- Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 91, 867 (1974).
- Prusík Z., Štěpánek J., Kašička V., v knize: *Electrophoresis' 79* (Radola, B. J., ed.), str. 284. Walter de Gruyter: Berlin/New York 1980.
- Everaerts F. M., Verheggen T. P. E. M.: *J. Chromatogr.* 53, 315 (1970).
- Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 29, 465 (2006).
- Gebauer P., Foret F.: *Chem. Listy* 114, 3 (2020).
- Křivánková L.: *Chem. Listy* 114, 10 (2020).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 470, 209 (1989).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 569, 123 (1991).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 273, 117 (1983).

16. Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 320, 75 (1985).
17. Prusík Z., Kašička V.: *J. Chromatogr.* 320, 81 (1985).
18. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
19. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Science* 222, 266 (1983).
20. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* 56, 111 (1984).
21. Terabe S., Otsuka K., Ando T.: *Anal. Chem.* 57, 834 (1985).
22. Prusík Z., Kašička V., Staněk S., Kuncová G., Hayer M., Vrkoč J.: *J. Chromatogr. A* 390, 87 (1987).
23. Kašička V., Prusík Z., Sázellová P., Chiari M., Mikšík I., Deyl Z.: *J. Chromatogr. B* 741, 43 (2000).
24. Kašička V., Prusík Z., Sázellová P., Brynda E., Stejskal J.: *Electrophoresis* 20, 2484 (1999).
25. Kašička V., Prusík Z., Pospíšek J.: *J. Chromatogr. A* 608, 13 (1992).
26. Kašička V., Prusík Z., Sázellová P., Jiráček J., Barth T.: *J. Chromatogr. A* 796, 211 (1998).
27. Kašička V.: *Electrophoresis* 30, S40-S52 (2009).
28. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
29. Konášová R., Koval D., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1568, 197 (2018).
30. Konášová R., Koval D., Hošek J., Kašička V.: *Talanta* 228, 122212 (2021).
31. Šolínová V., Kašička V., Sázellová P., Barth T., Mikšík I.: *J. Chromatogr. A* 1155, 146 (2007).
32. Koval D., Busnel J. M., Hlaváček J., Jiráček J., Kašička V., Peltre G.: *Electrophoresis* 29, 3759 (2008).
33. Šolínová V., Poitevin M., Koval D., Busnel J. M., Peltre G., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1267, 231 (2012).
34. Ehala S., Kašička V., Makrlík E.: *Electrophoresis* 29, 652 (2008).
35. Pangavhane S., Makrlík E., Ruzza P., Kašička V.: *Electrophoresis* 40, 2321 (2019).
36. Ehala S., Makrlík E., Toman P., Kašička V.: *Electrophoresis* 31, 702 (2010).
37. Konášová R., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 39, 4429 (2016).
38. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Barth T., Ciencialová A., Žáková L.: *J. Chromatogr. B* 808, 75 (2004).
39. Kovač I., Jakl M., Šolínová V., Konášová R., Kašička V., Jaklová Dyrtrtová J.: *J. Chromatogr. A* 1652, 462385 (2021).
40. Šolínová V., Kašička V., Sázellová P., Holý A.: *Electrophoresis* 30, 2245 (2009).
41. De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
42. Šolínová V., Kaiser M. M., Lukáč M., Janeba Z., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 37, 295 (2014).
43. Koval D., Severa L., Adriaenssens L., Vávra J., Teplý F., Kašička V.: *Electrophoresis* 32, 2683 (2011).
44. Bílek J., Koval D., Sázellová P., Šolínová V., Severa L., Gutiérrez P. E. R., Teplý F., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 46, 2300417 (2023).
45. Pomeisl K., Lamatová N., Šolínová V., Pohl R., Brabcová J., Kašička V., Krečmerová M.: *Bioorg. Med. Chem.* 27, 1246 (2019).
46. Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 45, 4245 (2022).
47. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J.: *J. Chromatogr. B* 681, 37 (1996).
48. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J.: *J. Chromatogr. B* 688, 213 (1997).
49. Sázellová P., Kašička V., Ibanez E., Cifuentes A.: *J. Sep. Sci.* 32, 3801 (2009).
50. Sázellová P., Kašička V., Leon C., Ibanez E., Cifuentes A.: *Food Chem.* 134, 1607 (2012).
51. Michalusová I., Sázellová P., Cejnar P., Kučková S., Hynek R., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 43, 3949 (2020).
52. Konášová R., Butnariu M., Šolínová V., Kašička V., Koval D.: *Anal. Chim. Acta* 1178, 338789 (2021).
53. Šolínová V., Tůma P., Butnariu M., Kašička V., Koval D.: *Electrophoresis* 43, 1953 (2022).
54. Kašička V., Prusík Z., Mudra P., Štěpánek J.: *J. Chromatogr. A* 709, 31 (1995).
55. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M., Garrow T. A.: *J. Chromatogr. B* 770, 145 (2002).
56. Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* 26, 3221 (2005).
57. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis* 24, 774 (2003).
58. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis* 27, 4648 (2006).
59. Šolínová V., Kašička V.: *Electrophoresis* 34, 2655 (2013).
60. Tůmová T., Monincová L., Čeřovský V., Kašička V.: *Electrophoresis* 37, 3186 (2016).
61. Tůmová T., Monincová L., Nešuta O., Čeřovský V., Kašička V.: *Electrophoresis* 38, 2018 (2017).
62. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Česnek M., Holý A.: *Electrophoresis* 27, 1006 (2006).
63. Geffertová D., Ali S. T., Šolínová V., Krečmerová M., Holý A., Havlas Z., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1479, 185 (2017).
64. Štěpánová S., Andris E., Gutten O., Buděšínský M., Dejmek M., Břehová P., Rulíšek L., Kašička V.: *Electrophoresis* 45, 687 (2024).
65. Ibrahim A., Koval D., Kašička V., Faye C., Cottet H.: *Macromolecules* 46, 533 (2013).
66. Chamieh J., Koval D., Besson A., Kašička V., Cottet H.: *J. Chromatogr. A* 1370, 255 (2014).
67. Šolínová V., Brynda J., Šícha V., Holub J., Grüner B., Kašička V.: *Electrophoresis* 42, 910 (2021).
68. Konášová R., Dyrtrtová J. J., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1408, 243 (2015).
69. Ehala S., Míšek J., Stará I. G., Starý I., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 31, 2686 (2008).
70. Šolínová V., Štěpánová S., Jančařík A., Klívar J., Šámal M., Stará I. G., Chocholoušová J. V., Vacek J., Starý I., Kašička V.: *Electrophoresis* 43, 696 (2022).
71. Šolínová V., Mikysková H., Kaiser M. M., Janeba Z., Holý A., Kašička V.: *Electrophoresis* 37, 239 (2016).

72. Štěpánová S., Břehová P., Kašička V.: *Electrophoresis* 45, 1000 (2024).
73. Sázelová P., Šolínová V., Schimperková T., Jiráček J., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 45, 3328 (2022).
74. Bílek J., Koval D., Šolínová V., Talele H. L., Severa L., Gutiérrez P. E. R., Teplý F., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 47, 2400286 (2024).
75. Sázelová P., Koval D., Severa L., Teplý F., Vigh G., Kašička V.: *Electrophoresis* 40, 523 (2020).
76. Růžička M., Čížková M., Jirásek M., Teplý F., Koval D., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1349, 116 (2014).
77. Růžička M., Koval D., Vávra J., Reyes-Gutierrez P. E., Teplý F., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1467, 417 (2016).
78. Šolínová V., Žáková L., Jiráček J., Kašička V.: *Anal. Chim. Acta* 1052, 170 (2019).

V. Kašička (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Development and Application of Electromigration Methods at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences**

This article summarizes the development and application of electromigration methods at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences in Prague (IOCB Prague) since the founding of the Institute up to the present time. The development of instrumentation, methodology and applications of the following methods is described: (i) non-cooled and cooled paper electrophoresis and its application for both analytical and semipreparative separation of amino acids and peptides for determination of primary structure of proteins; (ii) continuous flow-through electrophoresis in a free solution (FFE) applied for purification of biologically active peptides, especially peptide hormones, with the preparative capacity of 50–100 mg h⁻¹; (iii) capillary isotachopheresis (CITP) used for the quality control of synthetic or isolated biological active peptides and their counterions; (iv) high performance capillary electromigration methods (HPCE) including zone electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, affinity electrophoresis, electrokinetic chromatography, and electrochromatography, and their application for separation, analysis and physicochemical and biochemical characterization of a wide spectrum of (bio)molecules isolated, (bio)synthesized and investigated at the IOCB, e.g. amino acids, peptides, proteins, nucleosides, nucleotides, fragments of nucleic bases, steroids, catecholamines, and various functional organic molecules, such as azahelicenes, helquats and diquats.

Keywords: capillary electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, affinity electrophoresis, electrokinetic chromatography, electrochromatography

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Academy of Sciences, project no. RVO 61388963.

The author thanks his coworkers participating in the presented results: Z. Prusík, V. Lišková, P. Sázelová, D. Koval, V. Šolínová, S. Štěpánová, R. Konášová, M. Růžička, T. Tůmová, S. Pangavhane, D. Geffertová, J. Bílek, J. Jaklová Dytrtová, and I. Kovač.



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

PACHOVÁ STOPA PROFESORA Z CHEMICKÝCH LISTŮ

Věnováno prof. RNDr. Jiřímu Barketovi k jeho 75. narozeninám.

ULRIKA MALÁ^a, MARTIN ANDERS^b a ŠTĚPÁN URBAN^a

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,

^b Psychiatrická klinika I. LF UK a VFN v Praze, Česká republika

ulrika.sandra.mala@gmail.com

Došlo 5.9.24, přijato 1.10.24.

Nepředpokládáme, že by pan profesor Berek páchal trestnou činnost, ale pokud bychom jeho pachovou stopu přesto odebrali a provedli detailní chemickou analýzu, mohli bychom se přesvědčit o tom, že je to muž, že je europoidní rasy a případně zjistit, jaká v jeho žilách koluje krev, zda patří do skupiny A, B nebo 0. Pachová stopa je zdroj informací, který orgány činné v trestním řízení prostřednictvím speciálně cvičených psů používají pro individuální identifikaci již desítky let. Nyní je snaha vytvořit instrumentální metodu pro detailní chemickou analýzu pachové stopy tak, aby pachová identifikace mohla být objektivizována a používána jako důkazní prostředek a samozřejmě, aby poskytovala řadu dalších informací o poskytovateli pachu.

Klíčová slova: forenzní olfaktorika, medicínální olfaktorika, olfaktorika, dvoudimenzionální plynová chromatografie, pachová stopa

Obsah

1. Úvod
2. Lidská pachová stopa
3. Forenzní olfaktorika a olfaktorika
4. Medicínální olfaktorika
5. Sorbenty pro odběr lidského pachu
6. Instrumentace
7. Závěr

1. Úvod

Pachová stopa je v řadě zemí používána orgány činnými v trestním řízení pro zjištění, zda byla daná osoba přítomna na určitém místě. K tomu se používá tzv. metoda pachové identifikace (MPI)¹, v rámci které speciálně cvičení policejní psi porovnávají pachové vzorky odebrané na místě činu s pachovými vzorky odebranými podezřelým a dalším osobám². Tato, tak zvaná olfaktorická metoda pachové identifikace, využívá jednak vynikající citlivost³ čichového ústrojí psů a jednak skutečnost, že tito speciálně cvičení psi jsou schopni se naučit rozeznávat tzv. individuální pachovou signaturu, tedy takovou část lidského pachu, o které se předpokládá, že je unikátní pro každého člověka^{4,5}. Tato pachová signatura je považována za geneticky podmíněnou⁶, z čehož vyplývá již zmíněná individualita. Naopak nevýhodou olfaktorické identifikace je určitá subjektivnost celého postupu, která je dána používáním psů

a související závislosti na jejich náladách, případnému vlivu psovodů a obecně okolí. Jinými slovy, i když budou pachové identifikace opakovány za stejných podmínek, nemusí být výsledky porovnávání identické. Z tohoto důvodu jsou v posledních letech vyvíjeny objektivní metody pro detailní chemickou analýzu pachových stop z místa činu⁶⁻⁹. Jedná se o tzv. olfaktoriku, která by měla využívat pokročilé metody analytické instrumentální chemie.

2. Lidská pachová stopa

Pojem lidská pachová stopa označuje skutečnost, že sloučeniny pachu konkrétní osoby jsou zanechány na určitém místě a logicky dávají toto místo do souvislosti s touto osobou. Pojem lidský pach je obvykle spojován s čichovým vjemem, který tyto sloučeniny vyvolávají a chemicky uvažující člověk, tedy i profesor Jiří Berek, si v této souvislosti vybaví v první řadě těkavé látky. Avšak obecně je tento pojem mnohem širší. V tomto článku se budeme zabývat pouze kožním pachem, tedy budeme uvažovat sloučeniny, které prochází pokožkou. Tento kožní pach obvykle lidé vnímají jen podprahově a to, co vytváří často nepříjemný čichový vjem, jsou až sloučeniny vzniklé degradací některých těchto látek mikroorganismy na povrchu kůže.

V policejní praxi se používá pojem „pachová signatura“, který vyjadřuje skupinu sloučenin v pachové stopě, které umožňují identifikaci jedince. Nedávné výzkumy prokázaly^{10,11}, že v jedné pachové stopě je několik tako-

vých pachových signatur, které se odlišují rozdílnou těkavostí, mluvíme o tzv. multiplicitě pachové signatury. Tyto studie^{10,11} také ukazují, že speciálně cvičení policejní psi používají pro identifikaci sloučeniny velmi málo těkavé látky, s vyšší molekulovou hmotností¹², jako jsou zejména estery vyšších mastných kyselin, vitaminy a steroly, které zůstávají na místě činu relativně dlouhou dobu a jejichž relativní koncentrace se mění minimálně.

V odorologické literatuře¹³ jsou sloučeniny lidského pachu děleny do tří, potažmo čtyř skupin, na primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární a sekundární pachové sloučeniny procházejí pokožkou. Primární část pachu je považována za geneticky determinovanou, přičemž relativní koncentrace těchto sloučenin jsou v dlouhodobém horizontu časově nejstabilnější. V rámci této skupiny je uvažována i již zmíněná pachová signatura. Nicméně časté výroky o neměnnosti primárního pachu jsou hluboce nesprávné, ať pro epigenetické změny DNA nebo pro degenerativní choroby (cukrovka, nádorová onemocnění, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a jiná onemocnění neurodegenerativní povahy, včetně schizofrenie atp.). Sloučeniny sekundárního pachu jsou ovlivňovány hlavně aktuálním metabolizmem, infekcemi, duševní a fyzickou kondicí nositele. Závisí tak na stravě, užívaných léčivých přípravcích nebo potravních doplňcích, zdravotním a hormonálním stavu apod. Jak již bylo zmíněno, jde tedy také o transdermální sloučeniny ovšem ovlivněné mnoha faktory a vnějším prostředím. U terciární části pachu jde o sloučeniny, které jednak pochází z kosmetiky a z okolního prostředí, jako jsou například specificky významně zapáchající oblasti, jako nemocnice, benzínové pumpy, chemické laboratoře a podobně. Podstatné je, že terciární látky neprocházejí pokožkou dotyčné osoby, ale při kontaktu s jinými osobami mohou být přeneseny i transdermální sloučeniny, které prošly kůží jiných osob, tedy jejich primární a sekundární látky. V poslední době je uvažována i kvartérní skupina. Je tvořena metabolity mikroorganismů na povrchu kůže, které jsou tvořeny degradací látek s vyšší molekulovou hmotností pocházejících z lidského pachu, zejména působením kvasinek a bakterií, které vegetují obvykle v nevětraných vlhkých oblastech lidského těla¹⁴. Tyto sloučeniny často charakteristicky zapáchají. Je zřejmé, že hranice mezi jednotlivými skupinami lidského pachu nejsou ostré a vzájemně se překrývají, jde tedy spíše o formální dělení, které má umožnit hlubší pochopení podstaty lidského pachu.

3. Forenzní olfaktorika a olfaktronika

Individuální charakteristika lidského pachu, resp. jeho pachové signatury, je v řadě zemí světa využívána orgány činnými v trestním řízení v rámci forenzní praxe pro identifikaci osob, kdy pachová stopa může spojit konkrétní osobu například s místem činu. Pro tyto účely se dosud využívá olfaktorická metoda pachové identifikace (MPI), kdy speciálně cvičený policejní pes porovnává vzorek

pachové stopy z místa činu s pachovými vzorky podezřelých osob². Tato identifikace je používána jako operativně pátrací prostředek a její použití jako důkaz u soudu je ve většině zemí nepřipustné vzhledem k její subjektivitě, nicméně v některých zemích, včetně České republiky, se používá jako podpůrný důkaz. S rozvojem pokročilých metod analytické chemie, kdy v latentním pachovém vzorku lze pozorovat desetitisíce pachových sloučenin, vzniká postupně olfaktronická analýza pachových stop, která má již objektivní charakter, a je statisticky vyhodnotitelná. Takto může forenzní olfaktronika doplnit stávající MPI, a tak vytvořit důkazní řetězec, který lze použít u soudu.

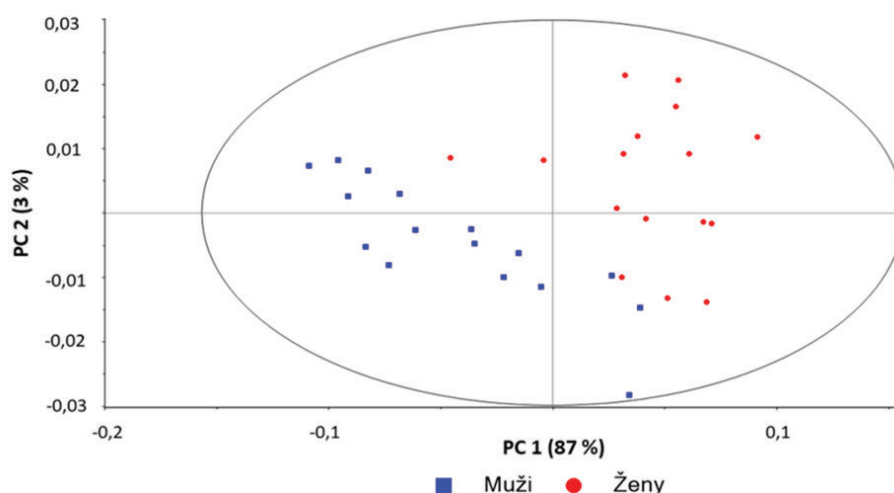
V rámci forenzní aplikace olfaktronické analýzy lidské pachové stopy je nejen evidentní individuální identifikace, ale zároveň bude možné využít další forenzní potenciál olfaktoriky, který olfaktorika pomocí speciálně cvičených psů obvykle nenabízí. Jde především o skupinovou identifikaci. Vzhledem ke genetické a metabolické determinaci lidského pachu lze podle pachové stopy v budoucnu určovat např. pohlaví, etnický původ, krevní skupinu zůstavitele pachu a řadu dalších informací¹⁶. Samozřejmě z pohledu orgánů činných v trestním řízení, taková analýza konkrétní pachové stopy z místa činu povede buď přímo k určení jedince, který stopu zanechal, případně k podstatnému zúžení okruhu potenciálních podezřelých (viz obr. 1, 2, 3).

4. Medicinální olfaktronika

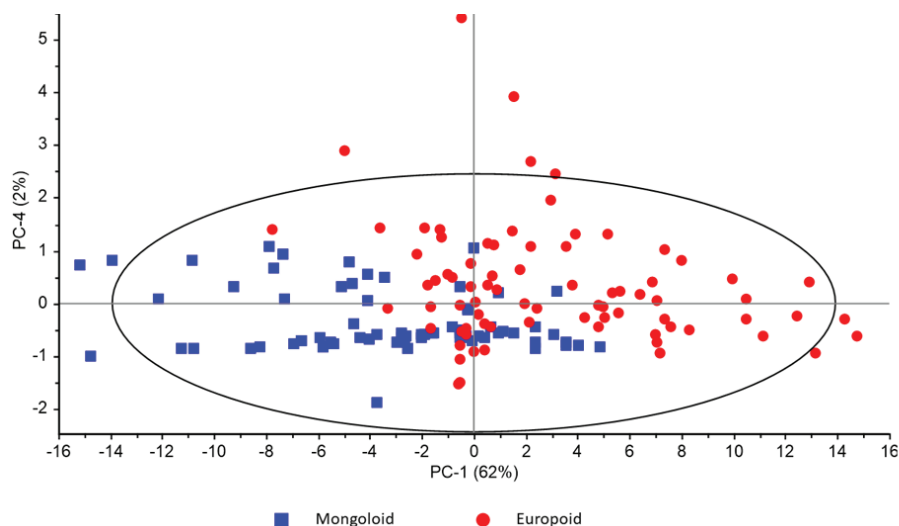
V souvislosti se skupinovou identifikací se ukazuje, že obrovský informační potenciál lidského pachu bude možné využívat i v lékařství například při neinvazivní pomocné diagnostice některých nemocí (viz obr. 4)^{15,19–21}. Předmětem olfaktronického výzkumu jsou především nádorová onemocnění. Principiální možnost neinvazivního vyšetření pachu by mohla přispívat ke včasnému zachytu těchto onemocnění tak, aby následná léčba byla po definitivním ověření nálezu co nejrychlejší, nejefektivnější a tím pádem byla doprovázena největší šancí na úspěch.

Vedle diagnostiky různých nádorových onemocnění se rozvíjí i výzkum olfaktronické diagnostiky psychických poruch, které jsou prakticky všechny doprovázeny neurodegenerativními procesy²². Může se jednat o neuropsychická onemocnění projevující se různorodými příznaky v oblasti pohybu anebo kognitivních funkcí jedince, například Parkinsonova a Huntingtonova choroba či jiné typy demencí, ale také o neurovývojová onemocnění s významnou neurodegenerativní složkou, které jsou dnes označovány jako schizofrenie, a kde věda stále hledá etiopatogenetické mechanismy, přičemž není stále vyloučeno neurotoxické působení různých látek²³. Neméně významnou kapitolou by se také mohlo stát hledání markerů či prediktorů odpovědi na léčbu v oblasti diagnostiky a léčby stále se rozšiřujících poruch nálad.

Tyto druhy chorob jsou často spojovány se změnami neurotransmiterových systémů podmíněných mutacemi DNA a výsledné produkty, které tyto mutace ovlivňují nebo přímo doprovázejí by měly být i skrze lidský pach



Obr. 1. PCA graf rozdělení lidského pachu na základě pohlaví muže a ženy. Hotellingova křivka pro hladinu významnosti 5 %. Pachové vzorky byly měřeny dvoudimenzionálním plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem. Převzato z disertační práce¹⁷

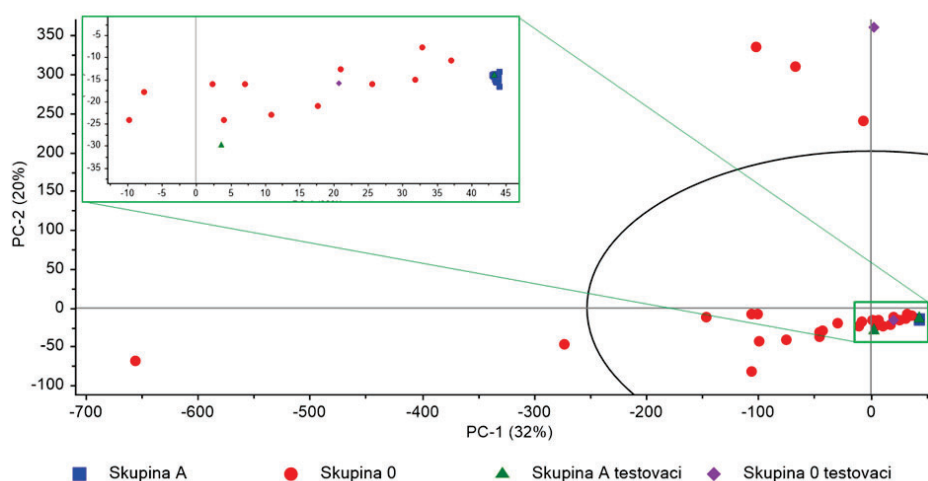


Obr. 2. PCA graf rozdělení dobrovolníků mongoloidního a europoidního typu dle lidského pachu. Hotellingova křivka pro hladinu významnosti 5 %. Pachové vzorky byly měřeny dvoudimenzionálním plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem. Převzato z diplomové práce¹⁸

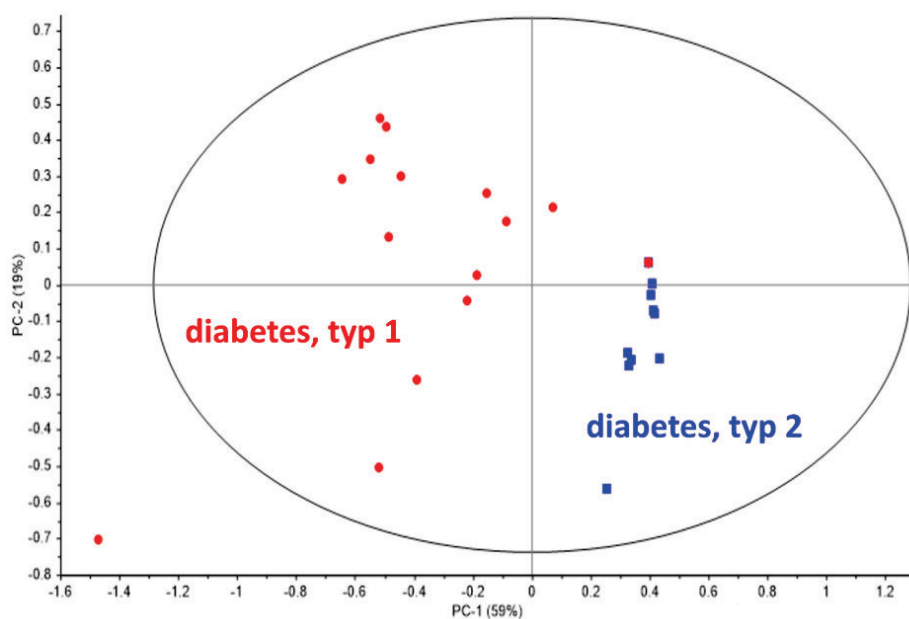
detegovány daleko dříve, než jsou pozorovány např. klasické symptomy onemocnění. Nejnovější nálezy potvrzují²⁴, že v etiopatogenezi řady duševních poruch hraje klíčovou roli aktivace imunitních buněk, které produkují vysoké koncentrace cytokinů, které ovlivňují vznik a metabolismus neurotransmiterů přímo v lidském mozku. Detekce neurotoxických látek by mohla být vodítkem pro volbu nejvhodnějšího léčivého přípravku a jeho případného vlivu na tyto procesy apod.

Olfaktronický výzkum prokázal, že lidský pach se sestává z desetitisíců, možná statisíců různých sloučenin,

kteří se dramaticky odlišují v relativních koncentracích a obsahuje geneticky podmíněnou složku, tzv. primární pach. V případě degenerativních onemocnění dochází k ovlivnění DNA nositele pachu a následně dochází ke specifickým změnám relativních koncentrací sloučenin primárního pachu. Základní výhodou medicínální olfaktoriky je tedy jednak neinvazivnost v porovnání s běžnými metodami diagnostiky těchto onemocnění a možnost získat z detailní chemické analýzy jednoho pachového vzorku informace o celé řadě chorob.



Obr. 3. PCA graf rozdělení dobrovolníků s krevní skupinou A a 0 dle lidského pachu. Hotellingova křivka pro hladinu významnosti 5 %. Pachové vzorky byly měřeny dvoudimenzionálním plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem. Převzato z práce¹⁶

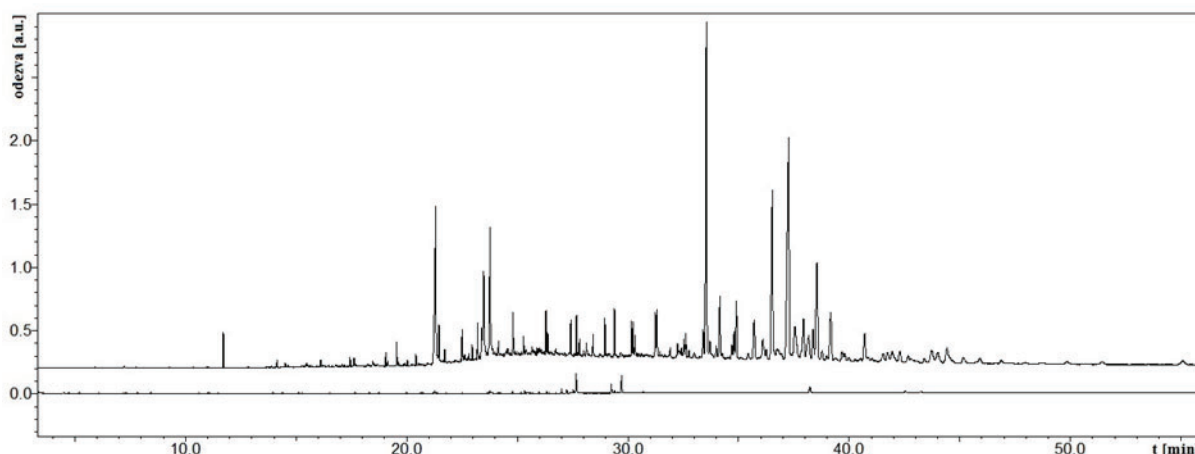


Obr. 4. Graf komponentního skóre (PCA) rozdělení pachu dobrovolníků s diabetem 1. a 2. typu. Hotellingova křivka vyznačující hladinu významnosti 5 %. Pachové vzorky byly měřeny dvoudimenzionálním plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem. Převzato z bakalářské práce¹⁵

5. Sorbenty pro odběr lidského pachu

Pro studium latentních vzorků je extrémně důležitý jejich odběr, při kterém hraje klíčovou roli samotná čistota sorbentu. Jde totiž o to, že koncentrace pachových sloučenin je menší než běžné nečistoty. Příkladem může být „čistý sorbent“ (viz obr. 5) používaný pro olfaktorickou

identifikaci osob pomocí psů, kdy se v rámci policejní praxe ČR používá komerčně dostupná netkaná textilie Aratex® (70 % bavlna, 25 % viskóza, 5 % polyester, 280 g m⁻², výrobce CHLUM-TEX, ČR)²⁵. Tato textilie je tedy pro přístrojovou analýzu krajně nevhodná. V této souvislosti se počátky olfaktorického výzkumu^{8,26} ubíraly směrem nalezení vhodnějších alternativ. Zde je dobré zmí-



Obr. 5. Porovnání GC chromatogramů čistého Aratexu (vrchní chromatogram) a čistých skleněných kuliček (spodní chromatogram) pro odběr lidského pachu. Převzato z práce²⁷

nit hlavně dva materiály, a to sklo a teflon. Tyto sorbenty jsou však poněkud problematictější pro olfaktorické účely, proto je část experimentů věnována i sterilním netkaným lékařsky využívaným textiliím jako vhodnější alternativě k již zmíněnému Aratexu.

