



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2025“

29. ledna 2025

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

Partneři soutěže O cenu Karla Šulíka 2025:



28. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“ proběhl ve znamení 100. výročí Katedry analytické chemie PřF UK v Praze

Již 28. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie O cenu Karla Štulíka 2025 úspěšně proběhl 29. ledna 2025 na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze na Albertově pod záštitou děkana PřF UK doc. RNDr. Ing. Vladimíra Krylova, Ph.D. Nejprve chci poděkovat kolegům a kolegyním z naší katedry (jmenovitě RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D., doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D., prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., a paní Michaelae Sochorové) za dokonalou organizaci soutěže a vytvoření příjemné atmosféry s touto soutěží již mnoho let spojené. Letos se sešlo celkem 18 soutěžních prací z nejrůznějších

oblastí moderních analytických metod důstojně reprezentujících vynikající pedagogickou a vědecko-výzkumnou práci v oblasti analytické chemie na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Univerzitě Karlově, Masarykově univerzitě v Brně, Mendelově univerzitě v Brně a Univerzitě Palackého v Olomouci. Seznam soutěžních prací je uveden v tab. I.

Náš dík patří pochopitelně i zúčastněným univerzitám za jejich významný příspěvek k rozvoji české analytické chemie a za podporu této soutěže. Zde bych rád vyjádřil své potěšení nad skutečností, že i v dnešní době charakterizované rostoucím ekonomickým tlakem zvyrazňujícím přednost vědecké práce před pedagogickou si tyto školy uvědomují význam práce pedagogické, neboť bez výchovy nových kvalitních absolventů by se excelentní výzkum brzy odstěhoval do zahraničí. Jako obvykle odborná porota reprezentovala všechny zúčastněné vysoké školy, takže letos pracovala ve složení prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (předseda), doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D., prof. Ing. René Kizek, DrSc., Ing. Jiří Kudr, Ph.D., prof. RNDr. Přemysl

Tabulka I

Seznam soutěžních prací na Ceně Karla Štulíka 2025 a studijní ročník soutěžících studentek a studentů

Marek Beneš: *Vývoj metodiky pro měření fluorescenční spektroeletrochemie* (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha a ÚFCH JH AV ČR, 1. NMgr.)

Monika Felcmanová: *Pyrolýza anhydridu butanové kyseliny z pohledu rotační spektroskopie* (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, 3. Bc.)

Lada Fialová: *Vývoj metody pro chirální separaci mandlové kyseliny pomocí kapilární elektroforézy s využitím kationického cyklodextrinu* (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, 2. NMgr.)

Kateřina Fuková: *Voltametrické sledování degradace léčivé látky ibuprofen přímo v degradační cele* (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha, 2. NMgr.)

Matěj Ondřej Fusek: *Elektrochemické studium hladiny iontů kovů v moči u pacientů se zhoubným nádorem prostaty* (Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, 3. Bc.)

Tomáš Grätz: *Metrologické aspekty stanovení kovů ve vybraných vzorcích jedlého hmyzu* (Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc, 2. NMgr.)

Michaela Heinzka: *Automatizace přípravy senzorů/biosenzorů na principu tištěných elektrod* (Ústav chemie a biochemie, Mendelova univerzita v Brně, 2. NMgr.)

Michal Javorek: *Basic Blue 7: Zástupce nové třídy duálních matic pro zobrazovací hmotnostní spektrometrii MALDI* (Ústav chemie, PřF MU Brno, 3. Bc.)

Tereza Kicová: *Prvková analýza ozdobných prvků barokních kostýmů* (Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc, 3. Bc.)

Jana Knytllová: *Ambientní hmotnostní spektrometrie pro analýzu selektivních modulátorů androgenního receptoru (SARM)* (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, 2. NMgr.)

Kateřina Konečná: *In-silico optimalizace vícerozměrné chromatografie pro proteomickou analýzu* (Ústav chemie, PřF MU Brno, 2. NMgr.)

Ondřej Kreuzer: *Využití ICP-MS v prvkové analýze po foliární aplikaci listových hnojiv u obilnin* (Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc, 3. Bc.)

Kristýna Machálková: *Použití separačních metod pro studium aniontového bambusurilového receptoru* (Ústav chemie, PřF MU Brno, 3. Bc.)

Michael Skála: *Využití kapalinové chromatografie při studiu stability a degradace farmaceuticky významných látek* (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha, 2. NMgr.)

Tomanová Marie: *Zachycení organických kontaminantů z vody pomocí nových magnetických robotů* (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha, 2. NMgr.)

Lukáš Cach: *Využití CD spektroskopie ve studiu aminokyselin a peptidů* (Ústav chemie, PřF MU Brno, 2. NMgr.)

Luiza Yanush: *Enantioselektivní analýza organických molekul s použitím chirálních nanomateriálů* (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha, 3. Bc.)

Victória Žužičová: *Využití vsádkové injekční analýzy při elektrochemickom stanovení warfarínu* (Katedra analytické chemie, PřF UK Praha, 2. NMgr.)

Lubal, Ph.D., doc. Mgr. Oleksiy Lyutakov, Ph.D., Ing. Radmila Řápková a prof. RNDr. David Sýkora, Ph.D. Všem členům poroty patří mé poděkování za nezištnou a obětavou činnost. Největší poděkování však pochopitelně náleží soutěžícím studentkám a studentům splňujícím moji představu o „rising stars in analytical chemistry“, kteří jsou schopni produkovat excelentní vědecké výsledky důstojně reprezentující své mateřské instituce.

A nyní to hlavní: **V celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“**

1. místo získala:

Bc. Jana Knytllová (Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha) za práci *Ambientní hmotnostní spektrometrie pro analýzu selektivních modulátorů androgenního receptoru (SARM)*.



Bc. Jana Knytllová vystudovala v letech 2020–2023 bakalářský studijní program Analytická a forenzní chemie na FCHI VŠCHT Praha. Nyní studuje 2. ročník magisterského studijního programu Analytická chemie se zaměřením na Analýzu léčiv, kde se zabývá ambientní hmotnostní spektrometrií pro analýzu selektivních modulátorů androgenního receptoru. V roce 2024 prezentovala výsledky své práce na České konferenci hmotnostní spektrometrie a dále na Studentské vědecké konferenci pořádané VŠCHT Praha, kde obdržela zvláštní cenu firmy PRO.MED.CS Praha a.s. za zajímavou studentskou vědeckou práci.

2. místo získala:

Kristýna Machálková (Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno) za práci *Použití separačních metod pro studium aniontového bambusurilového receptoru*.



Bc. Kristýna Machálková absolvovala bakalářský studijní program Chemie, studijní plán Analytický chemik

– manažer chemické laboratoře, a poté magisterský studijní program Chemie, studijní plán Analytická chemie. Téma závěrečné práce bylo IEC studium aniontových receptorů na bázi bambusurilu.

3. místo získal:

Bc. Lukáš Cach (Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno) za práci *Využití CD spektroskopie ve studiu aminokyselin a peptidů*.



Bc. et Bc. Lukáš Cach absolvoval bakalářský studijní program Chemie, studijní plán Chemie, a poté magisterský studijní program Chemie, studijní plán Analytická chemie, obojí na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Zabývá se stanovením farmaceuticky významných látek pomocí optických metod.

Zvláštní cenu firmy Metrohm za nejlepší práci v oblasti elektroanalytické chemie v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“ získali:

Matěj Ondřej Fusek (Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha) za práci *Elektrochemické studium hladiny iontů kovů v moči u pacientů se zhoubným nádorem prostaty*.

Bc. Michaela Heinzka (Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně) za práci *Automatizace přípravy senzorů/biosenzorů*.



Bc. Michaela Heinzka v roce 2023 dokončila bakalářský studijní obor Biochemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity. V současné době studuje 2. ročník magisterského studijního oboru Molekulární biologie

a biotechnologie živočichů na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně, kde se zabývá automatizací přípravy biosenzorů na principu tištěných elektrod, se zaměřením na analýzu fenolických sloučenin obsažených ve víně. Mimo studium se věnuje doučování žáků základních a středních škol.

Zvláštní cenu firmy Nicolet za nejlepší práci v oblasti molekulární spektroskopie v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“ získala:

Monika Felcmanová (Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha) za práci *Pyrolyza anhydridu butanové kyseliny z pohledu rotační spektroskopie*.



Monika Felcmanová studuje analytickou chemii na FCHI VŠCHT Praha v bakalářském programu. Kromě studia pracuje i ve společnosti Mandario (výrobce parfémů a kosmetiky). Zajímá se o moderní analytické metody a jejich využití v průmyslu i výzkumu.

Zvláštní cenu poroty za nejlepší práci v oblasti environmentální analýzy v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“ získal:

Bc. Tomáš Grätz (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci) za práci *Metrologické aspekty stanovení kovů ve vybraných vzorcích jedlého hmyzu*.

