



# Chemické

# listy

# 8



Malé molekuly vs. biologická léčiva

Detekce kontaminantů v korýších a měkkýších

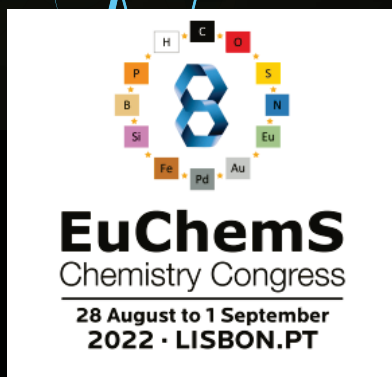
Azolová rezistence kvasinek rodu *Candida*

Bezpečnost hlubinného úložiště

# Chemistry Europe Amplifying Great Science

 **Chemistry  
Europe**

European Chemical  
Societies Publishing



Stop by our  
booth #3

## Chemistry Europe Symposium Monday, August 29, 9:15 – 12:30 Room #9

- We will celebrate the 10th anniversaries of *ChemistryOpen* and *ChemPlusChem*
- Mark the launch of *Chemistry-Methods* and *Analysis & Sensing*
- And introduce the redesign of *ChemistryViews* on a new platform

## Join us for five fascinating talks by top scientists



**Célia Fonseca-Guerra**  
Vrije Universiteit Amsterdam



**Francesco Ricci**  
Rome Tor Vergata



**Javier García Martínez**  
Universidad de Alicante  
Current President of IUPAC



**Anat Milo**  
Ben Gurion University



**Ramón Martínez Mánez**  
Universitat Politècnica  
de València

We look forward to  
seeing you in Lisbon

[chemistry-europe.org](http://chemistry-europe.org)



## Záhady polyamidů a mezilidská chemie

„Za každým velkým objevem a vynálezem je třeba vidět jednoho jediného člověka. Ten poskytne prvotní nápad a ideu, kterou pak jeho spolupracovníci dále rozpracují a uvedou do praxe.“ Takový názor jednou vyjádřil Otto Wichterle (1913–1998), známý jako spoluautor vynálezu přípravy polymerního hydrogelu založeného na hydrofilním 2-hydroxyethylmethakrylátu (spolu s Drahoslavem Límem [1925–2003]) a vynálezce původní metody přípravy měkkých kontaktních čoček polymerací v rotujících formičkách. A ještě pokračoval: „Také originální hudební dílo, třeba symfonii, vytvoří jen jediný skladatel. Až po něm mohou přijít další, kteří jeho motivy mohou dále upravovat, třeba pro jiné nástrojové obsazení.“ Můžeme si představit, že za významnými vynálezy, které jsou dnes součástí civilizace, byli opravdu geniální jednotlivci. Ale dnes už je nemožné zjistit, kdo byl ten první, koho napadlo udělat si luk a šíp, vytvořit kolo na hřídeli, rozdělat třením oheň nebo kombinaci mědi a cínu vytvořit bronz.

Zato historie současných syntetických polymerních materiálů je poměrně mladá. Jejich masivního rozvoje a využití v jednadvacátém století se původní vynálezci a objevitelé často nedožili, zato o nich existují písemná svědectví, patentová literatura a množství vědecké a odborné literatury. Přesto o vzniku významných polymerů, jako jsou polyethyleny, polypropylen nebo polyamidy, které jsou dnes součástí každodenního života, panuje řada nejasností, a dokonce i záhad a pověr. To platí zejména pro historii polyamidů. Jejich příběh je natolik zajímavý, že stojí za bližší prozkoumání. A ukazuje se, že u významných objevů prvních polyamidů opravdu vystupují výrazní jednotlivci. Nikdy ale nebyli sami.

Na prvním místě je to jistě Hermann Staudinger (1881–1965), nositel Nobelovy ceny. Staudinger v roce 1920 v časopise *Chemische Berichte* zveřejnil revoluční článek nazvaný O polymeraci. Samotný termín polymer už na počátku 19. století navrhl švédský chemik Berselius pro látky, jejichž molekuly jsou vytvořeny z mnoha stejných chemických jednotek. Až do Staudingerova článku platil v chemii názor, že polymerní molekuly jsou jen koloidní shluky nízkomolekulárních jednotek. Staudinger ale formuloval představu, že polymery jsou molekulární řetězce, v nichž jsou nízkomolekulární jednotky spojeny chemickými vazbami. Z toho pak logicky vyplynula možnost takové řetězce vytvářet synteticky chemickým spojováním dvojfunkčních monomerů.

Myšlenky polymerních řetězců se hned ve dvacátých letech dvacátého století chopilo několik prozíravých chemiků a snažili se takové nové polymery záměrně vytvářet. Právě třicátá a čtyřicátá léta 20. století byla pro tvůrčí chemiky neobyčejně vzrušující a napínavá. Otevíral se před nimi svět nejrůznějších, dosud neznámých materiálů s netušenými vlastnostmi. Mezi takovými tvůrčími chemiky hned vystupuje tvůrce „nylonového věku“ Wallace

H. Carothers (1896–1937). Absolvoval Harvardovu univerzitu, nějakou dobu přednášel studentům a v roce 1928 nastoupil do ústředních laboratoří firmy DuPont ve Wilmingtonu v americkém státě Delaware. I když Němec Staudinger dostal Nobelovu cenu až v roce 1953, je téměř jisté, že američtí chemici jeho představu polymerního řetězce znali a prakticky podle ní postupovali. Carothersově skupině se takto podařilo připravit několik pozoruhodných polymerních materiálů, např. chloroprenový kaučuk (neopren) a také polyamidy. Největšího úspěchu ale dosáhli přípravou polyamidů kondenzační reakcí hexamethyldiaminu a dichloridu kyseliny adipové na rozhraní vodné a organické fáze. Společnost DuPont přihlásila americký patent na takový polyamid už v červenci 1931. První úspěšnou laboratorní syntézu uskutečnil v Carothersově laboratoři 28. února 1935 francouzsko-americký chemik Gerard Bérchet (1902–1990). Protože každá z reakčních složek má v molekule 6 atomů uhlíku, chemici navrhli pro výsledný produkt jméno polyamid 6-6. To se ale nelíbilo názvoslovné komisi firmy. Vedení společnosti pochopilo, že polyamidová vlákna naleznou rozsáhlé uplatnění na výrobu dámských punčoch. A také, že polyamidové punčochy budou mnohem odolnější proti páření a tvorbě oček. Očku na punčoše se v Americe říká „run“, a tak první návrh jména pro polyamidová vlákna byl „no run“. Z tohoto sloganu se pak postupným přeskupováním písmen vzniklo nyní známé slovo nylon. To slovo se všem líbilo, protože nemělo do té doby žádný konkrétní význam, a navíc se dal vysvětlit jako počáteční písmena dvou největších měst USA a Velké Británie NY-LON. Když se blížila válka a Japonci zablokovali dovoz čínského hedvábí do Ameriky, dostala zkratka nylon ještě další víceslovný rozvoj: **Now You Lost, Old Nippon, tedy: Teď jste prohráli, staří Japonci.**

Další nadějnou cestu na přípravu polyamidů nabízel už od počátku kaprolaktam. Molekula tohoto cyklického amidu tvoří sedmičlenný uzavřený kruh. Každého prozíravého chemika by mělo napadnout, že rozevřením kruhu mezi skupinou C=O a skupinou NH vznikne segment, jehož postupným opakováním by vznikl lineární řetězec polyamidu. Polymer kaprolaktamu ve třicátých letech 20. století doslova visel ve vzduchu. Vzdělaný Carothers o něm nepochybně uvažoval, ale rozevřít kruh kaprolaktamu se mu nepodařilo. A to je hned první záhada spojená s polyamidy (možná neměl patřičně čisté výchozí látky). A následuje hned další a tragické tajemství: Ten chytrý a úspěšný chemik ukončil dobrovolně svůj život. Ještě navštívil krátce svou laboratoř a pak, 28. dubna 1937, objevili náhodní hosté jeho mrtvé tělo v hotelovém pokoji. Poblíž byla polo-prázdná ampulka se zbytkem kyanidu draselného a půlka vymačkaného citrónu. Motiv jeho nešťastného činu se nepodařilo jednoznačně objasnit, ale s kaprolaktamem určitě nesouvisel.

Mezitím, na druhé straně Atlantického oceánu, usiloval o přípravu polyamidů Němec Paul Schlack (1897–1987), výzkumný chemik u německé firmy Glanzstoff. Když zjistil, že příprava polyamidů z kaprolaktamu není patentově chráněna, vydal se tímto výzkumným směrem. Výzkum zahájil z vlastního zaujetí bez přímého příkazu vedení firmy. S jediným laborantem W. Ahrensem byli tak přesvědčeni o dosažitelnosti svého cíle, že pracovali doslova ve dne v noci. Právě jedné noci z 28. na 29. ledna 1938 připravili první polykaprolaktam neboli polyamid-6 (jeho strukturální jednotka má právě 6 uhlíků).

U nás se zabýval přípravou polymerů kaprolaktamu za protektorátu ve výzkumném ústavu firmy Baťa ve Zlíně Otto Wichterle, a to zřejmě nezávisle na Schlackovi. A to je vlastně další záhada. Na druhé straně Wichterle znal americké publikace a řešerše Carothersovy skupiny. Ty přípravu vláknatovného polymeru z kaprolaktamu kupodivu vylučovaly. Přesto se o to Wichterle pokusil, a spolu s Jiřím Procházkou, který pracoval v jeho oddělení v Baťových laboratorích, první kaprolaktam skutečně připravili. Když získali první pětigramovou kuličku polymeru, vytáhli z ní horkou tyčinkou dlouhé vlákno. Wichterle to hrdě předvedl vedoucímu laboratoří docentu Stanislavu Landovi (1898–1981) a spolu s ním pak v osmém patře zlínského mrakodrapu i ředitelům firmy Baťa, Hlavničkovi a Čiperovi. Ředitelé celé oddělení finančně podpořili a rozšířili o další chemiky. Mezi nimi byl přijat také Alois Novotný. Po válce pak pomohl Otto Wichterle zavést průmyslovou výrobu polyamidu-6 v Československu. Nejprve v chemických závodech Žilina, později v Plané nad Lužnicí. Navržený název domácího polyamidu winop (Wichterle-Novotný-Procházka) byl změněn na silon. Jiří Brožek z pražské Vysoké školy chemicko-technologické uvádí, že slovo silon navrhl básník Vítězslav Nezval.

Když se teď pokusíme spletitou historii počátků syntetických polyamidů shrnout, je zřejmé, že by vyžadovala vysvětlení jednotlivých kroků chemických reakcí. Také sled

jednotlivých událostí by si zasloužil podrobnější výklad. Ale jedna věc je zřejmá, žádný z těch vedoucích chemiků, kteří jsou uváděni jako původci prvních polyamidů, nebyl sám. Vždycky měli alespoň jednoho nebo dva blízké spolupracovníky a pak také nezbytné laboratorní zázemí, včetně týmů svědomitých laborantek a laborantů. Úspěšné výsledky spolupracujících chemiků byly možné jen proto, že mezi nimi panovala také optimální spolupráce a vzájemné porozumění, správná mezilidská chemie. Podle nezaručené ústní tradice by se dalo jméno nylon sestavit také z počátečních písmen křestních jmen Carothersových spolupracovníků: Naomi, Yvet, Luisa, Olivia, Nancy.

Závěrem je třeba říct, že polyamidy a polyamidová vlákna nevytvořil jako první žádný z výše uvedených výjimečných lidí, ale Matka Příroda. Proteiny (bílkoviny) jsou totiž přírodní polyamidy dovedené milióny let evoluce do chemické i strukturální dokonalosti. Stejně jako v průmyslové zvláknovací lince také při vzniku přírodních polyamidových vláken probíhá důležitá fáze dloužení. Ta vlákna zjemňuje a vytváří jejich nadmolekulární strukturu. Pavouk své vlákno neustále nožičkami odtahuje a housenka bource morušového se při vypuzování vlákna vrtí kolem své osy. Až si budeme příště vázat hedvábný šátek, nebo vymetat pavučiny, měli bychom si to uvědomit.

Miroslav Raab, Martin Hrubý a Tereza Hamsová

#### LITERATURA

1. McAllister J. F.: *The First Nylon Plant*. American Chemical Society, 1995.
2. Wichterle O.: *Vzpomínky*. Academia, Praha 2007.
3. Raab M.: *Materiály a člověk*. Univerzita Tomáše Bati, Zlín 2000.

● Raab M., Hrubý M., Hamsová T.: Chem. Listy 116, 469–470 (2022).

● <https://doi.org/10.54779/ch120220469>

# BUDOU LÉČIVY BUDOUCNOSTI MALÉ MOLEKULY NEBO BIOLOGICKÁ LÉČIVA?

STANISLAV RÁDL, ONDŘEJ DAMMER a LUDĚK RIDVAN

Zentiva k.s., U kabelovny 130, 102 37 Praha 10  
 Stanislav.radl@zentiva.com,  
 Ondrej.dammer@zentiva.com, Ludek.ridvan@zentiva.com

Došlo 17.3.22, přijato 13.5.22.

Klíčová slova: malé molekuly, biologická léčiva, biosimilární léky, polymorfy, solváty, kokrystaly, amorfní pevné disperze, lipidické formulace

• <https://doi.org/10.54779/chl20220471>

## Obsah

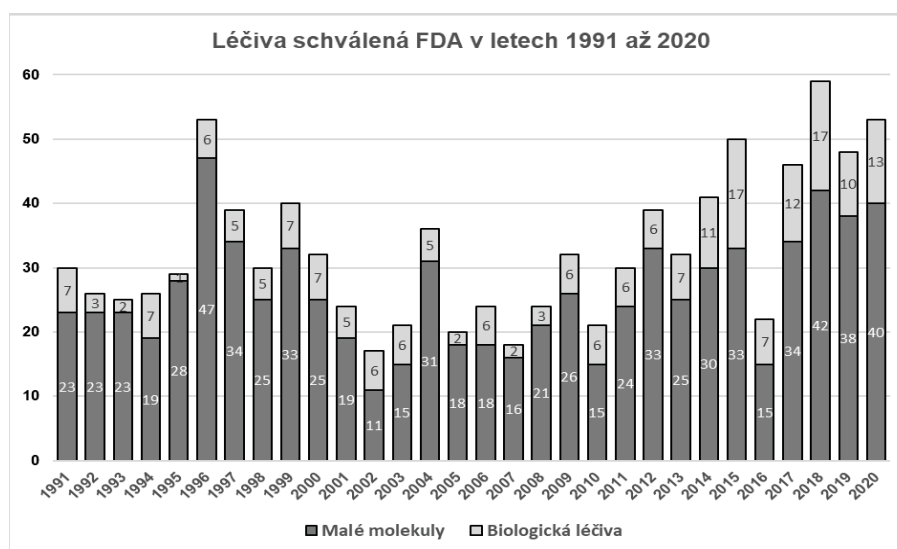
1. Úvod
2. Malé molekuly a biologická léčiva
3. Pokroky v oblasti léčiv s malými molekulami
4. Problémy řešené v souvislosti s aplikací malých molekul
  - 4.1. Proléčiva
  - 4.2. Pevné formy účinných látek: polymorfy, solváty, soli a kokrystaly
  - 4.3. Amorfní pevné disperze
  - 4.4. Lipidické formulace
5. Koexistence malých molekul s biologickými léčivy
6. Závěr

## 1. Úvod

Když se stal jeden z autorů tohoto příspěvku (SR) skoro před 30 lety členem širší redakční rady mezinárodního časopisu *Drugs of the Future*<sup>1</sup>, pojednával tento časopis v podstatě pouze o takzvaných „malých molekulách“ (small molecules). S nástupem biologických léčiv na počátku 90. let se situace začala měnit, ale stále počet schválených biologických léčiv nedosahuje počtu schválených léčiv s malými molekulami. Např. v roce 2018 americký regulační úřad FDA (Food and Drug Administration) schválil sice největší počet biologik v historii (17), ale také 42 malých molekul (obr. 1). Zjevně tedy léky budoucnosti budou představovány oběma zmíněnými třídami léčiv. V následujícím textu bychom chtěli osvětlit hlavně roli malých molekul v terapii, včetně problémů, které zavádění takových léčiv provází.

## 2. Malé molekuly a biologická léčiva

Pod pojmem malé molekuly se ve farmacii obvykle míní látky s jednoduchou strukturou o poměrně nízké molekulové hmotnosti. Většinou jsou schopné se dostat dovnitř buněk a tam zprostředkovávat svoji biologickou aktivitu. Dalším aspektem malých molekul je, že je lze podávat řadou způsobů a pokud mají vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, tak i orální cestou. Vzhledem k jednoduše struktuře a malé velikosti lze tato léčiva snadno charakterizovat a také analyticky sledovat jejich čistotu. Byly to právě



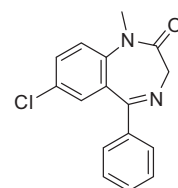
Obr. 1. Počet malých molekul a biologických léčiv schválených v letech 1991 až 2020

malé molekuly, které během minulého století dosáhly významných úspěchů v léčbě řady onemocnění a které pomohly současným farmaceutickým firmám k dosažení jejich věhlasu a bohatství. Většina léků s ročními prodeji nad milion amerických dolarů, takzvaných „blockbusterů“, patřila dlouho k malým molekulám. V 60. a 70. letech minulého století takovým léčivem byl benzodiazepin diazepam (Valium), který se záhy po jeho zavedení v roce 1963 stal „blockbusterem“ a po několik desetiletí zůstal v USA nejprodávějším lékem na předpis. Dalším průlomem bylo hypolipidemikum atorvastatin (Lipitor, Sortis), který v letech 2003–2011 přinášel firmě Pfizer ročně obrát několika miliard USD s vrcholem 13 miliard v roce 2006 (cit.<sup>2</sup>). Vzhledem k jednotkové ceně není žádným překvapením, že monoklonální protilátka adalimumab (Humira) firmy AbbVie několik let po svém schválení překonala svými prodeji atorvastatin a stala se největším „blockbusterem“ všech dob.

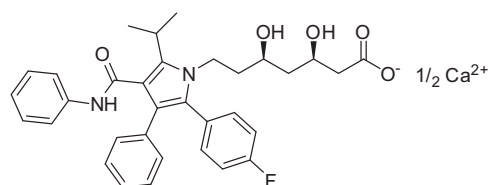
Většina malých molekul je získávána chemickou syntézou nebo z přírodních zdrojů, popřípadě chemickou modifikací prekurzorů získaných z přírodních zdrojů. Mezi malé molekuly ale také patří klasická antibiotika získávaná fermentačně. Podobně jsou biotechnologicky získávané i další typy malých molekul. Z těch známějších lze zmínit první schválené statinové hypolipidemikum lovastatin (Mevacor) nebo orlistat (Xenical) k léčbě obezity.

Na druhou stranu biologická léčiva (biofarmaceutika)<sup>3</sup> jsou složité organické struktury, obvykle nemající jednotnou strukturu. My se v následující diskusi budeme věnovat hlavně monoklonálním protilátkám (-mabům), které představují zdaleka největší část nově schvalovaných biologických léčiv<sup>4,5</sup>. Díky svojí velké molekule tyto látky obvykle nejsou schopny proniknout do buněk a svoji biologickou aktivitu zprostředkovávají mimo buňky. Vzhledem k jejich charakteru nelze biologická léčiva snadno strukturně charakterizovat a stávajícími analytickými metodami nelze spolehlivě sledovat jejich čistotu.

S rozvojem molekulární biologie a podobných věd



diazepam



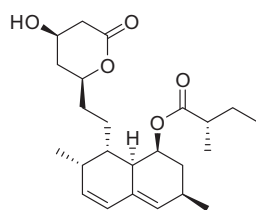
atorvastatin

došlo za posledních 50 let k výraznému rozvoji v oblasti biologických léčiv a někteří experti předpokládali rychlou dominanci těchto léčiv ve většině terapeutických oblastí. Ve skutečnosti malé molekuly stále dominují jak ve výzkumu, tak v terapii většiny onemocnění. Tento fakt má řadu příčin, mezi něž patří jak nemožnost orálního podání, tak vysoká cena těchto léčiv. Dalším důvodem je fakt, že u malých molekul vzhledem k relativně nízké molekulové hmotnosti a jednoduchým chemickým strukturám jsou jejich farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti obvykle předvídatelnější než je tomu u biologických léčiv. A i když některá léčiva s malou molekulou, zvláště ta z přírodních zdrojů nebo ta přírodními látkami inspirovaná, jsou strukturně velmi složitá, jsou jejich výroba a čištění ve srovnání s biologickými léčivy obvykle poměrně jednoduché. Výsledkem je fakt, že většina malých molekul může být cenově mnohem dostupnějšími, zvláště v okamžiku vstupu generických ekvivalentů na trh, kdy dochází k významnému snížení jejich ceny. U biologických léčiv sice také po uplynutí patentové ochrany mohou nastoupit takzvaná biosimilární léčiva<sup>6</sup>, cenová eroze v této oblasti ale nebývá tak výrazná jako u generik. To je dáno jednak značnou složitostí výroby biologických léčiv, do značné míry ale také tím, že vzhledem k složitosti jejich výroby a kontroly jakosti zde neexistuje tak ostrá konkurence jako u generických léčiv.

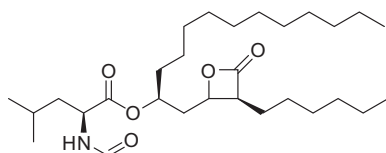
Zvláště v onkologii se biologická léčiva velmi rychle stala nepostradatelnou součástí terapie, kde naplňují nenaplněné klinické potřeby, které malé molekuly nemohou uspokojit. Řada monoklonálních protilátek, jako je například trastuzumab (Herceptin), se stala základní cílenou terapií v léčbě řady onkologických onemocnění.

### 3. Pokroky v oblasti léčiv s malými molekulami

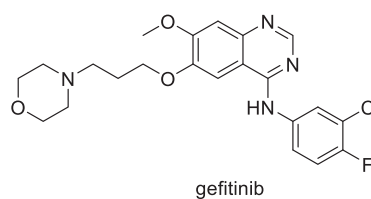
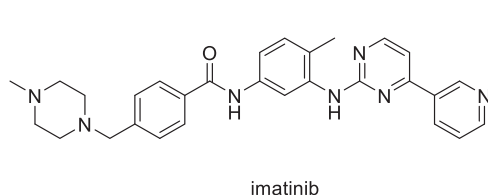
V tomto pojednání bychom rádi diskutovali roli malých molekul a biologických léčiv v různých terapeutických oblastech a ilustrovali naše názory příklady několika



lovastatin



orlistat



terapeutických oblastí. Vzhledem ke schopnosti řady malých molekul dostat se do buňky a tam ovlivňovat intracelulární děje, včetně těch zprostředkovaných proteiny, jsou a i v budoucnosti budou malé molekuly nepostradatelnou součástí terapie. Vzhledem k jednoduššímu získávání malých molekul ve velkých kvantech se dá předpokládat, že zvláště u léčby chronických a široce rozšířených onemocnění malé molekuly zůstanou pilířem klinické léčby.

Farmaceutický výzkum účinných látek v podobě malých molekul stále roste, avšak jejich povaha se mění – jsou často velmi špatně rozpustné a vysoce potentní. To přináší mnoho výzev pro farmaceutické firmy, které musejí měnit své výrobní trendy a průmyslové zázemí, aby mohly zformulovat nové účinné látky do léčivých produktů, které se stávají velmi komplexní a vyžadují použití inovativních technologií.

V současné době největší část nových léčiv s malými molekulami zaváděných do terapie patří do skupiny inhibitorů proteinových kinas, které inhibují těchto enzymů blokují přenos signálu v buňce. Brzy po zavedení prvního léčiva této kategorie, inhibitoru tyrosinové kinasy imatinibu (Gleevec) v roce 2001, následovalo v roce 2003 zavedení gefitinibu (Iressa). Obě léčiva používaná v onkologii, imatinib k léčbě určitých typů leukémie a gefitinib v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, se záhy stala „blockbustery“.

Následovalo schválení mnoha dalších léčiv založených na inhibici řady tyrosinových kinas. Zjistilo se, že u těchto léčiv je výhodnější, pokud inhibují současně několik kinas, a tak modernější léčiva této skupiny již nejsou selektivními inhibitory, ale jsou cíleny na několik různých enzymů. Kromě typických inhibitorů tyrosinových kinas některá nová léčiva inhibovala jejich různé subtypy, včetně Janus kinasy (např. ruxolitinib – Jakafi), Brutonovy kinasy (např. ibrutinib – Imbruvica), nebo serin-threoninové kinasy, jako jsou cyklin-dependentní kinasy (např. palbociclib – Ibrance). Nástup kinasových inhibitorů je patrný z toho, že od schválení imatinibu uplynulo

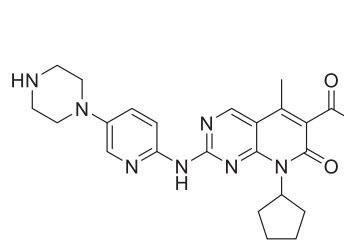
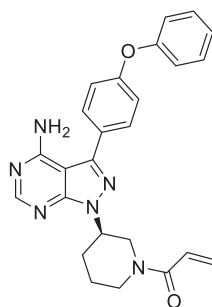
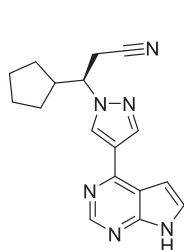
pouhých 20 let a v současné době je již registrováno kolem 70 kinasových inhibitorů.

#### 4. Problémy řešené v souvislosti s aplikací malých molekul

V průběhu vývoje medicínální chemie a farmakologie byla objevena řada platných principů, jejichž aplikací lze obecně získat malé molekuly, které svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi zajišťují přijatelnou úroveň farmakokinetických parametrů požadovanou pro orálně podávaná léčiva. Jedním z nich je takzvané Lipinského pravidlo 5 (cit.<sup>7</sup>), jehož aplikací při optimalizaci struktury vyvíjeného léčiva došlo v posledních 20 letech k podstatnému zvýšení účinnosti tohoto procesu. Řada biologicky zajímavých látek působících novými mechanismy účinku (např. inhibitory proteinových kinas) ale spadají do oblasti sloučenin, které Lipinského pravidlo 5 nesplňují. Uvádí se, že se to týká zhruba poloviny nově zaváděných léčiv. V těchto případech se používá pro dosažení přijatelné biodostupnosti řada přístupů zahrnující chemickou a fyzikální modifikaci účinné látky. O nejčastěji používaných se zmíníme v následujícím textu.

##### 4.1. Proléčiva

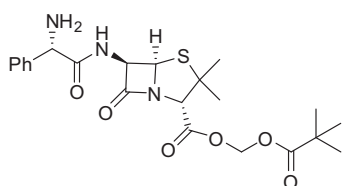
Proléčivo je neúčinná látka, která se teprve v organismu přemění na účinné léčivo. Původně se často teprve během vývoje, nebo dokonce během používání léčiva zjistilo, že k vyvolání požadovaného účinku se musí nejprve podaná látka metabolizovat. V současné době musí být již během vývoje léčiva známá jeho farmakokinetika a proléčiva jsou u účinných látek s nevhodnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi vyvíjena cíleně. Racionálním důvodem pro přípravu proléčiv je nejčastěji optimalizace absorpce, distribuce, metabolismu nebo vylučování léčiva, které obecně směřují ke zlepšení biologické dostupnosti



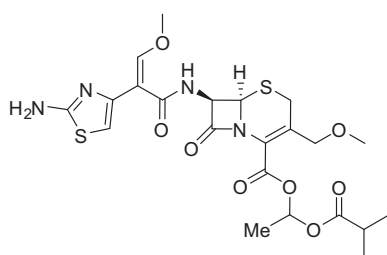
aktivní substance.

Tento článek nemá za cíl pojednávat o proléčivech, pokud ale máme diskutovat oblast zlepšení biodostupnosti léčiv, nemůžeme se této oblasti vyhnout. Pro bližší seznámení s problematikou existuje řada knih a několik recentních publikací<sup>8–10</sup>.

Velkým přínosem byl výzkum proléčiv odvozených od betalaktamových antibiotik, kde pro zlepšení biodostupnosti byla často modifikována karboxylová skupina, obvykle ve formě složených esterů. Typickým příkladem mohou být pivaloyloxymethylester ampicillinu pivampicilin nebo obdobně odvozený ester cefalosporinového antibiotika cefpodoximu.



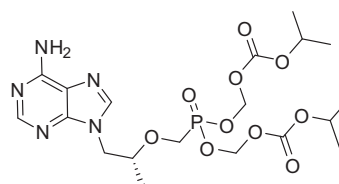
pivampicilin



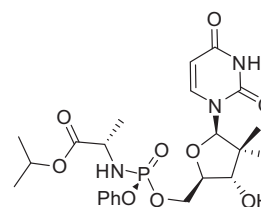
cefpodoxim proxetil

Největšího rozšíření využívání proléčiv se zřejmě dostalo v oblasti protivirotických nukleosidů<sup>10</sup>, kde přítomnost silně polárních fosfátových nebo fosfonátových skupin způsobovala špatné vstřebávání. Typickým příkladem takového proléčiva je Dr. Holým objevený tenofovir používaný ve formě esteru disoproxil (Viread). Významným pokrokem v této oblasti bylo zavedení sofosbuviru (Sovaldi), léku proti hepatitidě C obsahujícího nový typ *promoiety*. Stejnou modifikací získaný tenofovir alafenamid (Vemlidy) je možné díky mnohem lepšímu vstřebávání podávat v podstatně nižších dávkách než příslušný disoproxil.

Většina dosud zavedených proléčiv byla navržena tak, aby svými vlastnostmi zlepšovala průnik různými bariérami v těle. Často se jednalo o zlepšení vstřebávání z gastrointestinálního traktu do krve, ale také umožnění přestupu léčiva přes hematoencefalickou bariéru. Nízká biodostupnost léčiv je ale často ve značné míře dána i tím, že je léčivo při prvním průchodu játry částečně odbouráváno. Tomu by se dalo vyhnout, pokud by se účinná látka modifikovala tak, aby se z buněk střevní stěny místo do krve dostala do lymfatického systému. Tento moderní trend je sice dosud ve fázi akademického výzkumu, představuje ale velmi perspektivní, dosud terapeuticky nevyužívaný směr výzkumu proléčiv<sup>11</sup>.



tenofovir disoproxil



sofosbuvir

#### 4.2. Pevné formy účinných látek: polymorfy, solváty, soli a kokrystaly

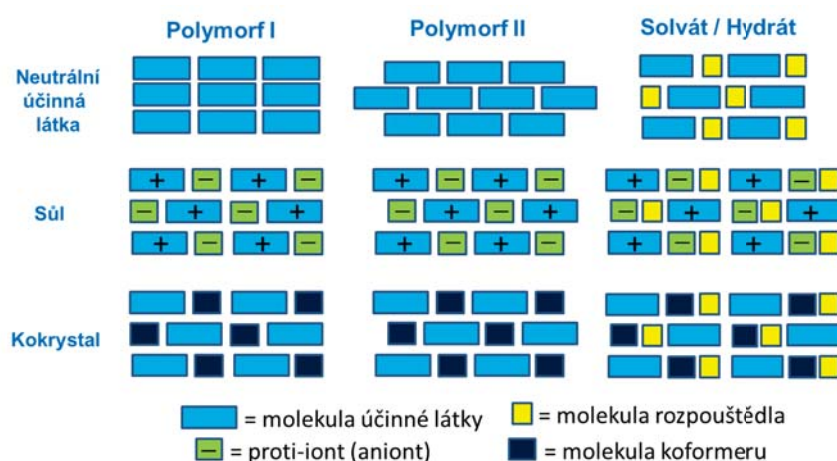
Účinné látky mohou být připraveny v řadě různých pevných krystalických forem (obr. 2). Volba pevné formy účinné látky je důležitá jednak pro izolaci (výtěžek krystalizace a její čistící schopnost) a především pro formulaci lékové formy, protože každá pevná forma vykazuje specifické fyzikálně-chemické vlastnosti (stabilita, rozpustnost, apod.). Z pohledu generických léčiv je podstatné, že všechny pevné formy, tj. polymorfy, soli, solváty i kokrystaly, jsou z pohledu Evropské lékové agentury ekvivalentní<sup>12</sup>.

