

IS-01

IZOLACE, SEPARACE A CHARAKTERIZACE
ROSTLINNÝCH GLYCEROLYKOLIPIDŮMARIE ZÁBRANSKÁ^{a,b}, VLADIMÍR VRKOSLAV^a
a JOSEF CVAČKA^a^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^b Katedra analytické chemie PrF UK, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
marie.zabranska@uochb.cas.cz

Mezi rostlinné glyceroglykolipidy patří monogalaktosyldiacylglyceroly (MGDG), digalaktosyldiacylglyceroly (DGDG) a sulfoquinovosyldiacylglyceroly (SQDG). Tyto lipidy utváří strukturu biologických membrán fotosyntetizujících organismů. Jednotlivé molekuly se liší přítomností různých mastných kyselin vázaných v poloze *sn*-1 a *sn*-2 na glycerolu. Zájem o studium těchto lipidů vzrůstá hlavně díky jejich protinádorovým a protizánětlivým účinkům¹.

V rámci této práce byly lipidy izolovány z rostlin pomocí modifikované Folchovy metody a tenkovrstvé chromatografie na silikagelu. Získané glyceroglykolipidy byly separovány na koloně Nucleosil C18. K charakterizaci lipidů byla použita hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací v kladném i záporném módu. Používán byl hmotnostní spektrometr s nízkým i vysokým rozlišením.

Separace MGDG bylo docíleno v binárním systému methanolu a vody, přičemž počáteční složení gradientu odpovídá 75 % methanolu a 25 % vody. Celková doba analýzy je 90 minut. Pro separaci DGDG je nutné použít ternární gradient acetonitrilu, methanolu a vody. Počáteční složení optimalizované mobilní fáze odpovídá 65 % acetonitrilu a 35 % vody, na konci analýzy je v mobilní fázi přítomen pouze methanol. Celková doba analýzy je 80 minut. V rámci studia elučního chování SQDG byly doposud provedeny dílčí experimenty. V současné době je vyvíjen izolační postup, který by zajistil účinnější extrakci těchto lipidů z rostlinného materiálu.

Pomocí optimalizovaných metod byly identifikovány oxidované i neoxidované formy glyceroglykolipidů. Bylo zjištěno, že pro správnou identifikaci mastných kyselin vázaných na glycerolu je nutné využití vysokého rozlišení, protože spektra oxidovaných a neoxidovaných forem jsou velmi podobná.

Optimalizované metody byly mimo jiné použity pro charakterizaci MGDG a DGDG v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Celkem bylo identifikováno 73 galaktolipidů, přičemž 27 z nich bylo popsáno nově (16 oxidovaných/11 neoxidovaných).

Tato práce vzniká za podpory grantu GA ČR 203/09/0139, výzkumných záměrů Z4 055 0506, MSM 0021620857 a projektu SVV 2012-265201.

LITERATURA

1. Maeda N., Kokai Y., Ohtani S., Hada T., Yoshida H., Mizushima Y.: Food Chem. 112, 205 (2009).

IS-02

VYUŽITÍ ELEKTROD NA BÁZI BÓREM
DOPOVANÉHO DIAMANTU A PLATINY
V AMPÉROMETRICKÉ DETEKCÍ AMINODERIVÁTŮ
NAFTALENU A BIFENYLU V HPLCJAROSLAVA ZAVÁZALOVÁ, HANA DEJMKOVÁ,
KAROLINA PECKOVÁ a JIŘÍ BAREKUniverzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2
jaroslava.zavazalova@natur.cuni.cz

Aminoderiváty naftalenu a bifenyly jsou, jakož i jiné aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH), prokázané či podezřelé karcinogeny a mutageny^{1,2}. Polohové isomery organických sloučenin jako chemická individua mohou mít různé biologické účinky. Z tohoto důvodu je žádoucí je od sebe odlišit. Elektrochemicky oxidovatelná aminoskupina umožňuje elektrochemickou detekci APAH s využitím tradičních i netradičních elektrodových materiálů, např. na bázi bórem dopovaného diamantu. Ten si získal oblibu především díky širokému potenciálovému oknu, odolnosti vůči pasivování a mechanické a elektrochemické stabilitě³. Tato práce se zabývá možností ampérometrické detekce vybraných genotoxických aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, konkrétně 1-aminonaftalenu, 2-amino-naftalenu, 2-aminobifenyly a 4-aminobifenyly, v HPLC.

