

3S-01 NOVÉ TYPY STŘÍBRNÝCH AMALGAMOVÝCH ELEKTROD A JEJICH VYUŽITÍ

ALEŠ DAÑHEL

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2 danhel@natur.cuni.cz

Stříbrné amalgamové elektrody poskytují široké možnosti využití při stanovení organických i anorganických elektrochemicky redukovatelných analytů^{1,2}. V tomto příspěvku budou popsány nové možnosti stříbrného amalgamu jako elektrodového materiálu použitého při konstrukci pracovních elektrod pro nové voltametrické a amperometrické metody stanovení vybraných nitrofenolů.

Smísením jemného prášku stříbrného amalgamu s vhodnou pastovací kapalinou byla připravena stříbrná tuhá amalgamová pastová elektroda (AgSA-PE) podobná uhlíkovým pastovým elektrodám. Výhodou AgSA-PE, je jednoduše obnovitelný elektrodový povrch eliminující jeho případnou pasivaci, potenciálové okno sice užší v porovnání s rtuťovou elektrodou, ale stále dostatečně široké, a dostatečná velikost a reprodukovatelnost měřeného signálu³.

Pro amperometrické stanovení směsi nitrofenolů po jejich separaci pomocí RP-HPLC byl porovnán klasický „tužkový“ typ leštěné stříbrné tuhé amalgamové elektrody (p-AgSAE) ve „wall-jet“ uspořádání s nově připravenou pracovní p-AgSAE kompatibilní s komerčně dostupným tenkovrstvým průtokovým detektorem (BAS, USA). Tenkovrstvé uspořádání poskytuje v porovnání s „wall-jet“ uspořádáním stabilnější signál s vyšší hodnotou poměru signál/šum⁴.

Zcela nově byly připraveny pracovní elektrody využívající jako elektrodový materiál krystal stříbrného amalgamu. Z něj byly připraveny mikrocyklindrické stříbrné amalgamové elektrody, vhodné pro vsádková voltametrická měření i v mikroobjemu. Krystal stříbrného amalgamu byl dále použit při konstrukci mikrocyklindrické průtokové detekční cely, která byla úspěšně použita při amperometrickém stanovení směsi nitrofenolů po jejich předchozí separaci pomocí RP-HPLC.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (LC 06035 and MSM 0021620857) a GAČR (203/07/1195) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204).

LITERATURA

1. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 189 (2009).
2. Yosypchuk B., Navratil T., Barek J., Peckova K., Fischer J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (LeFebvre M. H., Roux M. M., ed.), kap. 4, s. 143. Nova Science Publishers, New York 2008.
3. Barek J., Danhel A., Kadlcikova A., Kotkova Z., Obsil T., Silhan J.: Chem. Listy 103, 331 (2009).
4. Danhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: Electroanalysis 21, 303 (2009).

3S-02 AUTOMATIZOVANÁ ANALÝZA V SPÁJANÍ IZOTACHOFORÉZA-ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA V KAPILÁRACH

MIROSLAVA HALAŠIOVÁ, RÓBERT BODOR
a DUŠAN KANIANSKY

Univerzita Komenského v Bratislave, Přírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava miroslava.halasiova@fns.uniba.sk

Práca pojednáva o automatizácii dvojdimenzionálneho (2D) režimu separácie na báze spájania kapilárnych kolón pre izotachoforézu (ITP) so zónovou elektroforézou (CZE). Toto spojenie (ITP-CZE), doplnené o použitie diskretných spacerov (DS) pridávaných do analyzovaných vzoriek, ponúka separáciu a detekciu analytov obsiahnutých v mnohózložkových zmesi látok. Súčasnou úlohou je tiež spracovať väčší počet vzoriek a pokryť pracovnú škálu pre ca. 24 hodín denne.

V našej práci bol použitý prototyp automatizovaného elektroforetického analyzátoru so separačnou jednotkou usporiadanou pre techniku spájania kolón¹. V experimentoch bola použitá aniónická modelová zmes (50 UV absorbujúcich analytov) a vzorky moču.