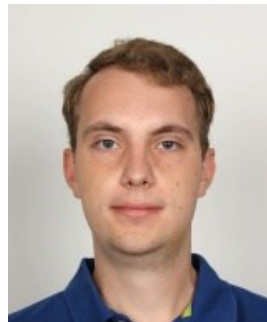


Bc. Tomáš Grätz odmaturoval na Střední škole logistiky a chemie se zaměřením na farmaceutické substance. Během bakalářského studia na PřF Univerzity Palackého v Olomouci na oboru Chemie se začal věnovat prvkové analýze jedlého hmyzu, ve které pokračuje i na magisterském studiu v oboru Analytická chemie na téže fakultě.

Mimo studium pracuje v olomouckém science centru pro popularizaci vědy *Pevnosti poznání*, jako animátor a edutainer chemických vzdělávacích programů pro děti a mládež.

Zvláštní cenu poroty pro studenty bakalářského studia v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2025“ získal:

Michal Javorek (Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno) za práci *Basic Blue 7: Zástupce nové třídy duálních matic pro zobrazovací hmotnostní spektrometrii MALDI*.



Michal Javorek absolvoval v letech 2018–2022 Střední průmyslovou školu chemickou, Vranovská 65, v Brně a v současné době studuje bakalářské studium chemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Pracuje ve výzkumné skupině prof. Preislera již od roku 2020, kdy pod vedením Dr. Bednaříka působil v oblasti středoškolské odborné činnosti. Během bakalářského studia se věnuje výzkumu nových matic pro zobrazovací hmotnostní spektrometrii MALDI a jejího propojení s dalšími zobrazovacími metodami. Je spoluautorem práce publikované ve špičkovém analytickém časopise (Javorek M., Hendrych M., Ondráková K., Preisler J., Bednařík A.: *Staining Tissues with Basic Blue 7: A New Dual-Polarity Matrix for MALDI Mass Spectrometry Imaging*. Anal. Chem. 97, 2828 (2025)).



Obr. 1. Ocenění studenti v soutěži Cena Karla Štulíka 2025. Zleva Bc. Michaela Heinzka, Bc. Tomáš Grätz, Bc. Kristýna Machálková, Bc. Jana Knytllová, Bc. Lukáš Cach, Michal Javorek, Monika Felcmanová, Matěj Ondřej Fusek



Obr. 2. Skupinové foto z Ceny Karla Štulíka 2025 na PřF UK v Praze

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

Závěrem bych rád poděkoval Ing. Radmile Řápkové, technické redaktorce časopisu Chemické listy, a prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., vedoucímu redaktoru našeho časopisu, za přípravu zvláštního elektronického čísla

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

A na závěr bych rád oznámil, že v příštím roce proběhne tato soutěž opět začátkem roku 2026 na Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské VŠCHT Praha a o detailech budou čtenáři informováni na www stránkách našeho časopisu (<http://www.chemicke-listy.cz/>), Odborné skupiny analytické chemie ČSCH (<https://osanal.csch.cz/>) a Katedry analytické chemie PřF UK v Praze (<https://natur.cuni.cz/chemie/katedry-a-pracoviste/katedra-analyticke-chemie>). A veškeré dotazy související s touto tradiční soutěží rád odpoví autor tohoto článku.

Jiří Barek

*Katedra analytické chemie PřF UK
Vedoucí UNESCO laboratoře elektrochemie životního
prostředí na PřF UK a předseda Odborné skupiny
analytické chemie České společnosti chemické
barek@natur.cuni.cz*

AMBIENTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PRO ANALÝZU SELEKTIVNÍCH MODULÁTORŮ ANDROGENNÍHO RECEPTORU

JANA KNYTLOVÁ^a, ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ^{a,b}
a MICHAEL VOLNÝ^{a,b}

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4, Česká republika
knytlovj@vscht.cz

Klíčová slova: ambientní ionizace, hmotnostní spektrometrie, selektivní modulátory androgenního receptoru

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20250007>

Úvod

Selektivní modulátory androgenního receptoru (SARM) jsou nízkomolekulární látky vyvíjené od 90. let 20. století jako alternativa k testosteronové terapii¹. Navzdory slibným anabolickým účinkům však tyto látky neprokázaly dostatečný přínos v léčbě a jsou spojovány s riziky jako potlačení přirozené produkce testosteronu nebo zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění². Pro své hormonální účinky jsou navíc zakázány Světovou antidopingovou agenturou a jejich prodej a distribuce je v mnoha státech, včetně České republiky, nezákonná. I přesto jsou SARM často zneužívány neprofesionálními sportovci³, zejména díky jejich snadné dostupnosti v nelegálních internetových obchodech, kde se prodávají jako potravinové doplňky ve formě tablet nebo kapslí.

Předkládaná práce se zabývá vývojem rychlé kvalitativní a semikvantitativní metody pro analýzu SARM v těchto preparátech pomocí hmotnostní spektrometrie s ambientní ionizací (AMS). Tato metoda umožňuje měření za atmosférického tlaku, často s minimální přípravou vzorku, a umožňuje tak rychlou detekci nelegálních látek⁴. Ve spojení s vhodným analyzátozem by pak metoda mohla být využita v přenosných zařízeních, například policií nebo celními orgány přímo v místě záchytu. Cílem práce je optimalizovat podmínky analýzy pomocí ionizace dielektrickým bariérovým polem a výsledky porovnat s tradiční LC-UV-MS analýzou.

Experimentální část

V práci byly analyzovány vybrané látky ze skupiny SARM, konkrétně ostarin, ligandrol, cardarin, YK-11, ibutamoren, andarin a radarin; jako vnitřní standardy byly

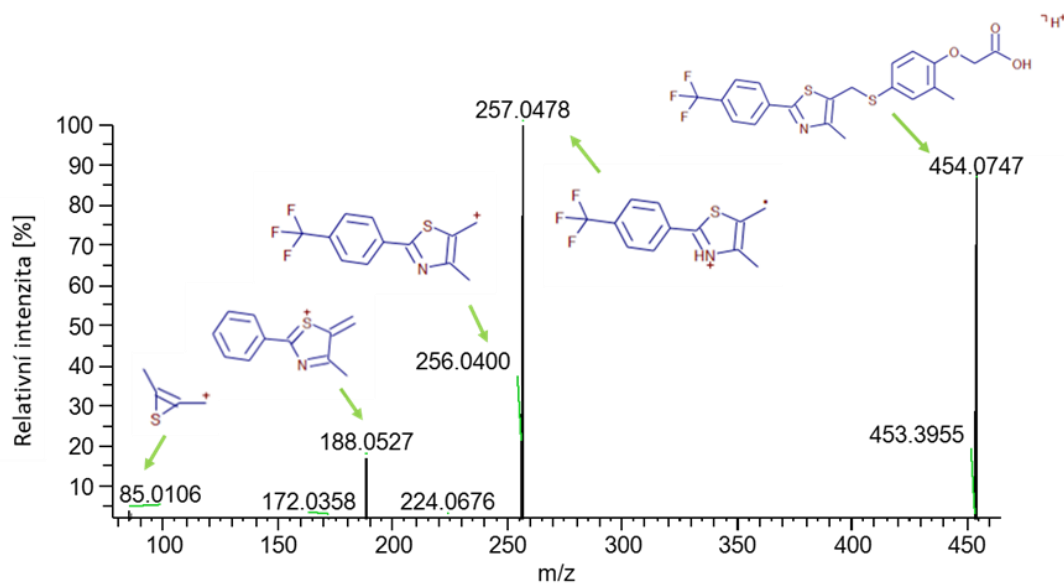
použity ostarin-*d*₄ a propranolol. Nejprve byla zaznamenána MS¹ a MS² spektra všech analytů, poté byl optimalizován postup při zavedení vzorku do ambientního iontového zdroje. Funkčnost metody byla poté ověřena s pomocí dvanácti potravinových doplňků s deklarovaným obsahem SARM. Příprava vzorku zahrnovala rozpuštění tablety nebo obsahu tobolky v methanolu, filtraci a ředění ultračistou vodou s přídavkem ostarinu-*d*₄. Obdobným způsobem byla připravena externí kalibrační řada s použitím stearanu hořečnatého jako reprezentativní matrice. Výsledné roztoky byly nejprve analyzovány pomocí LC-UV-MS, poté byly obohaceny o další vnitřní standard propranolol a analyzovány pomocí AMS.