6. Instrumentace

Analýza lidského pachu pomocí přístrojového vybavení byla směřována hlavně směrem plynové chromatografie často ve spojení s hmotnostní spektrometrií^{7,12,28,29}. V posledních letech je sledována jako velice užitečnou metoda dvoudimenzionální komprehenzivní plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC×GC-MS). Díky zapojení druhé kolony do chromatografického systému lze dosáhnout vyšší separační účinnosti, která má za následek detekci více látek než umožňuje systém jednodimenzionální. Z předchozích experimentů²⁵ bylo zjištěno, že pro účely analýzy lidského pachu je vhodnější tzv. reverzní uspořádání obou kolon. Konkrétně první třicetimetrová středně polární kolona (Rtx-200MS) s dvoumetrovou předkolonou a druhá jednometrová nepolární kolona (TG-5HT).

7. Závěr

Z předchozího textu je zřejmý obrovský informační potenciál olfaktoriky, který v sobě ukrývá lidský pach. Z pohledu orgánů činných v trestním řízení jde především o individuální a skupinovou identifikaci, která může výrazným způsobem přispět k identifikaci osob, které na daném místě svůj osobní pach zanechaly. Do skupinové identifikace patří nejen určení pohlaví, etnického původu, ale i určení nemoci, užívání konkrétních léků, rozpoznání alkoholismu případně drogové závislosti atp. Tato medicí-

nální olfaktorika, která je sice zatím v počátečním stadiu výzkumu, má jednoznačně obrovský potenciál pro včasnou neinvazivní diagnostiku řady nemocí (nádorových, neurodegenerativních atp.). Z toho lze také jednoznačně usoudit, že profesor Barek stařeckou demencí netrpí, a proto mu přejeme mnoho zdraví a pracovních úspěchů u příležitosti jeho 75. narozenin.

Tento článek byl podpořen Ministerstvem vnitra České republiky, číslo projektu VJ01010123.

LITERATURA

1. Ferry B. a 12 spoluautorů: *Forensic Sci. Int.* 302, 109895 (2019).
2. Pinc L., Vyplelová P., Vlasák P., Santariová M., Čapková Z., Lněničková J.: *Komparace individuálních pachů pomocí speciálně vycvičených psů. Metodická příručka.* Nakladatelství ČZU, Praha 2015.
3. Krestel D., Passe D., Smith J. C., Jonsson L.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8, 169 (1984).
4. Furton K. G., Caraballo N. I., Cerreta M. M., Holness H. K.: *Philos. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 370, (2015). doi: 10.1098/rstb.2014.0262.
5. Natsch A., v knize: *Springer Handbook of Odor* (Buettner A., ed.), kap. 49, str. 937. Springer International Publishing, Cham 2017.
6. Curran A. M., Rabin S. I., Furton K. G.: *Forensic Science Communications* 7(2) (2005).
7. Cuzuel V., Sizun A., Cognon G., Rivals I., Heulard F., Thiébaud D., Vial J.: *J. Chromatogr. A* 1536, 58 (2018).
8. Pojmanová P., Ladislavová N., Škeříková V., Kania P., Urban Š.: *Chem. Pap.* 74, 1383 (2020).
9. Pandey S. K., Kim K.-H.: *Trends Anal. Chem.* 30, 784 (2011).

10. Doležal P., Furton K. G., Lněničková J., Kyjaková P., Škeříková V., Valterová I., Pinc L., Urban Š.: *Egypt. J. Forensic Sci.* 9, 7 (2019).
11. Malá U.: *Aktivní pachové signatury v málo tékavých frakcích pachu. Diplomová práce.* VŠCHT Praha, Praha 2022.
12. Doležal P., Kyjaková P., Valterová I., Urban Š.: *J. Chromatogr. A* 1505, 77 (2017).
13. Prada P. A., Curran A. M., Furton K. G.: *Human Scent Evidence.* CRC Press. Boca Raton 2014.
14. Starkenmann C., v knize: *Springer Handbook of Odor* (Buettner A., ed.), str. 121, Springer International Publishing, Cham 2017.
15. Prostějovská L.: *Forenzní určení příznaků nemoci podle pachové stopy. Bakalářská práce.* VŠCHT Praha, Praha 2021.
16. Čechová J., Kaminsky O., Ladislavová N., Malá U., Pojmanová P., Škeříková V., Urban Š.: *Forenzní vědy, právo, kriminalistika* 8, 6 (2023).
17. Pojmanová P.: *Molekulová skladba pachové signatury. Disertační práce.* VŠCHT Praha, Praha 2020.
18. Kroutilová K.: *Studium rozdílů v chemickém složení primárního lidského pachu Asiatů a Evropanů. Diplomová práce.* VŠCHT Praha, Praha 2022.
19. Kure S., Iida S., Yamada M., Takei H., Yamashita N., Sato Y., Miyashita M.: *Biology* 10, 517 (2021).
20. Muppidi S. S., Katragadda R., Lega J., Alford T., Aidman C. B., Moore C.: *J. Breath Res.* 15, 024001 (2021).
21. Pleil J. D., Wallace M. A. G., McCord J., Madden M. C., Sibus J., Ferguson G.: *J. Breath Res.* 14, 016006 (2020).
22. Kapczinski F., Berk M., Magalhães P. V. d. S.: *Neuro-progression in Psychiatry.* Oxford University Press, Oxford 2019.
23. Jauhar S., Johnstone M., McKenna P. J.: *The Lancet* 399, 473 (2022).
24. Orlovska-Waast S., Benros M. E., v knize: *Immuno-Psychiatry: Facts and Prospects* (Berk M., Leboyer M., Sommer I. E., ed.), kap. 1, str. 3. Springer International Publishing, Cham 2021.
25. Pojmanová P., Ladislavová N., Urban Š.: *Separations* 8, 232 (2021).
26. Bernier U. R., Booth M. M., Yost R. A.: *Anal. Chem.* 71, 1 (1999).
27. Doležal P., Cinková P., Benediktová K., Urban Š., Lněničková J., Pinc L.: *Kriminalistika: čtvrtletník pro kriminalistickou teorii a praxi* 3, 11 (2016).
28. Curran A. M., Prada P. A., Furton K. G.: *J. Forensic Sci.* 55, 50 (2010).
29. Sommerville B. A., McCormick J. P., Broom D. M.: *Pestic. Sci.* 41, 365 (1994).

U. Malá^a, M. Anders^b, and Š. Urban^a (^a Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague, Czech Republic, ^b Psychiatric Clinic, First Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic): **The Scent Trace of a Professor from Chemické Listy**

We do not presume that professor Berek has committed any criminal act, but, if we nevertheless collect his scent sample and conduct a detailed chemical analysis, we could confirm that he is male, of the Caucasian race, and perhaps determine which blood type flows in his veins, whether it is A, B, or O. Scent evidence is a source of information that prosecuting authorities have been using for decades to identify individuals through specially trained canines. There is now an effort to create an instrumental method for a detailed chemical analysis of the scent trace so that scent identification can be objectified and used as an evidence in court, and of course, to provide a range of additional pieces of information about the scent provider.

Keywords: forensic olfactronics, medical olfactronics, olfactory, two-dimensional gas chromatography, scent evidence

Acknowledgement

This research was supported by Ministry of Interior of The Czech Republic, project number VJ01010123.



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

URČOVÁNÍ POLOH FUNKČNÍCH SKUPIN V ALIFATICKÝCH ŘETĚZCÍCH LIPIDŮ A POLOH ALIFATICKÝCH ŘETĚZCŮ V ACYLGLYCEROLIPIDECH METODAMI HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Tento článek je věnován profesorovi Jiřímu Barkovi u příležitosti jeho 75. narozenin.

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika
josef.cvacka@uochb.cas.cz

Došlo 2.10.24, přijato 16.10.24.

Lipidy hrají klíčové role v mnoha biologických procesech. Většina lipidů obsahuje dlouhé alifatické řetězce, jejichž variabilní struktura přispívá k rozmanitým fyzikálně-chemickým vlastnostem a biologickým funkcím těchto molekul. Alifatické řetězce lipidů mohou být rovné nebo rozvětvené, s dvojnými či trojnými vazbami, případně s různými funkčními skupinami. V posledních letech došlo k významnému pokroku ve strukturní analýze lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Nové metody jsou založeny na využití netradičních fragmentačních technik a nových derivatizačních reakcí. S jejich pomocí lze určovat podrobnou strukturu alifatických řetězců, včetně určení polohy násobných vazeb, funkčních skupin a uspořádání alifatických řetězců v komplexních lipidech. Tento přehledový článek navazuje na dva předchozí, které se zabývaly určováním poloh dvojných vazeb (Chem. Listy 117, 684 (2023), Chem. Listy 117, 747 (2023)). Tento text je zaměřen na určení polohy methylového větvení, kyslíkatých funkčních skupin, karbocyklů a stereospecifické polohy acylového řetězce na glycerolu.

Klíčová slova: fragmentace, funkční skupiny, karbocykly, lipidy, methylové větvení, *sn* pozice, strukturní analýza

Obsah

1. Úvod
2. Methylové větvení alifatických řetězců
3. Funkční skupiny obsahující kyslík a karbocykly
4. Stereospecifická poloha acylového řetězce na glycerolu
5. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích se hmotnostní spektrometrie stala klíčovým nástrojem pro analýzu a charakterizaci biomolekul. Moderní hmotnostní spektrometrie díky citlivosti, novým fragmentačním technikám a vysokému rozlišení hmotnostních spekter umožňuje detailní studium struktury a složení směsí lipidů. Větvení alifatických řetězců a přítomnost funkčních skupin významně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti lipidů, jako je například jejich polarita, rozpustnost a schopnost tvořit membránové struktury. Tyto změny se mohou projevit v jejich biologické aktivitě a hrát klíčovou roli při vzniku a vývoji různých patologických stavů, včetně metabolických a kardiovaskulárních onemocnění. Proto je důležité mít k dispozici pokročilé

analytické nástroje, které umožňují podrobný popis struktury lipidů a jejich modifikací. Tento článek představuje přehled současných metod hmotnostní spektrometrie používaných k charakterizaci větvení alifatického řetězce, funkčních skupin lipidů a stereoizomerie na glycerolu. Stručné shrnutí principů, výhod a omezení hlavních metod je uvedeno v tabulce I.

2. Methylové větvení alifatických řetězců

Mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem (BCFA, z angl. branched-chain fatty acid) s jednou nebo více methylovými skupinami v řetězci se v biologických vzorcích vyskytují poměrně často¹⁻³. Nejběžnější BCFA mají methylovou skupinu v poloze n-2 (*iso*) nebo n-3 (*anteiso*). Tradiční metody určování poloh větvení alifatických řetězců jsou založeny na derivatizaci a následné GC-MS analýze⁴. Novější postupy využívají LC-MS s elektrosprejovou ionizací (ESI) a fragmentace vyvolané radikálovým centrem (RDD, radical-driven dissociation)⁵⁻¹² nebo fragmentace s odlehým nábojem (CRF, charge remote fragmentation), často po změně polarity prekurzorového iontu (charge-switch)¹³⁻¹⁵.

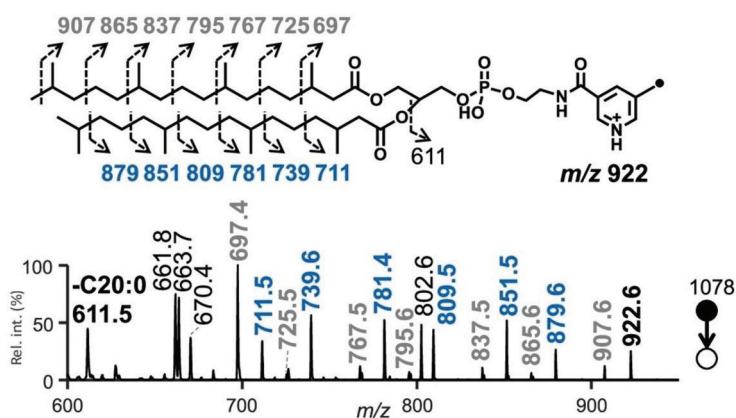
Tabulka I

Hlavní metody pro charakterizaci větvení alifatického řetězce, funkčních skupin lipidů a stereoisomerie na glycerolu

Metoda	Princip	Výhody	Omezení
Fragmentace vyvolaná radikálovým centrem (RDD)	fragmentace iniciovaná radikálem, která vede ke štěpení vazeb C-C nebo C-H	lokalizace polohy větvení alifatického řetězce a dalších funkčních skupin	vyžaduje derivatizaci (I-AMPP ⁺ , činidla obsahující skupinu TEMPO atd.)
Fragmentace s odlehkým nábojem (CRF)	fragmentace iontů s pevně lokalizovaným nábojem	lokalizace polohy methylových skupin; lze využít běžně dostupnou fragmentační techniku – nízkoenergetickou CID	vyžaduje derivatizaci (AMPP ⁺ , [Mg(Terpy) ₂] ²⁺ , atd.)
Fotodisociace (UVPD)	fragmentace iontů po jejich interakci s UV zářením	charakterizace polohy funkčních skupin obsahujících kyslík; vhodné pro určení <i>sn</i> pozic	speciální nákladná instrumentace pro UVPD; nízká výtěžnost fragmentace
Disociace vyvolaná elektrony (EID)	fragmentace iontů po jejich interakci s elektrony	podrobná strukturní charakterizace lipidů	speciální nákladná instrumentace pro EID; nízká výtěžnost fragmentace; spektra složitých lipidů jsou náročná na interpretaci

Při RDD vzniká z iontu se sudým počtem elektronů radikálový prekurzor, který se dále štěpí. Prekurzor s lichým počtem elektronů lze vytvořit pomocí kolizně indukované disociace (CID, collision-induced dissociation) nebo fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD, ultraviolet photodissociation). Fragmenty radikálového prekurzoru odpovídají štěpení jednotlivých C-C vazeb. Přítomnost methylového větvení v řetězci se projeví narušením pravidelného vzoru, přičemž mezi fragmenty vzniká mezera 28 Da. Dosud bylo navrženo několik derivátů, které poskytují RDD rozvětvených alifatických řetězců. Jedna z metod využívá amidaci mastných kyselin *o*-benzylhydroxylaminem⁸. Při kolizní aktivaci eliminují lithné adukty těchto derivátů benzylové radikály. Vznikají

nitroxidové radikál-kationty, které se následně rozkládají mechanismem RDD. Metoda byla použita pro LC-MS analýzu BCFA ve vzorcích jačihho mléka a lidské plazmy⁸. Lze také využít derivatizační činidla obsahující skupinu TEMPO, jako je 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester 3-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) pikolinové kyseliny (TPN) nebo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester 5-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) nikotinové kyseliny (TBN). Při nízkoenergetické CID se TEMPO eliminuje a tvoří se pyridinmethylový radikál, který iniciuje RDD přenosem vodíku z řetězce na místo radikálu (obr. 1). Metoda byla využita pro studium modifikací v bakteriálních fosfoethanolaminech⁷.



Obr. 1. CID MS2 spektrum fosfatidylethanolaminu PE 4Me-16:0/4Me-16:0 derivatizovaného pomocí TPN (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl esterem 3-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) pikolinové kyseliny). Upraveno dle cit.⁷. Fragmentace C-C vazeb v alifatických řetězcích je vyvolaná radikálem po eliminaci skupiny TEMPO. Modrou a šedou barvou jsou označeny série diagnostických iontů ve spektru a místa štěpení alifatických řetězců lipidů

Radikálový prekurzor lze vytvořit také fotodisociací nekovalentních⁵ nebo kovalentních^{6,16} derivátů obsahujících aryl-jodovou vazbu. Po interakci těchto derivátů s fotony o vlnové délce 266 nm dochází k eliminaci jodu, a vzniklý fragment s lichým počtem elektronů dále fragmentuje mechanismem RDD. Příkladem nekovalentního derivátu je komplex fosfatidylcholinu s 4-jodo-benzoovou kyselinou⁵. Kovalentní deriváty mastných kyselin lze připravit například esterifikací s 4-jodobenzylalkoholem⁶. Fotodisociací sodných aduktů těchto derivátů vznikají ionty $[M + Na - I]^{+}$, které se dále štěpí za vzniku fragmentů určujících polohu methylového větvení. Derivace pomocí 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-ia (I-AMPP⁺) nabízí kromě možnosti strukturální analýzy alifatických řetězců také vyšší citlivost detekce¹⁶. Tato derivatizace byla využita například pro strukturální analýzu rozvětvených mastných kyselin v lipidech v novorozeneckém mázku¹⁶. Účinnost interakce s fotony závisí na chemické struktuře látek, proto je důležité vyvinout derivatizační činidla s vysokým výtěžkem fotodisociace. V rámci zkoumání vztahu mezi strukturou a aktivitou bylo připraveno činidlo NIBA (*N*-(2-aminoethyl)-4-jodobenzamid)¹². Deriváty mastných kyselin s NIBA dosahují vysoké účinnosti konverze (97 %), což umožňuje využití fotodisociace při 266 nm pro LC-MS analýzu mastných kyselin.

Polohu methylových větvení lze určit také s využitím fragmentací s odlehkým nábojem (CRF, charge remote fragmentation), které probíhají u iontů s pevně lokalizovaným nábojem. Tyto reakce byly zpočátku sledovány u rozvětvených mastných kyselin pomocí ionizace ostřelováním urychlenými atomy (FAB, fast atom bombardment) na magnetických sektorových analyzátoch s vysokoenergetickou CID (cit.^{17,18}). Dnes běžně dostupná nízkoenergetická CID také umožňuje u některých iontů vyvolat CRF. Například deriváty AMPP⁺ umožnily charakterizaci methylového větvení v bakteriálních lipidech^{13,14}. Dále byly využity bis-terpyridinové hořečnaté dikationy $[Mg(Terpy)_2]^{2+}$, a to i v metodě LC-MS² (cit.¹⁵). Alternativou k tomuto ligandu pro charakterizaci struktury mastných kyselin je $[Mg(ttb-Terpy)_2]^{2+}$, který naopak ztrátou methylového radikálu podporuje RDD fragmentaci¹⁰.

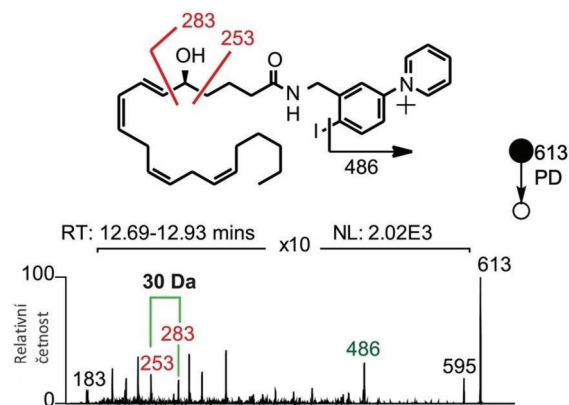
3. Funkční skupiny obsahující kyslík a karbocyklické sloučeniny

Kromě methylových skupin obsahují bioaktivní lipidy také různé funkční skupiny s kyslíkem a karbocyklické struktury. Oxylipiny jsou strukturálně různorodé molekuly s hydroxylovými, epoxidovými a dalšími funkčními skupinami obsahujícími kyslík, které hrají důležitou roli jako signální molekuly při zánětu a dalších biologických procesech^{19,20}. LC-MS je metodou první volby pro analýzu oxylinů v rozličných biologických maticích^{21–23}. Analytické postupy obvykle využívají ESI v negativním módu, přičemž nižší citlivost v tomto módu lze obejít derivatizací, např. zavedením perfluorobenzylové (PFB) skupiny^{24–27}. MS² spektra záporně nabitých oxylinových iontů jsou

strukturálně specifická a poskytují informace o poloze skupin obsahujících kyslík. V případě hydroxylové skupiny obvykle dochází k α -hydroxy štěpení ve vinylové a/nebo allylové poloze s přenosem protonu^{28–30}. Pro analýzu oxylinů v pozitivním módu byla použita široká škála derivátů^{31–35}, včetně derivátů *N*-(4-aminomethylfenyl)pyridinia (AMPP⁺)^{34,36,37}. Nedávno bylo demonstrováno využití derivatizace AMPP⁺ pro analýzu oxylinů v plazmě, séru a buňkách pomocí necílené lipidomiky³⁸. CID derivátů AMPP⁺ byla rovněž použita k charakterizaci polymetylovaných, hydroxyftyoceranových a ftyoceranových kyselin v bakteriálních sulfolipidech³⁷. Fotodisociace a RDD fragmentace vedou ke specifickému štěpení vazeb uhlík-uhlík sousedících s hydroxylovými skupinami, díky čemuž jsou užitečné pro identifikaci místa hydroxylace v hydroxymastných kyselinách (HFA)^{6,39,40}. LC-MS² využívající fotodisociaci při vlnové délce 266 nm umožňuje strukturální identifikaci 4-I-AMPP⁺ derivatizovaných eikosanoidů ze skupiny hydroxyeikosatetraenových kyselin (HETE) a hydroxyeikosapentaenových kyselin (HEPE)³⁴ (obr. 2).

HFA lze derivatizovat také 4-jodobenzoovou kyselinou. RDD spektrum získané následnou CID iontu $[M + Na - I]^{+}$ obsahuje dva produktové ionty, které charakterizují pozici hydroxyly na alifatickém řetězci⁶. Brodbelt a spol. použili UVPD (193 nm) spektra těchto derivátů ke studiu hydroxylace acylových řetězců bakteriálních glycerofosfolipidů⁴⁰ a ke strukturální charakterizaci lipopolysacharidů³⁹.

Další důležitou funkční skupinou je esterová vazba vzniklá esterifikací hydroxyskupiny v HFA karboxylovou kyselinou. Poloha esterové vazby se často označuje polohou větvení⁴¹ a lipidy obsahující tento strukturální motiv se nazývají estolidy. Estery hydroxymastných kyselin (FAHFA) jsou skupinou estolidů s důležitými biologickými vlastnostmi. Jsou to endogenní bioaktivní lipidy s anti-diabetickými a protizánětlivými vlastnostmi. Poloha este-



Obr. 2. Fotodisociační hmotnostní spektrum 4-I-AMPP⁺ derivátu 5-hydroxyeikosatetraenové kyseliny (5-HETE). Upraveno dle cit.³⁴. Fotodisociaci dochází k odštěpení jodu za vzniku radikálu, který vyvolá štěpení vazeb uhlík-uhlík sousedících s OH skupinou. Ionty určující polohu hydroxylové skupiny jsou ve schématu a ve spektru naznačeny červeně

rové vazby výrazně ovlivňuje jejich biologickou aktivitu. Ke strukturní charakterizaci FAHFA se většinou využívá CID záporně nabitých iontů vytvořených v ESI. Fragmentační MS² spektra obsahují deprotonované mastné a hydroxymastné kyseliny, a dále ionty odpovídající jejich dehydrataci^{42–49}. MS³ fragmentací iontu hydroxy mastné kyseliny nebo MS² fragmentací při vyšších energiích se ve spektrech objevují fragmentové ionty, které jsou specifické pro polohu hydroxylové skupiny v HFA^{43,45–47}. FAHFA odvozené od α -hydroxy mastné kyseliny poskytují v MS² spektrech⁴⁹ a MS³ spektrech⁴⁷ charakteristické fragmenty neutrálních ztrát (46 Da). Podobně jako u výše uvedených derivátů derivatizace karboxylové skupiny FAHFA pomocí činidel AMPP⁺ (cit.^{50,51}), 4-I-AMPP⁺ (cit.⁵¹), nebo dimethylaminoethylaminu (DMED)^{52,53} zvyšuje citlivost detekce a spektra těchto derivátů poskytují fragmenty k určení struktury. Kompletní charakterizace struktury FAHFA, včetně určení délky mastných kyselin, polohy dvojných vazeb a regioizomerie esterové vazby, lze provést fragmentací produktů vzniklých reakcí deprotonované FAHFA a trisfenantrolinového hořčnatého komplexu v plynné fázi⁵⁴. Tyto experimenty byly prováděny v modifikovaném hybridním hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem/lineárním iontovou pastí a se střídavě přepínanou polaritou napětí nanoelektrospreje. Úprava přístroje umožnila vstup dikationtů činidla i aniontů FAHFA do hmotnostního spektrometru a jejich reakci.

Cyklopropanové mastné kyseliny (CFA) vznikají *in situ* methylací dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin. CFA se často vyskytují v bakteriích, např. v *E. coli*⁵⁵. Charakterizace cyklopropylových skupin v alifatických řetězcích lipidů může být provedena s využitím UVPD-MS (cit.⁵⁶), RDD (cit.^{7,16}), nebo inverze náboje v plynné fázi⁵⁷. V UVPD spektrech můžeme pozorovat štěpení vazby uhlík-uhlík na obou stranách cyklopropanového kruhu. Dvojice fragmentů vzdálených od sebe 14 Da charakterizuje polohu cyklopropanového kruhu. UVPD-MS s vlnovou délkou 213 nm bylo použito k charakterizaci CFA a mykolových kyselin v bakteriálních extraktech⁵⁶. RDD derivátů I-AMPP⁺ vedla ke štěpení řetězce na obou stranách cyklopropanové části a poskytla charakteristickou mezeru 40 Da mezi fragmentovými ionty¹⁶. Lipidy derivatizované činidly obsahujícími TEMPO poskytovaly fragmenty odpovídající štěpení vazeb na obou stranách cyklopropanového kruhu⁷ podobně jako v UVPD-MS. K charakterizaci polohy cyklopropylu v kardiolipinech *E. coli* byly negativně nabitě prekurzorové ionty fragmentovány pomocí CID a vzniklé produkty pak reagovaly s trisfenantrolinovými dikationty hořčičku⁵⁷. CID takto vzniklého komplexu poskytla diagnostické fragmenty pro určení polohy cyklopropanového kruhu.

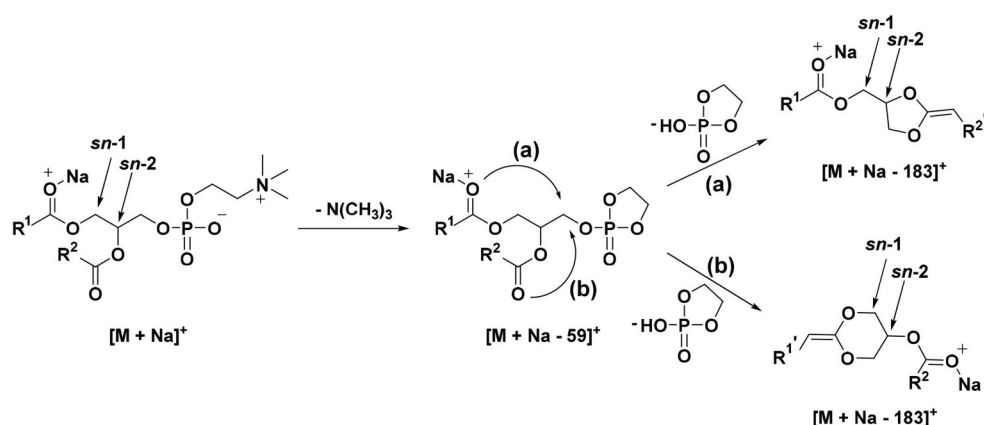
4. Stereospecifická poloha acylového řetězce na glycerolu

Glycerol sám o sobě není chirální, ale různé substituce na jeho hydroxyskupinách způsobují, že glycerolipidy

jsou chirální molekuly. Stereospecifický systém číslování definuje polohy substituentů jako *sn-1*, *sn-2* a *sn-3*. Analytické metody pro přiřazení polohy substituentů jsou důležité, protože poloha acylových skupin na glycerolu ovlivňuje biologické účinky glycerolipidů. Analýza může zahrnovat kroky, které umožňují separaci stereoizomerů, například stereoselektivní štěpení mastných acylů enzymy jako je fosfolipasa A2 (cit.⁵⁸) nebo separaci pomocí chromatografie či iontové mobility^{59–62}. Většina metod je omezena na rozlišení sekundární polohy od primární (*sn-2* vs. *sn-1/3*). Při fragmentaci v hmotnostním spektrometru je štěpení mastných kyselin z poloh *sn-1* a *sn-3* stejně výhodné, a pravděpodobnější než ztráta z polohy *sn-2*. K rozlišení substituentů *sn-2* od *sn-1/3* lze tedy využít relativní intenzity fragmentů⁶³. Například fosfatidylcholinové *sn*-izomery lze rozlišit a kvantifikovat porovnáním intenzit fragmentů pozorovaných v UVPD a CID spektrech dvojnásobně nabitých molekulových aduktů s kovy ([PC + Fe]²⁺)⁶⁴. Hsu a Turk podrobně zkoumali nízkoenergetické CID procesy vedoucí k regiospecifickým fragmentacím mastných kyselin v glycerofosfolipidech^{65–67}. Tandemová hmotnostní spektra deprotonovaných molekul a molekulových aduktů s různými alkalickými kovy poskytla podrobné strukturní informace včetně identifikace polární hlavy fosfolipidu, acylových substituentů a jejich *sn* pozic určených z relativních intenzit fragmentů. Aduky fosfolipidů s alkalickými kovy (např. Li⁺, Na⁺) poskytují intenzivní fragmenty odpovídající neutrální ztrátě polární hlavičky. U fosfatidylcholinů probíhá eliminace této skupiny přes meziproduct s pětičlenným kruhem, čímž vzniká fragment s 1,3-dioxolanovým kruhem spojeným s *sn-2* acylovým řetězcem nově vytvořenou dvojnou vazbou (obr. 3a). Alternativní cesta může vést k 1,3-dioxolanovým fragmentům (obr. 3b)⁶⁶, nicméně se ukazuje, že převážně vznikají 1,3-dioxolanové izomery⁶⁸. Struktura těchto fragmentů byla nedávno potvrzena pomocí kryogenní infračervené spektrometrie⁶⁹.