V 2D ITP(DS)-CZE separáciách sme študovali úlohu prostriedkov zvyšujúcich CZE rozlíšenie analytov vrátane zbytkových zložiek matrice. Ukázali sme, že pre 50 analytov bolo rozpoznávaných 35–36 analytov. Riziko takéhoto prekryvu bolo eliminované využitím 4 DS (vytvorenie 5 frakcií). Dobrá reprodukovateľnosť tohto prístupu bola opakovane preukázaná. Tento prístup, využitie 2D separácií, sa dá považovať za významný analytický nástroj pre separáciu mnohózložkových zmesí v kapilárnej elektroforéze. Prirodzene, experimenty študované pre 2D ITP(DS)-CZE separáciu vzoriek moču vykazujú možnosti, ktoré boli typické pre separácie modelových zmesí.

Z našej práce je logické konštatovať, že 2D ITP(DS)-CZE prístup je kľúčovým prostriedkom na zníženie rizika prekryvu separovaných látok (zníženie tzv. saturačného faktora, definovaného Giddingsom). Inými slovami, je to nástroj vhodný na separáciu biologických vzoriek komplexného charakteru. Dá sa poznamenať, že prístup uvedený v tejto práci nebol doteraz prezentovaný.

Práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (1/0672/09 a 1/0882/09), Slovenskou agentúrou pre výskum a vývoj (VVCE-0070-07) a Grantom Univerzity Komenského číslo UK/329/2009.

LITERATÚRA

1. Kaniansky D., Marák J., Vaváková V., Masár M., v knihe: *Automated Capillary Electrophoresis Analyzer*. Omega Info, Bratislava 2004.

3S-03

ELEKTROFORETICKÉ STANOVENIE DUSIČNANOV A DUSITANOV V MOZGOVOMIECHOVOM MOKU NA ČIPE S VODIVOSTNOU DETEKCIU**MICHAL HORČIČIAK^a, RICHARD CHUDOBA^b, MARIÁN MASÁR^a a DUŠAN KANIANSKY^a**

^a Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, ^bUniverzita Karlova v Praze, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a makromolekulovej chémie, Hlavova 8, 128 40 Praha 2
michal.horciciak@fns.uniba.sk

Cieľom práce bolo súčasné stanovenie dusičnanov a dusitanov, produktov oxidácie oxidu dusnatého, v mozgovomiechovom moku (CSF) metódou zónovej elektroforézy (CZE) na čipe s vodivostnou detekciou.

Elektroforetické separácie dusičnanov a dusitanov boli vykonané na polymetylmakrylátovom (PMMA) čipe so systémom spájania separačných kanálikov (CC) v hydrodynamicky uzatvorenom separačnom systéme s potlačením elektroosmózy. Separácie boli uskutočnené v nosnom elektrolyte (pH 3,8 s prídavkom dodecylidimethylammoniopropánsulfonátu, DDAPS), ktorý umožnil separáciu dusičnanov a dusitanov, a zároveň dusičnanov a chloridov, ktoré sú typickou makrozložkou v CSF. Použitím dávkovača o objeme 1 µl boli získané detekčné limity pre dusičnany a dusitany na úrovni 5–6 µg l⁻¹.

Chloridy nachádzajúce sa vo vzorkách CSF na veľmi vysokých koncentračných úrovniach (cca 4500 mg l⁻¹) znemožňovali stanovenie dusičnanov a dusitanov (prekryv pík), preto na ich odstránenie z finálneho separačného systému pred analýzou boli zvolené dva prístupy: (1) on-line ZE predúprava na CC čipe pracujúceho v CS režime a (2) extrakčná predúprava (SPE) na báze IC-Ag mikrokolónok. Oba uvedené prístupy umožnili odstrániť cca 80 % chloridov z dávkovanej vzorky a umožnili rýchle, reprodukovateľné a citlivé stanovenie dusičnanov vo vzorkách CSF. Vzhľadom na veľmi nízke koncentračné úrovne dusitanov v CSF (jednotky µg l⁻¹) je však potrebné použiť vhodnú on-line alebo off-line prekoncentračnú techniku na ich stanovenie (napr. izotachoréza v kombinácii so zónovou elektroforézou na CC čipe).

Práca bola podporená grantovými agentúrami VEGA (č. 1/0672/09) a APVV (VVCE-0070-07).

LITERATÚRA

1. Kaniansky D., Masár M., Bodor R., Žúborová M., Ölvecská E., Jöhnck M., Stanislawski B.: *Electrophoresis* 24, 2208 (2003).