Polymorfie byla diskutována v řadě publikací<sup>13,14</sup> a její znalost pro danou účinnou látku je zásadní nejen pro vývoj krystalizačního procesu, ale i pro vývoj lékové formy. V současné době je polymorfni screening součástí vývoje každého léčiva, a to jak založeného na nové účinné látce, tak léčiva generického. U nových léčiv jde o nalezení polymorfu s optimální biodostupností a stabilitou – nejstabilnější pevná forma mívá nejpomalejší rozpouštěcí rychlost. U generických léčiv pak jde o to, aby výsledná léková forma byla bioekvivalentní s originálním léčivem. Proto by měl být vybraný polymorf srovnatelnou nebo vyšší disoluční rychlost, kterou lze formulací měnit a dosáhnout tak požadované bioekvivalence.

V některých případech jsou účinné látky izolovány a dále použity v lékovém přípravku ve formě solvátu, nejčastěji hydrátu<sup>15</sup>. Na trh však byly uvedeny i solváty s organickými rozpouštědly, např. s acetonem (cabazitaxel, Jevtana firmy Sanofi), dimethylsulfoxidem (trametinib, Mekinist firmy Novartis), nebo ethanolem (darunavir, Prezista firmy Janssen).

Převod neutrální účinné látky na vhodnou sůl s vyšší rozpustností ve vodě je běžně používaný způsob jak zvýšit biodostupnost. V posledních letech je pro zlepšení fyzikálně-chemických vlastností využívána i příprava kokrystalů<sup>16</sup>. Vzhledem k tomu, že existence specifických pevných forem není jednoznačně předvídatelná, je možné jejich



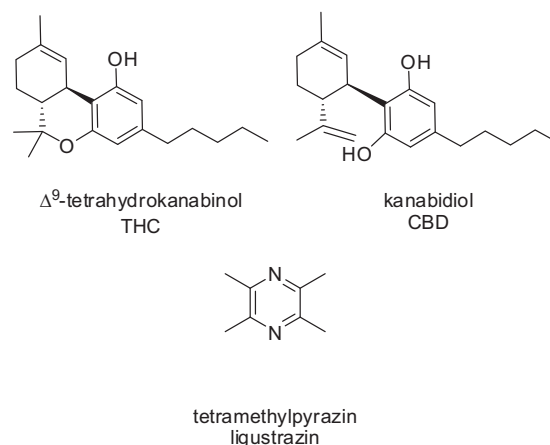


Obr. 2. Schématické zobrazení možných krystalických forem účinných látek

patentování. Toho využívají jednak originátorské společnosti k prodloužení exkluzivity léčiva, tak i generické firmy, které se snaží uvést cenově dostupnější ekvivalent na trh co nejdříve.

Zatímco použití různých solí stejné účinné látky je poměrně běžné, využití kokrystalu účinné látky s vhodným koformerem v komerčně využívaném léčivu je jevem relativně novým. Příkladem takového léčiva je přípravek Entresto, kde je použit kokrystal dvou účinných látek, sodných solí valsartanu a sacubitrilu. Prvním generickým příkladem léčiva s účinnou látkou ve formě kokrystalu na trhu je přípravek Agomelatin Zentiva, obsahující kokrystal agomelatinu s kyselinou citronovou. V originálním antidepresivu firmy Servier Valdoxanu používaný stabilní polymorf agomelatinu (forma II) je patentově chráněn až do roku 2025 a objevení zmíněného kokrystalu umožnilo firmě Zentiva vstoupit na trh již v roce 2019.

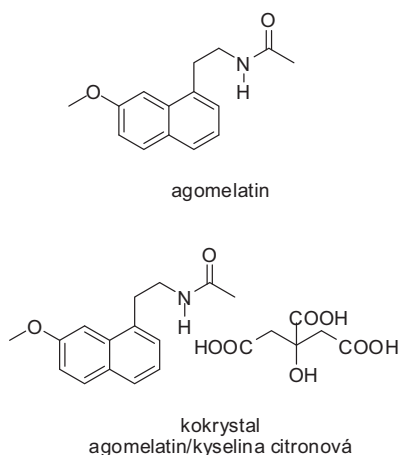
Uvolnění restrikcí týkajících se léčebného užití kannabinoidů vedlo k zavedení prvních léčiv obsahujících  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol (THC) a kanabidiol (CBD)<sup>17</sup>. Přes-



to přetrvává problém nízké biodostupnosti těchto látek a je v současné době řešen u řady firem, hlavně u CBD, který je díky absenci psychoaktivních vlastností potenciálním léčivem v řadě indikací. Nejdále se ve vývoji zřejmě dostala firma Artelo, která vyvíjí pod označením ART-12.11 kokrystal CBD s tetramethylpyrazinem, látkou přírodního původu známou také pod názvem ligustrazin. Podle předběžných výsledků lze tímto způsobem několikanásobně zvýšit biodostupnost CBD.

#### 4.3. Amorfní pevné disperze

Zvýšení rozpustnosti účinné látky může být dosaženo jak na úrovni účinné látky (proléčiva, pevné formy), tak technologickým procesem v rámci formulace léčivého přípravku<sup>18–21</sup>. V současnosti se nejčastěji setkáváme s použitím pevných disperzí, které se v průmyslu připravují metodami sprejového sušení nebo extruze z taveniny. Pevné disperze se skládají z nejméně dvou komponent – účinné látky a nosiče (hydrofilního polymeru), přičemž



nejvyšší rozpustnosti a tedy i biodostupnosti daného léčiva je dosaženo v případě, že účinná látka je molekulárně dispergována v polymeru<sup>22,23</sup>. Přítomnost polymeru zajišťuje jak vyšší fyzikální stabilitu ve srovnání s čistou amorfni formou, tak ovlivňuje uvolňování léčiva z polymerní matrice. Snažíme se dosáhnout tzv. „spring and parachute“ efektu, kdy je dosaženo vyšší rozpustnosti účinné látky díky její přítomnosti v termodynamicky vyšším energetickém stavu (spring) a polymer následně zajišťuje udržení účinné látky v rozpuštěném, často přesyceném stavu (parachute)<sup>24</sup>. Tím dochází k prodloužení doby potřebné pro vstřebávání účinné látky ze zažívacího traktu a z toho plynoucímu zvýšení biodostupnosti. Polymer zároveň brání nežádoucí krystalizaci léčiva a zabraňuje jeho vysrážení.

Sprejové sušení je nejběžnějším způsobem přípravy amorfních pevných disperzí, které se používají v pevných lékových formách pro zvýšení biodostupnosti špatně rozpustných účinných látek<sup>25</sup>. Amorfni pevné disperze jsou získány rozpuštěním účinné látky a polymeru v organickém rozpouštědle. Roztok je následně rozprašován do horkého média, ve kterém jsou jemné kapky roztoku sušeny a vzniklé pevné částice jsou použity jako komponenta do pevných lékových forem. Pro průmyslové použití této technologie a její následné převedení do většího měřítka (scale-up) je klíčovým parametrem rozpustnost účinné látky ve zvoleném rozpouštědle.

V tabulce I jsou shrnuty léčivé přípravky obsahující pevné disperze účinné látky a polymeru připravené metodou sprejového sušení. Pro přípravu pevných disperzí byly použity následující polymery: směsný acetát-sukcinát hydroxypropyl methylcelulosa (acetát-sukcinát hypromelosa, HPMC-AS), hydroxypropyl methylcelulosa (hypromelosa, HPMC) a kopovidon. Nejčastěji používaný HPMC-AS má vhodné vlastnosti pro použití při sprejovém sušení: vykazuje vysokou teplotu skelného přechodu v jejím neionizovaném stavu, vysokou rozpustnost v organických rozpouš-

tředlech a amfifilní povahu. Ta zajišťuje interakci nerozpustných molekul aktivní substance (API) s hydrofobními částmi polymeru, přičemž hydrofilní části tohoto polymeru zaručují stabilitu ve vodném roztoku<sup>26</sup>.

Extruze z taveniny je další průmyslová technologie, která je používána pro zvýšení rozpustnosti a biodostupnosti špatně rozpustných účinných látek<sup>27</sup>. Jedná se o termomechanický proces, ve kterém je účinná látka spolu s polymerem, případně se změkčovadlem (plastifikátorem) intenzivně hnětena ve šnekovém extrudéru účinkem střížných sil při teplotě vyšší než je teplota skelného přechodu polymeru. Tavenina je vytlačena přes profilový otvor a následně zchlazena. Vytlačovaný extrudát ve formě dlouhých válečků (špaget) je následně zpracován například mletím a spolu s dalšími pomocnými látkami formulován do léčivého přípravku. Mezi hlavní výhody této techniky ve farmacii patří možnost jejího využití jako kontinuálního procesu ve výrobě bez potřeby rozpouštědla a všestrannost použití extrudátu pro lékové formy s okamžitým i řízeným uvolňováním.

V produktech, které byly vyrobeny touto technologií v posledních letech, byly jako polymery použity kopovidon a HPMC-AS (viz tab. II). V produktu Venclxyto obsahující účinnou látku venetoclax byla k extruzi použita čtyřsložková směs obsahující API, kopovidon, polysorbát Tween 80 a koloidní oxid křemičitý (Aerosil)<sup>28</sup>. Tento produkt vykazuje zajímavou zvýšenou biodostupnost v závislosti na obsahu tuku v jídle<sup>29</sup>.

#### 4.4. Lipidické formulace

Lipidické formulace představují vedle modifikace účinné látky a technologického postupu další možnost pro zvýšení biodostupnosti špatně rozpustných účinných látek<sup>30,31</sup>. Jedná se o poměrně širokou škálu systémů, ve kterých se využívá rozpustnosti účinné látky v různých

Tabulka I

Seznam produktů vyrobených technologií sprejového sušení, dle registrační dokumentace

| Produkt  | Účinná látka                            | Polymer                                  | Společnost | Registrace |
|----------|---|--|------------|------------|
| Kalydeco | ivacaftor                               | HPMC-AS                                  | Vertex     | 2012       |
| Harvoni  | ledipasvir + sofosbuvir                 | kopovidon (ledipasvir)                   | Gilead     | 2014       |
| Zepatier | elbasvir + grazoprevir                  | kopovidon                                | Merck      | 2016       |
| Orkambi  | lumacaftor + ivacaftor                  | HPMC-AS <sup>a</sup> (ivacaftor)         | Vertex     | 2016       |
| Epclusa  | sofosbuvir + velpatasvir                | kopovidon (velpatasvir)                  | Gilead     | 2016       |
| Vosevi   | sofosbuvir + velpetasvir + voxilaprevir | kopovidon                                | Gilead     | 2017       |
| Erleada  | apalutamid                              | HPMC-AS <sup>a</sup>                     | Janssen    | 2018       |
| Symkevi  | tezacaftor + ivacaftor                  | HPMC-AS <sup>a</sup> , HPMC <sup>b</sup> | Vertex     | 2018       |

<sup>a</sup> HPMC-AS – směsný acetát-sukcinát hydroxypropyl methylcelulosa; <sup>b</sup> HPMC – hydroxypropyl methylcelulosa

## Tabulka II

Seznam produktů vyrobených technologií extruze z taveniny, dle registrační dokumentace

| Produkt   | Účinná látka               | Polymer              | Společnost | Registrace |
|-----------|----------------------------|----------------------|------------|------------|
| Noxafil   | posaconazol                | HPMC-AS <sup>a</sup> | Merck      | 2013       |
| Belsomra  | suvorexant                 | kopovidon            | Merck      | 2015       |
| Venclyxto | venetoclax                 | kopovidon            | AbbVie     | 2016       |
| Maviret   | glecaprevir + pibrentasvir | kopovidon (obě API)  | AbbVie     | 2017       |

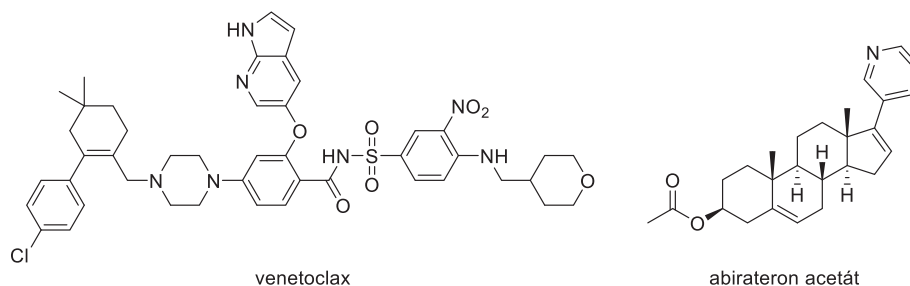
<sup>a</sup> HPMC-AS – směsný acetát-sukcinát hydroxypropyl methylcelulosity

tucích, přičemž formulace často obsahují surfaktanty a kosolventy. Lipidické formulace zahrnující účinnou látku v rozpuštěném nebo suspendovaném stavu byly rozděleny do čtyř hlavních tříd podle zastoupení mono-, di-, triglyceridů, ve vodě nerozpustných a rozpustných tenzidů a množství hydrofilních kosolventů. Složení lipidické formulace má vliv na *in vivo* účinnost, a proto musí být zhodnocena celá řada parametrů pro úspěšnou formulaci. Mezi ně patří například fyzikálně chemické vlastnosti účinné látky a formulace a zhodnoceno musí být také chování formulace v zažívacím traktu – dispergovatelnost formulace a udržení solubilizační schopnosti rozpouštědla při zředění formulace v zažívacím traktu a následném trávení lipidických vehikulů. Absorpce účinné látky z lipidické formulace je komplexní biochemický proces, který zahrnuje trávení tuků příslušnými lipasami, vznik micel solí žlučových kyselin a účinné látky a jejich přenos do krevního řečiště nebo lymfatického systému. Přes lymfatický systém se mohou vysoce lipofilní účinné látky dostat do krevního oběhu aniž by byly portálními žilním transportem dopraveny do jater, kde by došlo k jejich metabolizaci (first pass effect)<sup>32</sup>. Nežádoucím jevem může být precipitace účinné látky v zažívacím traktu, které se snažíme zabránit vhodným složením formulace nebo přidáním inhibitorů precipitace. Výzkum lipidických formulací je v současnosti prováděn především na akademických pracovištích a ve specializovaných kontraktních firmách. Pro větší průmyslovou aplikovatelnost různorodých v literatuře popsaných formulací je potřeba dosáhnout účinné spolupráce mezi akademickou a průmyslovou sférou, alespoň v některých částech výzkumu, jak navrhuje R. Holm ve své publikaci<sup>33</sup>.

Platforma The Parc (Pharmaceutical Applied Research Center) představuje spolupráci mezi akademickým a průmyslovým prostředím ve farmaceutických vědách

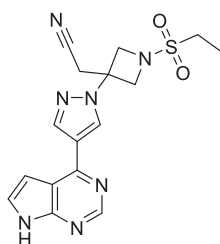
v České republice. Z této spolupráce vznikla v roce 2020 start-up společnost Marblemat, která se věnuje přípravě lipidických samoemulgujících systémů. Jedná se o olejové kuličky složené z lipidického jádra obsahující směs olejů a surfaktantů, ve které je rozpuštěna účinná látka. Kuličky jsou zpevněny/zhutněny smáčivým práškovým excipientem, který brání jejich aglomeraci. Zpevněné kuličky vykazují (alespoň při pokojové teplotě) vlastnosti pevných lékových forem a dají se plnit například do kapslí. Účinnost této formulace obsahující jako účinnou látku abirateron acetát a jako zhutňující excipient pH závislý typ HPMC-AS byla testována *in vitro* a v *in vivo* studii na potkanech<sup>34</sup>. Ve srovnání s originálním přípravkem bylo dosaženo zvýšení biodostupnosti léčiva nalačno. Navíc bylo ukázáno, že tento typ formulace potlačuje nežádoucí efekt jídla ve srovnání s originálním přípravkem, který je nutno podávat pacientům výhradně nalačno.

Pro účinné látky vykazující nízkou rozpustnost v tucích je potřeba k dosažení požadované dávky účinné látky v přípravku hledat nové strategie lipidických formulací. Mezi ně patří přesycené lipidické formulace<sup>35</sup>, použití lipofilních solí<sup>36</sup> nebo lipidických hybridních systémů<sup>37</sup>. Uvedené přístupy byly použity u dříve zmíněné účinné látky venetoclax. V případě přesycených formulací byla zkoumána role polymerních inhibitorů precipitace na *in vitro* a *in vivo* účinnost. Použití lipofilní soli venetoclax dokusátu v lipidické formulaci v preklinické studii na prasech ukázalo více než dvojnásobné zvýšení biodostupnosti nalačno a odstranění efektu jídla na biodostupnost<sup>36</sup>. Uvedená formulace abirateron acetátu a venetoclaxu tak ukazuje směry, jakým by mohly být současné přípravky na trhu vylepšeny – snížením dávky účinné látky v přípravku a/nebo odstraněním „food efektu“.



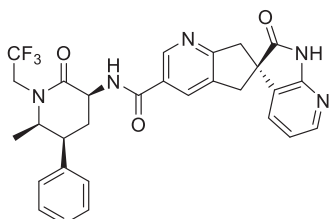
## 5. Koexistence malých molekul s biologickými léčivy

Jak bylo ukázáno výše, nejrychleji se rozvíjející skupinou léčiv s malými molekulami jsou inhibitory proteiny-ových kinas používané mimo léčby některých autoimunitních onemocnění hlavně v léčbě onkologických onemocnění. Přitom ve stejných indikacích se široce rozvíjí i využívání biologických léčiv. Příkladem může být dvojice moderních léčiv široce používaných k léčbě revmatoidní artritidy – monoklonální protilátka adalimumab (Humira) a inhibitor Janus kinasy baricitinib (Olumiant). Adalimumab je indikován i u řady dalších autoimunitních onemocnění (např. Crohnova choroba) a vzhledem k vysoké ceně se stal v roce 2018 lékem s nejvyššími prodeji, kdy jeho obrat dosáhl téměř 20 miliard dolarů. Na druhou stranu mnohem levnější baricitinib je používán hlavně k léčbě artritidy a v menší míře k léčbě závažnějších forem atopické dermatitidy. I když některé zdroje v případě revmatitidy uvádějí výhodnost dražší biologické léčby<sup>38</sup>, jiné dospěly hlavně v případě zmírnění bolesti k opačným závěrům<sup>39</sup>.



baricitinib

Kromě léčby onkologických a autoimunitních onemocnění se začínají biologická léčiva prosazovat i v některých oblastech dosud využívajících pouze léčiva s malými molekulami. Příkladem mohou být hypolipidemika<sup>40</sup>, kde jsou již řadu let léčivy volby statiny, popřípadě v kombinaci s inhibitorem vstřebávání cholesterolu ezetimibem (Zetia). I přes jejich významnou účinnost má tato léčba u některých pacientů nežádoucí účinky a také pro část pacientů není vhodná. Proto se již řadu let zkoumají další možnosti léčiv působících jiným mechanismem. V poslední době se výzkum soustředil hlavně na inhibici peptidu PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9), který se vyskytuje v řadě tkání, nejvíce ale v játrech. První dva PCSK9 inhibitory byly schváleny v roce 2015. Jedná se o monoklonální protilátky alirocumab (Praluent) firmy Sanofi a evolocumab (Repatha) firmy



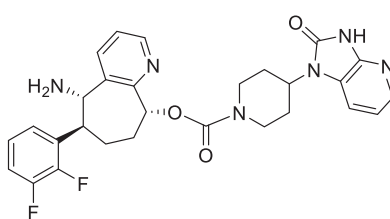
ubrogepant

Amgen. Podávají se injekčně 1× za 4 týdny a jsou určeny hlavně pro pacienty, kteří nejsou léčitelni statiny. Nevýhodou těchto léčiv je nutnost injekčního podání a také vysoká cena. Snahy vyvinout malé molekuly jako orálně fungující PCSK9 inhibitory byly u firmy Pfizer úspěšné *in vivo*, do klinického hodnocení se ale žádná taková látka nedostala. Přesto aktivity farmaceutických firem v tomto směru pokračují.

Dalším zajímavým příkladem koexistence obou tříd léčiv jsou moderní léčiva k léčbě migrény<sup>41</sup>. Zlomem v léčbě tohoto závažného onemocnění bylo zavedení nové skupiny léčiv triptanů v 90. letech minulého století. Tyto látky působí jako agonisté serotoninových 5-HT<sub>1B</sub> a 5-HT<sub>1D</sub> receptorů (některé i 5-HT<sub>1F</sub>) a jsou obvykle dobře tolerovány. I když triptany představovaly výrazný pokrok v léčbě migrény, jejich omezené využití u některých pacientů a také fakt, že u 25–40 % pacientů se po počáteční úlevě znovuobjeví bolest, vedl k hledání alternativních přístupů k léčbě migrény. Zatím nejnadějnějším přístupem se jeví ovlivnění systému kalcitoninu genově příbuzného peptidu (Calcitonin Gene-Related Peptide – CGRP). Příslušné CGRP receptory jsou v řadě cév, zvláště vysoká koncentrace je ale v cévách zajišťujících prokrvení mozku. CGRP receptor se tedy stal cílem výzkumu nových antimi-grenik. Počáteční snaha se zaměřila na obměnu struktury CGRP s cílem najít účinné antagonisty, u nichž se předpokládala jejich vazokonstrikční účinek. Skutečně bylo objeveno několik takových peptidů, jednalo se hlavně o C-terminální fragmenty CGRP, např. CGRP<sub>8-37</sub>. Pro terapii nejsou ale peptidy příliš vhodné a snahy o objevení účinných peptidomimetik, tedy látek s modifikovaným peptidovým řetězcem s vyšší stabilitou, nevedly k objevení nadějných molekul.

Další výzkum se zaměřil na vývoj malých molekul a u několika farmaceutických firem bylo prováděno testování knihoven vlastních látek s cílem objevit ligandy tohoto receptoru. Neúspěchy prvních léčiv tohoto typu v klinických studiích vedly u velkých farmaceutických firem k deziluzi a firma Merck dvě své látky v roce 2015 licencovala firmě Allergan. Jedna z nich s generickým názvem ubrogepant prokázala terapeutický účinek bez závažných vedlejších účinků a byla v prosinci 2019 schválena FDA pod názvem Ubrovelvy jako první gepant schválený pro terapii migrény. V únoru 2020 byl FDA schválen také rimegepant (Nurtec) podávaný ve formě ODT (Orally Disintegrating Tablet), což umožňuje rychlý nástup účinku.

Ještě zcela nedávno před schválením uvedených gepantů se zdálo perspektivnější využití biologických léčiv využívajících CGRP systém. V roce 2018 byla pro preven-



rimegepant

ci migrény schválena tři biologická léčiva používaná subkutánně 1× za měsíc. Jednalo se o anti-CGRP monoklonální protilátky erenumab (Aimovig) a fremanezumab (Ajovy). Další biologický preparát galcanezumab, který byl schválen pro prevenci migrény pod názvem Emgality, na rozdíl od výše uvedených protilátek blokuje vlastní CGRP receptor. V roce 2020 pak byla schválena první monoklonální protilátka pro prevenci migrény podávaná intravenózně 1× za 3 měsíce eptinezumab (Vyepiti). Zatím je brzo na hodnocení přínosu těchto biologických léčiv, současné ceny kolem 575 USD za měsíc ale naznačují jen omezené použití.

## 6. Závěr

Na závěr bychom měli odpovědět na otázku vyřčenou v názvu tohoto článku, tedy zda se stanou v budoucnosti léčivy volby převážně malé molekuly, nebo biologická léčiva. Současná situace napovídá, že trh s léčivy opanuje rozumná rovnováha obou těchto typů léčiv. Nepominutelným aspektem podporujícím používání léčiv s malými molekulami je a v dohledné době zřejmě bude snaha mít vysoce účinná léčiva pro léčbu co největšího počtu pacientů bez ohrožení rozpočtů na zdravotnictví jednotlivých zemí. Budoucnost terapie pak musí být založena na pokračujícím výzkumu jak léčiv založených na malých molekulách, tak biologických léčiv a jen jejich vyváženou kombinací lze dosáhnout významného pokroku v léčbě onemocnění, která jsou za současného stavu poznání dosud neléčitelná. A bohužel příkladů takových onemocnění je dosud celá řada, jen namátkou lze zmínit Alzheimerovu chorobu.

## LITERATURA

1. [https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk\\_journals.xml\\_about\\_pr?p\\_JournalID=2](https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_about_pr?p_JournalID=2), staženo 2. 1. 2022.
2. Hájková M., Kratochvíl B., Rádl S.: Chem. Listy 102, 3 (2008).
3. Cvak L., Fusek M.: Chem. Listy 98, 1087 (2004).
4. Shepard H. M., Phillips G. L., Thanos C. D., Feldmann M.: Clin. Med. (Lond). 17, 220 (2017).
5. Zahavi D., Weiner L.: Antibodies 9, 34 (2020).
6. Ratih R., Asmari M., Abdel-Megied A. M., Elbarbry F., El Deeb S.: Microchem. J. 165, 106143 (2021).
7. Kuchař M., v knize: *Farmaceutický encyklopedický slovník*, str. 555. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha 2014.
8. Rautio J., Meanwell N., Di L., Hagemna M. J.: Nat. Rev. Drug Discov. 17, 559 (2018).
9. Najjar A., Najjar A., Karaman R.: Molecules 25, 884 (2020).
10. Alanazi A. S., Miccoli A., Mehellou Y.: J. Med. Chem. 64, 16703 (2021).
11. Ryšánek P., Grus T., Šíma M., Slanař O.: Pharm. Res. 37, 166 (2020).
12. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-cocrystals-active-substances-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-cocrystals-active-substances-medicinal-products_en.pdf), staženo 2. 1. 2022.
13. Bučar D.-K., Lancaster R. W., Bernstein J.: Angew. Chem. Int. Ed. 54, 6972 (2015).
14. Kratochvíl B., Hušák M., Jegorov A.: Chem. Listy 96, 330 (2002).
15. Griesser U. J., v knize: *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry* (Hilfiker R., ed.), kap. 8, str. 211–233. Wiley-VCH, Weinheim 2006.
16. Duggirala N. K., Perry M. L., Almarsson Ö., Zaworotko M. J.: Chem. Commun. 52, 640 (2016).
17. Rádl S.: Chem. Listy 115, 246 (2021).
18. Okáčová L., Vetchý D., Franc A., Rabišková M.: Chem. Listy 105, 34 (2011).
19. Okáčová L., Vetchý D., Franc A., Rabišková M., Kratochvíl B.: Chem. Listy 104, 21 (2010).
20. Kuentz M., Holm R., Elder D. P.: Eur. J. Pharm. Sci. 87, 136 (2016).
21. Di L., Fish P. V., Mano, T.: Drug Discov. Today 17, 486 (2012).
22. Gruberová L., Kratochvíl B.: Chem. Listy 113, 383 (2019).
23. Newman A. (ed.): *Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersion*. Wiley, New York 2015.
24. Brouwers J., Brewster M. E., Augustijns P.: J. Pharm. Sci. 98, 2549 (2009).
25. Friesen D. T., Shanker R., Crew M., Smithey D. T., Curatolo W. J., Nightingale J. A. S.: Mol. Pharmaceutics 5, 1003 (2008).
26. Kanikkannan N.: J. Anal. Pharm. Res. 7, 198 (2018).
27. Patil H., Tiwari R. V., Repka M. A.: AAPS PharmSciTech 17, 20 (2016).
28. Birtalan E., Hoelig P., Lindley D. J., Sanzgiri Y. D., Tong P. (AbbVie Inc.): WO2012/121758.
29. EMA Assessment report Venclyxto (EMA/H/C/004106/0000).
30. Franc A., Vetchý D., Smilková L., Rabišková M., Kratochvíl B.: Chem. Listy 106, 3 (2012).
31. Chakraborty S., Shukla D., Mishra B., Singh S.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 73, 1 (2009).
32. Rezhdo O., Speciner L., Carrier R.: J. Controlled Release 240, 544 (2016).
33. Holm R.: Adv. Drug Deliv. Rev. 142, 118 (2019).
34. Boleslavská T. a 14 spoluautorů: AAPS J. 22, 122 (2020).
35. Koehl N. J., Henze L. J., Bennett-Lenane H., Faisal W., Price D. J., Holm R., Kuentz M., Griffin B.T.: Mol. Pharm. 18, 2174 (2021).
36. Koehl N. J., Henze L. J., Holm R., Kuentz M., Keating J. J., Vijlder, T., Marx A., Griffina B. T.: Eur. J. Pharm. Sci. 111, 164 (2022).
37. Tan A., Simovic S., Davey A. K., Rades T., Prestidge C. A.: J. Controlled Release 134, 62 (2009).
38. Makurved F. D.: Med. Drug Discovery 9, 100075 (2021).
39. Taylor P. C. a 14 spoluautorů: J. Clin. Med. 8, 831 (2019).
40. Rádl S.: Vesmír 101, 122 (2022).
41. Rádl S.: Vesmír 99, 334 (2020).

**S. Rádĭ, O. Dammer, and L. Ridvan** (*Zentiva, Prague, Czech Republic*): **Will the Drugs of the Future Be Small Molecules or Biological Drugs?**

After the approval of the first therapeutic monoclonal antibodies and their successful introduction into therapy, a great future was expected for this class of drugs. This assumption has been fulfilled to a limited extent only, especially in the treatment of oncological problems, some autoimmune diseases and in the treatment of some rare diseases. On the other hand, a considerable progress has been made in the fields of oncology and autoimmune diseases by discovering protein kinases, and these small molecule drugs represent alternatives in the treatment of a range of such diseases. In this article, we have tried to shed light mainly on the role of small molecules in therapy, including problems connected with the development of this class of drugs. For many of them, their physico-

chemical properties prevent using traditional formulation techniques and modern technologies must be applied. This paper summarizes the most commonly used approaches for increasing bioavailability, including both the prodrug approach and the use of various solid forms of the active ingredient in specific formulations available on the market. The article also provides examples of practical use of amorphous solid dispersions and modern trends, including the development of various types of lipid formulations.