LC-UV-MS analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu s UV detektorem a hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól, pracujícím v MRM módu. Separace byla provedena na koloně Poroshell 120 EC-C18 a použita byla gradientová eluce s dobou trvání 12 min. Pro AMS analýzu byl použit ambientní iontový zdroj Sicit®[®], vybavený modulem pro mikroextrakci na tuhé fázi (GC/SPME) a spojený s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 120. Dávkování vzorku probíhalo pomocí mikrostříkačky, která byla krátce ponořena do roztoku vzorku a poté vložena na dobu přibližně 5 s do GC/SPME modulu, ohřívaného a neustále proplachovaného dusíkem. Po tuto dobu byl zaznamenáván celkový signál iontů (angl. total ion chromatogram, TIC). Fragmentační mechanismy zkoumaných látek byly ověřovány programem Mass Frontier 8.0.

Výsledky a diskuse

Cílem předkládané práce je vývoj rychlé metody ambientní ionizace, která nevyžaduje chromatografickou separaci a která by mohla být využita i ve spojení s přenosným hmotnostním spektrometrem, např. typu iontové pasti. Pro účely identifikace byla vytvořena interní knihovna MS² spekter (obr. 1), kde byly zaznamenány typické fragmenty jednotlivých SARM, na základě kterých by bylo možné látku identifikovat i s použitím analyzátoru s nízkým rozlišením.

Následovala analýza připravených roztoků. Nejprve byla provedena kvalitativní analýza dat pomocí AMS. Ze získaných dat TIC byly extrahovány záznamy pro specifické *m/z* jednotlivých analytů s přesností 5 ppm. Přítomnost analytu byla hodnocena jako pozitivní v případě, kdy byl v okamžiku dávkování vzorku zaznamenán pik o šířce přibližně 5 s, která odpovídala době dávkování vzorku do zdroje (obr. 2, vlevo). Získané kvalitativní výsledky byly porovnány s měřením pomocí LC-UV-MS, ve kterých byla přítomnost analytu hodnocena na základě retenčních

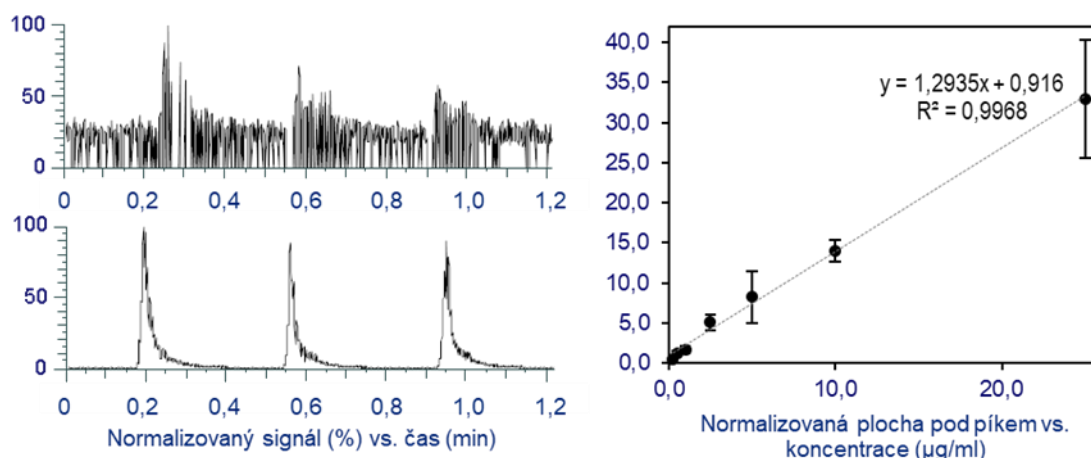


Obr. 1. MS² spektrum protonované molekuly cardarinu ($m/z = 454$) s navrhovanými strukturami charakteristických fragmentů. Měřeno v pozitivním módu, rozsah skenu 50–600 m/z , normalizovaná kolizní energie v HCD cele NCE = 30, rozlišení 120 000 pro hypotetickou hodnotu m/z 200. Charakteristickými fragmenty cardarinu jsou ionty o $m/z = 257$, 256, 188 a 85

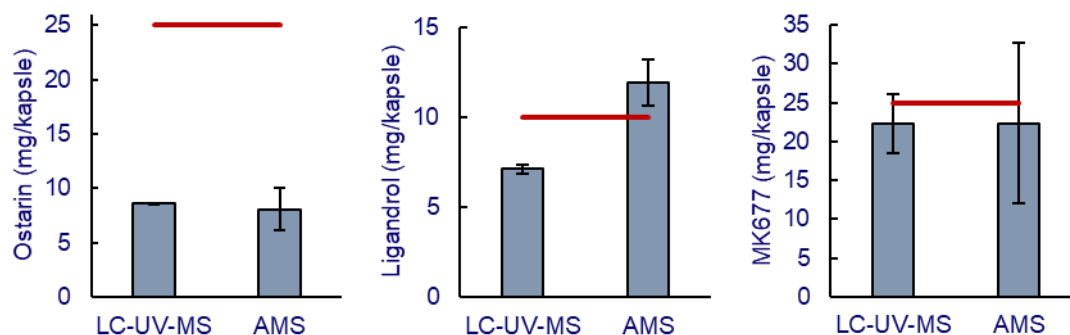
časů MRM přechodů. Při porovnání výsledků byla pozorována dobrá shoda; z celkového počtu 84 signálů, tj. 12 vzorků a 7 analytů, se 78 (93 %) signálů kvalitativně shodovalo, 4 (5 %) signály byly pomocí AMS vyhodnoceny jako falešně pozitivní a 2 (2 %) signály jako falešně negativní.

Data získaná z analýzy kalibrační závislosti byla dále použita pro kvantitativní vyhodnocení. Využití AMS pro kvantifikaci je omezené⁴, neboť tato metoda vykazuje vyšší variabilitu signálu v závislosti na složení vzorku nebo okolních podmínkách.

Tato práce zkoumá využití propranololu jako vnitřního standardu pro korekci kolísajícího signálu. Po integraci píku analytu a vnitřního standardu byla pro každý analyt sestavena normalizovaná kalibrační závislost (obr. 2, vpravo), pomocí které byl stanoven obsah jednotlivých SARM v přípravku. Porovnání výsledků s tradiční LC-UV-MS analýzou ukázalo různou míru shody (obr. 3), tento fakt je předmětem dalšího zkoumání. U mnoha přípravků byl také pozorován významný rozdíl mezi naměřeným obsahem a hodnotou deklarovanou výrobcem (obr. 3, vyznačeno červeně). Toto pozorování potvrzují i předchozí studie⁵,



Obr. 2. Kvalitativní a kvantitativní analýza ligandrolu: extrahovaný záznam signálu pro m/z 339,0932 v rozpouštědle (vlevo nahoře) a v kalibračním roztoku o koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (vlevo dole); záznam odpovídá třem konsektivním nástřikům roztoku do GC/SPME modulu. Integrací píků kalibračních roztoků byla získána kalibrační závislost pro ligandrol (vpravo); normalizováno na vnitřní standard propranolol, vynesen průměr a směrodatná odchylka pro $n = 3$



Obr. 3. Vybrané výsledky stanovení obsahu pomocí dvou metod pro analyt ostarin ve vzorku 1 (vlevo), ligandrol ve vzorku 3 (uprostřed) a MK677 ve vzorku 5 (vpravo). Červenou linií je vyznačen obsah deklarovaný výrobcem

důvodem může být absence kontrolních mechanismů, které by zajišťovaly kvalitu těchto produktů.

Ačkoliv ve srovnání s referenční LC-UV-MS analýzou vykazovala metoda AMS horší linearitu odezvy ($R^2 > 0,9$ versus $R^2 > 0,99$) a vysokou variabilitu signálu (s_r až 92 %), je nutné vyzdvihnout významně kratší dobu analýzy. Zatímco analýza jednoho vzorku pomocí LC-UV-MS trvala 12 min, pomocí AMS byla provedena přibližně za 5 s. Metoda AMS tedy může být užitečná pro semikvantitativní analýzu, kdy je cílem rychlé zjištění přítomnosti látky nad určitým prahem, například v kontextu toxikologických nebo legislativních limitů.

Závěr

V této práci byly studovány vybrané SARM pomocí přenosného ambientního zdroje Sicrit®. Metoda ukázala vysokou shodu s referenční LC-UV-MS metodou (93 % správně identifikovaných signálů) a výrazně kratší dobu analýzy (5 s oproti 12 min). Přestože má ambientní ionizace omezení v kvantitativní analýze, její rychlost a jednoduchost z ní činí užitečný nástroj pro semikvantitativní screening s využitím v terénu, například pro potřeby policie nebo celní správy.

LITERATURA

1. Handlon A. L., Schaller L. T., Leesnitzer L. M., Merrihew R. V., Poole C., Ulrich J. C., Wilson J. W., Cadilla R., Turnbull P.: ACS Med. Chem. Lett. 7, 83 (2016).
2. Wen J., Syed B., Leapart J., Shehabat M., Ansari U., Akhtar M., Razick D., Pai D.: Clin. Endocrinol. 102, 3 (2025).