3S-04

ANALÝZA BIOLOGICÝCH VZORKŮ POMOCÍ LASEROVÉ DESORPCE ZA ÚČASTI SUBSTRÁTU VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM**PAVLA JUNGOVÁ^a, ONDŘEJ PEŠ^a, TOMÁŠ VACULOVIČ^a, JARMILA NAVRÁTILOVÁ^b, JAN ŠMARDA^b, VIKTOR KANICKÝ^a a JAN PREISLER^{a,b}**

^a Ústav chemie, ^b Ústav experimentální biologie, Prírodovedecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno
pavla.jungova@gmail.com

Laserová desorpce za účasti substrátu ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (substrate-assited laser desorption inductively-coupled plasma mass spectrometry, SALD ICP-MS)¹ je nová metoda umožňující stanovení stopových a ultrastopových prvků v submikrolitrových objemech biologických vzorků. Na rozdíl od běžně používané metody laserové ablace ICP-MS, SALD ICP-MS umožňuje kvantitativní analýzu kovů v kapalných vzorcích a to díky kompletní desorpci vzorků o přesně definovaném objemu (typicky 200 nl) nanesených na silně absorbující substrát a odpařených několika pulsy laserového záření o vlnové délce 213 nm při relativně nízké hustotě zářivého výkonu laseru (10–100 MW cm⁻²). Byla provedena detailní charakteristika metody na modelových vzorcích Cu a zjištěna nezávislost ICP-MS signálu na hustotě zářivého výkonu laseru, na velikosti a typu rastru, lineární rozsah přes 6 řádů a nízké limity detekce (0,1–14 fmol pro Cr, Cu, Ni, Sn a Zn).

SALD ICP-MS byla úspěšně aplikována na stanovení koncentrace měďnatých iontů, které ovlivňují cytotoxicitu disulfiramu vůči buňkám myeloidní leukémie². Správnost SALD ICP-MS byla ověřena stanovením mědi v buňkách pomocí ICP-MS se zmlžováním, tato konvenční metoda ovšem vyžadovala přípravu řádově většího množství vzorku.

Kromě toho mohou biologické vzorky jako jsou metalothioneiny být po přidání matrice analyzovány ze stejného substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice (MALDI MS). Kombinace technik SALD ICP-MS a MALDI MS tak poskytne kompletní informace jak o obsahu kovu tak o hmotnosti proteinu s minimální spotřebou vzorku.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (grant č. 203/09/1025) a grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSM0021622411, MSM0021622412 a MSM0021622415).

LITERATURA

1. Peš O., Jungová P., Vyhnánek R., Vaculovič T., Kanický V., Preisler J.: *Anal. Chem.* 80, 8720 (2008).
2. Navrátilová J., Jungová P., Vaňhara P., Preisler J., Kanický V., Šmarda J.: *Int. J. Mol. Med.* 24, 661 (2009).

3S-05

MULTIMARKEROVÝ SCREENING TĚLNÍCH TEKUTIN PRO STANOVENÍ NEMOCÍ OXIDATIVNÍHO STRESU**ADÉLA PANKRÁCOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER***Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
adela.pankracova@vscht.cz*

Sledování specifických molekul, tzv. „biomarkerů“ produkovaných organismem při patologických procesech, je v dnešní době součástí moderní lékařské diagnostiky. Běžně se setkáváme s analýzou látek v krevní plazmě a moči, méně často pak v mozkomíšním moku a kondenzátu vydechaného vzduchu. Biomarkery oxidativního stresu obsažené v těchto matricích vznikají neenzymatickou peroxidací základních stavebních jedno-tek organismu reaktivními kyslíkovými částicemi (ROS – reactive oxygen species). Mezi biomarkery poškození nukleových kyselin se řadí 8-hydroxyguanosin, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin a 8-hydroxyguanine, poškození bílkovin signalizují *o*-tyrosin a nitrotyrosin. Biomarkery poškození fosfolipidových membrán (zejména ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin) jsou 8-isoprostan a aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, 4-hydroxyhexenal a C6-C13 aldehydy).