**Keywords:** small molecules, biologics, biosimilars, polymorphs, solvates, cocrystals, amorphous solid dispersions, lipidic formulations

- Rádĭ S., Dammer O., Ridvan L.: Chem. Listy 116, 471–480 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220471>

## ANALYTICKÉ METÓDY NA DETEKCIU KONTAMINANTOV V KÔROVCOCH A MÄKKÝŠOCH

KATARÍNA RUSIŇÁKOVÁ<sup>a</sup>, MICHAL KIRCHNER<sup>b</sup>  
a SVETLANA HROUZKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

<sup>b</sup> Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, Slovenská republika  
svetlana.hrouzkova@stuba.sk

Došlo 14.4.22, prijaté 17.5.22.

Kľúčové slová: čistenie extraktu, GC-MS, kontaminanty, kôrovce, mäkkýše, PAH, QuEChERS, rezíduá pesticídov

• <https://doi.org/10.54779/chl20220481>

### Obsah

1. Úvod
2. Kôrovce a mäkkýše
3. Metódy prípravy vzorky
  - 3.1. Príprava na extrakciu
  - 3.2. Procedúra QuEChERS
  - 3.3. Soxhletova extrakcia
  - 3.4. Iné metódy extrakcie
4. Separácia a detekcia
5. Záver

### 1. Úvod

Voda je esenciálnou podmienkou života na Zemi a je tak nevyhnutné kontrolovať jej kvalitu a stanovovať kontaminujúce zložky. Pesticídy a polyaromatické uhľovodíky sú príklady zlučenin, ktorými je voda v rôznych oblastiach sveta často znečistená. Pri detekcii a stanovení týchto analytov vo vzorkách vody sa však stretávame s problémom. Nakoľko polyaromatické uhľovodíky a mnoho pesticídov vykazujú lipofilný charakter, ich koncentrácia priamo vo vzorkách vody je príliš nízka. Vodné druhy kôrovcov a mäkkýšov, ale aj ryby sa tak používajú ako indikátory kvality vody. Telá týchto organizmov majú schopnosť lipofilné látky akumulovať a koncentrovať vo svojich tukových tkanivách. Kôrovce, mäkkýše a ryby sú zdrojom nízkokalorických bielkovín a ich nutričná hodnota je vysoká. Práve kvôli týmto charakteristikám sú spomínané organizmy okrem indikácie čistoty ich biotopov aj častým prvkom ľudskej stravy. V prípade požívania kontaminovaných jedincov je konzument vystavený karcinogénnym,

mutagénnym, alebo iným negatívnym vplyvom. V prípade kontaminácie polyaromatickými uhľovodíkmi a intoxikácie rezíduami pesticídov môže dochádzať k narušeniu činnosti endokrinného systému konzumenta, z čoho vyplýva nutnosť kontroly prítomnosti kontaminantov v jedlých častiach diskutovaných organizmov.

Cieľom referátu je poskytnúť literárny prehľad poznatkov uverejnených v rozmedzí rokov 2015 až 2022, ktoré boli prínosom v oblasti vývoja alebo aplikácie analytických metód na analýzu látok znečisťujúcich životné prostredie zameraných na pesticídy a polyaromatické uhľovodíky zo vzoriek kôrovcov a vodných druhov mäkkýšov a tiež ich zhodnotenie pre vstupné zorientovanie sa čitateľa v problematike. Práca sa v úvodnej kapitole venuje kôrovcom a mäkkýšom, so zameraním sa na ich chemické zloženie, pretože je to kľúčom k potenciálnym komplikáciám počas analýzy. Následne sa veľmi detailne diskutujú rôzne spôsoby prípravy týchto vzoriek na analýzu a inštrumentálna analýza extraktov, pričom sa hodnotia aj medze detekcie analytických metód v súvislosti so spojením chromatografie s rôznymi detektormi. Prehľad je ukončený poukázaním na tie výskumy, v ktorých výsledky pozitívnych nálezov kontaminantov v reálnych vzorkách vyvolali obavy o zdravie konzumentov analyzovaných kôrovcov a mäkkýšov.

### 2. Kôrovce a mäkkýše

Kôrovce a mäkkýše sú indikátory čistoty prostredia, v ktorom žijú a sú tak častou vzorkou environmentálnych analýz. Kôrovce s mäkkýšmi predstavujú veľmi komplexnú maticu, ktorej chemické zloženie je pre vývoj analytickej metódy a predovšetkým časti extrakcie a čistenia extraktu kľúčovým poznatkom. Chemické zloženie tiel mäkkýšov a kôrovcov je v mnohom podobné zloženiu rýb<sup>1</sup>. Živočíchy oboch spomínaných skupín pozostávajú najmä z vody, ktorá môže tvoriť až 80 % ich tel<sup>2</sup>. Bielkoviny sú hlavnou zložkou tiel rýb aj vodných bezstavovcov a príjem bielkovín práve z týchto organizmov môže pôsobiť preventívne pred kardiovaskulárnymi chorobami<sup>1</sup>. Vo svalových tkanivách kôrovcov a mäkkýšov rozpoznávame tri druhy bielkovín. Myofibrilárne bielkoviny v telách vodných bezstavovcov v najväčšom množstve zastupuje paramyozín a z celkového obsahu bielkovín sú myofibrilárne proteíny v tkanivách kôrovcov a mäkkýšov zastúpené až na úrovni 75 % (cit.<sup>1</sup>). Sarkoplazmatické bielkoviny predstavujú až do 30 % celkového množstva bielkovín vodných bezstavovcov<sup>1</sup>. Z významne zastúpených proteínov v kôrovcoch nájdeme myoglobín. Taktiež sú obsiahnuté enzýmy, ako rôzne oxydoreduktázy, transferázy, fosforilázy a iné. Stromatické bielkoviny sú triedou bielkovín, ktorá tvorí len približne 3 % všetkých bielkovín svalov

vej hmoty rýb a vodných bezstavovcov a ako príklad týchto bielkovín môžeme uviesť elastín a kolagén, ktoré sa vyskytujú najmä v telách lastúrnikov, konkrétne v ich pružných väzoch, ktoré umožňujú otváranie a uzatváranie schránok<sup>1</sup>.

Telá kôrovcov a mäkkýšov pozostávajú iba z 3 % tuku, čo je podstatne menej, ako je to pri telách rýb, nakoľko niektoré druhy rýb môžu obsahovať až 13 % tuku z ich celkovej hmotnosti<sup>1</sup>. Množstvo tuku však závisí najmä od potravy, ktorú jedince prijímajú. Živočíchy chované na farmách sú častokrát kŕmené vysoko tukovou stravou s cieľom dosiahnuť maximálnu veľkosť jedincov, zatiaľ čo jedince tých istých druhov žijúcich voľne sú podstatne menšie s menším obsahom tuku. Tuky vodných bezstavovcov, ale aj rýb, pozostávajú najmä z nasýtených mastných kyselín, v najväčšom množstve zastúpené kyselinou palmítovou, no vo veľkom množstve je prítomná aj mononenásytená kyselina olejová. Cholesterol je podobne ako aj u ľudí dôležitou zložkou tiel rýb a vodných bezstavovcov, v ktorých tvorí bunkové membrány či nervové obaly a tiež je zodpovedný za produkciu žlčových kyselín. V morských rybách môže tvoriť až 90 % všetkých sterolov, zatiaľ čo v telách kôrovcov a mäkkýšov je zastúpený len na úrovni 25 %, čo vyplýva z prítomnosti vysokej hladiny organickej kyseliny – taurínu, ktorá v ich telách spôsobuje lepšiu degradáciu cholesterolu a vylučovanie žlčových kyselín<sup>1</sup>.

Morské plody sú vo všeobecnosti bohatým zdrojom vitamínov a minerálov, keďže aj samotné živočíchy potrebujú tieto zložky pre svoj vývin a správnu funkciu. Kôrovce a mäkkýše obsahujú najmä vo svojich vnútornostiach, no v menších koncentráciách aj v ich mäse, vitamíny A, D a E, avšak v neporovnateľne menšom množstve v porovnaní s ich koncentraciami v telách rýb. Vo vode rozpustné vitamíny sú distribuované v celom tele kôrovcov a mäkkýšov. Vitamíny B1, B2 a B3 predstavujú až do 7 % všetkých prítomných a o niečo menšie zastúpenie na úrovni 3 % zo všetkých prítomných vitamínov prislúcha vitamínom B5 a B9. Vitamín B12, ktorý je obsiahnutý vo veľkých koncentráciách najmä v mäse cicavcov, je v tkanivách niektorých mäkkýšov, hlavne z triedy Lastúrniky, obsiahnutý až na úrovni 18 % zo všetkých prítomných vitamínov<sup>2</sup>.

Z literárneho prehľadu je zjavné, že najčastejšie analyzovanými kôrovcami sú rôzne druhy kreviet. Krevety sú kozmopolitné živočíchy a je teda vhodné vyvíjať metódy na ich analýzu, nakoľko môžu byť aplikované celosvetovo. Podobne je to aj pri analýze mäkkýšov. Práve menšie druhy ako šklabky, ustrice, mušle, či slimáky sú relevantnými vzorkami. Ich populácia je veľká a pohybujú sa pomaly alebo vôbec sa nepohybujú, čo zjednodušuje vzorkovanie. Menšie druhy kôrovcov a mäkkýšov sa analyzujú s cieľom hodnotiť kvalitu komplexných vodných biotopov, nakoľko je relatívne jednoduché odobrať veľa vzorky. Väčšie druhy mäkkýšov a kôrovcov ako homáre, raky či chobotnice sa vzorkujú zložitejšie, nakoľko ich populácia je malá, môžu sa pohybovať veľmi rýchlo, v prípade chobotníc až reaktívne a v porovnaní s krevetami či mušľami a ustricami sa zvyčajne vyskytujú vo väčších hĺbkach. Spomenuté väčšie

druhy mäkkýšov a kôrovcov sú často konzumované najmä v prímorských oblastiach a cieľom analýz týchto vzoriek je najmä kontrolovať ich kvalitu ako potravy. Prehľad analyzovaných vzoriek s príslušnými referenciami je sumarizovaný v tab. I.

### 3. Metódy prípravy vzorky

Kôrovce a mäkkýše predstavujú komplexné vzorky a príprava na samotnú prístrojovú analýzu musí zohľadniť fakt, že extrakty je potrebné cielene čistiť od interferencií. Vzorky sa v prvom kroku vždy homogenizujú s cieľom zvýšiť povrch vzorky a následne tak dosiahnuť vyššiu účinnosť extrakcie. Sušenie mrazom alebo lyofilizácia je tiež častým krokom predúpravy vzoriek, ktorý je zaradený ešte pred homogenizáciou. Výsledkom lyofilizácie je vzorka, ktorá je lepšie homogenizovateľná, skladovateľná a trvanlivejšia. Z homogenátu sa extrahujú cieľové analyty a prvotný extrakt sa kvôli komplikovanosti vzoriek musí prečistiť, čo môže prebiehať rôznymi spôsobmi a technikami.

#### 3.1. Príprava na extrakciu

Homogenizáciou sa získava vzorka, ktorej chemické zloženie je rovnaké v každej jej časti, čo sa realizuje v zariadeniach, ktoré homogenizáciu zabezpečujú mechanickým rozrušovaním. Na homogenizáciu vzoriek kôrovcov a mäkkýšov sa používajú zariadenia, ktoré homogenizáciu vzorky dosahujú jej mletím, drvením či rezaním na menšie časti, avšak pre dokonalú homogenizáciu je často nutné použiť kombináciu homogenizačných metód, ktoré sa kombinujú s občasným chladením homogenizačného prístroja ako aj homogenátu s cieľom chrániť vzorku pred tepelnou degradáciou.

Lyofilizácia alebo sušenie mrazom sa aplikuje pred homogenizáciou vzoriek. Lyofilizovaním vzoriek sa predchádza degradácii zložiek, ktoré sú tepelne nestabilné. Ochránajú sa tak svalové tkanivá a bielkoviny v nich, no lyofilizovaním vzorky sa zabezpečuje aj jej sterilita a stabilita, čo napomáha v ďalších krokoch analýzy. Proces sušenia mrazom môžeme rozdeliť do troch krokov, ktorými sú fáza mrazenia, sublimácie a fáza desorpcie. Vo fáze mrazenia je cieľom dosiahnuť zmrazenie vody prítomnej vo vzorke. Voda je vo vzorkách prítomná ako roztok a nie ako chemické individuum, preto je potrebné vzorku chladiť na teplotu nižšiu ako je bod topenia vody. Fáza sublimácie tiež označovaná ako primárne sušenie aplikuje nízky tlak pomocou vákua, čím sa vytvoria podmienky pre sublimáciu. Kryštály zmrazenej vody vytvorené v prvej fáze procesu sublimujú a výsledkom sú mikroskopické kanáliky a dutiny vo vzorke. Vzorka sa tak stáva krehkejšia, čo ďalej uľahčuje nasledovnú homogenizáciu. Studený povrch kondenzátora poskytuje povrch pre desublimáciu pár kvapaliny, čím odstraňuje pary vody z lyofilizačnej komory a umožňuje tak prestup ďalších pár z povrchu vzorky. V poslednom kroku s názvom desorpčná fáza alebo sekundárne sušenie, sa teplota vzorky oproti



Tabuľka I  
QuEChERS postup prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty       | Vzorka  | Príprava vzorky   | Analytická metóda   | LOD, LOQ   | Lit. |
|---------------|---|---|---|--|------|
| 66 pesticídov | krevety<br>(bližšie neurčené)                         | 1. HOMOG<br>2. E: QuEChERS:<br>CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> EDTA,<br>ACN, CH <sub>3</sub> COONa<br>d-SPE: PSA, C <sub>18</sub><br>3. filtrácia (PVDF)       | LC-MS/MS<br>kolóna: XSELECT HSS C <sub>18</sub><br>MF: voda(HCOOH)/MeOH<br>(HCOOH+octan amónny)<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, SIM           | LOD < 5 µg kg <sup>-1</sup><br>LOQ < 10 µg kg <sup>-1</sup>  | 3    |
| 18 OPP        | biele, obrovské<br>riečne, obrovské<br>tigrie krevety | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS, d-SPE  | LC-MS/MS, GC-MS/MS<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, SIM  | LOQ = 5 ng g <sup>-1</sup>                                   | 4    |
| 84 PCB, OCP   | mušle, škľabky  | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie<br>QuEChERS:<br>hexán:acetón+voda, MgSO <sub>4</sub> ,<br>NaCl<br>d-SPE: PSA, MgSO <sub>4</sub> , MIPs<br>3. čistenie supernatantu:<br>filtrácia | GC-MS/MS<br>kolóna: DB-5<br>dávkovanie: splitless<br>analyzátor: QqQ, DMRM  | LOQ = 0,01–9,02<br>µg kg <sup>-1</sup>                       | 5    |
| 59 POP        | rôzne krevety<br>(bližšie neurčené)                   | 1. HOMOG.<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN,<br>HCOONH <sub>4</sub><br>d-SPE+in-vial fil: MgSO <sub>4</sub> ,<br>PSA, C <sub>18</sub> , Z-Sep                             | LPGC-MS/MS, HPLC-MS/MS<br>kolóny: Supelco SLBTM-5 ms,<br>RP ODS3<br>dávkovanie: PTV<br>MF: HCOOH/MeCN<br>ionizácia: EI, ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM | LOD < 5 ng g <sup>-1</sup>                                   | 6    |
| imidaklopid   | krevety<br>(Metapenaeus<br>macleayi)                  | 1. HOMOG s ACN<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN, Q-Sep<br>d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , PSA   | LC-MS<br>kolóna: RP-C <sub>18</sub><br>MF: (voda+TFA), (ACN+TFA)<br>ionizácia: ESI  | LOD = 0,9 ng g <sup>-1</sup><br>LOQ = 2,7 ng g <sup>-1</sup> | 7    |
| imidaklopid   | krevety<br>(Panaeus monodon)                          | 1. HOMOG s ACN<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN, Q-Sep<br>d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , PSA   | HPLC-MS<br>kolóna: fenyl/hexyl<br>MF: (voda+TFA), (ACN+TFA)<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: SQ, SIM  | LOD = 0,3 ng ml <sup>-1</sup><br>LOQ = 1 ng ml <sup>-1</sup> | 8    |
| Fenobukarb    | krevety<br>(aj vajcia, mlieko,<br>mäso)               | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: (ACN+TFA),<br>NaCl, SCTD, SCDS<br>d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , C <sub>18</sub>   | LC-MS/MS<br>kolóna: RP-C <sub>18</sub><br>MF: voda(HCOOH/octan<br>amónny)<br>MeOH(HCOOG/octn amónny)<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM      | LOD = 0,7 µg kg <sup>-1</sup><br>LOQ = 2 µg kg <sup>-1</sup> | 9    |
| 19 OCP        | krevety (bližšie<br>neurčené)                         | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN, MgSO <sub>4</sub> ,<br>NaCl<br>d-SPE: PSA, MgSO <sub>4</sub>  | GC-ECD<br>kolóna: RTX-CL<br>dávkovanie: splitless   | LOD = 3–9 ng kg <sup>-1</sup>                                | 10   |

Tabuľka I  
Pokračovanie

| Analyty                                    | Vzorka   | Príprava vzorky  | Analytická metóda   | LOD, LOQ   | Lit. |
|--|--|--|---|--|------|
| 76 herbicídov                              | ustrice<br>( <i>Crassostrea gigas</i> )<br>škľabky ( <i>Meretrix lusoria</i> , <i>Corbicula fluminea</i> ) | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN<br>d-SPE  | LC-MS/MS, GC-MS/MS<br>dávkovanie: splitless<br>ionizácia: ESI, EI<br>analyzátor: QqQ, MRM   | LOQ < 5 ng g <sup>-1</sup>   | 11   |
| 60 pesticídov                              | raky, krevety  | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: ACN, NaCl<br>d-SPE: PSA   | HPLC-MS/MS<br>kolóna: RP-C <sub>18</sub><br>MF: ACN/HCOOH<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM   | LOD = 0,4–10 ng g <sup>-1</sup><br>LOQ = 1–16 ng g <sup>-1</sup>               | 12   |
| 6 diacyl-<br>hydrazínových<br>insekticídov | krab ( <i>Eriocheir sinensis</i> )<br>krevety ( <i>Panaeus vannamei</i> )                                  | 1. HOMOG mäsa<br>a pohlavných žliaz (krab),<br>homogenizácia krevety<br>2. extrakcia čistenie:<br>QuEChERS:<br>ACN, MgSO <sub>4</sub> , NaCl,<br>dispergátor, hexán<br>d-SPE: PSA, C <sub>18</sub>   | LC-MS/MS<br>kolóna: Hypersil Gold C <sub>18</sub><br>MF: CH <sub>3</sub> COOH/ACN<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM   | LOD = 0,38–0,96<br>ng g <sup>-1</sup><br>LOQ = 1,27–3,20<br>ng g <sup>-1</sup> | 13   |
| 20 pesticídov                              | krevety<br>(bližšie neurčené)  | 1. HOMOG<br>2 extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS<br>EDTA 0,1M, CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub><br>(pufor), ACN, NaCl<br>dSPE: PSA, MgSO <sub>4</sub> , C <sub>18</sub>  | LC-MS/MS<br>kolóna: Phenomenex Luna C <sub>18</sub><br>MF: (HCOOH+voda)/<br>(HCOOH+ACN)<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM   | LOQ ≤ 5 ng g <sup>-1</sup>   | 14   |
| Imidakloprid                               | krevety<br>( <i>Saccostrea</i> ), ustrice  | 1. HOMOG<br>2. QuEChERS: ACN, Q-Sep  | LC-DAD/MS<br>kolóna: Zorbax C <sub>18</sub><br>MF: (voda+TFA)/(ACN+TFA)<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: SQ, SIM  | LOD = 1 ng ml <sup>-1</sup><br>LOQ = 3,7 ng ml <sup>-1</sup>                   | 15   |
| PAH  | krevety<br>( <i>Gammarus pulex</i> )   | 1. HOMOG sušených kreviet<br>2. extrakcia, čistenie:<br>QuEChERS: MiliQ, ACN,<br>MgSO <sub>4</sub> , NaCl<br>d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , C <sub>18</sub><br>DLLME: NaHCO <sub>3</sub> , CHCl <sub>3</sub><br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> clean up: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>pridané k odobratej<br>sedimentovej fáze, ručné<br>pretrepanie, pridanie hexánu | kvantitatívna analýza:<br>GC-MS/MS<br>kolóna: 2×15 m kapilárne<br>kolóny pripravené rozdelením<br>kolóny (30 m) selektívnej na<br>PAH<br>dávkovanie: pulzný splitless<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: QqQ, pseudo MRM<br>kvalitatívna analýza:<br>GC-MS<br>kolóna: 2×15 m identické<br>HP-5MS<br>dávkovanie: PTV, TDU,<br>splitless<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: Q, FS | LOD = 1,5–2,1 ng g <sup>-1</sup><br>LOQ = 4,7–6,3 ng g <sup>-1</sup>           | 16   |

Pozn. ACN – acetonitril, C<sub>18</sub> – silikagél modifikovaný oktadecylsilánom, DLLME – disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina, dSPE – disperzná extrakcia tuhou fázou, HOMOG – homogenizácia, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PCB – polychlórované bifenylly, POP – perzistentné organické polutanty, PSA – silikagél modifikovaný funkčnými skupinami primárnych a sekundárnych amínov, Q-Sep – extrakčný set na QuEChERS

2. fáze procesu zvýši, čím sa dosiahne rozbitie väzieb medzi molekulami kvapaliny a vzorkou.

Najjednoduchšie sa lyofilizácia realizuje pomocou veľkých kryštálov, ktorých vznik sa dá dosiahnuť pomalým mrazením alebo chladením. V prípade biologických vzoriek sú veľké kryštály nevýhodné, pretože môžu narúšať bunkovú stenu, a preto proces mrazenia kôrovcov a mäkkýšov prebieha veľmi rýchlo.

### 3.2. Procedúra QuEChERS

Koncepcia prípravy vzorky na analýzu s názvom QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe, jedná sa o akronym slov: rýchla, jednoduchá, lacná, účinná, robustná a bezpečná) je najčastejšie používanou extrakčnou technikou prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov s cieľom detekcie a stanovenia pesticídov<sup>3–15</sup>, ale aj polyaromatických uhľovodíkov<sup>16</sup>, polychlórovaných bifenylov (PCB)<sup>5</sup> a celej skupiny perzistentných organických polutantov (POP)<sup>6</sup>. Postup prípravy vzoriek QuEChERS je v súlade s požiadavkami zelenej analytickej chémie, keďže QuEChERS využíva len malé objemy extrakčných rozpúšťadiel a chlórované rozpúšťadlá sa pri tejto metóde nepoužívajú vôbec. Najčastejšie používaným rozpúšťadlom pri extrakcii pesticídov z homogenátov kôrovcov a mäkkýšov je acetonitril<sup>3,6–8,10–16</sup>, ktorý je všeobecne najdominantnejším extrakčným rozpúšťadlom QuEChERS postupu, pretože poskytuje najčistejšie extrakty v porovnaní s ďalšími bežne dostupnými rozpúšťadlami a je vhodný na dávkovanie v plynovej chromatografii. QuEChERS postup prípravy vzoriek vodných bezstavovcov bol tiež realizovaný extrakčnou zmesou hexánu a acetónu v pomere 1:9 s prídavkom destilovanej vody<sup>5</sup> alebo aj 0,1 % roztokom kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile<sup>9</sup>. Použitá bola aj modifikácia QuEChERS spočívajúca v pridaní tlmivého roztoku do známeho postupu. Homogenát vzorky sa najprv vortexuje spolu so suspenziou tlmivého roztoku octanu a soli kyseliny etyléndiamintetraoctovej a až následne je k tejto zmesi pridávané extrakčné činidlo (ACN) a to už priamo s extrakčnou soľou<sup>14</sup>.

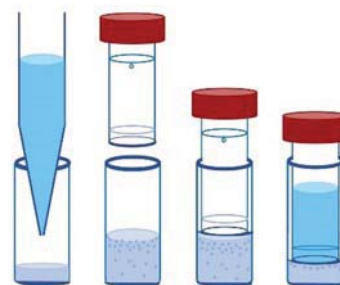
Ďalším krokom QuEChERS postupu prípravy vzoriek je prídanie extrakčných solí, ktoré zabezpečujú oddelenie vodnej a organickej fázy. Pri získavaní extraktov z kôrovcov a mäkkýšov sa na oddelenie fáz pridávajú soli NaCl a MgSO<sub>4</sub>. Extrakčné soli ako dihydrát citrónanu trisodného (SCTD) a seskvihydrát disodnej soli kyseliny citrónovej (SCDS), prípadne ich zmes je možné použiť namiesto pufrov v prípade potreby stabilizácie pH (cit.<sup>9</sup>). V prípade originálneho QuEChERS postupu, ktorý nevyužíva tmenie, sa často uplatňuje Q-Sep komerčná soľ originálneho QuEChERS kitu. Balenie obsahuje presne naváženu zmes solí NaCl a MgSO<sub>4</sub>, čím sa práca spresňuje a zjednodušuje<sup>7,8,15</sup>.

QuEChERS extrakty kôrovcov a mäkkýšov sú následne čistené pomocou rôznych sorbentov a ich zmesami postupom čistenia extraktov známym ako disperzná extrakcia tuhú fázou (d-SPE). Metóda d-SPE je v porovnaní s klasickou SPE omnoho rýchlejšia a navyiac používa me-

nej extrakčného činidla. Princíp čistenia spočíva v disperzii tuhého sorbentu priamo vo vzorke/v extrakte. Po disperzii je sorbent zo vzorky izolovaný pomocou centrifúgy alebo filtrácie. Najčastejšie používanými sorbentmi je PSA (silikagél s fixovanou primárnou/sekundárnou aminovou funkčnou skupinou) a C18 (silikagél modifikovaný oktadecylsilánom), avšak kvôli komplexnosti vzorky sa takmer stále používa zmes viacerých sorbentov. Použitie samotného PSA alebo jeho kombinácia s MgSO<sub>4</sub> poskytuje dostatočne čisté extrakty vzoriek, ktorých matrica neobsahuje vysoké percento tuku<sup>7,8,10,12</sup>. Touto maticou sú zvyčajne voľne žijúce krevety a v prípade veľmi chudého druhu kreviet je možné krok čistenia prvotného QuEChERS extraktu úplne vynechať<sup>15</sup>. Pri tukových vzorkách je vhodné použiť zmes PSA a C18, ale aj zmes MgSO<sub>4</sub>, PSA, C18 a Z-Sep (silikagél modifikovaný oxidom zirkoničitým), keďže čistenie zmesami týchto sorbentov sa javí byť najefektívnejšie pri eliminácii tukových interferentov<sup>6</sup>. V prípade čistenia extraktu QuEChERS získaného extrakčnou zmesou hexánu a acetónu sa uplatnilo aj čistenie zmesou MgSO<sub>4</sub> so sorbentmi PSA a selektívnym sorbentom tvoreným polymérom s odtlačkom molekuly MIP (molecularly imprinted polymer) v pomere 3:1:1 (cit.<sup>5</sup>).

Osobitnú pozornosť si vyžaduje metóda čistenia d-SPE v spojení s filtráciou vo vialke (d-SPE + in-vial filtration), ktorá bola vyvinutá a aplikovaná na vzorky kreviet s cieľom detegovať 59 organických perzistentných polutantov<sup>6</sup>. Na obr. 1 je zobrazený postup tejto procedúry, ktorá výrazne zjednodušuje a urýchľuje prípravu vzorky. V prvom kroku sa k sorbentu, ktorý je pripravený vo vialke, pridá primárny QuEChERS extrakt. Filtračný piest sa zatlačí do polovice výšky vialky a obsah sa pretrepáva po dobu 30 sekúnd. Piest sa nakoniec zatlačí úplne, čím sa získa filtrovaný extrakt vhodný na inštrumentálnu analýzu.

Nagyová a spol.<sup>16</sup> predstavili spojenie QuEChERS a disperznej mikroextrakcie v systéme kvapalina-kvapalina (DLLME) a tiež použili roztok kyseliny sírovej na úpravu extraktu DLLME. Ako prvá bola aplikovaná originálna acetonitrilová metóda QuEChERS spolu s klasickou d-SPE. Po odskúšaní sorbentov C18, PSA a ich zmesi spolu s MgSO<sub>4</sub> bola pre krok disperznej extrakcie tuhú fázou vybraná zmes sorbentov C18 a MgSO<sub>4</sub>. DLLME



Obr. 1. Postup disperznej extrakcie tuhú fázou d-SPE v kombinácii s in vial filtráciou. (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

Tabuľka II

Soxhletova extrakcia ako metóda prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty                    | Vzorka   | Príprava vzorky  | Analytická metóda  | LOD, LOQ                             | Lit. |
|----------------------------|--|--|--|--------------------------------------|------|
| PAH                        | škľabky (Ruditapes philippinarum)  | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie: SoxE: DCM:acetón, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>SPE: PSA,DCM:hexán   | HPLC – DAD<br>kolóna: RP-C <sub>18</sub><br>MF: voda, ACN                  | LOD = 0,07–0,16 ng g <sup>-1</sup>   | 17   |
| PAH                        | krevelty (Panaeus monodon)<br>kraby (Uca tangeri)  | 1. HOMOG mrazených vzoriek (prídavok acetónu a Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )<br>2. extrakcia: SoxE (DCM:hexán)   | GC-FID<br>kolóna: HP-5890  | neuvedené                            | 18   |
| 8 OCP,<br>7 PAH,<br>18 PCB | krevelty (Parapanaeus, Panaeus),<br>mušle (Mytilus galloprovincialis),<br>chobotnica (Octopus vulgaris)<br>kalamáre (Teuthida) | 1. LYO<br>2. extrakcia, čistenie: SoxE: DCM<br>GCP: cyklohexán/etylacetát  | GC-MS/MS<br>kolóna: BPX5<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: QqQ               | LOQ = 0,008–0,028 ng g <sup>-1</sup> | 19   |
| OCP, PCB                   | krevelty (Exopalaemon carinicauda)<br>mušle (Mactra veneriformis, Meretrix meretrix)   | 1. LYO, HOMOG s Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>2. extrakcia: SoxE: hexán/acetón<br>3. čistenie: kolóna (silikagél, alumina)<br>elučný roztok (DCM:hexán) | GC – bližšie neurčené  | neuvedené                            | 20   |
| EDC (PCB, PBDE, DDT)       | škľabky (Ruditapes philippinarum)  | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia: SoxE: hexán/acetón<br>3. čistenie: kolóna (kyslý silikagél, Florisil)<br>elučný roztok (DCM:hexán)                            | GC-MS/MS<br>dávkoč: PTV<br>kolóna: 5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: QqQ | neuvedené                            | 21   |
| PCB, OCP                   | škľabky, mušle   | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia: SoxE: (hexán:acetón)<br>3. čistenie: kolóna (silikagél, alumina; Florisil)<br>elučný roztok (hexán:acetón, hexán)             | GC-ECD<br>kolóna: DB5  | LOD = 0,01–0,03 ng g <sup>-1</sup>   | 22   |

Pozn. ACN – acetonitril, DCM – dichlórmetán, EDC – endokrinne disruptívne chemikálie, GCP – gélová permeačná chromatografia, HOMOG – homogenizácia, LYO – lyofilizácia, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PBDE – polybromované difenylétery, PCB – polychlórované bifenyly, POP – perzistentné organické polutanty, PSA – silikagél s funkčnými skupinami primárnych a sekundárnych amínov, SoxE – Soxhletova extrakcia, SPE – extrakcia tuhou fázou

a úprava extraktu roztokom kyseliny sírovej boli aplikované s cieľom prečistiť extrakt, vymeniť rozpúšťadlo a zakonzentrovat' extrakt bez toho, aby bolo potrebné rozpúšťadlo odparovať. Ako disperzné rozpúšťadlo sa použil chloroform. Aby sa predišlo rozkladu niektorých polyaromatických uhlíkovodíkov, bolo nutné zvolit' úpravu chloroformového DLLME extraktu pomocou roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po

skúšaní roztokov kyseliny sírovej s rôznymi koncentraciami bol za optimálny zvolený 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nakoľko sa zistilo, že má pozitívny vplyv na potlačanie matricových efektov a pri tvorení fázy sedimentu sa účinne uvoľňujú cieľové analyty.