3. Thevis M., Geyer H., Kamber M., Schänzer W.: Drug Test. Anal. 1, 387 (2009).
4. Feider C. L., Krieger A., DeHoog R. J., Eberlin L. S.: Anal. Chem. 91, 4266 (2019).
5. Gaudio M. C., Aureli F., Manna L., Borioni A., Maccelli A., Raimondo M., De Giorgi D., Bartolomei M.: Sex. Med. 12, 2 (2024).

J. Knytllová^a, A. Nemeškalová^{a,b}, and M. Volný^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague, Czech Republic, ^b Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic): **Ambient Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Selective Androgen Receptor Modulators**

Ambient ionization mass spectrometry (AMS) enables sample analysis in its native state with minimal preparation. This study explores the use of a commercial Sicrit® ion source, based on dielectric barrier discharge ionization, for detecting selective androgen receptor modulators (SARM) in dietary supplements, commonly abused for muscle mass enhancement. Tablets and capsules were dissolved in methanol and analyzed directly using the Sicrit® source coupled to an Orbitrap Exploris 120 mass spectrometer in positive mode. For confirmation, samples were also analyzed by LC-UV-MS. While LC-UV-MS provided superior quantitative analysis, AMS demonstrated strong qualitative agreement, indicating its potential for rapid screening of illegal anabolic substances in dietary supplements.

Keywords: ambient ionization, mass spectrometry, selective androgen receptor modulators



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

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PŘI STUDIU STABILITY A DEGRADACE FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK

MICHAEL SKÁLA a TOMÁŠ KRÍŽEK

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 2030/8, 128 00 Praha 2, Česká republika
skalamic@natur.cuni.cz

Klíčová slova: HPLC, radikál, radikálový scavenger, UV-Vis detekce, TEMPO, GSH, GSSG, askorbová kyselina, kumarin

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20250010>

Úvod

Chemické radikály jsou jedním z nejfrekventovanějších témat moderního pojetí chemie. Tyto molekuly, typické přítomností nepárového elektronu ve valenční sféře, vytváří řadu otazníků ve světě průmyslové chemie, chemických technologií i medicínských oborů. Jedním z odvětví, která se s volnými radikály potýkají, je farmaceutický průmysl. Přítomnost volných radikálů v léčivých přípravcích je nutno sledovat, protože může vést k degradaci účinné látky (API) a zkrácení doby trvanlivosti léčiva, často za vzniku neúčinných až toxických produktů. Volné radikály se do léčiva dostávají převážně z kontaminovaných přídatných látek (excipientů) – plnidel, barviv, sladidel atd. Chemická syntéza těchto složek probíhá často jako polymerizační reakce s použitím radikálů nebo radikálových činidel jako katalyzátorů. Ty i přes procesy přechištění zůstávají v excipientech a mohou se tak dostat až do léčiv samotných¹.

Ač se v přírodě jedná o molekuly různorodého tvaru a velikosti, jedna vlastnost je prakticky všem společná – reagují takřka se všemi látkami, jsou přítomné téměř všude a jejich stanovení je značně obtížné. Malé radikály disponují poločasem života v řádech nanosekund až mikrosekund, pro stanovení těchto radikálů je nejvhodnější analytickou metodou elektronová paramagnetická rezonance (EPR) a pro jejich zachycení jsou nutné speciální nitronové radikálové pasti. Jiné radikály přežívají déle, existují dokonce i radikály plně stabilní a separovatelné. Pro jejich stanovení se dají využít běžné laboratorní metody. Nejčastěji voleným postupem je eliminace radikálu pomocí radikálového scavengeru (lze přeložit z angličtiny jako „mrchožrout“), to jsou molekuly schopné zbavit radikál jeho typické radikálové struktury, a tedy i jeho typického radikálového chování tím, že přijmou nepárový elektron do své struktury nebo radikálu předají druhý elektron do

páru. Mezi radikálové scavengery lze zařadit i řadu v přírodě se vyskytujících látek – redukovaný glutathion, askorbovou kyselinu (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), kumarinové deriváty, β -karoten aj.²

Ve své práci se snažím nalézt vhodný radikálový scavenger a vyvinout metodu, jež by umožňovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-Vis spektrometrickým detektorem univerzální kvantifikaci radikálů obsažených ve farmaceutických excipientech, což by napomohlo používání chemicky čistších excipientů při výrobě, a tím pádem i prodloužení doby trvanlivosti léčiv. S tím jde ruku v ruce snížení množství farmaceuticky aktivního odpadu. V případě úspěšného vývoje metody budou provedeny kvantifikace radikálů v různých farmaceutických excipientech a bude provedeno srovnání hodnot. Práce rovněž povede k lepší charakterizaci reakcí radikálových scavengerů s radikály, převážně s radikálem TEMPO, který je používán jako modelový radikál.

Experimentální část

Chromatograf

Pro separaci byl využíván kapalinový chromatograf od společnosti Agilent Technologies (USA) s pumpou a kolonovým oddílem série 1260 Infinity. Detektorový oddíl s diodovým polem a injektorový oddíl byly staršího typu 1200. Analýzy byly prováděny na koloně série Kinetex C₁₈ (Phenomenex, USA) obsahující částice technologie core-shell o velikosti 2,6 μ m s velikostí pórů 100 Å. Délka chromatografické kolony byla 100 mm s vnitřním průměrem 2,1 mm.

Pro experimenty s hmotnostní detekcí byl za stejných chromatografických podmínek použit chromatograf Vanquish s MS Orbitrap Exploris 120 od výrobce Thermo Fisher Scientific (USA).

Další vybavení

Analytické váhy Precisa 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko); automatické pipety Socorex série Acura 825 (Socorex Isba, Švýcarsko); systém čištění vody pro HPLC Millipore Milli-Q (Merck Millipore, USA).

Chemikálie

Acetonitril HPLC kvality (VWR International, USA); trifluoroctová kyselina p.a.; stabilní radikál TEMPO 99 %; L-glutathion redukovaný p.a.; L-glutathion oxidovaný p.a.; kumarin p.a. (vše Sigma-Aldrich, Německo); askorbová kyselina p.a. (Lach-Ner, Česká republika).

Výsledky a diskuse

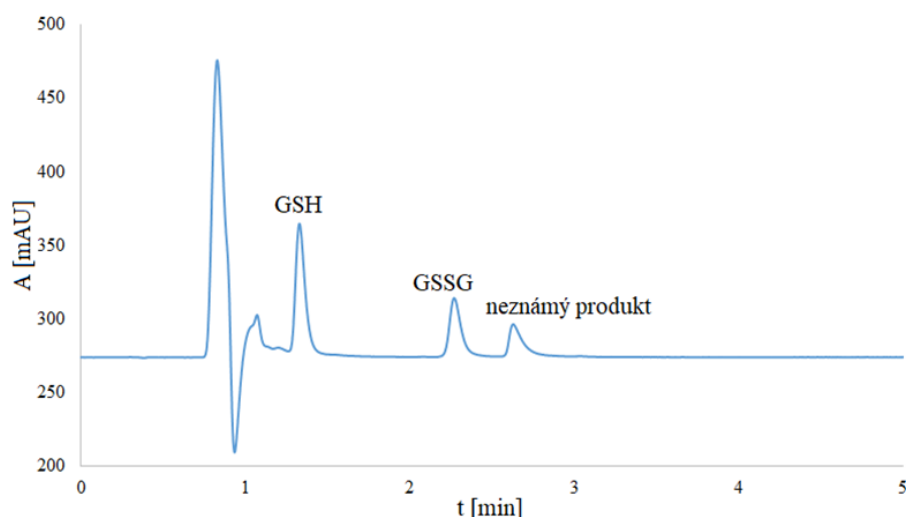
Pro vývoj metody byl jako radikálový standard zvolen radikál TEMPO. Jedná se o červenou krystalickou látku plně stabilní v radikálové formě, zároveň je to látka velmi dobře dostupná.

Jako první testovaný radikálový scavenger byl zvolen redukovaný L-glutathion (GSH). Jedná se o jeden z nejznámějších buněčných antioxidantů, který přispívá k eliminaci radikálů i na buněčné úrovni jednoduchým mechanismem předání vodíku za vzniku oxidované formy (GSSG). Otázkou bylo, jakým způsobem bude reakce probíhat *in vitro* bez přítomnosti příslušných enzymů.