Jako pracovní elektrody ampérometrického detektoru byly použity platinová elektroda v mikrocylindrickém³ a tubulárním⁴ uspořádání a bórem dopovaná diamantová elektroda ve wall-jet uspořádání. Byly optimalizovány detekční podmínky, změřeny kalibrační závislosti a určeny meze stanovitelnosti jednotlivých látek a porovnány pracovní charakteristiky jednotlivých detektorů. Dále byla vyvinuta metoda stanovení nanomolárních koncentrací studovaných látek v lidské moči pomocí HPLC-ED s využitím předběžné separace a prekoncentrace pomocí extrakce na tuhé fázi.

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a KONTAKT (AMVIS) projekt ME10004), Univerzitou Karlovou v Praze (projekt SVV 2012-265201, projekt UNCE 2012/44 Center for Supramolecular Chemistry), a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151). JZ děkuje Univerzitě Karlově, Přírodovědecké fakultě (projekt STARS) za finanční podporu.

LITERATURA

1. <http://www.iarc.fr/en/publications/list/monographs/>, staženo 5. 3. 2012.
2. Cheung Y., Lewis D. F. V., Ridd T. I., Gray T. J. B., Ioannides C.: Toxicology 118, 115 (1997).
3. Pecková K., Musilová J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. 39, 148 (2009).
4. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Barek J.: Chem. Listy 100, 124 (2006).
5. Cvačka J., Opekar F., Barek J., Zima J.: Electroanalysis 12, 39 (2000).

1S-03

SEPARACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK NA MONOLITICKÝCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍCH

MAGDA STÁNKOVÁ, JIŘÍ URBAN, VERONIKA ŠKERÍKOVÁ a PAVEL JANDERA

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
magda.stankova@student.upce.cz

Současným trendem v kapalinové chromatografii je miniaturizace, což umožňuje použití drahých aditiv, snížit spotřebu mobilních fází i množství dávkaného vzorku. Použití monolitických stacionárních fází v kapilární chromatografii je velmi výhodné z hlediska jejich snadné přípravy přímo uvnitř křemenné kapiláry. Monolit je souvislý kus porézního materiálu, který vyplňuje celý prostor kolony a připravuje se radikálovou polymerací směsi obsahující funkční monomer, síťující monomer, porogenní rozpouštědla a iniciátor reakce.

Za účelem zvýšení účinnosti separace nízkomolekulárních látek byl studován vliv délky řetězce síťujícího monomeru v polymetakrylátových monolitických kolonách. Základní polymerační směs obsahovala funkční monomer lauryl metakrylát a ethylen dimetakrylát jako síťující monomer. Ten byl v polymerační směsi postupně nahrazován dimetakryláty s různou délkou řetězce mezi dvěma metakrylátovými jednotkami. Postupnou optimalizací byla pro chromatografii v systému obrácených fází připravena kolona umožňující velmi rychlou izokratickou separaci směsi šesti alkybenzenů pod dvě minuty. Její účinnost dosáhla 71 000 teoretických pater/metr pro zadržovanou látku benzen.

Silně polární látky jsou velmi těžko dělitelné v systému obrácených fází, a proto byla polymerační směs optimalizována také pro použití v chromatografii hydrofilních interakcí, která umožňuje dostatečnou retenci pro jejich rozdělení. Lauryl metakrylát byl nahrazen zwitteriontovým funkčním monomerem a po optimalizaci složení polymerační směsi za použití různých síťujících monomerů byla vybrána kolona s účinností 69 000 teoretických pater/metr pro zadržovanou látku thiomocovinu.

