

MUNI



Sborník vybraných příspěvků

## 22. ROČNÍK CELOSTÁTNÍ SOUTĚŽE O NEJLEPŠÍ STUDENSKOU VĚDECKOU PRÁCI V OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2019“

6. a 7. února 2019

Masarykova univerzita, Brno



**Editoři sborníku:**  
Jiří Barek  
Vlastimil Vyskočil

Soutěž o Cenu Karla Štulíka 2019 byla organizována pod záštitou a s finanční podporou následujících partnerů, kterým patří naše díky a obdiv:



## 22. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie o „Cenu Karla Štulíka 2019“

Jedním z hlavních úkolů České společnosti chemické by měla být péče o nastupující generaci chemiků, bez které si lze jen obtížně představit úspěšný rozvoj této disciplíny v České republice. Neobyčejně záslužným počinem odborné skupiny analytické chemie ČSCH v této oblasti je organizace soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie. Již 22. ročník této soutěže, která od roku 2015 nese jméno profesora Štulíka, byl jistě důstojným uctěním jeho památky. V letošním roce tato soutěž proběhla ve dnech 6.–7. února 2019 pod záštitou děkana Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity doc. Mgr. Tomáše Kašparovského, Ph.D. v prostorách Univerzitního centra ve Šlapanicích. Díky vynikající práci organizačního výboru ve složení prof. RNDr. Viktor Kaničák, DrSc., prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D., Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D. a Mgr. Filip Smrčka proběhla soutěž neprosto bezchybně a v přívětivé, byť ve vědecky náročné atmosféře.

Soutěže se v roce 2019 zúčastnilo celkem 19 studentů ze 4 českých a jedné slovenské vysoké školy, uvedených na www stránkách soutěže [http://ustavchemie.sci.muni.cz/Stulik\\_2019\\_uvod](http://ustavchemie.sci.muni.cz/Stulik_2019_uvod)). Vzhledem k vysoké odborné úrovni přihlášených studentských prací a jejich mimořádně kvalitní prezentaci, dokazující zájem i motivaci všech soutěžících, bych na tomto místě rád poděkoval nejen všem soutěžícím bez ohledu na jejich umístění, ale i jejich mateřským pracovištím, bez jejichž pomoci by tak kvalitní práce pochopitelně nemohly vzniknout. Jako každý rok, tak i letos porota reprezentovala prakticky všechny zúčastněné školy a pracovala ve složení prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (Univerzita Karlova, Praha), prof. Ing. René Kizek, DrSc., MBA (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno), doc. Ing. Zdeňka Kolská, Ph.D. (Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem), prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D. (Masarykova univerzita, Brno), doc. Ing. Kamil Záruba, Ph.D. (VŠCHT Praha), doc. Ing. David Milde, Ph.D. (Univerzita Palackého v Olomouci), Ing. Radmila Řápková (Chemické listy), doc. Ing. Ľubomír Švorc, Ph.D. (Slovenská technická univerzita v Bratislavě) a prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. (VŠCHT Praha). I všem členům této poroty patří můj dík za obětavou a nezištnou práci nepochybně účinně pomáhající nastupující generaci mladých analytických chemiků.

Hodnotící komise se po vyslechnutí všech příspěvků rozhodla vedle 1. místa v soutěži udělit dvě 2. místa a tři zvláštní ceny poroty.

**1. místo získala Bc. Vatrsková Lenka** (studentka oboru Forenzní biologická analýza na Fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT Praha) za práci Forenzní elektrochemie nových psychoaktivních látek vypracovanou na Ústavu analytické chemie, FCHI VŠCHT Praha

### 2. místo získali současně

**Chufistova Sofia** (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha) za práci Pokročilá plazmonika pro detekci stopových množství vodíku a

**Bc. Haško Marek** (Ústav analytické chemie, Slovenská technická univerzita v Bratislavě) za práci Miniaturizovaný elektrochemický senzor na stanovení teobromínu v čokoládových výrobcích

### Zvláštní cenu poroty získali

**Hekerle Lukáš** (Ústav chemie, MU Brno) za práci Optimalizace HPLC pomocí matematického plánování

**Lacmanová Tereza** (Katedra analytické chemie, FaF UK v Hradci Králové) za práci Využití superkritické fluidní chromatografie v analýze přírodních látek

**Sehnal Karel** (Ústav humánní farmakologie a toxikologie, VFU Brno) za práci Biofyzikální analýza stříbrných nanočástic připravených zelenou syntézou a využití pro 3D tisk antibakteriálního materiálu

Chci zde poblahopřát všem oceněným za jejich excelentní výkony a i všem soutěžícím poděkovat za jejich ochotu odvést více než je základní penzum vysokoškolského studenta analytické chemie. Mé poděkování patří i Ing. Radmile Řápkové, výkonné redaktorce časopisu Chemické listy, a doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Czech Chemical Society Symposium Series (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného této soutěži. A v neposlední řadě patří velký dík nás všech a celé analytické komunity



Foto: Ocenění soutěžící o Cenu Karla Štulíka 2019. Zleva: Marek Haško, Sofia Chufistova, Tereza Lacmanová, Lenka Vatrsková, Lukáš Hekerle, Karel Sehnal. Nahoře prof. J. Barek (předseda OS analytické chemie ČSCH), prof. P. Lubal (předseda organizačního výboru soutěže)

v České republice všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga si dále dovoluujeme otisknout, za jejich podporu, bez které by tato soutěž nikdy neproběhla.

A na závěr s radostí oznamuji české analytické komunitě, že nelehkého úkolu zorganizovat další kolo soutěže o Cenu Karla Štulíka ve dnech 5. a 6. února 2020 se ujal tým kolegů z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením doc. RNDr. Vlastimila Vyskočila, Ph.D. v rámci oslav 100. výročí založení této fakulty a že záštitu nad touto soutěží pro rok 2020 převzal děkan PřF UK v Praze prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

*Jiří Barek*  
*Předseda odborné skupiny analytické chemie*  
*České společnosti chemické*

## VYUŽITÍ SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE V ANALÝZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

**TEREZA LACMANOVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA PLACHKÁ<sup>a</sup>, VERONIKA PILAŘOVÁ<sup>a</sup>, LUCIE CAHLÍKOVÁ<sup>b</sup> a LUCIE NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, <sup>b</sup> Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
lacmanot@faf.cuni.cz

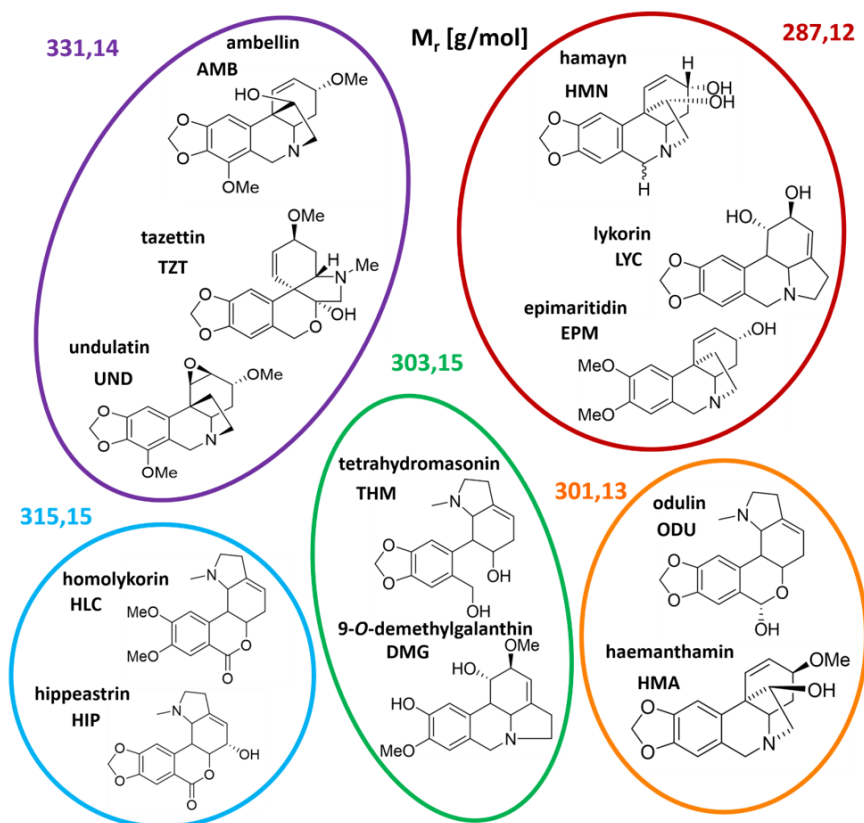
### Úvod

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační metoda, která byla díky moderní instrumentaci znovuobjevena teprve v posledních dvaceti letech. SFC se stala ekologickou alternativou kapalinové (HPLC) a plynové (GC) chromatografie. Jako mobilní fáze je využíván oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>) v nadkritickém stavu. Zavedením pří-

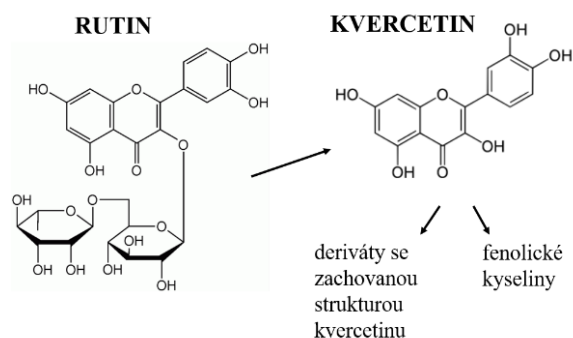
pravků organických modifikátorů a aditiv k CO<sub>2</sub> se spektrum analytů rozšířilo směrem k polárnějším sloučeninám. Pokročilou verzí SFC využívající částic menších než 2 mikrometry je ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC). Cílem této práce bylo ověřit vhodnost UHPSFC-MS metody pro analýzu přírodních látek. Pro analýzy byly vybrány látky ze skupiny alkaloidů a fenolické sloučeniny.

První skupinou byly alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité) vykazující potenciální účinek v léčbě Alzheimerovy demence. Jejich chemické struktury, zkratky a barevné rozdělení do skupin isomerů jsou na obr. 1.

Druhou skupinou byly fenolické látky – flavonoidy rutin, kvercetin a jejich metabolity. Vzhledem k významné antioxidační aktivitě jsou tyto látky spojované s prevencí kardiovaskulárních onemocnění. V rámci práce bylo analyzováno 10 zástupců (obr. 2): rutin (RUT), kvercetin (QCE), dva deriváty se strukturou kvercetinu – tamarixetin (TMX), isorhamnetin (IRN) a šest fenolických kyselin – kyselina homovanilinová (HVA), kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (HFP), kyselina 3,4-dihydroxy-



Obr. 1. Chemické struktury alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* a jejich barevné rozdělení dle molekulové hmotnosti



Obr. 2. Chemické struktury fenolických látek

fenyloctová (PAA), kyselina 3-hydroxyfenyloctová (HFA), 4-methylcatechol (4MC) a floriglucinol (PG).

### Experimentální část

Standards alkaloidů byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK, standardy fenolických látek pocházely z více zdrojů (Sigma-Aldrich, Extrasynthase a Toronto Research Chemicals). Rozpouštědla methanol (HiPerSolv Chromanorm) a acetonitril (Merck KGaA) byla čistoty LC-MS grade. Oxid uhlíčitý ( $\text{CO}_2 > 99\%$ ) byl od firmy Messer. Mezi aditiva mobilních fází patřil 25% roztok amoniaku (Merck KGaA) a mravenčan amonný (Sigma-Aldrich). UHPSFC analýzy proběhly na systému Acquity UPC<sup>2</sup> (Waters, Milford, USA). Prvním krokem byl screening stacionárních fází (od firmy Waters): Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP, Viridis HSS C18 SB, Acquity UPC<sup>2</sup> BEH, Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA, Acquity UPC<sup>2</sup> CSH PFP, Torus 1-AA, Cortecs HILIC a Acquity UPLC BEH Amide. Rozměry kolon byly  $100 \times 3,0$  mm a velikost částic  $1,7 \mu\text{m}$ . Výjimkou byly rozměry  $100 \times 2,1$  mm a velikost částic  $2,7 \mu\text{m}$  u Cortecs HILIC a velikost částic  $1,8 \mu\text{m}$  u HSS C18. Screeningové analýzy proběhly za podmínek: průtok  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ , teplota  $40^\circ\text{C}$ , BPR tlak 140 bar (2030,5 psi), nástřik vzorku byl  $2 \mu\text{l}$ . Gradientová eluce začínala izokratickým krokem při 2 % organického modifikátoru s aditivem po dobu 1 min, od 1. do 4. min se zvyšovala na 40 %, od 4. do 5. min byl nastaven izokratický krok a poté do 7. min klesalo množství organického modifikátoru s aditivem na 2 %. Analyty byly detegovány pomocí Acquity UPC<sup>2</sup> PDA detektoru při vlnové délce 290 nm pro alkaloidy a 220 nm pro fenolické látky. Pro hmotnostní detekci byl využit QDa detektor, kdy alkaloidy byly ionizovány pomocí kladného (ESI<sup>+</sup>) a fenolické látky pomocí záporného (ESI<sup>-</sup>) módu.

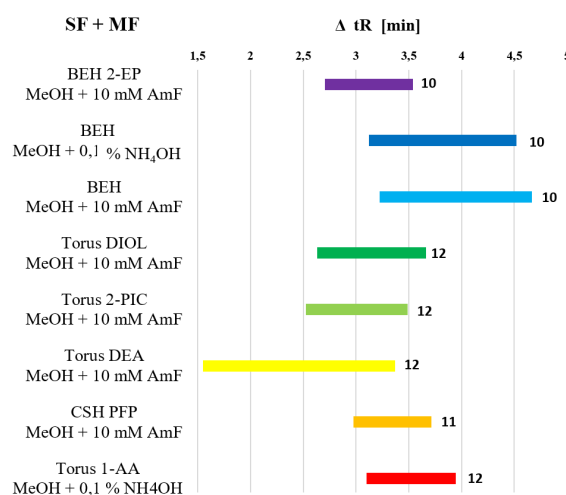
### Výsledky a diskuse

Základní screening byl proveden na 10 různých stacionárních fázích se 4 mobilními fázemi: (1)  $\text{CO}_2/\text{MeOH}$  (methanol), (2)  $\text{CO}_2/\text{MeOH} + 0,1\%$   $\text{NH}_3$ , (3)  $\text{CO}_2/\text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$  (mravenčan amonný), (4)  $\text{CO}_2/\text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF} + 2\%$   $\text{H}_2\text{O}$ , kdy bylo získáno 40 chromatogramů pro obě skupiny látek. V rámci nalezení nejlepší stacionární a mobilní fáze byly optimalizovány chromatografické podmínky, což zahrnovalo změnu organických modifikátorů a aditiv, změnu obsahu modifikátoru při gradientové eluci a dále změnu hodnot tlaku a teploty. Ve skupině alkaloidů byla kvůli výskytu několika isomerů stěžejním cílem účinná separace. V případě fenolických látek byl z důvodu různorodosti chemických struktur a odlišnosti fyzikálně-chemických vlastností řešen problém jejich separace v rámci jedné chromatografické analýzy.

Optimalizace UHPSFC metody pro alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Z velkého množství chromatogramů získaných v primárním screeningu (tab. I) bylo vybráno 8 nejlepších kombinací stacionární a mobilní fáze (obr. 3). Úspěšného oddělení všech analytů bylo dosaženo na kolonách Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA a Torus 1-AA. Nejlepších separací na základní linii bylo dosaženo se všemi mobilními fázemi na koloně Torus DEA. Z důvodu přítomnosti isomerů byla na této koloně výhodná větší šířka okna retenčních časů. Právě tato kolona byla předmětem optimalizace složení mobilní fáze a gradientové eluce. Výsledný chromatogram s optimalizovanými podmínkami je uveden na obr. 4.