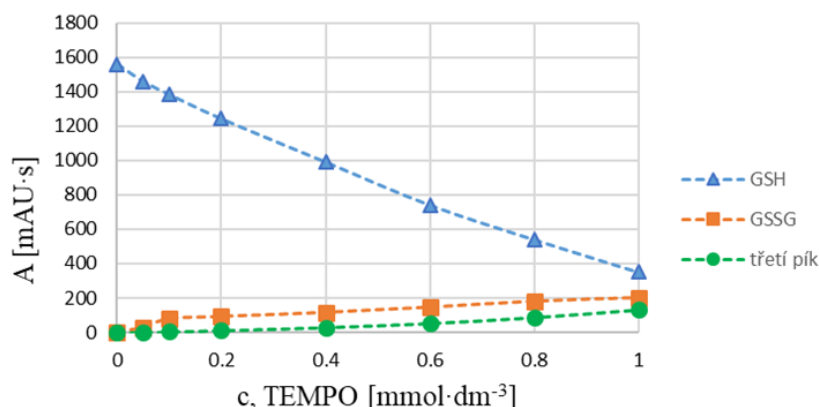
Nejprve bylo třeba optimalizovat metodu separace GSH a GSSG. Jedná se o vysoce polární analyty, které vykazují nízkou afinitu k nepolárním stacionárním fázím. Prvotní obtíže se zadržením GSH a GSSG na RP-HPLC vyřešil přidavek iontové párové činidla, trifluoroctové

kyseliny (TFA), do mobilní fáze. Koncentrace TFA byla zvolena jako 0,1 % (pH = 2), objemový poměr tohoto roztoku a acetonitrilu byl 98:2. V takové směsi jsou oba peptidy kladně nabitě a dochází tak k vhodnému iontovému párování s TFA. Detekce byla prováděna při 215 nm, kde absorbují peptidové vazby glutathionu.

Při předpokládaném mechanismu reakce přenosem vodíku by jedna molekula GSH byla schopna eliminovat jednu molekulu radikálu TEMPO. Při stejné molární koncentraci by tedy po dosažení ustáleného stavu nemělo být GSH ani TEMPO detekovatelné. Jak se ukázalo, reakce probíhá takřka okamžitě, radikál TEMPO je při reakci spotřebován a není detekovatelný při 215 nm ani ve svém absorpčním maximu 445 nm, nicméně k poklesu koncentrace GSH dochází přibližně ze 75 % a nárůst koncentrace GSSG je minimální. K tomu je na spektru při 215 nm detekovatelný třetí pík některého z vedlejších produktů objevujícího se při vyšších koncentracích radikálu (obr. 1).



Obr. 1. Chromatogram produktů reakce 1mM GSH a 1mM TEMPO



Obr. 2. Vznikající množství produktů a zanikající množství GSH v závislosti na koncentraci radikálu TEMPO

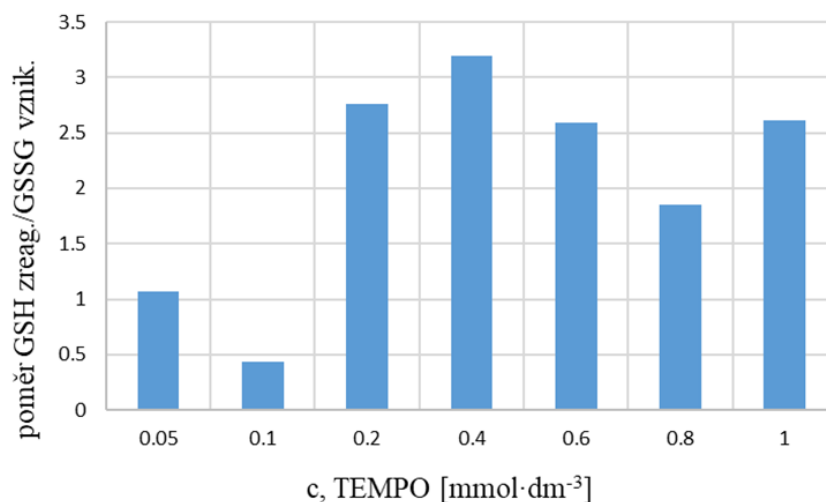
Je tedy zřejmé, že reakce neprobíhá pouze mechanismem přenosu vodíku, ale z větší části se uplatňuje mechanismus jiný. Druhou možností je, že TEMPO reaguje i s jinými složkami roztoku, nejenom s GSH (cit.³). Plochy píků produktů reakce naměřené po třiceti minutách reakce 1mM GSH s postupně narůstající koncentrací TEMPO jsou znázorněny na obr. 2. Je vidět, že při vyšších koncentracích radikálu vzniká menší množství GSSG a dochází k intenzivnějšímu nárůstu třetího píku. S vzrůstající koncentrací radikálu logicky klesá koncentrace výchozího GSH, s ní ale neroste koncentrace vzniklého GSSG tak rapidně, jak znázorňuje sloupcový diagram poměru zreagovaného GSH a vzniklého GSSG (obr. 3).

Po logické úvaze následovala MS analýza produktů reakce. Třetí pik pozorovaný na HPLC-UV-Vis chromatogramu byl pravděpodobně fragment GSH vznikající při jednom z vedlejších mechanismů reakce a došlo u něj k lepšímu zadržení z důvodu přítomnosti dvojné vazby (142 *m/z*, viz cit.⁴). Z látek elujících v blízkosti času eluce TEMPO lze pozorovat nárůst intenzity pro 158 *m/z* – tedy

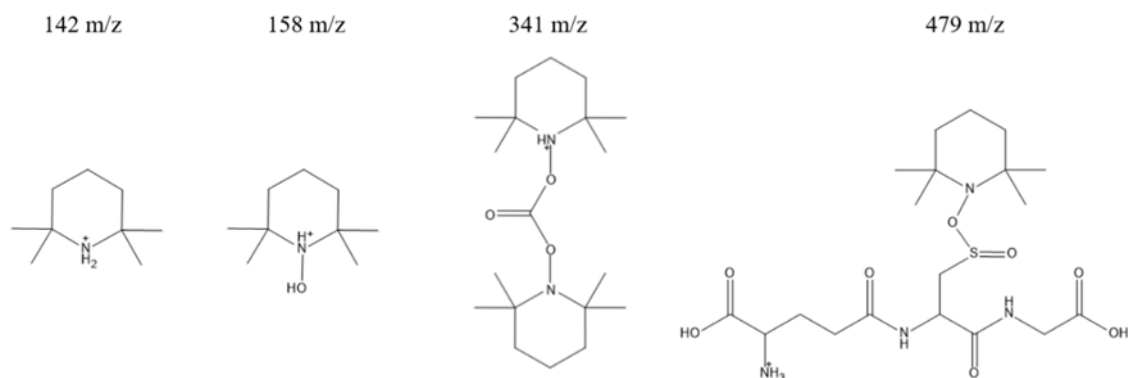
pro námi předpokládaný produkt přenosu vodíku za vzniku TEMPOH – a pro další dva významné píky aduktů TEMPO s GSH u 479 *m/z* a 341 *m/z*. Dále pak lze pozorovat celkový nárůst intenzity pro 142 *m/z* (protonovaný 2,2,6,6-tetramethylpiperidin), odhadované struktury produktů jsou zobrazeny na obr. 4. Oxidace redukované formy glutathionu je tedy dobrým indikátorem přítomnosti radikálů, nicméně lze ji použít pouze k řádovému odhadu koncentrace. Přesná kvantifikace radikálů je problematická z důvodu nelineárního vzniku oxidované formy a velkého množství možných vedlejších produktů radikálové reakce s peptidem, proto bylo od jeho použití ve vývoji metody upuštěno.

Dalším testovaným radikálovým scavengerem byl kumarin, který nereagoval s radikálem vůbec, jedná se pravděpodobně pouze o scavenger hydroxylových radikálů.

V současnosti probíhá testování askorbové kyseliny jako radikálového scavengeru. Jedná se o další látku hojně se vyskytující na buněčné úrovni, a to v relativně vysokých koncentracích. Obtíž je zatím podobnost výchozí



Obr. 3. Poměry zreagovaného GSH a vzniklého GSSG v závislosti na koncentraci radikálu TEMPO



Obr. 4. Předpokládané struktury produktů scavengerové reakce TEMPO a GSH

látky a produktu – askorbové, resp. dehydroaskorbové kyseliny. Obě látky eluují ve stejném čase zatím při všech vyzkoušených podmínkách, čili cílem v blízké době je jejich dostatečná chromatografická separace a následné vytvoření kalibrační závislosti odezvy vzniklého produktu na koncentraci radikálu.

Závěr

Charakterizace reakcí radikálových scavengerů s volnými radikály je stále žhavým tématem moderní doby. Další součástí mé práce bude charakterizace reakce askorbové kyseliny s radikálovým standardem, dále snaha porozumět mechanismu a pokusit se charakterizovat produkty reakce s takto významným biologickým antioxidantem.

LITERATURA

1. Wu Y., Levons J., Narang A. S., Raghavan K., Rao V. M.: AAPS PharmSciTech 12, 1248 (2011).
2. Polterait O.: Curr. Org. Chem. 1, 415 (1997).
3. Ma Y., Loyns C., Price P., Chechik V.: Org. Biomol. Chem. 9, 5573 (2011).
4. Alanazi A. M., Mostafa G. A., Al-Badr A. A., v knize: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 40 (Brittain H. G., ed.), kap. 2, str. 43. Academic Press, London 2015.