Bylo zjištěno, že hladiny výše uvedených biomarkerů jsou oproti hladině fyziologické významně zvýšeny v souvislosti s řadou závažných chorob. Mezi ně patří např. plicní onemocnění (chronická obstrukční plicní nemoc, rakovina plic, azbestóza, silikóza), neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova a Parkinsonova choroba) a onemocnění kardiovaskulárního systému (infarkt myokardu a ateroskleróza). Ačkoliv byla v nedávné době vyvinuta řada metod pro stanovení biomarkerů oxidativního stresu v tělních tekutinách a byla prokázána možnost diferenciální diagnostiky oxidativního stresu, neexistuje do současnosti standardizovaný postup pro stanovení jejich koncentračních hladin a výsledky z různých pracovišť vykazují značnou nesourodost. Mezi možné zdroje chyb při analýze zmíněných biomarkerů lze zařadit jejich velice rychlou teplotní degradaci.

Cílem předkládané a zcela originální metody bylo postihnout a kvantifikovat parametry, které mohou být zdrojem v literatuře uvážených rozporuplných výsledků, a vypracovat protokol zpracování tělních tekutin pro stanovení biomarkerů oxidativního stresu. K tomu byly použity metody na bázi „stable-isotope dilution assay“ a hmotnostní spektrometrie kombinované s předseparačními metodami (SPE, případně imunoafinitní extrakce). Vyvinutou metodu multimarkerového screeningu oxidativního stresu lze charakterizovat nízkým limitem detekce a kvantifikace a vysokou přesností, správností a selektivitou. Vyvinutá metoda byla testována v klinické studii, ve které byly sledovány hladiny biomarkerů u pacientů s nemocí oxidativního stresu a kontrolní skupinou zdravých osob.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR (Grant NS 10298-3/2009).

3S-06

ANALÝZA SILIC V BYLINNÝCH NÁPOJÍCH S VYUŽITÍM TECHNIKY MIKROEXTRAKCE JEDNOU KAPKOU**PETRA PAVLÍKOVÁ*, PETR DOBIÁŠ, MARTIN ADAM a KAREL VENTURA***Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
peta.pavlikova@gmail.com*

Silice jsou složité směsi organických sloučenin obsažených v rostlinách. Vyskytují se prakticky ve všech částech (květy, plody, listy, stonky, kořeny...). Hlavní složkou silic jsou terpenové sloučeniny (monoterpeny a seskviterpeny), které ale většinou nemají velký vliv na vůni a chuť silic, protože nositelem těchto vlastností jsou hlavně kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, estery atd.)^{1,2}. Silice jsou významné především pro jejich pozitivní vliv na lidský organismus. Lidé využívali mnoho druhů bylin a koření k léčení různých nemocí (např. máta pro zažívání a bolest hlavy, levandule má protizánětlivý a analgetický účinek, meduňka proti kašli, pelyněk pro zažívání, atd.)³.

Nejčastěji používanými metodami pro izolaci silic z rostlin jsou destilace s vodní parou, lisování či extrakční metody. Avšak vzhledem k tomu, že silice jsou těžké sloučeniny, je možné je analyzovat po zakoncentrování nejen přímo z roztoku (DI), ale také z plynného prostoru nad vzorkem, tzv. headspace (HS) technikou. K tomuto účelu se jako perspektivní jeví metoda mikroextrakce jednou kapkou (SDME – single-drop microextraction). SDME je proces založený na ustavování rovnováhy mezi vzorkem, headspace prostorem a kapkou vhodného extrakčního rozpouštědla. Získaný extrakt obsahující zachycené sloučeniny je pak přímo nastříknut do nástřikového prostoru plynového chromatografu bez nutnosti zařazení desorpčního kroku⁴.

Práce se zabývá nalezením vhodných extrakčních podmínek, jako jsou doba extrakce, vhodné rozpouštědlo a jeho objem, způsob vzorkování a množství vzorku, pro izolaci silic z bylinných nápojů. Pro analýzu získaných extraktů byla použita plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. Dosažené výsledky byly porovnány s hodnotami získanými analýzou původních bylin metodou HS-SDME ve statickém uspořádání.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantového projektu MŠMT ČR (projekt MSM 002162750).