Využití relativních intenzit fragmentačních iontů pro přiřazení mastných kyselin k *sn* pozicím nemusí být vždy spolehlivé, protože intenzity iontů jsou ovlivněny strukturou mastných acylových řetězců a polární hlavičkou lipidu. Intenzity iontů ovlivňuje i typ přístroje a velikost kolizní energie. Proto se ve spektrech hledají unikátní fragmenty pro jednoznačnou identifikaci regioizomerů^{70–72}. Ionty s 1,3-dioxolanovým motivem jsou vhodným cílem pro další fragmentaci. Brodbelt a spoluautoři představili MS³ metodu, která využívá HCD v kombinaci s UVPD (193 nm) pro přiřazení *sn* pozic v glycerofosfolipidech⁷⁰. Produktový iont ztráty polární hlavičky lipidu vytvořený při HCD je aktivován UV fotony. Mastná kyselina v poloze *sn-1* poskytuje allylesterový fragment vznikající fotolytickým štěpením přes dioxolanovou část. Menší pík generovaný jiným fotolytickým štěpením určuje mastnou kyselinu v poloze *sn-2* (obr. 4). Metoda byla testována pro různé fosfolipidy a integrována do LC-MS³ analýzy⁷⁰.

Kombinace epoxidace pomocí m-CPBA ve spojení s LC-MS³ byla využita k určení polohy dvojných vazeb a *sn* pozice fosfolipidů⁷³. Dvojná vazba 1,3-dioxolanového

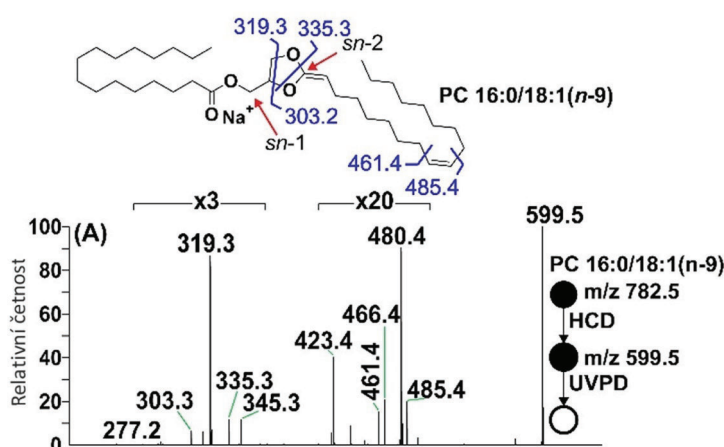


Obr. 3. Ztráta polární hlavičky fosfatidylcholinu z aduktu $[\text{PC} + \text{Na}]^+$ při nízkenergetické CID. Upraveno dle cit.⁶⁶. Eliminace cyklického ethylenfosfátu vede ke vzniku fragmentu s 1,3-dioxolanovým kruhem spojeným s *sn*-2 acylovým řetězcem nově vytvořenou dvojnou vazbou (a). Alternativní cesta může vést k 1,3-dioxanovým fragmentům (b)

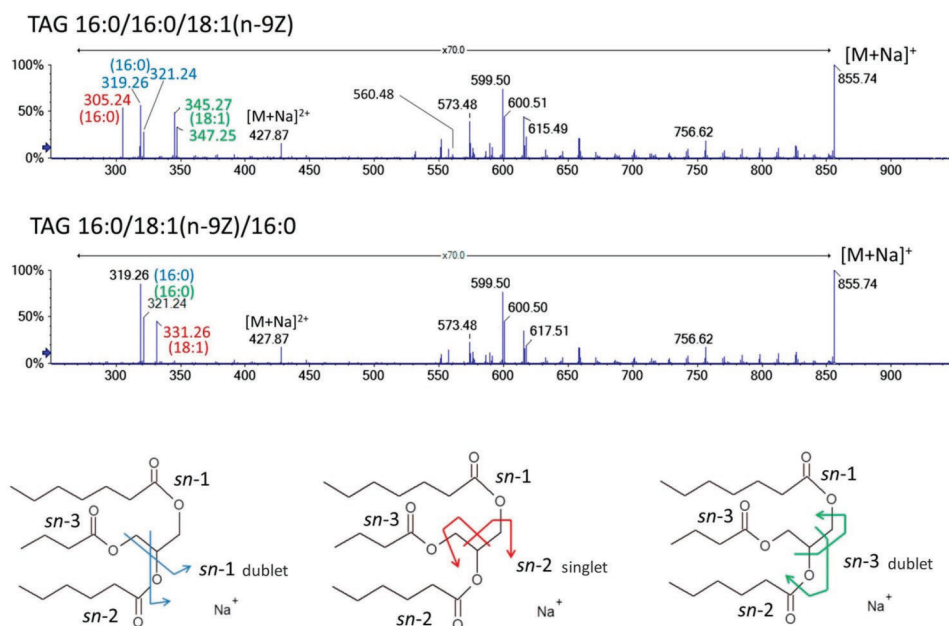
fragmentu může reagovat s ozonem, čehož lze využít jako dalšího způsobu identifikace *sn* izomerů. Tento způsob určení *sn* poloh byl aplikovaný na sodné adukty aduktů fosfolipidů v hmotnostním spektrometru s lineární iontovou pastí⁷¹. 1,3-dioxolanový fragment z CID byl následně podroben disociaci vyvolané ozonem (OzID, ozone-induced dissociation). Aktivace 1,3-dioxolanových fragmentů z lipidů derivatizovaných Paternò-Büchiho činidlem (PB) také umožňuje přiřazení mastných kyselin k *sn* pozicím⁷². Ma a spolupracovníci použili 2-acetylpyridin (2-AP) jako PB činidlo pro nenasycené glycerofosfolipidy. Výhodou 2-AP je jeho vysoká afinita k sodíku. Aktivace 1,3-dioxolanového fragmentu 2-AP derivátu poskytuje fragmenty, které charakterizují *sn* pozice mastných kyselin na glycerolu a polohy dvojných vazeb v ře-

tězcích. Tuto metodu lze snadno implementovat do lipidomické analýzy⁷².

Pro regiospecifickou analýzu mastných acylů ve fosfatidylcholinech může být dostačující MS², pokud jsou fragmentovány adukty s hydrogenuhlíkatým aniontem⁷⁴. Jejich fragmentace iniciovaná ztrátami H₂CO₃ a *N,N*-dimethylaminomethylového radikálu pokračuje eliminací mastné kyseliny z polohy *sn*-2. Vzniklý fragmentový iont obsahuje acyl z polohy *sn*-1, čímž se jednoznačně identifikují *sn* izomery. Tuto metodu lze snadno implementovat do LC-MS analýzy, pokud se do mobilní fáze přidá hydrogenuhlíkatý amonny⁷⁴. V navazující práci bylo zjištěno, že při fragmentaci dochází také ke vzniku iontů, které mají potenciál pro zjištění polohy dvojných vazeb a methylového větvení. V kombinaci s LC-MS analý-



Obr. 4. HCD/UVPD MS³ spektrum sodného aduktu fosfatidylcholinu PC 16:0/18:1 (*n*-9). Upraveno dle cit.⁷⁰. Produktový iont, který vznikl při HCD ztrátou polární hlavičky lipidu, je dále aktivován UV fotony. Mastná kyselina v poloze *sn*-1 poskytuje allylesterový fragment fotolytickým štěpením přes dioxolanovou část. Menší pík z jiného fotolytického štěpení identifikuje mastnou kyselinu v poloze *sn*-2



Obr. 5. EID MS² spektra sodíkových aduktů triacylglycerolových regioizomerů TG 16:0/16:0/18:1 (n-9Z), TG 16:0/18:1 (n-9Z)/16:0. Upraveno dle cit.⁷⁸. Spektra poskytují dvě odlišné skupiny píků, singlety a dublety lišící se o 2 Da. Singletový pík identifikuje acylový řetězec v poloze *sn*-2 (označeno červeně), dubletové píky charakterizují acylové řetězce v polohách *sn*-1 a *sn*-3 (označeno modře a zeleně)

zou byla tato metoda použita pro charakterizaci lysosfatidylcholinů v lidské plazmě⁹.

Při disociaci indukované elektrony (EID, electron-induced dissociation) interagují ionty lipidů se svazkem elektronů, přičemž vznikají diagnostické fragmenty (viz kapitola 4 části II článku Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie⁷⁵). Spektra EID poskytují téměř úplnou strukturní charakterizaci lipidů, jak bylo prokázáno u fosfatidylcholinů⁷⁶, sfingomyelinů⁷⁷ a triacylglycerolů⁷⁸. Fragmenty glycerolipidů vznikající v místech štěpení glycerolové části charakterizují regioizomery. Například EID spektra triacylglycerolů poskytují dvě odlišné skupiny píků, singlety a dublety lišící se o 2 Da. Zatímco singletový pík identifikuje acylový řetězec v poloze *sn*-2, dubletové píky charakterizují acylové řetězce v polohách *sn*-1 a *sn*-3 (obr. 5).

5. Závěr

V tomto přehledovém článku jsme se zaměřili na nové metody pro podrobnou analýzu struktury lipidů se zvláštním důrazem na charakterizaci větvení, vybraných funkčních skupin a stereoizomerie na glycerolu. Pokročilé analytické postupy, jako jsou nové fragmentační techniky a nové derivatizační postupy ve spojení s tandemovou a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií nabízejí nové možnosti strukturní analýzy. Některé metody lze využít pro charakterizaci různých strukturních motivů

v alifatických řetězcích lipidů, například pro charakterizaci větvení i poloh násobných vazeb ze stejného hmotnostního spektra.

Další rozvoj strukturní analýzy lipidů bude nepochybně spjat s technologickými pokroky v hmotnostní spektrometrii. Lze očekávat nejen vyšší rozlišení a citlivost hmotnostních spektrometrů, ale i širší využití nových aktivačních metod, jako jsou EID a UVPD. Častější integrace iontové mobility umožní separaci lipidů na základě jejich tvaru před hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Nové způsoby derivatizace lipidů zvýší účinnost ionizace a pomohou získat podrobnější informace o jejich struktuře. Všechny tyto inovace výrazně zlepší analýzu lipidů ve složitých biologických vzorcích, což pomůže k lepšímu pochopení jejich biologických funkcí. Nové přístupy mohou vést k důležitým objevům v oblasti biologie lipidů, například k lepšímu pochopení nemocí spojených s lipidovým metabolismem a k vývoji nových terapií.

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

LITERATURA

1. Ran-Ressler R. R., Devapatla S., Lawrence P., Brenna J. T.: *Pediatr. Res.* 64, 605 (2008).
2. Oku H., Nakanishi T., Kumamoto K., Chinen I.:

- Comp. Biochem. Physiol. B 96, 475 (1990).
- Zhang W., Jian R., Zhao J., Liu Y., Xia Y.: J. Lipid Res. 63, 100219 (2022).
 - Ran-Ressler R. R., Lawrence P., Brenna J. T.: J. Lipid Res. 53, 195 (2012).
 - Pham H. T., Ly T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Anal. Chem. 84, 7525 (2012).
 - Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 27, 805 (2013).
 - Lin Q., Li P., Jian R., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 33, 714 (2022).
 - Jian R., Zhao X., Lin Q., Xia Y.: Analyst 147, 2115 (2022).
 - Zhao X., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 32, 560 (2021).
 - Nsiah S. T., Fabijanczuk K. C., McLuckey S. A.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 38, e9741 (2024).
 - Zhao J., Qiao L., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 34, 2394 (2023).
 - Narreddula V. R., McKinnon B. I., Marlton S. J. P., Marshall D. L., Boase N. R. B., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Analyst 146, 156 (2021).
 - Tatituri R. V. V., Wolf B. J., Brenner M. B., Turk J., Hsu F. F.: Anal. Bioanal. Chem. 407, 2519 (2015).
 - Flentie K. N., Stallings C. L., Turk J., Minnaard A. J., Hsu F. F.: J. Lipid Res. 57, 142 (2016).
 - Randolph C. E., Beveridge C. H., Iyer S., Blanksby S. J., McLuckey S. A., Chopra G.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 33, 2156 (2022).
 - Narreddula V. R., Boase N. R., Ailuri R., Marshall D. L., Poad B. L. J., Kelso M. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Anal. Chem. 91, 9901 (2019).
 - Jensen N. J., Gross M. L.: Lipids 21, 362 (1986).
 - Contado M. J., Adams J.: Anal. Chim. Acta 246, 187 (1991).
 - Funk C. D.: Science 294, 1871 (2001).
 - Berglund L.: Am. J. Clin. Nutr. 78, 353 (2003).
 - Gladine C., Ostermann A. I., Newman J. W., Schebb N. H.: Free Radicals Biol. Med. 144, 72 (2019).
 - Thakare R. a 10 spoluautorů: Biomed. Chromatogr. 32, 4102 (2018).
 - Puppulo M., Varma D., Jansen S. A.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 964, 50 (2014).
 - Mesaros C., Blair I. A.: Metabolites 2, 337 (2012).
 - Murphy R. C., Barkley R. M., Zemski Berry K., Hankin J., Harrison K., Johnson C., Krank J., McAnoy A., Uhlson C., Zarini S.: Anal. Biochem. 346, 1 (2005).
 - Yang J., Schmelzer K., Georgi K., Hammock B. D.: Anal. Chem. 81, 8085 (2009).
 - Chocholoušková M., Jirásko R., Vrána D., Gatěk J., Melichar B., Holčapek M.: Anal. Bioanal. Chem. 411, 1239 (2019).
 - Lee S. H., Williams M. V., DuBois R. N., Blair I. A.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 2168 (2003).
 - Di Giovanni J. P., Barkley R. M., Jones D. N. M., Hankin J. A., Murphy R. C.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 29, 1231 (2018).
 - Yuan Z. X., Majchrzak-Hong S., Keyes G. S., Iadarola M. J., Mannes A. J., Ramsden C. E.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 6009 (2018).
 - Bollinger J. G., Thompson W., Lai Y., Oslund R. C., Hallstrand T. S., Sadilek M., Turecek F., Gelb M. H.: Anal. Chem. 82, 6790 (2010).
 - Sun D., Meng X., Ren T., Fawcett J. P., Wang H., Gu J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 29, 1365 (2018).
 - Liu X., Moon S. H., Mancuso D. J., Jenkins C. M., Guan S., Sims H. F., Gross R. W.: Anal. Biochem. 442, 40 (2013).
 - Narreddula V. R., Sadowski P., Boase N. R. B., Marshall D. L., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 34, (2020).
 - Bollinger J. G., Naika G. S., Sadilek M., Gelb M. H.: J. Lipid Res. 54, 3523 (2013).
 - Meckelmann S. W., Hellhake S., Steuck M., Krohn M., Schebb N. H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 130, 8 (2017).
 - Hsu F. F.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 27, 622 (2016).
 - Hellhake S., Meckelmann S. W., Empl M. T., Rentmeister K., Wissdorf W., Steinberg P., Schmitz O. J., Benter T., Schebb N. H.: Anal. Bioanal. Chem. 412, 5743 (2020).
 - Madsen J. A., Cullen T. W., Trent M. S., Brodbelt J. S.: Anal. Chem. 83, 5107 (2011).
 - Blevins M. S., James V. K., Herrera C. M., Purcell A. B., Trent M. S., Brodbelt J. S.: Anal. Chem. 92, 9146 (2020).
 - Brejchova K., Balas L., Paluchova V., Brezinova M., Durand T., Kuda O.: Prog. Lipid Res. 79, 101053 (2020).
 - Butovich I. A., Wojtowicz J. C., Molai M.: J. Lipid Res. 50, 2471 (2009).
 - Kuda O. a 11 spoluautorů: Diabetes 65, 2580 (2016).
 - Kolar M. J., Nelson A. T., Chang T., Ertunc M. E., Christy M. P., Ohlsson L., Harrod M., Kahn B. B., Siegel D., Saghatelian A.: Anal. Chem. 90, 5358 (2018).
 - Ma Y., Kind T., Vaniya A., Gennity I., Fahrman J. F., Fiehn O.: J. Cheminform. 7, 53 (2015).
 - Marshall D. L., Saville J. T., Maccarone A. T., Ailuri R., Kelso M. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 30, 2351 (2016).
 - Gowda S. G. B., Liang C., Gowda D., Hou F., Kawakami K., Fukiya S., Yokota A., Chiba H., Hui S. P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 34, e8831 (2020).
 - Hu T., Lin M., Zhang D., Li M., Zhang J.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 7415 (2018).
 - Vavrušová A., Vrkoslav V., Plavka R., Bosáková Z., Cvačka J.: Anal. Bioanal. Chem. 412, 2291 (2020).
 - Hu C., Wang M., Duan Q., Han X.: Anal. Chim. Acta. 1105, 105 (2020).
 - Hancock S. E. a 12 spoluautorů: J. Lipid. Res. 59, 1510 (2018).

52. Zhu Q. F., Yan J. W., Gao Y., Zhang J. W., Yuan B. F., Feng Y. Q.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1061, 34 (2017).
53. Zhu Q. F., Yan J. W., Zhang T. Y., Xiao H. M., Feng Y. Q.: *Anal. Chem.* 90, 10056 (2018).
54. Randolph C. E., Marshall D. L., Blanksby S. J., McLuckey S. A.: *Anal. Chim. Acta* 31, 1129 (2020).
55. Jiang X., Duan Y., Zhou B., Guo Q., Wang H., Hang X., Zeng L., Jia J., Bi H.: *J. Bacteriol.* 201, 374 (2019).
56. Blevins M. S., Klein D. R., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* 91, 6820 (2019).
57. Randolph C. E., Shenault D. S. M., Blanksby S. J., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 455 (2021).
58. Mouchlis V. D., Chen Y., McCammon J. A., Dennis E. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 140, 3285 (2018).
59. Kawana H., Kano K., Shindou H., Inoue A., Shimizu T., Aoki J.: *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids* 1864, 1053 (2019).
60. Groessl M., Graf S., Knochenmuss R.: *Analyst* 140, 6904 (2015).
61. Bowman A. P., Abzalimov R. R., Shvartsburg A. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1552 (2017).
62. Maccarone A. T., Duldig J., Mitchell T. W., Blanksby S. J., Duchoslav E., Campbell J. L.: *J. Lipid Res.* 55, 1668 (2014).
63. Laakso P.: *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 104, 43 (2002).
64. Becher S., Esch P., Heiles S.: *Anal. Chem.* 90, 11486 (2018).
65. Hsu F. F., Turk J.: *J. Mass Spectrom.* 35, 596 (2000).
66. Hsu F. F., Turk J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 352 (2003).
67. Hsu F. F., Turk J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1510 (2005).
68. Becher S., Berden G., Martens J., Oomens J., Heiles S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 2874 (2021).
69. Kirschbaum C., Greis K., Polewski L., Gewinner S., Schöllkopf W., Meijer G., von Helden G., Pagel K.: *J. Am. Chem. Soc.* 143, 14827 (2021).
70. Williams P. E., Klein D. R., Greer S. M., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 139, 15681 (2017).
71. Pham H. T., Maccarone A. T., Thomas M. C., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* 139, 204 (2014).
72. Ma X. X., Zhang W. P., Li Z. S., Xia Y., Ouyang Z.: *Accounts Chem. Res.* 54, 3873 (2021).
73. Cao W., Tan J.: *Chinese J. Anal. Chem.* 51, 100290 (2023).
74. Zhao X., Zhang W., Zhang D., Liu X., Cao W., Chen Q., Ouyang Z., Xia Y.: *Chem. Sci. J.* 10, 10740 (2019).
75. Strnad Š., Vrkoslav V., Cvačka J.: *Chem. listy* 117, 747 (2023).
76. Campbell J. L., Baba T.: *Anal. Chem.* 87, 5837 (2015).
77. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 858 (2016).
78. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 2015 (2016).

Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Locations of Functional Groups in the Aliphatic Chains of Lipids and the Arrangement of Aliphatic Chains within Acyl-glycerolipids by the Methods of Mass Spectrometry**

Lipids play key roles in many biological processes. Most lipids contain long aliphatic chains whose variable structure contributes to diverse physicochemical properties and biological functions of these molecules. The aliphatic chains of lipids can be straight or branched, with double or triple bonds, or with various functional groups. In recent years, mass spectrometry has made significant progress in the structural analysis of lipids. New methods are based on unconventional fragmentation techniques and new derivatization reactions. They can be used to determine the detailed structure of aliphatic chains, including the position of multiple bonds, functional groups, and the arrangement of aliphatic chains in complex lipids. This review article is a follow-up to two previous articles that dealt with the determination of double bond positions (*Chem. Listy* 117, 684 (2023), *Chem. Listy* 117, 747 (2023)). Here, we focus on determining the position of methyl branching, oxygen-containing functional groups, carbocyclic structures, and the stereospecific position of the acyl chain on glycerol.

Keywords: carbocyclic compounds, fragmentation, functional groups, lipids, methyl branching, *sn*-positions, structural analysis

Acknowledgment

This work was supported by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.



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

UNIVERZÁLNÍ SYSTÉM REFERENČNÍ ELEKTRODY PRO NEIDEÁLNÍ MÉDIA

Tento příspěvek je věnován k 75. narozeninám profesora Jiřího Barka.

JIŘÍ JANATA^a, VLASTIMIL DORČÁK^b, JAN HRBÁČ^c a JAN VACEK^b

^a School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332, USA, ^b Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Česká republika, ^c Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika jj94@gatech.edu

Došlo 14.8.24, přijato 15.9.24.

Hodnoty potenciálů se v elektrochemických experimentech vztahují k potenciálu standardní vodíkové elektrody. Tyto experimenty jsou realizovány ve vodném „ideálním“ prostředí. V mnohých případech se však elektrochemická měření provádí v tzv. „neideálním“ prostředí, které obsahuje i podíl dalších rozpouštědel. Uvedené nutně vede k použití kapalinového spoje mezi ideálními a neideálními roztoky nebo aplikaci tzv. pseudoreferenční elektrody. Výsledný nedefinovaný a nereprodukovatelný kapalinový potenciál lze eliminovat pomocí zde představené *univerzální referenční elektrody* (URE). Náš koncept je založený na kombinaci dvou elektrod: kalibrační voltametrické metalocenové elektrody a potenciometrické polyanilinové URE. Tento koncept nenahrazuje standardní vodíkovou elektrodu. Jde pouze o eliminaci kapalinového potenciálu při práci v neideálním prostředí.

Klíčová slova: kapalinový potenciál, metalocen, polyanilin, standardní vodíková elektroda

Obsah

1. Úvod
2. Součásti univerzálního systému pro měření potenciálů v neideálním prostředí
 - 2.1. Univerzální referenční elektroda
 - 2.2. Metalocenová elektroda
 - 2.3. Postup eliminace kapalinového potenciálu pomocí univerzální referenční elektrody
3. Diskuse
4. Závěry

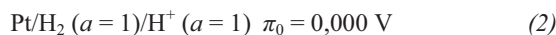
1. Úvod

V elektrochemickém experimentu je elektrolyt obvykle založený na vodném roztoku (A), organickém rozpouštědle (B) nebo speciálním molekulárním rozpouštědle o vysoké hustotě, jako jsou např. iontové kapaliny (C). Tyto tři základní verze elektrolytů lze znázornit jako tři vrcholy trojúhelníku (obr. 1). Skutečné podmínky jakéhokoliv elektrochemického experimentu (bod X) jsou pak libovolnou kombinací koncentrací *a*, *b*, *c* těchto tří čistých médií. Tento zdánlivě triviální popis se zkomplikuje, když je potřeba standardní potenciál libovolného elektrochemického procesu v nevodném „neideálním“ médiu (NIM)

vztáhnout na standardní vodíkovou stupnici. Vodíková stupnice je založena na jednoduché Faradayické reakci:



kteřá probíhá ve vodném prostředí, viz vrchol A na obr. 1. V praxi se reakce 1 realizuje pomocí *standardní vodíkové elektrody* (NHE, z angl. Normal Hydrogen Electrode), která je vyrobena z platinovou černí pokryté platiny ponořené do kyseliny o aktivitě vodíkových iontů $a_{\text{H}^+} = 1$, pod tlakem 101,3 kPa H_2 .

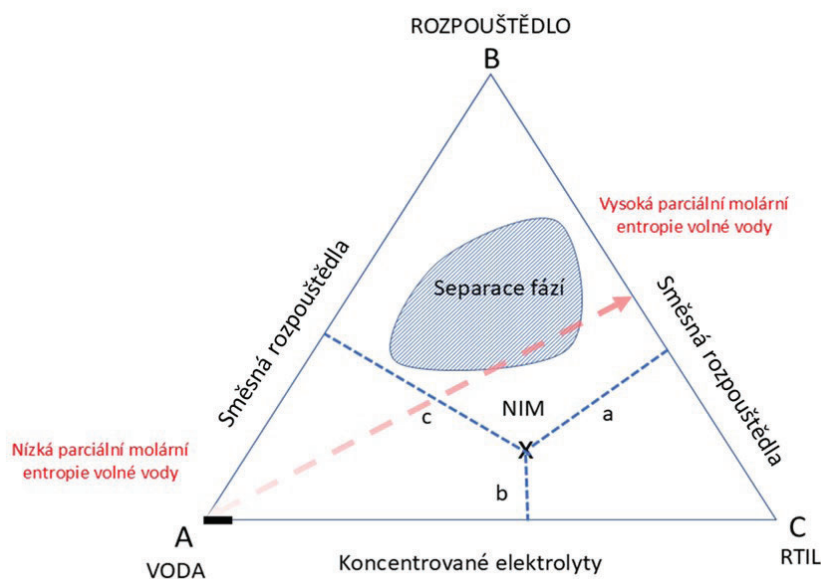


Standardnímu potenciálu této elektrody byla definicí přiřazena nulová hodnota¹. Proto je nutně každý elektrochemický experiment $X_{a,b,c}$ prováděný v *neideálním* prostředí vztažen k vodíkové stupnici, která je ovšem definována ve vodném *ideálním* prostředí.

Každý elektrochemický experiment vyžaduje minimálně dvě elektrody, protože potenciál jedné elektrody není experimentálně dostupný. Měřit lze pouze rozdíl potenciálů dvou elektrod, tedy *napětí článku* E_{cell} :

$$E_{\text{cell}} (\text{V}) = \pi_{\text{W}} - \pi_{\text{ref}} \quad (3)$$

Referenční elektroda je při tomto měření konstruována tak, aby její potenciál (π_{ref}) byl stabilní a reprodukovatelný (π_{W} – potenciál pracovní elektrody). Taková elektroda se



Obr. 1. **Elektrochemie v ideálním a neideálním prostředí.** Ideálním prostředím je voda se zředěnou solí (černý pruh v bodě A). Jakýkoli jiný bod uvnitř trojúhelníku je třeba považovat za „neideální“ prostředí (NIM). Taktéž je zobrazeno (modře šrafované) rozdělení fází. Entropie volné vody (přerušovaná červená šipka) se zvyšuje od bodu A k úsečce BC. RTIL: iontová kapalina, z angl. Room Temperature Ionic Liquid

nazývá *sekundární referenční elektroda*. Její potenciál π_{ref} je vždy vztažen k NHE. Příkladem takových sekundárních referenčních elektrod jsou vodné argenchloridové nebo kalomelové elektrody. Jejich potenciál je definován aktivitou chloridového iontu ve vodném *vnitřním* prostoru referenční elektrody. Vodivé spojení mezi tímto vnitřním prostorem a prostorem, kde se nachází pracovní elektroda, je zprostředkováno *iontově vodivým kapalinovým spojením*, který přináší vlastní *kapalinový potenciál* π_{LJ} (angl. Liquid Junction Potential). Kapalinové rozhraní je tedy iontově vodivá fyzikální bariéra, která odděluje *vnitřní* prostor referenční elektrody od *vnějšího pracovního* prostoru, kde se provádí vlastní elektrochemický experiment. Pokud jsou média ve vnějším a vnitřním prostoru identická, je kapalinový potenciál rovný nule. Při nulovém proudu a konstantní teplotě a tlaku je takový systém v termodynamické rovnováze. Ve skutečnosti tomu tak ale není, protože roztoky ve vnitřním a pracovním prostoru téměř nikdy nejsou identické. V běžné praxi se média v obou výše popsaných prostorech liší, ale přesto spolu elektricky komunikují prostřednictvím kapalinového spoje. Proto se chemický potenciál ($\mu_i = (\partial G/\partial n_i)_{j,T}$) všech chemických entit v obou prostorech má tendenci vyrovnávat. Tato podmínka platí jak pro iontové, tak pro elektricky neutrální systémy. Pokud nejsou média identická, vede kapalinový spoj vždy ke vzniku nedefinovaného a proměnného π_{LJ} .

Voda hraje dominantní roli pro řadu elektrochemických experimentů, od bioelektrochemie přes vývoj baterií až po organickou elektrosyntézu. Ve vodě je pouze malá či nepatrná část molekul přítomna ve volné molekulární formě. Zbytek interaguje prostřednictvím vodíkových vazeb a vytváří tak do jisté míry organizovanou strukturu. Přesto

jsou to právě volné molekuly vody, které dominují v interakci (solvataci) s ostatními rozpuštěnými komponentami. Částice H_2 a H^+ v rovnici 1 se tedy ve vodě nevyskytují. Vždy interagují s jinými molekulami vody, tedy jsou solvatovány. Pokud je přítomna jiná mísitelná složka, dochází ke *smíšené (multikomponentní) solvataci*. Při provádění a porovnávání elektrochemického experimentu v různých prostředích je proto třeba zahrnout solvatační energie jednotlivých chemických entit do celkové energetické bilance systému. Protože NHE (rovnice 2) je definována v ideálním vodném prostředí, musí být z hlediska interpretace naměřených potenciálů vzata v úvahu solvatační energie pro jakýkoli bod X mimo vrchol A, který je vyznačen v trojúhelníku na obr. 1. Vycházíme zde z *volné energie přenosu* mezi ideálním a neideálním prostředím pro všechny rozpuštěné částice. Čím dále je tedy vzdálen bod X od bodu A v jakémkoli směru, tím vyšší je entropie systému. Organizace vody v jakémkoli prostředí, tj. entropie volné vody, je tedy jedním z klíčových termodynamických parametrů v elektrochemickém experimentu. Na obr. 1 je znázorněna entropie vody jako červená šipka. Nejnižší entropie volné vody je v čistě vodném roztoku a nejvyšší v prostředí obsahujícím nízký podíl vody (viz úsečka BC v obr. 1).

