

Přenosný kapalinový chromatograf – miniLC

a jeho využití pro analýzu toxinů a dalších nebezpečných látek

Kamila Lunerová¹, Jozef Šesták², Jakub Vaněk¹, Ivan Hamerník³

1 Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i., Brno

2 Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Brno

3 INGOS, s.r.o., Praha



iac
brno



Podpořeno Programem Bezpečnostního výzkumu MV ČR projekt č.. VB02000015 – Přenosný kapalinový chromatograf – zvýšení technologické úrovně a adaptace pokročilých optických metod detekce a nové aplikace

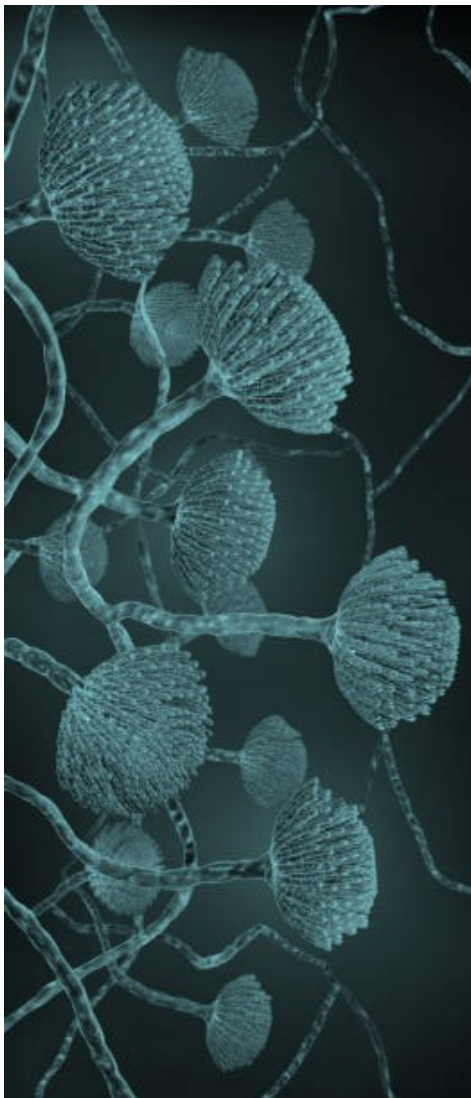


Toxin – chemická látka biologického původu schopna poškodit živý organismus svým zásahem do biochemismu jeho biologických funkcí

Velmi rozmanitá skupina – dělení:

- **Biologický původ:** živočišné (hmyz, pavoukovci, štíři, hadi, sasanky, plži, mlži, obojživelníci...), plankton, rostlinné, mikrobiální...
- **Chemická struktura:** alkaloidy, steroidy, polycyklické ethery, terpeny, peptidy, proteiny...
- **Mechanismus účinku** – interakce s biomolekulami/buněčnými strukturami: inhibitory enzymů, inhibitory/aktivátory iontových kanálů, blokátory replikace DNA...
- **Cílové působení:** hepatotoxiny, neurotoxiny, genotoxiny a mutageny, embryotoxiny...

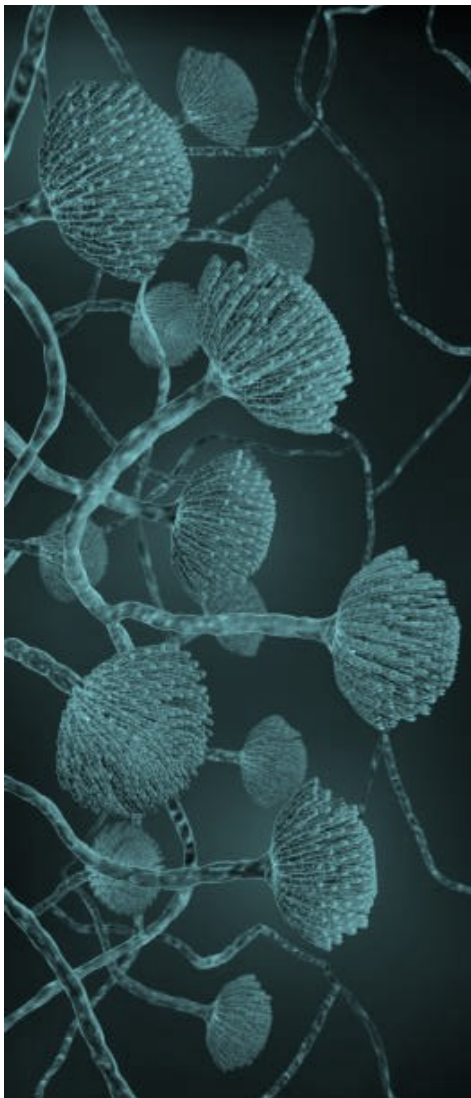
Toxicita – patří k nejtoxičtějším látkám: <https://www.youtube.com/watch?v=flv0ql218-A>



Toxiny jako biologické zbraně

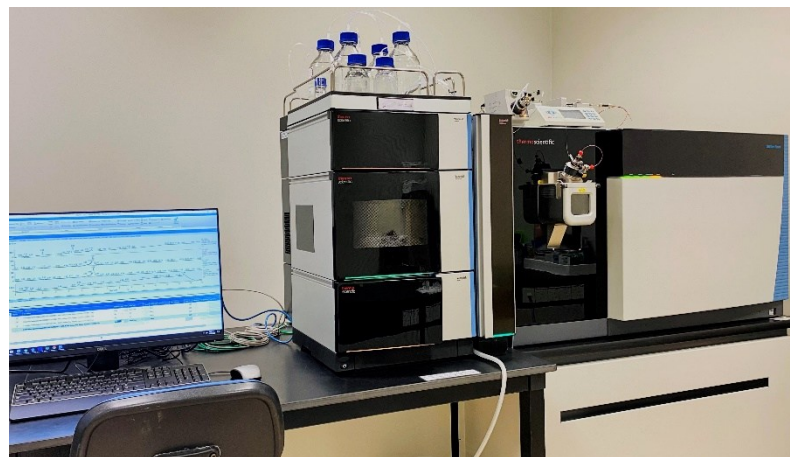
Bioterorismus, toxinové zbraně → Biological Weapons Convention (1972) - Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění zásob bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o jejich zničení → **Zákon č. 281/2002 Sb.**, o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní + **Vyhláška č. 474/2002 Sb.**, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb. a 379/2017 Sb. → **SÚJB**

- **Neproteinové toxiny** – aflatoxiny, trichotheceny (**mykotoxiny plísní**)
 - mikrocystiny, anatoxiny (**toxiny sinic**)
 - ciguatoxiny, saxitoxin, tetrodotoxiny (bičíkovci – **plankton**)
 - conotoxiny (**plži**)
- **Proteinové toxiny** – botulotoxiny, cholera toxin, shigatoxin, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (**bakteriální**)
 - abrin, ricin, modeccin, viscumin, volkensin (**rostliny**)
 - bungarotoxin (**živočichové**)