LITERATURA

1. Velišek J.: *Chemie potravin 2*. Osssiss, Tábor 2002.
2. Hálková J., Rumišková M., Riedlová J.: *Analýza potravin*. vydavatel RNDr. Ivan Straka, Újezd u Brana 2000.
3. Hajhashemi V., Sadraei H., Ghannadi A. R., Mohseni M.: *J. Ethnopharmacol.* 71, 187 (2000).
4. Zhao E., Han L., Juany S., Wang Q., Zhou Z.: *J. Chromatogr., A* 1114, 269 (2006).

3S-07

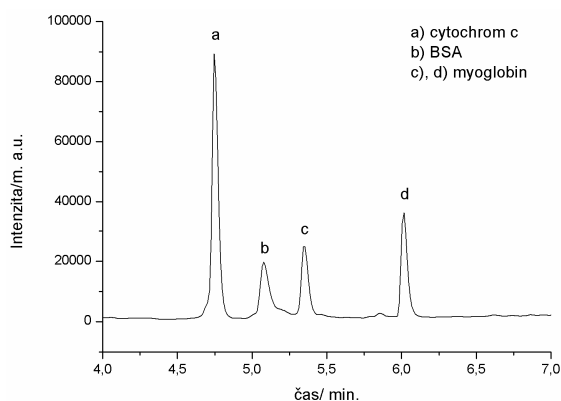
SEPARACE METALOPROTEINŮ V NATIVNÍM STAVU METODOU RP-HPLC SE STACIONÁRNÍ FÁZÍ NA BÁZI MONOLITU

**MARKÉTA PROCHÁZKOVÁ, JAN HAVLIŠ
a VIKTOR KANICKÝ**

Ústav chemie, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37
Brno
marky.prochazkova@centrum.cz

Metaloproteiny a kov vážící proteiny jsou důležitou součástí velkého množství biochemických procesů, jako jsou například transport kyslíku, fotosyntéza, respirační procesy (redoxní reakce), jsou známé jako kofaktory DNA a RNA polymeras a fungují i jako metabolické enzymy (P450)¹. Díky rozmanité struktuře a velkému množství funkcí těchto látek jsou tyto proteiny a jejich analýza stále v popředí zájmu bioanalytiky. Jednou z podmínek úspěšného studia těchto proteinů je jejich separace. Denaturace struktury během separace je většinou nežádoucí, neboť dochází k uvolňování kovové specie, a proto se stále hledají vhodné stacionární fáze. Nově se uplatňuje využití monolitických stacionárních fází².

Byla navržena metoda separace směsi metaloproteinů pomocí techniky HPLC s reverzní (RP) monolitickou (MP) stacionární fází (C8). Navrženou metodou byla úspěšně analyzována modelová směs dvou metaloproteinů (cytochrom c, myoglobin) ve směsi s kov vážícím proteinem BSA (hovězí sérový albumin). Metoda poskytuje vysokou účinnost separace jednotlivých složek směsi (viz obr.) a reprodukovatelné výsledky, na rozdíl od metod s použitím reverzní částicové stacionární fáze C8. Současně jsou prováděny pokusy pro off-line spojení této metody separace s metodou ICP-MS, sloužící k detekci kovů obsažených ve struktuře metaloproteinů. Výzkum by měl vést k navržení on-line spojení RP-HPLC(ML)-ICP-MS jako nové metodiky studia komplexů kov-protein.



LITERATURA

1. Wörle D., Pomogailo A. D.: *Metal complexes and metals in macromolecules*. Wiley, 2003.
2. Švec F., Tennikova T. B., Deyl Z.: *Monolithic materials, preparation, properties and applications*. Elsevier, 2003.

3S-08

ÚLOHA MATRICE PRI ANALÝZE ORGANICKÝCH LÁTKOV V HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRII SEKUNDÁRNYCH IÓNOV

**MONIKA STUPAVSKÁ^a, MONIKA ARANYOSIOVÁ^{a,b}
a DUŠAN VELIČ^{a,b}**

^a Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, ^b Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 841 04 Bratislava
stupavska@fns.uniba.sk