Postup QuEChERS extrakcií s prehľadom relevantných detailov analytickej metódy vrátane prehľadu vzoriek

a tiež medzi detekcie získaných danou metódou sumarizuje tab. I.

### 3.3. Soxhletova extrakcia

Soxhletova extrakcia je jednoduchá a efektívna metóda extrakcie, ktorou sa môžu extrahovať najrôznejšie tuhé vzorky, ako sú aj živočíšne tkanivá. Extrakcia sa odohráva v Soxhletovom extraktore, ktorý pozostáva z destilačnej banky uloženej na variči, extrakčnej nádoby so vzorkou a chladiča. Pary extrakčného činidla uvoľneného varom v destilačnej banke kondenzujú v chladiči a pretekajú do extrakčnej nádoby so vzorkou, z ktorej extrahujú jej zložky. Po naplnení nádoby roztok extrahovaných látok pretečie cez spätný prepád – naspäť do varnej banky. Extrahované analyty sa už následne z roztoku neodparujú. Odparuje sa len čisté rozpúšťadlo, čo umožňuje opakovanie procesu extrakcie s ďalšou dávkou čistého extrakčného činidla. Soxhletova extrakcia je veľmi účinná, zároveň však zdĺhavá a používa relatívne veľké objemy rozpúšťadla, ktoré je spravidla v následnom kroku potrebné odstrániť.

Soxhletovou extrakciou sa pripravujú vzorky kôrovcov a mäkkýšov s cieľom detekcie hlavne polyaromatických uhľovodíkov<sup>17–19</sup>, ale aj organochlórovaných pesticídov, polychlórovaných bifenylov<sup>19–22</sup> a zlúčenín radených do skupiny disruptorov hormonálneho systému<sup>21</sup>. Používajú sa rôzne extrakčné rozpúšťadlá a ich zmesi, ktoré sa volia tak, aby mali vysokú afinitu k analytu a naopak nízku afinitu k matrici. Pri izolácii cieľových analytov sa používa zmes hexánu a acetónu v rôznych pomeroch<sup>20–22</sup>, samotný dichlórmetán<sup>19</sup>, ale aj jeho zmesi s acetónom<sup>17</sup> či hexánom<sup>18</sup>. Prehľad metód je sumarizovaný v tab. II.

Na čistenie extraktov po realizácii Soxhletovej extrakcie vzoriek kôrovcov a mäkkýšov boli najčastejšie použité metódy stĺpcovej chromatografie a SPE. Uvoľnenie kontaminantov z kolónok sa realizuje vhodnými rozpúšťadlami. Pri potrebe oddeliť polárne aj nepolárne látky z extraktov boli použité kolónky naplnené zmesou deaktivovaného silikagélu a alumíny, alebo Florisilu, ktoré látky zadržia a následne sú eluované zmesami elučných činidiel s vhodnou polaritou<sup>20–22</sup>. Podobne ako pri čistení QuEChERS extraktov poskytol PSA dobré výsledky aj pri čistení Soxhletových extraktov, avšak v režime SPE (cit.<sup>17</sup>). Gélová permeačná chromatografia je konvenčná metóda čistenia vzoriek s veľkým obsahom tuku a účinne bola použitá nie len pri čistení extraktov Soxhletovej extrakcie<sup>19</sup>, ale aj pri extraktoch mikrovlnne podporenej extrakcie, ultrazvukom podporenej extrakcie a extrakcie kvapalina-kvapalina, ktorých využitie pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov na analýzu je diskutované v nasledujúcej podkapitole.

### 3.4. Ďalšie metódy extrakcie

Prehľad ďalších metód na extrakciu kôrovcov a mäkkýšov sumarizuje prehľad v tab. III. Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE) je jedna z najviac používaných extrakcií všeobecne a svoje využitie má aj pri analýze

organických látok v kôrovcach a mäkkýšov. Ide o metódu, kedy sa rozpustená látka – analyt – rozdeľuje medzi dve kvapaliny, ktoré sa navzájom nemiešajú. Táto technika bola použitá pri izolovaní polyaromatických uhľovodíkov<sup>23,24</sup>, na multireziduálnu analýzu disruptorov endokrinného systému a farmaceutík<sup>25</sup> ako aj rôznych tried pesticídov<sup>26</sup>. Pre LLE sa používajú rôzne extrahovadlá, ktoré môžu byť obdobné ako pri Soxhletovej extrakcii<sup>24,26</sup>, alebo stačí k vzorke obsahujúcej vodu pridať organické rozpúšťadlo ako napr. etylacetát<sup>23</sup>. Použitá bola taktiež extrakčná zmes rozpúšťadiel acetonitrilu s metanolom<sup>25</sup>. Pri extrakcii sa pre lepšie oddelenie fáz používajú extrakčné soli podobne ako v QuEChERS extrakciách. Pri príprave vzorky na LLE extrakciu je možné vzorku homogenizovať priamo s extrakčnou soľou<sup>24</sup>. Čistenie extraktov po extrakcii kvapalina-kvapalina prebieha v kolónkach najčastejšie naplnenej silikagéloom<sup>23</sup>, ale účinným je aj prístup čistenia extraktu vo filtračnom lieviku cez vrstvu sklenej vaty<sup>24</sup> a v prípade príliš znečisteného extraktu použitie už spomenutej gélovej permeačnej chromatografie<sup>26</sup>.

Ultrazvukom (UAE)<sup>27–30</sup> a mikrovlnným žiarením (MAE)<sup>31</sup> podporené extrakcie vo všeobecnosti poskytujú výťažnosti približne rovnaké ako LLE, avšak v kratšom čase. Je teda prirodzené, že našli uplatnenie v prípade analýz kôrovcov a mäkkýšov. Sorbent LiChrolut®EN je komerčný produkt, ktorý sa vyznačuje vysokou adsorpčnou kapacitou na polárne látky a jeho použitím na čistenie UAE extraktu pomocou prietokovej metódy SPE sa pri analýze inštrumentáciou GC-MS dosahuje výťažnosť až 96 % (cit.<sup>28</sup>). V prípade čistenia extraktov vzoriek získaných týmito extrakčnými mechanizmami bolo reportované použitie gélovej permeačnej chromatografie s náplňou BioBead, čo je nepolárny styren-divinylbenzénový gél, ktorý sa používa predovšetkým na čistenie extraktov matric s vysokým obsahom tuku<sup>29,31</sup>. Urýchlená extrakcia rozpúšťadlom (ASE – Accelerated Solvent Extraction) je v porovnaní s LLE bližšie ku kritériám zelenej analytickej chémie, nakoľko tlak a teplota, ktorá je pri extrakcii aplikovaná, nielen urýchľuje proces, ale vyžaduje sa použitie menšieho objemu rozpúšťadla ako pri klasickej LLE. ASE sa použila pri extrakcii celej skupiny POP látok<sup>32</sup> a pri extrakcii PAH (cit.<sup>33</sup>) pomocou klasických organických rozpúšťadiel, používaných pri LLE extrakciách.

Disperzia matrice vzorky na tuhej fáze (MSPD) je metóda extrakcie, ktorá využíva disperziu zložiek vzorky na tuhej fáze sorbentu pomocou mechanického roztierania vzorky so sorbentom v trecej miske. Pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov bola aplikovaná na analýzu POP zlúčenín s použitím aktívneho silikagélu s elučným činidlom – dichlórmetánom<sup>35</sup>.

Pri izolácii PAH látok z kôrovcov a mäkkýšov je tiež možné použiť extrakciu s predradeným zmydelňovaním, pri ktorej sa homogenát vzorky zahrieva v banke spolu s alkoholovým roztokom hydroxidu a až následne sa v deliacom lieviku takto zahriaty roztok pretrepáva spolu s organickým rozpúšťadlom. Takto získané extrakty sú pomerne dosť znečistené a je nevyhnutné prečistiť ich viacerými sorbentmi<sup>34</sup>.

## Tabuľka III

Iné spôsoby extrakcií používané pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty                              | Vzorka  | Príprava vzorky  | Analytická metóda  | LOD, LOQ                             | Lit. |
|--------------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|------|
| PAH                                  | Krevety<br>( <i>Macrobrachium felicinum</i> )   | 1. HOMOG, LYO<br>2. extrakcia:<br>LLE: etylacetát, voda,<br>MgSO <sub>4</sub> , NaCl<br>3. čistenie extraktu:<br>Mini-column Silica<br>elučný roztok:<br>(hexán:DCM)   | GC-FID + Trace GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: ZB-5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM              | neuvedené                            | 23   |
| PAH                                  | Kraby<br>( <i>Callinectes amnicola</i> )<br>Krevety<br>( <i>Penaeus notialis</i> )  | 1. HOMOG s Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>2. extrakcia, čistenie:<br>LLE (DCM:hexán), filtrácia<br>v lieviku (síran sodný,<br>sklená vata),<br>3. čistenie (vyrobená<br>kolóna, sklená vata,<br>silikagél, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: Fused silica kapilár-<br>na kolóna<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,02–30<br>mg kg <sup>-1</sup> | 24   |
| 44 EDC, PhAC                         | Mušle<br>( <i>Perna viridis</i> ),<br>škľabky<br>( <i>Polymesoda expansa</i> )  | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>LLE: ACN/MeOH   | LC-MS/MS<br>dávkovanie:<br>kolóna: SB-C18<br>ionizácia: ESI<br>analyzátor: QqQ, MRM                                  | LOD < 1 ng g <sup>-1</sup>           | 25   |
| OCP, OPP, kar-<br>bamáty, pyretroidy | Krevety<br>( <i>Penaeus indicus</i> ,<br><i>Metapenaeus monoceros</i> ,<br><i>M. monoceros</i> ,<br><i>P. semisulcatus</i> ,<br><i>P. indicus</i> )   | 1. strihanie nožnicami<br>z nehrdzavejúcej ocele,<br>HOMOG<br>2. extrakcia: LLE (DCM,<br>cyklohexán)<br>3. čistenie: SEC<br>(etylacetát:cyklohexán)  | GC-MS, GC-FID<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: 5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM                        | LOD = 10 ng g <sup>-1</sup>          | 26   |
| 16<br>PAH                            | krevety<br>( <i>Metapenaeus affinis</i> ,<br><i>Penaeus semisculatus</i> )  | 1. HOMOG<br>s Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub><br>2. extrakcia: UAE<br>(hexán:acetón)<br>3. čistenie: stĺpcová<br>chromatografia (Silikagél,<br>Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) elučný roztok<br>(hexán:DCM)                | HPLC – FLD,<br>UV-Vis<br>kolóna: kapilárna, bližšie<br>neurčená  | LOD = 2,3 ng g <sup>-1</sup>         | 27   |
| 24 EDC                               | sépie ( <i>Sepia lycidas</i> )<br>chobotnice<br>( <i>Octopus vulgaris</i> )<br>krevety ( <i>Crangon crangon</i> )<br>varené krevety<br>( <i>Panaeus kerathurus</i> )<br>pečený krab<br>( <i>Carcinus maenas</i> )<br>mušle ( <i>Mytillus galloprovincialis</i> )<br>mušle ( <i>Ruditapes decussatus</i> )<br>ustrice ( <i>Crassostrea gigas</i> ) | 1. HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie: UAE<br>(ACN)<br>kontinuálna SPE (PTFE<br>vyrobená kolóna, LiChrolut<br>sorbent)  | GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: DB-5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM                             | LOD = 0,5–20 ng kg <sup>-1</sup>     | 28   |

Tabuľka III  
Pokračovanie

| Analyty                                      | Vzorka  | Príprava vzorky   | Analytická metóda  | LOD, LOQ   | Lit. |
|--|---|---|--|--|------|
| 89 POP, EDC                                  | škľabky   | 1. HOMOG s Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>2. extrakcia: UAE<br>(DCM:hexán)<br>3. čistenie:<br>GPC (Bio-Beads,<br>DCM-hexán)<br>75% pre GC, 25% pre LC<br>GC: Florisil, DCM:hexán<br>LC: filtrácia v striekačke                              | GC-MS/MS<br>kolóna: DB5-MS, HT5-MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: QqQ, MRM<br>LC-MS/MS:<br>kolóna: ZORBAX Eclipse<br>Plus C18<br>MF: MiliQ/(ACN:MeOH)<br>ionizácia: ESI | LOD = 0,9–33 ng g <sup>-1</sup>  | 29   |
| 15 PAH                                       | krevety, kraby  | 1. HOMOG<br>2. extrakcia: UAE<br>(hexán:DCM),<br>filtrácia organickej vrstvy<br>cez lievik s vrstvou<br>(Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )<br>3. čistenie: sklená kolóna<br>(aktívna a neutrálna<br>Alumina),<br>elučný roztok (hexán:DCM)      | GC-FID<br>bližšie neurčené   | neuvedené  | 30   |
| OCP  | krevety<br>(Leander modestus<br>Heller),<br>slimáky<br>(Cipangopaludina<br>chinensis) | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia, čistenie:<br>MAE, filtrácia za zníženého<br>tlaku, GPC (BioBead)<br>elučný roztok<br>(etylacetát:hexán), SPE<br>(silikagél, DCM:hexán –<br>elučný roztok)  | GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: HP5<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM  | LOD (DDD, DDT) =<br>5 ng g <sup>-1</sup><br>LOD (iné OCPs) ≤ 1<br>ng g <sup>-1</sup> | 31   |
| POP<br>(10 PCB, 4 PBDE,<br>13 OCP)<br>29 PAH | ustrice   | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia: ASE – DCM<br>3. čistenie PAH: Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>a silikagél mikrokolóna,<br>elučný roztok<br>(DCM:pentán)<br>4. čistenie POP: kyslý<br>silikagél a sklenené<br>perličky v extrakčných<br>bunkách | PAH: GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: HP-5<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM<br>PCB, PBDE, OCPs<br>GC-ECD<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: HP-5        | LOD = 0,1–0,2 ng g <sup>-1</sup><br>LOQ = 0,3–0,6 ng g <sup>-1</sup>                 | 32   |
| 16 PAH                                       | krevety<br>slimáky<br>mušle   | 1. LYO, HOMOG<br>2. extrakcia: ASE<br>(DCM:Hexán)<br>3. čistenie: silikagél-<br>alumina kolóna, okyslený<br>silikagél, rotačná odpadka  | GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: HP-5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM   | LOD = 0,57–2,96<br>ng g <sup>-1</sup>  | 33   |
| 16 PAH                                       | krevety<br>(Matapenaeus<br>affinis)   | 1. LYO<br>2. extrakcia:<br>zmydelňovaním (KOH<br>v EtOH roztoku +<br>cyklohexán)<br>3. čistenie: stĺpcová<br>chromatografia Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,<br>silikagél, elučný roztok<br>hexán:DCM  | GC-MS<br>dávkovanie: splitless<br>kolóna: BPX-5MS<br>ionizácia: EI<br>analyzátor: SQ, SIM  | LOD = 0,13–0,51<br>ng g <sup>-1</sup>  | 34   |

Tabuľka III  
Pokračovanie

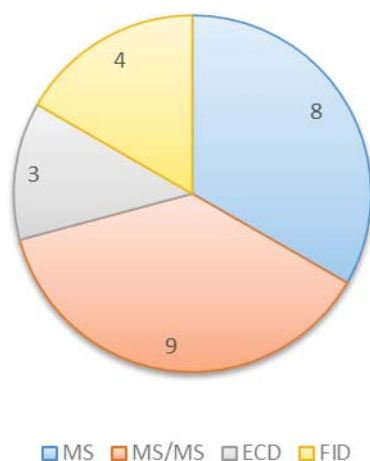
| Analyty | Vzorka         | Príprava vzorky            | Analytická metóda    | LOD, LOQ                         | Lit. |
|---------|----------------|----------------------------|----------------------|----------------------------------|------|
| PAH     | ustrice, mušle | 1. LYO, HOMOG              | GC-MS/MS             | LOD (úroveň $\text{ng g}^{-1}$ ) | 35   |
| OCP     |                | s Florisilom               | dávkovanie: LVI-PTV  |                                  |      |
| OPP     |                | 2. extrakcia, čistenie:    | kolóna: HP-5MS       |                                  |      |
| PDBE    |                | MSPD: $\text{SiO}_2$ , DCM | ionizácia: EI        |                                  |      |
|         |                |                            | analyzátor: QqQ, SRM |                                  |      |

Pozn. ACN – acetonitril, DCM – dichlórmetán, EDC – endokrinne disruptívne chemikálie, GC – plynová chromatografia, GPC – gélová permeačná chromatografia, HOMOG – homogenizácia, LC – kvapalinová chromatografia, LYO – lyofilizácia, MSPD – matrix solid phase dispersion, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PBDE – polybromované difenylétery, PCB – polychlórované bifenyly, POP – perzistentné organické polutanty, SPE – extrakcia tuhou fázou, UAE – extrakcia podporená ultrazvukom

#### 4. Separácia a detekcia

Pri detekcii rezíduí pesticídov a iných organických kontaminantov je potrebné dosahovať nízke medze detekcie (LOD) a analytická metóda musí mať multireziduálny charakter. Plynová a kvapalinová chromatografia sú v spojení s jednoduchou hmotnostnou spektrometriou alebo v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou najčastejšie používané analytické metódy na detekciu a stanovenie organických zlúčenín vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov.

Početné zastúpenie typov detektorov použitých pri plynovej chromatografii v rámci publikácií, ktoré sú predmetom prehľadu, zobrazuje obr. 2. Často je aplikované spojenie plynovej chromatografie s jednoduchým hmotnostným spektrometrom s kvadrupólovým analyzátorom.



Obr. 2. Zastúpenie typov GC detektorov reportovaných v publikáciách venovaných detekcii organických látok vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov; ECD: detektor elektrónového záchytu (Electron Capture Detector); FID: plameňovo-ionizačný detektor (Flame Ionization Detector); MS: hmotnostná spektrometria (Mass Spectrometry), MS/MS: tandemová hmotnostná spektrometria (Tandem Mass Spectrometry). (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

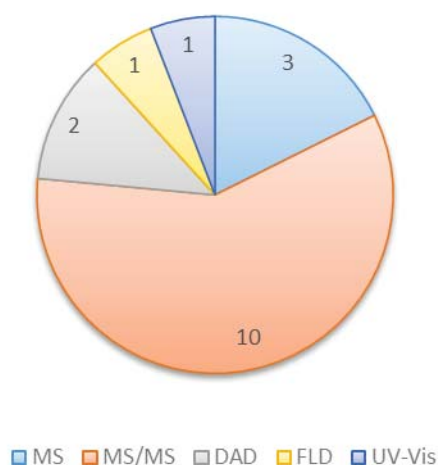
Najnižšie hodnoty LOD dosiahnuté použitím tejto inštrumentácie dosahujú 0,5 až 20  $\text{ng kg}^{-1}$ , čo bolo dosiahnuté najmä použitím čistenia extraktu sorbentom LiChrolut®EN (cit.<sup>28</sup>). Pre separáciu a detekciu PAH sa okrem GC-MS volí aj GC s plameňovo-ionizačným detektorom<sup>16,23,26</sup>. Pri multireziduálnych analýzach, ktorých cieľom je stanoviť látky na nízkych koncentračných hladinách, je vhodné použiť plynovú chromatografiu v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou<sup>4-6,16,19,29,35</sup>.

Po aplikácii vyvinutého čistiaceho kroku d-SPE + filtrácia vo vialke sa pomocou nízkotlakovej plynovej chromatografie (LPGC-MS/MS) stanovilo 30 z celkového počtu sledovaných 42 pesticídov a medze detekcie tejto analytickej metódy siahali pod 5  $\text{ng g}^{-1}$  (cit.<sup>6</sup>). Nízke medze detekcie (0,01–0,03  $\text{ng g}^{-1}$ ) dosiahla aj inštrumentácia GC-ECD aplikovaná pre detekciu organochlórovaných pesticídov a polychlórovaných bifenylov<sup>22</sup>.

Početné zastúpenie typov detektorov použitých na detekciu kontaminantov použitím kvapalinovej chromatografie zobrazuje obr. 3. Najrozšírenejšie je spojenie kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou s trojitým kvadrupólom. Najnižšie hodnoty LOD (0,38–0,96  $\text{ng g}^{-1}$ ) boli dosiahnuté pri analýze šiestich diacylhydrazínových pesticídov, ktoré boli zo vzorky extrahované postupom QuEChERS (cit.<sup>13</sup>). Jednoduchá hmotnostná spektrometria bola s kvapalinovým chromatografom kombinovaná pri analýzach imidaklopridu<sup>7,8,15</sup> a v spojení s QuEChERS postupom sa dosiahla medza detekcie 0,3  $\text{ng ml}^{-1}$  (cit.<sup>8</sup>). Použitý bol aj detektor diódového poľa (DAD) a jeho použitie v HPLC inštrumentácii na detekciu PAH zlúčenín umožnilo dosiahnuť medze detekcie v rozmedzí 0,07 až 0,16  $\text{ng g}^{-1}$  (cit.<sup>17</sup>). Na analýzu 16 US EPA PAH zlúčenín bol taktiež použitý fluorescenčný detektor (FLD), na detekciu a stanovenie acetnaftylénu bol použitý UV-Vis detektor<sup>27</sup>.

Pesticídy boli vyvinuté na hubenie škodcov, avšak mnohokrát sa ich aplikáciou poškodzujú aj necieľové organizmy, ľudí nevynímajúc. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) každý rok zaznamenáva 3 milióny prípadov otravy pesticídmi, z ktorých až 220 tisíc končí smrťou ľudí. K otravám dochádza najmä v štátoch, v ktorých regu-





Obr. 3. Zastúpenie typov LC detektorov reportovaných v publikáciách venovaných detekcii organických látok vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov; FLD: fluorescenčný detektor; UV-Vis: spektrofotometrický detektor; DAD: detektor s diodovým poľom (Diode-Array Detector); MS: hmotnostná spektrometria (Single Mass Spectrometry), MS/MS: tandemová hmotnostná spektrometria (Tandem Mass Spectrometry). (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

lácia používania pesticídov nie je tak prísna, resp. kontrolovaná a existujúca regulácia sa nedodržiava<sup>36</sup>. Organochlórované pesticídy sú zvyčajne používané ako insekticídy, ktoré spôsobujú nervovú paralýzu hmyzu. Používanie tejto skupiny pesticídov je veľmi obmedzené a v mnohých krajinách úplne zakázané. Ich rezíduá sú však vo vzorkách pôdy, vody a živých organizmov stále detegovateľné, a tak sa OCP látky radia aj do skupiny perzistentných organických polutantov (POP). Používanie DDT pesticídu je dnes úplne zakázané, avšak v poľnohospodárskych oblastiach je stále detegovateľný na pomerne vysokých koncentračných hladinách, ako ukazuje aj analýza kreviet žijúcich na pobreží Bangladéšu, v ktorých bol pesticíd 4,4 DDT stanovený na 0,95 mg kg<sup>-1</sup> sušiny<sup>10</sup>.

Organofosforečné pesticídy (OPP) pôsobia ako inhibítory enzýmu cholinesterázy, ktorá je zodpovedná za hydrolyzu acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú. Výsledkom je prekryv nervových synapsií acetylcholínom, čo ústi do zlyhání nervového prenosu a organizmus zomiera na svalový kŕč<sup>4</sup>. Pôsobia na stavovce aj bezstavovce a ich pozitívom je biodegradovateľnosť. Chlórpyrifos a trichlorfon boli stanovené na hladine 0,02 mg kg<sup>-1</sup> a 0,03 mg kg<sup>-1</sup> v dvoch zo 46 kusov kreviet lovených na Taiwanskom pobreží, čo indikovalo znečistenie vody a zdravotné riziko pre konzumentov<sup>4</sup>.

Pyretroidové pesticídy sú z dôvodu ich schopnosti rozkladať sa na svetle považované za najbezpečnejšie pesticídy. Analýza kreviet, sedimentov a vody s cieľom detekcie pesticídov rôznych tried poskytla výsledok, ktorý značne potvrdzuje schopnosť organizmov akumulovať a koncentrovať pesticídy silnejšie ako vzorky vody. Py-

retroid lambda-cyhalotrín bol stanovený vo vzorkách kreviet na úrovni 0,28–16,49 mg kg<sup>-1</sup>, zatiaľ čo vo vzorkách vody sa nedetegoval vôbec<sup>26</sup>. Koncentrácia tohto pesticídu výrazne prekročovala maximálny akceptovateľný limit 0,05 mg kg<sup>-1</sup> určený Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO).

Neonikotinoidové pesticídy sú systémové neurotoxíny so štruktúrou odvodenou od nikotínu. Vo vode rozpustný pesticíd imidakloprid bol analytom vo viacerých výskumoch, ktorých cieľom bolo preskúmať správanie kreviet pri dlhodobom vystavení imidaklopridu a zistiť, v ktorých častiach tiel vodných bezstavovcov sa imidakloprid koncentruje najviac. Počas 21 dní vystavovaní kreviet roztoku imidaklopridu sa ich rast úplne zastavil a výrazne sa znížil podiel tuku v ich telách<sup>7</sup>. Analýzou orgánov ustríc, ktoré boli vystavené imidaklopridu po dobu 3 dní, sa zistilo najvyššie zakonzentrovanie analytu v žiabroch, tráviacich žľazách a sťahovacích svaloch, avšak ponechaním jedincov v čistej vode počas jedného dňa sa dosiahla úplná eliminácia imidaklopridu s výnimkou sťahovacích svalov<sup>15</sup>.

Hlavným zdrojom polyaromatických uhľovodíkov je ropa, zemný plyn a spaliny týchto pohonných hmôt. Agentúra Spojených štátov amerických pre ochranu životného prostredia (US EPA) a Európska únia stanovila 16 zlúčenín PAH, ktorých kontrola má byť prioritná. Sú nimi naftalén, acenaftylén, acenaftén, fluorén, fenantrén, antracén, fluorantén, pyrén, benzo(α)antracén, chryzén, benzo(b)fluorantén, benzo(k)pyrén, indeno(1,2,3-cd)pyrén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(ghi)perylén a benzo(a)pyrén. Všetkých 16 prioritných PAH zlúčenín bolo vo vzorkách kreviet Perzského zálivu stanovených na 10–144 μg kg<sup>-1</sup> (cit.<sup>34</sup>), ktoré indikovali len mierne prekročenie povolených limitov, zatiaľ čo analýzou kreviet v Nigérii boli PAH stanovené na 77 mg kg<sup>-1</sup> (cit.<sup>24</sup>) a potvrdila sa tak závažnosť kontaminácie celej oblasti, ktorá bola zapríčinená únikom ropy pri jej ťažbe.

## 5. Záver

Drobné kôrovce a vodné druhy mäkkýšov obsahujú tukové tkanivá, ktoré umožňujú akumuláciu kontaminantov, predovšetkým nepolárnych organických látok, ako sú pesticídy, polyaromatické uhľovodíky ale aj iné organické kontaminanty, vo svojich tkanivách. Analýzou týchto drobných živočíchov je tak možné usudzovať o úrovni environmentálnej kontaminácie.

Komplexnosť analyzovaných vzoriek vyžaduje precíznú a mnohokrát komplikovanú metódu ich prípravy. Izolácia pesticídov zo vzoriek kôrovcov a mäkkýšov sa najčastejšie realizuje metódou QuEChERS, ktorej používanie sa kvôli jej súladu s požiadavkami zelenej analytickej chémie často preferuje. Polyaromatické uhľovodíky boli zo vzoriek extrahované najmä pomocou Soxhletovej extrakcie. Pre izolovanie analytov zo spomínaných vzoriek sa môže zvoliť aj klasická extrakcia kvapalina-kvapalina, ultrazvukom či mikrovlnným žiarením podporená extrakcia, rozpúšťadlom urýchlená extrakcia, ale aj technika

disperzie matrice vzorky na tuhej fáze. Kvôli komplikovanosti matrice vzoriek je nutné extrakty čistiť, pričom spôsoby čistenia extraktov môžu byť rôzne. Najčastejšie ide o čistenie rôznymi sorbentmi, kombináciami sorbentov, ale aj gélovou permeačnou chromatografiou a mnohokrát je nutné druhotné extrakty ešte filtrovať. Separácia a detekcia analytov prebieha plynovou alebo kvapalinovou chromatografiou s hmotnostnou spektrometriou alebo tandemovou hmotnostnou spektrometriou, ktoré ako techniky multireziduálnej analýzy sú pre vysokú účinnosť separácie a selektivitu detekcie metódami preferovanými. Prehľadový článok prezentuje aj výsledky analýz reálnych vzoriek. Trendom je vývoj analytických metód, aplikovateľných na detekciu a stanovenie viacerých skupín analytov naraz so zvyšovanou mierou selektivity a zároveň aj príklon k manuálne menej náročným metódam a voľba postupov znižujúcich environmentálnu záťaž produkovanú samotnou analýzou životného prostredia.

*Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0149 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV na základe projektu VEGA 01/0412/20.*

#### LITERATÚRA

- Petricorena Z. C., v knihe: *Handbook of Food Chemistry* (Cheung P., Mehta B., eds.), kap. 14, str. 403. Springer, Heidelberg/Berlin 2014. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_12)
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P.: *Food Chemistry*. Springer, Heidelberg/Berlin 2009.
- Shin D., Kim J., Kang H. S.: *Food Control* 120, 107552 (2021).
- Chang H. Y., Yang W. CH., Xue Y. J., Tsai M. Y., Wang J. H., Chang G. R.: *Mar. Pollut. Bull.* 144, 140 (2019).
- Li W., Zhang Z. M., Zhang R. R., Jiao H. F., Sun A. L., Shi X. Z., Chen J.: *J. Mater.* 384, 121241 (2020).
- Han L., Sapozhnikova Y., Lehotay S. J.: *Anal. Chim. Acta* 827, 40 (2014).
- McLuckie C., Moltschanivskyj N., Gaston T., Dunstan R. H., Crompton M., Butcherine P., Bekendorff K., Taylor M. D.: *Sci. Total Environ.* 742, 140449 (2020).
- Butcherine P., Kelaher B. P., Taylor M. D., Barkla B. J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 198, 110682 (2020).
- Zheng W., Park J. A., Zhang D., Abd El-Aty A. M., Kim S. K., Cho S. H., Choi J. M., Shim J. H., Chang B. J., Kim J. S., Shin H. C.: *J. Chromatogr. B* 1058, 1 (2017).
- Prodhan M., Alam S. N.: *SAARC J. Agric.* 16, 81 (2018).
- Chang G. R., Chen H. S., Lin F. Y.: *Mar. Pollut. Bull.* 113, 579 (2016).
- Song S., Zhu K., Han L., Sapozhnikova Y., Zhang Z., Yao W.: *J. Agric. Food Chem.* 66, 5031 (2018).
- Gan J., Liu H., Chen Y., Peng J., Liu T., Chen J., He L.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 210, 111853 (2021).
- Cho H. R., Park J. S., Kim J., Han S. B., Choi Y. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 9043 (2015).
- Ewere E. E., Powell D., Rudd D., Reichelt-Brushett A., Mouatt P., Voelcker N. H., Bekendorff K.: *Chemosphere* 230, 1 (2019).
- Nagyová S., Tölgyessy P., Laurenčík M., Kirchner M.: *Microchem. J.* 173, 107011 (2022).
- Sun J., Pan L., Cao Y., Li Z.: *Mar. Pollut. Bull.* 160, 111556 (2020).
- Tongo I., Etor E. E., Ezemonye L.: *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 22, 731 (2018).
- Rodríguez-Hernández Á., Camacho M., Henríquez-Hernández L. A., Boada L. D., Ruiz-Suárez N., Valerón P. F., González M. A., Zaccaroni A., Zumbado M., Luzardo O. P.: *Sci. Total Environ.* 557, 808 (2016).
- Li H., Ye S., Ye J., Fan J., Gao M., Guo H.: *Mar. Pollut. Bull.* 114, 555 (2017).
- Casatta N., Mascolo G., Roscioli C., Vigano L.: *Sci. Total Environ.* 511, 214 (2015).
- Choi J. Y., Yang D. B., Hong G. H., Kim K., Shin K. H.: *Environ. Eng. Res.* 21, 373 (2016).
- Dosunmu M. I., Oyo-Ita I. O., Oyo-Ita O. E.: *Environ. Geochem. Health* 38, 1333 (2016).
- Olayinka O. O., Adewusi A. A., Olujimi O. O., Aladesida A. A.: *J. Health Pollut.* 9, 191204 (2019).
- Bayen S., Estrada E. S., Juhel G., Kelly B. C.: *Bioanal. Chem.* 407, 5553 (2015).
- Patiri G. F.: *Heavy metals and pesticide residues as quality determinants for sustainable management of prawns along the Indian coastline of Tanzania. Dizertačná práca*. Nelson Mandela African Institution of Science and Technology, Pretória 2020.
- Soltani N., Moore F., Keshavarzi B., Sorooshian A., Javid R.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 251 (2019).
- Azzouz A., Colón L. P., Souhail B., Ballesteros E.: *Environ. Res.* 178, 108727 (2019).
- Zhang H., Bayen S., Kelly B. C.: *Talanta* 143, 7 (2015).
- Akinsanya B., Adebusoye S. A., Alinson T., Ukwu U. D.: *J. Basic Appl. Zool.* 79, 40 (2018).
- Liu W. X., Wang Y., He W., Qin N., Kong X. Z., He Q. S., Yang B., Yang C., Jiang Y. J., Jorgensen S. E., Xu F. L.: *Ecol. Indic.* 60, 335 (2016).
- Luna-Acosta A., Budzinski H., Le Menach K., Thomas-Guyon H., Bustamante P.: *Sci. Total Environ.* 514, 500 (2015).
- Qadeer A., Liu M., Yang J., Liu X., Khalil S. K., Huang Y., Habibullah-al-Mamun M., Gao D., Yang Y.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 178, 17 (2019).
- Keshavarzifard M., Vazirzadeh A., Sharifinia M.: *Mar. Pollut. Bull.* 159, 111463 (2020).
- Ziarrusta H., Olivares M., Delgado A., Posada-Ureta O., Zuloaga O., Etxebarria N.: *J. Chromatogr. A* 1391, 18 (2015).
- Kaur R., Mavi G. G., Raghav S.: *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8, 1889 (2019).

**K. Rusiňáková<sup>a</sup>, M. Kirchner<sup>b</sup>, and S. Hrouzková<sup>a</sup>**  
(*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia, <sup>a</sup>Water Research Institute, Bratislava, Slovakia*): **Analytical Methods for the Detection of Contaminants in Crustaceans and Mollusks**

The paper overviews analytical methods for the detection of a variety of contaminants, such as pesticide residues, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, etc. in environmental samples – crustaceans and mollusks. Complexity of analyzed samples requires a sophisticated sample preparation: mostly two-step procedures include an extraction followed by a clean-up of the extract. QuEChERES technique complies with the requirements of the green analytical chemistry and is preferred for the isolation of pesticide residues. Polyaromatic hydrocarbons are extracted from samples utilizing Soxhlet extraction. For the isolation of a variety of contaminants, liquid-liquid extraction, ultrasound assisted and microwave assisted extraction, accelerated solvent extraction as well as matrix solid phase dispersion are employed. Because of the com-

plexity of samples, a clean-up by sorbents or gel permeation chromatography are used. For the separation, gas or liquid chromatography connected with a variety of detectors may be used. However, mass spectrometry or tandem mass spectrometry are indispensable at present. Numerous real-life findings show the necessity of application of analytical methods to inspect the products.

**Keywords:** cleaning the extract, GC-MS, contaminants, crustaceans, mollusks, PAH, QuEChERES, pesticide residues

- Rusiňáková K., Kirchner M., Hrouzková S.: Chem. Listy 116, 481–493 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220481>

#### *Acknowledgements*

*This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. APVV-19-0149. The work was supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic (VEGA project no. 1/0412/20).*

## AZOLOVÁ REZISTENCIA KVASINIEK RODU *CANDIDA*

ZUZANA MALINOVSKÁ, EVA ČONKOVÁ,  
PETER VÁCZI a MARTINA PROŠKOVCOVÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinár-  
skeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73,  
041 81 Košice, Slovenská republika  
zuzana.malinovska@uvlf.sk

Došlo 23.8.21, prijaté 2.6.22.

Kľúčové slová: *Candida*, antimykotická citlivosť,  
rezistencia, biofilm, gén

● <https://doi.org/10.54779/chl20220494>

### Obsah

1. Úvod
2. Azolové antimykotiká
3. Rezistencia
4. Biofilm
5. Záver

### 1. Úvod

Mykotické ochorenia v podobe invazívnych systémových ochorení a septikémií sa stávajú veľkým medicínskym problémom. Posledné štatistiky uvádzajú každý rok približne 1,6 milióna ľudských úmrtí v dôsledku systémových mykóz. Za 90 % všetkých týchto ochorení je zodpovedná oportúnna kvasinka rodu *Candida*, ktorá je zároveň štvrtou najčastejšou príčinou všetkých nozokomiálnych infekcií krvi<sup>1–3</sup>. Systémové kandidové infekcie vznikajú v prípadoch celkového oslabenia alebo imunodeficiencie organizmu: u imunokompromitovaných pacientov, u rizikových alebo predčasne narodených novorodencov, u pacientov po komplikovaných a závažných operáciách, najmä brušných, u pacientov vo vážnom stave po popáleninách a na jednotke intenzívnej starostlivosti, u pacientov po liečbe širokospektrálnymi antibiotikami a imunosupresívami, po liečbe chemoterapiou, po transplantácii orgánov, hemodialýze, pri dlhodobom zavedení katétrov, po podávaní parenterálnej výživy atď.<sup>4–11</sup>. Z hľadiska možnosti liečby a jej úspešnosti je prognóza týchto život ohrozujúcich ochorení nepriaznivá s mortalitou 45 %, pričom niektorí autori udávajú až 75% úmrtnosť<sup>12–14</sup>.

Kvasinky rodu *Candida* patria do kmeňa *Ascomycota*. Sú to jednobunkové eukaryotické organizmy oválneho,

elipsovitého alebo pretiahnutého tvaru s veľkosťou 1–8 × 1–6 μm (cit.<sup>15</sup>). Osídľujú kožu a sliznice ľudí a zvierat a môžu byť súčasťou prirodzenej mikróflóry. Po narušení lokálnej kožnej alebo slizničnej imunity sú častou príčinou povrchových mykóz u ľudí, ktoré ale na rozdiel od systémových infekcií nie sú život ohrozujúce a ich liečba je jednoduchšia a úspešnejšia. Na terapiu superficiálnych mykóz sa využíva veľká skupina lokálne pôsobiacich antimykotík<sup>1,13,16</sup>.

Do skupiny pôvodcov systémových infekcií patria okrem najznámejšieho druhu *C. albicans* aj ďalšie druhy rodu *Candida*, a to *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, a *C. krusei*<sup>16,17</sup>. Základným mechanizmom vzniku ochorení spôsobených týmito oportúnne patogénnymi kvasinkami je prelomenie hostiteľskej imunity a vytvorenie vhodných podmienok pre pomnoženie kvasinkových buniek. Princíp ich patogenity je zložitý. Patogenita sa pripisuje určitým faktorom virulencie, a to adhezencii, produkcii hydrolytických enzýmov poškodzujúcich tkanivá a tvorbe biofilmu<sup>18,19</sup>. Kvasinky rodu *Candida* sú schopné adherovať na rôzne povrchy v organizme (napr. epitel, endotel, trombocyty) alebo na umelé povrchy zdravotníckych pomôcok (katétre, endoprotézy atď.). Schopnosť adhezencie je okrem hýf zabezpečená glykoproteínmi – adhezíni, ktoré sa nachádzajú na povrchu kandidových buniek a dokážu prepojiť kvasinkové bunky navzájom, s inertným povrchom alebo s hostiteľskými bunkami. Ďalším dôležitým virulentným znakom kandid je schopnosť deštrukcie hostiteľských bunkových membrán hydrolytickými enzýmami. K najvýznamnejším hydrolytickým enzýmom patria proteázy a fosfolipázy. Proteázy sú zastúpené skupinou sekretovaných aspartických proteáz a fosfolipázy enzýmami hydrolyzujúcimi esterové väzby v glycerolfosfolipidoch. Najväčším problémom pri liečbe kandidových systémových infekcií je vysoký stupeň rezistencie na antimykotiká a tvorba biofilmu. V prípade parenterálnej terapie systémových ochorení sú možnosti výberu vhodného antimykotika veľmi obmedzené<sup>13,14,19–21</sup>.

### 2. Azolové antimykotiká

Prvé antifungálne látky sa objavili už v prvej polovici 20. storočia a ich vývoj pokračuje aj v súčasnosti. Aj napriek pokroku v medicíne, počet systémových kandidóz z viacerých dôvodov narastá, a tým aj potreba vývoja nových a menej toxických liečiv. Do veľkej skupiny antifungálnych látok patria antimykotiká prírodného pôvodu (polyénové antibiotiká a grizeofulvín), syntetického pôvodu (azoly, alylamíny a flucytozín) a polosyntetického pôvodu (echinokandíny). V terapii systémových mykóz vo veľkej miere prevažujú azolové antimykotiká<sup>22</sup>.

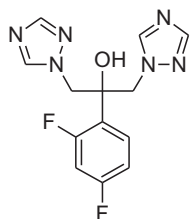
Azoly sú najpočetnejšou skupinou antimykotík. Azolové antimykotiká obsahujú päťčlenný heterocyklus a podľa počtu dusíkových atómov sa delia na dve skupiny, a to na imidazoly, ktoré obsahujú dva dusíkové atómy a na triazoly s obsahom 3 dusíkových atómov<sup>23</sup>. K najvýznamnejším imidazolom, ktoré sa využívajú len na lokálnu aplikáciu, patria: ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, bifonazol, oxikonazol, butokonazol, ekonazol a flutrimazol. Skupina triazolov je viac antifungálne špecifická, vyznačuje sa menším množstvom nežiaducich účinkov a je najčastejšie indikovaná pri liečbe systémových mykóz. Z triazolových antimykotík sa pri celkovej liečbe systémových kandidových infekcií využívajú najmä flukonazol, itraconazol, vorikonazol a posakonazol<sup>22–24</sup>.

Mechanizmus účinku azolov je založený na špecifickej inhibícii 14- $\alpha$ -sterol demetylázy, ktorá katalyzuje premenu lanosterolu na ergosterol. Enzým je závislý na pôsobení fungálneho cytochrómu P450. Azoly ovplyvňujú metabolizmus sterolov v bunkách kvasiniek a narušajú syntézu membránových lipidov, a tým pôsobia fungistaticky<sup>25,26</sup>.

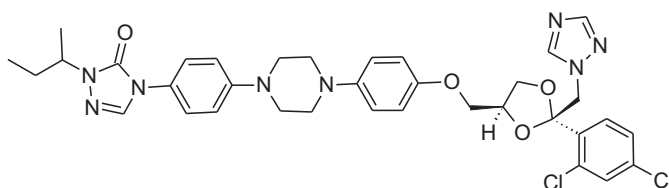
U kvasiniek je ergosterol (5,7-dién-oxysterol) najvýznamnejším štrukturálnym lipidom bunkových membrán, zabezpečuje ich permeabilitu a fluiditu. Štruktúrne je veľmi podobný cholesterolu. Líši sa len prítomnosťou metylovej skupiny viazanej na uhlík C-24 a dvomi dvojítmymi väzbami medzi uhlíkmi 7–8 a 22–23. Nedávne štúdie preukázali, že ergosterol je imunologicky aktívny lipid, ktorý indukuje pyroptózu, čo je forma nekrotickej a zápalovej programovanej bunkovej smrti indukovanej zápalovými kaspázami<sup>27–29</sup>. Ergosterol je syntetizovaný v endoplazmatickom retikule a biosyntéza je regulovaná prostredníctvom aktivity produktov 25 rôznych génov<sup>25</sup>. V súčasnosti dostupné antimykotiká interferujúce so syntézou ergosterolu ovplyvňujú produkty génu *ERG11* (azoly), génu *ERG1* (alylamíny) a génu *ERG2* (morfolíny). Potenciál

produktov ďalších génov ako antifungálnych cieľov je veľmi veľký. Cieľom účinku antimykotických liečiv môžu byť prakticky všetky kroky biosyntézy ergosterolu<sup>30</sup>, a to otvára ďalšie možnosti pri vývoji nových antimykotík.

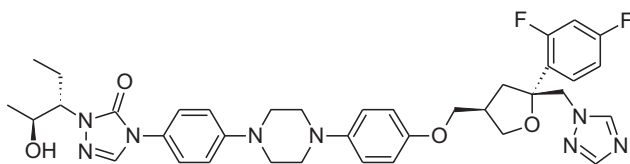
Jedným z najpoužívanejších azolov v klinickej praxi je flukonazol (obr. 1), ktorý sa vyznačuje širokým spektrom účinku. Jedná sa o fluórový triazolový derivát používaný hlavne pri systémových kandidózach a kryptokokovej meningitíde. Prírodzene rezistentná na flukonazol je *C. krusei* a rod *Aspergillus*, zatiaľ čo u niektorých druhov rodu *Candida*, napr. *C. glabrata*, sa môže rezistencia vyvinúť postupne. Skrížená rezistencia bola zaznamenaná pri niektorých kmeňoch *C. glabrata*, *C. krusei* a *C. lusitaniae* (cit.<sup>31–34</sup>). Flukonazol je využívaný v profylaxii systémovej kandidózy u predčasne narodených detí<sup>35</sup>. Itraconazol je chlórovaný triazoldioxolanový derivát (obr. 2), ktorý sa využíva najmä pri liečbe aspergilózy, ale má široké spektrum účinku aj na kandidózy, histoplazmózy a blastomykózy<sup>36</sup>. Vorikonazol a posakonazol sú zástupcami druhej generácie triazolov a patria medzi pomerne nové antimykotiká. Používajú sa pri liečbe systémových aspergilových a kandidových infekcií<sup>37</sup>. Posakonazol (obr. 3) je štruktúrou blízky itraconazolu, v podstate sa jedná o jeho hydroxylovaný analóg, avšak s inými liečivami vykazuje menej interakcií<sup>38</sup>. Vorikonazol (obr. 4) sa štruktúrou, farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnosťami podobá flukonazolu, ale vyznačuje sa väčším množstvom nežiaducich účinkov. V jeho molekule je na rozdiel od flukonazolu jeden triazolový kruh nahradený fluoropyrimidínovým. Spektrum účinku vorikonazolu je podobné itraconazolu<sup>39</sup>. Farmakokinetické vlastnosti sú v rámci týchto štyroch azolových antimykotík rozdielne (tab. I). Itraconazol, vorikonazol a posakonazol majú afinitu k lipidom, ale flukonazol je hydrofilný a má odlišné farmakokinetické vlastnosti. Všetky sa môžu podávať orálne, ale intravenózne sa aplikujú len flukonazol, itraconazol



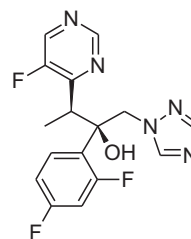
Obr. 1. Flukonazol



Obr. 2. Itraconazol



Obr. 3. Posakonazol



Obr. 4. Vorikonazol

## Tabuľka I

Farmakokinetické vlastnosti azolových antimykotík používaných na terapiu fungálnych systémových infekcií<sup>33,35–40</sup>

| Antimykotikum | Spôsob podania | Biologická dostupnosť [%] | Maximálna koncentrácia [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] | AUC <sup>a</sup> [ $\text{mg h l}^{-1}$ ] | Väzba na bielkoviny plazmy [%] | Eliminačný polčas [h] |
|---------------|----------------|---------------------------|--|---|--------------------------------|-----------------------|
| Flukonazol    | per os         | > 90                      | 0,7  | 400,0                                     | 10–12                          | 27–31                 |
| Itrakonazol   | per os         | > 55                      | 1,1  | 29,2                                      | 99,8                           | 21–64                 |
| Posakonazol   | per os         | > 98                      | 7,8  | 17,0                                      | 99,0                           | 15–35                 |
| Vorikonazol   | per os         | > 96                      | 4,6  | 20,3                                      | 60,0                           | 6,0                   |

<sup>a</sup> AUC (Area Under Curve) – plocha pod krivkou

a vorikonazol. Absorpcia po orálnej aplikácii je závislá od aktuálneho pH žalúdka, najväčšiu variabilitu vykazuje itrakonazol, je slabšie alkalický a vstrebáva sa najlepšie za prítomnosti žalúdočnej šťavy (v pevnej liekovej forme po jedle). Flukonazol a vorikonazol majú vysokú biologickú dostupnosť, po perorálnom podaní dosahuje flukonazol maximálnu koncentráciu za 30–90 minút, vorikonazol za 1–2 hodiny (itrakonazol a posakonazol za cca 4 hodiny). Všetky dobre prenikajú do telesných tekutín a tkanív, kde dosahujú výrazne vyššie koncentrácie ako v plazme. Terapeutické hladiny dosahujú aj v mozgo-miechovom moku. V niektorých tkanivách pretrvávajú dlho po ukončení liečby, napr. v nechtovej platničke je možná detekcia flukonazolu a itrakonazolu až 6 mesiacov po liečbe. Flukonazol sa vylučuje močom v aktívnej nezmenenej forme, čo sa využíva pri liečbe urogenitálnych infekcií. Ostatné spomínané antimykotiká podliehajú biotransformácii v pečeni<sup>35,37–42</sup>.

Vedľajšími účinkami azolov je ovplyvnenie syntézy steroidných hormónov, a to hlavne androgénov a kortizolu a hepatotoxicita. Azolové antimykotiká sa vyznačujú veľkým počtom liekových interakcií, od stredne závažných až po veľmi závažné formy. Riziko vzniku nežiaducich účinkov sa zvyšuje s množstvom súčasne užívaných liečiv. Dochádza k nim najčastejšie pri kombináciách s liečivami zo skupín antihistaminík, steroidov, antineoplastík, antimikrobiálnych látok, antiretrovirálnych látok, opioidov, dlhodobo pôsobiacej barbiturátov, kardiovaskulárnych liečiv, psychotropných látok a orálnych kontraceptív<sup>33,37–42</sup>.

### 3. Rezistencia

Objasnenie mechanizmov rezistencie je zásadné pre dosiahnutie pokroku v porozumení a liečbe invazívnych infekcií vyvolaných kvasinkami rodu *Candida*. Patogénne kvasinky si vyvinuli množstvo mechanizmov umožňujúcich ich prežitie v prítomnosti antimykotických látok. Rezistencia na antimykotiká vzniká ako dôsledok:

a) zmien v bunkovej stene alebo plazmatickej membráne, ktoré vedú k narušeniu absorpcie liečiva,

b) zmien v afinite liečiva k 14- $\alpha$ -sterol demetyláze alebo v bunkovom obsahu 14- $\alpha$ -sterol demetylázy v dô-

sledku mutácie cieľového miesta alebo nadmernej expresie génu *ERG11*,

c) efluxu liečiva sprostredkovaného membránovými transportnými proteínmi (efluxnými pumpami) patriacimi do rodiny ATP-Binding Cassette (ABC) alebo do rodiny Major Facilitator Superfamily (MFS). Sú známe dva typy efluxných púmp, ktoré sú lokalizované v cytoplazmatickej membráne a transportujú z bunky antimykotické liečivá či iné toxické látky (xenobiotiká). Do prvej skupiny patria primárne transportéry využívajúce energiu zo štiepenia ATP, čo sú proteíny patriace do rodiny ABC. Druhú skupinu tvoria sekundárne transportéry čerpajúce energiu z koncentračného gradientu protónov typického pre biologické membrány. Túto kategóriu zastupujú proteíny MFS. V prípade kvasiniek sú produktami génov *CDR1* a *CDR2* proteíny ABC a produktami génu *MDR1* transportéry typu MFS (cit.<sup>43,44</sup>).

U klinických izolátov rodu *Candida* často dochádza ku kombináciám rôznych mechanizmov rezistencie, ktoré sú často spojené aj s tvorbou biofilmu. Najmä pri flukonazole, ktorý je najpoužívanejším azolovým antimykotikom, často dochádza ku kombináciám rôznych mechanizmov, ktoré vedú k postupnému vývoju rezistencie kandid v flukonazol, ale aj na iné azolové antimykotiká<sup>45–47</sup>.

Dôležitým génom v genóme kvasiniek rodu *Candida* je *ERG11*, ktorý kóduje 14- $\alpha$ -sterol demetylázu. V *ERG11* môže dôjsť k vzniku bodových mutácií, a to môže viesť k nadmernej expresii génu a následne k nadprodukcii enzýmu, na ktorý je liek zameraný<sup>54</sup>. Mutácie v *ERG11* môžu mať za následok vznik skríženej rezistencie na rôzne azoly. Predpokladá sa, že k regulácii génovej expresie môže dochádzať aj metyláciou DNA. Metylácia môže zmeniť aktivitu segmentu DNA bez zmeny sekvencie<sup>48</sup>.

S biosyntézou ergosterolu u kandid priamo súvisí Upc2 transkripčný regulátor génu *ERG11*. Upc2 je centrálnym regulátorom nielen *ERG11*, ale aj ďalších génov v dráhe biosyntézy ergosterolu. Upc2 sníma intracelulárne hladiny sterolov, čo vedie k aktivácii génov potrebných na absorpciu a biosyntézu sterolov<sup>49</sup>. Bolo zistené, že narušenie štruktúry Upc2 zvyšuje citlivosť týchto organizmov na azolové antimykotiká. Boli identifikované dva Upc2 homológy, UPCA a UPGB. Bolo zistené, že UPCA ovplyvňuje citlivosť na azoly a je kľúčovým regulátorom biosyn-

tézy ergosterolu a je nevyhnutný pre rezistenciu na inhibítory biosyntézy sterolov v *C. glabrata*. Dráha UPC2A preto môže predstavovať potenciálny terapeutický cieľ na zvýšenie účinnosti azolu proti tomuto organizmu<sup>50</sup>.

Inhibícia 14 $\alpha$ -sterol demetylázy flukonazolom vedie nielen k deplícii ergosterolu, ale aj k akumulácii metylovaného sterolu 14 $\alpha$ -metylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolu, ktorý inhibuje bunkový rast. Zmeny v dráhe biosyntézy sterolov môžu spôsobiť rezistenciu na flukonazol. Inaktivácia  $\Delta$ 5,6 desaturázy (ERG3), enzýmu, ktorý v dráhe biosyntézy ergosterolu účinkuje v skoršom kroku ako 14- $\alpha$ -sterol demetyláza, má za následok zmenu zloženia sterolu v membráne (vysoký obsah fekosterolu) a rezistenciu na flukonazol, pravdepodobne akumuláciou 14 $\alpha$ -metylfekosterolu, ktorý umožňuje rast bunky<sup>51</sup>. Posledné štúdie ukázali, že delécia alebo mutácia génu *ERG3* u *C. albicans* vedie k zníženej citlivosti mutantov na flukonazol, čo poskytuje priamy genetický dôkaz, že zmena dráhy biosyntézy sterolov môže spôsobiť rezistenciu na flukonazol<sup>51,52</sup>.

Fenoméni rezistencie na viac liečiv (MDR – Multi-Drug-Resistance) je známy aj u kandid. Kvasinky sa môžu stať rezistentnými aj na viac štruktúrne odlišné antimykotiká s rôznymi spôsobmi účinku. Aktívnym transportom antimykotika z bunky dochádza k zníženiu jeho koncentrácie, ktorá nie je postačujúca na ovplyvnenie cieľového miesta<sup>53</sup>. Gén *MDR1* môže byť nadmerne exprimovaný v mnohých klinických izolátoch *C. albicans* rezistentných na flukonazol, a to vedie k zníženej intracelulárnej akumulácii flukonazolu. Aktivácia génu v rezistentných izolátoch je spôsobená mutáciami doposiaľ neznámych transregulačných faktorov a výsledná konštitutívna vysoká úroveň expresie *MDR1* spôsobuje rezistenciu okrem flukonazolu aj na ďalšie antimykotické zlúčeniny. Narušenie obidvoch alel génu *MDR1* v rezistentných izolátoch *C. albicans* ruší ich rezistenciu na tieto liečivá, čo poskytuje genetické dôkazy o tom, že *MDR1* sprostredkúva rezistenciu *C. albicans* voči viacerým antimykotikám<sup>54,55</sup>.

Gén *CDR1* zo skupiny ABC transportérov je súčasťou genómu *C. albicans*. Jeho delécia mala za následok precitlivosť na flukonazol, itraconazol a ketokonazol a na ďalšie metabolické inhibítory<sup>56</sup>. Vynútená nadmerná expresia *CDR1* spôsobila zvýšenú rezistenciu na antimykotiká, čo dokazuje, že u *C. albicans* môže *CDR1* spôsobiť rezistenciu na viac liečiv. Druhý ABC transportér u *C. albicans* je označený ako *CDR2* (cit.<sup>57</sup>). *CDR1* a *CDR2* sú vysoko homológne (84% aminokyselínová identita) a poskytujú rezistenciu voči podobnému, ale nie identickému spektru antimykotík<sup>57,58</sup>. Nútená nadmerná expresia *CDR2* u *C. albicans* viedla k zvýšenej rezistencii na antimykotiká. Gény *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* sprostredkujú okrem rezistencie na azoly rezistenciu aj na mnoho rôznych xenobiôtiká a *CDR1* a *CDR2* tiež spôsobujú rezistenciu na lokálne fungicídy terbinafin a amorolfín. Tieto efluxné pumpy nespôsobujú rezistenciu na iné medicínske dôležité lieky flucytozín, amfotericín B a echinokandíny, pretože rezistencia k nim vzniká inými mechanizmami<sup>59</sup>.

U *C. tropicalis* sú homológy *MDR1* a *CDR1* nadmerne exprimované po postupných pasážach kmeňa citlivého na liečivo v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií fluko-

nazolu, súčasne s vývojom rezistencie na azoly a terbinafin<sup>60</sup>. *C. glabrata* je druh, ktorý prirodzene vykazuje relatívne vysokú rezistenciu na flukonazol, ale jeho rezistencia sa môže počas liečby flukonazolom ďalej zvyšovať. Delécia *CDR1* v kmeni *C. glabrata* rezistentnom na azoly mala za následok zvýšenú intracelulárnu akumuláciu flukonazolu a precitlivosť na ďalšie azoly. Následkom expresie *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* u niektorých kmeňov *C. glabrata* vzniká multirezistencia<sup>61</sup>. *C. krusei* je prirodzene rezistentná na flukonazol kvôli nízkej afinite 14- $\alpha$ -sterol demetylázy k tomuto liečivu a môže získať rezistenciu na ďalšie azoly zníženou intracelulárnou akumuláciou liečiva. Zvýšená expresia efluxných púmp kódovaných *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* je hlavným, klinicky relevantným mechanizmom azolovej rezistencie u *Candida* spp. a vedie k zvýšeniu rezistencie na iné xenobiôtiká<sup>31,62,63</sup>.

#### 4. Biofilm

S rastúcim používaním širokospektrálnych antibiotík narastá problém vzniku kvasinkového biofilmu u pacientov s rôznymi do tela zavedenými zdravotníckymi pomôckami (intravaskulárne katétre, močové katétre, kardioverterové defibrilátory, protetické srdcové chlopne, náhrady kĺbov a iné). Tvorba biofilmu je významným faktorom virulencie kvasiniek rodu *Candida* a je vážnym problémom pre budúcu antimykotickú terapiu. Kvasinky *Candida* spp. majú schopnosť adherencie a kolonizácie na povrchoch zdravotníckych pomôcok a tkanivách<sup>18</sup>. Biofilm svojím prostredím umožňuje množenie buniek, ochranu pred imunitným systémom hostiteľa a pred účinkami antifungálnych látok. Z toho dôvodu sa biofilm stáva nebezpečným rezervoárom kvasinkových buniek a infekcií, ktoré často nereagujú na antimykotickú liečbu. Z biofilmu sa môžu uvoľňovať bunky alebo mikrokolonie, ktoré sú príčinou opakujúcich sa recidív. Vznik biofilmu býva často jedným z dôvodov vysokej mortality u postihnutých pacientov. Kvasinky rodu *Candida* dokážu vytvoriť biofilm za 38–72 h. Je to zložitý proces, ktorý pozostáva z viacerých fáz. Počas prvej fázy dochádza k adhezii solitérnych buniek na vhodný povrch, k ich agregácii do mikrokolónií a k vzniku bazálnej monovrstvy. Ďalšia etapa vývoja biofilmu spočíva v bunkovej proliferácii a skorom štádiu filamentácie adherovaných buniek. Nasleduje dozrievanie biofilmu, ktorého výsledkom je komplexná sieť niekoľkých vrstiev polymorfnych buniek vrátane hýfálnych buniek (reťazce buniek valcového tvaru), pseudohýfálnych buniek (elipsoidné bunky spojené od konca k sebe) a okrúhlych kvasinkových buniek obalených v extracelulárnej matici. To dáva biofilmu hustý a štruktúrovaný vzhľad a poskytuje ochranu. Posledný krok vývoja biofilmu sa nazýva disperzné štádium, keď sa niektoré okrúhle kvasinkové bunky dispergujú z biofilmu do prostredia<sup>17,18,64,65</sup>.