Použití konvenční vodné sekundární referenční elektrody v NIM vždy vede k vytvoření nedefinovaného a nereprodukovatelného π_{LJ} . V tomto článku představujeme referenční elektrodu, ve které je π_{LJ} v NIM eliminován, a také systém její kalibrace. Experimenty se provádějí pomocí tří elektrod: univerzální referenční elektrody (URE), metalocenové elektrody (PtMc) a sekundární referenční elektrody, jako je např. argenchloridová nebo kalo-

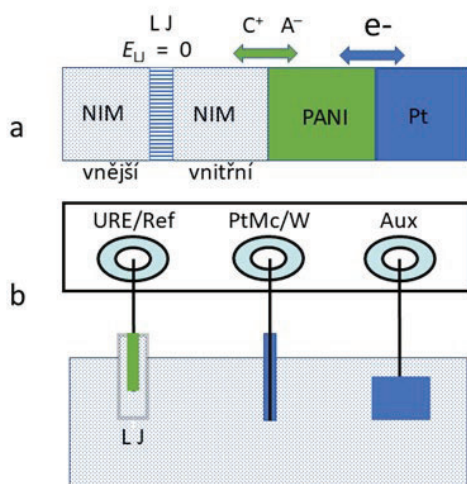
melová elektroda, pomocí které vztahujeme potenciály v NIM ke stupnici vodíkové elektrody. Vycházíme z předpokladu, že solvatační energie metalocenové elektrody jsou ve všech NIM konstantní. Tento předpoklad vychází z netermodynamických úvah². URE systém pro NIM tedy spojuje URE s NHE, ale nenahrazuje ji. Pouze eliminuje nedefinovaný π_{LJ} .

2. Součásti univerzálního systému pro měření potenciálů v neideálním prostředí

Eliminace nežádoucího π_{LJ} v jakémkoli NIM se provádí v běžném tříelektrodovém voltametrickém experimentu (obr. 2), který se skládá z URE, pracovní PtMc elektrody a pomocné elektrody (Aux). Kapalinové rozhraní je iontově vodivá fyzikální bariéra mezi vnitřním prostorem URE a prostorem pracovní elektrody. Tyto dva prostory musí obsahovat identické médium. Účelem kapalinového spoje (můstku) je zabránit pronikání elektroaktivních látek (depolarizátorů) z pracovního prostoru do vnitřního prostoru URE.

2.1. Univerzální referenční elektroda

URE musí splňovat následující požadavky. Její konstrukce musí být reprodukovatelná a musí být vhodná pro jakékoli médium znázorněné v trojúhelníku na obr. 1. Musí být stabilní po předpokládanou dobu trvání experimentu, obvykle po dobu 24 hodin. Detailní popis URE pro měření v NIM a její umístění v elektrochemické cele jsou



Obr. 2. (a) Schéma univerzální referenční elektrody; (b) voltametrická cela pro elektrochemii v neideálním prostředí. Metalocenová elektroda (PtMc) je připojena ke svorce pracovní elektrody (W) pro kalibraci URE. Při vlastním elektrochemickém experimentu je URE nahrazena pracovní elektrodou a je připojena ke vstupu referenční elektrody (Ref); pomocná elektroda je zde označena jako Aux. LJ: kapalinový spoj, z angl. Liquid Junction, PANI: polyanilin

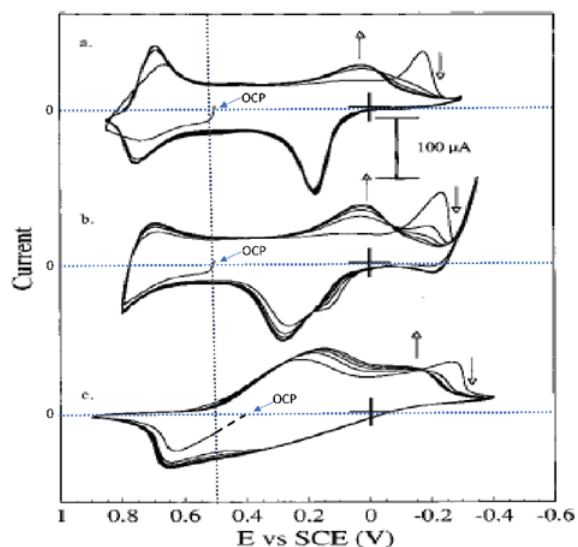
znázorněny na obr. 2. Systém se skládá z vnitřní elektrody, vnitřního NIM a kapalinového spoje, který fyzicky odděluje vnitřní a vnější pracovní prostor. Depolarizátor je v pracovním prostoru vždy přítomen v koncentraci mnohem nižší než jakýkoli jiný elektrolyt, obvykle $< 1 \cdot 10^{-4}$ M, a proto lze jeho vliv na π_{LJ} zanedbat. Protože média na obou stranách tohoto přechodu jsou identická, platí $\pi_{LJ} = 0$ V. Eliminace π_{LJ} z měřeného napětí článku platí pro libovolné NIM a libovolný kapalinový spoj. Skutečná konstrukce a materiály použité pro kapalinový spoj nejsou rozhodující. Lze použít skleněnou fritu, azbestová vlákna, teflonovou kapiláru atd. Ani impedance na rozhraní kapalin není rozhodující, protože elektroda je připojena k vysokoimpedančnímu vstupu potenciostatu.

Vnitřní elektroda URE je Pt elektroda potažená tenkou vrstvou vodivého polymeru, např. polyanilinu (PANI)³. Účelem této vrstvy je sloužit jako elektronový/iontový vodič. Tento vodič umožňuje čistě elektronovou komunikaci mezi vodivým polymerem a platinou a iontovou výměnu mezi polymerem a elektrolytem ve vnitřním prostoru elektrody. Jinými slovy, vnitřní elektroda je *elektronově vodivý iontoměnič*. Při absenci elektronicky aktivních částic ve vnitřním prostoru je mezifázový potenciál mezi PANI a NIM určen pouze iontovou výměnou na rozhraní polymer/médium. V zásadě lze použít i jiný stabilní konjugovaný vodivý polymer, např. i polypyrrol, polythiofen atd.

Rozhraní polymer/kov je ohmické, což znamená, že náboj přenáší elektrony. V důsledku toho vzniká na rozhraní PANI/Pt *kontaktní potenciál*, který se v celkovém naměřeném napětí článku anulují. Za těchto podmínek při nulovém proudu je PANI stabilní. Nanášení PANI na Pt lze provést z vhodného roztoku (angl. Solvent Casting)⁴ nebo elektrochemickou syntézou při konstantním potenciálu⁵. Elektrochemické vlastnosti PANI jsou závislé na zvoleném prostředí, což je dokumentováno na cyklických voltamogramech na obr. 3. V silných kyselinách je elektrochemická transformace při $\sim 0,7$ V doprovázena výměnou aniontů, zatímco přeměna při $\sim 0,2$ V je spojena s výměnou protonů (obr. 3). *Potenciál otevřeného obvodu*, $\pi_{OCP} = \pi_{URE}$ (obr. 3, šipky), je potenciál rozhraní PANI/elektrolyt při nulovém proudu ($J = 0$). Protože se iontové výměny mezi PANI a prostředím volně účastní více iontů, je π_{OCP} z definice *smíšený potenciál*. Ten je určen velikostí jednotlivých dílčích výměnných proudových hustot, j_i , všech iontů procházejících rozhraním PANI/elektrolyt při nulovém proudu:

$$J = \sum_i j_i = 0 \quad (4)$$

Smíšenému potenciálu dominuje ion s nejvyšší výměnnou proudovou hustotou. Nazývá se primární ion, jehož aktivita je a_{\pm} . Ostatní ionty, které přispívají menší výměnou proudovou hustotou, jsou sekundární ionty a jsou obvykle přítomny s nižšími aktivitami a_j . U iontově selektivních elektrod je dominance primárního iontu mírou selektivity primárního iontu vůči sekundárním iontům.



Obr. 3. Cyklické voltamogramy PANI naneseného na Pt elektrodě v prostředí mravenčí kyseliny: Měřeno v prostředí 2 M (a) HBF_4 , (b) H_2SO_4 a (c) CH_3COOH . Šipkami je vyznačen potenciál otevřeného obvodu (OCP, z angl. Open Circuit Potential). Pík při $-0,3$ V při prvním CV záznamu a isosbestický bod při $-0,2$ V jsou charakteristické pro výměnu rozpouštědla v panelech a, b, c. Převzato a upraveno z cit.⁴

Při potenciometrickém měření tento stav popisuje Nikolského-Eisenmannova rovnice:

$$\pi_{\text{URE}} = \frac{2,3RT}{z_x F} \log \left(a_x + \sum_{ji} K_{x,j} a_j^{z_x/z_j} \right) \quad (5)$$

Potenciál univerzální referenční elektrody je π_{URE} . Primární (a_x) a sekundární (a_j) ionty mají náboje z_x , resp. z_j . Tímto rozhraním volně prochází více iontů (rovnice 4), přičemž proudová hustota výměny jednotlivých nábojů (j_i) je větší než $1 \cdot 10^{-3}$ A cm^{-2} . Konstanta $K_{x,j}$ je koeficient selektivity, který normalizuje výměnný proud primárních a sekundárních iontů⁶. Z průběhu voltamogramů na obr. 3 vyplývá, že celková výměna iontů doprovázející elektrochemické reakce je rychlá, což naznačuje, že toto rozhraní je nepolarizovatelné. Dle našich znalostí toto platí pro PANI v širokém spektru různých elektrolytů. Souhrnně lze říci, že π_{URE} PANI/NIM je stabilní, ale jeho hodnota se v různých prostředích liší. Proto je třeba URE kalibrovat vůči konstantnímu potenciálu metalocenové elektrody.

2.2. Metalocenová elektroda

Vliv rozpouštědel na elektrochemické chování různých metalocenů (Mc) byl v minulosti podrobně studován⁷. Metaloceny byly navrženy a schváleny IUPAC jako univerzální standard pro určení volné energie u přenosových dějů. Ferrocen a kobaltocen byly použity jako standard pro elektrochemickou definici Hammettovy funkce

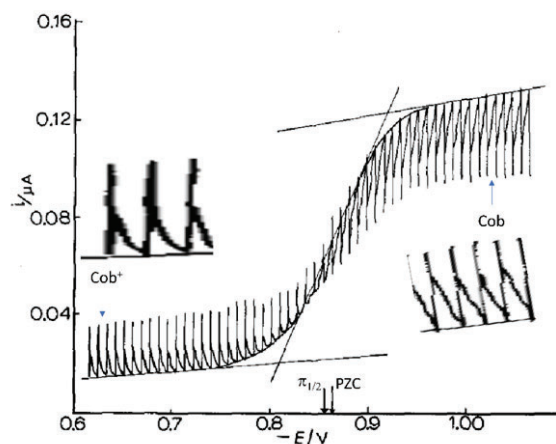
kyselosti^{8–10}. Při těchto měřeních byly polarogramy rozpuštěných metalocenů zaznamenány na kapající rtuťové elektrodě. Experimenty byly zatíženy adsorpcí Mc na povrchu rtuťi (obr. 4).

V případě NIM se také pravděpodobně mění Stokesův poloměr Mc a Mc^+ , což způsobuje chybu při určování $E_{1/2}$ z voltametrických měření. Aby se zabránilo těmto nežádoucím jevům, musí být metalocen kovalentně navázan k povrchu Pt elektrody^{11–13}. Pak lze získat dobře vyvinuté CV imobilizovaného Mc. V případě, že je Faradayický proud překryt velkým kapacitním proudem, je možné místo cyklické voltametrie použít pulzní voltametrickou techniku¹⁴. Takto připravenou PtMc elektrodu lze kalibrovat vůči vodným sekundárním referenčním elektrodám, což vede k navázání na potenciál vodíkové stupnice.

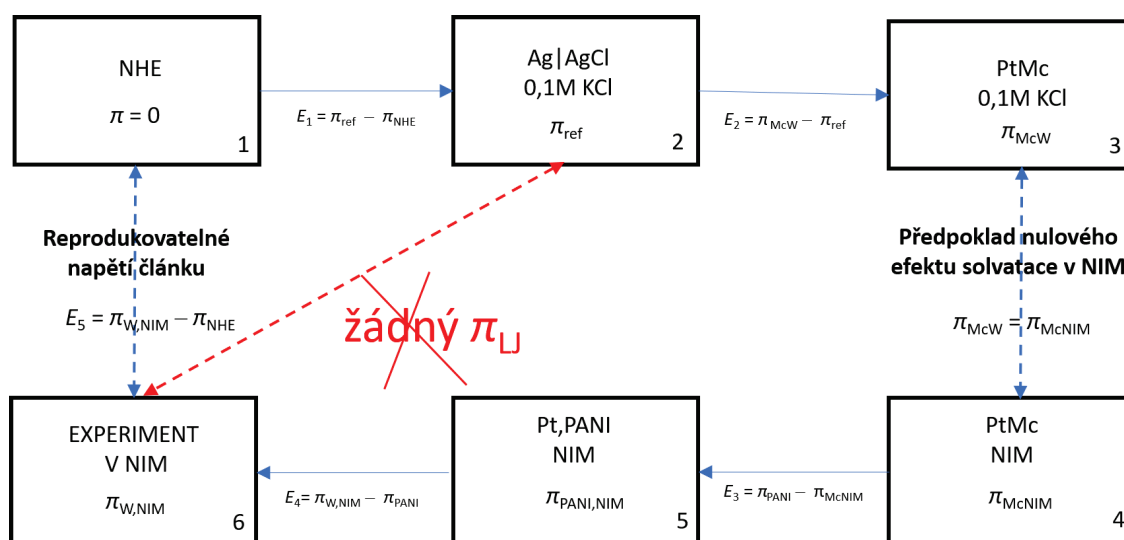
2.3. Postup eliminace kapalinového potenciálu pomocí univerzální referenční elektrody

Kapalinový potenciál URE lze eliminovat tím, že na obou stranách rozhraní je stejné médium. Smíšený potenciál URE se pak kalibruje proti potenciálu PtMc elektrody ve stejném NIM. Postup je shrnut na obr. 5. Na šesti panelech jsou znázorněny použité elektrodové systémy a přechody mezi jednotlivými panely představují měření napětí.

Panel 1 je *normální vodíková elektroda*. Panel 2 je *sekundární referenční elektroda*, tj. Ag|AgCl v KCl. Měření napětí článku v přechodu 1–2 je kalibrační této sekundární referenční elektrody vůči NHE. Tím se získá známá hodnota potenciálu sekundární referenční elektrody vůči NHE. Pro Ag|AgCl v 0,1 M KCl je napětí článku $+0,288$ V vs. NHE při 25 °C.



Obr. 4. Polarogram $1 \cdot 10^{-4}$ M kobaltocenu na kapající rtuťové elektrodě v 0,965 M vodném roztoku ethylendiaminu. Pro srovnání tvarů $i-t$ křivek jsou zobrazeny úseky $i-t$ křivek pro Cob^+ ($E < \text{PZC}$) a Cob ($E > \text{PZC}$, otočené o 180°). Půlvalnový potenciál ($\pi_{1/2}$) a potenciál nulového náboje (PZC, z angl. Potential of Zero Charge) jsou označeny šipkami. Převzato a upraveno z cit.⁹



Obr. 5. Postup eliminace kapalinového potenciálu pomocí URE a kalibrace PtMc elektrody. Vysvětlení viz text

$$E_1 = \pi_{\text{ref}} - \pi_{\text{NHE}} = 0,288 \text{ V} \quad (6)$$

Na panelu 3 je aplikována platinová elektroda s kovalentně navázaným metalocenem. Měření 2–3 ve vodném roztoku KCl je kalibrace PtMc elektrody vůči sekundární referenční elektrodě pomocí cyklické voltametrie. Za účelem eliminace vysokého kapacitního proudu lze případně použít diferenční pulsní voltametrii. Na základě naměřených potenciálů Mc/Mc^+ provedeme kalibraci PtMc elektrody vůči vodíkové stupnici potenciálů.

$$E_2 = \pi_{\text{McW}} - \pi_{\text{ref}} \quad (7)$$

V případě panelu 4 je využita stejná PtMc elektroda, ale ponořená do NIM. Vycházíme zde z předpokladu nulového vlivu prostředí na potenciál PtMc. Jinými slovy se předpokládá, že potenciál metalocenové elektrody je stejný ve vodě i v NIM.

$$E_2 = \pi_{\text{McW}} - \pi_{\text{McNIM}} = 0 \text{ V} \quad (8)$$

Panel 5 ukazuje URE, která je založena na Pt s vrstvou PANI, ponořená do NIM. Potenciál URE je proměnlivý a závisí pouze na použitém NIM. Měření 4–5 kalibruje URE vůči PtMc elektrodě v daném NIM.

$$E_3 = \pi_{\text{PANI}} - \pi_{\text{McNIM}} \quad (9)$$

Na panelu 6 je skutečný elektrochemický experiment v NIM se studovaným depolarizátorem. Při měření 5–6 je URE připojena k vysoké vstupní impedanci ($I_{\text{bias}} = 0,000 \text{ A}$) potenciostatu. Při tomto elektrochemickém experimentu jsou pracovní a vnitřní prostor URE odděleny, čímž je zabráněno kontaminaci vnitřního prostoru URE studovaným depolarizátorem. Protože médium je na obou stranách rozhraní stejné, je rozdíl potenciálů z definice nulový.

$$E_4 = \pi_{\text{PANI}} - \pi_{\text{W,NIM}} \quad (10)$$

Potenciál pracovní elektrody v NIM na vodíkové stupnici potenciálů pak získáme řešením rovnic 7 až 10.

$$E_5 = \pi_{\text{W,NIM}} - \pi_{\text{NHE}} \quad (11)$$

3. Diskuse

Předpokládá se, že zde popsané měřicí postupy se provádějí v plně rovnovážném stavu. Každá částice a každé rozhraní jsou tak solvatovány médiem. Při náhlé změně prostředí, např. při přechodu z panelu 3 na 4 (obr. 5), se odpovídajícím způsobem změní příslušná solvatace. Tato solvatační výměna může být velmi pomalý proces, někdy trvající hodiny až dny^{9,15}. Pomalá kinetika solvatace a výměny rozpouštědla a její vliv na rovnovážné potenciály v NIM mohou být studovány pomocí následujících experimentů. Připraví se dvě identické URE ve vodném roztoku. První URE₁ se ponechá v daném NIM po libovolně zvolenou dobu, např. 24 hodin. Druhá URE₂ se pak vloží do NIM v čase $t = 0$ a zaznamená se EMF(t) = URE₁ – URE₂ jako funkce času ($E_{\text{cell}}(t) = X_3(t)$). Pokud je kinetika výměny rozpouštědla rychlá, $X_3 = 0$. Pokud však platí, že $X_3(t) > 0$, je to známka pomalé kinetiky solvatace a URE se musí nechat stabilizovat, než se použije v experimentu. Kinetika výměny rozpouštědla není *a priori* známa. Na druhou stranu by se taková měření mohla stát novým nástrojem elektrochemického studia kinetiky solvatace.

V případě konstrukce McPt kalibrační elektrody bude klíčový výběr vhodnějšího Mc, a to z hlediska Marcusovy teorie přenosu elektronů („outer sphere” model). Byla provedena komplexní studie elektrochemického chování ferrocenu, pentamethyl- a dekamethylferrocenu v osmadvaceti organických rozpouštědlech⁷. Dekamethylferrocen se ukázal být vhodný díky své hydrofobicitě. Postup kovalentního navázání dekamethylferrocenu na povrch Pt elektrody však dosud nebyl publikován.

4. Závěry

Navržený systém URE využívá dvou elektrod. První (referenční) elektrodou je platina potažená polyanilinem.

Jedná se o smíšený iontový/elektronový vodič, který při nulovém proudu vytváří stabilní, ale neznámý potenciál v jakémkoli NIM. Tato elektroda je vždy připojena ke vstupu referenční elektrody potenciostatu, aby bylo zajištěno $J = 0$. Druhá (pracovní) elektroda je tvořena platinou s kovalentně vázaným metallocenem. Na této PtMc elektrodě se provádí voltametrický experiment. Předpokládáme, že postupem popsáním v této práci lze eliminovat neznámý a nedefinovaný π_{LJ} .

Za finanční podporu děkujeme Univerzitě Palackého v Olomouci (RVO 61989592).

LITERATURA

- Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical Methods*, kapitola 1, 2. vyd. J. Wiley & Sons, Inc., New York 2001.
- Strehlow H., Wendt H.: *Z. Phys. Chem. N. F.* 30, 141 (1961).
- Garcia B., Fusalba F., Belanger D.: *Can. J. Chem.* 75, 1536 (1997).
- Hatchett D. W., Josowicz M., Janata J.: *J. Phys. Chem. B* 103, 10992 (1999).
- Jonke A. P., Josowicz M., Janata J.: *J. Electrochem. Soc.* 159, 40 (2012).
- Janata J.: *Principles of Chemical Sensors*, kapitola 6, 2. vyd. Springer, New York 2009.
- Noviandri I., Brown K. N., Fleming D. S., Gulyas P. T., Lay P. A., Masters A. F., Phillips L.: *J. Phys. Chem. B* 103, 6713 (1999).
- Janata J., Jansen G.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 68, 1656 (1972).
- Janata J., Holtby-Brown R. D.: *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 2* 7, 991 (1973).
- Janata J., Zuman P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1635 (2009).
- Wrighton M. S., Austin R. G., Bocarsly A. B., Bolts J. M., Haas O., Legg K. D., Nadjó L., Palazzotto M. C.: *J. Electroanal. Chem.* 87, 429 (1978).
- Sheridan M. V., Lam K., Geiger W. E.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 12897 (2013).
- Lenhard J. R., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 7870 (1978).
- Dorčák V., Hrbáč J., Janata J., Vacek J.: nepublikované výsledky (2024).
- Moakes G., Janata J.: *Acc. Chem. Res.* 40, 720 (2007).

J. Janata^a, V. Dorčák^b, J. Hrbáč^c, and J. Vacek^b
^a*School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA,* ^b*Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic,* ^c*Institute of Chemistry, Masaryk University, Kamenice, Brno, Czech Republic):* **Universal Reference Electrode System for Non-Ideal Media**

Potentials in electrochemical experiments are referenced to a hydrogen electrode, which is set up in an ideal aqueous medium. However, most electrochemical experiments are performed in media which are far from ideal. This inevitably leads to the necessity of using a liquid junction between ideal and non-ideal solutions, or a pseudoreference electrode. The resulting undefined and irreproducible liquid junction potential can be eliminated by the Universal Reference Electrode system presented here. This consists of two electrodes: a voltammetric metallocene electrode and a potentiometric polyaniline electrode. The system is not a replacement for a Normal Hydrogen Electrode. It is only an elimination of undefined liquid junction potential, when working in a non-ideal medium.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: liquid junction potential, metallocene, polyaniline, standard hydrogen electrode

Acknowledgements

The study was supported by Palacky University in Olomouc, Czech Republic (RVO 61989592).



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

NÁVRH MINIATURIZOVANÝCH IONTOVĚ-SELEKTIVNÍCH ELEKTROD A PRAKTICKÉ APLIKACE

Věnováno prof. J. Barkovi k 75. narozeninám.

HANA BŘEZNOVÁ, GABRIELA BRONCOVÁ a TATIANA V. SHISHKANOVA

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
Gabriela.Broncova@vscht.cz

Došlo 28.8.24, přijato 12.9.24.

V této studii jsou představeny miniaturizované membránové iontově-selektivní elektrody (ISE). Tělo elektrody je vyrobeno z poly(vinylchloridové) trubice s vnitřní porézní fritou, která je mechanickou oporou pro vytvořenou membránu. Membrána vzniká jednorázovým nebo opakovaným ponořením konce elektrody do membránového koktejlu rozpuštěného v tetrahydrofuranu (THF). Tloušťka membrány může být řízena množstvím ponoření a/nebo viskozitou membránového koktejlu, resp. množstvím THF. Navržené elektrody byly charakterizovány z hlediska opakovatelnosti, dynamické odezvy, pracovních rozsahů a citlivosti. Jejich parametry byly porovnány s literárními údaji získanými pro konvenční membránové ISE. Tato konstrukce elektrody může být jednoduchou alternativou ke klasickým/tradičním membránovým elektrodám pro různé analytické aplikace.

Klíčová slova: iontově-selektivní elektrody, miniaturizace, aplikace

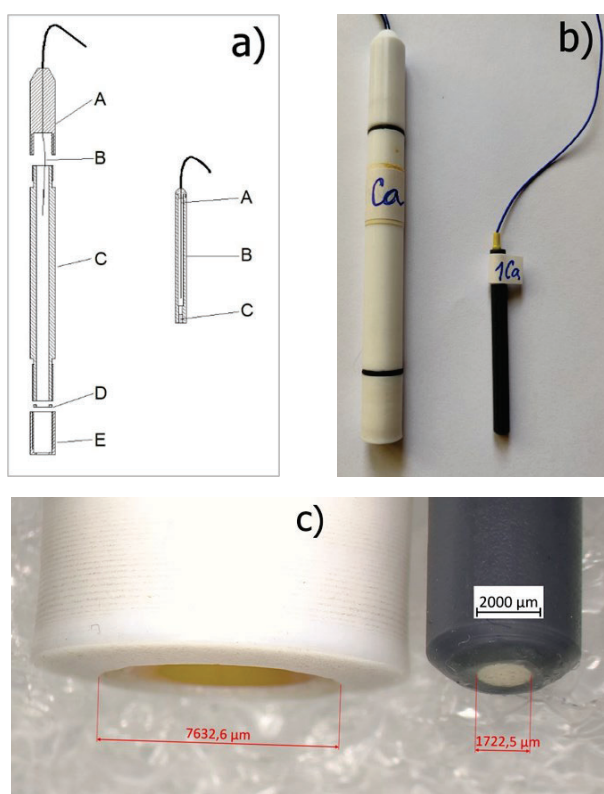
Úvod

Iontově-selektivní elektrody (ISE) jsou jedním z nejčastěji používaných analytických nástrojů v praxi^{1–3}. Potenciometrie s ISE podléhá neustálým inovacím, které jsou nezbytné, jak vyplývá ze statistik. Nicméně počet analýz prováděných s ISE ročně, především v klinické praxi⁴, představuje použití několika milionů elektrod a každé sebemenší zlepšení znamená obrovskou úsporu finančních prostředků a také času. Rovněž nutnost analýzy pouze omezeného množství/objemu vzorku a také sledování více analytů najednou vyžaduje malé rozměry elektrod nejen pro samostatné využití, ale i pro jejich možnou kombinaci do elektrodového pole⁵.

Dosud byly navrženy a v praxi využívány různé konstrukce ISE. Mezi nimi jsou tzv. „coated wire“ a/nebo „solid-state“ elektrody s pevnou vnitřní referenční elektrodou lišící se konstrukcí a přípravou⁶. Avšak nevýhodou těchto elektrod může být špatná reprodukovatelnost elektrodového potenciálu a drift, který v mnoha případech může souviset se špatně definovaným přenosem náboje na rozhraní mezi selektivní membránou s iontovou vodivostí a elektronicky vodivým substrátem⁷. Na druhou stranu konvenční elektrody s vnitřním plnicím roztokem mají velmi dobře definovaný potenciál, ale přítomnost plnicí kapaliny má za následek zase další potíže.

Běžná ISE se skládá z teflonového těla s přichycenou selektivní membránou (obr. 1). Uvnitř těla je vnitřní roztok, který lze nahradit gelem^{8–10}. PVC membrána je připravena z membránového koktejlu, který obsahuje směs PVC, plastifikátoru (změkčovadla), ionoforu a lipofilní přísady rozpuštěné v tetrahydrofuranu (THF). Po odpaření THF z membránového koktejlu se elastická membrána umístí do teflonového těla. Toto uspořádání ISE pro sériovou výrobu není optimální z důvodu velké spotřeby materiálu a časové náročnosti. V této studii představujeme přípravu miniaturizovaných elektrod, které jsou jednoduché, levné a snadno vyrobitelné ve velkých sériích.

Teflonová a epoxidová koncová tělesa mají lepší chemickou odolnost a jejich výměna za tělo elektrody z PVC nabízí nové možnosti jako a) nerozbitnost, b) snadné vstřikování do libovolné formy, c) značná úspora financí a d) přirozené lepení (ve srovnání s teflonem a epoxidem). Fixaci membrány na epoxidové a teflonové těleso lze provést buď kapáním, anebo šroubováním. Z technického hlediska je šroubování poměrně nákladné a náročné na obrábění. Naproti tomu fixace membrány k tělu elektrody z PVC může být snadnou a levnou cestou, a to lepením pomocí směsi čistého PVC prášku rozpuštěného v THF (cit.¹¹). Tato lepicí směs má podobné vlastnosti jako membrána a tudíž neovlivňuje odezvu systému. Lepení spoj je sice trvalý a výměna membrány není možná,



Obr. 1. Konvenční vs. miniaturizovaná elektroda; a) náčrty konvenční elektrody: A – šroubovací uzávěr, B – Ag drát, C – tělo, D – membrána, E – spodní šroubovací uzávěr; miniaturizovaná elektroda: A – vnitřní Ag/AgCl referenční elektroda, B – tělo, C – porézní frit; b) reálné zobrazení a c) jejich detail. Mini-elektroda je umístěna na jednotlivých obrázcích a) až c) vždy vpravo

ale v případě levné elektrody to není významný problém a lze nahradit celou elektrodou.

Dalším požadavkem pro aplikace je mechanická odolnost membrány v ISE elektrodách, jednoduše jejich praktická nezníčitelnost. Membrána ISE může být vždy snadno zničena perforací neadekvátní silou. Tomuto riziku lze předejít přidáním porézního materiálu jako frity do těla elektrody, který zabezpečí mechanickou odolnost mem-

brány. Tato porézní frita umožňuje vyhnout se časově náročné přípravě membrány pro montáž/vlepení do těla elektrody. Konec těla elektrody z PVC s fritou uvnitř lze jednoduše ponořit do membránového koktejlu rozpuštěného v THF (obr. 1b). Příprava ISE je ukončena po odpaření THF (typicky 10 až 15 minut). Tloušťku membrány pak lze snadno řídit celkovým množstvím ponoření a množstvím THF pro rozpuštění membránového koktejlu. Méně THF znamená vyšší viskozitu a silnější membránu. Detail obou membránových elektrod je na obr. 1c, kdy naše nové membrány mají průměr méně než 2 mm a jsou přibližně 4,5× menší než konvenční membrány ISE.