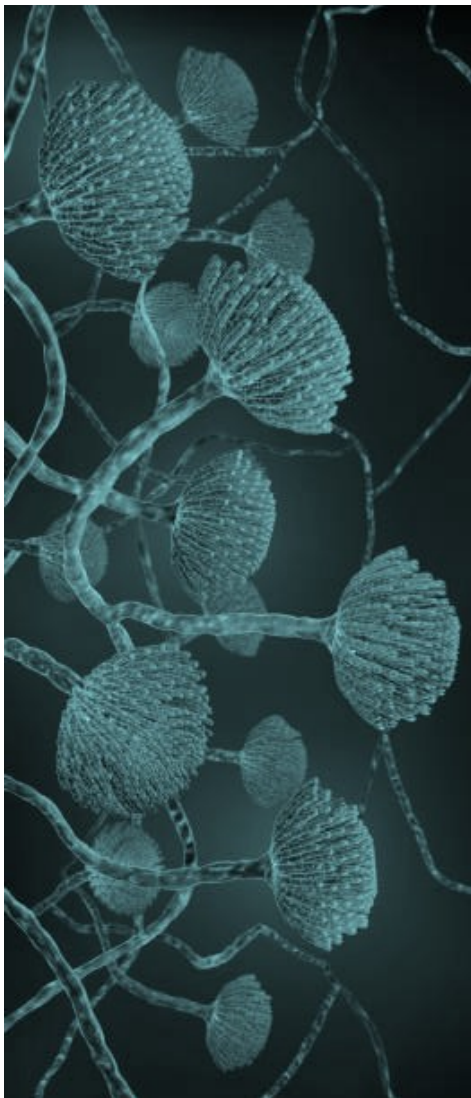
Analýza toxinů

HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografie + různé typy detektorů (MS, UV/VIS, FLD...) – základní analytická technika – farmacie, potravinářství, medicína...



Další metody:

- GC/MS – látky do cca MW 500
- MALDI-TOF – analýza proteinů, peptidů, DNA...
- ELISA, RIA – analýza proteinů, peptidů
- CE, IEF
- Biosenzory, imunochromatografické kity

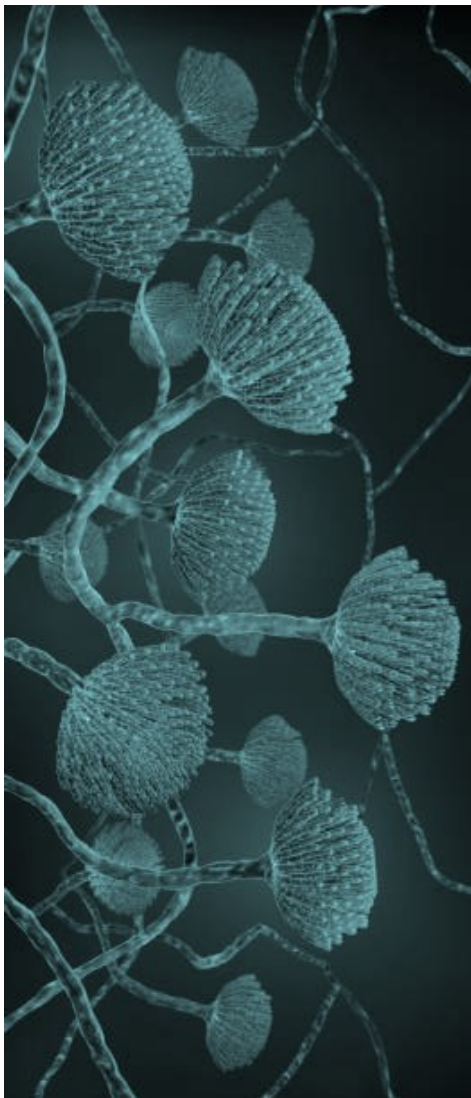


Přenosný kapalinový chromatograf – miniLC



Cíl:

- Použití v mobilní aboratoři
- Velikost kufříku
- Hmotnost do 10 kg
- Provoz i na baterie (min. 8 h)
- Nízká spotřeba rozpouštědel i odpadních roztoků
- Analýzy do 10 minut



Přenosný kapalinový chromatograf – miniLC

Komerčně dostupné přístroje:



Axcend Focus LC

- UV detekce jen při 1-2 vlnových délkách nad 255 nm
- Nelze použít běžné komerční kolony
- Tlak max 69 MPa



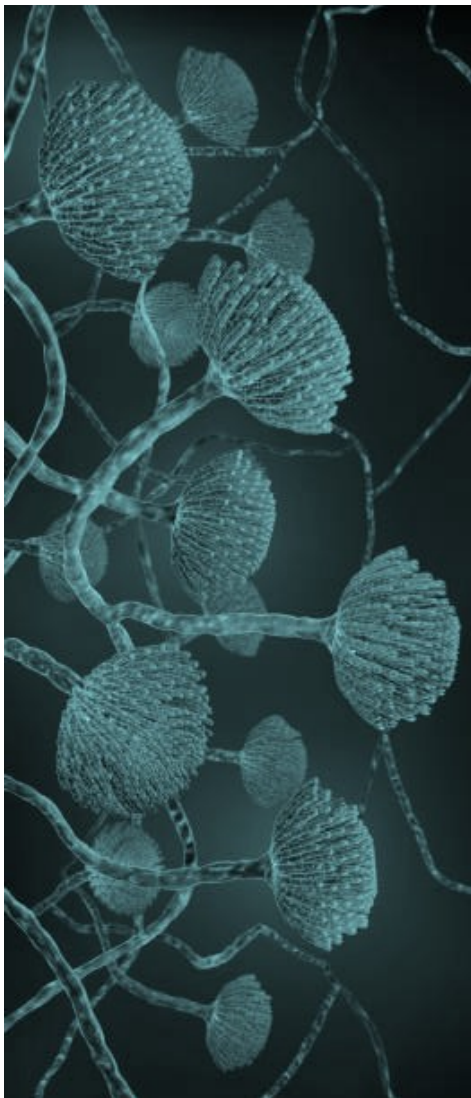
SmartLifeLC PolyLC

- UV detekce jen při 415 nm
- Nelze použít běžné komerční kolony
- Tlak max 21 MPa

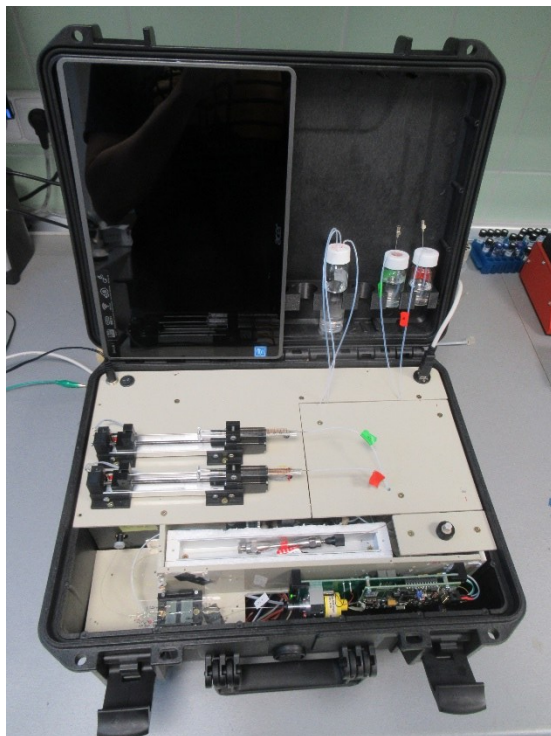


Light Lab 3 Orange Photonics

- Analýza kannabinoidů
- UV detekce
- Nelze použít běžné komerční kolony
- Tlak max 0,7 MPa