Optimalizované kolony byly použity pro separace komplexních směsí fenolických látek. Dále byl studován vliv pracovní teploty na kvalitu separace a získané poznatky byly aplikovány v dvourozměrné kapalinové chromatografii.

Připravené monolitické kolony mohou být s úspěchem použity všude tam, kde je potřeba získat rychlé a přesné informace o složení komplexních směsí polárních i nepolárních látek v malém množství vzorku. Je tedy možné je využít pro analýzy potravinářských vzorků, analýzy vzorků životního prostředí anebo separace biologicky aktivních látek.

Tato práce vznikla za podpory projektu GA ČR P206/12/0398.

1S-04

STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASY POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V OFFLINE A ONLINE USPOŘÁDÁNÍ**TOMÁŠ KRÍŽEK^a, VERONIKA DOUBNEROVÁ^b, HELENA RYŠLAVÁ^b a PAVEL COUFAL^a**

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, ^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
krizek@natur.cuni.cz

β -N-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) katalyzuje hydrolýzu koncových N-acetylglukosaminových a N-acetyl-galaktosaminových jednotek oligosacharidů a glykokonjugátů^{1,2}. U hub a rostlin je součástí binárních chitinolytických systémů, které hrají důležitou roli při regeneraci buněčných stěn, uchycení organismu k podložce a podobně. Hexosaminidasa se však vyskytuje i u člověka, kde se účastní degradčních procesů.

V této práci byla vyvinuta elektroforetická metoda pro stanovení N,N',N''-triacetylchitotriosy, N,N'-diacetylchitobiosy a N-acetylglukosaminu, jako substrátů a produktů studovaného enzymu. Metoda byla úspěšně využita pro automatizované sledování průběhu reakce a pro stanovení některých vlastností enzymu, jako je závislost aktivity na pH nebo určení substrátové specifity.

Kromě klasického provedení v tzv. offline uspořádání, tedy s enzymovou reakcí probíhající ve vialce mimo elektroforetický systém, jsou studovány také možnosti využití tzv. online přístupu, kdy k mísení substrátu a enzymu, jejich reakci a separaci produktů dochází přímo uvnitř kapiláry. Konkrétně jde o využití metody „Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles“ (TDLFP)³, která na rozdíl od dřívějších online metodik nevyžaduje znalost elektroforetických pohyblivostí enzymu a substrátu. Nespornou výhodou online přístupu je minimální spotřeba substrátu a enzymu, která se pohybuje v řádu stovek nanolitů. Vysoký stupeň automatizace s sebou přináší zvýšení reprodukovatelnosti a snížení rizika kontaminace nebo ztráty vzorku.

Tato práce vznikla za podpory Univerzity Karlovy v Praze (projekt SVV 2012-265201), GAUK (projekt 710) a MŠMT ČR (projekt MSM0021620857).

LITERATURA

1. Plíhal O., Sklenář J., Hofbauerová K., Novák P., Man P., Pompach P., Kavan, D., Ryšlavá H., Weignerová L., Charvátová-Pišvejcová A., Křen V., Bezouška K.: Biochemistry 46, 2719 (2007).
2. Ettrich R., Kopecký V., Hofbauerová K., Baumruk V., Novák P., Pompach P., Man P., Plíhal O., Kutý M., Kulík N., Sklenář J., Ryšlavá H., Křen V., Bezouška K.: BMC Struct. Biol. 7, 32 (2007).
3. Okhonin V., Liu X., Krylov S. N.: Anal. Chem. 77, 5925 (2005).