Experimentální část

Chemikálie

Membránové komponenty: poly(vinylchlorid) (PVC, vysokomolekulární typ), 2-nitrofenyloxyethylether (o-NPOE), tetrafenylboritan sodný (TPB), chlorid tridodecylmethylamonný (TDDMACl), dusičnan tridodecylmethylamonný (TDDMANO₃), ionofor vápenatých iontů II (ETH 129), ionofor vápenatých iontů IV (ETH 5234), ionofor draselných iontů (BME 44), ionofor chloridových iontů II (ETH 9009), bis(2-ethylhexyl)sebakát (BEHS) a tetrahydrofuran (THF) byly zakoupeny od společnosti Fluka. Všechny anorganické soli byly zakoupeny od společnosti Lachema (ČR). Všechny roztoky byly připraveny v redestilované vodě. Vzorky minerálních vod (tab. I) byly zakoupeny v místních prodejnách Praha (ČR).

Příprava elektrod

Keramická frit 4/1,8 mm byla vlepena do 60 mm dlouhé trubičky z tvrzeného PVC (AK Plast, ČR) o průměru 5/2,5 mm nahoře a 5/1,9 mm dole (obr. 1b). Špička těla elektrody z PVC s fritou uvnitř byla ponořena do membránového koktejlu rozpuštěného v THF a ponechána, dokud se THF neodpařil (asi 10 minut). Membránové koktejly byly připraveny podle standardní receptury: 100 mg membránového koktejlu bylo rozpuštěno v 0,6 ml THF. Složení membránových koktejlů a vnitřních roztoků je uvedeno v tab. II.

Tabulka I

Obsah vybraných iontů udaných výrobcem v testovaných vzorcích použitých pro stanovení pomocí sensorového pole

Ionty	Dobrá voda [mg l ⁻¹]	Karlovarská korunní kyselka [mg l ⁻¹]	Aquara [mg l ⁻¹]	Kojenecká voda [mg l ⁻¹]	Poděbradka [mg l ⁻¹]	Calcium-500 [mg]
K ⁺	9,3	24,30	–	–	49,3	–
Ca ²⁺	8,7	78,55	40,0	min. 30	144,0	500
NO ₃ ⁻	0,1	–	9,5	max. 15	–	–
Cl ⁻	0,8	14,05	–	–	373,3	–

Tabulka II

Složení membránového koktejlu použitého pro přípravu PVC-membrán se změkčovadlem o-NPOE

Ionofor	Iont	Složení membrány (m/m%)				Vnitřní roztok
		ionofor	lipofilní přídavek ^a	změkčovadlo	PVC	
TDDMACl	ClO ₄ ⁻	–	3,00	64,67	32,33	10 ⁻² NaCl
ETH 129	Ca ²⁺	2,00	0,70 (TPB)	64,70	32,60	10 ⁻² CaCl ₂
ETH 5234	Ca ²⁺	1,00	0,28 (TPB)	65,82	32,90	10 ⁻² CaCl ₂
BME 44	K ⁺	2,00	0,50 (TPB)	65,00	33,00	10 ⁻³ KCl
ETH 9009	Cl ⁻	2,00	0,03 (TDDMA)	64,97 ^b	33,00	10 ⁻² NaCl
TDDMANO ₃	NO ₃ ⁻	6,00	–	65,00	29,00	10 ⁻² KNO ₃

^a TPB – tetrafenylboritan sodný, TDDMACl – chlorid tridodecylmethylamonný; ^b jako změkčovadlo byl použit sebakát (BEHS)

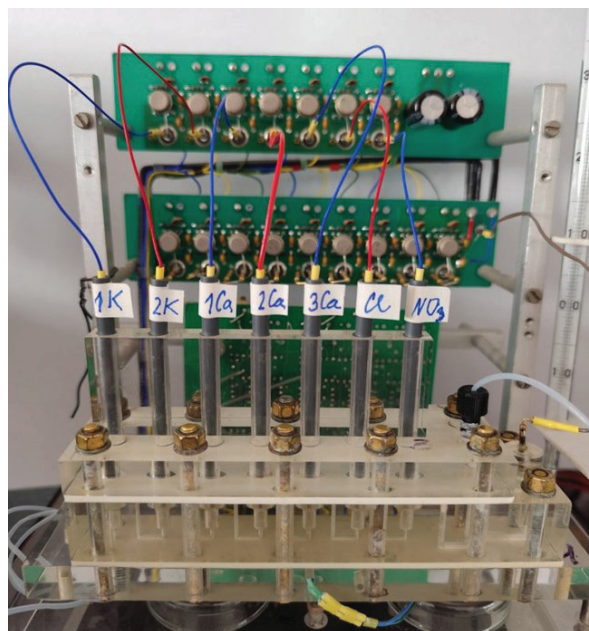
Potenciometrická měření

Před měřením byly elektrody ponořeny do 1·10⁻³ mol l⁻¹ roztoku odpovídajícího iontu. Měření byla provedena pomocí na zakázku vyrobeného automatického ISE testeru navrženého se sedmi kanálovou průtočnou celou (obr. 2). Elektrochemická cela byla umístěna do termostatu o teplotě 25,00 ± 0,01 °C.

Stanovení vzorků minerálních vod

Potenciometrická měření

Koncentrace Ca²⁺ v minerální vodě byla měřena metodou standardního přídavku. Jako pozadí standardní kon-



Obr. 2. Potenciometrické elektrodové pole tvořené 7 označenými minielektrodami pro draselné (1K, 2K), vápenaté (1Ca až 3Ca), chloridové (Cl) a dusičnanové (NO₃) ionty

centrace vápníku 5·10⁻⁴ mol l⁻¹ byl použit 1·10⁻¹ mol l⁻¹ roztok LiCl pro vzorek Veseta a Matoni a 1·10⁻³ mol l⁻¹ LiCl pro vzorek Aquila. Poté byly přidány 3 ml vzorku do 20 ml standardního roztoku. Minerální vody s obsahem uhličitánů byly před použitím probublány proudem dusíku a všechna měření byla třikrát opakována.

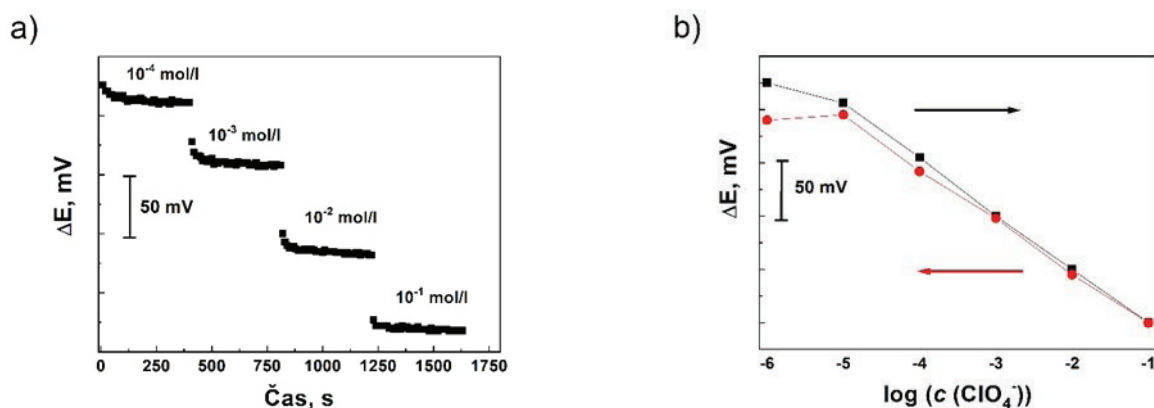
AAS měření

Měření AAS byla provedena pomocí dvouapráskového spektrometru GBC 932AA řízeného PC (GBC, Austrálie). Použitá vlnová délka byla 422,7 nm, šířka štěrbin byla 0,5 nm a proud lampy byl 7,0 mA. Poloha hořáku a poměr acetylen/vzduch byly optimalizovány podle standardního měřicího postupu. Koncentrace vápníku (II) v minerální vodě byla měřena metodou standardního přídavku. Jako pozadí standardní koncentrace vápníku 1·10⁻⁵ mol l⁻¹ byl použit 1·10⁻³ mol l⁻¹ roztok KCl. Poté byl přidán 1 ml vzorku do 50 ml standardního roztoku.

Výsledky a diskuse

Miniaturizované elektrody založené na měničích aniontů

Elektrody byly připraveny s TDDMACl jako nejběžnějším iontoměničovým lipofilním aditivem pro ověření funkčnosti prezentovaného konceptu. TDDMACl je typický lipofilní kationt schopný reagovat s anionty prostřednictvím coulombických interakcí a vykazovat selektivitu odpovídající Hofmeisterově řadě¹². Chloristany byly vybrány jako modelový systém pro ověření použitelnosti navržené konstrukce elektrody. Časová charakteristika membránové odezvy byla testována skokovou změnou koncentrace vzorku v rozsahu 1·10⁻⁴ – 1·10⁻¹ mol l⁻¹ (obr. 3a) a časová konstanta t₉₀ je od 90 do 160 sekund v závislosti na rozdílu mezi počáteční a konečnou koncentrací. Hystereze odezvy byla velmi nízká (obr. 3b). Po dobu jednoho měsíce byly sledovány potenciometrické parametry miniaturizované elektrody na bázi TDDMACl.



Obr. 3. Studium a) dynamické odezvy a b) hystereze miniaturizované ISE založené na TDDMACI v chloristanu sodném

Tabulka III

Parametry kalibrační závislosti miniaturizované ($n=3$) a konvenční ISE při stanovení chloristanu sodného

Typ elektrody	Směrnice [mV/dekádu]	Pracovní rozsah [mol l^{-1}]	Úsek [mV]
Miniaturizovaná	$-60,1 \pm 8,4$	$10^{-5} - 10^{-1}$	$-58,3 \pm 24,7$
Konvenční	$-57,8$	$10^{-5} - 10^{-1}$	$-75,8$

Bylo zjištěno, že se směrnice měnila nepatrně ($-52,4 \pm 1,9$) mV/dekáda ($S_r = 3,4\%$) a úsek kalibrační závislosti rovněž ($-40,9 \pm 3,5$) mV ($S_r = 8,1\%$), pokles potenciometrického signálu byl 12 mV/měsíc (0,4 mV/den).

Opakovatelnost přípravy membrán byla potvrzena přípravou třech stejných elektrod, jejich parametry jsou shrnuty v tab. III a porovnány s parametry konvenčních ISE. Ve stejné tabulce jsou charakteristiky membrány zachycené v klasicky konstruovaném teflonovém těle. Odezvy jsou totožné ve smyslu směrnice a úseku kalibrační závislosti i pracovního rozsahu.

Miniaturizované elektrody založené na komerčně dostupných ionoforech

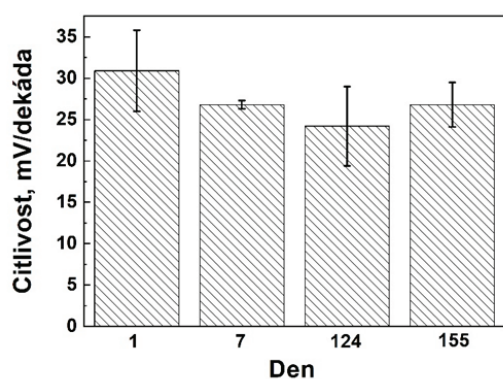
Jako logické pokračování práce byly použity i různé ionofory k ověření, zda funkce miniaturizovaných elektrod není omezena pouze na použití měničů aniontů. Byly připraveny miniaturizované elektrody s komerčními ionofory selektivními na kationty (draselné a vápenaté ionty) a anionty (chloridové, dusičnanové) (tab. II). Hlavní parametry experimentálních kalibračních závislostí jsou shrnuty v tab. IV. Je třeba poznamenat, že potenciometrické parametry miniaturizovaných a konvenčních ISE jsou v souladu s očekávanými hodnotami z literatury^{13–16}. Jak je vidět z tab. IV, neexistují žádné významné rozdíly mezi

Tabulka IV

Parametry kalibračních závislostí získaných pomocí nově navržených experimentálních miniaturizovaných elektrod ($n=3$) a konvenčních elektrod z literatury

Ionty	Miniaturizované elektrody		Konvenční elektrody ^a	
	směrnice [mV/dekáda]	pracovní rozmezí [mol l^{-1}]	směrnice [mV/dekáda]	pracovní rozmezí [mol l^{-1}]
Ca^{2+}	$30,9 \pm 4,9$	$10^{-6} - 10^{-3}$	29,7	$10^{-8} - 10^{-1}$
K^+	$52,8 \pm 4,9$	$10^{-5} - 10^{-1}$	56,0	$10^{-5} - 10^{-1}$
Cl^-	$-53,1 \pm 1,1$	$10^{-4} - 10^{-1}$	$-57,6$	$10^{-5} - 10^{-1}$
NO_3^-	$-50,9 \pm 5,7$	$10^{-4} - 10^{-1}$	$-60,0$	$9 \cdot 10^{-5} - 10^{-1}$

^a Pro konvenční elektrody byly potenciometrické parametry převzaty z cit.¹³ (ionty Ca^{2+}), cit.¹⁴ (ionty K^+), cit.¹⁵ (ionty Cl^-) a cit.¹⁶ (ionty NO_3^-)



Obr. 4. Sledování časové stálosti potenciometrické odezvy Ca-ISE

navrhovanými a konvenčně konstruovanými membránovými ISE v citlivosti a pracovním koncentračním rozsahu. Příklad dlouhodobé stability miniaturizované Ca-ISE ukazuje, že elektroda zůstává funkční v průběhu 3 měsíců (obr. 4).

Analytické aplikace

Samostatné elektrody

Abychom demonstrovali využití dříve popsáných elektrod pro reálné vzorky, použili jsme je pro měření minerálních vod. Protože je Česká republika známa svými minerálními léčivými prameny s minerálními vodami, byla pro testování vybrána miniaturizovaná elektroda na bázi ionoforu ETH 129 citlivého na ionty vápenaté. Výsledky potenciometrických stanovení byly porovnány se stanoveními provedenými technikou AAS (tab. V) a koncentrací deklarovanou výrobcem.

Elektrodové pole

K ověření schopnosti identifikace jednotlivých minerálních vod pomocí elektrodového pole vytvořeného sedmi miniaturizovanými membránovými elektrodami byla využita metoda PCA. PCA nám poskytla transformovanou mapu, ve které byly velmi dobře rozlišeny jednotlivé vzorky minerálních vod (obr. 5a). PCA analýza minerálních vod obsahuje 96 % celkové variability systému. Rozptylový diagram komponentního skóre (obr. 5a) ukazuje po-

dobnost a zároveň odlišnost jednotlivých vzorků minerálních vod, které jsou na základě blízkosti dat v grafu rozděleny do 4 skupin. První hlavní komponenta nese 81 % celkové variability systému a dělí minerální vody na 4 velké shluky. Druhá hlavní komponenta popisuje 15 % variability dat.

Vliv jednotlivých elektrod na rozlišení minerálních vod je patrný z obr. 5b. Vysoký obsah K^+ iontů v minerálních vodách Karlovarská korunní kyselka (K) a Poděbradka (P) měl vliv na separaci těchto dvou minerálních vod vpravo nahoře (zelená elipsa) především vlivem miniaturizovaných elektrod připravených s 1K a 2K receptorem. Minerální vody Aquara (A) a Kojenecká voda (KJ) byly separovány opět společně vpravo dole (modrá elipsa) na základě podobného složení, obsahovaly pouze Ca^{2+} a NO_3^- ionty, pomocí miniaturizovaných elektrod připravených s 1Ca a NO_3^- receptorem. Dobrá voda (DV) byla separována samostatně vlevo nahoře (žlutá elipsa) především vlivem receptoru pro vápenaté ionty 2Ca a 3Ca a receptoru pro chloridové ionty Cl. Poslední testovaná minerální voda Calcium-500 vytvořila zcela samostatný shluk (červená elipsa) na základě přítomnosti pouze velkého obsahu vápenatých iontů, a tudíž vlivu receptoru pro vápenaté ionty 2Ca a 3Ca.

Z obr. 5 je patrná schopnost elektrodového pole rozlišit jednotlivé vzorky minerálních vod a využít je tak k rychlému screeningovému testu většího množství odlišných, ale i podobných vzorků.

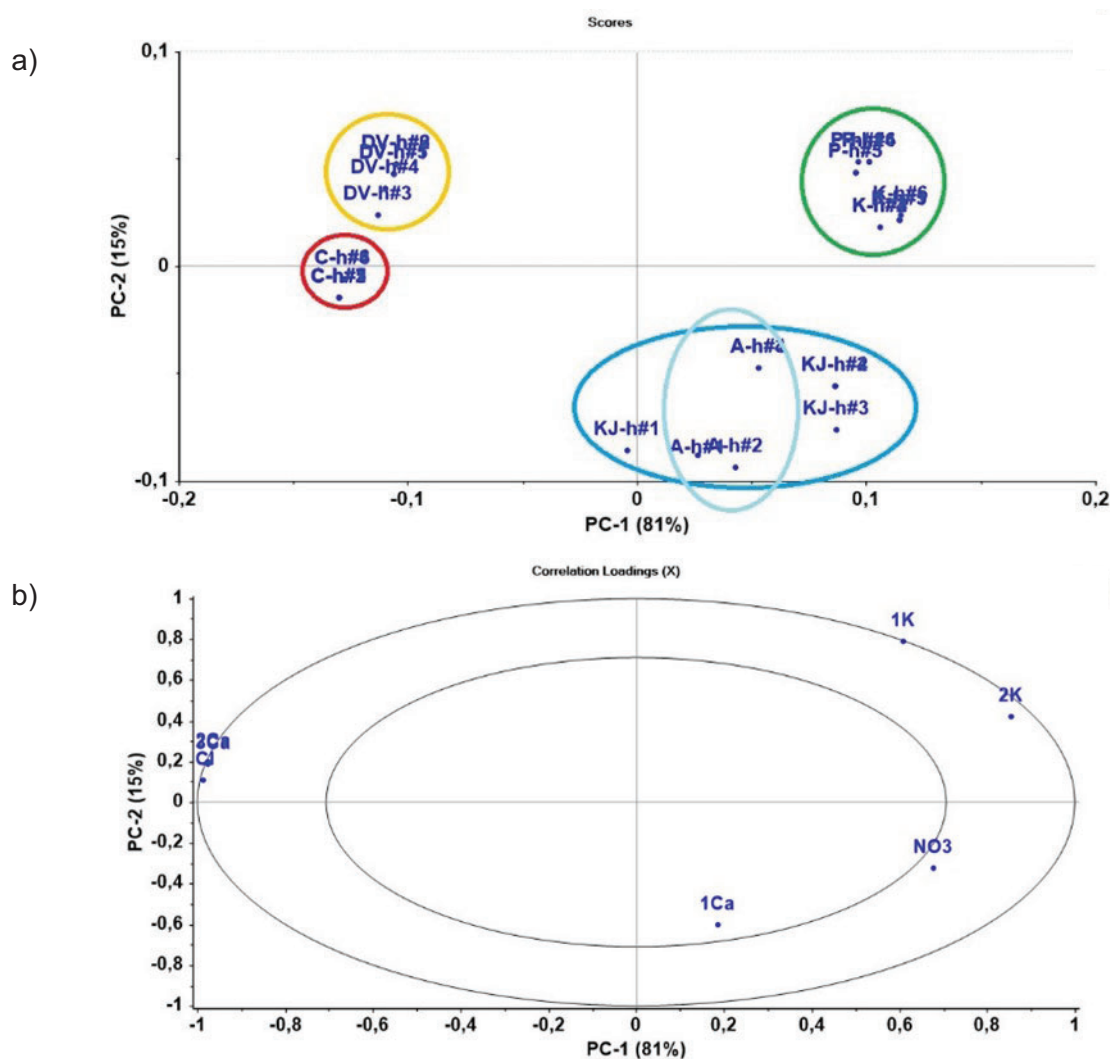
Závěr

Prezentovaná data ukazují, že membránové ISE lze připravit jednoduchým ponořením PVC trubičky do membránového koktejlu. Výsledné elektrody vykazují stejné analytické parametry jako jejich konvenční varianty a předčí je jednoduchostí přípravy a mechanickou odolností. Jedna z našich elektrod dokonce poskytla nezměnnou odezvu, i když se několik našich kolegů pokusilo selektivní vrstvu roztrhnout nehty. Testy provedené se samotným iontoměničem ukázaly, že náš koncept dobře funguje. Experimenty s jinými ionofory potvrzují, že funkce není omezena pouze na TDDMACl a analýzou minerálních vod byla prokázána funkce i pro reálné vzorky. Obecně tedy můžeme konstatovat, že máčené elektrody s PVC tělem jsou velmi životaschopným konceptem.

Tabulka V

Výsledky stanovení Ca^{2+} iontů v reálných vzorcích minerálních vod pomocí AAS a nové ISE

Vzorek	Metoda stanovení		Výrobce/etiketa [mmol l ⁻¹]
	AAS [mmol l ⁻¹]	ISE [mmol l ⁻¹]	
Mattoni	1,8 ± 0,7	2,6 ± 0,8	2,5
Veseta	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2
Aquila	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,9



Obr. 5. PCA analýza minerálních vod pomocí 7 připravených miniaturizovaných membránových elektrod s různými receptory pro Ca^{2+} , K^+ , Cl^- a NO_3^- ionty: a) rozptylový diagram komponentního skóre; b) diagram skóre s vyznačením jednotlivých zátěží. Vzorky jsou označeny následujícími zkratkami: DV – Dobrá voda, P – Poděbradka, KJ – Kojenecká voda, A – Aquara, K – Karlovarská korunní kyselka, Pro vzorek tablety: C – Calcium-500. Pro miniaturizované elektrody testované v senzorovém poli byly použity následující receptory a vnitřní roztoky: 1Ca – ionofor ETH 129 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-2}$ M CaCl_2), 2Ca – ionofor ETH 5234 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-2}$ M CaCl_2), 3Ca – ionofor ETH 129 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-4}$ M EDTA a $1 \cdot 10^{-3}$ M KCl), 1K – ionofor BME 44 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-3}$ M KCl), 2K – ionofor BME 44 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-3}$ M KNO_3), Cl – ionofor ETH 9009 (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-2}$ M NaCl), NO_3^- – ionofor TDDMANO₃ (vnitřní roztok $1 \cdot 10^{-2}$ M KNO_3)

Tato práce byla podpořena institucionálními zdroji (Katedra analytické chemie, VŠCHT Praha, CZ; Číslo grantu: 402850061). Autoři děkují R. Volfovi a M. Kronďákovi za technický návrh a pomoc při výrobě miniaturizovaných iontově-selektivních elektrod a Vladimíru Královi za zakoupení automatického ISE testeru.

LITERATURA

- Isildak Ö., Özbek O.: Crit. Rev. Anal. Chem. 51, 218 (2021).
- Ruiz-Gonzalez A.: Electrochem. 5, 178 (2024).
- Jadon N., Hosseinzadeh B., Kaya S. I., Ozelikay-Akyildiz G., Cetinkaya A., Ozkan S. A.: Electrochim. Acta 488, 144204 (2024).
- Ferrão A. R., Pestana P., Borges L., Palmeira-de-Oliveira R., Palmeira-de-Oliveira A., Martinez-de-Oliveira J.: Biomedicines 12, 1848 (2024).

5. Shishkanova T. V., Broncova G., Kroncak M., Sykora D., Kral V.: *J. Mater. Sci.* **46**, 7594 (2011).
6. Shao Y., Ying Y., Ping J.: *Chem. Soc. Rev.* **49**, 4405 (2020).
7. Bobacka J., Lindfords T., McCarrick M., Ivaska A., Lewenstam A.: *Anal. Chem.* **67**, 3819 (1995).
8. Cosofret V. V., Erdosy M., Johnson T. A., Buck R. P., Ash R. B., Neuman M. R.: *Anal. Chem.* **67**, 1647 (1995).
9. Walsh S., Diamond D., McLaughlin J., McAdams E., Woolfson D., Jones D., Bouner M.: *Electroanalysis* **9**, 1318 (1997).
10. Zieľinska R., Mulik E., Michalska A., Achmatowicz S., Maj-Žuravska M.: *Anal. Chim. Acta* **451**, 243 (2002).
11. Issa Y. M., El-Ansary A. L., Tag-Eldin A. S.: *Microchim. Acta* **135**, 97 (2000).
12. Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E.: *Chem. Rev.* **97**, 3083 (1997).
13. Schefer U., Ammann D., Pretsch E., Oesch U., Simon W.: *Anal. Chem.* **58**, 2282 (1986).
14. Lindner E., Tóth K., Jeney J., Horváth M., Pungor E., Bitter I., Agai D., Tölke L.: *Microchim. Acta* **100**, 157 (1990).
15. Rothmaier M., Simon W.: *Anal. Chim. Acta* **271**, 135 (1993).
16. Wegmann D., Weiss H., Ammann D., Morf W. E., Pretsch E., Sugahara K., Simon W.: *Microchim. Acta* **84**, 1 (1984).

H. Březnová, G. Broncová, and T. V. Shishkanova
(*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*):
Design of Miniaturized Ion-Selective Electrodes and Practical Applications

Miniaturized membrane ion-selective electrodes are introduced. The body of electrode is made of a poly(vinyl chloride) tube with an internal porous frit, which is a mechanical support for the membrane. The membrane is created by a one-time or repeated dipping of the electrode tip into the membrane cocktail dissolved in tetrahydrofuran (THF). The thickness of the membrane is controlled by the number of dipping and/or the viscosity of the membrane cocktail, or the amount of THF. The electrodes were characterized in term of repeatability, dynamic response properties, working ranges, and sensitivity. Their analytical performance was compared with literature data for conventional membrane ion-selective electrodes. This electrode design can be a simple alternative to classical/traditional membrane electrodes for various analytical applications.

Keywords: ion-selective electrodes, miniaturization, application



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

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ LÉČIVA METRONIDAZOLU POMOCÍ PEVNÉ BISMUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODY

Tento příspěvek je věnován prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. u příležitosti jeho 75. narozenin a vychází v rámci seriálu Nové pohledy na analytickou chemii.*

JOHANKA JAROŠOVÁ A VLASTIMIL VYSKOČIL

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

Došlo 4.9.24 přijato 14.10.24.

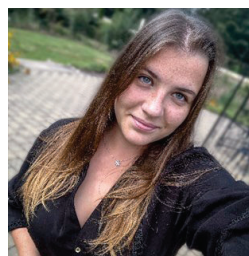
Pevná bismutová kapková elektroda (SBI_{DE} – solid bismuth drop electrode) je nová pracovní elektroda, kterou od roku 2020 komerčně nabízí na českém trhu společnost Metrohm. Cílem této práce bylo ověřit použitelnost SBI_{DE} při voltametričtém stanovení modelové organické látky reprezentující elektrochemicky redukovatelné biologicky aktivní sloučeniny – léčiva metronidazolu (antibiotika používaného k léčbě onemocnění způsobených gram-pozitivními i gram-negativními anaerobními bakteriemi). Podle dostupných informací se jedná o vůbec první publikovanou výzkumnou práci využívající SBI_{DE}. Za optimálních podmínek (Brittonův-Robinsonův pufr o pH 12,0 byl použit jako základní elektrolyt a povrch pracovní elektrody nebyl elektrochemicky regenerován) byla získána pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) lineární kalibrační závislost metronidazolu v koncentračním rozmezí od 1 do 600 $\mu\text{mol l}^{-1}$, přičemž dosažená mez detekce (*LOD*) byla 0,41 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti (*LOQ*) byla 1,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Cyklická voltametrie (CV) na SBI_{DE} byla použita pro charakterizaci elektrodového děje při ireverzibilní katodické redukci metronidazolu. Nově vyvinutá DPV metoda byla rovněž úspěšně použita při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody (*LOD* = 1,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a *LOQ* = 5,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a v různých lékových formách (jako srovnávací analytická metoda byla použita UV-Vis spektrofotometrie).

Klíčová slova: metronidazol, antibiotika, analýza léčiv, elektrochemie, diferenční pulzní voltametrie, cyklická voltametrie, pevná bismutová kapková elektroda, UV-Vis spektrofotometrie

Úvod

Bismutové elektrody (BiE) jsou v elektroanalytické chemii využívány jako pracovní elektrody již od roku 2000. Bismut je velmi šetrný k životnímu prostředí a stává se tak vhodným elektrodovým materiálem, kterým lze velmi dobře nahradit kovová rtuť^{1,2}. Pomocí těchto elektrod byly již dříve stanoveny ionty kovů Zn, Cd, Pb, Tl, In, Sn, Sb, Cu, Mn, Cr a Mo (cit.³), též Co a Ni (cit.^{3,4}), ale také některé organické sloučeniny, jako jsou pesticidy nebo léčiva^{1,2}. Mezi základní typy bismutových pracovních elektrod patří bismutové filmové elektrody (BiFE) a bismutové pevné (angl. bulk) elektrody (BiBE), mezi které lze řadit i námi nově zkoumanou pevnou bismutovou kapkovou elektrodu (SBI_{DE}, z angl. solid bismuth drop electrode).

BiFE je nejčastěji vyráběna elektrochemickým nanesením tenkého bismutového filmu na povrch pracovní



Bc. Johanka Jarošová studovala v letech 2020–2023 bakalářský obor Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, kde na Katedře analytické chemie vypracovala svoji bakalářskou práci, kterou obhájila v červnu 2023. V současnosti na stejné katedře vypracovává diplomovou práci v rámci navazujícího magisterského studia oboru Analytická chemie, ve které se zabývá využitím pevné bismutové kapkové elektrody při voltametričtém stanovení léčiv. **Výsledky své práce prezentovala na celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2024“, ve které získala zvláštní cenu firmy Metrohm Česká republika za nejlepší práci v oblasti elektroanalytické chemie.**

(substrátové) elektrody za konstantní teploty metodou *in situ* nebo *ex situ*^{1,3,5}. Metoda *in situ* je proveditelná ve dvou variantách. První variantou je vyloučení povlaku bismutu přímo v analyzovaném roztoku. Nejčastěji používaným zdrojem bismutitých iontů je jejich dobře disociovatelná sůl – dusičnan bismutitý^{3,5}. Koncentrace přidávané bismutité soli jsou 10–20krát vyšší než předpokládané koncentrace stanovovaných iontů. Redukce soli probíhá za konstantního potenciálu (–1,0 až –1,4 V vs. Ag|AgCl), který umožňuje vyloučení filmu kovového bismutu. Takto vzniklý film bismutu vydrží pouze jedno měření a nakonec jsou jeho zbytky elektrochemicky odstraněny³. Druhou variantou provedení metody *in situ* je vyredukování kovového bismutu v průběhu samotného měření za pomoci pevného oxidu bismutitého, který je přimíchán do uhlíkových past či inkoustů. Kovový film je vyloučen při potenciálech –0,8 až –1,0 V vs. Ag|AgCl (cit.³). Metoda *ex situ* naopak spočívá ve vyloučení bismutového filmu ze speciálních pokovovacích roztoků. Vyloučené bismutové filmy metodou *ex situ* jsou stabilnější než u metody *in situ* a vydrží tak, pokud při rozpouštěním kroku nedojde k jejich oxidaci, po celou dobu měření^{3,6–8}.