Přenosný kapalinový chromatograf – miniLC

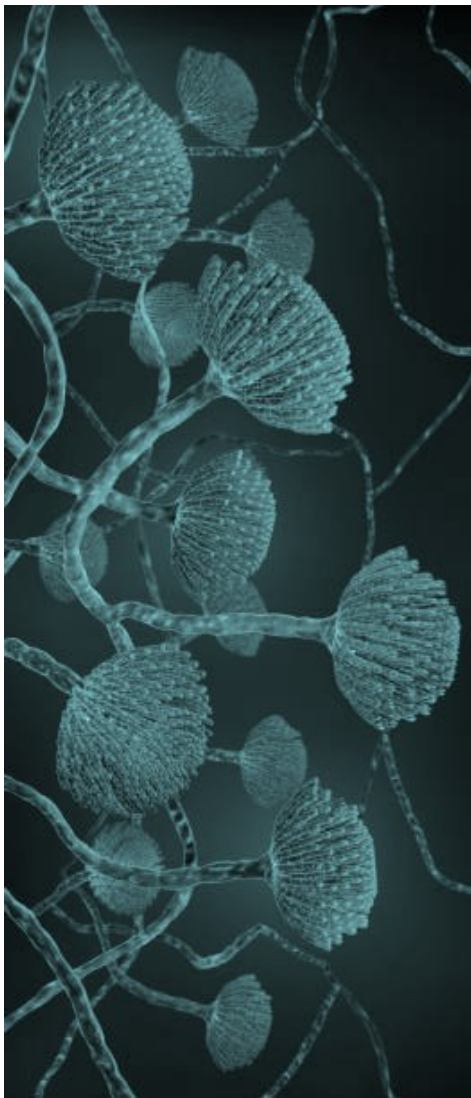


Parametry

- Kufřík 420 x 350 x 180 mm, 9.5 kg
- UV/VIS spektrometr 200 – 600 nm
- Fluorescenční detektor
- Běžné komerčně dostupné kolony
- Pracovní tlak 100 Mpa
- Automatická příprava mobilní fáze (2 složky)
- Gradientová eluce
- Analýzy 3 – 5 min

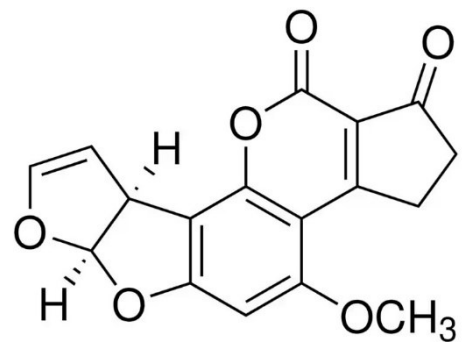
Navazující projekty BV MV ČR

Verze 1 (2020) → Verze 2 (2022) → Verze 3 (2026) – komerční produkt

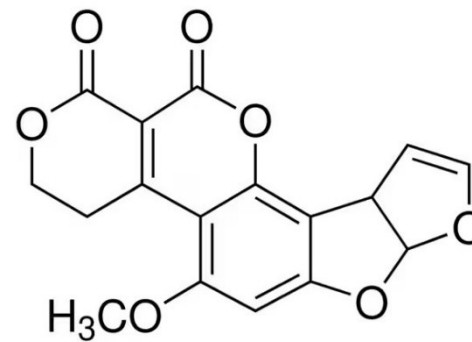


Aflatoxiny – mykotoxiny (toxiny plísňí)

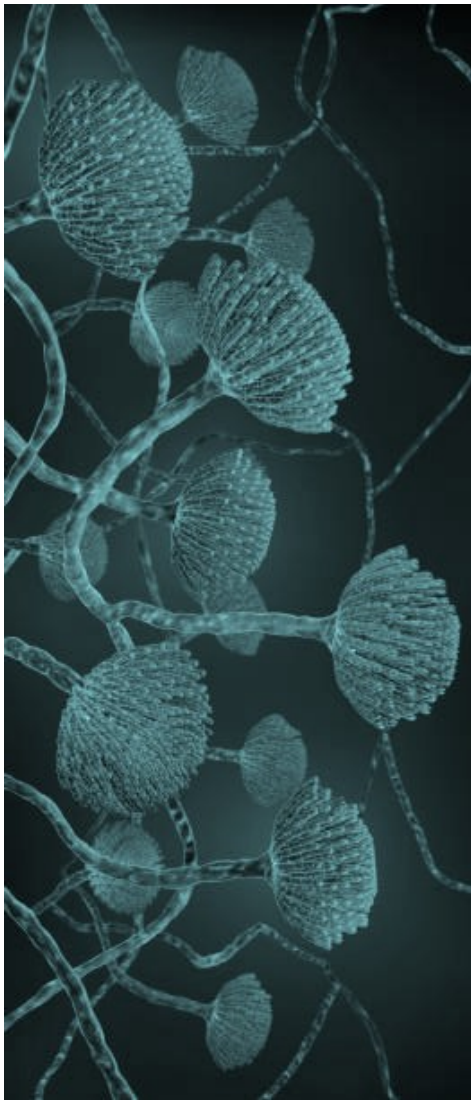
- Plísně *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*... – kontaminace obilí, ořechů, plejnin, koření, krmiv...
- Difuranokumariny
- Akutní otravy – hepatotoxické, chronické otravy – kancerogeny, mutageny



Aflatoxin B1



Aflatoxin G1



Aflatoxiny – mykotoxiny

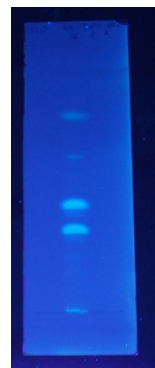


Vzorek

Izolace
↓



Detekce
↓



TLC – UV 366 nm



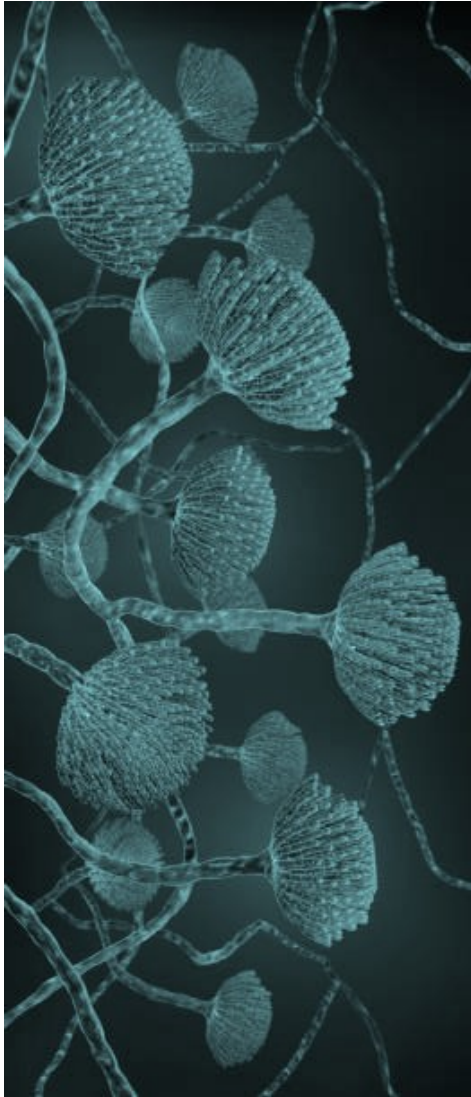
minLC + UV/FLD

Izolace:

- Extrakce do AcCN
- Filtrace
- Zakoncentrování/purifikace na SPE

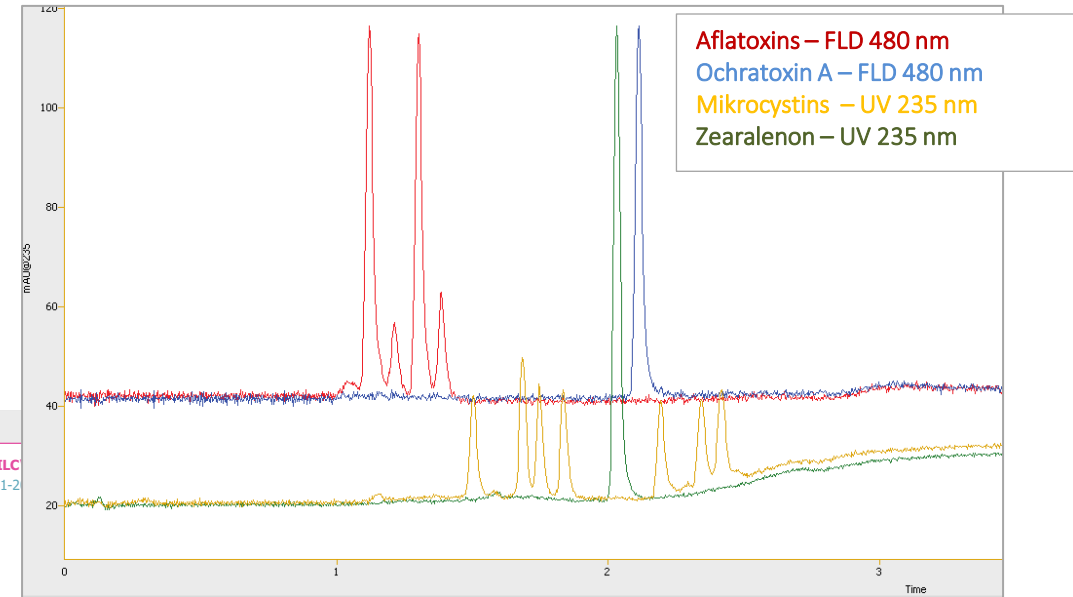
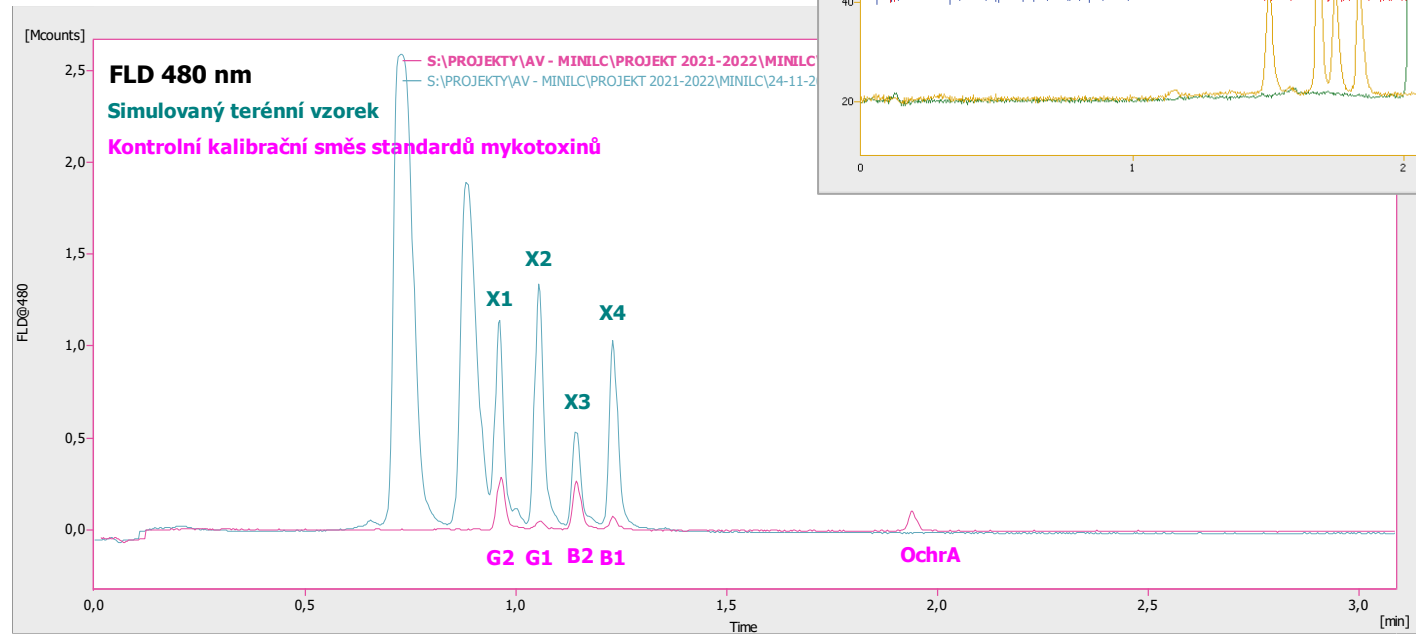


HPLC + UV/FLD



Aflatoxiny – mykotoxiny

- Analýza pomocí miniLC



LOD 1-15 µg/L



Mikrocystiny – cyanotoxiny – toxiny produkované sinicemi

- Toxiny produkované sinicemi (cyanobacteria) sp. *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*... – vodní květ na rybnících, přehradách
- Cyklické heptapeptidy (LA, LR, RR, LW, LY, YR...)
- hepatotoxické, kancerogenní, genotoxické, embryotoxické
- Vazba na proteinofosfatázy a jejich inhibice – hyperfosforylace, borcení cytoskeletu a rozpad buněk
- detekce: HPLC+UV/MS, GC/MS, ELISA, RIA...

- Další cyanotoxiny: anatoxiny, saxitoxin, cytotoxické a dermatologické alkaloidy