Hmotnostná spektrometria sekundárnych iónov (SIMS) je analytická technika používaná na určenie chemického zloženia povrchov materiálov, pričom nároky na druh a charakter týchto materiálov sú minimálne. Pôvodne bola táto technika koncipovaná pre potreby polovodičového priemyslu, avšak v súčasnej dobe možno sledovať obrovský progres SIMS aplikácií v oblasti organických a biologických materiálov. SIMS metóda je založená na procese, kde sekundárne ióny, vzniknuté pri bombardovaní povrchu pevnej látky primárnymi iónmi, sú extrahované jednotným napätím, s rovnakou kinetickou energiou a separované podľa doby letu ToF – SIMS (Time of Flight). Tvorba takýchto častíc je však zložitý proces už v prípade atomárnych sekundárnych iónov, tým viac v prípade veľkých organických sekundárnych iónov. Z tohto dôvodu predstavuje množstvo emitovaných sekundárnych iónov – iónový výťažok – kľúčový parameter SIMS analýzy. Ten závisí od viacerých faktorov, avšak najväčší vplyv má matricový efekt, čo je závislosť iónového výťažku od chemického prostredia, z ktorého sú ióny vyrábané. Tento faktor výrazne zaväzuje predovšetkým pri analýze organických a biologických materiálov, kde majú prejavy matricového efektu oveľa komplexnejší charakter ako pri polovodičových vzorkách. A práve z týchto dôvodov je matricový efekt veľmi páličivou témou, nakoľko súčasne BIO zameranie SIMS analýz (BIO-SIMS) si vyžaduje citlivú odozvu na veľké makromolekulové systémy.

Matricový efekt bude demonštrovaný na matriciach na báze uhlíka, anorganických solí a nanočastíc, pričom dôraz sa kladie na topografiu matrice – geometrický faktor a na samotnú chemickú povahu týchto látok. Matrice budú diskutované z hľadiska efektivity tvorby organických sekundárnych iónov. Optimalizácia matric z chemického a geometrického hľadiska predstavuje koncepčne nový prístup, ktorý poskytuje elegantné a komplexné riešenie otázky zvyšovania citlivosti BIO-SIMS analýz, nakoľko získané poznatky sú zúžitkované pri vývoji nového typu matrice vhodnej pre SIMS analýzy látok s vysokou molekulovou hmotnosťou.

Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu "meta-QUTE: Centrum excelentnosti kvantových technológií", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a tiež grantu APVV-0491-07.

3S-09

PŘÍPRAVA MAGNETICKÝCH ČÁSTIC PRO SEPARACI BIOMARKERŮ Z TĚLNÍCH TEKUTIN**KATEŘINA ŠIMKOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ
a PETR KAČER***Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
katerina.simkova@vscht.cz*

Včasná diagnostika onemocnění hraje důležitou roli z hlediska zahájení terapie a minimalizace poškození organismu pacient. Moderní medicína využívá k diagnostice pacientů měření hladin látek, které jsou pro dané procesy charakteristické (tzv. „biomarkery“). Nejčastěji se provádí rozbor krve a moči, výjimečný není ani rozbor mozkomíšního moku. Poměrně novou vyšetřovací metodu plicních onemocnění představuje analýza kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV), jehož složení koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách. Velkou výhodou odběru KVV je, že je zcela neinvazivní a pro pacienta nezatěžující, neboť dosavadní metody vyšetření jsou velmi často invazivní (bronchiální biopsie, bronchoalveolární laváž) nebo semi-invazivní povahy (metoda indukovaného sputa) a mohou být pro pacienta zatěžující a nepříjemné, u dětí a seniorů mohou představovat až stresovou záležitost. Princip analýzy kondenzátu vydechaného vzduchu spočívá v kvantifikaci látek specifických pro určitá konkrétní onemocnění, jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhajícího patologického procesu v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena.