M. Skála and T. Křížek (*Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague, Czech Republic*): **Application of Liquid Chromatography in the Study of Stability and Degradation of Pharmaceutically Important Materials**

Nowadays, the determination of free radicals has become one of the main goals in chemical industry, especially in pharmaceuticals, because of the reactivity of radicals and thus the formation of impurities and possibly inactive or toxic products resulting from reactions with active pharmaceutical ingredients. This work focuses on the determination of radicals contained in pharmaceutical excipients using high-performance liquid chromatography on reverse phase (RP-HPLC). As a desired result, we are looking for a radical scavenger that is able to undergo a defined reaction with the radical and linearly produce a quantifiable product. The stable radical molecule (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) is used as a standard of radical behavior. Firstly, the purity of the radical was verified for possible impurities by MS analysis, which showed a high purity of TEMPO. Secondly, the efficiency of several well-known scavengers was tested by reaction with TEMPO. While the reduced glutathione showed a very fast reaction with the radical, the predicted product (in this case oxidized glutathione) did not form linearly, and the subsequently performed MS analysis showed multiple reaction pathways, mostly explained by breakage of the peptide chain. Coumarin was used next in order, which showed no determinable reaction with the radical at all, even after increasing the temperature. At present, the main attention is focused on ascorbic acid and its oxidation product dehydroascorbic acid. We expect the scavenging mechanism to be very similar to that of reduced glutathione, however, the possibilities of side products are limited, the main issue at this point being the RP-HPLC separation of ascorbic and dehydroascorbic acid, respectively.

Keywords: HPLC, radical, radical scavenger, UV-Vis detection, TEMPO, GSH, GSSG, ascorbic acid, coumarin



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

VYUŽITIE VSÁDZKOVEJ INJEKČNEJ ANALÝZY PRI ELEKTROCHEMICKOM STANOVENÍ WARFARÍNU

VICTÓRIA ŽUŽIČOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 00 Praha 2, Česká republika
victoria.zuzicova@natur.cuni.cz

Kľúčové slová: warfarín, vsádzková injekčná analýza, ampérometria, sieťotlačová uhlíková elektróda, analýza liečiv

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20250014>

Úvod

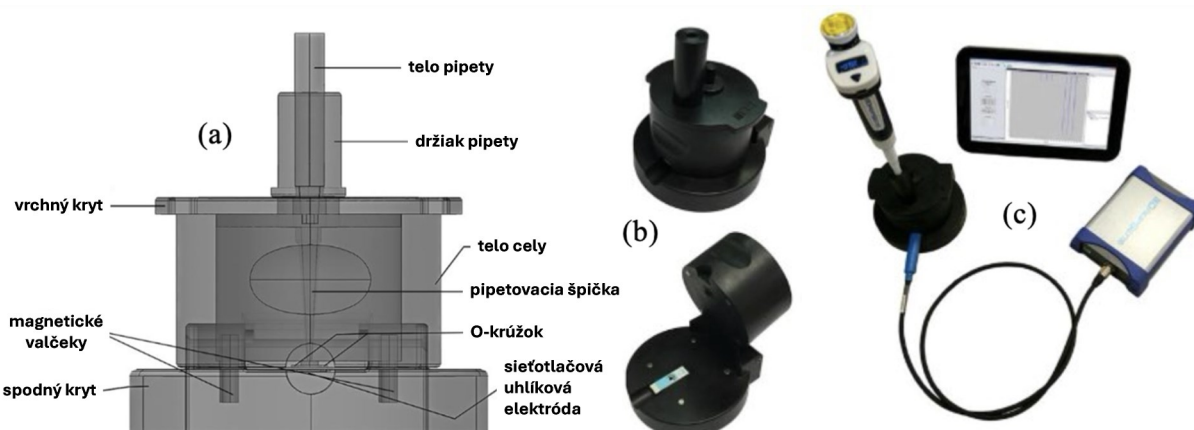
Vsádzková injekčná analýza (z angl. batch injection analysis, BIA) je elektroanalytická technika, ktorej podstatou je dávkovanie malého objemu vzorky priamo k povrchu detektoru. Odpoveď má tvar píku s nasledujúcim rýchlym poklesom signálu na základnú líniu. Medzi hlavné výhody tejto techniky patrí rýchlosť analýzy, nízka spotreba vzorky a ďalších chemikálií, ekonomická a priestorová nenáročnosť a vďaka využitiu automatickej pipety aj reprodukovateľnosť výsledkov. BIA môže byť kombinovaná s viacerými druhmi detekcie s využitím elektrochemických či optických techník. V tejto práci bola využitá ampérometrická detekcia, ktorej jednou z hlavných výhod je, že vzorku je možné dávkovať do detekčnej cely aj bez prítomnosti základného elektrolytu. BIA v kombinácii s elektrochemickou detekciou nachádza uplatnenie v envi-

ronmentálnej analýze, potravinárskom a farmaceutickom priemysle či v klinickej diagnostike^{1,2}.

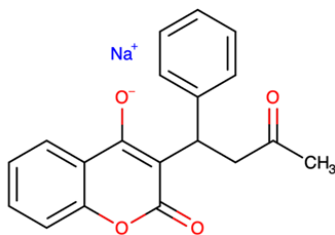
S cieľom miniaturizácie a automatizácie bývajú čoraz častejšie využívané sieťotlačové elektródy (SPE), ktoré sú navrhnuté v trojelektrodovom systéme zloženom z pracovnej, referenčnej a pomocnej elektródy vytlačených na dosťičke, spravidla z keramiky alebo plastu. Komerčne dostupné tlačené elektródy je možné ďalej modifikovať, a tak sú využívané pre široké spektrum aplikácií³. Spojenie BIA-SPE (obr. 1) prináša výhody v podobe jednoduchej manipulácie, malej spotreby vzorky, nízkych nákladov, rýchlosti analýzy a robustnosti, a tak predstavujú vhodný systém pre prenosné zariadenia⁴.

Warfarín (obr. 2), systematickým názvom 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-fenylbutyl)kumarín, je antikoagulačné liečivo predpisované pacientom pri prevencii a liečbe žilovej trombózy a komplikáciách spojených s fibriláciou predsiení a náhradou srdcových chlopní. Ako liečivo sa využíva jeho sodná soľ, ktorá je dobre rozpustná vo vode. Warfarín účinkuje prostredníctvom inhibície regenerácie vitamínu K. Tá je potrebná k aktivácii koagulačných faktorov a antikoagulačných proteínov, čím dochádza k narušeniu koagulačnej kaskády⁶. Metódy jeho stanovenia majú vzhľadom k veľmi úzkemu terapeutickému indexu ($2,0\text{--}5,0\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) v praxi zásadný význam. Preto je potrebná presná, rýchla a jednoduchá metóda, pomocou ktorej je možné efektívne určiť hladinu koncentrácie warfarínu pri antikoagulačnej liečbe pacienta. Vyššia dávka môže mať fatálne následky, pretože spôsobuje zvýšené riziko krvácania a závažné komplikácie⁷.

Cieľom tejto práce bolo štúdium elektrochemického chovania warfarínu sodného na sieťotlačovej uhlíkovej elektróde (SPCE). Hlavným predmetom bolo nájdenie



Obr. 1. (a) Schéma BIA-SPE systému; (b) elektrochemická BIA-SPE cely (c); prenosný systém pozostávajúci z BIA-SPE cely, automatickej mikropipety, prenosného potenciostatu a vyhodnocovacieho zariadenia. Prevzaté a upravené z cit.⁵



Obr. 2. Štruktúrny vzorec warfarínu sodného

optimálnych podmienok pre stanovenie uvedenej látky technikou vsádzkovej injekčnej analýzy s ampérometrickou detekciou⁸ (BIA-AD) so zámerom vyvinúť elektroanalytickú metódu pre stanovenie obsahu liečiva v tablete.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