1S-05**ŠTÚDIUM MOŽNOSTÍ ANALÝZY SACHARIDOV V PROTEÍNOVÝCH VZORKÁCH****VERONIKA KOMOROWSKA a MILAN HUTTA**

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
komorowska@fns.uniba.sk*

Práca bola zameraná na počiatočné overenie možnosti analýzy sacharidov vyskytujúcich sa vo vzorke popri látkach proteínového charakteru. Výskum sme vykonali na modelovej vzorke, ktorú predstavoval výživový doplnok s liečebným účinkom s komerčným názvom Wobenzym, ktorý obsahuje šesť druhov enzýmov a medzi pomocnými látkami aj monohydrát laktózy a sacharózu. Vyvinuli sme jednoduchú a rýchlu metódu úpravy vzorky na odstránenie proteínov pomocou prídavku acetonitrilu a následnej úpravy na sorbente Silasorb Amín. Na separáciu sacharidov sme využili HILIC-HPLC-ELSD metódu. Obsah sacharózy v jednej tablete výživového doplnku s hmotnosťou 300 mg sme stanovili na $21,1 \pm 0,7$ mg a laktózy na $18,9 \pm 0,9$ mg.

Postupy a metódy využité v tejto práci budú ďalej využívané pri analýze glykoproteínov na našom pracovisku, na ktorých správnu identifikáciu je vhodné proteínovú a sacharidovú zložku analyzovať osobitne.

Táto práca vznikla vďaka podpore projektu Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov, ITMS projektu: 26240220034. Agentúra Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ: Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.

1S-06**CHARACTERIZATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS COMPOSITION OF DISTILLATE OBTAINED FROM SORBUS DOMESTICA BY COMPREHENSIVE GAS CHROMATOGRAPHY****OLGA VYVIURSKA^a, IVAN ŠPÁNIK^a, ANTONIA JANÁČOVÁ^a a SOLOMIYA PYSAREVSKA^{a,b}**

*^a Institute of Analytical Chemistry, Slovak University of Technology, 812 37 Bratislava, Slovakia, ^b Department of Analytical Chemistry, Ivan Franko National University, 79000 Lviv, Ukraine
olga.vyviurska@stuba.sk*

Recently, a great deal of emphasis has been placed on the protection of national products accordingly to European Union legislation. For instance, alcoholic beverages made from fruits of Service Tree (*Sorbus Domestica*) are specified for Slovakia and Czech Republic region. These distillates are often valued by experts due to their specific aroma and taste characteristics, which are defined by presence of particular

organic compounds. In addition, Service Tree fruits are famous for its antioxidant effect and a few studies have been devoted to this question^{1,2}.

Thus, our work was devoted to determination of volatile organic compounds content of Service tree distillate (Bosaca distillery, Slovakia). Liquid-liquid extraction procedure with pentane was applied for the preconcentration. For the separation and analyzing comprehensive gas chromatography system coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF MS) was used.

In order to obtain a more detailed analysis of the sample two column systems with different separation mechanisms were utilized. Such approach provides a possibility to observe VOC profile of the alcoholic distillate from different points of view. For example, the combination of non-polar HP-PONA (50 m × 0.2 mm × 0.5 μm) column in the first dimension and semi-polar BPX-50 (2 m × 0.1 mm × 1 μm) column is very effective for separation of non-polar compounds and is a typical orthogonal system. Whereas a application of high polar DB-FFAP (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) for the first dimension allows to improve separation of polar compounds and the chromatographic system receives some features of reverse orthogonality. The results obtained from these two column combinations have been compared and more than 400 compounds have been identified. The identification of compounds was performed using the data software and also with application of GC×GC data of standard compounds.

This work was supported by project VEGA no. 1/0972/12.

REFERENCES

1. Termentzi A., Kefalas P., Kokkalou E.: Food Chem. 1234, 106 (2008).
2. Termentzi A., Zervou M., Kokkalou E.: Food Chem. 371, 116 (2009).