BiBE se nejčastěji připravuje z bismutového drátku⁵ nebo nasátím roztaveného bismutu do skleněné kapiláry, jejíž konec je následně vyleštěn do tvaru disku^{1,3}. Více podrobností o přípravě a použití BiBE lze najít např. v pracích^{9,10}.

SBiDE (obr. 1) je nová pracovní elektroda komerčně dodávaná na český trh společností Metrohm od roku 2020 (cit.¹¹). Jedná se o kapku zatuhnutého kovového bismutu o průměru přibližně 2 mm na konci skleněné kapiláry. Dle výrobce lze tuto elektrodu použít bez leštění či další modifikace jejího povrchu pro stanovení nízkých koncentrací těžkých kovů v jezerech, řekách, podzemních vodách a především v kontaminované pitné vodě. Lze stanovovat



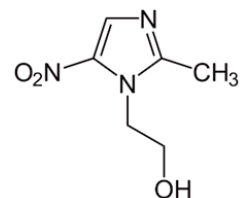
Obr. 1. Pevná bismutová kapková elektroda (SBiDE); převzato z materiálů poskytovaných výrobcem¹¹

nízké koncentrace od jednotek $\mu\text{g l}^{-1}$, někdy je však možné stanovit koncentraci již od jednotek ng l^{-1} . Elektroda je vhodná pro stopovou analýzu iontů těžkých kovů, jako jsou Cd, Pb, Ni, Co a Fe, proto dokáže v těchto stanoveních zcela nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu^{11,12}.

Metronidazol (obr. 2), neboli 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol, je bílý, popřípadě nažloutlý krystalický prášek omezeně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, ethanolu, dichlormethanu a v etheru. Jedná se o antibiotikum vyvinuté v roce 1960, používané pro léčbu onemocnění způsobených gram-pozitivními a gram-negativními anaerobními bakteriemi (především *Bacteroides fragilis*)^{13–16}.

V literatuře jsou jako nejčastější analytické metody pro stanovení metronidazolu uváděny elektrochemické metody (DC voltametrie, diferenční pulzní voltametrie (DPV) či square-wave voltametrie)^{16–18}, separační metoda HPLC–UV¹⁶ nebo optické metody UV-Vis absorpční spektrofotometrie¹⁶ a fluorescenční spektrofotometrie¹⁹. V tab. I jsou uvedeny vybrané příklady stanovení metronidazolu metodou DPV na různých pracovních elektrodách a pro srovnání jsou uvedeny i výsledky této studie. Přítomnost metronidazolu lze také dokázat pomocí lékopisné metody²⁰ složené ze dvou hlavních kroků. Prvním krokem je detekce na základě teploty tání, která se pohybuje v rozmezí 159–163 °C. Druhým krokem je zaznamenání infračerveného absorpčního spektra, které se porovná se spektrem standardu metronidazolu. Stanovení metronidazolu lékopisnou metodou²⁰ spočívá v rozpuštění 0,1500 g vzorku metronidazolu v 50 ml bezvodé octové kyseliny a titraci vzniklého roztoku 0,1M HClO₄. Bod ekvivalence je určen potenciometricky s platinovou indikační elektrodou a kalomelovou nebo argentchloridovou referenční elektrodou.

Metronidazol byl v tomto výzkumu zvolen jako modelové léčivo reprezentující elektrochemicky redukovatelné biologicky aktivní látky. Cílem této práce bylo ověření využitelnosti nového typu komerčně dodávané bismutové pracovní elektrody (SBiDE) při voltametrickém (DPV) stanovení modelové organické látky, přičemž dle dostupných informací se jedná o zcela první ve světě publikovanou práci na toto téma. Cyklická voltametrie (CV) na SBiDE byla v této studii použita pro charakterizaci katodické redukce metronidazolu a nově vyvinutá DPV metoda byla úspěšně aplikována při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody a v různých lékových



Obr. 2. Strukturální vzorec metronidazolu

Tabulka I

Příklady stanovení metronidazolu metodou DPV s uvedením dosažených mezí detekce (*LOD*) a stanovitelnosti (*LOQ*)

Elektroda ^a	Prostředí	Lineární rozsah [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	<i>LOD</i> [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	<i>LOQ</i> [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
AgSE	BR pufr pH 10,0	1–400	0,55	1,8	17
BiF-PLE	BR pufr pH 4,0	0,2–2 a 2–30	0,039	0,13	18
DMIP/CPE	BR pufr pH 5,0	0,4–200	0,091	0,30	21
DNA/GCE	0,1M octanový pufr pH 4,5	1–100	1,7	5,7	22
GCE	0,1M octanový pufr pH 4,5	2,9–100	3,4	11	22
HMDE	BR pufr pH 9,0	0,23–1,8	0,036	0,12	23
m-AgSAE	BR pufr pH 8,0	2–100	0,057	0,19	24
p-AgSA-CE	BR pufr pH 4,0	2–100	1,2	4,0	25
SBiDE	BR pufr pH 12,0	1–600	0,41	1,4	tato práce

^a AgSE – stříbrná pevná elektroda, BiF-PLE – bismutovým filmem modifikovaná tuhá elektroda, DMIP/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná polymerním hybridním filmem s duplexním molekulovým otiskem, DNA/GCE – elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná DNA, GCE – elektroda ze skelného uhlíku, HMDE – visící rtuťová kapková elektroda, m-AgSAE – rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda, p-AgSA-CE – leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda, SBiDE – pevná bismutová kapková elektroda

formách, kde jako srovnávací analytická metoda byla použita UV-Vis spektrofotometrie. Část tohoto výzkumu byla již dříve prezentována na studentské konferenci O cenu Karla Štulíka 2024 (cit.²⁶), přičemž tento článek představuje významné rozšíření soutěžního příspěvku zahrnující rovněž popis dalších experimentů a jejich výsledků.

Experimentální část

Chemikálie a vzorky

Zásobní roztok metronidazolu (p.a., Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Německo) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven v deionizované vodě. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův (BR) pufr připravený smíchaním zásadité složky (0,2M NaOH (p.a., Penta, Praha, ČR)) s kyselou složkou (85% H_3PO_4 , H_3BO_3 (p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a 99,8% CH_3COOH (p.a., Penta, Praha, ČR)) o koncentraci všech kyselin 0,04 mol l^{-1} . Pro optimalizaci prostředí autentických vzorků pitné vody byl použit vodný roztok chelatonu III (Na_2EDTA , p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentraci 0,1 mol l^{-1} . Pitná voda byla odebrána z vodovodního řádu v budově Chemického ústavu (Hlavova 8, Praha 2) Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

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

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru Eco-Tribo Polarograf ovládaného programem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Pro měření bylo použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita SBiDE (typ 6.0346.000, průměr kapky bismutu 2 mm, Metrohm, Herisau, Švýcarsko), jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda (typ 10-20+polaro Ag 10 10-2014-3, 3M KCl, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Byla použita technika DPV s parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , potenciálový krok 3 mV, šířka pulzu 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), výška pulzu –50 mV a perioda pulzu 150 ms. CV využívala rychlosti polarizace 10–1000 mV s^{-1} a potenciálový krok 3 mV. Ve voltametrické nádobce byly analyzované vzorky o celkovém objemu 20,0 ml.

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

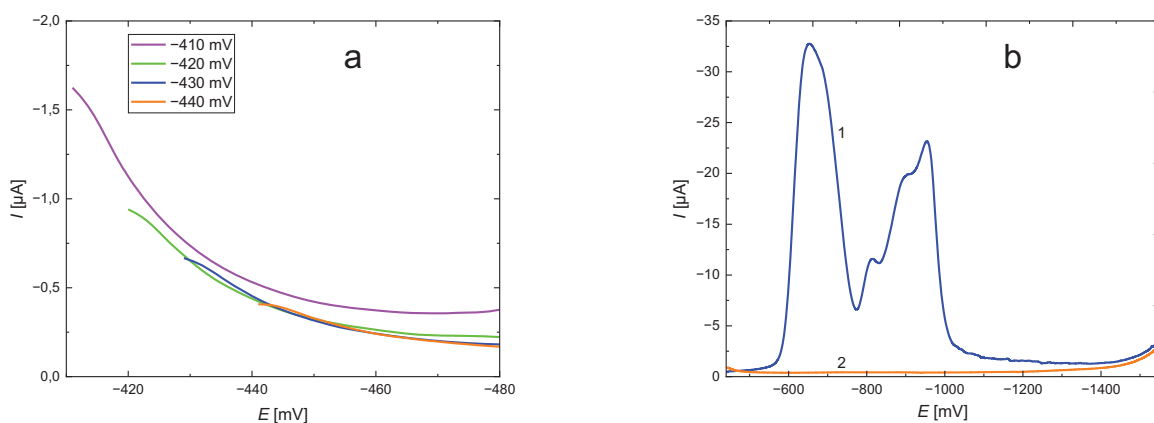
pH bylo měřeno pomocí digitálního pH metru Jenway 3510 (Jenway, Felsted, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Výsledky a diskuse

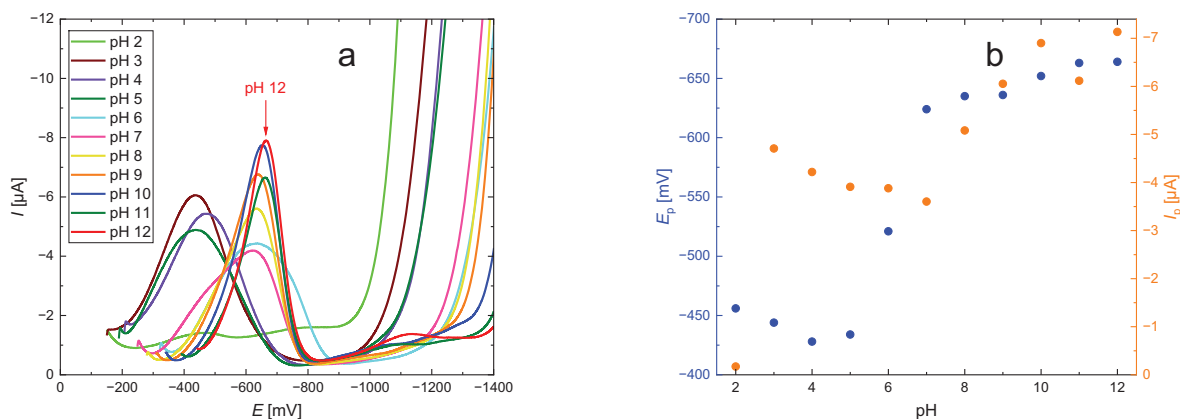
Voltametrické chování metronidazolu na pevné bismutové kapkové elektrodě

Prvním krokem bylo nalezení vhodného počátku potenciálového okna (E_{in}) tak, aby naměřený pík analytu byl co nejlépe vyvinutý, vyhodnotitelný a voltamogramy základního elektrolytu vykazovaly co nejnižší proud pozadí (obr. 3a). SBiDE je velmi citlivá na použití potenciálů, při kterých dochází k tvorbě oxidů bismutu anebo rozpouštění bismutu samotného. Pokud byla bismutová elektroda ponechána v roztoku pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, bismut začal oxidovat a vzniklé oxidy byly následně při prvním voltametrickém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou píku (obr. 3b).

Dalším krokem při vývoji DPV metody bylo nalezení vhodného základního elektrolytu. Voltametrické chování metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ bylo zkoumáno ve vodném prostředí BR pufru o pH 2,0–12,0. Z obr. 4a je patrné, že metronidazol ve vodném roztoku BR pufru v rozmezí pH 3,0–12,0 poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, který odpovídá čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na odpovídající hydroxylaminoskupinu¹⁵. Za povšimnutí jistě stojí skutečnost, že potenciál píku (E_p) metronidazolu se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám v určité sigmoidní závislosti (obr. 4b), přičemž běžný trend pozorovaný u tohoto analytu na elektrodách z jiných materiálů se posun E_p s pH lineární, s hodnotou směrnice blízké se očekávané teoretické hodnotě -59 mV pH^{-1} (cit.^{21,24,25}). Pro tento jev však momentálně nemáme žádné vysvětlení a bude v rámci dalšího výzkumu zkoumán, především prostřednictvím studia



Obr. 3. (a) Nalezení počátku potenciálového okna vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 na SBiDE technikou DPV (cit.²⁶). (b) Příklad prvního (1) a druhého (2) měření ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 na SBiDE technikou DPV při $E_{in} = -440 \text{ mV}$ (cit.²⁶). Barevná verze všech obrázků je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy

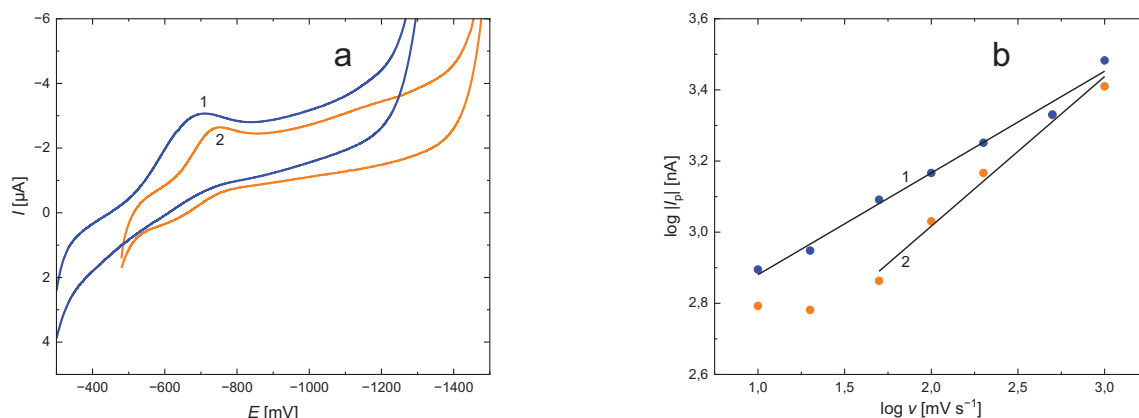


Obr. 4. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE ve vodných roztocích BR pufru o pH 2,0–12,0 (cit.²⁶). (b) Odpovídající závislost potenciálu píku (E_p) a výšky píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na pH

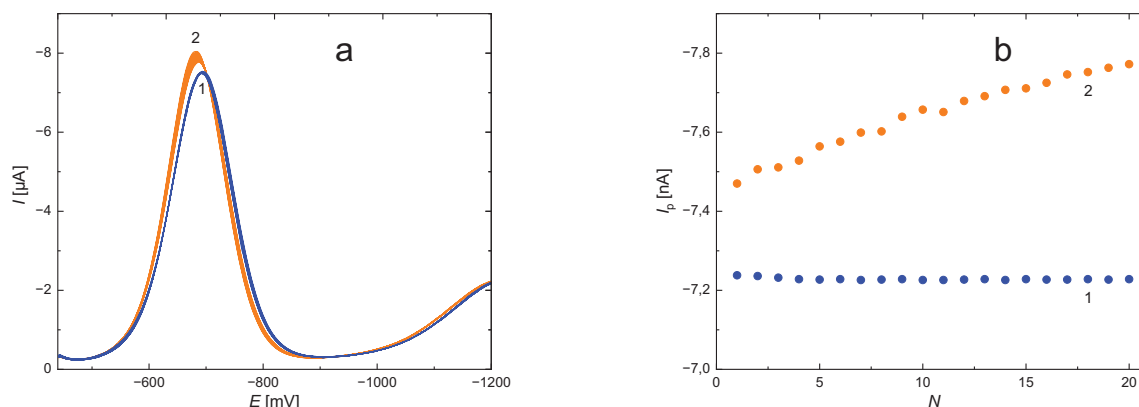
dalších strukturálně podobných elektrochemicky aktivních látek na SBiDE. Jako optimální prostředí pro další měření byl vybrán vodný roztok BR pufru o pH 12,0, protože toto prostředí poskytovalo dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu (I_p) analytu (obr. 4b).

Voltametrické chování metronidazolu na SBiDE bylo rovněž zkoumáno pomocí CV, přičemž hlavní důraz byl kladen na určení reverzibility elektrodové reakce při redukcí nitroskupiny přítomné ve struktuře metronidazolu a na zjištění, jakým dějem je tato reakce, resp. celý elektrodový proces, na SBiDE kontrolována. Vliv různých rychlostí polarizace (10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1}) na chování metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při CV byl zkoumán ve třech různých prostředích – kyselém (BR pufr o pH 3,0), neutrálním (BR pufr o pH 7,0) a zásaditém (BR pufr o pH 12,0). V kyselém prostředí nebylo

možné na získaných voltamogramech vyhodnotit odezvu metronidazolu. CV metronidazolu v neutrálním a zásaditém prostředí při rychlosti polarizace 200 mV s^{-1} jsou zobrazeny na obr. 5a, přičemž je patrné, že elektrodová reakce odpovídající čtyřelektronové redukcí nitroskupiny na odpovídající hydroxylaminoskupinu je i na SBiDE ireverzibilní (resp. v prostředí o pH 12,0 ji lze považovat i za kvazi-reverzibilní). V obou zkoumaných prostředích byly při jednotlivých rychlostech polarizace (ν) vyhodnoceny výšky píku (I_p) metronidazolu a do grafu byly vyneseny závislosti $\log |I_p|$ vs. $\log \nu$ (obr. 5b), z jejichž absolutních hodnot směrnice ($|k|$) je možné určit, jakým krokem (nejčastěji difuze analytu při $|k| = 0,5$, adsorpce analytu při $|k| = 1,0$ či kinetika elektrodové reakce při $0 < |k| < 0,5$) jsou elektrodové děje na SBiDE kontrolovány²⁸. V neutrálním prostředí byla získána závislost logaritmu



Obr. 5. (a) Cyklické voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE při rychlosti polarizace (ν) 200 mV s^{-1} ve vodném roztoku BR pufru o pH 7,0 (1) a 12,0 (2). (b) Závislost $\log |I_p|$ metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na $\log \nu$ změřená pomocí cyklické voltametrie na SBiDE v rozmezí rychlostí polarizace 10–1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufru o pH 7,0 (1) a 12,0 (2)



Obr. 6. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) ($n = 20$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 bez použití regeneračních potenciálů (1) a s regeneračními potenciály $E_{\text{in}_r} = -490 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}_r} = -1500 \text{ mV}$ (2). (b) Odpovídající závislost proudové odezvy (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) ($n = 20$), měřeno na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0 technikou DPV bez použití regeneračních potenciálů (1) a s regeneračními potenciály $E_{\text{in}_r} = -490 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}_r} = -1500 \text{ mV}$ (2) (cit.²⁶)

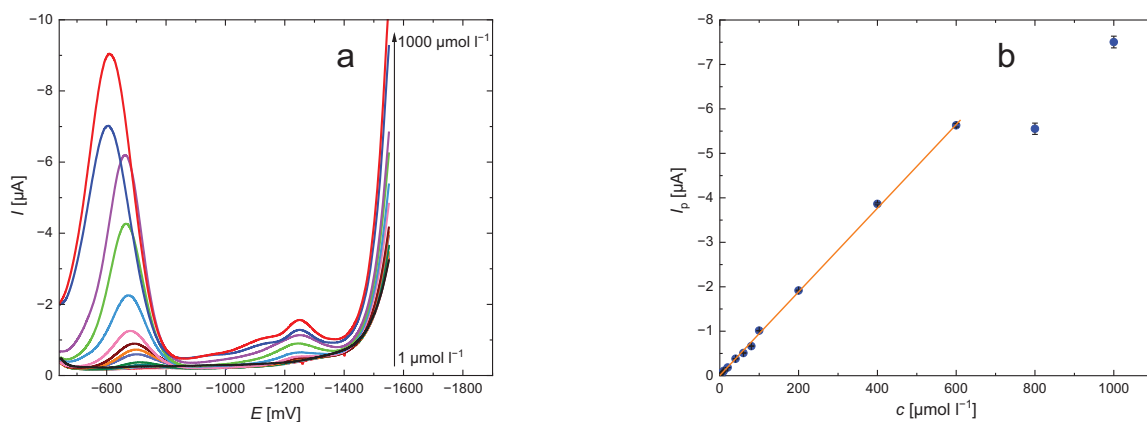
absolutní hodnoty výšky píku metronidazolu na logaritmu rychlosti polarizace s absolutní hodnotou směrnice 0,29 a $r^2 = 0,9891$ (obr. 5b, závislost 1). To značí, že v tomto prostředí je elektrodový děj kontrolovaný čistě kinetikou elektrodové reakce, tedy její nízkou rychlostí. V zásaditém prostředí (obr. 5b, závislost 2) nelze získanou závislost spolehlivě proložit přímkou v celém studovaném intervalu rychlostí polarizace, avšak je možné ji proložit v rozmezí vyšších rychlostí polarizace 50–1000 mV s^{-1} a získat absolutní hodnotou směrnice 0,42 a $r^2 = 0,9871$, které nasvědčují ději kontrolovanému spíše difuzí; v rozmezí rychlostí polarizace 50–200 mV s^{-1} je vliv difuze již zcela převažující ($|k| = 0,50$ a $r^2 = 0,9965$).

Dále bylo zjišťováno, zda je nutné provádět elektrochemickou regeneraci při opakovaných DPV stanoveních metronidazolu na SBiDE, aby nedocházelo k pasivaci pracovní elektrody a stanovení vykazovala dobrou opakovatelnost. Regenerační potenciály²⁷ $E_{\text{in,r}} = -490$ mV a $E_{\text{in,r}} = -1500$ mV byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech). Aplikované regenerační potenciály mírně zvýšily proudovou odezvu metronidazolu (obr. 6a), avšak zhoršily opakovatelnost (docházelo k postupnému nárůstu výšky píku; obr. 6b, sada bodů 2 s hodnotou $s_r = 1,2$ %, $n = 20$), proto byla následující měření technikou DPV prováděna bez vkládání těchto regeneračních potenciálů (obr. 6b, sada bodů 1 s hodnotou $s_r = 0,045$ %, $n = 20$).

Voltametrické stanovení metronidazolu na pevné bismutové kapkové elektrodě

Kalibrační závislosti metronidazolu byly měřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} . Kalibrace byla proměřena kromě optimálního prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 také v prostředích o pH 3,0 a 7,0. Jevilo se jako zajímavé zjistit, jaký průběh bude mít koncentrační závislost metronidazolu v kyselém či neutrálním prostředí, avšak bylo potvrzeno, že pro stanovení metronidazolu je kyselé i neutrální prostředí nevyhovující. Kalibrační závislost v prostředí BR pufru o pH 12,0 je lineární v koncentračním rozsahu metronidazolu $1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Mez stanovitelnosti (LOQ ; $10\sigma/k$) činila $1,4$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ a mez detekce (LOD ; $3\sigma/k$) $0,41$ $\mu\text{mol l}^{-1}$. Na obr. 7a jsou znázorněny DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) v prostředí BR pufru o pH 12,0. Na obr. 7b je zobrazena odpovídající kalibrační závislost výšky píku metronidazolu na jeho koncentraci ($c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}). V tab. II jsou uvedeny parametry jednotlivých kalibračních přímk.

U řady organických elektrochemicky aktivních sloučenin je možné pro další zvýšení citlivosti jejich stanovení (a tedy snížení hodnot LOD a LOQ) využít vložením potenciálem stimulovanou adsorpční akumulaci analytu na povrch pracovní elektrody^{29,30}. V případě stanovení metronidazolu na SBiDE však nebylo možné techniku diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie použít, proto-



Obr. 7. (a) DP voltamogramy metronidazolu ($c = 1-1000$ $\mu\text{mol l}^{-1}$) zaznamenané na SBiDE ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0; černá barva značí základní elektrolyt (cit.²⁶). (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci metronidazolu ($c = 1-1000$ $\mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$; rovnice regrese: I_p [nA] = $-9,47c$ [$\mu\text{mol l}^{-1}$] - $0,585$; $r^2 = 0,9993$ (cit.²⁶)

Tabulka II

Parametry kalibračních přímk metronidazolu pro techniku DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0

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

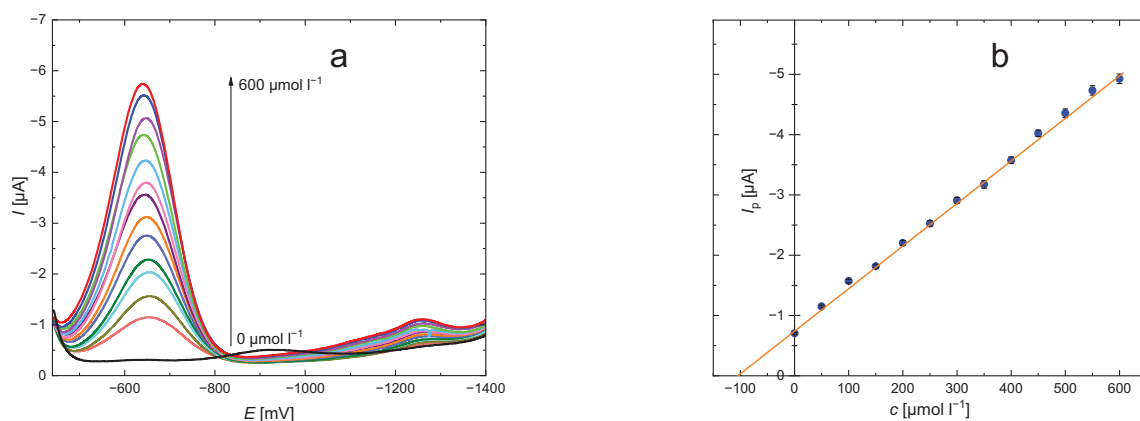
že mezi začátkem využitelného potenciálového okna ohraničeného elektrochemickou oxidací povrchu bismutové kapky (-440 mV, obr. 3a) a mezi potenciálem píku metronidazolu (cca -700 mV, obr. 7a) se nenachází žádné pro tento účel vhodné akumulární potenciály, při kterých by buďto nedocházelo k degradaci povrchu pracovní elektrody, nebo k nechtěné elektrolýze metronidazolu.

Aplikovatelnost nově vyvinuté DPV metody byla ověřena při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody. Pitná voda byla odebrána z vodovodní sítě v budově Chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Autentické vzorky o objemu 20,0 ml byly tvořeny 18,0 ml pitné vody obsahující přídavný standard metronidazolu o určité koncentraci a 2,0 ml BR pufru o pH 12,0, které navíc obsahovaly nezbytný přídavek 100 μ l roztoku chelatonu III o koncentraci 0,1 mol Γ^{-1} pro potlačení interferujícího vlivu kationtů přítomných v pitné vodě^{6,7}. Kalibrační závislost metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody byla měřena v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} s rovnicí regrese celkové lineární závislosti: I_p [nA] = $-6,47c$ [μ mol Γ^{-1}] - 132; $r^2 = 0,9586$ ($LOD = 1,8$ μ mol Γ^{-1} a $LOQ = 5,8$ μ mol Γ^{-1}). Z nižší hodnoty směrnice získané závislosti oproti závislostem z obr. 7b a tab. II je patrné, že matrice pitné vody mírně

snižuje citlivost stanovení, přičemž určitou roli zde hraje i nařazení autentických vzorků pitné vody základním elektrolytem v objemovém poměru 9:1.

Stanovení metronidazolu v lékových formách

Voltametrické stanovení metronidazolu v léčivech bylo prováděno metodou přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, v tabletě Entizol 250 mg, vaginální tablety Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml. Pro měření metodou DPV byly připraveny roztoky 20,0 ml BR pufru o pH 12,0, které obsahovaly 200 μ l zásobního roztoku léčiva bez přídavku a s přídavkem 50 μ l zásobního roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol Γ^{-1}), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 50 μ l. Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} . Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu $5 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1} . Na obr. 8a jsou pro ilustraci ukázány DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané při jeho stanovení v tabletě Entizol 250 mg a na obr. 8b je znázorněna závislost výšky píku na kon-

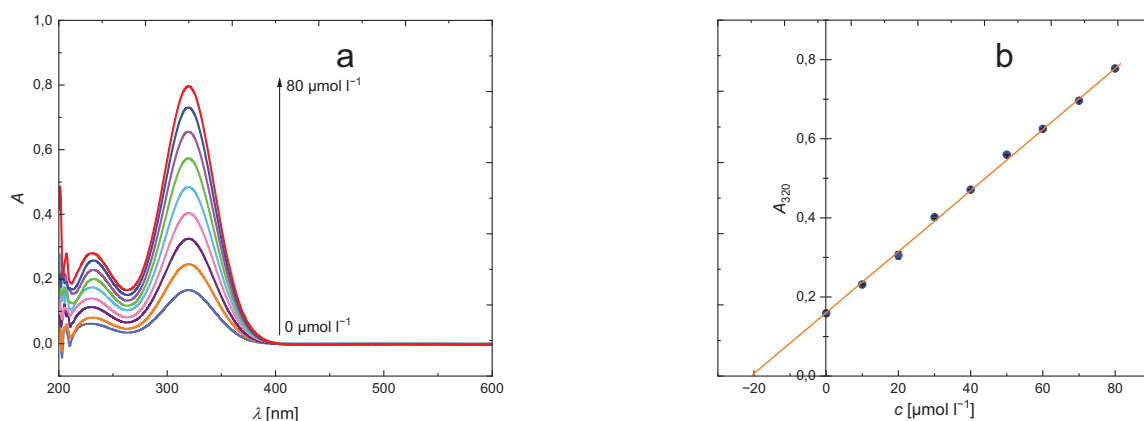


Obr. 8. (a) DP voltamogramy metronidazolu zaznamenané na SBiDE ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přídavným standardem analytu ($c = 0-600$ μ mol Γ^{-1}) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0-600$ μ mol Γ^{-1}); chybové úsečky pro $n = 5$

Tabulka III

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí DPV na SBiDE v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0

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



Obr. 9. (a) Absorpční spektra metronidazolu zaznamenaná v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm ve vzorcích tvořených podílem tablety Entizol 250 mg a přidáním standardem analytu ($c = 0\text{--}80\ \mu\text{mol l}^{-1}$) při použití metody přidavku standardu ve vodném roztoku BR pufru o pH 12,0. (b) Závislost absorbance při vlnové délce 320 nm (A_{320}) na koncentraci přidávaného standardu metronidazolu v tabletě Entizol 250 mg ($c = 0\text{--}80\ \mu\text{mol l}^{-1}$); chybové úsečky pro $n = 5$

centraci přidávaného standardu metronidazolu v téže tabletě. V tab. III jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidávaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech.