Microcystin LR



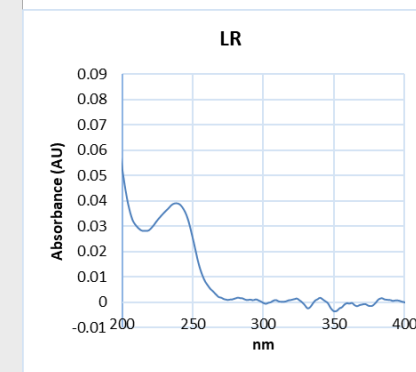
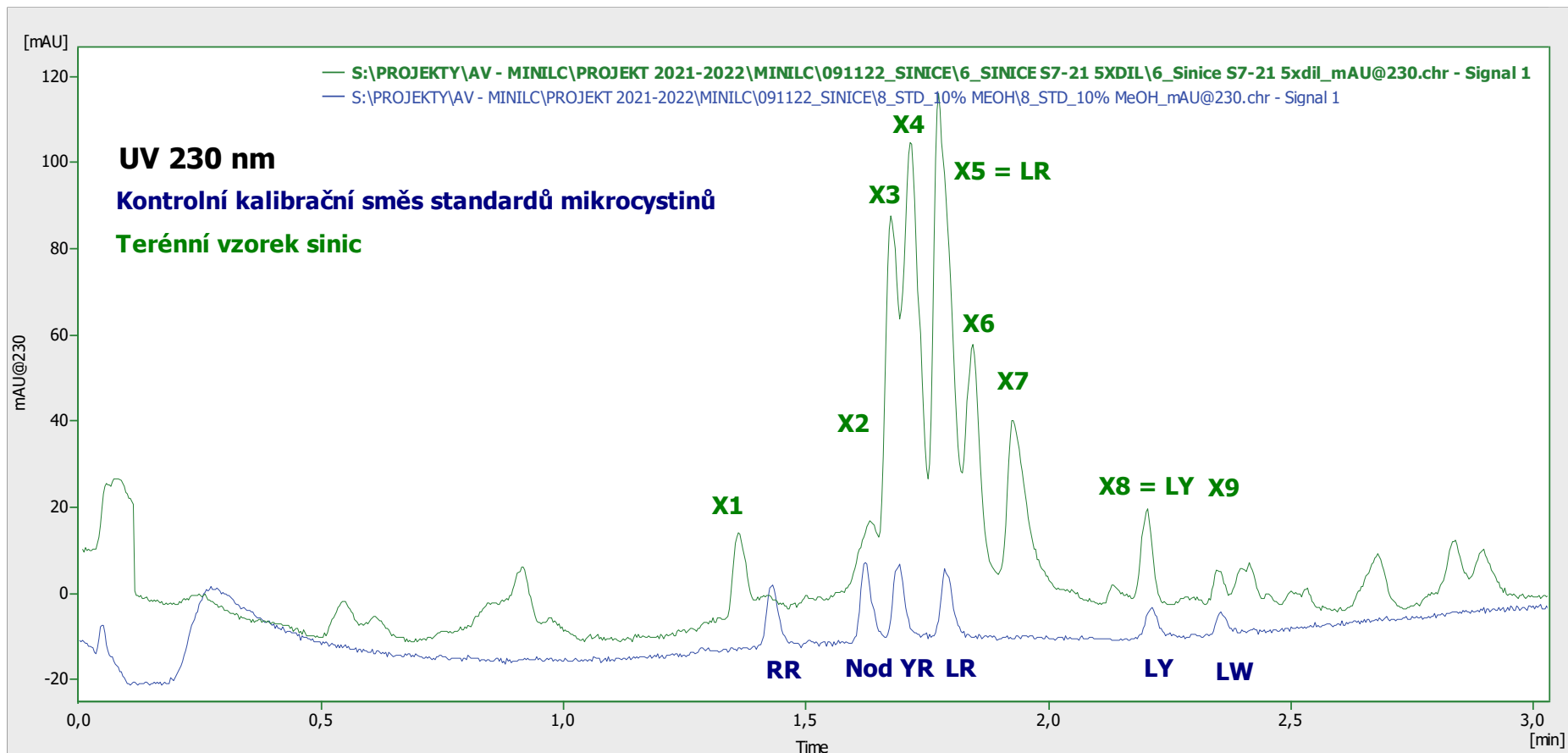


Mikrocystiny – izolace, detekce a identifikace

- Odběr vzorků
- Separace biomasy – centrifugace/filtrace
- Extrakce do organického rozpouštědla
- Purifikace na SPE kolonce
- Analýza pomocí miniLC



minLC + UV/FLD



UV spectra

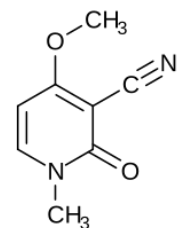
LOD 250 µg/L

Standard mikrocytinů RR, Nod, YR, LR, LY, LW

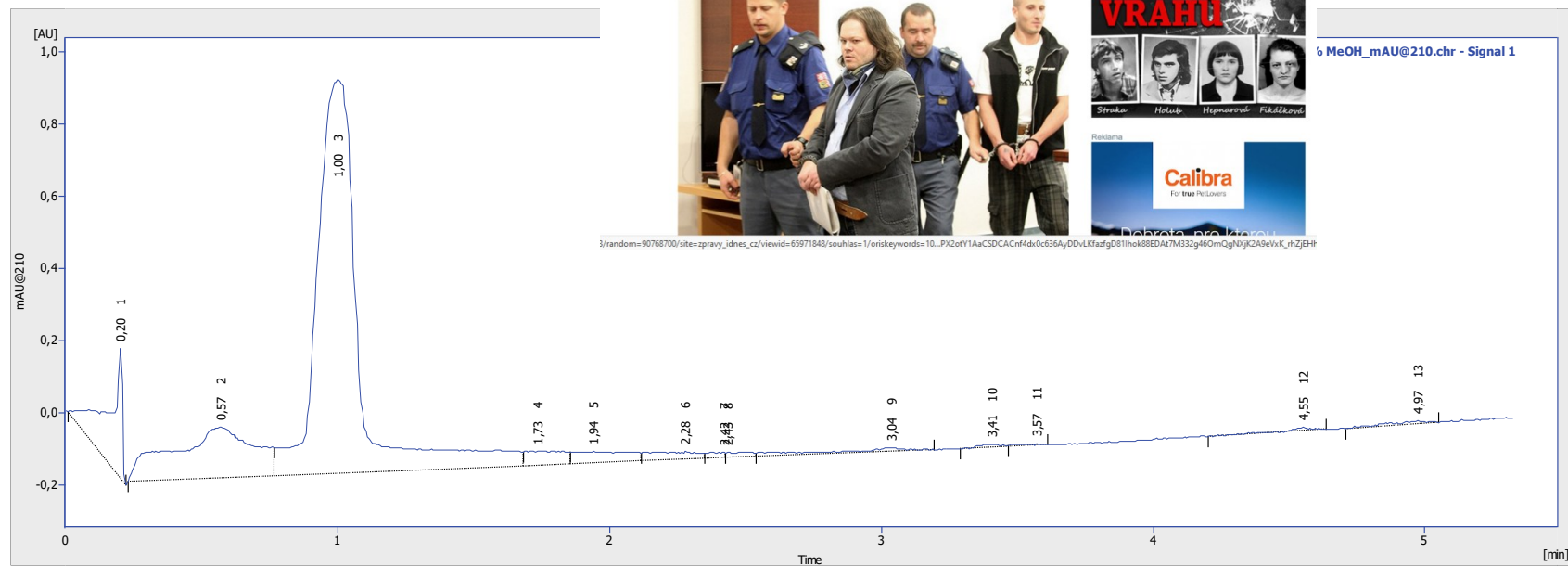
Vzorek biomasy po extrakci 50% MeOH a zakoncentrování pomocí SPE



Analýza ricininu – nepřímá analýza ricinu



Ricinin



Bývalý exekutor dostal pět let, hrozbu ricinem musí ještě soud prověřit

© 22. dubna 2013 13:33

Pražský vrchní soud projednal odvolání Daniela Drábka, který čelí obžalobě z vyhrožování smrtícím jedem ricinem. Rozhodl, že bývalý exekutor půjde do vězení na pět let za prodej drog a držení stříeliva. Zda hrozil i otravou, ale musí znovu prověřit krajský soud.



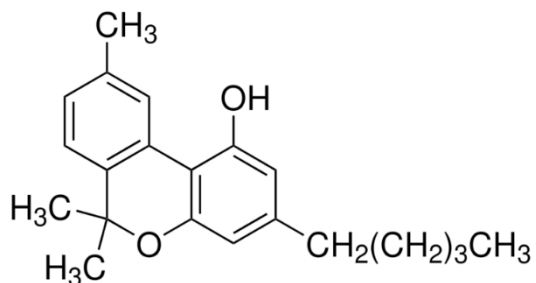
3/random=90768700/site=zpravy_idnes.cz/viewid=65971848/souhlas=1/oriskeywords=10...PX2otY1AaCSDCAcNf4d:0:c536AyDDvLKfzfgD811hoK88EDA7M332g46OmGgK9K2A9eVv_K_hZjEHP

Další aplikace miniLC – analýza kannabinoidů

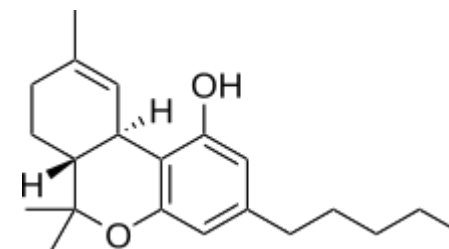


Kannabinoidy – obsahové látky *Cannabis* sp.