Předkládaná práce se zabývá vývojem diagnostické molekulární sondy, jejímž principem je magnetická nanočástice s navázanou monoklonální protilátkou proti cysteinyl-lysovaným leukotrienům (cysLTs = LTC₄, LTD₄, LTE₄). Cysteinyl-lysované leukotrieny vznikají v těle enzymatickými pochody z kyseliny arachidonové, přičemž jedinci s onemocněním Asthma bronchiale mají jejich hodnoty výrazně zvýšeny oproti jejich fyziologickým koncentračním hladinám, což umožňuje jejich využití pro účely diferenciální diagnostiky uvedeného onemocnění. Principem separace z komplexní biologické matrice (KVV, moč, krevní plazma ad.) je vysoce specifická tvorba komplexu antigen-protilátka na povrchu připravené magnetické nanočástice. Pro separaci na povrchu nanočástice vytvořeného komplexu antigen-protilátka je využito externího magnetického pole. Byl vypracován protokol přípravy, charakterizace (TEM, XRD, AFM ad.) a klinického využití magnetických nano-částic pro rychlou diagnostiku a monitoring průběhu bronchiálního záchvatu, případně pro sledování účinnosti farmakoterapie. Uvedená separační metoda byla použita v kombinaci s vysoce selektivní a citlivou metodou LC-ESI-MS/MS (MRM mód, izotopické ředění). Vyvinutá metoda je charakterizovatelná vysokou citlivostí, nízkou chybou stanovení (< 9 %) a možností vícenásobného použití připravené molekulární sondy.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR (Grant NS 10298-3/2009).

3S-10

VÝVOJ METODY UHPLC-MS/MS A MIKRO-EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI PRO STANOVENÍ ATORVASTATINU A JEHO DERIVÁTŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**HANA VLČKOVÁ^a, MILAN BLÁHA^b a PETR SOLICH^a**

^a *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,*
^b *2. Interní klinika, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice, Sokolská 408, 500 05 Hradec Králové
hana.vlckova@faf.cuni.cz*

Atorvastatin patří do skupiny hypolipidemik, které se nazývají statiny. Snižují hladinu celkového cholesterolu, triglyceridů a LDL (low density lipoprotein) cholesterolu.

Cílem bylo vyvinout a validovat UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení atorvastatinu a jeho derivátů v biologickém materiálu a zároveň nalézt optimální postup úpravy vzorků. Vyvinutá metoda bude používána pro rutinní hodnocení velkého množství vzorků, a proto jedním z hlavních požadavků je časová nenáročnost. Jako příprava vzorků byla zvolena mikroextrakce na tuhé fázi, MEPS (microextraction by packed sorbent). Jedná se o novou miniaturizovanou extrakci na tuhé fázi pomocí jehly a stříkačky. Mezi jehlou a stříkačkou je umístěn zásobník s 1–2 mg sorbentu. V současné době jsou komerčně dostupné sorbenty na základě modifikovaného silikagelu C2, C8, C18 a sorbent M1 (směs C8 a SCX).

Byly nalezeny vhodné podmínky UHPLC-MS/MS a MEPS metody přípravy vzorků pro stanovení atorvastatinu a jeho derivátů. Byla zvolena analytická kolona Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm, 2,1 × 100 mm), mobilní fáze směs acetonitrilu a 0,5 mM pufru octanu amonného pH 4,0 s průtokem 0,25 ml min⁻¹ a gradientovou elucí. Jako ionizační technika byla užitá ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Byly optimalizovány jednotlivé parametry ESI a trojitého kvadrupólu. Pro dostatečnou spolehlivost dané metody byly analyty měřeny na dvou SRM (selected reaction monitoring) přechodech. Mikroextrakce byla provedena pomocí sorbentu C8. Bylo nasáto 50 μl vzorku a eluce analytů byla provedena 100 μl směsí acetonitril: 0,1 M pufr octanu amonného pH 4,5 (95: 5, v: v). Vyvinutá metoda byla validována. Výsledky validace jsou: linearita ($r^2 > 0,9990$), přesnost (RSD= 1,43–9,78 %), správnost (87–118 %), LOD (0,03–0,19) a LOQ (0,15–0,57). Celkový čas přípravy vzorku se snížil třikrát, a to na 7 min, což už je doba srovnatelná s délkou vlastní UHPLC-MS/MS analýzy. Použitý objem vzorku byl snížen dvacetkrát a množství rozpouštědel desetkrát. Z těchto důvodů MEPS nahradila dříve používanou časově náročnou SPE metodu a jeví se jako vhodná pro úpravu biologického materiálu.

Nově vyvinutá metoda bude používána zejména pro monitorování hladin atorvastatinu a jeho derivátů u pacientů s familiární hypercholesterolemiií léčených vysokými dávkami atorvastatinu a současně pomocí extrakorporálních eliminačních procedur a budou stanoveny celkové ztráty statinu během procedury, což umožní individuální úpravu farmakoterapeutického režimu.

Poděkování IGA NR/9103-4 a MSM 0021620822.