#### ALKALOIDY čeledi *Amaryllidaceae*

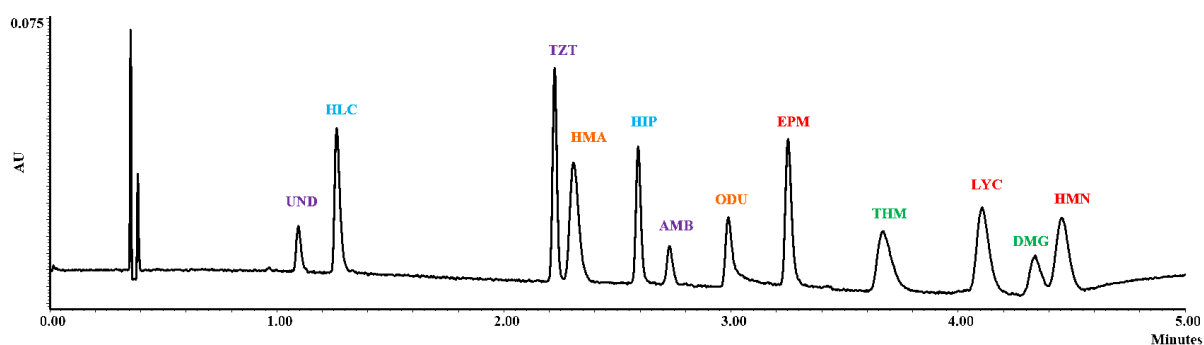


Obr. 3. Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných alkaloidů pro 8 nejlepších separací

Tabulka I

Výsledky primárního screeningu stacionárních a mobilních fází pro UHPSFC analýzu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* vyjádřené počtem eluovaných piků a počtem separovaných analytů

	MeOH		MeOH + 0,1% NH <sub>3</sub>		MeOH + 10 mM AmF		MeOH + 10 mM AmF + 2% H <sub>2</sub> O	
	eluované piky	separované alkaloidy	eluované piky	separované alkaloidy	eluované piky	separované alkaloidy	eluované piky	separované alkaloidy
1. BEH 2-EP	9	12	9	12	10	12	9	12
2. HSS C18	0	0	8	9	8	11	8	11
3. BEH	9	12	10	12	10	12	9	12
4. Torus DIOL	11	12	11	12	12	12	11	12
5. Torus 2-PIC	10	12	11	12	12	12	11	12
6. Torus DEA	12	12	12	12	12	12	12	12
7. CSH PFP	8	11	7	12	11	12	11	12
8. Torus 1-AA	7	12	12	12	10	12	10	12
9. Cortecs HILIC	4	6	11	12	8	12	10	12
10. BEH Amide	6	9	9	12	9	12	9	12



Obr. 4. Optimální chromatografické podmínky pro UHPSFC analýzu alkaloidů: separační kolona Torus DEA (3,0 × 100 mm; 1,7 μm), mobilní fáze CO<sub>2</sub>, organický modifikátor MeOH + ACN (acetonitril) (1:1), aditivum 0,1 % NH<sub>3</sub>, průtok 1,5 ml min<sup>-1</sup>, dávkovaný objem 2 μl, rozpouštědlo ACN, teplota 40 °C, tlak 140 bar / 2031 psi, gradientová eluce 4–20 %, UV detekce 290 nm, MS detekce MS sken v kladném ESI<sup>+</sup> módu, 60–500 Da

#### Optimalizace UHPSFC metody pro fenolické látky

Analýzy fenolických látek na kolonách Torus DIOL, Torus DEA, BEH a BEH Amide poskytovaly nejlepší separaci analytů (tab. II). Pro vybrané podmínky separací byl vyhotoven pruhový graf znázorňující velikost separačního okna analytů (obr. 5). Z důvodu eluce největšího počtu analytů a symetrickému tvaru piků byla pro následující

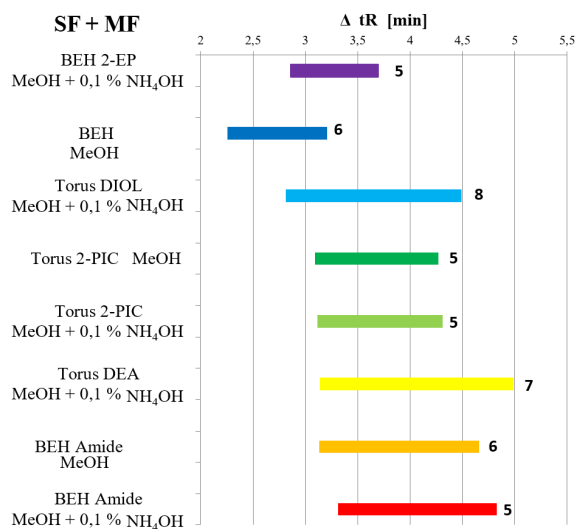
optimalizaci vybrána kolona Torus DIOL. Největším problémem zde byla eluce flavonoidů (rutin a sloučeniny odvozené od kvercetinu) z kolony. Z tohoto důvodu se tedy metoda jeví jako vhodná zejména pro fenolické kyseliny. Na obr. 6 je zobrazen chromatogram fenolických látek za použití optimalizovaných podmínek.

Tabulka II

Výsledky primárního screeningu stacionárních a mobilních fází pro UHPSFC analýzu fenolických látek vyjádřené počtem eluovaných píků a počtem separovaných analytů

	MeOH		MeOH + 0,1% NH <sub>3</sub>		MeOH + 10 mM AmF		MeOH + 10 mM AmF + 2% H <sub>2</sub> O	
	eluované píky	separované flavonoidy	eluované píky	separované flavonoidy	eluované píky	separované flavonoidy	eluované píky	separované flavonoidy
1. BEH 2-EP	5	5	5	5	5	5	5	5
2. HSS C18	2	2	4	6	2	2	2	2
3. BEH	6	6	6	6	5	6	6	6
4. Torus DIOL	8	8	8	8	8	8	8	8
5. Torus 2-PIC	5	5	5	5	5	5	5	5
6. Torus DEA	6	6	6	6	5	5	5	5
7. CSH PFP	4	4	4	3	2	2	2	2
8. Torus 1-AA	6	6	5	5	5	5	5	5
9. Cortecs HILIC	7	6	5	5	5	5	4	4
10. BEH Amide	6	6	5	5	7	6	7	6

### FENOLICKÉ LÁTKY



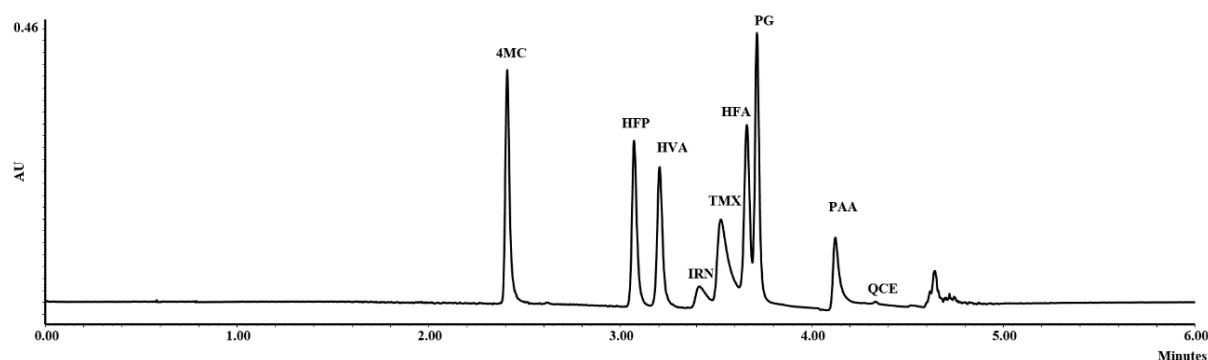
Obr. 5. Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných fenolických látek pro 8 nejlepších separací

### Závěr

Pro obě skupiny přírodních látek byla vyvinuta analytická metoda s využitím UHPSFC. Chromatografické podmínky byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity, vysokého rozlišení a symetrických píků. Pro skupinu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla nejvhodnější analýza na koloně Torus DEA, kde se eluovaly všechny analyty a isomery byly dostatečně separované. Nejvýhodnější pro separaci fenolických kyselin byla sledována kolona Torus DIOL, nicméně eluce flavonoidních struktur (kvercetin a jeho glykosidu rutin) prozatím zůstala předmětem budoucí optimalizace. Cílená a rychlá analýza těchto dvou skupin přírodních látek může sloužit k pochopení jejich metabolismu a vysvětlení léčivých účinků na lidský organismus.

*Tato práce vznikla za podpory projektu EFSA-CDN (reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) spolufinancovaného z EFRR a SVV No. 260412/2018.*





Obr. 6. **Optimální chromatografické podmínky pro UHPSFC analýzu fenolických látek:** separační kolona Torus DIOL ( $3,0 \times 100$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ), mobilní fáze  $\text{CO}_2$ , organický modifikátor MeOH, aditivum  $0,1 \%$   $\text{NH}_3 + 2 \%$   $\text{H}_2\text{O}$ , průtok  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , dávkovaný objem  $2 \mu\text{l}$ , rozpouštědlo MeOH, teplota  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , tlak  $140 \text{ bar} / 2031 \text{ psi}$ , gradientová eluce  $2\text{--}50 \%$ , UV detekce  $220 \text{ nm}$ , MS detekce MS sken v negativním (ESI<sup>-</sup>) módu,  $90\text{--}620 \text{ Da}$

## LITERATURA

1. Plachká K., Švec F., Nováková L.: *Anal. Chim. Acta* **1039**, 149 (2018).
2. Nováková L., Desfontaine V., Ponzetto F., Nicoli R., Saugy M., Veuthey J. L., Guillaume D.: *Anal. Chim. Acta* **915**, 102 (2016).
3. Torras-Claveria L., Tallini L., Viladomat F., Bastida J.: *Res. Signpost*, 69 (2017).
4. Egert S., Wolfram S., Schulze B., Langguth P., Hubbermann E. M., Schwarz K., Adolphi B., Bosy-Westphal A., Rimbach G., Müller M. J.: *Br. J. Nutri.* **107**, 539 (2012).

**T. Lacmanová<sup>a</sup>, K. Plachká<sup>a</sup>, V. Pilařová<sup>a</sup>, L. Cahliková<sup>b</sup>, and L. Nováková<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic*): **Supercritical Fluid Chromatography in Natural Products Analysis**

The goal of this study is to verify the suitability of UHPSFC method with PDA and MS detection for analysis of natural products. For the analytes, two representatives of natural compounds – the alkaloids of the family *Amaryllidaceae* with effect in the treatment of Alzheimer's disease and phenolic compounds with antioxidant activity – flavonoid rutin, quercetin and their metabolites were chosen.

Separations were carried out on the UHPSFC system Acquity UPC<sup>2</sup> with PDA and MS detector. The basic screening was performed on 10 stationary phases: BEH 2-EP, HSS SB C18, BEH, Torus DIOL, Torus 2-PIC,

Torus DEA, CSH PFP, Torus 1-AA, Cortecs HILIC and BEH Amide. Four mobile phases were tested: 1.  $\text{CO}_2 + \text{MeOH}$ , 2.  $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 0.1 \%$   $\text{NH}_4\text{OH}$ , 3.  $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM}$  ammonium formate, and 4.  $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM}$  ammonium formate +  $2 \%$   $\text{H}_2\text{O}$ . Separation conditions were as follows: flow rate  $1.5 \text{ ml/min}$ , temperature  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , pressure  $140 \text{ bar}$ , gradient elution from  $2 \%$  to  $40 \%$  within 4 minutes, with two isocratic steps at the beginning and at the end of the gradient. Detailed optimization of the chromatographic conditions involved changing the composition of the mobile phases, changing the gradient elution, and the pressure and temperature settings.

The UHPSFC method was developed for both groups of natural compounds and the conditions were optimized to achieve the best selectivity. In the alkaloid group, effective separation of isomers was a critical issue. In the case of phenolic compounds, the problem of elution and separation within one analysis had to be solved due to their different physicochemical properties. For the *Amaryllidaceae* family alkaloids, analysis on a Torus DEA column with  $\text{CO}_2 + \text{MeOH/ACN}$  (1:1) +  $0.1 \%$   $\text{NH}_4\text{OH}$  mobile phase was the most suitable, and allowed separation of all analytes. The separation of phenolic compounds was achieved with Torus DIOL column with a mobile phase of  $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 0.05 \%$   $\text{NH}_4\text{OH} + 2 \%$   $\text{H}_2\text{O}$ . However the elution of quercetin and its glycoside rutin remained subject of future optimization. Targeted analysis of both groups of natural compounds can be used to explain their metabolism and health effects on the human body.

**Keywords:** alkaloids of the *Amaryllidaceae* family, phenolic compounds, rutin, quercetin, UHPSFC-PDA/MS, method development, optimization of chromatographic conditions

## VÝVOJ CHEMICKÝCH JAZYKŮ S VYUŽITÍM SOLVATOCHROMNÍCH DERIVÁTŮ STILBAZOLU

TEREZA NAVRÁTILOVÁ, KAROLÍNA KUČÁKOVÁ a BOHUMIL DOLENSKÝ

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
navratit@vscht.cz

Klíčová slova: solvatochromismus, chemický jazyk, barvivo citlivé na polaritu, analýza rozpouštědel

### Úvod

Chemické jazyky jsou sdružená sensorová pole indikátorů o různé selektivitě a citlivosti, která umožňují jednoduchou analýzu kapalného chemického individua nebo vícesložkových systémů. Vyhodnocením signálů získaných ze sensorového pole lze získat komplexnější informaci o obsažených analytech ve vzorku než při použití samostatného indikátoru. Chemické jazyky mohou být využity například při kontrole čistoty vod<sup>1</sup>, organických rozpouštědel či kvality pohonných hmot<sup>2</sup>.

Vhodnými indikátory pro chemické jazyky jsou solvatochromní látky, např. deriváty stilbazolů, které jsou schopné měnit svou barvu v závislosti na polaritě prostředí ve svém okolí<sup>3</sup>. Tyto látky mají strukturu tzv. push-pull systému. Jejich strukturální základ tvoří *N*-alkylovaný stilbazol, kde dusík vystupuje jako elektron-donorní skupina. Na druhé straně molekuly je pak elektron-akceptorní skupina, např. kyslík. Tyto dvě skupiny jsou spojeny systémem konjugovaných dvojných vazeb, tzv.  $\pi$ -elektronovým můstkem. Svou přítomností  $\pi$ -elektronový můstek výrazně polarizují, což způsobuje energetickou nerovnocennost rezonančních stavů molekuly. Toto uspořádání v molekule

umožňuje vnitřní přenos náboje z donoru na akceptor, což umožňuje změny zbarvení indikátoru<sup>4</sup>.

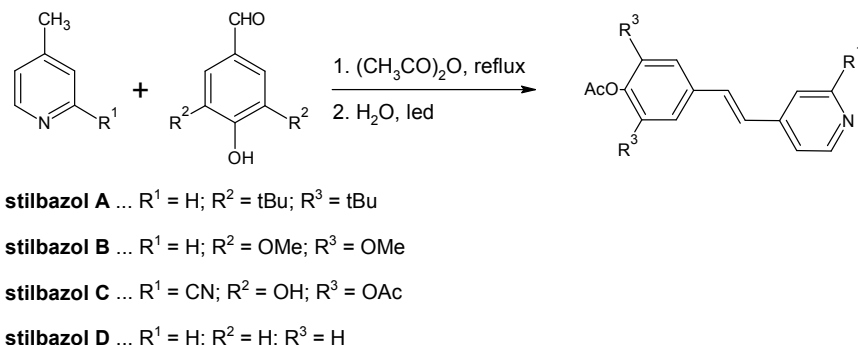
Pro konstrukci optických chemických jazyků je výhodná imobilizace solvatochromních látek na pevném povrchu. Pro uchycení indikátoru na povrch nosiče lze využít různých přístupů od nekovalentního navázání prostřednictvím nekovalentních interakcí (fyzisorpce) po kovalentní navázání prostřednictvím chemických vazeb (chemisorpce)<sup>5</sup>.

Cílem této práce bylo připravit stilbazoly A, B, C a D, které se liší povahou substituentů na aromatických jádrech (viz obr. 1) a tyto stilbazoly charakterizovat NMR spektroskopii. Po *N*-alkylaci připravených stilbazolů lze očekávat odlišné solvatochromní chování.

### Experimentální část

Výchozí 4-methylpyridin (čistota 98 %), 3,4,5-trihydroxybenzaldehyd (čistota 98,0 %) a 4-hydroxybenzaldehyd (čistota 98,0 %) byly zakoupeny od firmy T.C.I. Co., Ltd. 4-Methyl-2-pyridinkarbonitril (čistota 97 %), 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyd hemihydrát (čistota 99 %) a syringaldehyd (čistota 98 %) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

Stilbazol A byl připraven aldolovou kondenzací 4-methylpyridinu (1,75 g; 18 mmol) a 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyd hemihydrátu (4,46 g; 19 mmol) v acetanhydridu (20 ml) při teplotě 150 °C (reflux) po dobu 3 dnů. Stilbazol B byl připraven aldolovou kondenzací 4-methylpyridinu (2,23 g; 24 mmol) a syringaldehydu (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd; 4,38 g; 24 mmol) v acetanhydridu (20 ml) při teplotě 150 °C (reflux) po dobu 3 dnů. Stilbazol C byl připraven aldolovou kondenzací 4-methyl-2-pyridinkarbonitrilu (0,90 g; 8 mmol) a 3,4,5-trihydroxybenzaldehydu (1,37 g; 9 mmol)



Obr. 1. Schéma přípravy stilbazolů A, B, C a D

v acetanhydridu (20 ml) při teplotě 150 °C (reflux) po dobu 3 dnů. Stilbazol D byl připraven aldolovou kondenzací 4-methylpyridinu (9,48 g; 0,10 mol) a 4-hydroxybenzaldehydu (15,24 g; 0,13 mol) v acetanhydridu (20 ml) při teplotě 170 °C (reflux) po dobu 24 hodin.