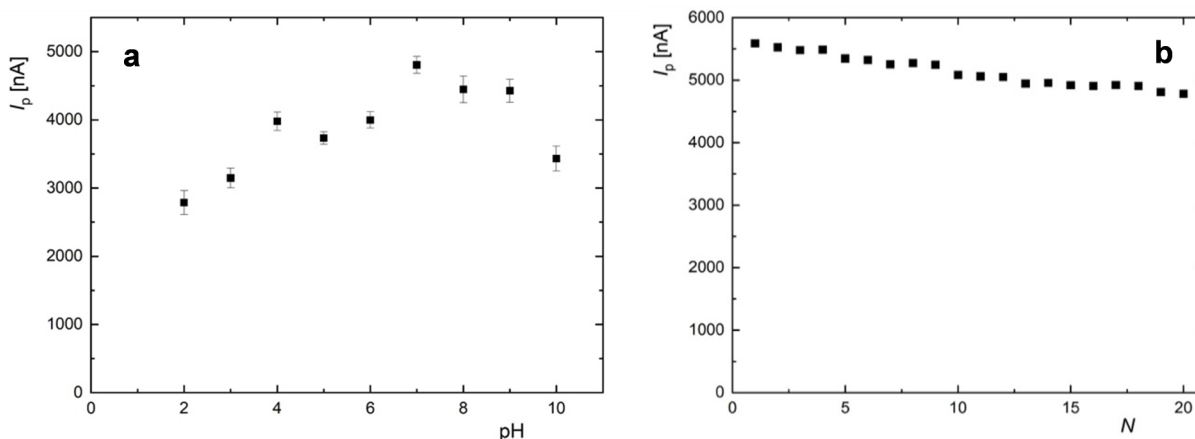
Zásobný roztok warfarínu sodného (WAR, Sigma-Aldrich, USA) o koncentrácii $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ bol pripravený v etanole (98 %, Penta, Praha, ČR). Roztoky WAR o nižšej koncentrácii boli pripravené presným riedením zásobného roztoku WAR základným elektrolytom. Základným elektrolytom bol Brittonov-Robinsonov (BR) pufer, pripravený zmiešaním zásaditej zložky (NaOH (p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentrácii $0,2 \text{ mol l}^{-1}$) a kyslej zložky (85% H_3PO_4 , H_3BO_3 (obidve p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a 99,8% CH_3COOH (p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentrácii kyselín $0,04 \text{ mol l}^{-1}$). Pre stanovenie obsahu účinnej látky v liekovej forme boli využité tablety Warfarin Orion (Orion Corporation, Fínsko) s obsahom účinnej látky v tablete 5 mg.

Aparatúra

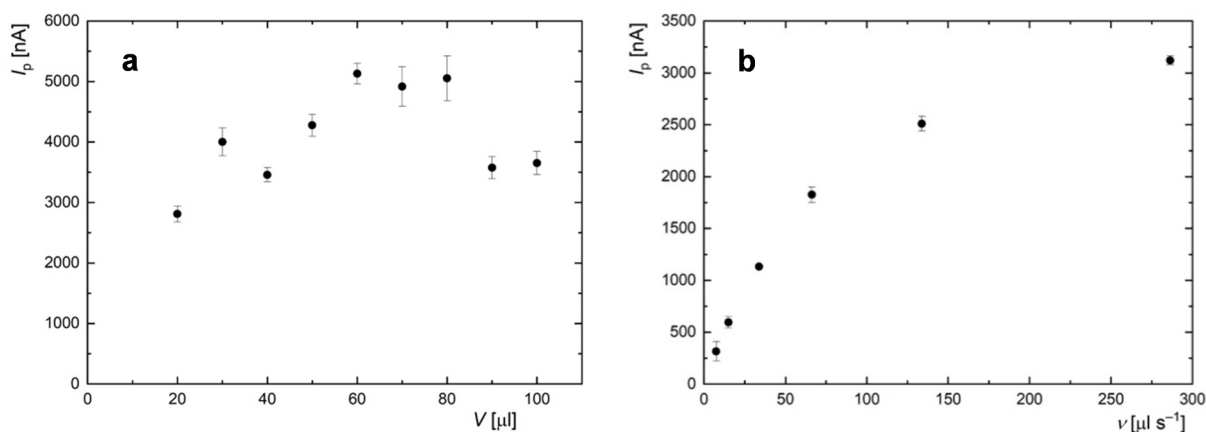
Na meranie bola využitá zostava BIASPE02 (DropSens, Španielsko) pozostávajúca z cely a programovateľnej pipety Gilson PIPETMAN M ($20\text{--}200 \mu\text{l}$). Pipeta bola programovaná pomocou softwaru Pipetting Mode Builder (Gilson, USA). Pre záznam merania bola využitá zostava Eco-Tribo Polarograf so softwarom Polar Pro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha, ČR) riadená operačným systémom Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Všetky merania boli uskutočnené v trojelektrodovom zapojení s využitím komerčne tlačenej uhlíkovej elektródy (DRP-110, DropSens, Španielsko). Na meranie pH pri príprave BR pufru bol použitý pH-meter Jenway 3501 (Jenway, Veľká Británia). Spektrofotometrické merania boli vykonané na prístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) ovládanom programom UV-Visible ChemStation 9.01 v kremenných kvetách o hrúbke $1,0 \text{ cm}$.

Výsledky a diskusia

Vplyv pH na elektrochemické chovanie WAR na SPCE bol sledovaný technikou BIA-AD v prostredí BR pufru v rozmedzí pH $2,0\text{--}12,0$. Detekčný potenciál ($+1,0 \text{ V}$) bol zvolený na základe záznamu DC voltampérometrie tak, aby bol väčší ako potenciál oxidačného píku pre všetky hodnoty pH. Pre hodnoty pH $2,0\text{--}10,0$ boli získané dobre vyvinuté ampérometrické píky (dáta nie sú zobrazené) odpovedajúce ireverzibilnej oxidácii WAR. Pri vyšších hodnotách pH dochádzalo k výraznému nárastu pozadia a píky nebolo možné spoľahlivo vyhodnotiť, preto neboli ďalej uvažované. Na obr. 3a je zobrazená závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR na pH. Na základe najvyššej prúdovej odozvy a nízkej relatívnej smerodajnej odchýlky opakovaných stanovení ($n = 5$) bolo prostredie o pH $7,0$ zvolené ako optimálne. Pre zvolené prostredie



Obr. 3. (a) Závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH roztoku zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostrediach BR pufru o pH $2,0\text{--}10,0$; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál $+1,0 \text{ V}$, dávkovaný objem $40 \mu\text{l}$, rýchlosť dávkovania $286,3 \mu\text{l s}^{-1}$. (b) Závislosť I_p na poradovom čísle stanovenia (N) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH $7,0$; detekčný potenciál $+1,0 \text{ V}$, dávkovaný objem $40 \mu\text{l}$, rýchlosť dávkovania $286,3 \mu\text{l s}^{-1}$.



Obr. 4. (a) Závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na dávkovanom objeme roztoku (V) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál +1,0 V, rýchlosť dávkovania $286,3 \text{ μl s}^{-1}$. (b) Závislosť I_p WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na rýchlosti dávkovania roztoku (v) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl

bolo meranie zopakované 20krát po sebe (obr. 3b) na stanovenie opakovateľnosti merania pri koncentrácii WAR $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a bola dosiahnutá uspokojivá relatívna smerodajná odchýlka 4,8 % ($n = 20$).

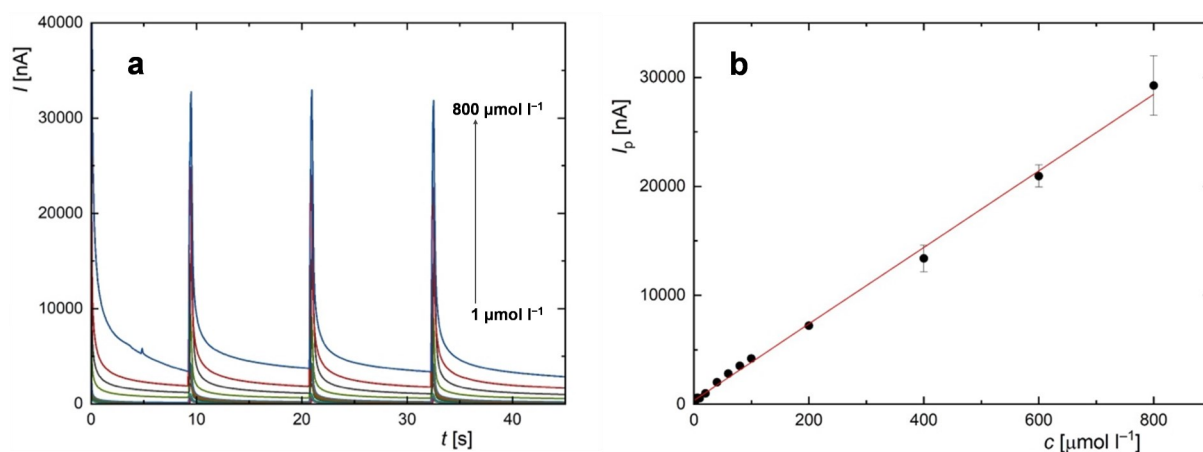
V prostredí BR pufru o pH 7,0 bola sledovaná závislosť signálu analytu na detekčnom potenciáli v rozsahu +0,7 až +1,3 V (dáta nie sú zobrazené). Najvyššia prúdová odozva bola dosiahnutá pri potenciáli +1,0 V, preto bola zvolená ako optimálna pre ďalšie merania. Pri vyšších hodnotách dochádzalo k postupnému nárastu prúdu pozadia.