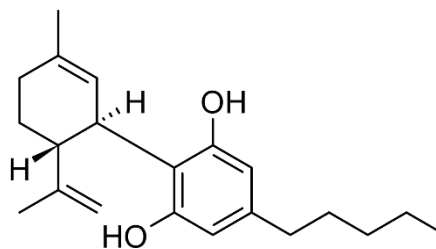
- Více než 70 známých látek – terpenofenolické látky



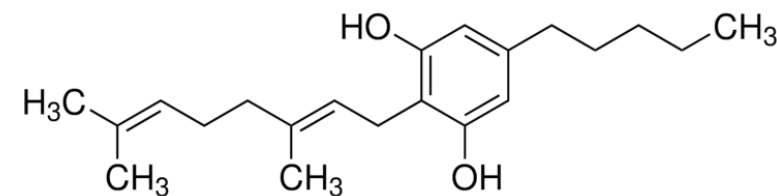
CBN – Cannabinol



trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; THC



CBD – Cannabidiol



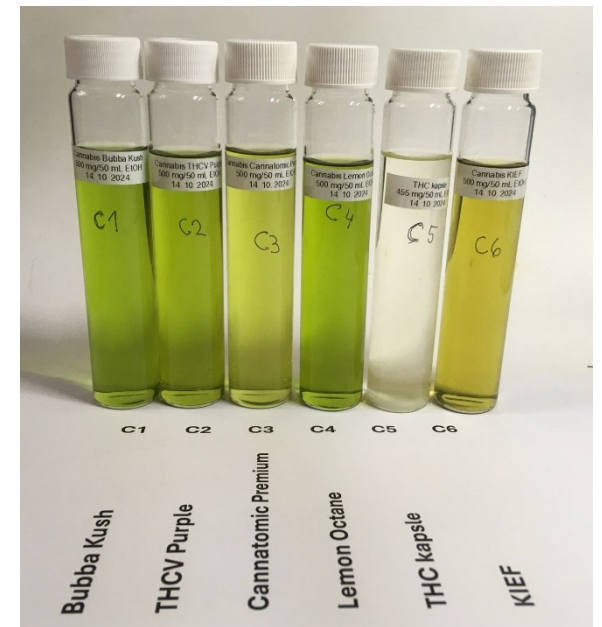
CBG – Cannabigerol

Kannabinoidy – obsahové látky *Cannabis sp.*



Vzorky C1-C6 → extrakce → centrifugace → filtration → analýza pomocí miniLC (UV 210 nm)

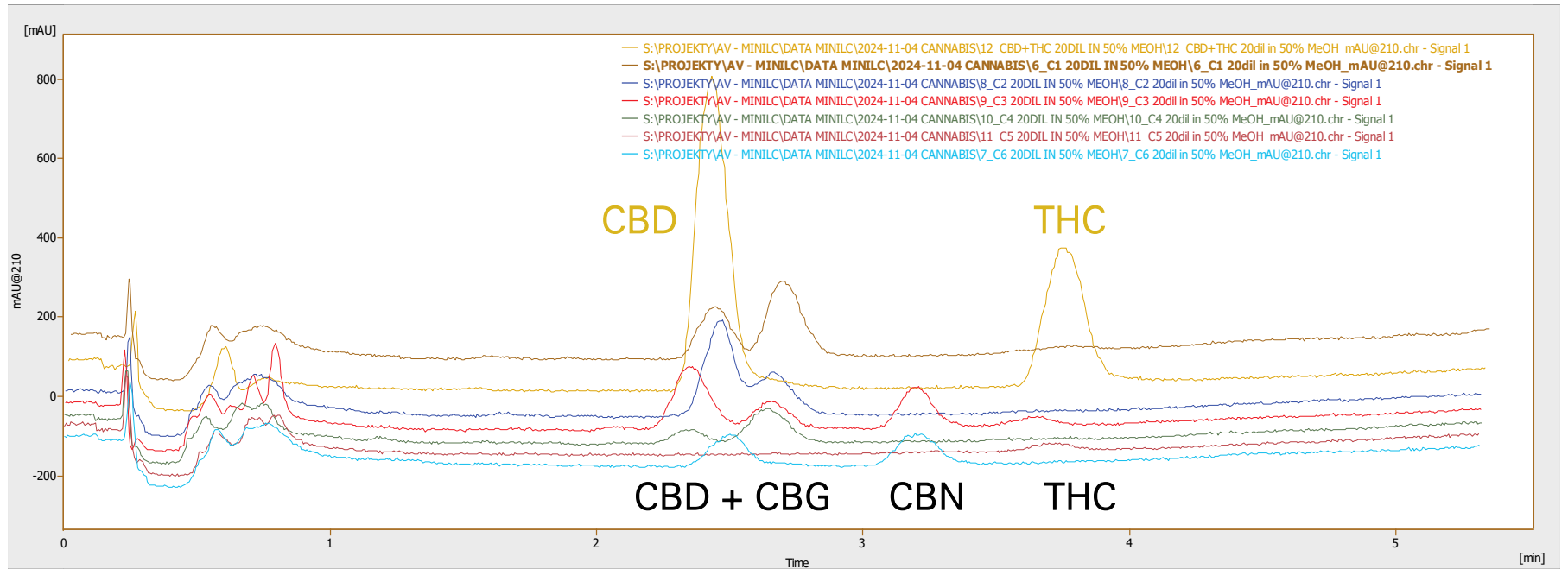
No.	Vzorek
C1	Bubba Kush
C2	THCV Purple
C3	Cannatomic Premium
C4	Lemon Octane
C6	KIEF



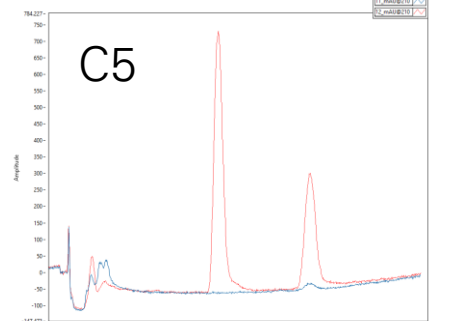
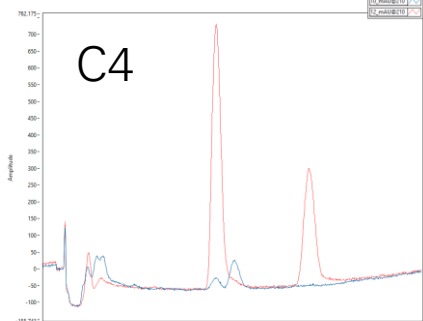
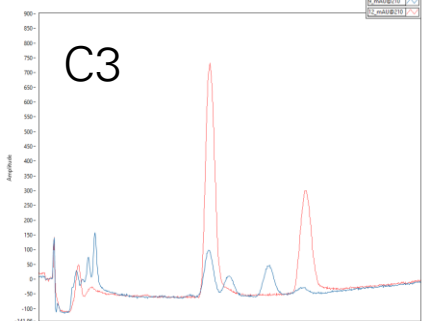
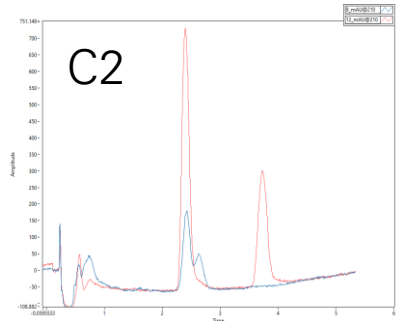
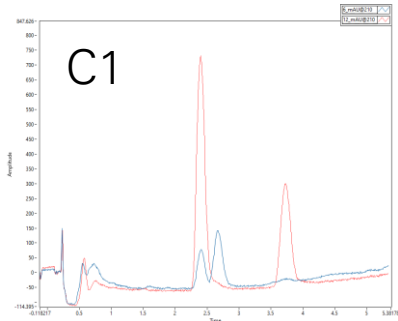
Kannabinoidy – obsahové látky *Cannabis sp.*