Průběh chemických reakcí byl sledován pomocí TLC analýzy. Použitá vyvíjecí soustava byla chloroform:methanol 98:2. Surové produkty reakcí A, B a C byly po vychladnutí nality na led a zpracovány extrakcí mezi H<sub>2</sub>O a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Do spojených organických frakcí bylo přidáno sušidlo (bezvodý Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a z roztoku nad sušidlem byly odebrány vzorky pro TLC a NMR analýzy. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byly získány přečištěné surové produkty. Reakcí A bylo získáno 6,21 g surového produktu, což činí výtěžek 93 %. Reakcí B bylo získáno 6,61 g surového produktu, což činí výtěžek 92 %. Reakcí C bylo získáno 2,27 g surového produktu, což činí výtěžek 67 %. Tyto produkty byly dále izolovány a alkylovány. Stilbazol A byl izolován sloupcovou chromatografií na silikagelu (velikost pórů 60 Å, velikost částic 40 až 63 μm) od firmy Material Harvest, Cambridge, UK. Mobilní fází byl chloroform:methanol (0,5–20 % MeOH, gradientová eluce).

Surový produkt D byl zpracován nalitím na led, následnou dekantací vzniklé sraženiny a rekrystalizací z acetonitrilu. Výsledným produktem byl žlutý prášek. Reakcí bylo získáno 12,47 g produktu, což činí výtěžek 51 %. Připravená látka (0,10 g; 0,42 mmol) byla následně alkylována (3-jodpropyl)trimethoxysilanem (0,19 g; 0,64 mmol) v acetonitrilu (3,5 ml) při teplotě 60 °C po dobu 3 dnů za vzniku soli **3** (obr. 2). Tato sůl byla kovalentně imobilizována na povrchu silikagelu a takto připravený materiál byl testován na solvatochromní chování. Celkem bylo připraveno 6,89 g modifikovaného silikagelu.

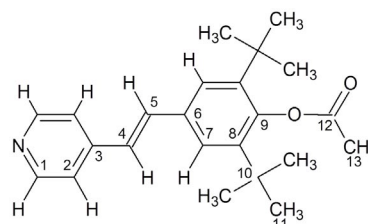
Analýza vzniklých směsí a identifikace připravených látek byla provedena NMR spektroskopií za využití <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter a korelačních 2D NMR spekter, a to <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C

HMBC a <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC. Vzorky pro NMR analýzu byly rozpouštěny v deuterovaném chloroformu (99,96 at.% D, 0,03 obj.% TMS) od firmy Sigma-Aldrich. K měření byly použity NMR kvety Wilmad WG-1000-7. NMR měření probíhalo na přístroji JEOL JNM-ECZR od firmy Jeol Resonance s pracovní frekvencí 500 MHz. V <sup>1</sup>H NMR a v <sup>13</sup>C NMR byl pro referenci použit zbytkový signál rozpouštědla CHCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H NMR: 7,26 ppm; <sup>13</sup>C NMR: 77,23 ppm). Jádra byla měřena při pracovních frekvencích: 500,16 MHz (<sup>1</sup>H), 125,77 MHz (<sup>13</sup>C) a 50,66 MHz (<sup>15</sup>N).

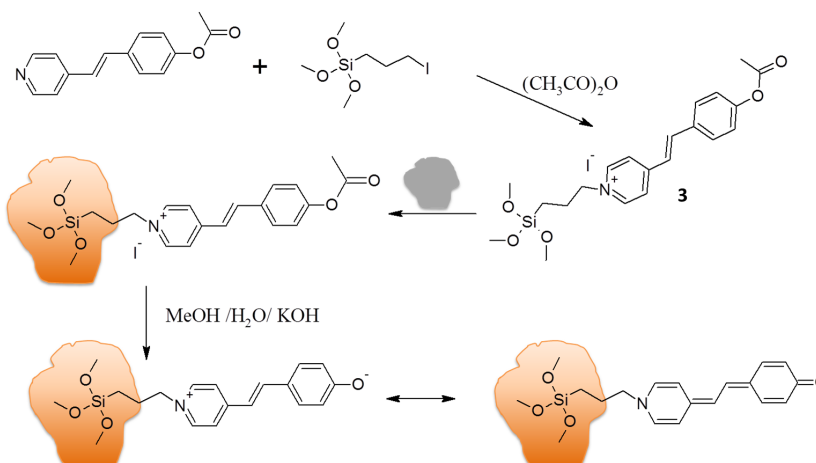
## Výsledky a diskuse

Stilbazol A byl v surovém produktu identifikován <sup>1</sup>H NMR spektroskopií. Po provedení sloupcové chromatografie a naměření <sup>1</sup>H NMR spekter jednotlivých frakcí byly určeny frakce, které náleží hledanému produktu. Čistota získaného produktu byla dostatečná pro provedení úplného přiřazení NMR signálů. K tomu byly využity 2D NMR spektra.

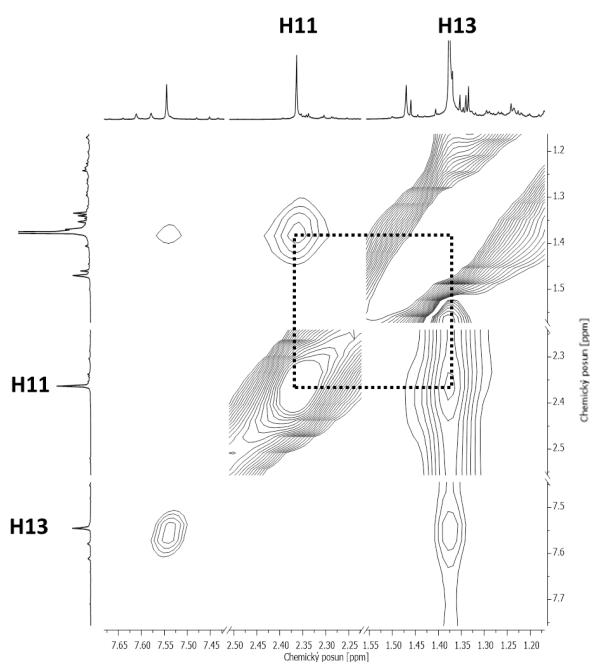
<sup>1</sup>H NMR (500,16 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d): δ 8,617 (m, *J* = 6,3 Hz, 2H, H1), 7,696 (m, *J* = 6,3 Hz, 2H, H2), 7,521 (s, 2H, H7), 7,490 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, H4), 7,358 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, H5), 2,362 (s, 3H, H13), 1,375 (s, 18H, H11) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d): δ 170,951 (C12), 151,448



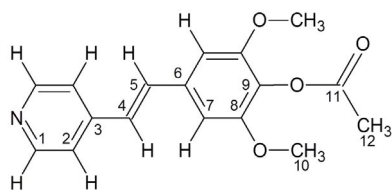
Obr. 3. Strukturální vzorec stilbazolu A s číselným značením uhlíkové kostry



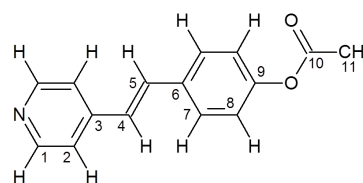
Obr. 2. Schématická příprava silikagelu modifikovaného stilbazolem D a rezonanční struktury navázané solvatochromní látky



Obr. 4.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY spektrum stilbazolu A s vyznačením krospeků vodíků H11 a H13



Obr. 5. Strukturální vzorec stilbazolu B s číselným značením uhlíkové kostry



Obr. 6. Strukturální vzorec stilbazolu D s číselným značením uhlíkové kostry

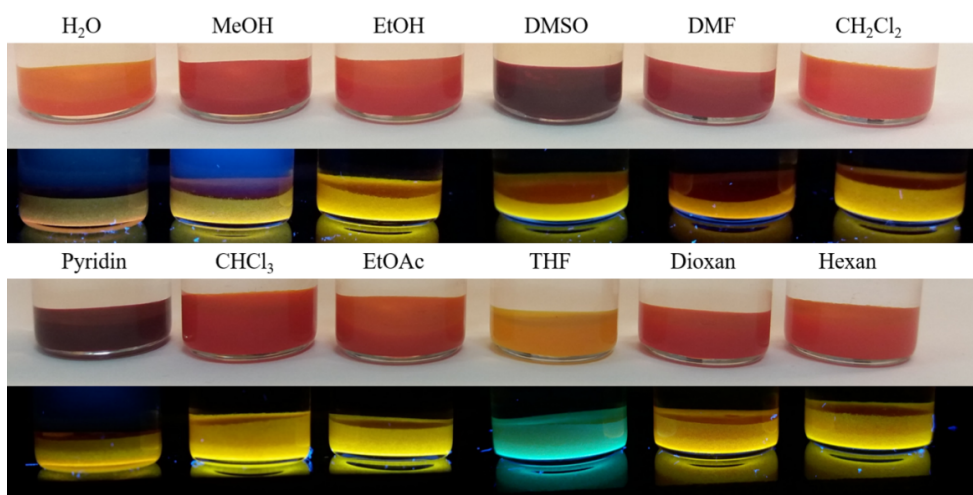
(C3), 150,072 (C10), 143,717 (C1), 143,627 (C9), 139,190 (C5), 132,068 (C6), 126,073 (C7), 123,188 (C4), 122,273 (C2), 35,655 (C8), 31,415 (C11), 22,695 (C13) ppm.  $^{15}\text{N}$  NMR (50,66 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*):  $\delta$  205,589 ppm (obr. 3).

Interakční konstanta  $J = 16,2$  Hz odpovídá *trans*-konfiguraci na dvojné vazbě. Spojení fragmentu  $-\text{COCH}_3$  se zbytkem molekuly bylo prokázáno pomocí  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY spektra, ve kterém je patrná výrazná korelace vodíků methylových skupin (H11 a H13) přes prostor (viz obr. 4).

Stilbazol B byl v surovém produktu identifikován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie.  $^1\text{H}$  NMR (500,16 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*):  $\delta$  8,568 (m,  $J = 6,5$  Hz, 2H, H1), 7,428 (m,  $J = 6,5$  Hz, 2H, H2), 7,265 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H4), 6,948 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H5), 6,767 (s, 2H, H7), 3,856 (s, 6H, H10), 2,325 (s, 3H, H12) ppm (obr. 5).

Bylo zjištěno, že za zvolených podmínek reakce C neposkytuje produkt aldolové kondenzace. Analýzou multipletů a integrálních intenzit naměřeného  $^1\text{H}$  NMR spektra surového produktu bylo zjištěno, že obsahuje nezureagovaný výchozí 4-methyl-2-pyridinkarbonitril a že majoritním produktem reakce je 5-[bis(acetyloxy)methyl]-1,2,3-benzotriol-1,2,3-triacetát.

Pomocí naměřených NMR spekter bylo provedeno úplné přiřazení  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR signálů připraveného stilba-



Obr. 7. Solvatochromní silikagel na dně vialek v rozpouštědlech různé polarity pod laboratorním (nahore) a UV (dole,  $\lambda_{\text{ex}} = 366$  nm) osvětlením

zolu D.  $^1\text{H}$  NMR (500,16 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*):  $\delta$  8,336 (m,  $J = 6,1$  Hz, 2H, H1), 7,344 (m,  $J = 8,6$  Hz, 2H, H7), 7,163 (m,  $J = 6,1$  Hz, 2H, H2), 7,083 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H, H4), 6,904 (m,  $J = 8,6$  Hz, 2H, H8), 6,770 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H, H5), 2,096 (s, 3H, H11) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*):  $\delta$  168,777 (C10), 150,459 (C9), 149,388 (C1), 144,214 (C3), 133,346 (C6), 131,824 (C4), 121,603 (C8), 125,596 (C5), 127,569 (C7), 120,485 (C2), 20,643 (C11) ppm (obr. 6).

Alkylaci připraveného stilbazolu D vznikla sůl **3** (viz obr. 2). Tato sůl byla smíchána za laboratorní teploty se silikagelem (velikost pórů 60 Å, velikost částic 40 až 63  $\mu\text{m}$ ). Suspenze byla následně promyta roztokem hydroxidu sodného v methanolu. Pevná fáze byla odfiltrována na filtračním papíře a promyta destilovanou vodou. Výsledný materiál byl vysušen při laboratorní teplotě. Celkem bylo připraveno 6,89 g modifikovaného silikagelu.

Modifikovaný silikagel byl navážen do vialek a testován na solvatochromní chování přidávkem 3 ml dvanácti rozpouštědel různé polarity. Změna zbarvení silikagelu v závislosti na přidaném rozpouštědle je patrná z obr. 7. V některých případech (např. MeOH a EtOH) mohou být velmi podobné barvy viditelné pouhým okem následně pod UV ozářením snadněji odlišitelné.

## Závěr

V rámci této práce byly připraveny stilbazoly A, B a D. Bylo zjištěno, že stilbazol C za daných podmínek v reakci jako hlavní produkt nevzniká. Stilbazoly A a D byly získány v čistotě dostatečné pro úplnou charakterizaci pomocí NMR spektroskopie. Připravené stilbazoly A a B budou následně *N*-alkylovány a otestovány na solvatochromní chování. Dále budou zakotveny na povrch silikagelu a takto připravený materiál bude testován na solvatochromní chování v rozpouštědlech různé polarity, přičemž cílem je, aby se solvatochromním chováním nelineárně lišil od již připraveného solvatochromního materiálu s kovalentně navázaným stilbazolem D (cit.<sup>5</sup>).

*Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za finanční podporu v projektu č. 17-02836S.*

## LITERATURA

1. Kalvoda R.: Chem. Listy 94, 215 (2000).
2. Park H., Chang S.: Dyes Pigm. 122, 324 (2015).
3. Askim J. R., Mahmoudi M., Suslick K. S.: Chem. Soc. Rev. 42, 8649 (2013).
4. Bureš F.: Chem. Listy 107, 834 (2013).
5. Navrátilová T.: *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2017.

**T. Navrátilová, K. Kučáková, and B. Dolenský** (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Development of Chemical Tongue Using Solvatochromic Derivatives of Stilbazole**

Aim of this work was to prepare stilbazoles A, B, C and D by aldole condensation reaction. Stilbazoles A, B and D were successfully prepared, purified and then characterized by NMR spectroscopy. It was found, that reaction C does not provide stilbazole C as a major product. Solvatochromic compound was then prepared by reaction of stilbazole D with (3-iodopropyl)trimethoxysilane. Given compound was immobilized on silica surface. Prepared material was treated with solvents of different polarity. It was proven, that prepared material is solvatochromic and thus applicable as sensing material. Alkylated stilbazoles A and B are assumed to give different solvatochromic response than stilbazole D.