Tvorba biofilmu závisí od schopnosti kvasinky produkovať extracelulárne polymérne látky (EPS) (polysacharidy, glukóza, hexosamín, lipidy, proteíny, kyselina fosforečná, kyselina urónová), od vlastností extracelulárnej

matrice (ECM), od schopnosti vykazovať dimorfny rast, od substrátu biofilmu (napr. silikón, latex, elastomér), od dostupnosti, typu a množstva zdroja uhlíka (glukóza, sacharóza, galaktóza), od typu produkovaných adhezínov (napr. Als1-7, Als9, Hwp1, Hwp2, Rbt1, Eap1, Ywp1) a od ďalších faktorov. Transkripčná kontrola nad procesmi, ako je adhézia, tvorba biofilmu, produkcia EPS a ostatných fáz, je navyše zložitá a vykazuje značnú rozmanitosť, pričom celý proces je ovplyvňovaný množstvom génov (pri *C. albicans* sú to napr. *Efg1*, *Bcr1*, *Tec1*, *Ndt80*, *Rob1*, *Brg1*, *Cph1*, *Nrg1*, *Tup1*, *Ume6*, *Cup9*, *Slf1*, *Rfg1*, *Csr1*, *Gcn4*, *Tye7*, *Rca1*, *Ace2* atď.). V rámci druhov rodu *Candida* existujú veľké rozdiely vo vlastnostiach biofilmu. Biofilmy vytvorené *C. albicans* majú heterogénnu štruktúru, ktorú tvoria blastofóry a hýfy obklopené ECM z polysacharidového materiálu<sup>18,65,66</sup>. ECM poskytuje štruktúrnu sieť pre adhéziu medzi samotnými bunkami a pre spojenie buniek s rôznymi povrchmi a zároveň bariéru medzi bunkami v biofilme a susedným prostredím. V štruktúre týchto biofilmov sú obvykle mikrokolónie obklopené vodnými kanálmi<sup>67</sup>. V prípade *C. glabrata* je biofilm tvorený výlučne kvasinkami vo forme buniek ohraničených viacvrstvou štruktúrou alebo v zhlukoch<sup>68</sup>. Biofilm *C. tropicalis* má formu siete kvasiniek, pseudohýf a hýf s intenzívnym pučaním<sup>69</sup>. Biofilm *C. parapsilosis* je tvorený zhlukmi kvasinkových buniek prilnutých k povrchu s minimálnym podielom ECM (cit.<sup>70</sup>).

Bunky v biofilme môžu vykazovať zvýšenú rezistenciu voči antimykotikám, a to je príčinou zlyhávania antimykotickej terapie v praxi. Bolo zistené, že biofilmy po 48 hodinách kultivácie vykazujú v porovnaní s planktonickými bunkami *C. albicans* päť- až osemnásobne vyššiu rezistenciu voči amfotericínu B, flucytozínu, flukonazolu a itrakonazolu<sup>71</sup>. Zvýšenie odolnosti kandid vo forme biofilmu možno vysvetliť niekoľkými faktormi. Jedným z nich je zvýšená metabolická aktivita buniek vyskytujúca sa v ranom vývoji biofilmu, v čase vzniku adhezenčnej vrstvy<sup>65</sup>. Ďalším dôvodom vzniku rezistentnejších biofilmov je skutočnosť, že EPS pôsobí ako bariéra pre difúziu liečiv. Bunky kvasiniek v biofilme s obsahom EPS odolávajú amfotericínu B o 20 % viac v porovnaní s rovnakými bunkami po odstránení EPS. Dôležitú úlohu pri rezistencii kvasiniek zohráva  $\beta$ -1,3-glukán, ktorý sa v matrici biofilmu nachádza vo zvýšenom množstve. Extracelulárna  $\beta$ -1,3-glukánová matrica vycytáva amfotericín B, a tým zvyšuje antimykotickú odolnosť bunky. Neprítomnosť  $\beta$ -1,3-glukánu v matrici zvyšuje citlivosť *C. albicans* na flukonazol a amfotericín<sup>72,73</sup>. Zmeny v génej expresii počas tvorby biofilmu *C. albicans* zahŕňajú zvýšenú aktivitu génov *CDR* a *MDR* kódujúcich rezistenciu na azoly. Táto regulácia sa javí ako dôležitá pre rozvoj antifungálnej rezistencie v počiatočnej fáze tvorby biofilmu, zatiaľ čo v procese dozrievania biofilmu sa javia ako podstatnejšie zmeny v zložení sterolov<sup>72,74</sup>. Prítomnosť perzistujúcich buniek v biofilme je ďalším dôvodom zníženej citlivosti voči antimykotikám. Perzistujúce bunky sú spiace, nedeiace sa bunky, ktoré majú vysokú toleranciu k antimikrobiálnym liekom. Predpokladá sa, že táto tolerancia je mož-

ná vďaka pokojovej dobe bunky, ktorá umožňuje väzbu antimikrobiálnych liečiv na špecifický cieľ a zároveň zneumožňuje liečivu inhibovať funkciu cieľovej molekuly<sup>75</sup>. Ramage a spol. zistili, že bunky *C. albicans* v biofilme vykazujú rezistenciu voči flukonazolu, zatiaľ čo rovnaké bunky pestované v planktonickej forme sú na flukonazol citlivé. Zistili, že bunky perzistujúce v biofilme vykazujú aj zvýšenú expresiu génov *CDR* (cit.<sup>74</sup>). Rozdiely medzi jednotlivými druhmi *Candida* spp. zvýrazňujú zložitost' procesov, ktoré sú základom tvorby biofilmu a ťažkosti s hľadaním jedinečného spôsobu eradikácie biofilmov jednotlivých druhov rodu *Candida*.

Farmakologické stratégie pri terapii mykotických infekcií nereagujúcich na liečbu zahŕňajú použitie nových foriem antimykotík, ako je napr.  $\beta$ -cyklodextrín itrakonazol, amfotericín B (lipidový komplex), amfotericín B (koloidná disperzia) alebo kombinácie viacerých antimykotík, napr. flukonazolu a flucytozínu, amfotericínu B a flukonazolu, kaspofungínu a flukonazolu<sup>42</sup>. Potenciálne alternatívna terapia zahŕňa použitie nových účinných látok získaných z rôznych všeobecných zdrojov, ako sú prírodné produkty, syntetické látky alebo polymérne materiály, u ktorých sa preukázalo, že sú aktívne *in vitro*. Rastliny sú zdrojom rôznych biologicky aktívnych molekúl, napr. silná antifungálna aktivita sa prejavila u zložiek éterických olejov<sup>75,76</sup>. Potvrdila sa antibiofilmová aktivita terpenov a mimoriadna účinnosť karvakrolu, geraniolu a tymolu pri liečbe kandidózy spojenjej so zdravotníckymi pomôckami<sup>77,78</sup>. Vynikajúcu aktivitu proti kvasinkám *C. albicans* vykazujú terpenoidy, ktoré môžu byť použité aj v synergii s antimykotikom, napr. flukonazolom<sup>79</sup>. Ďalšími zlúčeninami s antimykotickou aktivitou získanými z rastlín sú saponíny, alkaloidy, peptidy a proteíny<sup>80</sup>. Stále sa však jedná o alternatívnu liečbu, ktorá nespĺňa podmienky pre použitie pri terapii systémových kvasinkových ochorení.

## 5. Záver

V posledných desaťročiach sa výskyt systémových mykotických ochorení dramaticky zvýšil z viacerých dôvodov, a to napr. v dôsledku nadmerného používania antibiotík, nárastu počtu pacientov so zníženou imunitou alebo chronickými ochoreniami, onkologických pacientov po chemoterapiách atď. Najčastejším patogénom sú oportúnne kvasinky z rodu *Candida*, ktoré u zdravých ľudí vystupujú ako komenzálne organizmy, ale v prípade systémovej kandidózy sú príčinou vysokej miery úmrtnosti. Dlhodobé používanie antimykotík pri liečbe infekcií spôsobených kvasinkami *Candida* spp. viedlo k vzniku rezistencie, ktorá spolu s tvorbou biofilmu vážne komplikuje terapiu týchto život ohrozujúcich mykóz.

### Zoznam skratiek

|     |  |
|-----|--|
| AUC | plocha pod krivkou                             |
| EPS | extracelulárne polymérne látky                 |
| ECM | extracelulárna matrica                         |
| ABC | ATP-Binding Cassette (ABC transportný proteín) |



MFS Major Facilitator Superfamily  
MDR Multi-Drug-Resistance (rezistencia na viac liečiv)

## LITERATÚRA

- Nami S., Aghebati-Maleki A., Morovati H., Aghebati-Maleki L.: *Biomed. Pharmacother.* 110, 857 (2019).
- MacCallum D. M.: *Int. J. Microbiol.* 2012, 363764.
- Marak M. B., Dhanashree B.: *Int. J. Microbiol.* 2018, 7495218.
- Mikulska M., del Bono V., Ratto S., Viscoli C.: *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 755 (2012).
- Sydnor E. R. M., Perl T. M.: *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 141 (2011).
- Zaoutis T. E., Argon J., Chu J., Berlin J. A., Walsh T. J., Feudtner C.: *Clin. Infect. Dis.* 41, 1232 (2005).
- Pfaller M. A., Diekema D. J.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 4419 (2004).
- Kontoyiannis D. P., Mantidakis E., Samonis G.: *J. Hosp. Infect.* 53, 243 (2003).
- Chowdhary A., Becker K., Fegeler W., Gugnani H. C., Kapoor L., Randhawa V. S., Mehta G.: *Mycoses* 46, 269 (2003).
- Fotadar R., Banerjee U., Chaudhary A. R.: *J. Mycol. Med.* 110, 100 (2000).
- Viscoli C. a 11 spoluautorov: *Clin. Infect. Dis.* 28, 1071 (1999).
- Bamba Y., Moro H., Aoki N., Koizumi K., Ohshima Y., Watanabe S., Sakagami T., Koya T., Takada T., Kikuchi T.: *PLoS One* 13, e0206089 (2018).
- Brown G. D., Denning D. W., Gow N. A., Levitz S. M., Netea M. G., White T. C.: *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13 (2012).
- Cheng M. F. a 10 spoluautorov: *BMC Infect. Dis.* 5, 22 (2005).
- Kašparová P., Mařátková O., Čejková A.: *Chem. Listy* 113, 415 (2019).
- Walsh T. J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E.: *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 48 (2004).
- Chandra J., Mukherjee P.: *Microbiol. Spectr.* 3, 157 (2015).
- Silva S., Rodrigues C. F., Araújo D., Rodrigues M. E., Henriques M.: *J. Fungi (Basel)* 3, 8 (2017).
- Lagunes L., Rello J.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1221 (2016).
- Pilišiová R., Paulovičová E.: *Chem. Listy* 108, 457 (2014).
- d'Enfert C. a 31 spoluautorov: *FEMS Microbiol. Rev.* 45, fuaa060 (2021).
- Bellmann R., Smuszkiewicz P.: *Infection* 45, 737 (2017).
- Sádaba B., García-Quetglas E., Azanza J. R.: *Rev. Esp. Quimioter.* 17, 71 (2004).
- Azanza J. R., García-Quetglas E., Sádaba B.: *Rev. Iberoam. Micol.* 24, 223 (2007).
- Dhingra S., Cramer R. A.: *Front. Microbiol.* 8, 92 (2017).
- Espinel-Ingroff A. a 18 spoluautorov: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2006 (2014).
- Koselny K., Mutlu N., Minard A. Y., Kumar A., Krysan D. J., Wellington M.: *mBio* 9, e01204 (2018).
- Man S. M., Karki R., Kanneganti T. D.: *Immunol. Rev.* 277, 61 (2017).
- Wellington M., Koselny K., Sutterwala F. S., Krysan D. J.: *Eukaryot. Cell* 13, 329 (2014).
- Bhattacharya S., Esquivel B. D., White T. C.: *mBio* 9, e01291 (2018).
- Pfaller M. A., Messer S. A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R. J., Diekema D. J.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 70 (2007).
- Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M. J., Monzon A., Rodriguez-Tudela J. L.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 917 (2006).
- Safdar A., van Rhee F., Henslee-Downey J. P., Singhal S., Mehta J.: *Bone Marrow Transplant.* 28, 873 (2001).
- Vazquez J. A., Peng G., Sobel J. O., Steele-Moore L., Schuman P., Holloway W., Neaton J. D.: *Clin. Infect. Dis.* 33, 1069 (2001).
- Kim Y. K., Lee J., Oh J., Rhee S. J., Shin S. H., Yoon S. H., Lee S., Kim H. S., Yu K. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01960-18 (2019).
- De Beule K., Van Gestel J.: *Drugs* 61, 27 (2001).
- Chen L., Krekels E. H. J., Verweij P. E., Buil J. B., Knibbe C. A. J., Brüggemann R. J. M.: *Drugs* 80, 671 (2020).
- Andes D., Marchillo K., Conklin R., Krishna G., Ezzet F., Cacciapuoti A., Loebenberg D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 137 (2004).
- Andes D., Marchillo K., Stamstad T., Conklin R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3165 (2003).
- Sienkiewicz B. M., Łapiński Ł., Wiela-Hojeńska A.: *Contemp. Oncol. (Pozn.)* 20, 365 (2016).
- Jin H., Wang T., Falcione B. A., Olsen K. M., Chen K., Tang H., Hui J., Zhai S.: *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1772 (2016).
- Spampinato C., Leonardi D.: *Biomed. Res. Int.* 2013, 204237.
- de Waard M. A., Andrade A. C., Hayashi K., Schoonbeek H. J., Stergiopoulos I., Zwiars L. H.: *Pest Manage. Sci.* 62, 195 (2006).
- Piddock L. J.: *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382 (2006).
- Sanglard D.: *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 20, 462 (2002).
- Morio F., Pagniez F., Besse M., Gay-Andrieu F., Miegville M., Le Pape P.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 410 (2013).
- Morschhäuser J.: *Fungal Genet. Biol.* 47, 94 (2010).
- Mishra P. K., Baum M., Carbon J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11965 (2011).
- Silver P. M., Oliver B. G., White T. C.: *Eukaryot. Cell* 3, 1391 (2004).
- Whaley S. G., Caudle K. E., Vermitsky J. P., Chadwick S. G., Toner G., Barker K. S., Gygas S. E., Rogers P. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4543 (2014).

51. Hirayama T. a 10 spoluautorov: *Pathogens* 10, e23 (2020).
  52. Rybak J. M. a 16 spoluautorov: *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00651 (2017).
  53. Anderson J. B.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 547 (2005).
  54. Khosravi Rad K., Falahati M., Roudbary M., Farahyar S., Nami S.: *Curr. Med. Mycol.* 2, 24 (2016).
  55. Hameed S., Fatima Z.: *Int. J. Microbiol.* 2013, 240209.
  56. Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2300 (1996).
  57. Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J.: *Microbiology (Reading)* 143, 405 (1997).
  58. Gauthier C., Weber S., Alarco A. M., Alqawi O., Daoud R., Georges E., Raymond M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1543 (2003).
  59. Schuetzer-Muehlbauer M., Willinger B., Egner R., Ecker G., Kuchler K.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 291 (2003).
  60. Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., Falconi Di Francesco L., Caselli F., Giannini D., Giacometti A., Gavaudan S., Scalise G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1578 (2000).
  61. Torelli R., Posteraro B., Ferrari S., La Sorda M., Fadda G., Sanglard D., Sanguinetti M.: *Mol. Microbiol.* 68, 186 (2008).
  62. Prasad R., Nair R., Banerjee A.: *Fungal Genet. Biol.* 132, 103252 (2019).
  63. Prasad R., Banerjee A., Khandelwal N. K., Dhamgaye S.: *Eukaryot. Cell* 14, 1154 (2015).
  64. Douglas L. J.: *Rev. Iberoam. Micol.* 19, 139 (2002).
  65. Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A.: *J. Bacteriol.* 183, 5385 (2001).
  66. Cavalheiro M., Teixeira M. C.: *Front. Med. (Lausanne)* 5, 28 (2018).
  67. Mitchell K. F., Zarnowski R., Andes D. R.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 931, 21 (2016).
  68. Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azeredo J.: *Med. Mycol.* 47, 681 (2009).
  69. Bizerra F. C., Nakamura C. V., de Poersch C., Estivalet Svidzinski T. I., Borsato Quesada R. M., Goldenberg S., Krieger M. A., Yamada-Ogatta S. F.: *FEMS Yeast Res.* 8, 442 (2008).
  70. Lattif A. A., Mukherjee P. K., Chandra J., Swindell K., Lockhart S. R., Diekema D. J., Pfaller M. A., Ghannoum M. A.: *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 265 (2010).
  71. Hawser S. P., Douglas L. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2128 (1995).
  72. Seneviratne C. J., Jin L., Samaranyake L. P.: *Oral Dis.* 14, 582 (2008).
  73. Nett J., Lincoln L., Marchillo K., Massey R., Holoyda K., Hoff B., VanHandel M., Andes D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 510 (2007).
  74. Ramage G., Bachmann S., Patterson T. F., Wickes B. L., López-Ribot J. L.: *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 973 (2002).
  75. Lewis K.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48 (2007).
  76. Le N. T. a 13 spoluautorov: *Antibiotics (Basel)* 9, 207 (2020).
  77. Dalleau S., Cateau E., Bergès T., Berjeaud J.-M., Imbert C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 572 (2008).
  78. Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N. A., Echard B. W., Bagchi D., Preuss H. G.: *Mol. Cell. Biochem.* 228, 111 (2001).
  79. Zore G. B., Thakre A. D., Jadhav S., Karuppayil S. M.: *Phytomedicine* 18, 1181 (2011).
  80. Soliman S. S. M., Semreen M. H., El-Keblawy A. A., Abdullah A., Uppuluri P., Ibrahim A. S.: *BMC Complement Altern. Med.* 17, 257 (2017).
- Z. Malinovská, E. Čonková, P. Váczi, and M. Proškovcová** (*Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Košice, Slovakia*): **Azole Resistance in *Candida* Yeasts**
- Systemic fungal diseases and antifungal resistance represent a serious problem in human medicine and contribute to increased patient mortality. The most common causes of these diseases are opportunistic yeasts of the genus *Candida*. *C. albicans* is considered to be the main pathogen, together with *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*. Azole antifungals predominate in the treatment of the systemic mycoses. For antifungal resistance in *Candida* spp. some genes and their mutations are responsible, the genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* being considered the most important. The main target of azole antifungals is the process of ergosterol synthesis. Due to ergosterol crucial functions and its unique structural properties, the synthesis of ergosterol and its individual steps represent the target of most clinically available antifungals. The biofilm appears to be a significant virulence factor of the yeast *Candida* spp. It allows hematogenous dissemination of cells, prevents the effect of antifungals on all cells during treatment and leads to a high level of antimicrobial resistance. The antifungal resistance in candidiasis often has a multifactorial origin, which must be considered in the treatment of systemic mycoses and in the development of new antifungals.
- Keywords:** *Candida*, antifungal susceptibility, resistance, biofilm, gene
- Malinovská Z., Čonková E., Váczi P., Proškovcová M.: *Chem. Listy* 116, 494–500 (2022).
  - <https://doi.org/10.54779/ch120220494>
- Acknowledgements*  
This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-15-0377.

# CHEMICKÉ ASPEKTY BEZPEČNOSTI HLUBINNÉHO ÚLOŽIŠTĚ

ANTONÍN VOKÁL

*Správa úložišť radioaktivních odpadů, Dlážděná 6, 110 00  
Praha 1  
vokal@surao.cz*

Došlo 13.4.22, přijato 15.6.22.

Klíčová slova: hlubinné úložiště, radioaktivní odpad, vyhořelé jaderné palivo, inženýrské bariéry, chemické aspekty

• <https://doi.org/10.54779/chl20220501>

## Obsah

1. Úvod
2. Základní principy zajištění bezpečnosti hlubinného úložiště
3. Bezpečnostní a technický koncept hlubinného úložiště plánovaného v ČR
4. Chemické procesy ovlivňující degradaci inženýrských bariér
5. Chemické procesy ovlivňující migraci a akumulaci radionuklidů
6. Závěr

## 1. Úvod

Hlubinné úložiště (HÚ) představuje podle názoru široké skupiny odborníků<sup>1</sup> přijatelné a bezpečné řešení zneškodnění vyhořelého jaderného paliva (VJP) a všech ostatních typů radioaktivního odpadu (RAO), které nesplňují podmínky přijatelnosti do pří povrchových úložišť. Současná koncepce nakládání s RAO a VJP v ČR<sup>2</sup> plánuje zahájení provozu HÚ až v roce 2065, ale je možné předpokládat, že vzhledem k plánované výstavbě nových jaderných zdrojů a možnému zařazení jaderné energetiky do takzvané taxonomie<sup>3</sup> (systému podpory ekologických investic), která požaduje vybudování HÚ do roku 2050, bude třeba jeho přípravu výrazněji urychlit.

Vývoj HÚ vyžaduje komplexní přístup, který je založen na dlouhodobém výzkumu<sup>4</sup> a porozumění procesům probíhajících v HÚ<sup>5</sup> (obr. 1). Především je třeba prokázat, že nebude ohroženo zdraví člověka ani životní prostředí jak v době provozu úložiště, tak po dobu statisíců let po jeho uzavření, tj. do doby, než radioaktivita odpadu klesne

v důsledku přeměny radionuklidů na úroveň, která nemůže ohrozit ani člověka ani životní prostředí.

Tento článek se věnuje zejména chemickým procesům ovlivňujícím bezpečnost úložiště, tj. procesům vedoucím ke změně vlastností bariér hlubinného úložiště po uzavření úložiště a procesům ovlivňujícím migraci radionuklidů z úložiště. V prvních částech však budou stručně popsány základní principy zajištění bezpečnosti HÚ a uvažované technické koncepty HÚ plánovaného v ČR.

## 2. Základní principy zajištění bezpečnosti hlubinného úložiště

Bezpečnostní filozofií projektu jaderných zařízení, kterým je i HÚ, je prevence nehod a havárií a zmírnění jejich následků, které by mohly vést k potenciálním únikům radioaktivních látek, a to uplatněním koncepce ochrany do hloubky u všech bezpečnostně významných činností ve všech fázích životního cyklu HÚ<sup>6,9</sup>.

HÚ od zahájení provozu do doby poklesu aktivity odpadu na zanedbatelnou úroveň musí<sup>6</sup>:

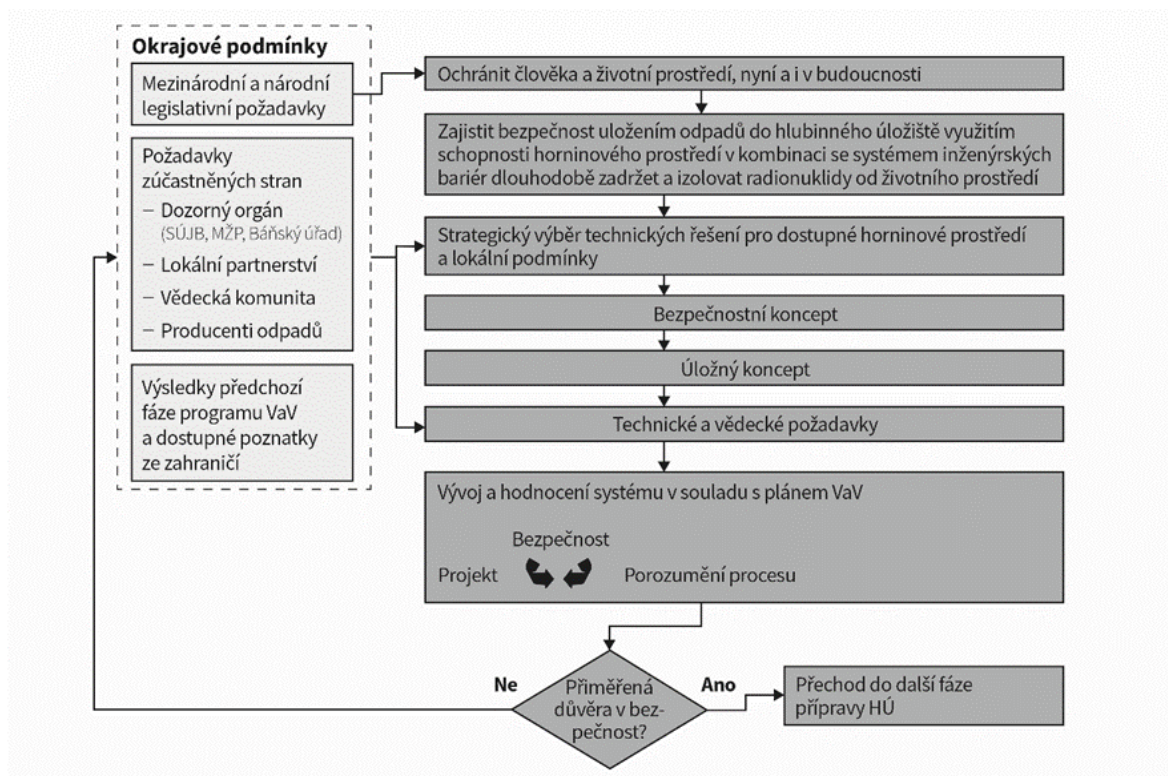
- a) fyzikálně znemožnit vznik kritického a nadkritického stavu,
- b) zajišťovat odvod vytvářeného tepla a
- c) zajistit stínění a zabránit úniku radioaktivní látky a šíření ionizujícího záření do životního prostředí.

Tyto základní bezpečnostní funkce HÚ jsou dále rozvedeny do formy požadavků ve vyhláškách č. 378/2016 Sb. (cit.<sup>7</sup>), č. 377/2016 Sb. (cit.<sup>8</sup>) a č. 329/2017 Sb. (cit.<sup>9</sup>).

Znemožnění vzniku kritického či nadkritického stavu, zajištění odvodu vytvářeného tepla či zajištění stínění při provozu HÚ je možno dosáhnout pomocí opatření běžně prováděných při provozu jaderných elektráren či skladů VJP. Zabránění úniku radioaktivních látek a šíření ionizujícího záření po dobu statisíců let, tj. do doby, než nebezpečnost radioaktivního odpadu klesne na zanedbatelnou úroveň, vyžaduje specifický přístup vyžadující dlouhodobý výzkum. Je třeba počítat i s tím, že po uzavření HÚ dojde k možné ztrátě povědomí o existenci HÚ. Bezpečnost HÚ je třeba zajistit bariérami, které, na rozdíl od bariér využívaných při provozu jaderných elektráren, není možno při jejich poškození opravit či nahradit a není možno ani dlouhodobě monitorovat změnu jejich vlastností.

Obecně přijímaný bezpečnostní koncept pro zabránění úniku radioaktivních látek z HÚ po jejich uzavření je formulován ve specifických požadavcích IAEA (cit.<sup>10</sup>) ve formě následujících bezpečnostních funkcí:

- a) zadržet radionuklidy uvnitř obalového souboru či ve stabilní formě odpadu,
- b) izolovat odpad od dostupné biosféry, procesů a událostí probíhajících na povrchu a podstatně snížit pravděpodobnost a všechny možné důsledky nežádoucího

Obr. 1. Přístup k vývoji HÚ<sup>5</sup>

- vníknutí člověka k radioaktivnímu odpadu (což je splněno především umístěním HÚ do hloubky několik set metrů pod povrchem země),
- inhibovat a omezovat migraci radionuklidů z odpadu do horninového prostředí a přístupné biosféry,
  - zajistit, aby množství radionuklidů, které se dostanou do životního prostředí bylo vždy přijatelné malé.
- Z těchto specifických požadavků IAEA (cit.<sup>10</sup>) vychází i bezpečnostní a technický koncept HÚ plánovaného v ČR.

### 3. Bezpečnostní a technický koncept hlubinného úložiště plánovaného v ČR

Výběr vhodného bezpečnostního a technického konceptu HÚ je závislý na typu a množství odpadu, které je třeba uložit, a především na horninovém prostředí, které je dostupné v dané zemi. Po velmi dlouhém procesu výběru vhodných lokalit pro vybudování HÚ v ČR, probíhajícím s malými přestávkami již od 90. let 20. století, v roce 2020 schválila vláda České republiky čtyři potenciální lokality pro umístění hlubinného úložiště: Březový potok, Horka, Hrádek a Janoch. Všechny lokality jsou v prostředí krystalinických hornin, které jako jediné jsou dostupné v dostatečných rozměrech v ČR. Výběr těchto lokalit byl

proveden na základě multikriteriální analýzy zvažující vliv HÚ na bezpečnost, životní prostředí a proveditelnost HÚ v kandidátních lokalitách. Podrobnosti o hodnocení lokalit je možné najít na webu SÚRAO (cit.<sup>11</sup>).

Nevýhodou krystalinických hornin, na rozdíl od prakticky nepropustných jílových hornin, kde je plánováno vybudovat úložiště například ve Švýcarsku<sup>12</sup> či Francii<sup>13</sup>, je přítomnost puklin a zlomů, které mohou představovat preferenční cesty pro vniknutí vody do HÚ a migraci radionuklidů z úložiště. Na rozdíl od jílových struktur jde však o velmi pevné horniny umožňující snadnější výstavbu úložiště.

SÚRAO se při návrhu vlastního bezpečnostního a technického konceptu HÚ inspirovalo řešením navrženým ve Švédsku<sup>16</sup> již v roce 1983 (tzv. koncept KBS 3), které později převzalo i Finsko, kde je HÚ rovněž plánováno umístit do prostředí krystalinických hornin.

Je pravděpodobné, že právě ve Finsku bude v provozu první HÚ pro uložení VJP ve světě<sup>14</sup>. Finská společnost POSIVA zodpovědná za přípravu HÚ podala již v prosinci roku 2021 žádost a povolení provozu úložiště. Obdobná švédská společnost SKB (cit.<sup>15</sup>) v tomto roce obdržela povolení k výstavbě úložiště.