1S-07**ANALÝZA SUPRAMOLEKULOVÝCH POVRCHOVÝCH NANOŠTRUKTÚR POMOCOU HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE SEKUNDÁRNYCH IÓNOV****SOŇA HALÁSZOVÁ^a, MONIKA STUPAVSKÁ^a, MONIKA JERIGOVÁ^{a,b} a DUŠAN VELIČ^{a,b}**

*^a Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, ^b Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava
sona.halaszova@gmail.com*

Štúdium povrchových nanoštruktúr je dôležité z hľadiska ich širokého uplatnenia v rôznych aplikáciách. Snahou je študovať komplexné funkčné systémy so špecifickými vlastnosťami. Toto sa dá docieľiť podrobným skúmaním supramolekulových povrchových nanoštruktúr, ktoré v našom projekte z chemického hľadiska pozostávajú z hostiteľskej molekuly β-cykloextrínu, do ktorej je implementovaná nanočastica Fe. Celý tento komplex sa nachádza na zlatom substráte. Tiolova-

né cyklodextríny boli zvolené zámerne, kvôli ich schopnosti tvoriť inklúzné komplexy a schopnosť viazať sa na substrát zlata. Na rozhraní pevnej a plynnej fázy môže dôjsť k inkludovaniu anorganickej molekuly do kavity cyklodextrínu, pričom vzniká supramolekulový komplex. Cyklodextríny sú taktiež schopné vytvárať štruktúry podobné samoposkladaným monomolekulovým vrstvám (Self-Assembled Monolayers, SAM) na povrchoch tuhých planárnych substrátov.

Tvorbu a správanie sa vzniknutých supramolekulových povrchových nanoštruktúr je možné analyzovať technikou hmotnostnej spektrometrie sekundárnych iónov. Pomocou tejto analytickej techniky je možné skúmať fragmentáciu monotiolovaného β -cyklodextrínu a výskyt supramolekulového komplexu na zlatom povrchu. Experiment tvorby inklúzneho komplexu monotiolovaný β -cyklodextrín + Fe je vykonaný priamo v predkomore hmotnostného spektrometra pomocou Knudsenovej efúznej cely. Ďalšou výhodou je vysoké vákuum v hlavnej komore, rovnako ako aj v predkomore, čo zaručuje inertné prostredie merania a prípravy. Hlavným zámerom tohto projektu je podrobné preštudovanie a zefektívnenie prípravy supramolekulových povrchových nanoštruktúr pozostávajúcich z komplexu hostiteľ – hosť (hostiteľ – tiolovaný β -cyklodextrín, hosť – Fe) na zlatom povrchu.

Štúdium tvorby supramolekulových komplexov so železom na substráte je v dnešnej dobe vysokoaktuálna téma¹ vďaka ich možnému uplatneniu v oblasti informačných technológií.

Táto práca vznikla za podpory grantov ERDF OP R&D, Project 'meta-QUTE- Centrum excelentnosti kvantových technológií' a APVV-0491-07.

LITERATÚRA

1. Rabara, L., Aranyosiova, M., Velic, D.: Appl. Surf. Sci. 257, 6 (2011).

1S-08

VLIV PEROXIDU VODÍKU A HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU NA TVORBU MALONDIALDEHYDU V BUŇKÁCH U937

ZUZANA MATUŠKOVÁ^a, MAREK RÁC^b, MICHAL KRUPKA^c a PAVEL ANZENBACHER^a

^a Ústav farmakologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^b Katedra biofyziky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. Listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, ^c Ústav imunologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
zuzu.matuskova@seznam.cz

Malondialdehyd (MDA), jako marker lipidové peroxidace, se používá ke stanovení oxidačního stresu v biologických systémech. Oxidační stres nezahrnuje pouze lipidovou peroxidaci, tedy poškození lipidů, ale také poškození proteinů a DNA. Cílem této studie bylo zjistit, zda jsou lipidy poškozovány společně s proteiny, nebo poškození lipidů probíhá odlišně než je u proteinů. V této studii byly použity buňky lid-