Keywords: solvatochromism, chemical tongue, polarity-sensitive dye, solvent analysis

## BIOFYZIKÁLNÍ ANALÝZA STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC PŘIPRAVENÝCH ZELENOU SYNTÉZOU A VYUŽITÍ PRO 3D TISK ANTIBAKTERIÁLNÍHO MATERIÁLU

KAREL SEHNAL<sup>a</sup>, MARTINA STAŇKOVÁ<sup>b</sup>,  
MICHAELA DOČEKALOVÁ<sup>b</sup>, DAGMAR  
UHLÍŘOVÁ<sup>b</sup>, MICHAEL GARGULÁK<sup>a,b</sup>,  
ZUZANA TÓTHOVÁ<sup>b</sup>, BRANISLAV  
RUTTKAY-NEDECKÝ<sup>a</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, <sup>b</sup> Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Tovární 342, 742 13 Studénka, <sup>c</sup> Ústav vinohradnictví a vinařství, Mendelova univerzita, Zahradnická fakulta, Valtická 337, 691 44 Lednice  
karelsehnal15@gmail.com

Klíčová slova: stříbrné nanočástice, zelená syntéza, antibakteriální aktivita, 3D tisk, nozokomiální infekce

### Úvod

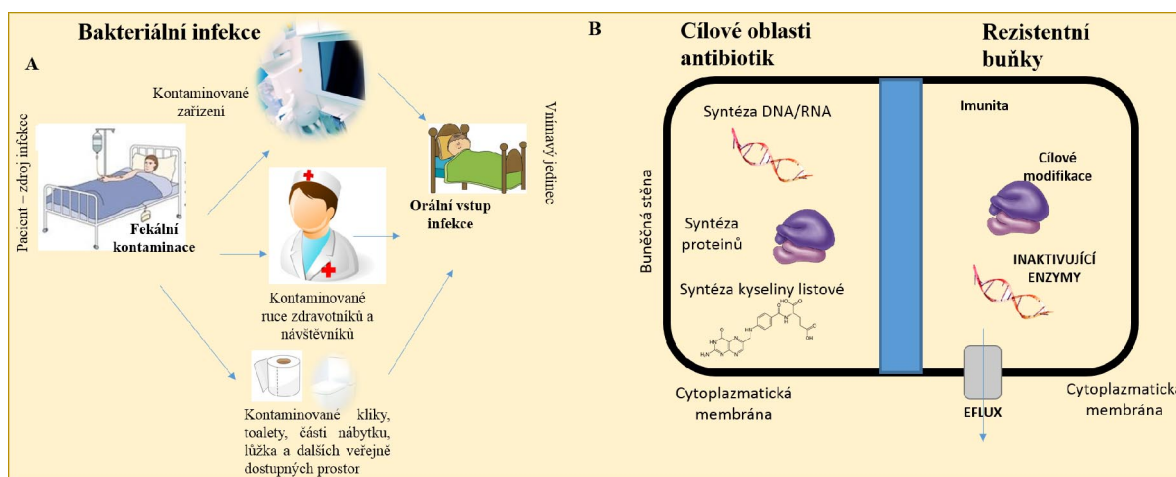
Na počátku 21. století jsou nadále velkým problémem nozokomiální infekce (obr. 1A), které vznikají v důsledku nesprávného užívání antibiotik, nadměrného využívání dezinfekce v nemocničních zařízeních a doposud nepřilíh dobře pochopenými mechanismy bakteriální rezistence (obr. 1B). Předcházení takovým infekcím není snadné<sup>1</sup>. Podle amerického National Institute of Health

(NIH) zemře ročně v USA téměř 100 000 lidí v důsledku zmíněných nálezů, což je asi 270 lidí denně. Nozokomiální infekce představují častější příčinu smrti než onemocnění HIV, dopravní nehody a rakovina prsu dohromady<sup>2,3</sup>. Pozorovaný rychlý vzestup bakteriální rezistence vyžaduje hledání nových strategií<sup>3</sup>. Jako jedno z možných řešení se jeví využívání nanotechnologií<sup>4</sup>. Některé druhy nanočástic včetně stříbrných nanočástic (AgNPs) vykazují antimikrobiální, antivirotické a antifungální účinky. Zelená syntéza AgNPs využívá enzymů, rostlinných a živočišných extraktů, které působí jako redukční činidla. Vyžaduje nižší náklady, je šetrná k životnímu prostředí a není potřeba používat vysoký tlak a teplotu<sup>5</sup>. 3D tisk nalézá svoje uplatnění napříč různými odvětvími včetně využití v chemických laboratořích<sup>6,7</sup>. Technologie pracuje s filamenti o rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech. 3D tiskem lze připravit plastové, keramické, kovové či biologické materiály. Díky snadnému a unikátnímu použití se počítá s jeho rozsáhlým uplatněním v biomedicíně. Cílem práce bylo navrhnout koncept spojení AgNPs připravených zelenou syntézou s antibakteriální aktivitou a technologií 3D tisku.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Dusičnan stříbrný, methanol, NaCl a další použité chemikálie byly pořízeny od firmy Merck (USA) v čistotě > 99 %. Pro kultivaci mikroorganismů byly zakoupeny



Obr. 1. (A) Zjednodušené schéma šíření infekce. Pacient je zdrojem infekce, dochází k fekální kontaminaci zdravotnického vybavení, rukou zdravotníků a návštěvníků. Infekční agens je uchováno na klikách, toaletách, nábytku apod. (B) Předpokládané pravděpodobné cílení antibiotik na prokaryotickou buňku. Účinek je směřován do DNA/RNA syntézy, buněčné stěny, buněčné membrány, syntézy proteinů, metabolismu folátu. Rezistence bakteriální buňky spočívá v oblasti inaktivace enzymů, modifikace DNA, syntézy proteinů, metabolických drah, změny v metabolismu folátu a aktivním vylučování antibiotik z buňky specifickým transportérem

trypton a kvasničný extrakt od firmy Duchefa Biochemie (Německo).

#### Přístroje

##### Fotometrie

Chemický analyzátor BS-300 firmy Mindray (Čína). Fotometrický detektor měří při vlnových délkách: 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630 a 670 nm. Spektrofotometrie: pro záznam UV/VIS spekter bylo využito jednopaprskového spektrofotometru UV/VIS UV-3100PC firmy VWR (USA). VIS spektrum bylo měřeno v plastových kyvetách s optickou dráhou 1 cm. Spektrofotometr Infinite F50, firmy Tecan (Švýcarsko), byl využit pro měření na polystyrenové mikrotitrační destičce firmy Gama Group a.s. (Česká republika).

##### Ostatní přístroje

3D tiskárna Profi3DMaker firmy 3Dfactories (Česká republika). 3D tiskárna využívá technologie FDM. Voda byla upravena systémem Aqual a následně upravena na čistotu 18 MΩ cm deionizátorem Elga firmy Purlab Flex (USA).

#### Příprava AgNPs zelenou syntézou

Biologický materiál: mateřídouška obecná, *T. serpyllum* (T), šalvěj lékařská, *S. officinalis* (S), jetel luční,

*T. pratense* (TP) (obr. 2A) byl sbírán v lokalitě Bořitov od června do srpna 2018. Rostliny byly sušeny (60 °C, 48 h) a homogenizovány mletím na částice o velikosti 1–2 mm. Příprava extraktu: směs byla míchána v ultračisté vodě (60 °C, 60 min) v poměru 5 g DW/100 ml, w/v. Následně proběhla centrifugace (15 min, 4000 g). Extrakt byl smíchán s 0,1 M AgNO<sub>3</sub> (1:1). Vytvořené nanočástice byly přečištěny methanolem (1:1). Po přečištění byl methanol odpipetován a AgNPs byly sušeny (24 h, 60 °C, sušárna firmy VWR, USA). Výtěžnost (%) byla vypočtena podle vzorce:  $V = m_{\text{zjištěné}}/m_{\text{teoretické}} \times 100$

#### Základní charakterizace AgNPs

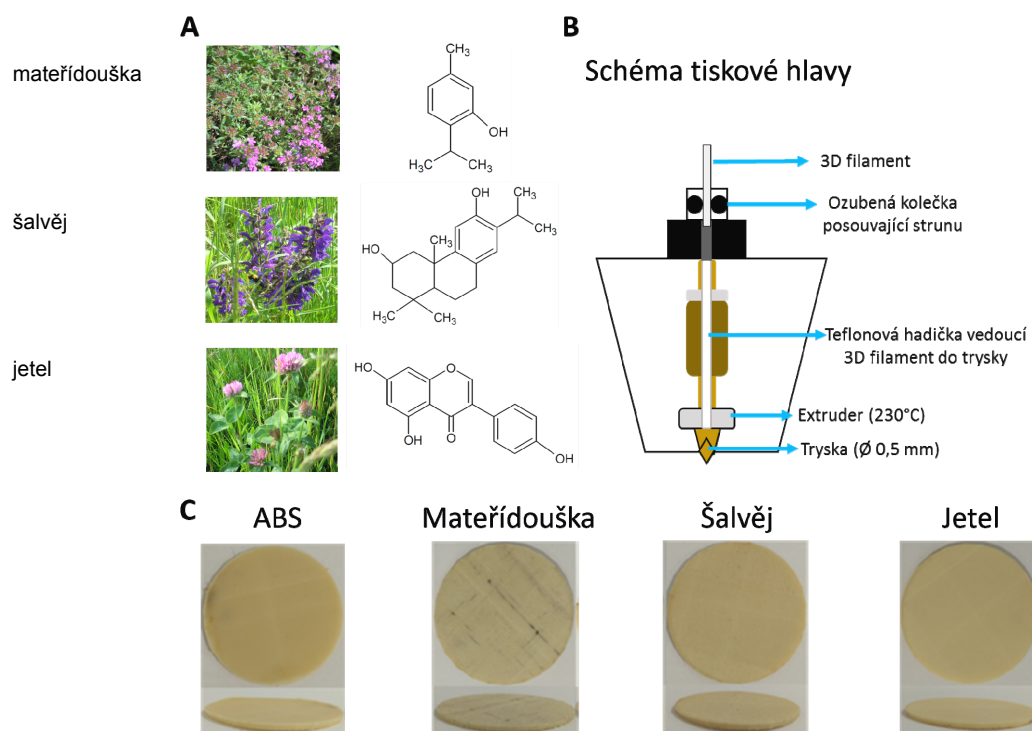
##### Fyzikální charakterizace

Změna zbarvení roztoku byla vyhodnocena z fotodokumentace (Canon 12 Mpx) ColorTestem firmy Prevention Medicals (ČR) a VIS spektrem (800–250 nm, sken 0,5 nm). Distribuce velikosti a ζ-potenciál byly stanoveny za využití Zetasizer Nano ZS ZEN3600 firmy Malvern Instruments (UK). AgNPs byly dále analyzovány SEM firmy Zeiss (Německo).

##### Chemická charakterizace

Metody ke zjištění schopnosti zhašení volných radikálů

Byla použita metoda DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Barevná změna byla sledována spektrofotometricky při 510 nm. Bylo napipetováno 20 μl



Obr. 2. (A) Rostliny použité pro zelenou syntézu AgNPs. Zástupci nejvíce zastoupených fytochemikálií – thymol, salviol, genistein. (B) Schéma technického řešení tiskové hlavy využívané v technologii 3D tisku (FDM) materiálu ABS. (C) Vzhled připravených platform

vzorku a 200  $\mu\text{l}$  činidla. Metoda ABTS je založena na schopnosti zhasět 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Bylo napipetováno 45  $\mu\text{l}$  vzorku a 200  $\mu\text{l}$  činidla. Absorbance byla sledována při 670 nm. Výsledná aktivita byla porovnána s aktivitou 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny<sup>8,9</sup>.

Metody k detekci celkových fenolů a flavonů

Celkové fenoly byly stanoveny pomocí činidla Folin-Ciocalteu<sup>10</sup>. Bylo napipetováno 4  $\mu\text{l}$  vzorku a 316  $\mu\text{l}$  činidla. Absorbance vzniklého komplexu byla sledována při 670 nm. K určení celkových flavonů byla použita aluminiová metoda<sup>11</sup>. Množství 0,5 ml vzorku bylo smícháno s 1,5 ml methanolu, 0,1 ml 10% chloridu hlinitého, 0,1 ml 1M octanu draselného a 2,8 ml ultračisté vody. Absorbance byla měřena při 415 nm.

Celková bílkovina

Celková bílkovina byla stanovena biuretovou<sup>12</sup> a pyrogalovou<sup>13</sup> metodou. Bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  biuretového činidla, následně 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Absorbance vzniklého fialového komplexu byla měřena při vlnové délce 546 nm. Ke stanovení koncentrace celkových bílkovin pyrogalovou červení bylo ke 200  $\mu\text{l}$  činidla přidáno 4  $\mu\text{l}$  vzorku. Měření absorbance vzniklých modrých komplexů proteinů probíhalo při 578 nm.

Antibakteriální aktivita AgNPs

*Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byly získány ze Sbírký mikroorganismů MU Brno (kultivace zásobní kultury LB medium, 37 °C, 24 h). Určení růstových křivek probíhalo po dobu 12 h při 25 °C ve sterilní mikrotitrační

destičce (0,3 ml, třepání 5 s, 150 rpm). Měření probíhalo na přístroji Infinite F50 firmy Tecan, (Švýcarsko) při 620 nm. Změna absorbance byla zaznamenávána každých 15 min.

Statistická analýza dat

Dostupná experimentální data byla zpracována a vyhodnocena matematicky a statisticky přímo v databázi Qinslab firmy Prevention Medicals (ČR). Vyloučení extrémních hodnot u souborů dat bylo uskutečněno výpočtem v Grubbsově testu. Experimentální práce byla provedena minimálně ve třech nezávislých experimentech ( $n_1$ ). Každý vzorek byl nejméně 5krát analyzován ( $n_2$ ). Získaná data prezentovaná v práci jsou uvedena jako průměrné hodnoty.  $IC_{50}$  byla stanovena probitovou analýzou.

## Výsledky a diskuse

Optimalizace metod

Výše zmíněné metody použité ke zjištění schopnosti zhasět volné radikály a k detekci celkových fenolů, flavonů a bílkovin byly optimalizovány. Hodnoty LOD a LOQ byly určeny podle práce Hubaux a Vose na hladině významnosti 95 % (cit.<sup>14</sup>). Dále byl určen RSD a QC koeficient. Výsledky jsou shrnuty v tab. I.

Optimalizace přípravy AgNPs

Z usušených rostlin byl mletím připraven materiál o velikosti 1–2 mm. Rostlinná droga byla navážena (0,5 g)

Tabulka I

Základní fytochemická analýza připraveného rostlinného extraktu při různých podmínkách extrakčního procesu

Analytická metoda	Linearita [g l <sup>-1</sup> ]	Rovnice přímky	Regresní koeficient ( $r^*$ )	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	LOQ <sup>b</sup>	RSD	Linearita (QC koeficient)
Celková bílkovina: (Biuretova metoda) <sup>c</sup>	1–60	$y = 7,65x - 22$	0,9962	7	23	2	7	14	17,68
Celková bílkovina: Pyrogalovou červení <sup>c</sup>	1–30	$y = 39,83x + 33$	0,9915	5	19	1	6	20	16,61
Celkové fenoly: Folin Ciocalteu metoda	1–1000	$y = 7,22x - 18$	0,9991	54	181	16	48	6,0	5,88
Celkové flavonoidy: aluminiová metoda	1–50	$y = 1,25x + 5,6$	0,9965	0,5	5	0,1	1	8,8	4,12
Zhášeni radikálu: ABTS metoda	1–125	$y = -327,42x + 45593$	0,9948	22	25	8	25	13	4,09
Zhášeni radikálu: DPPH metoda	1–20	$y = -429,5x + 8330$	0,9956	5	18	2	6	8,8	4,12

<sup>a</sup> LOD, LOQ, ISO, <sup>b</sup> LOD, LOQ, SmOdch; hodnoty LOD a LOQ byly určeny podle práce Hubaux a Vos na hladině významnosti 95 % (cit.<sup>14</sup>). Vzorce pro SmOdch a ISO dle cit.<sup>14</sup>; počet opakování  $n = 6$ , <sup>c</sup> kalibrátor sojový protein



a převedena do 10 ml ultračisté vody, extrakce probíhala po dobu 60 min při teplotách 20, 40, 60 a 80 °C. Vyšší teploty nebyly zvoleny z důvodu potencionálního ovlivnění připraveného extraktu. Následně byly extrakty centrifugovány (15 min, 4000 g) a filtrovány. Další podrobnosti budou publikovány na mezinárodní konferenci NANO-OSTRAVA 2019 (cit. <sup>15</sup>).

#### Charakterizace připravených rostlinných extraktů

Rostlinné extrakty byly analyzovány dříve popsány metodami. Obsah celkových bílkovin v extraktech měřených za využití pyrogalové červeně klesal s rostoucí teplotou přípravy extraktů. Pomocí biuretové metody byl dokázán nejvyšší podíl bílkovin (93,5 g l<sup>-1</sup>) v extraktech připravených ze *S. officinalis* (20 °C). Nejnižší koncentrace (0,27 g l<sup>-1</sup>) byla zjištěna v extraktu z *T. pratense* (20 °C).

Koncentrace fenolických látek (Folinova-Ciocalteu metoda) v extraktech vzrůstala přímo úměrně s teplotou přípravy. Za využití Folinovy metody bylo dokázáno nejvíce fenolických látek (1046 g l<sup>-1</sup>) v extraktu z *T. serpyllum* (80 °C). Obsah flavonoidů v extraktech z *T. serpyllum* s rostoucí teplotou přípravy klesal, naopak u extraktů získaných ze *S. officinalis* rostl. Metoda DPPH prokázala závislost schopnosti extraktů z *T. pratense* zhášet volné radikály na teplotě jejich přípravy. Volné radikály byly nejvíce zhášeny (10,5 GA g l<sup>-1</sup>) extrakty ze *S. officinalis* (80 °C). Při teplotách 60 °C a 80 °C byla schopnost extraktů zhášet volné radikály nižší než při teplotách 20 °C a 40 °C. Za využití metody ABTS se schopnost extraktů (*S. officinalis*, *T. pratense*) zhášet volné radikály se zvyšující teplotou jejich přípravy průkazně snižovala. Podle metody ABTS zhášely volné radikály nejvíce výluhy z *T. pratense* (12,74 GA g l<sup>-1</sup>).