HÚ plánované v ČR je určeno jednak pro VJP z českých jaderných elektráren a jednak pro ostatní RAO nepřijatelné do stávajícího povrchového úložiště

v Dukovanech a podzemního úložiště Richard blízko Lito-měřic. HÚ tedy představuje dvě úložiště, jejichž bezpečnostní a technické koncepty jsou odlišné. Stejná pro obě úložiště však bude jedna lokalita v prostředí krystalinických hornin.

#### Hlubinné úložiště VJP

Bezpečnostní a technický koncept KBS 3, ze kterého vychází i český koncept, je možno popsat následovně:

1) Radioaktivní látky jsou prakticky po celou dobu jejich nebezpečnosti zadrženy v korozivzdorném ukládacím obalovém souboru (UOS) s přebalem z mědi, která velmi pomalu koroduje v redukčním prostředí krystalinických hornin v hloubce několika set metrů pod povrchem země. Mechanická pevnost UOS je zajištěna vnitřní vestavbou z litiny. Za normálních podmínek úložiště se nepředpokládá poškození ani jednoho obalového souboru s VJP po dobu až 1 miliónu let, která se uvažuje ve většině bezpečnostních rozborů HÚ<sup>17</sup>.

2) UOS jsou obklopeny v ukládacích vrtech (vertikální uspořádání KBS 3V) či ukládacích tunelech (horizontální uspořádání KBS 3H) zhutněných sodným bentonitem typu Wyoming, který brání advektivnímu toku vody k UOS, rychlé migraci korozi-aktivních látek z podzemní vody (sulfidů, chloridů) k povrchu UOS a proliferaci bakterií vyvolávajících mikrobiální korozi. Tyto vlastnosti bentonitu jsou výsledkem jeho schopnosti přijímat vodu (bobtnat), což se v uzavřeném prostoru projevuje vysokým bobtnacím tlakem, který nedovoluje advektivní transport vody a korozi-aktivních látek k UOS a proliferaci bakterií. Po poškození UOS zhutněný bentonit zpomaluje migraci radionuklidů od UOS dále do horninového prostředí.

3) Ukládací vrty či ukládací tunely jsou vyhloubeny v prostředí s malým množstvím puklin a zlomů a velmi pomalým tokem vody tak, aby horninové prostředí přispívalo k ochraně vlastností jak UOS, tak i zhutněného bentonitu. Především však horninové prostředí v hloubce několik set metrů pod povrchem země zajišťuje bezkyslíkaté, redukční prostředí, které zabraňuje rychlé korozi materiálů UOS. Po poškození UOS horninové prostředí brání migraci radionuklidů tak, že množství radionuklidů, které se dostane do životního prostředí bude zanedbatelně malé.

Tento bezpečnostní a technický koncept zajišťuje za normálních podmínek zadržení radioaktivních látek v UOS po celou dobu jejich nebezpečnosti, tj. prakticky po celou dobu 1 miliónu let uvažovanou v bezpečnostních rozbo-rech. Při hodnocení bezpečnosti se však uvažují i méně pravděpodobné scénáře, které by mohly vést za určitých nepříznivých podmínek k předčasnému poškození UOS a k předčasnému úniku radioaktivních látek do horninového a dále životního prostředí. Jde zpravidla o scénáře vyvolané klimatickými změnami, které nelze ve vzdálené budoucnosti s jistotou předpovídat. Ve švédských<sup>18</sup> či finských<sup>19</sup> bezpečnostních rozbo-rech se například počítá s tím, že po skončení první doby ledové může dojít v důsledku změny složení podzemní vody k erozi bentonitu, který brání korozi měděného obalového souboru, či k

poškození UOS vlivem zemětřesení, jehož velikost je obtížné v tak vzdálené době predikovat. Pravděpodobnost těchto událostí je malá, ale v horizontu statisíců let je třeba s ní počítat. Samozřejmě je třeba počítat, i přes přísný systém zajišťování jakosti, s možnými skrytými defekty inženýrských bariér vzniklými při jejich výrobě či manipulacích.

Český bezpečnostní a technický koncept HÚ je velmi podobný švédskému konceptu KBS 3. Z důvodu větších zkušeností s výrobou ocelových obalových souborů v ČR a naopak malých zkušeností s výrobou měděných obalových souborů pro VJP, byl však v prvním referenčním konceptu HÚ<sup>20</sup> měděný UOS nahrazen dvouvrstvým UOS s vnitřním tenkostěnným pouzdrzem (5 mm) z korozivzdorné oceli a vnějším přebalem z uhlíkové oceli (60 mm). V průběhu následujících projektů<sup>21,22</sup> však bylo zjištěno, že navržená koncepce UOS s vnitřním tenkostěnným pouzdrzem z korozivzdorné oceli nemůže splnit bezpečnostní požadavky, zejména z důvodu nízké mechanické pevnosti tenkostěnného pouzdra. Proto byl tento koncept UOS nahrazen konceptem UOS s vnitřním pouzdrzem z korozivzdorné oceli, jehož tloušťka (36 mm) zaručuje i po korozi vnějšího obalu z uhlíkové oceli (60 mm) mechanickou odolnost UOS (cit.<sup>21</sup>).

Sodný bentonit typu Wyoming navrhovaný ve Švédsku a Finsku byl z ekonomických důvodů nahrazen vápenato-hořečnatým bentonitem z českých ložisek<sup>20</sup>.

Předběžné bezpečnostní analýzy<sup>21,22</sup> ukázaly, že koncept s ocelovým UOS a českým typem bentonitu může splnit bezpečnostní požadavky. Přesto existuje ještě řada pochybností, které bude třeba vyvrátit komplexním programem výzkumu a vývoje<sup>4</sup>. SÚRAO proto zatím definitivně nerozhodlo o využití navrženého dvouvrstvého, ocelového UOS. V případě, že nebude dostatečně prokázáno, že ocelové UOS splní všechny bezpečnostní funkce, SÚRAO počítá s možností využití UOS s měděným přebalem navrženým ve Švédsku a Finsku.

#### Hlubinné úložiště ostatních RAO

HÚ ostatního RAO je určeno pro velmi různorodý středně a vysokoaktivní odpad. Největší část odpadu bude pocházet z vyřazování jaderných elektráren z provozu. Jde především o aktivované konstrukční a korozivzdorné oceli z primární části aktivní zóny a serpentinitový beton sloužící jako biologické stínění. Další odpad pochází z využití ionizujícího záření v průmyslu, zemědělství, zdravotnictví a výzkumu. Jde například o použité zářiče, odpady z produkce radioizotopů a odpad pocházející zejména z výzkumu probíhajícího v ÚJV Řež v 60. a 70. letech minulého století. Bezpečnostní a technický koncept zajištění bezpečnosti tohoto úložiště spočívá ve výběru vhodné úpravy radioaktivního odpadu a výběru vhodného výplňového materiálu ukládacích komor.

Při hodnocení bezpečnosti tohoto HÚ musí být navržené technické řešení pro každý typ odpadu posuzováno zvlášť. Například pro aktivované ocelové materiály větší- nou stačí jako hlavní bezpečnostní bariéra betonová výplň, která vysokým pH příznivě ovlivňuje pomalou korozi oceli

a tím i pomalé uvolňování radionuklidů z aktivovaných kovů. Naopak tato betonová výplň není vhodná pro aktivovaný hliníkový odpad, který se v anaerobním, alkalickém prostředí poměrně rychle rozkládá za vzniku vodíku<sup>23</sup>. Velkou pozornost je třeba věnovat úpravě organického odpadu<sup>24</sup>, který může degradovat za vzniku plynů a koloidů, které mohou usnadnit rychlou migraci radionuklidů do životního prostředí.

#### 4. Chemické procesy ovlivňující degradaci inženýrských bariér

Vzhledem k velmi dlouhé době, kterou je třeba uvažovat při hodnocení funkčnosti bariér úložiště, je třeba vycházet z prediktivních modelů, které zahrnou všechny důležité externí a interní procesy ovlivňující vlastnosti bariér HÚ v čase a prostoru. Je zřejmé, že není možné řešit zvláště chemické procesy bez zahrnutí tepelných, hydraulických či mechanických procesů. V této části se však zaměříme pouze na popis základních chemických procesů vedoucích ke změně vlastností nejdůležitějších bariér HÚ, tj. UOS pro VJP, zhuštěného bentonitu a betonu využívaného pro solidifikaci RAO, výplně ukládacích komor HÚ RAO či jako konstrukční materiál při výstavbě HÚ.

##### Degradace UOS VJP

Základním procesem vedoucím k možnému poškození UOS s VJP, které nastává zpravidla vlivem hydrostatického tlaku a bobtnacího tlaku bentonitu, je koroze. Rychlost koroze UOS určuje životnost UOS a možnost uvolnění radioaktivních látek do horninového prostředí. Z hlediska koroze UOS se stávající český koncept s dvouvrstevným ocelovým UOS a švédský koncept KBS 3 s měděným UOS výrazně odlišují. Zatímco měď patří ke kovům, které jsou za bezkyslíkatých, redukčních podmínek v čisté vodě termodynamicky stabilní, první vrstva českého konceptu UOS tvořená uhlíkovou ocelí, což je v podstatě železo s menším množstvím uhlíku, reaguje poměrně snadno s čistou vodou i v redukčním prostředí<sup>25</sup>. To neplatí pro druhou vrstvu UOS tvořenou korozivzdornou ocelí, která vytváří tenkou vrstvu termodynamicky stabilního oxidu chromu na povrchu kovu. Předpokládá se, že rychlost koroze korozivzdorné oceli v podmínkách úložiště bude řízena chemickým rozpouštěním pasivní vrstvy na bázi oxidu chromu<sup>21</sup>.

Za určitých podmínek i uhlíková ocel může tvořit ochrannou vrstvu na povrchu oceli. Její ochranné vlastnosti závisí na pH, Eh a složení vody, která bude v kontaktu s kovem a na rychlosti transportu vody k UOS a transportu vzniklých železnatých iontů od povrchu kovu<sup>26,21</sup>. Při reakci železa s vodou nejpravděpodobněji vzniká magnetit, ale může vznikat i mnoho jiných sloučenin v závislosti na koncentraci aniontů přítomných v obklopujícím bentonitu a podzemní vodě ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HS}^-$ ), které mají různé ochranné vlastnosti bránící rychlé korozi uhlíkové oceli.

Predikce životnosti ocelového UOS je možná pouze

pomocí prediktivních modelů, které na základě znalosti pH, Eh a složení podzemní vody v kontaktu s UOS mohou predikovat průběh poklesu rychlosti koroze uhlíkové oceli v důsledku tvorby korozních produktů a rychlost rozpouštění pasivní vrstvy oxidu chromu na povrchu korozivzdorné oceli.

##### Degradace bentonitu

Jak bylo uvedeno výše, hlavní bezpečnostní funkcí bentonitu je chránit UOS před negativními vlivy, které mohou ohrozit UOS. Jde především o udržení hodnot bobtnacího tlaku bentonitu v potřebném rozmezí tak, aby se výrazně zpomalila migrace korozi-aktivních látek k UOS a zabránilo se proliferaci bakterií, způsobujících mikrobiální korozi.

Tento materiál však rovněž může měnit svoje vlastnosti a degradovat. Změna vlastností bentonitu může být ovlivněna například následujícími procesy<sup>27</sup>:

- 1) precipitací železnatých iontů vznikajících při korozi uhlíkové oceli v bentonitu,
- 2) rozpouštěním montmorillonitu, tvořícího základní minerál bentonitu, který způsobuje bobtnání bentonitu,
- 3) illitizací bentonitu v důsledku vysoké koncentrace draslíku v podzemní vodě, který nebobtná jako montmorillonit,
- 4) erozí bentonitu za tvorby jílových koloidů na rozhraní podzemní voda/bentonit v důsledku nízké iontové síly podzemní vody v kombinaci s nepříznivým chemickým složením podzemní vody,
- 5) vznikem preferenčních cest v důsledku vodíku vznikajícího při anaerobní korozi kovů.

Cílem výzkumných prací je porozumět všem těmto procesům a zjistit, zda bentonit bude plnit svoje bezpečnostní funkce do doby poklesu koncentrace radionuklidů na zanedbatelnou úroveň.

##### Degradace betonu

Beton se v HÚ využívá jednak jako konstrukční materiál, jednak jako solidifikační matrice odpadů či jako výplň ukládacích komor úložiště ostatního RAO. Beton jako konstrukční materiál se posuzuje zpravidla z hlediska jeho vlivu na bezpečnostní funkce UOS či bentonitu, nemá však primární bariérovou funkci v úložišti z hlediska zpomalení úniku radionuklidů. Významnou bariérovou funkci má beton v HÚ ostatních RAO, a to ve formě solidifikační matrice odpadu a výplně ukládacích komor. Kromě snížení propustnosti HÚ a zvýšení jeho stability se využívá jako chemická bariéra, která přispívá vysokým pH k nízké rychlosti koroze ocelového RAO a nízké mobilitě radionuklidů.

Beton postupně mění svoje vlastnosti v důsledku postupné hydratace, hydrolýzy a vyluhování rozpustných látek. Pro zajištění bariérové funkce betonů je třeba, aby při interakci podzemní vody nedocházelo rychlému vyluhování pojiva (v principu vyluhování portlanditu  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )<sup>28</sup>, což způsobuje jednak zvýšení propustnosti beto-

nu a zhoršení jeho mechanických vlastností, ale především postupné snižování pH, které, jak bylo uvedeno výše, přispívá ke snížení rychlosti koroze kovových odpadů. K rychlé degradaci cementových/betonových materiálů může dojít i při zvýšení koncentrace agresivního CO<sub>2</sub> v kombinaci s nízkým pH (tj. < 6,5). V případě zvýšené koncentrace síranů > 200 mg l<sup>-1</sup> dochází k interakci s pojivem, která způsobuje vznik ettringitu, přičemž dochází k expanzi, vznikají trhliny a beton se rozpadá.

## 5. Chemické procesy ovlivňující migraci a akumulaci radionuklidů

Při hodnocení bezpečnosti úložiště je třeba počítat s tím, že po poškození obalového souboru se radionuklidy uvolní z obalového souboru a formy odpadu prostřednictvím podzemní vody budou migrovat přes inženýrské bariéry do horninového a dále do životního prostředí, kde se mohou akumulovat a potravinovým řetězcem dostat až k člověku. Pomocí bezpečnostních rozborů je třeba prokázat, že množství radionuklidů, které se dostane do životního prostředí, bude vždy přijatelné malé, tj. bude splněno, že efektivní dávka, kterou může obdržet v kalendářním roce reprezentativní osoba z kritické skupiny obyvatel, bude s rezervou menší než 0,25 mSv (cit.<sup>6</sup>).

Většina radionuklidů obsažených ve VJP se přemění na stabilní prvky ještě v době před jejich uložením do HÚ či před uzavřením úložiště. Nebezpečné jsou proto pouze radionuklidy s dlouhým poločasem přeměny (tab. I).

Nebezpečnost jednotlivých radionuklidů souvisí nejenom s poločasem jejich přeměny či radiotoxicitou, ale i s jejich rychlostí uvolňování z forem odpadu, jejich rozpustností v podzemní vodě, schopností se sorbovat na ma-

teriály inženýrských bariér a horninu a schopností se akumulovat v životním prostředí.

### Uvolňování radionuklidů z forem odpadů

Po vniknutí vody do UOS se radionuklidy začnou uvolňovat z formy odpadů. Za uvolněním radionuklidů stojí především rozpouštění, degradace matrice odpadu nebo difuze radionuklidů z matrice odpadu. V případě HÚ VJP představuje formu odpadu vlastní VJP, které můžeme dělit na následující složky<sup>29</sup>:

1. matici paliva (z 96 % oxid uranický),
2. konstrukční materiály (hlavice, hexagonální trubky, pokrytí),
3. mezery mezi pokrytím a maticí paliva.

Nejmobilnější jsou tzv. okamžitě uvolnitelné radionuklidy (zejména <sup>129</sup>I, <sup>36</sup>Cl, <sup>135</sup>Cs, <sup>79</sup>Se), které se nahromadily při provozu reaktoru v mezerách mezi vlastní maticí paliva a povlakem paliva. Právě přítomnost těchto mobilních radionuklidů v mezeře mezi vlastní maticí paliva a povlakem odlišuje hodnocení bezpečnosti HÚ VJP a hodnocení bezpečnosti HÚ pro vitrifikované zbytky z přepracování VJP. Uvolňování radionuklidů z matrice VJP závisí zejména na rychlosti rozpouštění uranové matrice v podzemní vodě, které je v redukčním prostředí velmi pomalé. Uvolňování radionuklidů z konstrukčních materiálů VJP závisí na rychlosti koroze těchto materiálů.

### Rozpustnost radionuklidů v podzemní vodě

Mobilita radionuklidů po uvolnění z formy odpadu je významně omezena rozpustností prvků v podzemní vodě. Při výpočtu maximální koncentrace jednotlivých radionuklidů je proto třeba uvažovat radioaktivní i stabilní izo-

Tabulka I  
Nebezpečné radionuklidy s dlouhým poločasem přeměny

| Aktivační produkty | Aktinidy          |                   |                   |                   |                  |                     | Štěpné produkty   |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| <sup>3</sup> H     |                   |                   |                   |                   |                  |                     | <sup>79</sup> Se  |
| <sup>10</sup> Be   | <sup>229</sup> Th | <sup>230</sup> Th | <sup>232</sup> Th |                   |                  |                     | <sup>85</sup> Kr  |
| <sup>14</sup> C    | <sup>231</sup> Pa |                   |                   |                   |                  |                     | <sup>90</sup> Sr  |
| <sup>36</sup> Cl   | <sup>233</sup> U  | <sup>234</sup> U  | <sup>235</sup> U  | <sup>236</sup> U  | <sup>238</sup> U |                     | <sup>93</sup> Zr  |
| <sup>41</sup> Ca   | <sup>237</sup> Np |                   |                   |                   |                  |                     | <sup>99</sup> Tc  |
| <sup>59</sup> Ni   | <sup>238</sup> Pu | <sup>239</sup> Pu | <sup>240</sup> Pu | <sup>242</sup> Pu |                  |                     | <sup>107</sup> Pd |
| <sup>63</sup> Ni   | <sup>241</sup> Am | <sup>242</sup> Am | <sup>243</sup> Am |                   |                  |                     | <sup>126</sup> Sn |
| <sup>93</sup> Zr   | <sup>244</sup> Cm | <sup>245</sup> Cm | <sup>246</sup> Cm |                   |                  |                     | <sup>129</sup> I  |
| <sup>93</sup> Mo   |                   |                   |                   |                   |                  |                     | <sup>135</sup> Cs |
| <sup>94</sup> Nb   |                   |                   |                   |                   |                  |                     | <sup>137</sup> Cs |
| <sup>108m</sup> Ag |                   |                   |                   |                   |                  | <sup>226</sup> Ra * | <sup>151</sup> Sm |
| <sup>166m</sup> Ho |                   |                   |                   |                   |                  |                     |                   |

\* <sup>226</sup>Ra nepatří mezi aktinidy, vzniká jako dceřiný produkt při rozpadu aktinidů

Tabulka II  
Maximální koncentrace vybraných prvků v referenční podzemní vodě<sup>22</sup>

| Prvek | Maximální koncentrace [mol m <sup>-3</sup> ] | Prvek | Maximální koncentrace [mol m <sup>-3</sup> ] |
|-------|--|-------|--|
| Ag    | 7,2.10 <sup>-4</sup>                         | Np    | 5,9.10 <sup>-5</sup>                         |
| Am    | 9,4.10 <sup>-05</sup>                        | Pa    | 3,2.10 <sup>-4</sup>                         |
| Be    | 1.10 <sup>-7</sup>                           | Pd    | 4,2.10 <sup>-7</sup>                         |
| C     | neomezená                                    | Pu    | 1,38.10 <sup>-7</sup>                        |
| Ca    | neomezená                                    | Ra    | 1,2.10 <sup>-1</sup>                         |
| Cl    | neomezená                                    | Se    | 2,59.10 <sup>-6</sup>                        |
| Cm    | 9,01.10 <sup>-6</sup>                        | Sm    | 8,03.10 <sup>-4</sup>                        |
| Cs    | neomezená                                    | Sn    | 4,70.10 <sup>-6</sup>                        |
| Ho    | 7,12.10 <sup>-4</sup>                        | Sr    | 1,21.10 <sup>-1</sup>                        |
| I     | neomezená                                    | Tc    | 7,9.10 <sup>-6</sup>                         |
| Mo    | 1.10 <sup>-2</sup>                           | Th    | 1,22.10 <sup>-6</sup>                        |
| Nb    | 1,27.10 <sup>-5</sup>                        | U     | 1,29.10 <sup>-4</sup>                        |
| Ni    |  | Zr    | 2,51.10 <sup>-6</sup>                        |

topy. V tabulce II jsou uvedeny maximální koncentrace prvků v referenční podzemní vodě shrnuté pro předběžné výpočty bezpečnosti HÚ<sup>22</sup>. Zvýšením pH je možno snížit maximální koncentraci některých aktinidů, např. plutonia, až o několik řádů<sup>30</sup>. Důležité je zabránit migraci radionuklidů vázaných na koloidy<sup>31</sup>. Důležitou roli bentonitu v HÚ VJP je proto i filtrace koloidů, které neumožní uvolnění radionuklidů z VJP do horninového prostředí ve formě koloidů.

#### Retardační mechanismy – sorpce a difuze do matrice

Po uvolnění radionuklidů z UOS VJP mohou radionuklidy migrovat prostřednictvím vody difuzí či advekcí přes různé inženýrské komponenty úložiště do horninového prostředí a dál až do životního prostředí. Rychlost jejich migrace je výrazně ovlivněna retardačními mechanismy, jako je iontová výměna, povrchová komplexace či difuze do matrice horniny<sup>32</sup>.

#### Akumulace radionuklidů v životním prostředí

Za určitých scénářů se ve velmi vzdálené budoucnosti mohou radionuklidy dostat až do životního prostředí. Jde především o radionuklidy, které nejsou omezeny rozpustností a nesorbují se ani na inženýrských komponentech, ani na hornině. V případě HÚ VJP jde např. o radionuklidy, jako jsou <sup>129</sup>I či <sup>36</sup>Cl. V případě HÚ pro ostatní RAO jde například o <sup>14</sup>C a některé aktinidy, které mohou být vázány na koloidy. Při výpočtech efektivní dávky je třeba počítat s tím, že ve vzdálené budoucnosti se může výrazně proměnit i životní prostředí. Je proto třeba uvažovat i velmi konzervativní scénáře, které vůbec nemusí nastat. Jedním z těchto scénářů je například vytvoření zemědělské usedlosti v kontaminované oblasti a využívání kontaminované vody pro pití i zemědělské účely. Modelování predik-

ce akumulace radionuklidů z HÚ a expozice člověka musí zohlednit všechny představitelné možnosti přenosu radionuklidů na člověka a složky životního prostředí.

## 6. Závěr

Příprava HÚ představuje multidisciplinární projekt, v němž chemické aspekty hrají velmi významnou roli. Ihned po umístění UOS s VJP či UOS s ostatními RAO jsou nastartovány chemické procesy vedoucí k degradaci bariér HÚ. Po degradaci bariér jsou to chemické procesy, jako je srážení a rozpouštění, iontová výměna, povrchová komplexace či tvorba koloidů, které rozhodují o rychlosti migrace radionuklidů do životního prostředí. Pro prokázání bezpečnosti úložiště je třeba tyto procesy popsat tak, aby bylo možno predikovat životnost inženýrských bariér a rychlost migrace radionuklidů v horizontu statisíců let. Tato predikce je možná pouze na základě vědeckého přístupu vycházejícího z obecných zákonitostí, které nelze jednoduše vyvrátit. Není možné vycházet pouze z empirického poznání, které je možné získat, ve srovnání s dobou predikce, pomocí relativně krátkodobých laboratorních či *in-situ* experimentů.

Příprava HÚ představuje úkol, který se dotkne několika generací výzkumníků. Naštěstí však Česká republika není na tento úkol sama. Všechny země provozující jadernou energetiku se zabývají již desítky let podobnými problémy a velmi mnoho poznatků již bylo získáno. Úplné převzetí jejich výsledků však není jednoduše možné vzhledem k jedinečnosti horninového prostředí, které je pro každou zemi jiné. Přebírání zahraničních výsledků vyžaduje rovněž důkladnou znalost problematiky, kterou je obtížné získat bez vlastních výzkumných prací.



## Seznam zkratek

|       |   |
|-------|---|
| HÚ    | hlubinné úložiště                       |
| Eh    | oxidačně redukční potenciál.            |
| KBS 3 | zkratka pro švédský a finský koncept HÚ |
| IAEA  | International Atomic Energy Agency      |
| RAO   | radioaktivní odpad                      |
| SÚJB  | Státní úřad pro jadernou bezpečnost     |
| SÚRAO | Správa úložišťradioaktivních odpadů     |
| UOS   | ukládací obalový soubor                 |
| VJP   | vyhořelé jaderné palivo                 |

## LITERATURA

- Směrnice Rady 2011/70/EURATOM ze dne 19. července 2011, kterou se stanoví rámec Společenství pro odpovědné a bezpečné nakládání s vyhořelým palivem a radioaktivním odpadem, Úřední věstník L 199/48, 2. 8. 2011.
- Česko, MPO: *Koncepce nakládání s radioaktivními odpady a vyhořelým jaderným palivem v České republice schválená 26. srpna usnesením vlády České republiky č. 597/2019*. [https://www.mpo.cz/assets/cz/energetika/RAO/2019/12/Koncepce-nakladani-s-RaO-a-VJP-v-CR\\_2019.pdf](https://www.mpo.cz/assets/cz/energetika/RAO/2019/12/Koncepce-nakladani-s-RaO-a-VJP-v-CR_2019.pdf), staženo 10. června 2022.
- Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) 2020/852 o zřízení rámce pro usnadnění udržitelných investic a nařízení a Komise v přenesené pravomoci (EU) 2021/2139, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/852), Úřední věstník L442/1, 9. 12. 2021.
- Vokál A., Vondrovic L., Hausmannová L., Dohnálková M., Hanusová I., Augusta J., Konopáčová K., Urik J., Kováčik M., Vencel M., Popelová E., Lahodová Z., Míkláš O., Máčelová M., Sud J.: *Střednědobý plán výzkumu a vývoje SÚRAO pro období 2020-2030*. – MS SÚRAO, TZ 525/2020, Praha, <https://www.surao.cz/dokument-kategorie/koncepcnidokumenty/>, staženo 10. června 2022.
- IGD-TP: *Implementing Geological Disposal of Radioactive waste, 2011*, [https://igdtp.eu/wp-content/uploads/2017/09/SRA-Complete-web-version\\_July-14\\_2011.pdf](https://igdtp.eu/wp-content/uploads/2017/09/SRA-Complete-web-version_July-14_2011.pdf), staženo 10. června 2022.
- Zákon č. 263/2016 Sb. (SÚJB, 2016), *Atomový zákon*, Sbírka zákonů č. 263/2016, Částka 102, str. 3938.
- Vyhláška č. 378/2016 ze dne 7. listopadu *o umístění jaderného zařízení*, Sbírka zákonů č. 378/2016, Částka 151, str. 5989.
- Vyhláška č. 377/2016 ze dne 7. listopadu 2016 *o požadavcích na bezpečné nakládání s radioaktivním odpadem a o vyřazování z provozu jaderného zařízení nebo pracoviště III. nebo IV. kategorie*, Sbírka zákonů č. 377/2016, Částka 151, str. 5978.
- Vyhláška 329/2017 ze dne 26. září 2017 *o požadavcích na projekt jaderného zařízení*, Sbírka zákonů č. 329/2017, Částka 112.
- International Atomic Energy Agency, *Disposal of radioactive waste, specific safety requirements*, SSR-5, Vienna 2011.
- <https://www.surao.cz/zuzovani/> staženo 10. června 2022.
- <https://www.nagra.ch/en/deep-geological-repository>, staženo 10. června 2022.
- <https://international.andra.fr/solutions-long-lived-waste/cigeo>, staženo 10. června 2022.
- <https://www.posiva.fi/en/index/news/pressreleasesstockexchangereleases/2021/we-ave-a-resolution-for-final-disposal-of-spent-nuclear-fuel.html>, staženo 10. června 2022.
- <https://www.skb.com/future-projects/the-spent-fuel-repository/the-review-process/> staženo 10. června 2022.
- SKBF/KBS, *Final Storage of Spent Nuclear Fuel – KBS-3*, (1983).
- NEA, *Considering timescales in the post-closure safety of geological disposal of radioactive waste*, NEA No. 6424, OECD 2009.
- SKB, *Long-term safety for the final repository for spent nuclear fuel at Forsmark*, SKB Technical report TR-11-01, March 2011.
- Posiva, *Safety case for the disposal of spent nuclear fuel at Olkiluoto, Synthesis 2012*, Posiva report 2012-12, December 2012.
- Vavřina V. a spol.: *Referenční projekt povrchových i podzemních systémů HÚ v hostitelském prostředí granitových hornin v dohodnuté skladbě úvodního projektu a hloubce projektové studie*, C.1.1 Technická zpráva PS 01, Arch. č. EGPI 443U-6-990003, 11/1999.
- Forman L. a 13 spoluautorů: *Výzkum a vývoj ukládacího obalového souboru pro hlubinné ukládání vyhořelého jaderného paliva do stadia realizace vzorku*, Technická zpráva SÚRAO č. 544/2021.
- Vokál A., Havlová V., Hercík M., Landa J., Lukin D., Vejsada J.: *Studie zadávací bezpečnostní zprávy, část C2 Hodnocení dlouhodobé bezpečnosti*, Zpráva ÚJV Řež a.s., 2010.
- Moreno L., Skagius K., Södergren S., Wiborg M.: *Project Safe, Gas related processes in SFR*, SKB Report R-01-11, July 2001.
- IAEA, *Predisposal Management of Organic Radioactive Waste*, Technical Reports No. 427, IAEA, Vienna 2004.
- Marsh G. P., Taylor K. J., Sharland S. M., Tasker P. W.: *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 84, 227 (1987)*, <https://doi.org/10.1557/PROC-84-227>.
- Vokál A., Lukin D., Vopálka D.: *Sci. Basis Nucl. Waste Manage. 932, 111 (2005)*.
- Pusch R.: *Evolution of models for conversion of smectite to non-expandable minerals*, SKB Technical report 93-33, December 1993.
- Hoglund L.O.: *Project Safe, Modelling of long-term concrete degradation processes in the Swedish SFR repository*, SKB report R-01-08, April 2001.
- Johnsson L., Ferry C., Poinssot Ch., Lovera P.: *J. Nucl. Mater. 346, 56 (2005)*.
- Berner U.: *Project Opalinus Clay: Radionuclide Con-*

*centration Limits in the Cementitious Near-Field of an ILW Repository*. Paul Scherrer Institute Report PSI Bericht 02-26, Paul Scherrer Institute, Villingen, Switzerland 2002.