Jako srovnávací metoda k voltametričkému stanovení metronidazolu v léčivech pomocí metody přidavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek byla použita UV-Vis absorpční spektrofotometrie. Pro měření metodou přidavku standardu byly připraveny roztoky 10,0 ml BR pufru o pH 12,0, které obsahovaly 200 μl zásobního roztoku léčiva bez přidavku a s přidavkem 100 μl zásobní-

ho roztoku standardu ($c = 1 \cdot 10^{-3}\ \text{mol l}^{-1}$), jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 μl . Stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran probíhalo v koncentračním rozmezí přidávaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $6 \cdot 10^{-5}\ \text{mol l}^{-1}$. Stanovení metronidazolu v tabletách a infuzním roztoku Noridem probíhalo v koncentračním rozmezí přidávaného standardu $1 \cdot 10^{-5}$ – $8 \cdot 10^{-5}\ \text{mol l}^{-1}$. Na obr. 9a jsou pro ukázkou uvedeny UV-Vis absorpční spektra metronidazolu zaznamenaná při jeho stanovení v tabletě Entizol 250 mg, na obr. 9b je znázorněna odpovídající závislost absorbance při vlnové délce 320 nm na koncen-

Tabulka IV

Parametry lineárních koncentračních závislostí přidávaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech získané pomocí UV-Vis spektrofotometrie při vlnové délce 320 nm v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 12,0 v rozsahu vlnových délek 200–1100 nm

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

Tabulka V

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

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

traci přidaného standardu metronidazolu. V tab. IV jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu metronidazolu v jednotlivých léčivech. V tab. V jsou porovnané výsledky získané pomocí DPV na SBiDE a UV-Vis spektrofotometrie.

Závěr

V této práci byla studována nová komerčně dostupná pracovní elektroda – pevná kapková bismutová elektroda (SBiDE) – a zkoumáno její využití pro voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV). Za optimálních podmínek bylo v prostředí BR pufru o pH 12,0 dosaženo $LOD = 0,41 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $LOQ = 1,4 \mu\text{mol l}^{-1}$. Nově vyvinutá DPV metoda byla rovněž úspěšně použita při stanovení metronidazolu v autentických vzorcích pitné vody ($LOD = 1,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $LOQ = 5,8 \mu\text{mol l}^{-1}$) a v různých lékových formách – v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablete Entizol 250 mg, vaginální tablete Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml. Jako srovnávací analytická metoda byla u lékových forem použita UV-Vis spektrofotometrie.

U infuzního roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tablety Entizol 250 mg a vaginální tablety Entizol 500 mg jsou hodnoty stanoveného množství léčiva metronidazolu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) za daných optimálních podmínek při použití DPV na SBiDE a UV-Vis spektrofotometrie srovnatelné. U infuzního roztoku Noridem 500 mg/100 ml bylo voltametrickou metodou stanoveno 78 % metronidazolu a spektrofotometrickou metodou bylo stanoveno 106 % metronidazolu. Z toho vyplývá, že DPV na SBiDE je vhodná pro stanovení metronidazolu v následujících lékových formách: infuzní roztok Efloran 500 mg/100 ml, tableta Entizol 250 mg a vaginální tableta Entizol 500 mg.

LITERATURA

- Lezi N., Vyskočil V., Economou A., Barek J., v knize: *Sensing in Electroanalysis, Vol. 7* (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vytřas K., ed.), str. 71–78. University Press Centre, Pardubice 2012.
- Abdallah R., Derghane A., Lou Y.-Y., Merdrignac-Conanec O., Floner D., Geneste F.: *J. Electroanal. Chem.* 839, 32 (2019).
- Švancara I., Vytřas K.: *Chem. Listy* 100, 90 (2006).
- Hutton E. A., Ogorevc B., Hočevar S. B., Smyth M. R.: *Anal. Chim. Acta* 557, 57 (2006).
- Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 117, 3 (2023).
- Deýlová D., Vyskočil V., Barek J., Economou A.: *Talanta* 102, 68 (2012).
- Deýlová D., Vyskočil V., Economou A., Mansfeldová V., Barek J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 9, 4653 (2014).
- Švancara I., Sýs M.: *Chem. Listy* 118, 525 (2024).
- Prchal V., Ottenschlägerová A., Vyskočil V., Barek J.: *Anal. Lett.* 49, 49 (2016).
- Prchal V., Vyskočil V., Barek J.: *J. Electrochem. Soc.* 164, H316 (2017).
- Metrohm: https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html, staženo 24. 8. 2024.
- Švancara I., Prior C., Hočevar S. B., Wang J.: *Electroanalysis* 22, 1405 (2010).
- Raether W., Hänel H.: *Parasitol. Res.* 90, S19 (2003).
- Edwards D. I.: *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9 (1993).
- Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C.: *Drugs* 54, 679 (1997).
- Meenakshi S., Rama R., Pandian K., Gopinath S. C. B.: *Microchem. J.* 165, 106151 (2021).
- Mráček O., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 115, 669 (2021).
- Asadpour-Zeynali K., Majidi M. R., Najafi-Marandi P., Norysaray Z.: *J. Chin. Chem. Soc.* 60, 1253 (2013).
- Yang X., Liu M., Yin Y., Tang F., Xu H., Liao X.: *Sensors* 18, 964 (2018).
- Český lékopis*. Grada Publishing, Praha 2017.
- Xiao N., Deng J., Cheng J., Ju S., Zhao H., Xie J., Qian D., He J.: *Biosens. Bioelectron.* 81, 54 (2016).
- Brett A. M. O., Serrano S. H. P., Gutz I., La-Scalea M. A.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42, 175 (1997).
- Gui Y., Ni Y. N., Kokot S.: *Chin. Chem. Lett.* 22, 591 (2011).
- Škvorová L.: *Voltametrické stanovení vybraných nitroimidazolových léčiv. Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012.
- Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčová Z., Škvorová L., Tvrđíková J., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 129 (2011).
- Jarošová J., Vyskočil V.: *Czech Chem. Soc. Symp. Ser.* 22, 61 (2024). doi: 10.54779/ccsss20240061.
- Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2957 (2011).
- Brett C. M. A., Brett A. M. O.: *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Barek J., Peckova K., Vyskočil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).
- Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 103, 889 (2009).

J. Jarošová and V. Vyskočil (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, Czech Republic): **Voltammetric Determination of the Drug Metronidazole Using a Solid Bismuth Drop Electrode**

Solid bismuth drop electrode (SBiDE) is a new working electrode commercially available on the Czech market since 2020 by the company Metrohm. The aim of this work was to verify the applicability of SBiDE for the voltammetric determination of a model organic substance

representing electrochemically reducible biologically active compounds, namely, the drug metronidazole (an antibiotic used to treat diseases caused by both Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria). To the best of our knowledge, this is the very first published research work using SBiDE. Under optimum conditions (Britton-Robinson buffer of pH 12.0 was used as the supporting electrolyte and the working electrode surface was not electrochemically regenerated), a linear calibration dependence of metronidazole was obtained using differential pulse voltammetry (DPV) in the concentration range from 1 to 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with the limits of detection (*LOD*) and quantification (*LOQ*) of 0.41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Cyclic voltammetry (CV) on SBiDE was

used to characterize the electrode process of the irreversible reduction of metronidazole. The newly developed DPV method was also successfully applied for the determination of metronidazole in authentic drinking water samples (*LOD* = 1.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and *LOQ* = 5.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and in various dosage forms (UV-Vis spectrophotometry was used as a comparative analytical method).

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: metronidazole, antibiotics, drug analysis, electrochemistry, differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry, solid bismuth drop electrode, UV-Vis spectrophotometry



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

NOVÉ MOŽNOSTI PRO VÝZKUM TERANOSTIK U CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODY

Publikace je věnována 100. výročí založení Katedry analytické chemie PŘF UK Praha.

MICHAELA KUCHYNKA^{a,b,c}, JAN BISKUPIČ^a, MAGDALENA ONUŠČÁKOVÁ^a, PETER SCHEER^c,
JANA HLOŽKOVÁ^c a VIKTOR KANICKÝ^b

^a Ústav chemických léčiv, Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno, ^b Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^c Ústav farmakologie a toxikologie, Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno, Česká republika
viktork@chemi.muni.cz

Došlo 16.9.24, přijato 15.10.24.

Cévní mozková příhoda, infarkt myokardu a plicní embolie představují významnou zdravotní zátěž pro současnou společnost, přičemž jejich hlavní příčinou jsou krevní sraženiny a poškození vnitřní výstelky cév (endotelu). Přesná a rychlá diagnostika těchto sraženin, zejména určení jejich stáří, je klíčová pro optimální volbu léčebného postupu, jako je trombolýza (farmakologické rozpuštění sraženiny) nebo trombektomie (mechanické odstranění sraženiny). Stávající diagnostické metody však nedosahují požadované úrovně přesnosti a efektivity.

Tento článek zkoumá potenciál jodovaných nanočástic (IoNP) na bázi polyjodovaných biodegradabilních polymerů, které mohou cíleně vyhledávat specifické složky, jako je fibrin, a umožnit tak vizualizaci krevních sraženin pomocí rentgenových zobrazovacích metod, jako je počítačová tomografie (CT) nebo skiaskopie. Nanočástice mají schopnost nejen zobrazit sraženiny, ale také odhadnout jejich stáří, což by mohlo výrazně podpořit moderní teranostický přístup, který kombinuje diagnostiku a terapii.

Článek také demonstruje možnosti testování farmakokinetiky těchto teranostik pomocí modelového organismu (potkana), využívající metodu laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Tento přístup přispívá k lepšímu porozumění biodegradability potenciálních léčiv a představuje klíčový krok v preklinickém hodnocení.

Klíčová slova: cévní mozková příhoda, teranostika, laserová ablace, nanočástice

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, zejména ischemická choroba srdeční a cerebrovaskulární neboli cévní mozkové příhody (CVP), jsou hlavními příčinami úmrtí ve vyspělých zemích. Dle údajů WHO byly v roce 2020 zodpovědné za více než 50 % úmrtí¹. Nejčastějším typem CVP je ischemická cévní mozková příhoda (CMP), která představuje přibližně 80 % všech příhod. U přeživších mohou komplikace spojené s cévní mozkovou příhodou přetrvávat po dlouhou dobu. Dokonce i po 15 letech žijí dvě třetiny pacientů s postižením, téměř dva z pěti trpí depresí a více než čtvrtina kognitivními poruchami. Kromě toho se u pacientů s cévní mozkovou příhodou mnohem častěji objevují další onemocnění a zdravotní komplikace². Z tohoto důvodu je nezbytné brát v úvahu také ekonomickou zátěž s ní spojenou. V Evropské unii (EU) činily celkové náklady na cévní mozkovou příhodu v roce 2015 45 miliard euro a v roce 2017 se zvýšily na 60 miliard euro (cit.³). Pouze 45 % této částky bylo vynaloženo na přímé

náklady na zdravotní péči. Zbývající rozpočtová položka byla určena na nepřímé náklady spojené s dlouhodobou léčbou, rehabilitací a ztrátou produktivity. V přepočtu činí roční náklady na léčbu každého pacienta s cévní mozkovou příhodou 3 483 euro, tj. 59 euro na občana EU. Statistické prognózy ukazují, že počet případů tohoto onemocnění v EU se do roku 2035 zvýší až o 36 %. Kromě toho je třeba věnovat pozornost také cévním mozkovým příhodám spojeným s pandemií koronaviru SARS-CoV-2. Ten se prokázal jako vysoce protrombotický (podporuje vznik sraženin) a může způsobit mikrovaskulární (malé krevní cévy – arterioly, kapiláry a venuly) a makrovaskulární (velké krevní cévy – tepny a žíly) trombózu (stav, při kterém dochází k tvorbě krevní sraženiny uvnitř cévy) v různých orgánech. Během pandemie koronaviru mnoho obyvatel váhalo s vyhledáním lékařské pomoci, což vedlo ke snížení počtu hospitalizací u méně závažných příhod a zvýšení hospitalizace u závažnějších případů a k zvýšení úmrtnosti. Jejím vlivem na společnost a systémy zdravotní péče je tedy potřeba se zabývat, aby bylo možné zlepšit

léčebné postupy cévních mozkových příhod a připravit se na možné budoucí epidemie⁴.

Vzhledem k významnému společenskému a ekonomickému dopadu je nejdůležitější otázkou zlepšení dlouhodobé prognózy přeživších a jejich návrat do normálního a produktivního života. Klíčem k úspěchu je čas (co nejkratší). Včasnost diagnostiky a léčby je prvořadá, přesto je odhalení počátku cévní mozkové příhody stále náročné, zejména v případech, kdy se příznaky projeví během spánku, tedy přesný čas počátku cévní mozkové příhody není znám (WUS, z angl. wake up stroke). Tito pacienti tvoří 20–25 % případů tohoto onemocnění a jsou často vyloučeni z konvenční léčby, což vede k horším výsledkům. V současné době se cévní mozková příhoda úspěšně diagnostikuje, nejčastěji s využitím počítačové tomografie (CT) nebo zobrazovací magnetické rezonance (MRI). Posouzení stáří cévní mozkové příhody však není možné, ačkoliv je pro další personalizovanou léčbu nesmírně důležité. Přizpůsobení léčby každému pacientovi vede k vyšší úspěšnosti při záchraně života, zmírnění případné invalidity a nepřímo i ke snížení ekonomické zátěže společnosti.

Strategie léčby mrtvice

U pacientů s akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou existují tři možnosti léčby. První možností je farmakologická léčba, kdy se přistupuje k aplikaci trombolitika (léčivo používané k rozpouštění krevních sraženin působící tak, že aktivuje enzymy, které štěpí fibrin – hlavní složku krevní sraženiny), čímž obnovuje průtok krve. V České republice je schválena pouze altepláza (rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu, t-PA) pro rozpuštění sraženiny vzniklé v krevním řečišti při mozkové příhodě. Další možností je trombektomie, tedy odstranění této sraženiny mechanicky pomocí katetrů, třetí případ je kombinace trombolýzy a trombektomie. Cílem všech těchto postupů je rekanalizace cévy, tedy obnovení její průchodnosti poté, co byla uzavřena⁵. Co nejrychlejší zahájení léčby pacientů je zásadní, protože „čas je mozek“. Každá hodina prodlení zhoršuje prognózu plného uzdravení o 15 %. Jak trombolýza, tak mechanická trombektomie mají svoje výhody i svá rizika. Hlavní výhodou trombolytického přístupu je nízká cena, nenáročnost na vybavení a velmi rychlé podání léčiva. Základním předpokladem pro použití intravenózní alteplázy je doba její aplikace. Nevýhodou je úzké terapeutické okno, lze ji použít pouze do 4,5 hodiny od jasně definovaného počátku příznaků. Další nevýhodou je nízká účinnost u velkých trombů a zvýšené riziko jak systémového, tak intrakraniálního krvácení. Výhodou mechanické trombektomie je naopak delší terapeutické okno (do 6 hodin, v indikovaných případech i více) a možnost vyřešit i okluzi velkými tromby. Nevýhoda spočívá v závislosti výsledků léčby na zkušenostech neuroradiologa, je mnohem finančně náročnější a její zahájení je vzhledem k nutným přípravám pozdější. Nebezpečím může být rozdělení sraženiny na více částí, které se mohou uvolnit dále do krevního řečiště.

Nejkritičtější podmínkou je identifikace penumbry, tj. již neprokrvované oblasti mozku ale stále ještě potenciálně zachrannitelné, nikoli již mrtvé mozkové tkáně. Bohužel v mnoha zemích stále ještě neexistuje dobrá síť specializovaných center pro léčbu cévních mozkových příhod s nepřetržitou péčí⁶.

Zobrazování sraženin *in situ*

Informace o velikosti, složení a původu sraženiny mají potenciál poskytnout zásadní podklady pro volbu léčebné strategie nejen u samotné cévní mozkové příhody, ale mohou pomoci i při diagnostice a léčbě dalších závažných kardiiovaskulárních onemocnění, jako jsou arteriální embolizace, infarkt myokardu nebo ledvin, plicní embolie a hluboká žilní trombóza⁷. Dnešní zobrazovací metody (např. CT, rentgen, ECHO – echokardiografie, tedy ultrazvuk k vyšetření srdce) umožňují spolehlivou vizualizaci sraženin. Ty se skládají především z trombocytů, červených a bílých krvinek a fibrinových vláken. Podle množství těchto složek existují tři typy sraženin (a) bílé sraženiny (vysoké množství fibrinu), (b) červené sraženiny (bohaté na červené krvinky) a (c) smíšené. Moderní zobrazovací metody detegují umístění sraženiny s velkou přesností, ale zobrazení sraženiny je reálné pouze v případě, že se jedná o červené sraženiny. Ty se velice dobře rozpouštějí a nejsou tak léčebnou výzvou. Hlavním problémem zůstává určení velikosti a charakteru sraženiny. Bílé sraženiny mají vysoký podíl fibrinu, jsou rezistentní k trombolýze, a proto je jejich vizualizace klíčová pro volbu správné léčebné strategie.

Teranostika

Teranostika je poměrně nová oblast medicíny a v současné době se jeví jako velmi vhodný nástroj personalizované medicíny, která je v mnoha případech při nastavení správné a účinné léčby nezbytná. Termínem teranostika označujeme spojení terapeutických a diagnostických přístupů do jednoho celku. Vytvoří se tak proces, který je současně diagnostikou, monitorováním a léčbou onemocnění za použití jednoho nástroje, látky nebo metody. Základním konceptem teranostiky je současně fungování diagnostického a léčebného prvku při jediné aplikaci. Cílem teranostiky bylo vytvořit pro různé patologické projevy specifickou a selektivní léčbu a tím dosáhnout zefektivnění terapie, přizpůsobení terapie na základě monitorování léčby a následně snížení pravděpodobnosti výskytu nežádoucích účinků⁸.

Odborný výraz teranostika byl poprvé použit v roce 1998 Johnem Funkhouserem⁹ a již léta se přístup teranostiky uplatňuje v nukleární medicíně, kde je úspěšně používána a má svůj nezastupitelný význam při léčbě např. nádorových onemocnění štítné žlázy. Postupně se teranostika dostává i do dalších oblastí medicíny vzhledem k postupnému rozvoji nanotechnologií. U nanočástic (NP) je předpoklad, že díky svým dobře modifikovatelným biolo-

gickým vlastnostem by mohly mít bohaté spektrum využití hlavně při rozvoji personalizované medicíny a teranostiky.

V nukleární medicíně je jako teranostikum vnímán specifický radioaktivní izotop, který je vázán na léčivou látku. Ta má pak selektivní afinitu k určitému typu tkáně, tj. váže se na receptory buněk¹⁰. V posledních letech se teranostika úspěšně aplikuje u celé řady nádorových onemocnění, jako je rakovina prostaty a neuroendokrinní nádory. Jedním z již registrovaných a v terapeutické praxi používaných teranostik je radioterapeutický konjugát zvaný ¹⁷⁷Lu-PSMA-617, který je určen k léčbě pokročilé rezistentní formy rakoviny prostaty. Tento preparát americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration) schválil začátkem roku 2022 pod obchodním názvem Pluvicto® (cit.¹¹). Léčivo ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 je kombinací radioaktivního izotopu lutecia-177 (¹⁷⁷Lu) a molekuly, která se váže na PSMA (prostate-specific membrane antigen), který je lokalizován na buňkách rakoviny prostaty. Diagnostickou složkou teranostika ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 je PSMA, které se váže na malformované buňky, pak je pomocí zobrazovací metody – pozitronové emisní tomografie – detegován radioaktivní izotop ¹⁷⁷Lu, který současně svým emitovaným zářením ničí rakovinové buňky¹⁰. Na stejném principu spojení molekuly s vysokou afinitou k určité tkáni a radioaktivního izotopu prvku fungují i další schválené preparáty: Zevalin (⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan)¹², Bexxar (¹³¹I-tositumomab)¹³ a Lutathera (¹⁷⁷Lu-Dotatate)¹⁴.

Teranostika založená na použití NP jako nosičů se ukazuje jako velmi perspektivní oblast v oboru medicíny. Nanočástice mohou být navázány s terapeutickými a diagnostickými látkami, což umožňuje pacientům zpřístupnit cílenější a efektivnější diagnostiku a léčbu onemocnění.

Prvním „nano“ léčivem registrovaným FDA byl Doxil® v roce 1995. Účinná látka doxorubicin je chemoterapeutikum, které se používá v terapii různých onkologických onemocnění, včetně rakoviny prsu, ovarií a Kaposiho sarkomu. Doxorubicin je obalen nanočásticemi – liposomální vrstvou, která je perspektivní pro umístění ligandů vázajících se na nádorové buňky, což zajišťuje jeho cílenější přístup k těmto buňkám, působí tak selektivně a snižuje vedlejší účinky léčby¹⁵.

Nanočásticové teranostikum najde uplatnění i v zobrazovacích metodách, kde jsou již používány nanočástice zlata nebo oxidu železitého, které podporují zvýšení kvality obrazu a tím zlepšení diagnostiky při použití MRI. Příkladem takové látky je Combindex® (ferumoxtran-10), který obsahuje syntetické magnetické nanočástice zlepšující kontrast ve snímcích MRI a případně i diagnostiku rakoviny lymfatických uzlin. Na povrch NP lze pak navázat samotné léčivo. Combindex® je však prozatím předmětem klinických hodnocení¹⁶.

Jodované nanočástice jako kontrastní látka

Nízkomolekulární jodované látky jsou nejstaršími kontrastními látkami používanými v medicíně s uplatněním pro zobrazování tkání pomocí rentgenového záření – skiagrafičká a CT angiografie. V současné době se v klinické praxi používá více než deset schválených jodovaných kontrastních látek¹⁷, které ovšem mají rychlou eliminaci z krve prostřednictvím ledvinové filtrace¹⁸, což omezuje optimální klinickou diagnostiku.

Nanočástice jsou v medicíně stále více využívány a jejich význam roste (viz tab. I a II).

Tabulka I

Příklady uplatnění NP v preklinické praxi (in vitro diagnostika)

Typ NP	Diagnostické využití	Lit.
Zlaté nanočástice	detekce viru SARS-CoV-2	19
NanoFlares	detekce rakovinných buněk v krvi	20
Nanočástice Europa	rychlá diagnostika viru ptačí chřipky podtypu H7	21
Polovodičové kvantové tečky	fluorescenční biomarker pro diagnostiku rakoviny	22
Uhlíkové nanotrubic	diagnostika a léčba rakoviny plic	23
Nanovláčna	detekce negativních DNA mutací a exprese genů	24

Tabulka II

Příklady uplatnění NP v klinické praxi

Název	Terapeutické využití	Lit.
Abelcet®, amfotericin B komplex	léčba invazivní mykotické infekce	25
Doxil®, nanolipozomy	léčba Kaposiho sarkomu, léčba karcinomu vaječnicků	26
ABRAXANE®, paclitaxel-albumin	léčba rakoviny prsu, plic a slinivky břišní	27
Genexol -PM, micelární paklitavex	léčba pokročilého stádia karcinomu prsu a plic	28
Rapamune®, nanokrystaly	prevence odmítnutí transplantovaného orgánu	29
Zlaté nanotyče	inhibice agregace β-amyloidu Alzheimerovy choroby	30

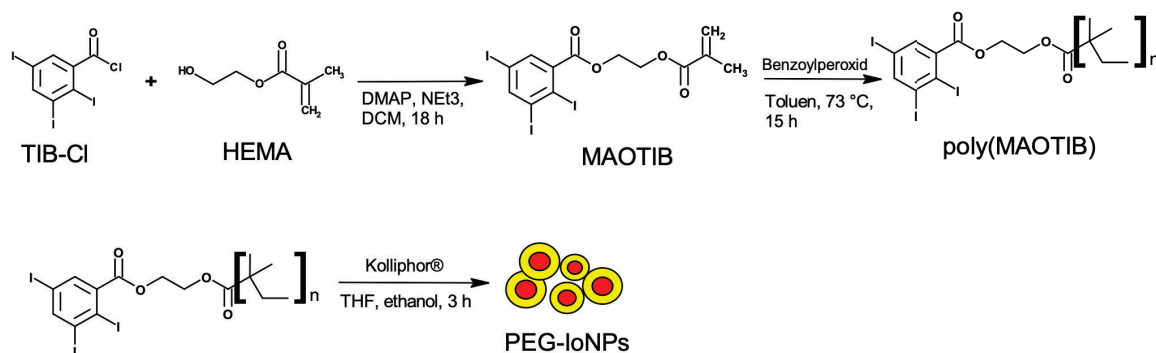
NP vykazují zásadní rozdíly oproti v současnosti používaným nízkomolekulárním kontrastním látkám v klinické praxi, a to díky svým fyzikálním vlastnostem – zejména velikosti, která prodlužuje jejich setrvání v krevním řečišti. Kromě toho mohou být nosiči léčiv a cílit na jakoukoliv strukturu/tkáň. Jedním z potenciálních teranostik jsou např. jodované nanočástice (IoNP), které mohou být vhodným doplňkem ke konvenčním jodovým kontrastním látkám. Ve srovnání s kovovými nanočásticemi (superparamagnetické nanočástice oxidů iontů – SPION, zlaté nanočástice – AuNP), které nejsou v těle rozložitelné, jsou právě IoNP biologicky odbouratelné. IoNP tak mají potenciál stát se základem moderního teranostického přístupu ke zlepšení léčby.

IoNP jsou tedy *diagnostikem* – mohou být uzavřeny do liposomů, které mají na povrchu tzv. binder (ligand) pro cílovou strukturu, v našem případě fibrin. Díky tomu mohou být selektivně vychytávány v krevním oběhu a zaměřeny na cílovou strukturu, čímž ji označí. Navíc může být na povrchu liposomu terapeutická molekula, například altepláza, plazmin nebo mikroplazmin, která umožňuje *terapeutický* účinek.

IoNP mohou být vyrobeny z monomeru MAOTIB (2-metakryloxyethyl(2,3,5-trijodobenzoát))³¹, viz obr. 1, a v literatuře jsou popisovány jako žádoucí kontrastní látky, například při zobrazování jater, sleziny a lymfatických uzlin³¹. Vykazují zvýšenou viditelnost v krvi a mohou být využity také při diagnostice rakovinných buněk v játrech³². IoNP navíc nabízejí nižší nefrotoxicitu (toxický účinek látek na ledviny) než nízkomolekulární látky a vykazují specifickou schopnost cílení. Zaměřují se na fibrin ve sraženině a jejich radiopacitní vlastnost (tedy nepropustnost pro rentgenové paprsky, jevící se na rentgenovém/CT snímku jako bílá oblast) tak může vizualizovat sraženinu *in situ*³³.

Laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS)

LA-ICP-MS je výkonná technika zobrazování prvků³⁴ a v některých případech i proteinů (hmotnostní cytometrie³⁵) s vynikajícími mezemi detekce, v ideálních případech až v řádech jednotek ng g⁻¹ (cit.^{34,36}). Jak bylo uvedeno výše, ischemická cévní mozková příhoda (spolu s rakovinou) je celosvětově hlavní příčinou úmrtí. Není proto překvapivé, že v posledních desetiletích roste zájem o zobrazování distribuce prvků/kovů a proteinů v biologických tkáních s cílem získat např. obecné prvkově-proteomické informace u konkrétního onemocnění^{37,38}. Barvení hematoxylinem a eosinem (HE) představuje základní tkáňové barvení používané v histologii, které slouží jako základní kámen v lékařské diagnostice a je často považováno za zlatý standard³⁹. Nicméně komplexní preklinický výzkum vyžaduje multidisciplinární přístup zahrnující studium farmakokinetiky a dynamiky tohoto potenciálního teranostika (IoNP pro detekci a léčbu mrtvice). Takové analýzy jsou možné právě díky použití této jedinečné metody LA-ICP-MS kombinující detekci více prvků a nově i proteinů. Stanovení distribuce proteinů/biomarkerů umožňuje tak popsat informace např. o rozsahu poškození mozku v zájmové oblasti. Tím se otevírá jedinečná možnost detegovat nově syntetizované léky/kontrastní látky, zkoumat jejich chování v modelovém organismu nebo sledovat jejich účinnost (spolu s kombinací histologických přístupů), a tím i úspěšnost celkové léčby. Proto může být tato zobrazovací technika velmi vhodná a může být využita jako tzv. „zlatý standard“ zobrazovací metody pro výzkum např. výše zmiňovaných IoNP použitelných v oblasti teranostické medicíny.



Obr. 1. Schéma syntézy IoNP. Monomer je připraven esterifikační reakcí trijodobenzoylchloridu (TIB-Cl) s 2-hydroxyethylmethakrylátem (HEMA) v prostředí dimethylaminopyridinu (DMAP) a triethylaminu (NEt₃) rozpuštěného v dichlormethanu (DCM). Polymerace probíhá mechanismem radikálové polymerizace. Pomocí tetrahydrofuranu (THF), polyMAOTIB, ethanolu a stabilizačního surfaktantu – polyethylenglykolu (PEG – komerční název Kolliphor®) jsou vytvořeny IoNP

Experimentální část

Příprava vzorků

In vivo: Laboratorním potkanům byla pod narkózou vyvolána okluze střední mozkové tepny (MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion). MCAO operace byla realizována zákrokem, kdy do krční tepny potkana byla aplikována umělá, baryem značená sraženina na bázi lidského fibrinu (umělý trombus), která se následně usadila ve střední mozkové tepně⁴⁰. Během terapeutického okna bylo potkanům aplikováno trombolitikum (např. altepláza) a IoNP.