Tabulka II

Výsledky fytochemické analýzy extraktů z nadzemních částí *T. serpyllum*, *S. officinalis*, *T. pratense*

Rostlinný extrakt	Celková barevnost [D]	Celková bílkovina <sup>a</sup> [g l <sup>-1</sup> ]	Celková bílkovina <sup>b</sup> [g l <sup>-1</sup> ]	Celkové fenolické látky <sup>c</sup> [g l <sup>-1</sup> ]	Celkové flavonoidy <sup>d</sup> [g l <sup>-1</sup> ]	Zhášení radikálu ABTS [GA g l <sup>-1</sup> ]	Zhášení radikálu DPPH [GA g l <sup>-1</sup> ]	Návratnost <sup>e</sup> [%]
Teplota extrakce 20 °C								
<i>T. serpyllum</i> (T)	0,47±0,01	59,7±16,5	26,9±1,0	806,6±0,8	1,3±0,07	871±0,4	7,7±4,2	92,0
<i>S. officinalis</i> (S)	0,27±0,01	93,5±18,3	115,6±2,7	702,9±12,5	1,9±0,05	861±0,7	10,5±3,0	146,4
<i>T. pratense</i> (TP)	0,76±0,04	24,5±5,4	77,3±2,3	351,1±30,2	2,2±0,09	1131±0,7	9,4±3,7	53,7
Teplota extrakce 40 °C								
<i>T. serpyllum</i> (T)	0,48±0,01	48,9±13,4	16,5±1,0	605,7±34,9	1,1±0,03	1042±0,5	7,3±6,0	92,2
<i>S. officinalis</i> (S)	0,27±0,01	89,6±26,7	60,1±1,0	763,2±5,7	2,2±0,06	805±0,4	9,4±1,1	133,6
<i>T. pratense</i> (TP)	0,69±0,04	24,6±5,9	56,9±1,3	326,2±6,2	2,6±0,06	1274±0,2	9,2±2,2	52,8
Teplota extrakce 60 °C								
<i>T. serpyllum</i> (T)	0,48±0,01	64,3±13,7	21,1±1,9	1014,1±8,9	0,8±0,05	663±0,4	7,1±1,6	92,2
<i>S. officinalis</i> (S)	0,30±0,01	91,5±26,4	63,8±2,1	736,2±73,9	2,4±0,08	733±0,5	9,5±3,9	134,6
<i>T. pratense</i> (TP)	0,70±0,04	27,6±6,3	22,4±1,1	446,8±20,1	2,0±0,07	1136±0,5	4,8±3,2	57,9
Teplota extrakce 80 °C								
<i>T. serpyllum</i> (T)	0,48±0,01	61,8±9,7	19,3±1,0	1170,7±25,6	0,9±0,06	530±0,5	6,4±2,7	92,6
<i>S. officinalis</i> (S)	0,31±0,01	81,6±15,3	33,6±1,9	1046,1±49,5	2,6±0,10	588±0,5	8,1±3,0	115,8
<i>T. pratense</i> (TP)	0,60±0,04	30,0±6,1	14,7±1,1	478,4±19,2	1,2±0,08	1085±0,5	4,7±2,2	57,9

\* extrakce v ultračisté vodě probíhala za stálého míchání (350 rpm) po dobu 60 min, <sup>a</sup> biuretová metoda, <sup>b</sup> metoda s pyrogalovou červení, <sup>c</sup> Folinova-Ciocalteu metoda, <sup>d</sup> aluminiová metoda, <sup>e</sup> vztaženo k hnědé barvě (D 0.52) pro 100 g DW/l extraktu

### Příprava stříbrných nanočástic zelenou syntézou

Připravený extrakt byl smíchán s dusičnanem stříbrným (1:1, 500 rpm, 25 °C)<sup>16</sup>. Přítomnost AgNPs ve směsi byla potvrzena signálem mezi 435–455 nm v absorpčním spektru UV/VIS (tab. II). AgNPs byly charakterizovány: hydrodynamická velikost se pohybovala v rozmezí 20 až 60 nm, absorpční spektra dosahovala maxima v intervalu mezi 440–470 nm. Rychlostní konstanty tvorby AgNPsT, S, TP byly určeny integrační metodou a experimentálně se pohybovaly kolem  $3 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ AU}^{-1}$ . AgNPs vznikaly nejrychleji při použití extraktu připravovaného při 60 °C. Byl zjištěn ideální čas, při kterém se vytvoří největší množství AgNPs v roztoku (24 h). Výťažnost zelené syntézy AgNPs pro T, S, TP byla vypočítána v rozmezí 40 až 80 %. Pro základní charakterizaci povrchových vlastností AgNPs bylo využito jednoduchých reakcí (celkové fenoly, flavony, schopnost zhaset radikály, celková bílkovina). Chemické vlastnosti: ABTS 40–80 % z kontroly, DPPH 15 až 55 % pokles za 15 min zhasení radikálů, celkové fenoly (extrakt): 1200–1800 mg ml<sup>-1</sup> ekv. GA. Z analýzy SEM vyplývá, že částice byly většinou kulovitého tvaru o velikosti 50 nm. Metodou SPR byla stanovena velikost částic v intervalech 20–60 nm a zeta potenciál v oblasti –20 mV až –5 mV.

### Modifikace 3D filamentu

AgNPs byly dispergovány v 18 MΩ cm vodě a acetonu (1:1, 3 mg ml<sup>-1</sup>). Možnosti využití 3D tisku v chemických laboratořích a pro biotechnologické aplikace jsou intenzivně rozvíjeny<sup>6,17,18</sup>. 3D filament (vlákno, ABS – akrylonitrilbutadienstyren, průměr 1,7 mm, bílá) požadované délky (min. 40 cm pro tisk materiálu ve tvaru kolečka ( $r = 14 \text{ mm}$ , tloušťka = 2 mm)) byl modifikován přečištěnými AgNPs. Po zaschnutí disperze byla struna uchycena do 3D tiskárny a byla vytisknuta testovací platforma. Extruder 3D tiskárny byl zahřátý na teplotu 230 °C a teplota podložky byla 80 °C, průměr trysky 0,5 mm (obr. 2B,C). Při teplotě 70 °C byla nanášena na podložku tenká vrstva 3D lepidla pro lepší uchycení první tiskové vrstvy. Tisková tryska a teflonová trubička přivádějící filament do tiskové hlavy byly mezi každým tiskem materiálu očištěny acetonem. V dalších postupech bude provedeno testování filamentu typu PLA (kyselina polymléčná) a PET-G (glykol modifikovaný polyethylentereftalátem). Další směr práce bude spočívat v používání jiných tiskových metod, které využívají nižších teplot.

### Antibakteriální aktivita 3D tiskem ABS-AgNPs

Vyvíjení baktericidních povrchů pomocí jednoduchých chemických metod představuje nadějnou cestu k řadě aplikací<sup>1,3–5,7,19–21</sup>. AgNPs s vázanými biomolekulami na povrchu prezentují možnost, jak účinně a dlouhodobě obcházet bakteriální rezistenci vůči AgNPs připraveným chemickou cestou. Antibakteriální aktivita byla stanovena na modelových organismech (*S. aureus*, *E. coli*).

Vytištěný materiál byl rozdrcen a vložen do mikrotitrační destičky (1 mg) k suspenzi s bakteriemi (250 μl, OD = 0,1). Byly měřeny růstové křivky (ABS, ABS-AgNPs). Diferenciál vzorek/kontrola (OD) byl proveden jako rozdíl jednotlivých bodů růstové křivky bakterie a bodů inhibice AgNPs. AgNPsT, S, TP vykazovaly inhibiční aktivitu o 20 až 40 % z kontroly (vytištěný čistý ABS materiál). Na základě výpočtu IC<sub>50</sub> byly MIC stanoveny na AgNPsT (2,5 μg ml<sup>-1</sup>), AgNPsS (3 μg ml<sup>-1</sup>), AgNPsTS (6 μg ml<sup>-1</sup>). Jednotlivé typy AgNPs byly nanášeny výše popsaným způsobem na ABS materiál. 3D tiskem byly vytisknuty testovací platformy. U všech testovaných materiálů byla zjištěna minimálně 25% inhibice ve srovnání s kontrolou (10<sup>10</sup>/ml buněk).

### Závěr

Nanočástice stříbra vykazují výrazné antibakteriální vlastnosti. U některých bakterií byla sledována rezistence vůči AgNPs získaných běžnou chemickou cestou. Pomocí zelené syntézy lze připravit modifikované AgNPs, které na svém povrchu obsahují vázané biomolekuly z použitých rostlinných extraktů. Zelenou syntézou získané AgNPs byly nanášeny na ABS materiál, který po jeho vytištění vykazoval antibakteriální účinek. Předpokládáme využití antibakteriálního materiálu v nemocničních zařízeních (kliky, držáky, klávesnice), kde přispěje k eliminaci nozokomiálních infekcí, které stále patří mezi největší problémy světového zdravotnictví.

*Práce byla realizována za podpory projektu H2020 CA COST Action CA15114, INTER-COST LTC18002. Autor děkuje Augustinovi Ofomajovi (Vaal University of Technology, JAR) za charakterizaci pomocí elektronového mikroskopu, Martě Kepinske (Wroclaw Medical University, PL) za charakterizaci pomocí Zeta-sizeru a Anetě Surovíkové (Farmaceutická fakulta, Brno, ČR) za pomoc při zpracování textu a provedení experimentů.*

### LITERATURA

1. Libertucci J., Young V. B.: *Nat. Microbiol.* 4, 35 (2019).
2. Dabbagh A., Laws R. L., Steulet C., Dumolard L., Mulders M. N., Kretsinger K., Alexander J. P., Rota P. A., Goodson J. L.: *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 67, 1323 (2018).
3. Li M., Du X., Villaruz A. E., Diep B. A., Wang D. C., Song Y., Tian Y. R., Hu J. H., Yu F. Y., Lu Y., Otto M.: *Nat. Med.* 18, 816 (2012).
4. Mura S., Nicolas J., Couvreur P.: *Nat. Mater.* 12, 991 (2013).
5. Kumar A., Vemula P. K., Ajayan P. M., John G.: *Nat. Mater.* 7, 236 (2008).
6. Capel A. J., Rimington R. P., Lewis M. P., Christie S. D. R.: *Nat. Rev. Chem.* 2, 422 (2018).

7. Kitson P. J., Glatzel S., Chen W., Lin C. G., Song Y. F., Cronin L.: *Nat. Protoc.* 11, 920 (2016).
8. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: *Free Radicals Biol. Med.* 26, 1231 (1999).
9. Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R.: *Molecules* 15, 8618 (2010).
10. Gulcin I., Bursal E., Sehitoglu M. H., Bilsel M., Goren A. C.: *Food Chem. Toxicol.* 48, 2227 (2010).
11. Bibi G., Haq I., Ullah N., Muazzam A. G., Mannan A., Mirza B.: *IJPI's Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulations* 2, 34 (2012).
12. Koch A. L., Putnam S. L.: *Anal. Biochem.* 44, 239 (1971).
13. Marklund S., Marklund G.: *Eur. J. Biochem.* 47, 469 (1974).
14. O'Neill D. T., Rochette E. A., Ramsey P. J.: *Anal. Chem.* 74, 5907 (2002).
15. Štrofová N., Sehnal K., Gargulák M., Tóthová Z., Uhlířová D., Dočekalová M.: *NanoOstrava 2019* (2019).
16. Hamelian M., Varmira K., Veisi H.: *J. Photochem. Photobiol. B* 184, 71 (2018).
17. Vaidya M.: *Nat. Med.* 21, 2 (2015).
18. Colaco M., Igel D. A., Atala A.: *Nat. Rev. Urol.* 15, 213 (2018).
19. Chambers H. F., Deleo F. R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629 (2009).
20. Li F. S., Weng J. K.: *Nat. Plants* 3, 7 (2017).
21. Metch J. W., Burrows N. D., Murphy C. J., Pruden A., Vikesland P. J.: *Nat. Nanotechnol.* 13, 253 (2018).

**K. Sehnal<sup>a</sup>, M. Staňková<sup>b</sup>, M. Dočekalová<sup>b</sup>, D. Uhlířová<sup>b</sup>, M. Gargulák<sup>a,b</sup>, Z. Tóthová<sup>b</sup>, B. Ruttkay-Nedecký<sup>a</sup>, and R. Kizek<sup>a,b,c</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Human Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno*, <sup>b</sup> *Department of Research and Development, Prevention Medicals, Studénka-Butovice*, <sup>c</sup> *Institute of Viticulture and Wine Production, Faculty of Horticulture, Lednice*): **Biophysical Analysis of Silver Nanoparticles Prepared by Green Synthesis and Their Use for 3D Printing of Antibacterial Material**

Nanotechnology approaches appear to be one of the possibilities of decreasing nosocomial infections. Silver nanoparticles (AgNPs) have a great antibacterial effect. Uniform silver nanoparticles can be typically prepared by using chemical synthesis. However, emerging bacterial resistance to the nanoparticles prepared this way represents an actual problem. Using green synthesis, we can modify the surface of AgNPs by biomolecules contained in used extracts. By this synthesis, we can prevent bacterial resistance. By modification of the 3D filament, it is possible to provide antibacterial material by 3D printing. We assume that antibacterial material like this (being part of handles, keyboards, holders, etc.) can be used in hospitals to eliminate nosocomial infections.

**Keywords:** silver nanoparticles, green synthesis, antibacterial activity, 3D printing, nosocomial infections

## NOVÉ SERS-AKTIVNÍ KOMPOZITNÍ SUBSTRÁTY NA BÁZI $\text{TiO}_2@Ag$ NANOČÁSTIC

PETR ŠÁLEK<sup>a</sup>, VERONIKA SKOUPÁ<sup>a</sup>, MILAN PLICKA<sup>b</sup> a VADYM PROKOPEC<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice,

<sup>b</sup> Ústav fyzikální chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
salekp@vscht.cz

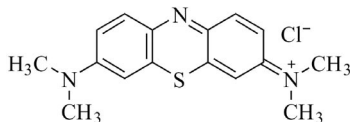
Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, SERS, kompozitní nanočástice, methylenová modř

### Úvod

V počátcích rozvoje nanotechnologií byly nanomateriály tvořeny pouze jednou složkou. S postupným vývojem bylo zjištěno, že využití kompozitních materiálů může vhodným způsobem ovlivňovat jejich požadované vlastnosti.

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) je analytická metoda umožňující kvalitativní detekci látek o velmi nízkých koncentracích. K tomu je využívána interakce molekul analytu s povrchem vhodného nanostrukturovaného substrátu vhodného tvaru a rozměru, který splňuje podmínku povrchové plasmonové rezonance. Jako materiály se používají především ušlechtilé kovy zlato, stříbro a měď. Oproti těmto samostatným kovům mohou kompozitní nanočástice (NPs) tvořené dielektrikem a plasmonickým kovem poskytovat výrazně vyšší faktor zesílení<sup>1</sup>.

Tato práce je zaměřena na přípravu a testování kompozitních substrátů na bázi nanočástic skládajících se z různého poměru  $\text{TiO}_2$  a Ag. Pro zjištění jejich SERS-aktivity a celkové optické odezvy byla použita methylenová modř (MB), její struktura je uvedena na obr. 1.



Obr. 1. Strukturální vzorec methylenové modře

Tabulka I

Přehled maxim plasmonové rezonance u vybraných nanočástic

Typ NPs	Ag	1A	2A	1T	2T
Maximum pásu plasmonové rezonance, nm	426	412	407	392	397

### Experimentální část

Pro přípravu  $\text{TiO}_2@Ag$  nanočástic byla zvolena metoda vycházející z přípravy stříbrných nanočástic redukcí dusičnanu stříbrného hydroxylamin hydrochloridem ( $\text{HA}\cdot\text{HCl}$ ) (cit.<sup>2</sup>). Roztoky  $0,042 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{HA}\cdot\text{HCl}$ ,  $0,083 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{NaOH}$ , koloidní roztok  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{TiO}_2$  a  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  byly postupně smíchány s mili-Q vodou a následně 15 min intenzivně míchány magnetickým míchadlem při laboratorní teplotě. Substráty byly připraveny v poměru  $\text{Ag}:\text{TiO}_2$  10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 a 1:10 ve dvou řadách. V řadě A bylo konstantní množství Ag  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  a v řadě T bylo konstantní množství  $\text{TiO}_2$ , taktéž  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ .

### Výsledky a diskuse

Charakterizace pásu plasmonové rezonance připravených nanočástic byla provedena absorpční UV/Vis spektrometrií. K měření absorbance byl využit spektrometr Varian Cary 50 (Agilent Technologies, USA) v jednopaprskovém uspořádání, vybavený Czerného-Turnerovým monochromátorem s rozsahem 200–800 nm, krokem  $0,15 \text{ nm}$  a rychlostí  $360 \text{ nm min}^{-1}$ . Pozorovaná maxima plasmonové rezonance v UV/Vis spektrech čistě stříbrných a kompozitních systémů 1A, 2A, 1T a 2T jsou uvedena v tab. I.

SERS-aktivita připravených nanočástic byla testována na analytu MB o koncentracích  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a  $1\cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ . Doba depozice analytu byla 1 h. Po depozici následovalo měření na disperzním spektrometru DXR Smart Raman (Thermo Fisher Scientific, USA) emitujícím záření o vlnové délce  $780 \text{ nm}$ . Spektra byla měřena s rozlišením  $5 \text{ cm}^{-1}$ , výkonem laseru  $50 \text{ mW}$ , po dobu 1 s a počtem akvizic 20. V tab. II jsou uvedeny zaznamenané hodnoty Ramanových posunů analytu MB v porovnání s literaturou<sup>3</sup> a s přiřazením k charakteristickým vibracím.

Pro srovnání byly připraveny stříbrné nanočástice redukcí dusičnanu stříbrného hydroxylamin hydrochloridem. Na stříbrných nanočásticích byla pozorována nejnižší koncentrace MB  $1\cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Nejvyšší intenzitu vykazovalo spektrum s roztokem MB o koncentraci  $1\cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ .

Na všech typech připravených kompozičních nanočástic byly detegovány pásy odpovídající charakteristickým vibracím MB. Nejvyšší intenzity bylo dosaženo v řadě A na nanočásticích 1A a v řadě T na nanočásticích

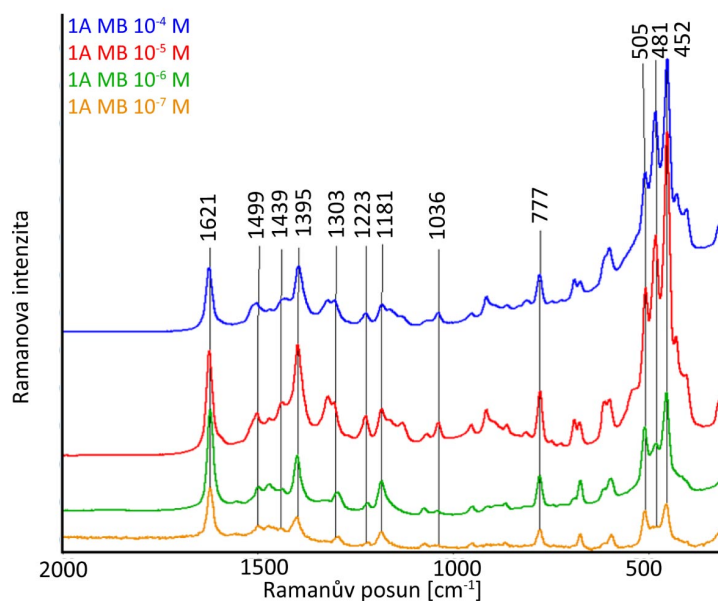
Tabulka II

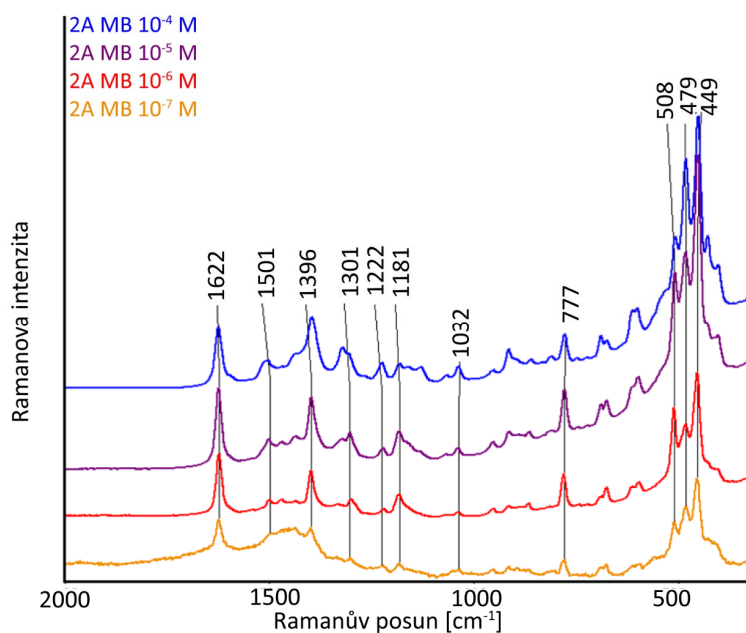
Přehled vybraných vlnočtů v Ramanových a SERS spektrech MB a jejich přiřazení k charakteristickým vibracím

MB literatura <sup>3</sup>	Ramanův posun [cm <sup>-1</sup> ]					Přiřazení vibrací
	MB na Ag NPs	1A	1T	2A	2T	
1625	1623	1621	1623	1623	1622	valenční (C–C) a (C–N) kruhu
1496	1499	1499	1507	1501	1503	rovinná deformační (CH)
1445	1444	1439	1441	1438	1438	rovinná def. (N–C–H), valenční (C–C) kruhu
1390	1397	1395	1397	1396	1394	valenční (C–N)
1300	1301	1303	1316	1301	1306	valenční (C–N) kruhu, rovinná def. (C–H)
1222	1223	1223	1223	1222	1222	rovinná def. (C–H), kývavá (–CH <sub>3</sub> )
1179	1181	1181	1179	1181	1177	kývavá (–CH <sub>3</sub> ), rovinná def. (C–H)
1035	1037	1036	1034	1032	1032	rovinná def. (C–H), valenční (C–S)
772	776	777	775	777	776	valenční (C–N–C) methylů, rovinná def. (C–N–C) kruhu
500	503	505	504	508	505	rovinná def. (C–N–C) methylů
484	479	481	477	479	480	rovinná def. (C–N–C) methylů
450	450	452	451	449	448	rovinná def. (C–N–C) methylů

1T. Na nanočásticích z příprav 1A, 2A, 1T a 2T byla měřena koncentrační řada MB v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-12}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Stejně jako v případě čistě stříbrných nanočástic vykazovala nejvyšší intenzitu spektra roztoků nanočástic s MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Druhá nejvyšší intenzita byla zaznamenána ve spektrech nanočástic s roztoky MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Celková Ramanova intenzita následně klesala se snižující se koncentrací analytu.

Na nanočásticích typu 1A bylo docíleno detekce MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Nejintenzivnější pásy jsou u vlnočtů  $505 \text{ cm}^{-1}$ ,  $481 \text{ cm}^{-1}$  a  $452 \text{ cm}^{-1}$  odpovídajících rovinným deformačním vibracím C–N–C methylových skupin, viz obr. 2. Na nanočásticích 2A byla taktéž naměřena nejnižší koncentrace MB  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Průběh SERS

Obr. 2. SERS spektra nanočástic 1A s MB v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\Gamma^{-1}$ ; spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu

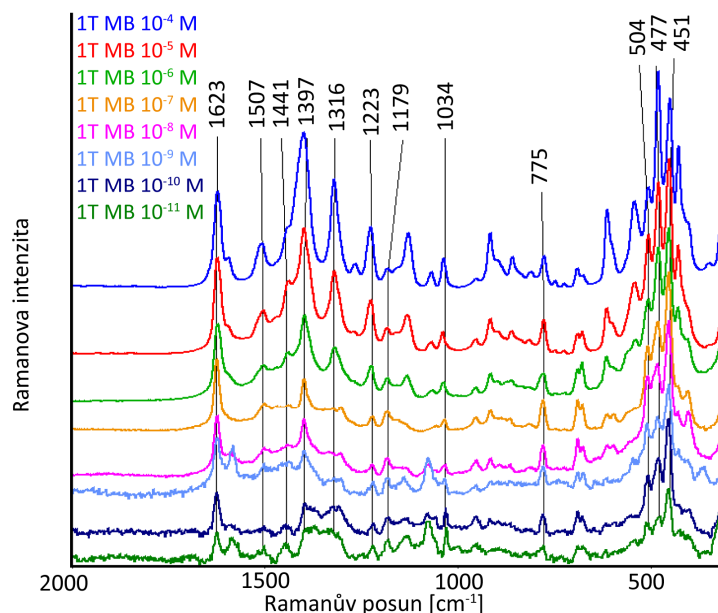


Obr. 3. SERS spektra nanočástic 2A s MB v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ; spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu

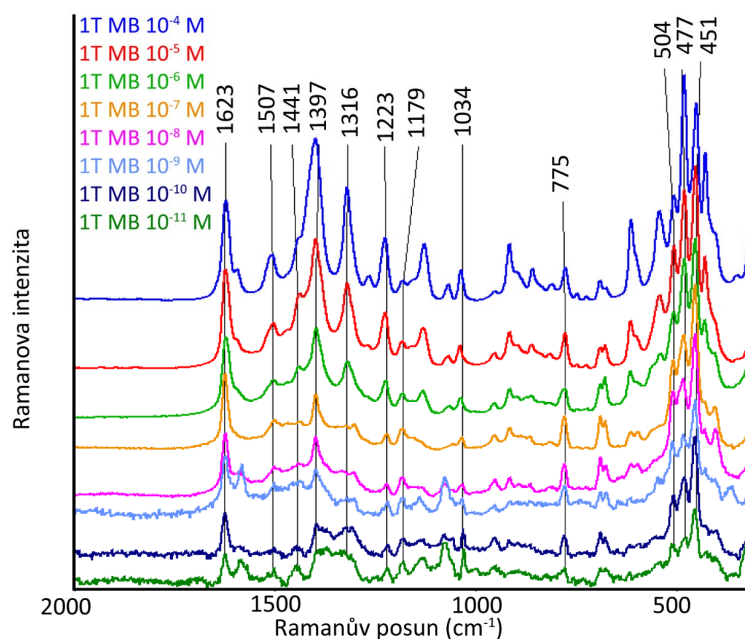
spektra byl obdobný se spektry naměřenými na nanočásticích 1A, viz obr. 3.

Na nanočásticích typu 1T (obr. 4) byla detegována koncentrace MB  $1 \cdot 10^{-11}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . U těchto nanočástic došlo ke zvýšení poměru intenzit u  $1623$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1316$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1032$   $\text{cm}^{-1}$  a dalších ve srovnání s intenzitou pásů při

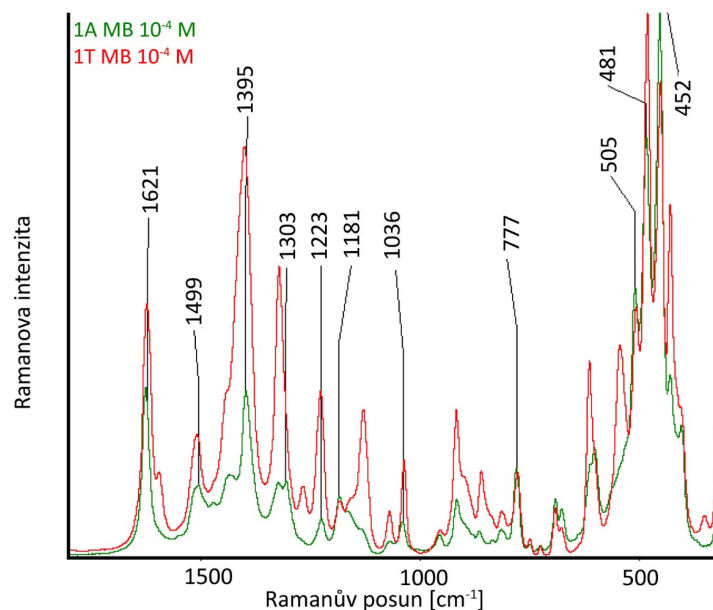
$504$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $479$   $\text{cm}^{-1}$  a  $451$   $\text{cm}^{-1}$ . Pásky s relativně zvýšenou intenzitou odpovídají především vibracím na heterocyklickém kruhu, viz tab. II. U nanočástic 2T byla naměřena nejnižší koncentrace MB  $1 \cdot 10^{-9}$  mol  $\text{l}^{-1}$ , viz obr. 5. I v tomto případě byl pozorován podobný jev jako u nanočástic 1T. Při srovnání spekter měřených na nanočásticích



Obr. 4. SERS spektra nanočástic 1T s MB v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-11}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ; spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu



Obr. 5. SERS spektra nanočástic 2T s MB v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup>; spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu



Obr. 6. Porovnání spekter substrátů 1A a 1T s MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>; spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu

1A a 1T (obr. 6) je možné pozorovat, že nanočástice řady T poskytují poměrově silnější odezvu pásů odpovídající vibračním na heterocyklické části molekuly oproti nanočásticím řady A. Lze tedy usuzovat, že molekuly MB během

interakce s povrchem nanočástic 1T a 2T zaujímají odlišnou prostorovou orientaci než v případě nanočástic 1A a 2A.

## Závěr

Cílem této práce bylo připravit  $\text{TiO}_2@\text{Ag}$  SERS-aktivní substráty. Tyto substráty byly připravovány redukcí dusičnanu stříbrného hydroxylamin hydrochloridem v poměrech  $\text{Ag}:\text{TiO}_2$  10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 a 1:10. Na nanočásticích 1A a 2A byla detegována methylenová modř (MB) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Detekce MB s využitím těchto nanočástic je srovnatelná s dobře známými stříbrnými nanočásticemi připravovanými redukcí hydroxylamin hydrochloridem. Na nanočásticích 2T byla detegována MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ . Pomocí nanočástic 1T byla pozorována MB o koncentraci  $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol l}^{-1}$ , což je ve srovnání s čistě stříbrnými nanočásticemi zlepšení možnosti detekce MB s využitím SERS spektroskopie o čtyři řády. Na nanočásticích řady A a T je pozorován rozdílný poměr pásů ve spektru. U řady A převládá intenzita pásů  $504 \text{ cm}^{-1}$ ,  $479 \text{ cm}^{-1}$  a  $451 \text{ cm}^{-1}$  odpovídající vibracím methylnů na dusíku. U řady T je pozorováno zvýšení pásů náležících heterocyklické části molekuly naznačující jinou prostorovou orientaci molekul MB vůči povrchu jednotlivých typů nanočástic. Připravené nanočástice byly charakterizovány pomocí UV/Vis spektroskopie a vykazovaly posun plasmonové rezonance k nižším vlnovým délkám než je u nanočástic tvořených pouze stříbrem.

*Tato práce byla realizována za podpory grantu IGA A2\_FCHI\_2018\_037.*

## LITERATURA

1. Li J.-F., Zhang Y.-J., Ding S.-Y., Panneerselvam R., Tian Z.-Q.: *Chem. Rev.* 117, 5002 (2017).
2. Leopold N., Lendl B.: *J. Phys. Chem. B* 107, 5723 (2003).
3. Dutta Roy S., Ghosh M., Chowdhury J.: *J. Raman Spectrosc.* 46, 451 (2015).

**P. Šálek<sup>a</sup>, V. Skoupá<sup>a</sup>, M. Plicka<sup>b</sup>, and V. Prokopec<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague,* <sup>b</sup>*Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Novel SERS-active Composite Substrate Based on  $\text{TiO}_2@\text{Ag}$  Nanoparticles**

Composite nanoparticles were prepared by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride in the colloidal solution of titanium dioxide. Different concentrations of added reactants lead to the exhibition of different optical properties by prepared nanoparticles. Methylene blue was used as a model analyte to test the newly designed substrate. SERS measurements were conducted using diode laser with 780 nm excitation wavelength.

Keywords: Raman spectroscopy, SERS, composite nanoparticles, methylene blue



## AMPÉROMETRICKÝ BIOSENZOR PRE RÝCHLE STANOVENIE ALBUMÍNU V MOČI

MARTINA ŠIŠKOVÁ<sup>a</sup>, MATĚJ PASTUCHA<sup>b</sup>,  
MARTA FARKOVÁ<sup>a</sup>, PŘEMYSL LUBAL<sup>a,b</sup>  
a ZDENĚK FARKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> CEITEC MU, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
436847@mail.muni.cz

Klíčové slová: ampérometria, ľudský sérový albumín, biosenzor

### 1. Úvod

Táto práca sa zaoberá vývojom ampérometrického biosenzora pre rýchle stanovenie ľudského sérového albumínu (HSA). Biosenzor je zariadenie pozostávajúce z biorekogničnej vrstvy, ktorá obsahuje imobilizovanú látku interagujúcu špecificky s daným analytom<sup>1</sup>. Táto vrstva je v kontakte s fyzikálno-chemickým prevodníkom, pričom naviazanie analytu poskytne elektrický signál, ktorý je úmerný množstvu analytu vo vzorke. Jednou z možností detekcie elektrochemického signálu je ampérometria, pri ktorej je analyt stanovený zo zmeny prúdu prechádzajúceho pracovnou elektródou pri konštantnom potenciáli. V ampérometrickom imunosenzore je na protilátku zachytenú na elektróde (biorekogničnú vrstvu) viazaný analyt, na ktorý sa špecificky viaže elektroaktívna značka<sup>1</sup>, zmena prúdu odovpovedá množstvu naviazanej značky.

Ľudský sérový albumín je plazmový proteín produkovaný v pečeni. Tento proteín má prevažne transportnú funkciu a jeho zvýšená koncentrácia v moči (albuminúria) môže indikovať nefropatiu<sup>2</sup>. Analýza prebehla v tzv. sendvičovom usporiadaní na sieťotlačových elektródach (screen-printed electrodes, SPEs)<sup>3,4</sup>, na ktorých bola kovalentne imobilizovaná primárna protilátka AL-01, ktorá viazala špecificky analyt. Detekcia bola založená na interakcii HSA so sekundárnou protilátkou konjugovanou s chrenovou peroxidázou (HRP)<sup>2</sup>, ktorá následne katalyzovala oxidáciu 3,3',5,5'-tetrametylbenzidínu (TMB), respektíve KI, za súčasnej redukcie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2. Experimentálna časť

Použitie chemikálie: hovädzi sérový albumín (BSA), cysteamín (CYS), [1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl] karbodiimid (EDC), glutaraldehyd (GA), ľudský sérový albumín (HSA), merkaptoundekanol (MUOL), merkaptoun-

dekánová kyselina (MUA), *N*-hydroxysukcinimid (NHS) a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín (TMB) boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich. Etanolamin (EA) a octan sodný boli zakúpené od firmy Lach-Ner. Ďalšie bežné chemikálie v odpovedajúcej čistote boli získané od firmy Penta. Monoklonálna myšia protilátka AL-01 (Exbio) a fluoresceinom značená anti-HSA prasacia polyklonálna protilátka (Sevapharma) konjugovaná s HRP (cit.<sup>6</sup>) boli použité pre špecifickú väzbu HSA.