31. Missana T., Alonso U., Garcia-Gutiérrez M., Mingarro M.: *Appl. Geochem.* 23, 1484 (2008).
32. Havlová V., Zuna M., Brázda L., Kolomá K., Galeková E., Rosendorf T., Jankovský F.: *Migrační procesy radionuklidů v prostředí krystalinických hornin a migrační parametry hornin českého masivu*, Technická zpráva SÚRAO č. 333/2018, [https://www.surao.cz/wp-content/uploads/2022/01/TZ333\\_2018.pdf](https://www.surao.cz/wp-content/uploads/2022/01/TZ333_2018.pdf), staženo 10. června 2022.

**A. Vokál** (*Radioactive Waste Repository Authority, Prague*): **Chemical Aspects of the Deep Repository Safety**

This review summarises the basic principles of evaluating the safety of the deep geological repository and describes the considered safety and technical concept of the deep geological repository planned in the Czech Republic. This concept is compared with similar concepts planned abroad. The next part of the review focuses on the discussion of chemical processes affecting the safety of the deep geological repository, especially on the degradation of engineered barriers and chemical processes related to the migration of radionuclides into the environment.

Keywords: deep geological repository, spent nuclear fuel, radioactive waste, engineered barriers, chemical aspects

- Vokál A.: *Chem. Listy* 116, 501–508 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/ch120220501>

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

### ZMĚNY KONCENTRACE ESTERŮ KYSELINY FTALOVÉ V PLASTOVÝCH MATERIÁLECH VOZIDLA V PRŮBĚHU POUŽÍVÁNÍ

ALŽBETA JAROŠOVÁ<sup>a</sup>, ŠTEFAN ČORŇÁK<sup>b</sup>,  
MICHAL KUČERA<sup>c</sup> a MARCELA JANDLOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav technologie potravin, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup> Katedra bojových a speciálních vozidel, Univerzita obrany v Brně, Kounicova 65, 662 10 Brno, <sup>c</sup> Lilacosta, s.r.o., Nádražní 458/8, 671 72 Miroslav  
alzbeta.jarosova@mendelu.cz

Došlo 23.3.22, přijato 17.5.22.

Klíčová slova: dibutyl-ftalát (DBP), di-2-ethylhexyl-ftalát (DEHP), plastové materiály vozidel, změkčovadlo, řídicí vozidla

• <https://doi.org/10.54779/chl20220509>

#### Úvod

Soudobá vozidla jsou vyrobená z různých materiálů. Jde nejenom o kovové a kompozitní materiály, ale také o pryž, plasty, termoplasty apod.<sup>1</sup> Podíl oceli v konstrukčním materiálu se postupně zmenšuje a je postupně nahrazován lehkými materiály nového stylu, jako jsou hliníkové slitiny, makromolekulární materiály a další<sup>2</sup>.

Často žádaným druhem materiálů jsou plasty<sup>3</sup>. Tyto materiály trvale napomáhají nejenom lehké konstrukci vozidel, jejich aktivní a pasivní bezpečnosti, ale také optickému a hmatovému aspektu konstrukčních prvků. Pro zlepšení pružnosti se do plastických materiálů přidávají tzv. změkčovadla. Jedním ze změkčovadel plastických materiálů jsou ftaláty (estery kyseliny ftalové, PAE)<sup>4</sup>.

Mezi nepoužívanější plastifikátory patří di-2-ethylhexyl-ftalát (DEHP), který představuje až 50% podíl světové produkce ftalátů, a dibutylftalát (DBP)<sup>5–7</sup>. DEHP i DBP se vyznačují vysokou úrovní reprodukční toxicity a mohou mít škodlivé účinky na plodnost a mohou poškodit i plod<sup>8</sup>.

Ftalátová změkčovadla nejsou v materiálu pevně vázána kovalentní vazbou, proto se pomalu uvolňují do okolního prostředí těkáním, vyluhováním nebo migrací<sup>9</sup>. K úniku ftalátů do prostředí dochází jak při jejich výrobě, tak i při výrobě materiálů obsahujících ftaláty<sup>10</sup>. Orální požití, inhalace, intravenózní injekce a kožní absorpce jsou možnými cestami expozice<sup>11–13</sup>. Lidská populace je vysta-

vena působení ftalátů hlavně dermálním kontaktem, inhalací a perorálně<sup>14</sup>. Člověk může být vystaven účinkům ftalátů v důsledku přímého kontaktu nebo prostřednictvím média, do kterého byly ftaláty vyluhovány (jako např. do potravin), nebo například z lékařského vybavení<sup>15</sup>. Výskyt ftalátů byl zjištěn ve vzduchu<sup>16</sup>, půdě<sup>17,18</sup>, sedimentech ze skládek<sup>19</sup>, v povrchových vodách<sup>20,21</sup>, ale také v potravinovém řetězci<sup>22</sup>, kde hlavním zdrojem kontaminace potravin ftaláty byly obalové materiály, se kterými přichází potraviny do přímého kontaktu<sup>23</sup>.

V živém organismu dochází k odbourávání – degradaci ftalátů na metabolity, které se vylučují močí. Laboratorní experimenty prokázaly vyšší hladiny ftalátů v moči žen ve srovnání s muži. Předpokládá se souvislost s častějším používáním kosmetických přípravků u žen, jako jsou pleťové vody, dekorativní kosmetika, vlasové produkty apod.<sup>24</sup>. Ftaláty nebo jejich metabolity jsou distribuovány v biologických tekutinách a orgánech v lidském těle a byly zjištěny i v mateřském mléce v souvislosti s expozicí matek znečišťujícími látkami. Kojenci mohou být takto vystaveni kontaminaci ftalátů mateřským mlékem, z hraček a předmětů, které vkládají do úst<sup>25</sup>. Přítomnost ftalátů byla zjištěna i v nových provozních kapalinách vozidel, kde se koncentrace pohybovaly od 0,33 mg kg<sup>-1</sup> do 9,78 mg kg<sup>-1</sup> kapaliny<sup>26</sup>. Pozitivní nález ftalátů byl zaznamenán u vzorků potahů na volant, kde se koncentrace u nových potahů pohybovaly od 5,5 mg kg<sup>-1</sup> do 55,0 mg kg<sup>-1</sup> plastu<sup>27</sup>.

Cílem předkládané práce je zjistit obsah ftalátů v plastových materiálech vozidel a zjistit, jak se mění jejich obsah s dobou používání.

#### Materiál a metody

Z havarovaného vozidla vyrobeného v České republice, které bylo v provozu pouze jeden měsíc, byly získány vzorky plastů ( $n=9$ ) z různých částí automobilu. Výběr vzorků byl zvolen tak, aby postihoval veškeré plasty ve vnitřním prostoru vozidla (volant, přístrojová deska, sedačky, opěrky hlavy a ovládání klimatizace). Vzorky nebyly materiálově homogenní, byly vyrobeny z různých druhů materiálů (foukaná pěna, tvrdý plast, měkký plast, kůže) a každá část byla analyzovaná samostatně. Obsah DBP a DEHP byl zjišťován celkem v šestnácti dílčích vzorcích, každý vzorek byl analyzován třikrát. Každý měsíc, kdy byly provedeny tři analýzy, bylo provedeno celkem 48 analýz. První analýza byla provedena ihned po přípravě vzorků, druhá po tříměsíčním skladování, třetí po šestiměsíčním skladování, čtvrtá po devítiměsíčním skladování a pátá po patnáctiměsíčním skladování plastů. Po dobu celého experimentu byly zkoumané díly plastů umístěny na nekontaminující podložce ve vozidle s cílem co nejvíce simulovat reálné prostředí provozu vozidla<sup>28</sup>.

Vzorky byly připraveny na Katedře bojových a speciálních vozidel Univerzity obrany (UO) v Brně ve spolupráci s Ústavem technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně (MENDELU). Vlastní analýza vzorků byla provedena v laboratoři Ústavu technologie potravin MENDELU v Brně. Pro stanovení esterů kyseliny ftalové byly využity ověřené metody pro stanovení PAE v plastových materiálech<sup>29</sup>.

Plastové vzorky z automobilu se extrahovaly směsí rozpouštědel hexan:dichlormethan (1:1) po dobu 72 hodin při teplotě 23 °C. Následně se obsah baňky třepal 1 hodinu na třepačce a extrakt se dekantoval přes nálevku s filtračním papírem, který byl třikrát dekontaminován acetonem. Extrakce se opakovala ještě dvakrát třepáním 0,5 hodiny stejnou směsí rozpouštědel. Spojené extrakty se odpařily na rotační vakuové odparce a byly dosušeny proudem dusíku. Odparek se rozpustil v acetonitrilu pro HPLC stanovení v případě čirých extraktů. Pokud byl extrakt kalný, vzorek byl čištěn na centrifuze pro usazení a odstranění kalu. V případě barevných extraktů, kdy při stanovení metodou HPLC by mohlo dojít k interferenci látek extrahovaných se stanovovanými ftaláty, bylo použito pročištění kyselinou sírovou. Odparek se rozpustil v hexanu, byla přidána kyselina sírová a po třepání a centrifugaci byla hexanová vrstva odstraněna. Ke vzorku byla přidána hydratovaná 65% kyselina sírová a hexan a po třepání a centrifugaci byla pro analýzu odebrána horní vrstva. Postup se opakoval ještě jednou. Odparek, po odstranění hexanu pomocí dusíku, byl rozpuštěn v acetonitrilu pro stanovení metodou HPLC (Pozn.: Hlav-

ním krokem reextrakce PAE z fáze kyseliny sírové je její hydratace spojená s deionizací ftalátů a jejich přechodem do nepolárního rozpouštědla. Přítomnost kyseliny sírové zvyšuje výtěžek PAE a zvyšuje čisticí účinek). Detekce a kvantifikace PAE byla provedena kapalinovou chromatografií s mobilní fází acetonitril; průtok 0,8 ml min<sup>-1</sup>; kolona Zorbax Eclipse XDB-8C, zrnění 5 μm, délka 150 mm, šířka 4,6 mm (Agilent Technologies, USA), UV detekce při 224 nm, kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1100 Series (Agilent Technologies, USA). Vyhodnocení bylo provedeno programem Agilent ChemStation for LC and LC/MS systems.

## Výsledky a diskuse

Souhrnné průměrné výsledky měření výskytu esterů kyseliny ftalové ve vzorcích plastů různých částí materiálů motorového vozidla jsou uvedeny v tabulce I a II.

Zjištěné průměrné koncentrace dibutyl-ftalátu (DBP) v automobilových plastech, stanovených v 0., 3., 6., 9. a 15. měsíci jsou uvedeny v tab. I. Průměrné koncentrace DBP se pohybovaly na počátku v rozmezí 1,3–197,1 μg g<sup>-1</sup> plastu, ve 3. měsíci 1,7–161,5 μg g<sup>-1</sup> plastu, v 6. měsíci 0,5–78,9 μg g<sup>-1</sup> plastu, v 9. měsíci 2,3–123,3 μg g<sup>-1</sup> plastu a v 15. měsíci 14,0–98,6 μg g<sup>-1</sup> plastu.

Všechny naměřené hodnoty di-2-ethylhexyl-ftalátu v automobilových plastech (DEHP) jsou uvedeny v tab. II.

Průměrné koncentrace DEHP se pohybovaly na počátku v rozmezí 1,7–185,7 μg g<sup>-1</sup> plastu, ve 3. měsíci

Tabulka I  
Obsah DBP v plastech z vozidla

| Vzorek | Typ vzorku                | Obsah DBP [mg g <sup>-1</sup> ] |          |          |          |           |
|--------|---------------------------|---------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|        |                           | 0. měsíc                        | 3. měsíc | 6. měsíc | 9. měsíc | 15. měsíc |
| 1      | foukaná pěna              | 151,8                           | 151,9    | 78,9     | 45,6     | 76,0      |
| 2      | a) tužší pěna             | 81,9                            | 53,6     | 6,9      | 15,5     | 70,0      |
|        | b) tuhý černý plast       | 15,6                            | 40,4     | 19,8     | 19,0     | 27,6      |
| 3      | a) tužší pěna             | 146,0                           | 47,1     | 4,0      | 16,5     | 78,6      |
|        | b) tuhý černý plast       | 11,0                            | 28,5     | 1,7      | 15,4     | 19,9      |
| 4      | a) měkký černý plast      | 197,1                           | 161,5    | 44,0     | 123,3    | 14,0      |
|        | b) foukaná pěna           | 43,1                            | 106,9    | 0,5      | 3,5      | 98,6      |
|        | c) tuhý černý plast       | 36,2                            | 40,2     | 5,9      | 26,0     | 29,5      |
| 5      | a) tuhý tvrdý černý plast | 32,5                            | 1,7      | 3,4      | 3,6      | 41,8      |
|        | b) měkký plast            | 2,5                             | 67,0     | 1,6      | 11,9     | 57,8      |
| 6      | měkký černý plast         | 9,7                             | 8,1      | 7,3      | 11,2     | 14,4      |
| 7      | a) tuhý tvrdý černý plast | 1,3                             | 6,5      | 56,3     | 69,5     | 19,3      |
|        | b) měkký plast            | 51,1                            | 29,2     | 22,8     | 15,6     | 40,3      |
| 8      | tvrdý černý plat          | 167,8                           | 27,1     | 22,8     | 27,9     | 29,5      |
| 9      | a) kůže a lepidlo         | 19,6                            | 7,2      | 11,1     | 7,1      | 97,1      |
|        | b) tvrdší plast           | 4,6                             | 3,8      | 1,5      | 2,3      | 46,6      |

Poznámka: Mez stanovitelnosti DBP je 0,1 mg kg<sup>-1</sup>

Tabulka II  
Obsah DEHP v plastech z vozidla

| Vzorek | Typ vzorku                | Obsah DEHP [ $\text{mg g}^{-1}$ ] |          |          |          |           |
|--------|---------------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|        |                           | 0. měsíc                          | 3. měsíc | 6. měsíc | 9. měsíc | 15. měsíc |
| 1      | foukaná pěna              | 91,3                              | 26,2     | 196,7    | 24,3     | 32,6      |
| 2      | a) tužší pěna             | 23,0                              | 12,2     | 16,7     | 41,7     | 26,2      |
|        | b) tuhý černý plast       | 54,5                              | 5,0      | 65,7     | 14,1     | 2,3       |
| 3      | a) tužší pěna             | 185,7                             | 45,4     | 252,4    | 20,4     | 28,1      |
|        | b) tuhý černý plast       | 129,7                             | 6,6      | 36,0     | 7,6      | 5,4       |
| 4      | a) měkký černý plast      | 158,1                             | 24,9     | 8,7      | 18,2     | 16,4      |
|        | b) foukaná pěna           | 162,5                             | 12,7     | 16,2     | 33,1     | 87,5      |
|        | c) tuhý černý plast       | 7,8                               | 5,6      | 22,7     | 7,3      | 2,9       |
| 5      | a) tuhý tvrdý černý plast | 33,0                              | 3,9      | 16,1     | 5,8      | 14,9      |
|        | b) měkký plast            | 2,6                               | 17,1     | 1,4      | 12,4     | 22,9      |
| 6      | měkký černý plast         | 65,2                              | 40,4     | 94,3     | 32,1     | 41,4      |
| 7      | a) tuhý tvrdý černý plast | 1,7                               | 18,4     | 88,5     | 10,1     | 8,4       |
|        | b) měkký plast            | 140,8                             | 22,2     | 73,4     | 17,0     | 32,0      |
| 8      | tvrdý černý plast         | 104,5                             | 11,8     | 16,2     | 15,0     | 13,1      |
| 9      | a) kůže a lepidlo         | 52,5                              | 34,8     | 32,5     | 23,2     | 53,6      |
|        | b) tvrdší plast           | 8,8                               | 6,0      | 7,9      | 5,1      | 15,4      |

Poznámka: Mez stanovitelnosti DEHP je  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$

3,9–45,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu, v 6. měsíci 1,4–252,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu, v 9. měsíci 5,1–41,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu a v 15. měsíci 2,3–87,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu.

Vyšší koncentrace byly zaznamenány u nových a zejména měkkých plastů (foukaná pěna, tužší pěna, měkký plast), kde např. průměrné koncentrace DBP dosahovaly hodnot 51,1–197,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu. U pevných plastů byla průměrná koncentrace DBP 1,3–36,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  plastu, pouze v jednom případě byla zaznamenána hodnota 167,8  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Zajímavým poznatkem je, že obsah obou ftalátů (DBP a DEHP) byl zjištěn také u materiálů z kůže (19,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  u DBP a 52,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  u DEHP).

Po devítiměsíčním skladování došlo u cca 70 % vzorků k poklesu obsahu DBP o 30–90 %. Po patnáctiměsíčním skladování ve srovnání s koncentracemi stanovenými hned po přípravě vzorků došlo u 44 % vzorků k poklesu obsahu DBP o 20–90 % a u 56 % vzorků k nárůstu, v některých případech až 22krát (tab. I, vzorek 5b). Po devítiměsíčním skladování došlo u 80 % vzorků k poklesu obsahu DEHP o 6–90 %. Po patnáctiměsíčním skladování ve srovnání s koncentracemi stanovenými hned po přípravě vzorků došlo u 70 % vzorků k poklesu obsahu DEHP o 30–90 % a u 30 % vzorků k nárůstu, v některých případech až 9krát (tab. II, vzorek 5b). Předpokládáme, že ke zvýšení obsahu ftalátů došlo vlivem podmínek skladování (působení UV záření, doba a teplota skladování), kdy nastala depolymerizace plastů, a tím došlo k uvolnění vázaných látek z matrice (ftalátů).

## Závěr

Provedená měření prokázala, že PAE byly nalezeny ve všech dílčích vzorcích plastů z vozidla. Zjištěné koncentrace obou zmíněných esterů kyseliny ftalové se pohybovaly od 3,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  do 382  $\mu\text{g g}^{-1}$  u nových vzorků a od 16,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  do 186,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  u vzorků po cca patnáctiměsíčním skladování, vyjádřeno jako suma obou ftalátů. Ve většině případů jde o materiál, se kterým je osádka vozidla neustále a bezprostředně ve styku. Právě dlouhodobý kontakt s materiály z plastů s vysokým obsahem ftalátů (volant, sedačky, opěrky hlavy) může být nebezpečný, protože tyto látky se mohou do těla dostat kožní resorpcí a dýcháním. Aktuálně platná legislativa v ČR se touto problematikou nezabývá.

## LITERATURA

1. Dufek J., Adamek V., Huzlík J.: *Výzkumná zpráva č. CE 801 210 109*. Brno, CDV, 2002, str. 63, <https://www.scientific.net/AMM.436.153>, staženo 19. 5. 2022.
2. Li Y. Z., Ding Z.H.: *Adv. Mater. Res.* 750–752, 2145 (2013).
3. Li Y., Huang S.Y., Liu Y.H., Ju Y.Y.: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 10285 (2021).
4. Berge A., Cladiere M., Gasperi J., Coursimault A., Tassin B., Moilleron R.: *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 8057 (2013).
5. Latini G.: *Clin. Chim. Acta* 361, 20 (2005).

6. Ventrice P., Ventrice D., Russoa E., Sarroa G.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 88 (2013).
7. Yang J., Li Y., Wang Y., Ruan J., Zhang J., Sun Ch.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **72**, 10 (2015).
8. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official Journal of the European Union (OJ) L 353*, 1 (2008). [http://publications.europa.eu/resource/cellar/6bf54b59-7673-461b-b8e1-f24c545cbd3c.0002.01/DOC\\_1](http://publications.europa.eu/resource/cellar/6bf54b59-7673-461b-b8e1-f24c545cbd3c.0002.01/DOC_1), staženo 16. 5. 2022.
9. Wormuth M., Scherlinger M., Vollenweider M., Hungerbühler K.: *Risk Analysis* **26**, 3, 803 (2006).
10. Velíšek J., v knize: *Chemie potravin 3*, s. 368. Osis, Tábor 2002.
11. Schettler T.: *Int. J. Androl.* **29**, 134 (2006).
12. Jarošová A., Harazim J., Krátká L., Kolečnicková D.: *Environ. Chem. Lett.* **8**, 387 (2010).
13. Klimisch H. J., Gamer A. O., Hellwig J., Kaufmann W., Jackh R.: *Food Chem. Toxicol.* **30**, 915 (1992).
14. Muscogiuri G., Colao A.: *Arch. Toxicol.* **91**, 1513 (2017).
15. Bui T. T., Giovanoulis G., Cousins A. P., Magner J., Cousins I. T.: *Sci. Total. Environ.* **15**, 541 (2016).
16. Wang J., Chen G. C., Christie P., Zhang M. Y., Luo Y. M., Teng Y.: *Sci. Total. Environ.* **1**, 129 (2015).
17. Hongjun Y., Wenjun X., Qing L., Jingtao L., Hongwen Y., Zhaohua L.: *Environ. Monit. Assess.* **185**, 8489 (2013).
18. Langová R., Jarošová A., Poláková Š., Kos I.: *Environ. Monit. Assess.* **192**, 20 (2020).
19. Schwarzbauer J., Heim S., Brinker S., Littke R.: *Water Res.* **36**, 2275 (2002).
20. Zheng Z., He P.-J., Shao L.-M., Lee D.-J. *Water Res.* **41**, 4696 (2007).
21. Fromme H., Kuchlerb T., Ottoc T., Pilzc K., Mullerb J., Wenzel A.: *Water Res.* **36**, 1429 (2002).
22. Wagner M., Oehlmann J.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **16**, 278 (2009).
23. Jandlová M., Jarošová A.: *Chem. Listy* **113**, 397 (2019).
24. Morenko M.: *JAMA Pediatrics* **168**, 96 (2014).
25. Tsatsakis A. M., Katsikantami I., Kalantzi O., Sevim C., Tsarouhas K., Sarigiannis D., Tzatzarakis M. N., Rizos A. K., v knize: *Encyclopedia of Environmental Health*, s. 163. Elsevier, Michigan 2019.
26. Čorňák Š., Jarošová A.: *Appl. Mech. Mater.* **436**, 153 (2013).
27. Čorňák Š., Jarošová A., Puškarová L.: *Chem. Listy* **107**, 960 (2013).
28. Kučera M.: *Výzkum mikroklimatu ve vozidle. Disertační práce*. Univerzita obrany, Brno 2018.
29. Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K.: *Vet Med-Czech* **44**, 61 (1999).

**A. Jarošová<sup>a</sup>, Š. Čorňák<sup>b</sup>, M. Kučera<sup>c</sup>, and M. Jandlová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Food Technology, Mendel University in Brno*, <sup>b</sup> *Department of Combat and Special Vehicles, University of Defence in Brno*, <sup>c</sup> *Lilacosta, s.r.o., Miroslav*): **Changes in the Concentration of Phthalic Acid Esters in the Plastic Materials of Vehicles During the Usage**

The presence of dibutyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) was monitored in 16 automotive plastic samples (steering wheel, dashboard, seats, headrests, and air conditioning control). The plastic samples were obtained from a crashed vehicle that had been in operation for only one month. Phthalates were determined by HPLC. The first analysis was performed immediately after the sample preparation, the second one after 3 months of storage, the third one after 6 months of storage, the fourth one after 9 months of storage, and the fifth one after 15 months of storage. The average DBP concentrations ranged from 1.3 to 197.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic at the beginning, 1.7 to 161.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic in the 3rd month, 0.5 to 78.9  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic in the 6th month, 2.3 to 123.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic in the 9th month, and 14.0 to 98.6  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic in the 15th month. The average DEHP concentrations ranged from 1,7 to 185,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic at the beginning, 3,9 to 45,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic in the 3rd month, 1,4 to 252,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  of plastic on the 6th month, 5,1 to 41,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  in the 9th month, and 2,3 to 87,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  in the 15th month. In particular, higher concentrations were found in soft plastics. An interesting finding is that the content of both phthalates (DBP and DEHP) was also present in leather materials. According to the comparison of phthalates concentrations during storage, it can be stated that phthalates concentration decreases with time and, after approximately 15 months of storage, concentrations decreased: for DBP by 20 to 90% (in 44% samples) and for DEHP by 30 to 90% (in 70% samples). For the other samples, the increase of both phthalates was probably due to depolymerisation of the plastics by UV exposure, temperature and storage time. Phthalates are human carcinogens and they can cause the death or tissue malformation. They are dangerous for liver function. The legislation of the Czech Republic and European Union has not yet dealt with these problems.

**Keywords:** dibutyl phthalate (DBP), di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), vehicle plastic materials, plasticizer, vehicle driver

- Jarošová A., Čorňák Š., Kučera M., Jandlová M.: *Chem. Listy* **116**, 509–512 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220509>



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.



# 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

## KOHO HLEDÁME?

- Absolventy oboru chemie, farmacie nebo přírodních věd



Jsme český farmaceutický výrobce s více než 130letou historií průmyslové farmaceutické výroby. Jsme součástí izraelské farmaceutické korporace Teva, celosvětově vůbec největšího producenta generických léčivých přípravků.



**45 000**

zaměstnanců



**74**

výrobních závodů  
ve třech desítkách zemí



**25**

pracovišť výzkumu, vývoje  
a klinického hodnocení



**120 mld.**

miliard tablet  
a kapslí/ročně

[www.teva.jobs.cz](http://www.teva.jobs.cz)

#### Stáže a praxe

Teva Czech Industries s.r.o.  
Školící středisko  
Ostravská 29, 747 70 Opava  
T: +420 553 646 105, E: [recepce.trainee@tevapharm.cz](mailto:recepce.trainee@tevapharm.cz)

#### Trainee program

Teva Czech Industries s.r.o.  
Oddělení lidských zdrojů  
Ostravská 29, 747 70 Opava  
T: +420 721 027 750, E: [petr.dudek@tevapharm.cz](mailto:petr.dudek@tevapharm.cz)

#### Náborové centrum

Teva Czech Industries s.r.o.  
Oddělení lidských zdrojů  
Ostravská 29, 747 70 Opava  
T: +420 553 642 424, E: [aneta.skowronkova@tevapharm.cz](mailto:aneta.skowronkova@tevapharm.cz)



---

**OBSAH****ÚVODNÍK**

- Záhady polyamidů a mezilidská chemie** 469  
M. Raab, M. Hrubý a T. Hamsová

**REFERÁTY**

- Budou léčivy budoucnosti malé molekuly nebo biologická léčiva?** 471  
S. Rádl, O. Dammer a L. Ridvan
- Analytické metody na detekci kontaminantů v kôrovcoch a mäkkýšoch** 481  
K. Rusiňáková, M. Kirchner a S. Hrouzková
- Azolová rezistencia kvasiniek rodu *Candida*** 494  
Z. Malinovská, E. Čonková, P. Váczi a M. Proškovcová
- Chemické aspekty bezpečnosti hlubinného úložiště** 501  
A. Vokál

**PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE**

- Změny koncentrace esterů kyseliny ftalové v plastových materiálech vozidla v průběhu používání** 509  
A. Jarošová, Š. Čorňák, M. Kučera a M. Jandlová

---

**CONTENTS****EDITORIAL**

- Mysteries of Polyamides and Interpersonal Chemistry** 469  
M. Raab, M. Hrubý, and T. Hamsová

**REVIEW ARTICLES**

- Will the Drugs of the Future Be Small Molecules or Biological Drugs?** 471  
S. Rádl, O. Dammer, and L. Ridvan
- Analytical Methods for the Detection of Contaminants in Crustaceans and Mollusks** 481  
K. Rusiňáková, M. Kirchner, and S. Hrouzková
- Azole Resistance in *Candida* Yeasts** 494  
Z. Malinovská, E. Čonková, P. Váczi, and M. Proškovcová
- Chemical Aspects of the Deep Repository Safety** 501  
A. Vokál

**ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS**

- Changes in the Concentration of Phthalic Acid Esters in the Plastic Materials of Vehicles During the Usage** 509  
A. Jarošová, Š. Čorňák, M. Kučera, and M. Jandlová

## Setkání absolventů Ústavu / Katedry organické chemie

Vážení kolegové, veteráni bojů v zákopech organické chemie, u příležitosti 70. výročí založení samostatné VŠCHT si Vás dovolujeme pozvat na slavnostní setkání našich absolventů, a to

**v sobotu 24. 9. 2022**

### Program setkání:

**9:00 – 12:00**

– příjezd účastníků, registrace v předsálí posluchárny AI, individuální návštěvy Vašich bývalých pracovišť a oblíbených školitelů, taktéž možnost organizované exkurze po Ústavu

**12:00 – 13:30**

– shromáždění účastníků v posluchárně AI, odborný program – přednášky z děl našich mistrů

**13:30 – 14:30**

– společný oběd v prostorách Respiria v budově B, dostupné nyní z budovy A pohodlně tunelem

**od 14:30**

– setkání, která jste nestihli dopoledne

**Těšíme se na Vás a doufáme v hojnou účast!**

Více informací a registrace na adrese <https://uoch.vscht.cz/>

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 116 (2022), čís./no. 8 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 146, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 132 • 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 • VEDOUČÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA) • 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, V. Šimánek, 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 • Copyright © 2022 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2022 (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 • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány 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: V. Spiwok • Dáno do tisku 28.7.2022.**



# Švýcarský nůž analytiky

Inspirovaný věrností a spolehlivostí – to je nová éra SFC

Superkritický fluidní chromatografický systém Nexera UC je dostupný v různých konfiguracích tak, aby poskytoval aplikačně specifické řešení zákazníkům ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Unikátní hardwarové inovace zaručují spolehlivou a stabilní analýzu, kterou lze získat ideální nástroj pro náročné separace vzorků. Díky spojení specifické MS detekce a všestrannosti SFC dosáhne tento systém nejvyšší možné citlivosti.

## **Bezprecedentní stabilita tlaku zajistí přesná a reprodukovatelná data**

pomocí unikátního nízko-objemového regulátoru zpětného tlaku

## **Rychlejší průtoky, vyšší výkon a nižší náklady na analýzu**

díky nízko-viskózní mobilní fázi, která je nejvíce přátelská k životnímu prostředí

**Automatizovaný proces vytváření metod**  
pro LC nebo SFC testování

**Kombinace se superkritickou fluidní extrakcí**  
spojuje rychlou a jednoduchou přípravu vzorku s nejmodernější chromatografickou analýzou a vysokocitlivostní detekcí



# cell monitoring EVOLVED

## The Millicell® DCI Digital Cell Imager

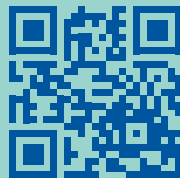
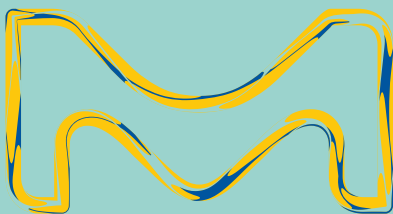
Assess your cell cultures with ease. Our Millicell® DCI instrument enables more efficient execution of the repetitive daily techniques associated with cell passaging. Quickly and objectively assess confluency, morphology, and growth trends for more consistent cell cultures.



## Taking confluency to a new level.

To learn more, visit  
[MillicellDCI.com](http://MillicellDCI.com)

Expand capabilities with off-device cloud storage and web-based application for data analysis, sorting, and smart archiving.



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

**Millipore®**

Preparation, Separation,  
Filtration & Monitoring Products