ského monocytárního lymfomu (U937) a k nim byl přidán roztok peroxidu vodíku nebo roztok peroxidu vodíku se síranem železnatým. Tato směs byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byly buňky centrifugovány, pomocí ultrazvuku rozbity a nakonec k nim byl přidán roztok 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). Toto derivatizační činidlo vytvořilo s malondialdehydem komplex MDA-DNPH, který byl měřen pomocí HPLC s UV detekcí při 310 nm (cit.¹). Mobilní fáze byla připravena z 25 mM triethylaminu s pH 3,5 a acetonitrilu v poměru 1:1. Dále byla použita kolona s reverzní stacionární fází C₁₈ a předkolonou se stejnou stacionární fází. Analýza probíhala 10 min při 35 °C. Ze změřených analýz bylo zjištěno, že po přidání peroxidu vodíku k buňkám U937 nedošlo k žádným změnám v hladinách MDA-DNPH ve srovnání s kontrolním vzorkem. Naproti tomu při použití peroxidu vodíku se síranem železnatým, kdy dojde k Fentonově reakci a vzniku hydroxylového radikálu, došlo ve srovnání s kontrolním vzorkem ke čtyřnásobnému nárůstu hladiny MDA-DNPH. Tyto výsledky potvrzují, že lipidy nejsou primárním cílem reaktivních forem kyslíku a k poškození lipidů nestačí jen peroxid vodíku, nýbrž hydroxylový radikál vytvořený Fentonovou reakcí.

*Tato práce vznikla za podpory grantů
CZ.1.05/2.1.00/01.0030, CZ.1.05/2.1.00/01.0007,
MSM6198959215 a MSM6198959223.*

LITERATURA

1. Pilz J., Meineke I., Gleiter Ch. H.: J. Chromatogr., B 742, 315 (2000).

1S-09

VYUŽITÍ FOTOAKTIVOVATELNÝCH NANOSOND A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE KE STUDIU STRUKTURY A INTERAKCÍ CYTOCHROMU P450 2B4 A CYTOCHROMU B₅

TOMÁŠ JEČMEN^{a,b}, MONIKA KOBEROVÁ^b, PETR NOVÁK^{a,b}, PETR HODEK^b, JIŘÍ HUDEČEK^b a MIROSLAV ŠULC^{a,b}

^a Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha,
^b Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha
tomas.jecmen@centrum.cz

Cytochromy P450 (P450) jsou terminálními monoxygenasami biotransformačního systému, který se účastní detoxikace cizorodých látek, metabolismu léčiv a bohužel i aktivace některých karcinogenů. Katalytická aktivita některých P450 je ovlivňována jejich fakultativním redoxním partnerem cytochromem b₅, který může v katalytickém cyklu P450 zprostředkovávat přenos druhého elektronu.

K rozšíření dosavadních zjištění o struktuře zkoumaných proteinů a jejich vzájemných interakcích, konkrétně v málo prozkoumané oblasti jejich ukotvení v lipidické membráně, jsme vyvinuli novou metodu fotoznačení. Při rekombinantní expresi cytochromu b₅ jsme nahradili 3 methioniny lokalizované v membránové kotvě proteinu fotoaktivovatelným analogem methioninu, který se po ozáření UV světlem kovalentně

váže na blízke aminokyselinové reťazce a fixuje tak jejich prípadnú interakciu. Fotoaktivovateľný cytochrom b_5 sme použili ako sondu k mapovaniu membránovej topológie P450 2B4. Oba cytochromy sme *in vitro* rekonstituovali v lipidické membráne, smes sme fotoaktivovali a elektroforeticky sme separovali vzniklé reakčné produkty. Podľa molekulovej hmotnosti sa patrne jedná o komplexy oboch proteínov v molárnych pomeroch 1:1, 1:2 a 2:1. Jednotlivé proteínové komplexy boli vyříznuté z gelu a po odbarvení štiepeny proteasou. Vzniklá smes peptidů byla analyzována LC-FT-ICR hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlíšením.

Identifikovali sme interagujúci aminokyseliny cytochromů v prostředí lipidické membrány a vúbec poprvé sme také přímo potvrdili interakciu membránových helixů zkoumaných proteínů. V závislosti na experimentálném provedení rekonstituce proteínů do lipidické membrány byla předpokládána slabší/silnější vazba cytochromu b_5 . Naším přístupem bylo pravděpodobně nalezeno odlišné kovalentní spojení proteínů odpovídající strukturně odlišné orientaci cytochromu b_5 v lipidické membráne.