Ako tlmivé roztoky boli v tejto práci použité fosfátom pufrovaný soľný roztok (PBS; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 150 mM NaCl), acetátový tlmivý roztok (50 mM, pH 5,0), premývací pufer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,01 % Tween 20, 0,05 % NaN<sub>3</sub>) a väzbový pufer (0,2 % BSA, 0,5 % BGG (hovädzi  $\gamma$ -globulín), 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % PVA, 1 % glukóza, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, a 0,01 % Tween 20, pH 7,5).

Senzory s tlačenými elektródami DRP-C220AT, DRP-220AT a DRP-110SWCNT boli zakúpené od firmy Metrohm a senzory AC2.W1.RS od firmy BVT Technologies. Experimenty boli vykonané na potenciostate PalmSens3 (PalmSens), ktorý bol použitý na meranie v miešanom (miešačka ARE Aluminium Hot Plate Stirrer, VELP Scientifica) i prietokovom (peristaltické čerpadlo Minipuls 3, Gilson; prietoková cela Flow Cell in Teflon for Screen-Printed Electrodes, Metrohm) usporiadaní.

Imobilizácia protilátky na zlatú elektródu pomocou CYS-GA

Na zlatú pracovnú elektródu bol naviazaný cysteamín (20 mg ml<sup>-1</sup> vo vode, 2 h) pomocou SH skupiny. Ďalším krokom bolo pridanie GA (5% roztok v PBS, 1 h), ktorý vďaka aldehydovým skupinám slúžil ako spojovník medzi cysteamínom a primárnou protilátkou. Následne bola imobilizovaná zachytávacia protilátka (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> v PBS, 4 °C, cez noc) a BSA (2 mg ml<sup>-1</sup> v PBS, 30 min) pre obmedzenie nešpecifických väzieb. Po každom kroku imobilizácie došlo k oplachu elektródy destilovanou vodou<sup>3</sup>.

Imobilizácia protilátky na zlatú elektródu pomocou MUA-MUOL

Do roztoku MUA-MUOL (3 mM MUA a 7 mM MUOL v etanole, cez noc) bol ponorený senzor s elektródami. Na ďalší deň došlo k oplachu elektródy etanolom a bol nanesený čerstvo pripravený roztok vzniknutý zmiešaním EDC (200 mM vo vode) a NHS (50 mM vo vode) v pomere 1:1 (10 min). Následne bola imobilizovaná protilátka AL-01 (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> v acetátovom tlmivom roztoku, 30 min) a blokácia prebehla pomocou EA (1 M, pH 8,5, 5 min) a BSA (2 mg ml<sup>-1</sup> v PBS, 10 min). Po každom kroku došlo k oplachu elektródy destilovanou vodou<sup>5</sup>.

## Imobilizácia protilátky na elektródu s uhlíkovými nanotrúbkami pomocou EDC-NHS

Uhlíková elektróda modifikovaná uhlíkovými nanotrúbkami s karboxylovými skupinami bola aktivovaná čerstvo pripraveným roztokom EDC (200 mM vo vode) a NHS (50 mM vo vode) v pomere 1:1 (10 min). Ďalej sa postupovalo ako u imobilizácie protilátky na zlatú elektródu prostredníctvom MUA-MUOL.

## Ampérometrická detekcia ľudského sérového albumínu

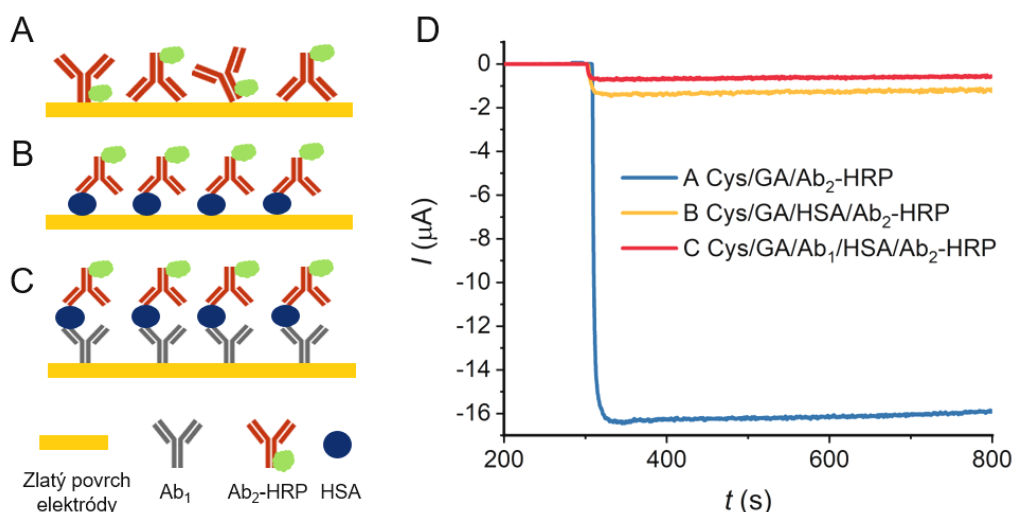
Na imobilizovanú elektródu bol naviazaný HSA (v PBS, 1 h), v prípade blanku bol použitý iba roztok PBS, a ďalším krokom bola väzba konjugátu ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  vo väzobnom pufrí, 30 min). Takto upravený senzor bol pripravený na analýzu pomocou ampérometrie.

Analýza v miešanom usporiadaní prebiehala tak, že senzor s elektródami bol ponorený do 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  v acetátovom tlmivom roztoku (pH 5,0) a na pracovnú elektródu bolo aplikované napätie  $-50 \text{ mV}$ . Po 300 s ustáľovania signálu bol pridaný 50 mM roztok TMB v DMSO (dimetylsulfoxid), pričom jeho konečná koncentrácia bola  $50 \mu\text{M}$ . V prietokovom usporiadaní bol pri  $-50 \text{ mV}$  čerpaný roztok  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM v acetátovom tlmivom roztoku, pH 5,0) po dobu 100 s, následne roztok 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  s 4 mM KI v acetátovom tlmivom roztoku (pH 5,0) po dobu 60 s a potom znova roztok peroxidu vodíka. Prietoková rýchlosť bola zvolená na  $50 \mu\text{l min}^{-1}$  (cit.<sup>4</sup>).

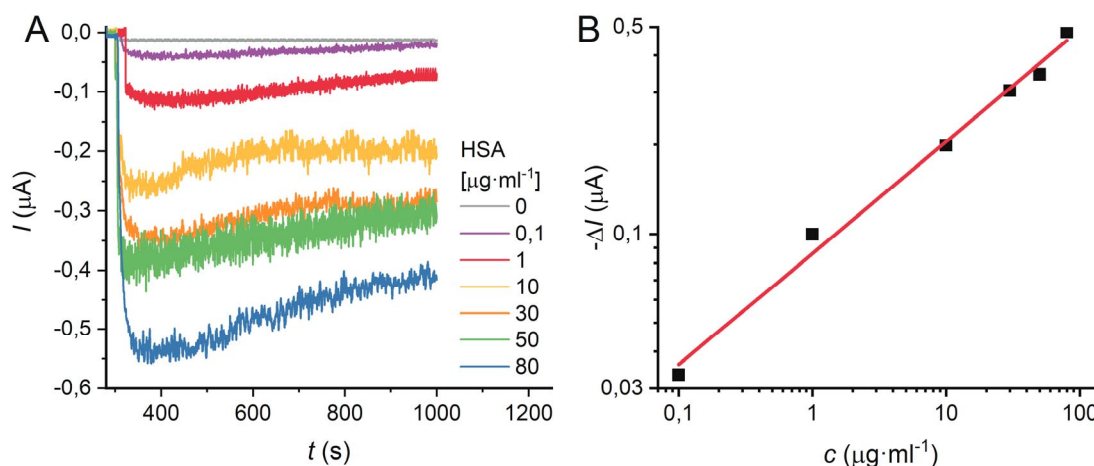
## 3. Výsledky a diskusia

Po skúške funkčnosti systému (obr. 1) boli testované rôzne spôsoby stanovenia HSA. Najlepší signál s najmenšími odchýlkami poskytovala metóda imobilizácie na zlatú elektródu pomocou CYS-GA, ktorá bola vybraná pre analýzu HSA v reálnych vzorkách. Táto metóda bola použitá pre ampérometrickú analýzu v miešanom i v prietokovom usporiadaní. Limit detekcie miešaného usporiadania (obr. 2), vypočítaný z kalibračnej závislosti ako koncentrácia odpovedajúca signálu blanku + 3 smerodajné odchýlky blanku, má hodnotu  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $0,15 \text{ nmol l}^{-1}$ ). Pri mikroalbuminúrii dochádza k vylučovaniu 30–300 mg albumínu močom za 24 h, čo pri vylúčení 2 l moču denne odpovedá priemernej koncentrácii 15 až  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>6</sup>). Vyvinutý senzor je tak vhodný pre stanovenie klinicky relevantných koncentrácií HSA v moči a vďaka svojej jednoduchosti a prenosnosti je vhodný na analýzu v mieste potreby – pri použití vhodného prenosného analyzátora pre „point of care“ analýzu napríklad i u pacienta doma, skôr však v ambulancii praktického či obvodného lekára, prípadne v klinickom laboratóriu.

Možnosť použitia vyvinutého senzora v moči bola demonštrovaná na analýze vzoriek moču s pridaným známym množstvom HSA. Čas analýzy za použitia súčasného postupu optimalizovaného smerom k dosiahnutiu čo najlepšieho limitu detekcie je 1 h 50 min. Pre prípadné praktické aplikácie by bolo vhodné tento čas výrazne skrátiť, čo by bolo ešte dosiahnuteľné po ďalšej optimalizácii zameranej na dobu analýzy. Taktiež bolo úspešne otestované i prietokové usporiadanie, ktoré je vhodné pre prípadné automatizované aplikácie.



Obr. 1. Testovanie funkčnosti systému v miešanom usporiadaní. (A) Imobilizácia detekčného konjugátu priamo na elektródu pre overenie jeho funkčnosti. (B) Priame stanovenie imobilizovaného HSA pre overenie špecifickej väzby konjugátu. (C) Funkčnosť finálneho usporiadania pre imunostanovenie. (D) Porovnanie získaných signálov



Obr. 2. (A) Ampérometrický záznam stanovenia rôznych koncentrácií HSA v miešanom usporiadaní pomocou zlatej elektródy s protilátkou imobilizovanou cez CYS-GA a (B) kalibračná závislosť vyvinutého imunosenzora

#### 4. Záver

Bol vyvinutý ampérometrický biosenzor na detekciu albumínu v moči s limitom detekcie  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $0,15 \text{ nmol l}^{-1}$ ). Prebehla úspešná analýza reálnych vzoriek ako v miešanom, tak aj v prietokovom usporiadaní s protilátkou imobilizovanou na zlatú sieťotlačovú elektródu pomocou CYS-GA. Táto jednoduchá metóda detekcie HSA sa vyznačuje krátkou dobou analýzy, nízkou cenou stanovenia a možnosťou miniaturizácie a automatizácie.

*Práca bola finančne podporená projektami MUNI/A/1237/2016 a CEITEC 2020 (LQ 1601).*

#### LITERATÚRA

1. Nakhjavani S. A., Khalilzadeh B., Pakchin P. S., Saber R., Ghahremani M. H., Omidi Y.: *Biosens. Bioelectron.* 122, 8 (2018).
2. Farka Z., Čunderlová V., Horáčková V., Pastucha M., Mikušová Z., Hlaváček A., Skládal P.: *Anal. Chem.* 90, 2348 (2018).
3. Farka Z., Juřík T., Pastucha M., Kovář D., Lacina K., Skládal P.: *Electroanalysis* 28, 1803 (2016).
4. Skládal P., Švábenská E., Žeravík J., Příbyl J., Šišková P., Tjærnhage T., Gustafson I.: *Electroanalysis* 24, 539 (2011).
5. Farka Z., Juřík T., Pastucha M., Skládal P.: *Anal. Chem.* 88, 11830 (2016).
6. Chugh A., Bakris G. L.: *J. Clin. Hypertens.* 9, 196 (2007).

**M. Šišková<sup>a</sup>, M. Pastucha<sup>b</sup>, M. Farková<sup>a</sup>, P. Lubal<sup>a,b</sup>, and Z. Farka<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*, <sup>b</sup>*CEITEC MU, Masaryk University, Brno*): **Amperometric Biosensor for Rapid Determination of Albumin in the Urine**

This work presents the development of an amperometric biosensor for the rapid determination of clinically relevant concentrations of human serum albumin in the urine, whose increased concentration indicates nephropathy. This simple method is characterized by a short analysis time, low cost of determination, possibility of miniaturization, automatization and point of care analysis. The assay was performed by using various methods of immobilization the antibody to screen-printed electrodes by means of mixed and flow-through configuration. By immobilizing the antibody via cysteamine and glutaraldehyde in a mixed analysis, a detection limit of  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  was reached, allowing the determination of human serum albumin in the urine.

Keywords: amperometry, human serum albumin, biosensor

## FORENZNÁ ELEKTROCHÉMIA NOVÝCH PSYCHOAKTÍVNYCH LÁTOK

LENKA VATRSKOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN KUČAŘ<sup>b</sup>,  
JAN BUDKA<sup>c</sup>, GABRIELA BRONCOVÁ<sup>a</sup>  
a TATIANA V. SHISHKANOVA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, <sup>c</sup> Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
vatrskol@vscht.cz

Klíčové slová: kalix[4]arén, potenciometria, detekcia, nové psychoaktívne látky

### Úvod

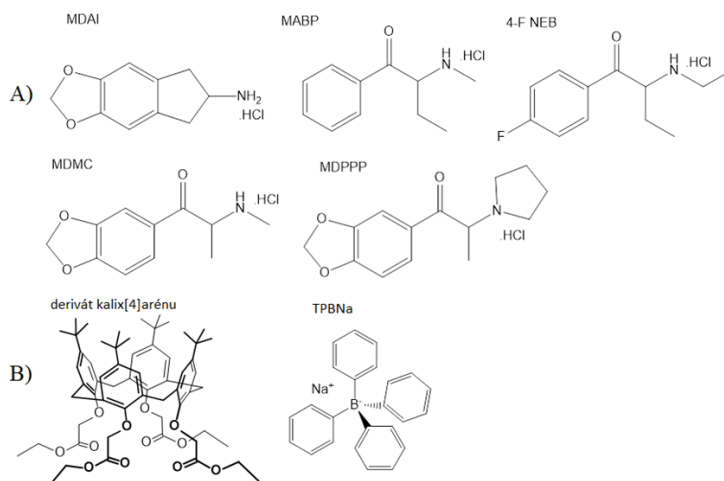
Jednou z najpoužívanějších úloh forenzní chemie je analýza nových psychoaktívnych látok (NPS), medzi ktoré patria syntetické katinóny a aminoinďány. Syntetické katinóny svojimi farmakologickými účinkami a štruktúrou napodobňujú drogy amfetamínového typu. Najčastejšia cesta požívania syntetických katinónov je nosná inhalácia, kedy sa požítá dávka pohybuje v rozmedzí 0,002–1,5 g. Pri perorálnom požití užívateľa zvyšujú dávku pre dosiahnutie požadovaného stavu na 0,01–2,5 g. Väčší úžitok užívateľa dosahujú kombináciu syntetických katinónov so stimulantami (amfetamín, metamfetamín, kokaín, kofeín),

sedatívami (benzodiazepín, alkohol) a halucinogénmi<sup>1,2</sup>. Kvalitatívna analýza NPS využíva kolorimetrické skúšky<sup>3,4</sup>, alebo imunochemické metódy<sup>4,5</sup>. Tieto presumpčné testy nie sú spoľahlivé, majú nízku citlivosť a poskytujú falošne pozitívne alebo falošne negatívne výsledky. Kvantitatívna analýza je založená na separačných technikách<sup>5</sup>. Nevýhodou separačných techník je príprava vzorku, ktorá zahŕňa derivatizáciu a nutnosť extrakcie syntetických katinónov z biologických matric, kedy môže dôjsť ku kontaminácii vzorky<sup>6–9</sup>. Elektrochemická detekcia NPS, konkrétne syntetických katinónov, je novým a perspektívnym trendom vo forenzní analýze<sup>5</sup>.