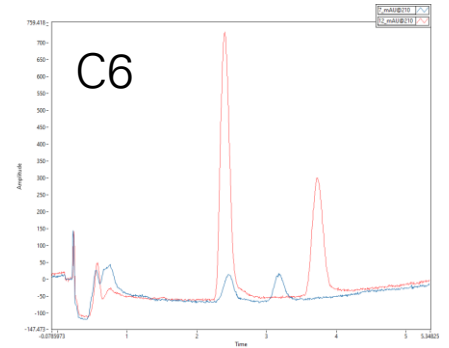
Analýza pomocí miniLC (detekce při UV 210 nm)



Cannabinoids by miniLC, UV 210 nm



	Rt (min)	C1	C2	C3	C4	C6
CBG	2,43			x	.	X
CBD	2,40	X	X		X	x
CBC?	2,68					
H4CBD	?		x	x		
CBGA	3,10					
CBN	3,26					
THC	3,75	.		.	x	

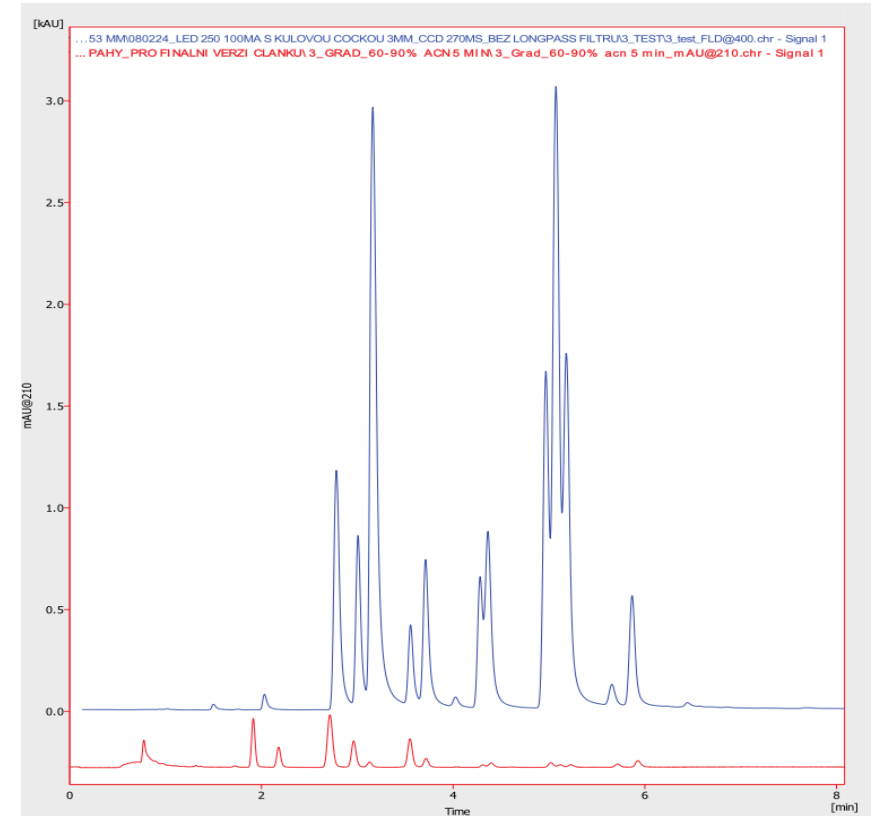
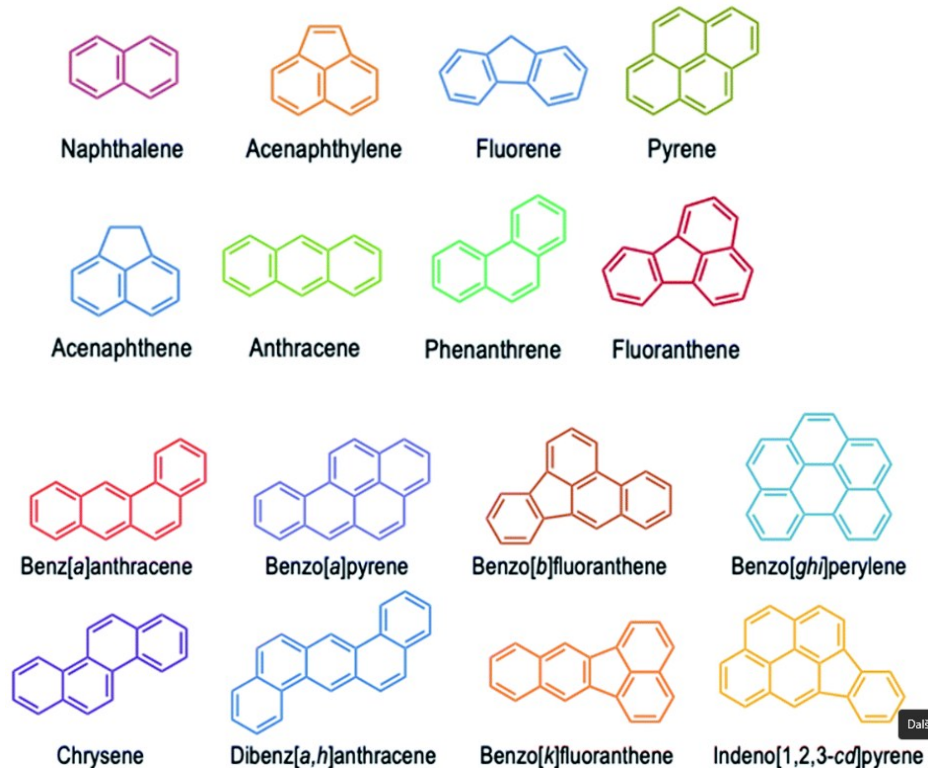




Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)

Absorbance 210 nm

Fluorescence 250 nm ex./ 400 nm em.