Ďalšie parametre ovplyvňujúce signál analytu súvisia s nastavením pipety. Obr. 4a znázorňuje vplyv dávkovaného objemu (20–100 μl) a obr. 4b vplyv rýchlosti dávkovania. Ako optimálny bol zvolený objem 60 μl, pri ktorom je dosiahnutá vyššia prúdová odozva a zároveň umožňuje tri

stanovenia v jednom meraní (maximálny objem špičky pipety je 200 μl). Na automatickej pipete je možné nastaviť šesť módov odpovedajúcich rýchlostiam dávkovania $7,5\text{--}286,3 \text{ μl s}^{-1}$. Pri najvyššej rýchlosti boli dosiahnuté dobre vyvinuté píky s najvyššou prúdovou odozvou, preto bola zvolená pre ďalšie merania rýchlosť $286,3 \text{ μl s}^{-1}$.

Koncentračná závislosť WAR v prostredí BR pufru o pH 7,0 bola meraná v rozsahu koncentrácií $1 \cdot 10^{-6} \text{--} 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Ampérogramy pre lineárnu oblasť koncentrácií ($1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) sú uvedené na obr. 5a. Na obr. 5b je zobrazená odpovedajúca koncentračná závislosť s rovnicou regresie $I_p [\text{nA}] = 35,1c [\text{μmol l}^{-1}] + 350$; $r^2 = 0,9989$. Bola stanovená medza detekcie (LOD ; $3\sigma/k$) $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a medza stanoviteľnosti (LOQ ; $10\sigma/k$) $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Za optimálnych podmienok bolo stanovené množstvo WAR v tableťoch Warfarin Orion 5 mg metódou prídavku



Obr. 5. (a) Ampérogramy zaznamenané technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0 pre rozsah koncentrácií roztoku WAR $1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl , rýchlosť dávkovania $286,3 \text{ μl s}^{-1}$. (b) Koncentračná závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) na koncentrácii WAR; chybové úsečky pro $n = 5$; rovnica regresie pre lineárnu oblasť koncentrácií ($1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$): $I_p [\text{nA}] = 35,1c [\text{μmol l}^{-1}] + 350$; $r^2 = 0,9989$

šandardu. Zásobný roztok tablety bol pripravený z navážky 0,1057 g homogenizovanej tablety doplnenej do 100 ml etanolom. Pre meranie boli pripravené 10ml roztoky BR pufru o pH 7,0 s obsahom 200 μl zásobného roztoku liečiva bez prídavku a s prídavkom 25 μl zásobného roztoku šandardu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$), ktorého objem sa v meraných roztokoch zvyšoval vždy o 25 μl . Stanovenie prebiehalo v rozsahu teoretických koncentrácií $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Bola získaná rovnica koncentračnej závislosti prídavku šandardu v tvare $I_p [\text{nA}] = 79,9c [\mu\text{mol l}^{-1}] + 1865$; $r^2 = 0,9986$.

Ako referenčná metóda k ampérometrickému stanoveniu WAR v liekovej forme bola využitá UV-VIS absorpčná spektrofotometria. Stanovenie bolo vykonané metódou prídavku šandardu v rozsahu teoretických koncentrácií $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Koncentračná závislosť bola zostrojená z hodnôt absorbiancií v maxime ($\lambda_{\text{max}} = 308 \text{ nm}$). Bola získaná rovnica koncentračnej závislosti prídavku šandardu v tvare $A_{308} [\text{AU}] = 0,0153c [\mu\text{mol l}^{-1}] + 0,431$; $r^2 = 0,9990$.

Z parametrov koncentračných závislostí bola vypočítaná hmotnosť účinnej látky v jednej tablete a vzťahnutá voči hodnote deklarovanej výrobcom, teda 5 mg. Pre ampérometrické stanovenie technikou BIA bola stanovená výťažnosť 103,8 %, pre spektrofotometrické stanovenie 99,6 %. Výťažnosť vyvinutej ampérometrickej metódy voči analytickej referenčnej metóde bola určená na 104,2 %.

Záver

V tejto práci boli hľadané optimálne podmienky pre stanovenie warfarínu sodného (WAR) technikou vsádzkovej injekčnej analýzy s ampérometrickou detekciou (BIA-AD) na sieťotlačovej uhlíkovej elektróde (SPCE) s cieľom využiť metódu pre stanovenie obsahu účinnej látky v liekovej forme. Optimalizácia experimentálnych podmienok prebiehala v prostredí Brittonovho-Robinsonovho (BR) pufru o pH 7,0. Boli nájdené optimálne parametre stanovenia: detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl , rýchlosť dávkovania 286,3 $\mu\text{l s}^{-1}$. Lineárna oblasť koncentračnej závislosti bola určená v rozsahu $1,0 \cdot 10^{-6} - 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a bola dosiahnutá medza detekcie $LOD = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a odpovedajúca medza stanoviteľnosti $LOQ = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Vyvinutá metóda bola využitá pre stanovenie obsahu účinnej látky v tabletách Warfarin Orion 5 mg a bola porovnávaná s UV-VIS absorpčnou spektrofotometriou. Výťažnosť vyvinutej ampérometrickej metódy voči analytickej referenčnej metóde bola určená na 104,2 %.

BIA-AD v spojení s SPCE sa v tejto práci preukázala ako rýchla, efektívna, jednoduchá a cenovo nenáročná metóda na stanovenie látok vo farmaceutických vzorkách.

LITERATÚRA

1. Quintino M. S. M., Angnes L.: *Electroanalysis* 16, 513 (2004).
2. Haššo M., Švorc L.: *Monatsh. Chem.* 153, 985 (2022).
3. Couto R. A. S., Lima J. L. F. C., Quinaz M. B.: *Talanta* 146, 801 (2016).
4. Stefano J. S., Dias A. C., Arantes I. V., Costa B. M., Silva L. A., Richter E. M., Banks C. E., Muñoz R. A.: *Electroanalysis* 31, 518 (2018).
5. Richter E. M., Tormin T. F., Cunha R. R., Silva W. P., Pérez-Junquera A., Fanjul-Bolado P., Hernández-Santos D., Muñoz R. A. A.: *Electroanalysis* 28, 1856 (2016).
6. Ufer M.: *Clin. Pharmacokinet.* 44, 1227 (2005).
7. Saeedi L., Ahmadi S., Thompson M., Hashemi P., Ramezani Z.: *Chemosensors* 10, 44 (2022).
8. Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 113, 703 (2019).

V. Žužičová and V. Vyskočil (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, Czech Republic): **Application of Batch Injection Analysis in the Electrochemical Determination of Warfarin**

In this work, the optimum conditions for the determination of warfarin sodium (WAR) by the technique of batch injection analysis with amperometric detection (BIA-AD) on a screen-printed carbon electrode (SPCE) were sought in order to use the method for the determination of the content of the active substance in the dosage form. Optimization of the experimental conditions was carried out in a Britton-Robinson (BR) buffer medium at pH 7.0. The optimum determination parameters were found: a detection potential of +1.0 V, a dosing volume of 60 μL , and a dosing rate of 286.3 $\mu\text{L s}^{-1}$. The linear region of concentration dependence was determined in the range of $1.0 \cdot 10^{-6} - 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, and the limit of detection $LOD = 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and the corresponding limit of quantification $LOQ = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ were achieved. The developed method was applied for the determination of the active substance content in Warfarin Orion 5 mg tablets and was compared with UV-VIS absorption spectrophotometry. The recovery of the developed amperometric method against the analytical reference method was determined to be 104.2%. The BIA-AD in conjunction with the SPCE was demonstrated in this work to be a rapid, efficient, simple, and inexpensive method for the determination of substances in pharmaceutical samples.

Keywords: warfarin, batch injection analysis, amperometry, screen-printed carbon electrode, drug analysis



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

OBSAH

<i>J. Knytllová, A. Nemeškalová, M. Volný</i>	Ambientní hmotnostní spektrometrie pro analýzu selektivních modulátorů androgenního receptoru	7
<i>M. Skála, T. Křížek</i>	Využití kapalinové chromatografie při studiu stability a degradace farmaceuticky významných látek	10
<i>V. Žužičová, V. Vyskočil</i>	Využitie vsádzkovej injekčnej analýzy pri elektrochemickom stanovení warfarínu	14

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Knytlová J. 7

Křížek T. 10

Nemeškalová A. 7

Skála M. 10

Volný M. 7

Vyskočil V. 14

Žužičová V. 14

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 23 (2025), čís./no. 1 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) • evidenční číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal, F. Švec; Webové stránky: P. Drašar • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč • Pokyny pro autory najdete na <http://www.ccsss.cz> , zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Molekulární námět na obálce: Vladimír Palivec • Dáno do tisku 20.3.2025.