Predložená práca naväzuje na výskum v laboratóriu elektroanalytických metód, ktorého cieľom je vyvíjanie elektrochemických senzorov aplikujúcich princípy supramolekulárneho rozpoznávania. Súčasný výskum je zameraný na vývoj potenciometrických senzorov na báze derivátu kalix[4]arénu, štúdium ich selektivity pre NPS z rady syntetických katinónov a aminoinďánov a ich analytickej aplikácie.

### Experimentálna časť

Hydrochloridy NPS (obr. 1A) a derivát kalix[4]arénu (25,26,27,28-tetrakis-(etoxykarbonylmetoxy)-5,11,17,23-tetra-*tert*-butylkalix[4]arén), neutrálny nosič (obr. 1B), boli poskytnuté Laboratóriom forenzní analýzy biologicky aktívnych látok a Ústavom organické chemie (VŠCHT



Obr. 1. Štruktúry študovaných hydrochloridov nových psychotropných látok (A) a aktívnych komponentov PVC-membrán (B); A) 5,6-metyléndioxy-2-aminoindán (MDAI); bufedron (MABP); 1-(4-fluórfenyl)-2-(etylamo)butan-1-ón hydrochlorid (4-F NEB); metylón (MDMC); 3',4'-metyléndioxy- $\alpha$ -pyrrolidinopropiofenón (MDPPP); B) derivát kalix[4]arénu (neutrálny nosič); tetrafenylborát sodný (TPBNa) (kationomenič)

Praha). Roztoky anorganických solí (Lach-Ner, Česká republika) a hydrochloridov NPS sa riedili redestilovanou vodou. Na vytvorenie membrán boli použité tetrahydrofuran (THF), poly(vinylchlorid) (PVC), 2-nitro-fenyl(oktyl)-éter (NPOE) a tetrafenylborát sodný (TPBNa) („selectophore“, Fluka, Švajčiarsko).

PVC-membrány ( $m = 0,2$  g) na báze derivátu kalix[4]arénu obsahovali ( $m/m$ ) 1 % (M-R1), 5 % (M-R5), 10 % (M-R10) receptoru, PVC a NPOE v pomere (1:2)<sup>10</sup>. Pre vyhodnotenie vplyvu nešpecifických interakcií bola pripravená PVC-membrána na báze katiónomeniča (TPBNa, M-KM).

Zmena elektromotorického napätia bola zmeraná pH metrom PHI 04 v systéme: Ag | AgCl | 3 mol l<sup>-1</sup> KCl || meraný roztok | PVC-membrána || 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaCl | AgCl | Ag. Výsledky potenciometrických meraní boli spracované programom Labio PHI 04 Datalogger HDD Stream. Potenciometrická selektivita bola stanovená proti sekundárnemu amínu, bufedrónu ( $\log K_{MABP,J}^{Pot}$ ). Koeficient selektivity bol vypočítaný porovnaním hodnôt kalibračnej krivky<sup>11</sup>. Metódou prídavku štandardu ( $c_{std.} = 2,14$  mg ml<sup>-1</sup>) bolo prevedené stanovenie bufedrónu (MABP) v modelovej vzorke ( $c_{vz.mod.} = 2,1$  µg ml<sup>-1</sup>) a vzorke slín ( $m_{slin} = 0,9858$  g) pripravenej podľa literatúry<sup>12</sup>. Vzorke slín bola po zväžení nariadená na objem 10 ml a bola zmeraná hodnota pH (pH = 7). Následne boli v odobratom objeme ( $V = 5$  ml) nasimulované koncentrácie bufedrónu 21,4; 34,2 a 55,6 µg ml<sup>-1</sup>.

## Výsledky a diskusia

### Potenciometrické vlastnosti

Kalix[n]arény sú makrocyclické molekuly zložené z podjednotiek (4–8) fenolu a spojené metylénovou skupinou v *ortho*-pozícii<sup>13</sup>. Vďaka svojim štruktúrnym znakom (tvorba kavít) a modifikáciou funkčných skupín majú využitie vo vývoji senzorov<sup>14,15</sup>. Prítomnosť funkčných skupín v deriváte kalix[4]arénu dokáže ovplyvňovať veľkosť kavít, výskyt možných konformerov (obr. 2) a tým pôsobí na jeho rozpoznávacíe vlastnosti.

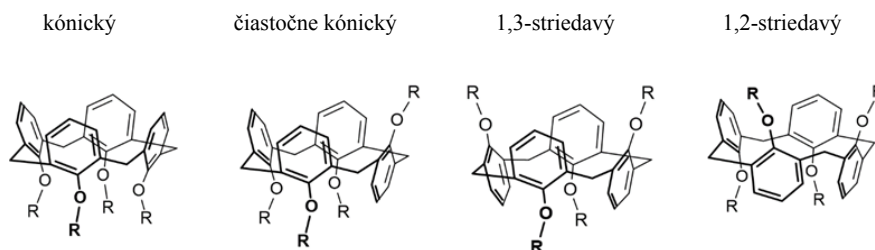
V prípade membrány na báze katiónomeniča (M-KM) bola dolná hranica koncentračného rozsahu ovplyvnená a) dostupnosťou pozitívneho náboja na dusíku v rade aminov obsahujúcich metyléndioxy skupinu, konkrétne primárny (MDAI) < sekundárny (MDMC) < terciárny amín (MDPPP); b) lipofilitou substituentu v blízkosti sekundárneho dusíku (MDMC, MABP) a substituentov na aromatickom jadre (4-F NEB) (obr. 3A).

Potenciometrická citlivosť membrány na báze neutrálneho nosiča nebola v takej miere ovplyvnená percentuálnym obsahom derivátu kalix[4]arénu, ako bola jej dolná hranica koncentračného rozsahu. Zvyšovanie obsahu derivátu kalix[4]arénu v PVC-matici z 1 % (M-R1) do 5 až 10 % (M-R5, M-R10) viedlo k posunu dolnej hranice koncentračného rozsahu do vyšších koncentrácií (obr. 3B–D).

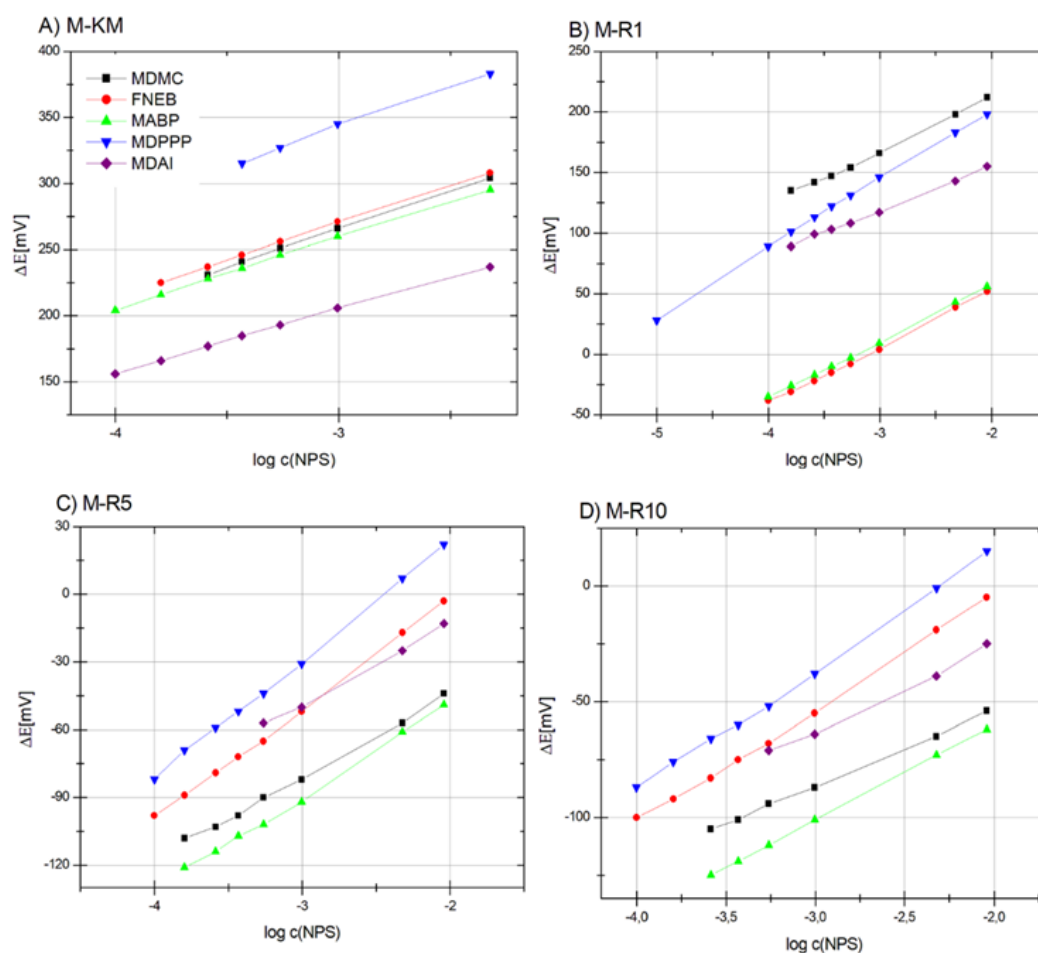
Potenciometrická selektivita bola po vyhodnotení potenciometrických vlastností stanovená vzhľadom k sekundárnemu amínu, bufedrónu. Napriek vysokému výskytu bufedrónu, je to jeden z najmenej preskúmaných katiónov. Jeho prítomnosť bola monitorovaná v mnohých vzorkách zo záchytu, či už ako hlavnej psychoaktívnej zložky alebo ako prímiesy. Jeho popularita vzrástla v roku 2011, kedy sa stal druhým najpoužívaným substituentom mefedrónu<sup>16</sup>. Potenciometrická selektivita pre membrány obsahujúce 5 % (M-R5) a 10 % (M-R10) derivátu kalix[4]arénu sa menila v rade: MDMC < MDAI < 4-F NEB < MDPPP a ukazovala podobné hodnoty koeficientov selektivity. Potenciometrická selektivita membrány obsahujúcej 1 % (M-R1) derivátu kalix[4]arénu sa od nich odlišovala: 4-F NEB < MDAI < MDMC ~ MDPPP. Pre membránu na báze katiónomeniča (M-KM) sa vplyv interferentov zvyšoval v rade: primárny amín < sekundárne amíny < terciárny amín.

### Potenciometrické stanovenie

Pri stanovení bufedrónu v modelovej vzorke sa ukázala ako úspešná membrána M-R10 ( $2,3 \pm 0,1$  µg ml<sup>-1</sup>,  $S_r = 2$  %), zatiaľ čo v reálnej vzorke sa ukázala perspektívnejšia membrána M-R1 ( $32,5 \pm 3,6$  µg ml<sup>-1</sup>,  $S_r = 7$  %).



Obr. 2. Konformery kalix[4]arénu



Obr. 3. Potenciometrické odozvy PVC-membrán na báze kationomenciča (A) a neutrálneho nosiča s rôznym obsahom derivátu kalix[4]arénu (B-D) získané v roztokoch hydrochloridov nových psychoaktívnych látok

## Záver

V rámci tejto práce bolo zistené, že množstvo derivátu kalix[4]arénu v PVC-membráne ovplyvňuje základné potenciometrické vlastnosti, najmä pracovný koncentračný rozsah a selektivitu. Význam vysokého obsahu derivátu kalix[4]arénu v PVC-membráne ISE ukázal dôležitú úlohu pri stanovení bufedrónu v reálnej vzorke slín.

Práce bola realizovaná za podpory grantu Ministerstva vnútra Českej republiky „Nové psychoaktívne látky“ číslo VI20172020056.

## LITERATÚRA

1. Assi S., Gulyamova N., Kneller P., Osselton D.: *Hum. Psychopharmacol.* 32, e2610 (2017).
2. Coppola M., Mondola R.: *Toxicol. Lett.* 211, 144 (2012).
3. Siegel J.: *Forensic Chemistry: Fundamentals and Applications*, Wiley-Blackwell, New York 2016.
4. Namera A., Kawamura M., Nakamoto A., Saito T., Nagao M.: *Forensic Toxicol.* 33, 175 (2015).
5. Couto R. A. S., Goncalves L. M., Carvalho F., Rodrigues J. A., Rodrigues C. M. P., Quinaz M. B.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48, 372 (2018).
6. Kerrigan S.: *Improved Detection of Synthetic Cathinones in Forensic Toxicology Samples: Thermal Degradation and Analytical Considerations*, Center for Substance Abuse Research, University of Maryland, 2015. <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/249251.pdf>
7. Kerrigan S., Savage M., Cavazos C., Bella P.: *J. Anal. Toxicol.* 40, 1 (2016).
8. Majchrzak M., Celiński R., Kuś P., Kowalska T., Sajewicz M.: *Forensic Toxicol.* 36, 33 (2018).
9. Mohamed K. M., Al-Hazmi A. H., Alasiri A. M., Ali M. E.-S.: *J. Chromatogr. Sci.* 54, 1271 (2016).
10. Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E.: *Chem. Rev.* 97,

- 3083 (1997).
11. Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E.: *Electroanalysis* 11, 915 (1999).
  12. Baliga S., Muglikar S., Kale R.: *J. Indian Soc. Periodontol.* 17, 461 (2013).
  13. Varejao E. V., de Fatima A., Fernandes S. A.: *Curr. Pharm. Des.* 19, 6507 (2013).
  14. Forster R. J., Cadogan A., Telting Diaz M., Diamond D., Harris S. J., McKervey M. A.: *Sens. Actuators, B* 4, 325 (1991).
  15. Gutsche C. D.: *Calixarenes: An Introduction*, 2. vyd. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2008.
  16. Zuba D., Adamowicz P., Byrska B.: *Forensic Sci. Int.* 227, 15 (2013).

**L. Vatrsková<sup>a</sup>, M. Kuchař<sup>b</sup>, J. Budka<sup>c</sup>, G. Broncová<sup>a</sup>, and T. V. Shishkanova<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague;* <sup>b</sup> *Forensic Laboratory of Biologically Active Substances and Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague;* <sup>c</sup> *Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Forensic Electrochemistry of New Psychoactive Substances**

This work presents potentiometric study of the interaction between calix[4]arene derivative in ion-selective membranes (ISMs) and novel psychoactive substances (NPSs) in the solution. Aminoindane (primary amine) and cathinone derivatives (secondary and tertiary amines) were tested as analytes. The main purpose was to investigate the effect of percent composition (1 wt%, 5 wt%, and 10 wt %) of calix[4]arene derivative in the ISMs on the basic potentiometric characteristics. It was found that the high percentage content of calix[4]arene derivative (5–10 wt%) significantly affected the linear concentration range and potentiometric selectivity of the experimental ISMs. The analytical applicability of calix[4]arene-based ISMs was verified and demonstrated at potentiometric analysis of both model sample and saliva spiked by cathinone derivative (buphedrone).

Keywords: calix[4]arene derivative, potentiometric detection, new psychoactive substances

## OBSAH

<i>T. Lacmanová, K. Plachká, V. Pilařová, L. Cahlíková, L. Nováková</i>	Využití superkritické fluidní chromatografie v analýze přírodních látek	57
<i>T. Navrátilová, K. Kučáková, B. Dolenský</i>	Vývoj chemických jazyků s využitím solvatochromních derivátů stilbazolu	62
<i>K. Sehnal, M. Staňková, M. Dočekalová, D. Uhlířová, M. Gargulák, Z. Tóthová, B. Ruttkay-Nedecký, R. Kizek</i>	Biofyzikální analýza stříbrných nanočástic připravených zelenou syntézou a využití pro 3D tisk antibakteriálního materiálu	66
<i>P. Šálek, V. Skoupá, M. Plicka, V. Prokopec</i>	Nové SERS-aktivní kompozitní substráty na bázi TiO <sub>2</sub> @Ag nanočástic	72
<i>M. Šišková, M. Pastucha, M. Farková, P. Lubal, Z. Farka</i>	Ampérometrický biosenzor pre rýchle stanovenie albumínu v moči	77
<i>L. Vatrsková, M. Kuchař, J. Budka, G. Broncová, T. V. Shishkanova</i>	Forenzná elektrochémia nových psychoaktívnych látok	80



## AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Broncová G. 80  
Budka J. 80

Cahlíková L. 57

Dočekalová M. 66  
Dolenský B. 62

Farka Z. 77  
Farková M. 77

Gargulák M. 66

Kizek R. 66  
Kučáková K. 62  
Kuchař M. 80

Lacmanová T. 57  
Lubal P. 77

Navrátilová T. 62  
Nováková L. 57

Pastucha M. 77  
Pilařová V. 57  
Plachká K. 57  
Plicka M. 72  
Prokopec V. 72

Ruttkay-Nedecký B. 66

Sehnal K. 66  
Shishkanova T. V. 80  
Skoupá V. 72  
Staňková M. 66

Šálek P. 72  
Šišková M. 77

Tóthová Z. 66

Uhlířová D. 66

Vatřsková L. 80

**CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 17 (2019), čís./no. 2 • 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: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, V. Vyskočil; Webové stránky: P. Zámotný • 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, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2019 Czech Chemical Society Symposium Series/ Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.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 22.5.2019.**