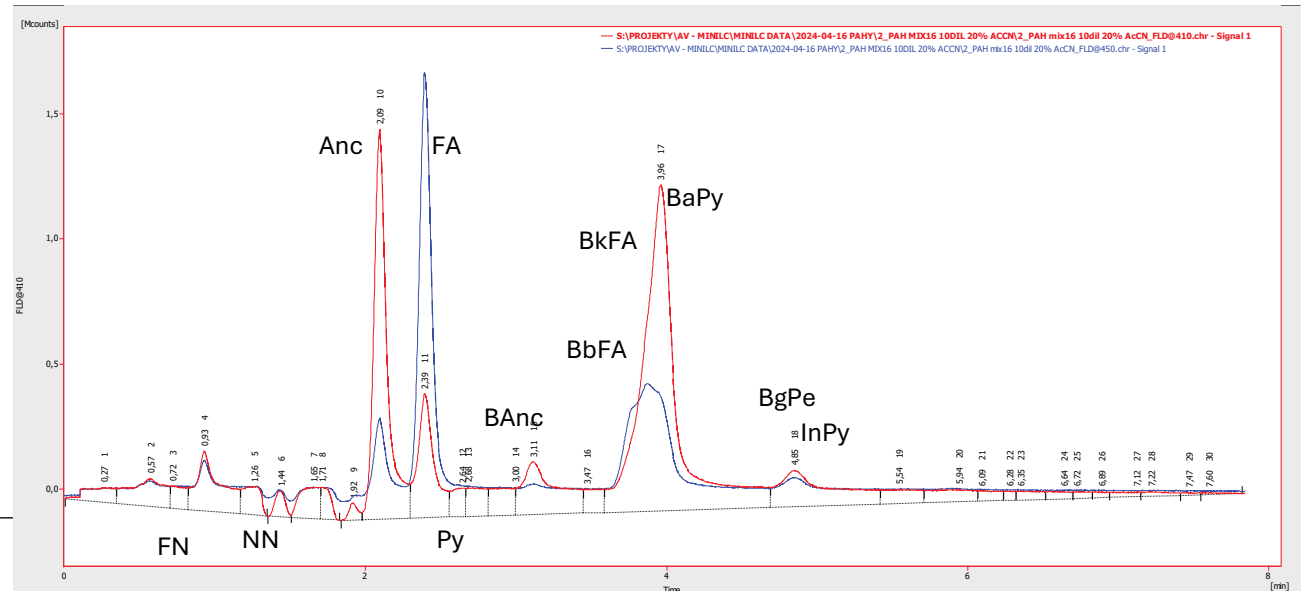
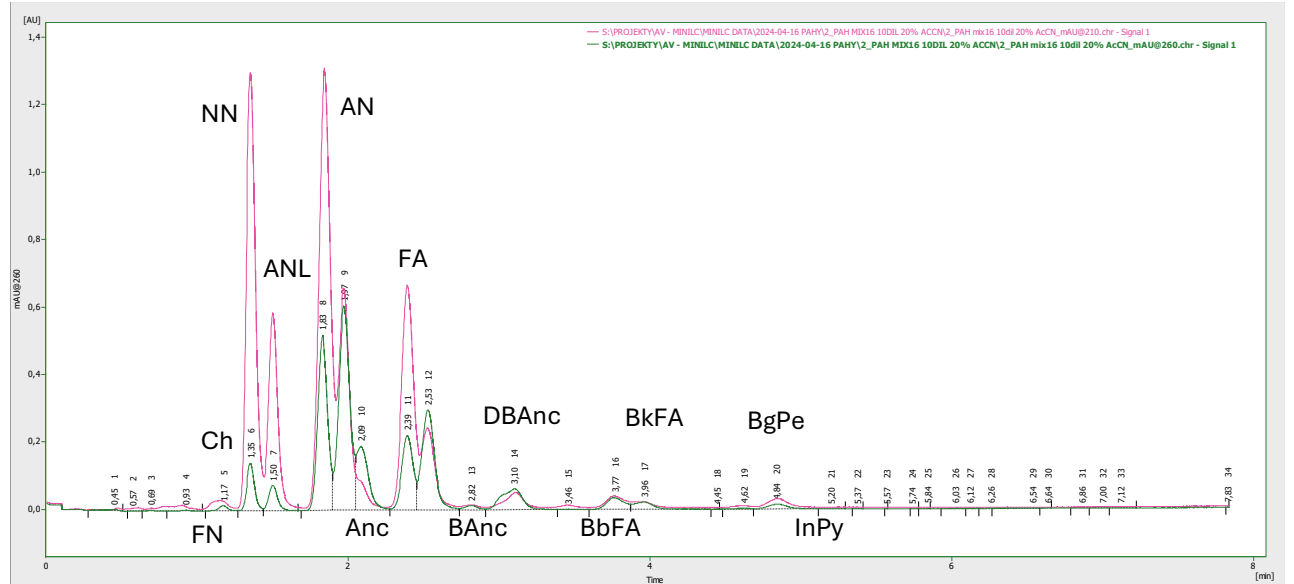
PAHy

UV 210 nm

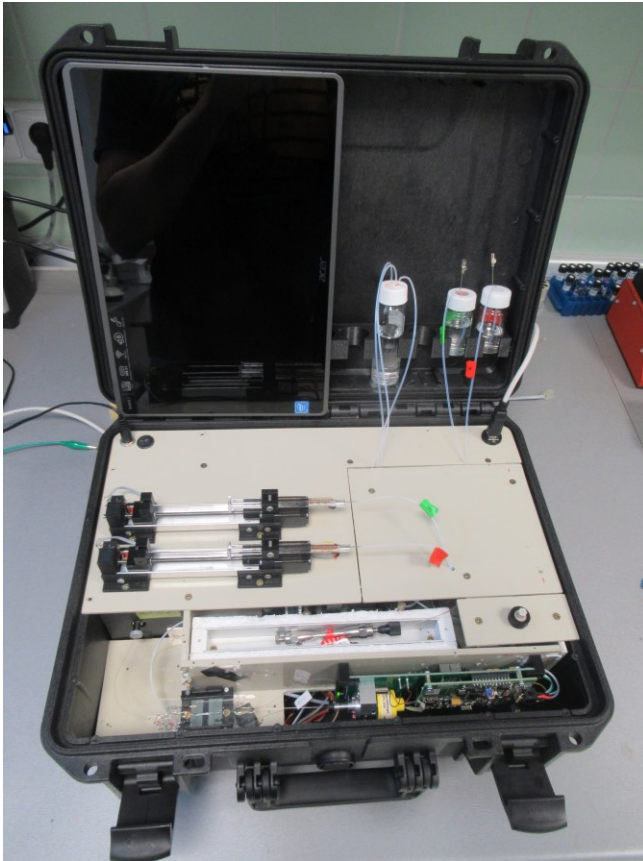
UV 260 nm

FLD 410 nm

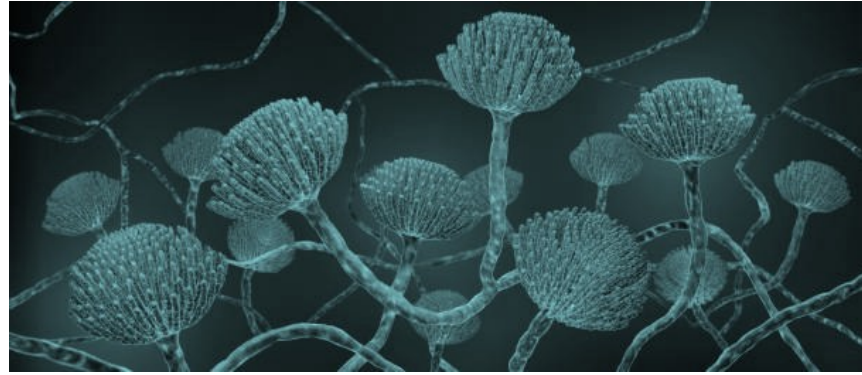
FLD 450 nm



Závěr



- Nová kategorie přenosných přístrojů
- Výkonnost srovnatelná s laboratorními přístroji
- Možnost analyzovat obrovskou škálu látek
 - Včetně nebezpečných látek
- Schopnost simultánní detekce v UV/VIS + FLD
- Pouze omezené možnosti automatických procesů
- Limitovaná robustnost
- Nutnost přípravy metodik na dostatečnou úpravu vzorků a rychlé analýzy



Děkuji za pozornost