Získané strukturní informace jsou využity pro zpřesňování *in silico* modelů jejich interakce, validaci experimentálních postupů *in vitro* rekonstituce a následně i výsledků farmakologického či toxikologického testování v tomto systému.

Podporováno GA ČR (P207/12/0627 a 305/09/H008) a projektem Univerzity Karlovy v Praze (projekt UNCE #42).

1S-10

STANOVENIE VEDĽAJŠÍCH PRODUKTOV DEZINFEKČIE PITNÝCH VÔD NA ELEKTROFORETICKOM ČÍPE

**LADISLAV DANCĎ, MARIÁN MASÁR a RÓBERT
BODOR**

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského V Bratislave, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava
ladislav.danc@fns.uniba.sk

Cieľom práce bol vývoj nových metód kapilárnej elektroforézy (CE) na čípe pre separáciu a stanovenie niektorých neprchavých vedľajších produktov dezinfekcie pitných vôd, ktoré vznikajú pri chlorácii, príp. ozonizácii. V tomto kontexte boli študované kyseliny monochlóroctová, dichlóroctová, trichlóroctová, monobrómoctová a dibrómoctová. Halogénové kyseliny (HAA) sú toxické pre ľudí, živočíchy a rastliny a niektoré z nich vykazujú karcinogénne vlastnosti.

CE separácie boli realizované na čípe so spájanými kanálkami (CC) a vodivostnými detektormi umiestnenými na oboch koncoch separačných kanálikov. Zónovo-elektroforetické separácie (ZE) uskutočňované v druhom separačnom kanáliku boli kombinované s elektroforetickou (ZE-ZE) alebo izotachoforetickou (ITP-ZE) prekoncentraciou analytov. ZE separácie halogénových kyselín boli študované v rôznych nosných elektrolytoch v rozmedzí pH 4–6. Pri ITP-ZE separáciách halogénových kyselín bola ITP použitá na CC čípe ako dávkovacia technika vzorky. ITP separácie

boli uskutočňované pri nízkom pH (pH 4) s cieľom odstrániť potenciálne interferujúce zložky (slabé kyseliny) prítomné v pitných vodách.

Pre študované analyty boli dosiahnuté RSD hodnoty migračných časov v rozmedzí 0,1–2,7 %. Pre plochy ich píkov boli dosiahnuté RSD hodnoty v rozmedzí 1,2–9,9 %. Použitím 900 nl objemu dávkovanej vzorky na čip boli získané detekčné limity (LOD) v rozmedzí 45–180 $\mu\text{g l}^{-1}$ pre analyty. Pri ZE stanoveniach sa výťažnosti HAA pohybovali v rozsahu 67–101 % a pri ITP-ZE stanoveniach sa dané hodnoty pohybovali v rozmedzí 59–103 %. Nižšie výťažnosti študovaných HAA boli predovšetkým spôsobené ich adsorpciou na povrch kanálikov na čípe.

Študované boli aj rôzne aniónicky migrujúce látky, ako potenciálne komigrujúce zložky, prítomné na rôznych koncentračných úrovniach v pitných vodách (chlorid, fluorid, bromid, jodid, síran, oxalát, dusičnan, dusitan, octan a fosfát). Pri ITP-ZE stanoveniach halogénových kyselín, z uvedených zložiek interferovali iba octan a fosfát. Negatívny vplyv daných zložiek v reálnych vzorkách vôd bol eliminovaný použitím off-line predúpravy na báze extrakcie membránou (SLME). Táto predúpravná technika umožnila selektívnu extrakciu a prekoncentrovanie analytov v reálnych vzorkách pitných vôd.

Tato práce vznikla za podpory grantov VEGA 1/1149/12, VVCE 0070-07 and OPVaV-2009/4.1/02-SORO (CE Green II).