Ex-vivo: Po eutanázii zvířete (potkana) byl odebrán vzorek krve a vyjmut mozek, společně s dalšími orgány (převážně játra, ledviny, slezina). (I) Orgány byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Takto chladem fixované orgány byly následně zality do kryo-média a nakrájeny na kryotomu do podoby histologických řezů o tloušťce $10\text{ }\mu\text{m}$. Přenos a skladování řezů byly realizovány uchováním na podložním skle při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (II) Vzorky krve byly pipetovány na podložní sklo.

Analýza LA-ICP-MS

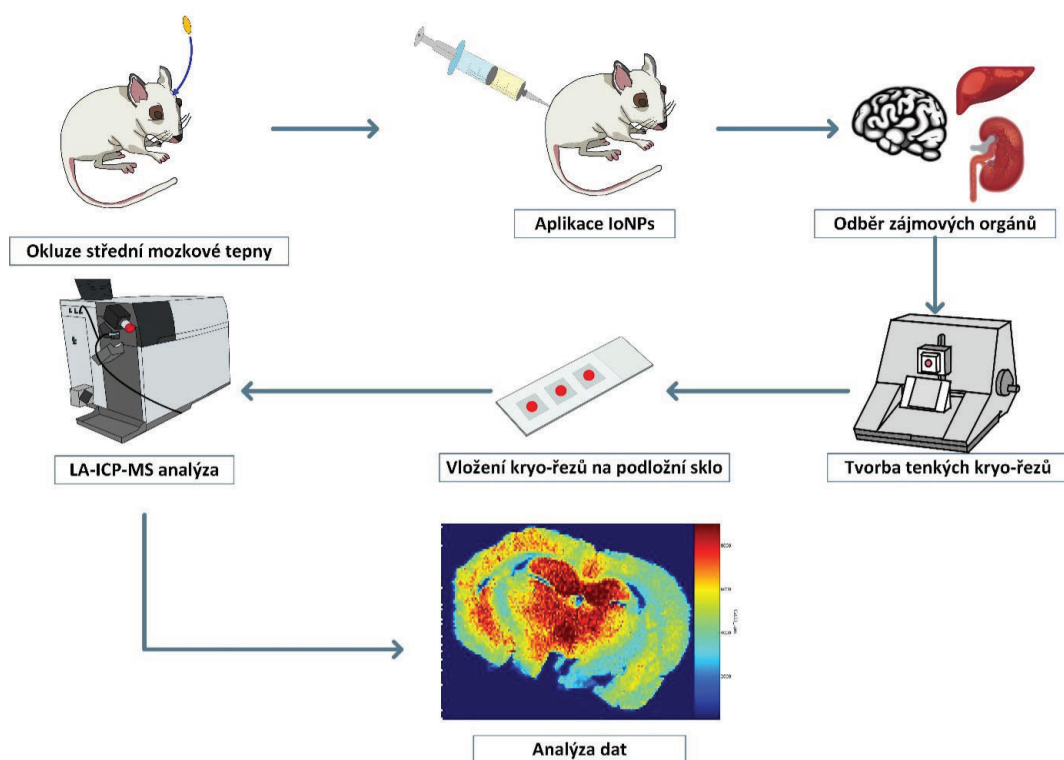
Vzorky byly upevněny do komory laserového ablačního systému společně s kalibračními standardy. Byla použita externí kalibrace s interním standardem telluru

a definovaným obsahem jodu ($0, 5, 10, 50, 100, 200$ a $500\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), které věrně napodobují charakteristiky neznámých vzorků (tzv. matrix-matched standardy, tedy standardy obsahující stejnou matici – tkáň – jako samotný vzorek). Ty slouží nejen ke kvantifikaci množství jodu, ale také k minimalizaci maticových efektů a potlačení různé ablační rychlosti^{41,42}. Podmínky analýzy byly optimalizovány pro kompletní ablací tkáňové hmoty z podložního skla, a vysoké ionizační účinnosti pro zvolené prvky (viz tab. III). Byly měřeny prvky: ^{31}P (zobrazující celý řez tkáně), ^{127}I (stanovení distribuce a farmakokinetiky IoNP), ^{125}Te (interní standard). Získané hmotnostní spektrum bylo kombinováno se záznamem pozice laserového paprsku a skládáním intenzifikovaných pixelů vznikla prvková distribuční mapa zájmového prvku. Celá metodologie přípravy a analýzy je znázorněna na obr. 2.

Výsledky a diskuse

Tělní tekutiny

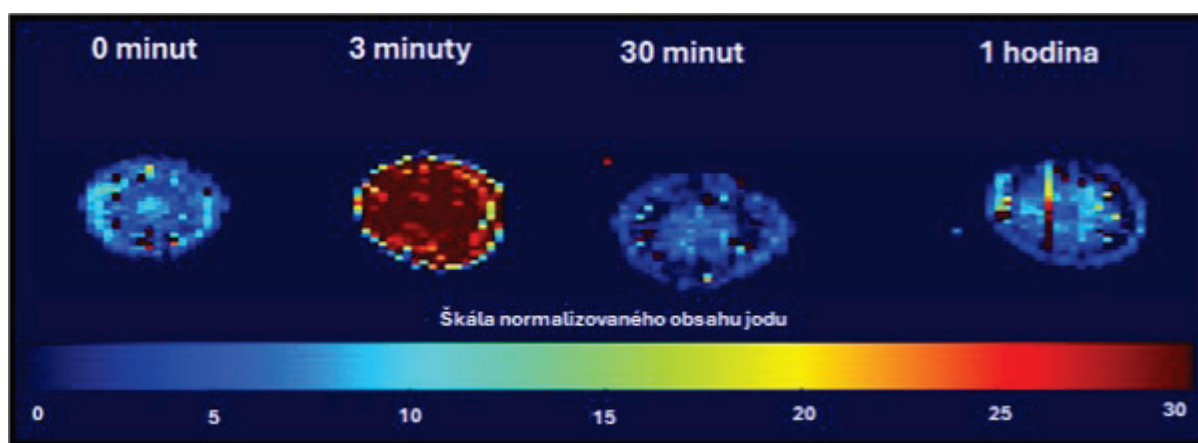
Krev díky své viskozitě vykazovala tzv. „efekt kávové skvrny“ (coffee stain effect). Zmíněný jev se projevil tím, že nejvyšší množství jodu bylo naměřeno na periferních kapkách a uprostřed kapky. Tento artefakt je viditelný i na prvkové distribuční mapě jodu (viz obr. 3) a zanáší do



Obr. 2. Postup přípravy vzorků pro analýzu pomocí LA-ICP-MS

Tabulka III
Podmínky analýzy LA-ICP-MS pro tkáňové vzorky

<i>Laserový ablační systém LSX-213G2+ (Teledyne, Photon Machines, USA)</i>	
Energie laserového záření, J cm ⁻²	4,0
Opakovací frekvence laserového paprsku, Hz	20
Průměr laserového paprsku, μm	150
Rychlost posunu, μm s ⁻¹	200
Příprava laserového paprsku s uzavřenou clonou, s	10
Posun mezi liniemi, μm	150
Průtok nosného plynu, l min ⁻¹	1,0
<i>Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7900ce (Agilent, Japonsko)</i>	
Příkon do indukční cívky ICP, W	1550
Průtok plazmového plynu, l min ⁻¹	17,0
Celkový integrační čas, s	0,5250



Obr. 3. Normalizovaný obsah jodu ve vzorcích krve potkana po aplikaci IoNP analyzovaných pomocí LA-ICP-MS

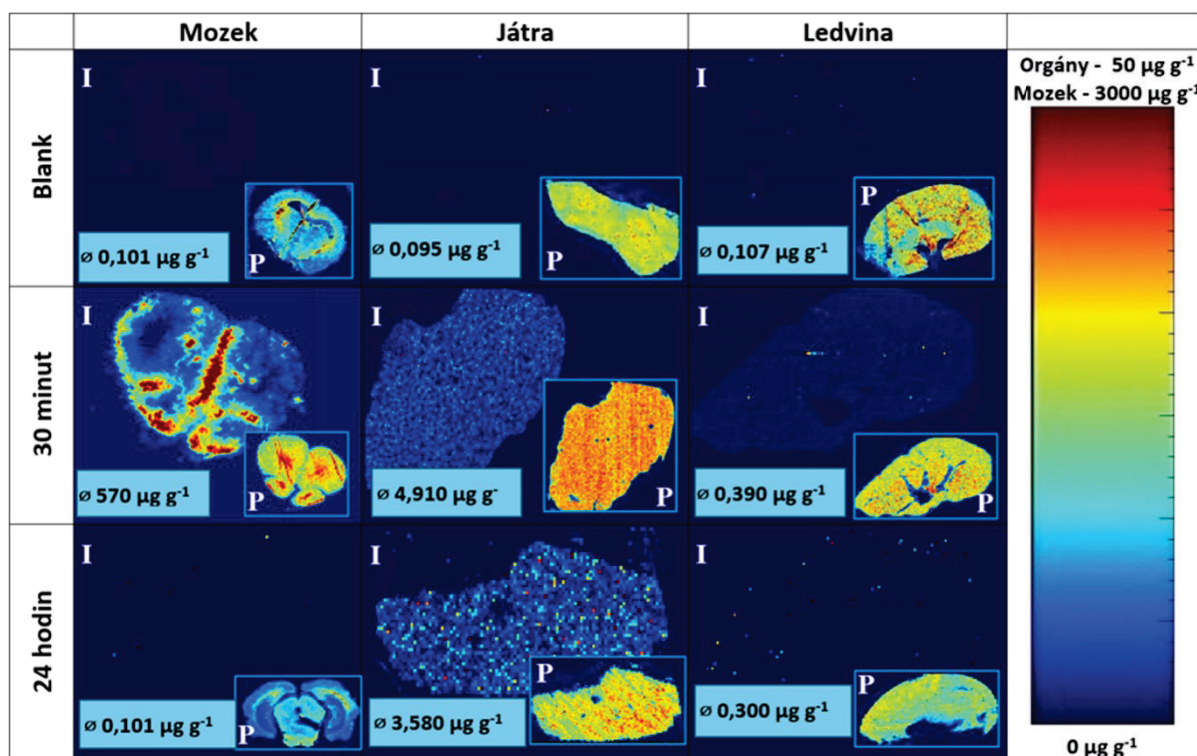
dat heterogenitu stanovení obsahu v celé kapce. Směrnice pro normalizaci byla získána pomocí tkáňových standardů jodu. Tento způsob normalizace byl zvolen z důvodu zajištění porovnatelnosti mezi jednotlivými měřeními. Jelikož ale standardy nereflektují matici krve, byla normalizace vztažena na bezrozměrné jednotky. Již ve 3. minutě od aplikace IoNP byl zaznamenán nárůst množství jodu (viz obr. 3, 3 minuty), což indikuje rychlou distribuci IoNP v krevním řečišti a dále do organismu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že již po 30 minutách od jejich aplikace se obsah jodu v krvi vrátil na původní hodnoty (viz obr. 3, 30 minut).

Orgány

Byly analyzovány tenké řezy tkání potkana (mozek, játra, ledviny) a výsledky jejich distribučních map jodu v orgánech popisuje obr. 4. Můžeme zde také pozorovat

časové značky eutanazie potkana po aplikaci IoNP (0, 30 min a 24 h). Pro lepší vizualizaci struktury orgánů byly distribuční mapy jodu v orgánech doplněny mapami fosforu. Hodnota „MAX“ vedle každé distribuční mapy označuje maximální nastavenou hodnotu obsahové škály, která je znázorněna červeně.

Sdružené skupiny distribučních map orgánů vykazují podobný trend jako u krve. Zde se 30 minut po aplikaci IoNP ve velkém množství dostaly z krevního řečiště do mozku (průměrný obsah v řezu tkáně 570 μg g⁻¹). Zde lze pozorovat značnou nehomogenitu distribuce jodu po 30 minutách po indukcii IoNP (viz obr. 4, Mozek – 30 minut). IoNP se zdržují pouze v místech s vysokým obsahem železa, což naznačuje distribuci v cévách bez větších průniků do nervové tkáně. Pro správnou vizualizaci sraženiny je potřeba optimalizace kroku „vymytí“ IoNP z krevního řečiště mozkové tkáně, aby nedocházelo k navyšování signálu v jiných místech mozkové tkáně, než kde je



Obr. 4. Stanovení distribuce a průměrného obsahu jodu v tenkých řezech orgánů po aplikaci IoNP pomocí LA-ICP-MS

přítomna sraženina. Pak je možná správná interpretace výsledků. Průměrný obsah jodu v řezu mozkové tkáně po 24 hodinách byl stanoven na $0,101 \mu\text{g g}^{-1}$. Tento obsah je stejný, jako u mozku potkana bez aplikace IoNP. Můžeme tedy říci, že IoNP jsou po 24 hodinách plně vyloučeny z tohoto orgánu. Detekcí jodu v dalších orgánech můžeme pozorovat, že odbourání IoNP probíhá v játrech ($4,910 \mu\text{g g}^{-1}$ po 30 min a $3,580 \mu\text{g g}^{-1}$ po 24 hodinách, ve srovnání s průměrným obsahem jodu bez aplikace IoNP, tedy $0,095 \mu\text{g g}^{-1}$, viz obr. 4, játra), tedy vyloučením přes žlučové cesty do střev. Oproti detekci jodu v ledvinách, jejichž obsah po 30 min ($0,390 \mu\text{g g}^{-1}$) i 24 hodinách ($0,300 \mu\text{g g}^{-1}$) po aplikaci IoNP je jen nepatrně zvýšen oproti obsahu v ledvině bez aplikace IoNP ($0,107 \mu\text{g g}^{-1}$). Již po 24 hodinách dochází tedy k vyloučení většiny IoNP z organismu.

Výhodou analýzy těchto biologických vzorků pomocí LA-ICP-MS je nejen stanovení jejich distribuce, posouzení (ne)homogenity v tkáni, ale také kvantitativní možnost výpočtu průměrného obsahu jodu v tkáni, a tedy stanovení farmakokinetiky těchto IoNP. Nevýhodou je stanovení IoNP jako signálu ^{127}I , nikoli ve formě „single nanoparticle modu“, tedy detekci jednotlivých nanočástic, která se v současné době rutinně zatím nepoužívá (z důvodu např. nedostatečně vyspělé instrumentace, velice složité optimalizace metody, či dlouhé doby a vysoké ceny analýzy). Tato nevýhoda znemožňuje získání informace o jejich

biodegradabilitě (rozložení biologickými procesy), tedy zda jsou IoNP v orgánech v původní formě nanočástic, nebo již rozložené. Tato informace může být následně získána pomocí zobrazení elektronovým mikroskopem.

Závěr

Výhodou LA-ICP-MS je při výzkumu celé řady onemocnění nejen zobrazení samotné distribuce zájmových prvků, ale také možnost jejich kvantifikace, a to jak celkově (v celém řezu tkáně), tak v její zájmové oblasti. Můžeme tedy popisovat farmakokinetiku chemických látek určených k použití v lékařské diagnostice, léčbě nebo prevenci nemoci založených na prvku, který není organismu vlastní (abiogenní). V takovém případě můžeme obsah a distribuci léčiva snadno sledovat. V našem případě je jod sice v organismu částečně zastoupen (např. štítná žláza), jak je ale patrné z analýz orgánů potkanů neléčených IoNP, jeho reálné množství vyjma štítné žlázy je v tkáních prakticky zanedbatelné.

LA-ICP-MS se tedy v posledních letech stává velice účinným nástrojem pro vývoj a testování léčiv, stanovení jejich farmakokinetiky a v neposlední řadě také účinnosti. Ruku v ruce jde stálý vývoj nové instrumentace, která již v dnešní době dovoluje nejen nižší meze detekce, ale také mnohem rychlejší a tím levnější analýzy.

Vypracováno s finanční podporou Grantové agentury Masarykovy univerzity v rámci Programu podpory studentského výzkumu – Podpora vynikajících diplomových prací, číslo projektu MUNI/C/0002/2023.

LITERATURA

- Global Burdens of Disease (GBD): Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020. <https://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>, staženo 12. 9. 2024.
- Hu H. J., Song M. K.: *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 26, 2706 (2017).
- Gallacher K. I., Batty G. D., McLean G., Mercer S. W., Guthrie B., May C. R., Langhorne P., Mair F. S.: *BMC Med.* 12, 1 (2014).
- Dusen R. A V., Abernethy K., Chaudhary N., Paudyal V., Kurmi O.: *BMJ Open* 13, 3 (2023).
- Fifi J. T., Mocco J.: *Lancet Neurol.* 19, 713 (2020).
- Škoda O., Herzig R., Mikulík R., Neumann J., Václavík D., Bar M., Šaňák D., Tomek A., Školoudík D.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 79, 351 (2016).
- Ospel J. a 13 spoluautorů: *Stroke* 52, 304 (2021).
- Powers W. J. a 18 spoluautorů: *Stroke* 50, e344 (2019).
- Kim J., Park J. E., Nahrendorf M., Kim D. E.: *J. Stroke* 18, 286 (2016).
- Theek B., Rizzo L., Ehling J., Kiessling F., Lammers T.: *Clinical Translational Imaging* 2, 67 (2014).
- Funkhouser J.: *Curr. Drug Discovery* 2, 17 (2002).
- Langbein T., Weber W., Eiber M.: *J. Nucl. Med.* 60, 13S (2019).
- T.C.f.D.E.a.R. (CDER): Drugs*, (2022) <https://www.fda.gov/drugs>, staženo 12. 9. 2024.
- Grillo-López A. J.: *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2, 485 (2002).
- Ziessman H. A., O'Malley J. P., Thrall H. J., v knize: *Nuclear Medicine*, 4. vyd., str. 265. Elsevier, Philadelphia 2014.
- Hennrich U., Kopka K.: *Pharmaceuticals* 12, 114 (2019).
- Barenholz Y., Peer D.: *J. Controll. Release* 160, 117 (2012).
- Huang Y., Hsu J., Koo H., Cormode D.: *Theranostics* 12, 796 (2022).
- You S. a 10 spoluautorů: *J. Controll. Release* 226, 258 (2016).
- Dean P. B., Kivisaari L., Korman M.: *Invest. Radiol.* 18, 368 (1983).
- Wang J., Drelich A., Hopkins C., Mecozzi S., Li L., Kwon G., Hong S.: *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 14, e1754 (2022).
- Halo T. a 11 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17104 (2014).
- Yeo S. a 11 spoluautorů: *Sci. Rep.* 7, 7933 (2017).
- Farias P., Santos B., Fontes A., v knize: *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis: Methods and Protocols*, str. 407. Springer, Totowa 2009.
- Sheikhpour M., Naghinejad M., Kasaeian A., Lohrasbi A., Shahraini S., Zomorodbakhsh S.: *Int. J. Nanomed.* 15, 7063 (2020).
- Sutariya V. B., Pathak Y.: *Biointeractions of Nanomaterials*, Taylor and Francis Group, Boca Raton 2014.
- Hamill R.: *Drugs* 73, 919 (2013).
- Cook D., Brown D., Alexander R., March R., Morgan P., Satterthwaite G., Pangalos M.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 13, 419 (2014).
- Miele E., Spinelli G., Miele E., Tomao F., Tomao S.: *Int. J. Nanomed.* 4, 99 (2009).
- Comier J., Awen A., Kwade A., Van de Voorde M.: *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production: Innovation and Production*. Wiley, Weinheim 2016.
- Haeri A., Osouli M., Bayat F., Alavi S., Dadashzadeh S.: *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.* 46, S1 (2018).
- Singh R. P., Singh K. R. B., Singh J., Adetunji C.: *Nanotechnology for Drug Delivery and Pharmaceuticals*. Elsevier, London 2023.
- Wallyn J., Anton N., Serra C. A., Bouquoy M., Collot M., Anton H., Weickert J. L., Messaddeq N., Vandamme T. F.: *Acta Biomater.* 66, 200 (2018).
- Aviv H., Bartling S., Kiesling F., Margel S.: *Biomaterials* 30, 5610 (2009).
- Hallouard F., Anton N., Choquet P., Constantinesco A., Vandamme T.: *Biomaterials* 31, 6249 (2010).
- Limbeck A., Galler P., Bonta M., Bauer G., Nischkauer W., Vanhaecke F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6593 (2015).
- Konz I., Fernández B., Fernández M., Pereiro R., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2113 (2012).
- Van Acker T., Theiner S., Bolea-Fernandez E., Vanhaecke F., Koellensperger G.: *Nat. Rev. Methods Primers* 3, 18 (2023).
- Pornwilar M. M., Merle U., Weiskirchen R., Becker J. S.: *Int. J. Mass Spectrom.* 354, 281 (2013).
- Matusch A., Depboylu C., Palm C., Wu B., Hoglinger G. U., Schafer M. K. H., Becker J. S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 161 (2010).
- World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington D.C 2007.
- Wünschova A. V. a 13 spoluautorů: *Pharmaceutics* 12, 1207 (2020).
- Vaculovic T., Warchilová T., Čadkova Z., Szaková J., Tlustoš P., Otruba V., Kanický V.: *Appl. Surf. Sci.* 351, 296 (2015).
- Anyz J., Vyslouzilova L., Vaculovic T., Tvrdonova M., Kanicky V., Haase H., Horak V., Stepankova O., Heger Z., Adam V.: *Sci. Rep.* 7, 40169 (2017).

M. Kuchynka^{a,b,c}, J. Biskupič^a, M. Onuščáková^a, P. Scheer^c, J. Hložková^c, and V. Kanický^b (^a *Department of Chemical Drugs, Masaryk University, Brno*, ^b *Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*, ^c *Department of Pharmacology and Toxicology, Masaryk University, Brno, Czech Republic*): **New Opportunities for Theranostics Research in Stroke**

Stroke, myocardial infarction, and pulmonary embolism represent a significant health burden for modern society, with their primary causes being blood clots and damage to the endothelial lining of blood vessels. Accurate and rapid diagnosis of these clots, particularly determining their age, is crucial for optimal treatment selection, such as thrombolysis (pharmacological dissolution of the clot) or thrombectomy (mechanical removal of the clot). However, existing diagnostic methods do not achieve the required levels of accuracy and efficiency. This article explores the potential of

iodinated nanoparticles (IoNPs) based on polyiodinated biodegradable polymers, which can selectively target specific components such as fibrin, thereby enabling visualization of blood clots using X-ray imaging techniques like computed tomography (CT) or fluoroscopy. The nanoparticles have the capability not only to visualize clots but also to estimate their age, which could significantly support a modern theranostic approach that combines diagnosis and therapy. The article also demonstrates the possibilities of testing the pharmacokinetics of these theranostics using a model organism (rat), employing the method of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). This approach contributes to a better understanding of the biodegradability of potential therapeutics and represents a key step in preclinical evaluation.

Keywords: stroke, theranostic, laser ablation, nanoparticles



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



Česká společnost chemická, Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
tel.: 221 082 383, redakce tel. 221 082 370
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Členské služby a výhody | Česká společnost chemická

Zapojení v České chemické společnosti, členu Asociace českých chemických společností, EuCheMS, ECTN-A a ČSVTS přináší individuálním chemikům, kromě vlastního členství v největší a nejstarší české profesní organizaci chemiků (zal. 1866):

ROZŠÍŘTE SVÉ KONTAKTY

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCh,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění,...
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC, členové IUPAC dostávají časopis Chemistry International,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),

ZÚČASTNĚTE SE NÁRODNÍCH SJEZDŮ

- možnost zúčastnit se národních sjezdů s významnou slevou pro členy, které jsou pořádány každoročně, jednou na Slovensku jednou v ČR,

ZLEPŠETE SVOJI INFORMOVANOST

- možnost dostávat 4x ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů v tištěné či elektronické podobě,
- možnost dostávat 4x ročně, cestou elektronické pošty, členské upozornění na nejdůležitější události a aktuality,
- volný přístup k členskému magazínu ChemViews (<http://www.chemistryviews.org/>), jehož je ČSCh spoluvlastníkem, a to i na vašem mobilním telefonu apod.,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě,
- informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCh“, kterou po dohodě s PřF UK Praha zřídila ČSCh v Knihovně chemie (sídlicí v budově Hlavova 8/2030, Praha 2, Albertov, přízemí, v místnostech č. 148, 149, 150).

ZAPOJTE SE DO ŘEŠENÍ GRANTŮ EU

- možnost participovat na řešení grantů s evropskými partnery, jako např. ECTN a partnerskými národními společnostmi.

UŠETŘETE PENÍZE

- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCh,
- významnou slevu (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCh spolumajitelem,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCh,
- slevu při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společností AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.

ZDŮRAZNĚTE SVOJI PROFESIONALITU

- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,

BUĎTE VIDĚNI

- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- a řadu dalších služeb, které se teprve sjednávají,

PRO FIRMY A PODNIKATELE

- Firmám, podnikům, institucím a dalším právnickým osobám nabízí ČSCh mimo jiné i tzv. „kolektivní členství“, při kterém se ve vzájemné smlouvě sjedná to, čím mohou pomoci jedna strana druhé. Podrobnosti na dotaz.

OBSAH**ÚVODNÍK**

- 76. sjezd chemických společností** 577
K. Kočí a T. Navrátil

REFERÁTY

- Vývoj a využití elektromigračních metod v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky** 579
V. Kašička

- Pachová stopa profesora z Chemických listů** 588
U. Malá, M. Anders a Š. Urban

- Určování poloh funkčních skupin v alifatických řetězcích lipidů a poloh alifatických řetězců v acylglycerolipidech metodami hmotnostní spektrometrie** 594
Š. Strnad, V. Vrkoslav a J. Cvačka

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

- Univerzální systém referenční elektrody pro neideální média** 602

- J. Janata, V. Dorčák, J. Hrbáč a J. Vacek
Návrh miniaturizovaných iontově-selektivních elektrod a praktické aplikace 608

- H. Březnová, G. Broncová a T. V. Shishkanova
Voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí pevné bismutové kapkové elektrody 615
J. Jarošová a V. Vyskočil

- Nové možnosti pro výzkum teranostik u cévní mozkové příhody** 625
M. Kuchynka, J. Biskupič, M. Onuščáková, P. Scheer, J. Hložková a V. Kanický

CONTENTS**EDITORIAL**

- 76th Meeting of Chemists** 577
K. Kočí and T. Navrátil

REVIEW ARTICLES

- Development and Application of Electromigration Methods at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences** 579
V. Kašička

- The Scent Trace of a Professor from Chemické Listy** 588
U. Malá, M. Anders, and Š. Urban

- Locations of Functional Groups in the Aliphatic Chains of Lipids and the Arrangement of Aliphatic Chains within Acylglycerolipids by the Methods of Mass Spectrometry** 594
Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka

ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS

- Universal Reference Electrode System for Non-Ideal Media** 602

- J. Janata, V. Dorčák, J. Hrbáč, and J. Vacek
Design of Miniaturized Ion-Selective Electrodes and Practical Applications 608

- H. Březnová, G. Broncová, and T. V. Shishkanova
Voltammetric Determination of the Drug Metronidazole Using a Solid Bismuth Drop Electrode 615
J. Jarošová and V. Vyskočil

- New Opportunities for Theranostics Research in Stroke** 625
M. Kuchynka, J. Biskupič, M. Onuščáková, P. Scheer, J. Hložková, and V. Kanický

ZALOŽTE SI VÝZKUMNOU SKUPINU

díky tříletému start-up grantu
ve výši 2 mil. Kč ročně

Vrátili jste se ze zahraniční stáže, máte maximálně 7 let od ukončení Ph.D. studia a projekt v oboru organické, bioorganické nebo medicínské chemie?

Přihlaste se
do 15. 3. 2025

www.experientia.cz



experientia
NADACE

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 118 (2024), čís./no. 11 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 148, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 134 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2024 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce (Světlem aktivovaný komplex ruthenia vázaný na DNA kvadruplex, McQuaid K. T. a spol.; <https://www.rcsb.org/structure/5l8s>): M. Štětina • Dáno do tisku 30.10.2024.

12. mezinárodní chemicko-technologická konference

DEKARBONIZACE ENERGETICKY NÁROČNÝCH ODVĚTVÍ - GREEN DEAL,

- Dekarbonizace - konverze a skladování energií, zachytávání uhlíku a jeho použití
- Inovativní způsoby výroby vodíku s využitím obnovitelných a udržitelných zdrojů energie
- Oběhové hospodářství

ORGANICKÁ TECHNOLOGIE, PETROCHEMIE, APLIKOVANÁ KATALÝZA A ORGANICKÁ TECHNOLOGIE

- Ropa, plyn, uhlí – alternativní suroviny, nové technologie, biorafinerie, paliva, biopaliva
- Petrochemie a organická technologie – alternativní suroviny, nové technologie, nové a rozhodující produkty včetně výroby polymerů
- Aplikovaná katalýza a organická technologie

BIOTECHNOLOGIE, TECHNOLOGIE CHEMICKÝCH SPECIALIT

- Biotechnologie a biorafinace
- Syntéza a výroba léčiv
- Polymery, kompozity

NOVÉ MATERIÁLY, ZDROJE ENERGIE, VODÍKOVÁ STRATEGIE, POKROČILÉ PROCESY A APARÁTY, TECHNOLOGIE PRO OCHRANU PROSTŘEDÍ

- Anorganická technologie
- Materiálové inženýrství (včetně moderních kovových biomateriálů pro lékařské účely)
- Procesní inženýrství
- Technologie pro ochranu prostředí

EKONOMIKA CHEMICKÉHO PRŮMYSLU

- Ekonomika chemického průmyslu v nových podmínkách

**Registrace, formulář
k zaslání abstrakt
a další informace od října
2024 na www.icct.cz.**



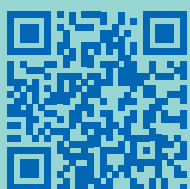
cell counting intelligence

The Scepter™ 3.0 Automated Handheld Cell Counter

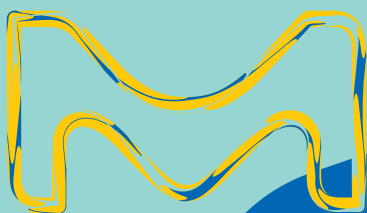
Upgrade your tissue culture room by getting accurate cell counts quickly, and recording results digitally. Our Scepter™ 3.0 handheld cell counter combines smart capabilities with the Coulter impedance principal to hand you precise, consistent counts in seconds.



Accuracy you can count on, smarter than ever.



SigmaAldrich.com/Scepter



The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.



Easy-to-read histogram display of cell counts

Mounts anywhere for storage and charging

Ergonomic design for fatigue-free use as if using a pipette

Wireless capability for instant printing or data transfer

Precise, microfluidic technology based sensors

Millipore®

Preparation, Separation, Filtration & Monitoring Products