



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



**Sborník vybraných příspěvků**

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

**„CENA KARLA ŠTULÍKA 2020“**

**12. a 13. února 2020**

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha**



**Editoři sborníku:**  
Jiří Barek  
Vlastimil Vyskočil

Partneři soutěže O cenu Karla Šulíka 2020:



**analytika<sup>®</sup>**



**Skalar**



**HELAGO<sup>®</sup> CZ**



**MERCK**



**Metrohm**



MOLECULAR SPECTROSCOPY  
**NICOLET CZ**  
www.nicoletcz.cz



**Waters**  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.<sup>®</sup>



**SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI**



**ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ**



**ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ**



**PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova



**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
V PRAZE**



**Univerzita  
Pardubice**



**MUNI  
SCI** Masarykova univerzita  
Přírodovědecká  
fakulta



**FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Univerzita Karlova



Mendelova  
univerzita  
v Brně



Přírodovědecká  
fakulta



**UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM**



**OSTRAVSKÁ  
UNIVERZITA**

## 23. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2020“

I v letošním roce Odborná skupina analytické chemie České společnosti chemické věnuje mimořádnou pozornost výchově mladé generace analytických chemiků. Důkazem toho je úspěšný průběh již 23. ročníku celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie a již 6. ročník, který nese jméno profesora Karla Štulíka. V letošním roce tato soutěž proběhla ve dnech 12. a 13. února 2020 pod záštitou děkana Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a ve spolupráci s Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i. Poprvé v historii se tato soutěž konala na půdě Přírodovědecké fakulty v Praze v rámci oslav 100. výročí založení samostatné Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a díky vynikající práci organizačního výboru pracujícího ve složení doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D., RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D., RNDr. Jan Fischer, Ph.D., RNDr. Hana Dejmková, Ph.D., Marie Datková (všichni z katedry analytické chemie PŘF UK v Praze) a Ing. Radmila Řápková (Chemické listy) proběhla i letos tato soutěž v příjemné a tvůrčí atmosféře.

Soutěže se v roce 2020 zúčastnilo celkem 14 studentů z pěti českých vysokých škol uvedených na www stránkách soutěže <http://web.natur.cuni.cz/~vyskoci1/cks2020/>. Jak bývá zvykem, porota reprezentovala prakticky všechny zúčastněné školy a pracovala ve složení prof. RNDr. Jiří Berek, 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), prof. Ing. Oto Mestek, CSc. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha), doc. Ing. David Milde, Ph.D. (Univerzita Palackého, Olomouc), Ing. Radmila Řápková (Chemické listy) a prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha). A vzhledem k vysoké úrovni předvedených soutěžních prací vůbec neměla lehkou práci.

**1. místo získala Jitka Máchalová** (Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy) za soutěžní práci „Stresové testování stability canagliflozinu“.

**2. místo získala Věra Kantorová** (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha) za soutěžní práci „Využití metody sp-ICP-MS pro monitoring stříbrných nanočástic v kosmetických přípravcích“.

**3. místo získala Tereza Navrátilová** (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha) za soutěžní práci „Využití INADEQUATE a ADEQUATE spekter NMR ke stanovení uhlíkové kostry molekul“.

**Zvláštní cenu firmy Metrohm ČR za nejlepší práci v oblasti elektroanalytických metod získal Pavel Dvořák** (Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy) za soutěžní práci „Stanovení for-

maldehydu v dřevěných výrobcích pomocí mikroextrakce z difundujícího plynu s následnou elektrochemickou detekcí na sitotiskových uhlíkových elektrodách“.

### **Zvláštní cenu poroty získali:**

**Jaroslava Jarolímková** (Ústecké materiálové centrum a katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem) za soutěžní práci „Charakterizace povrchových vlastností vybraných polyesterů před a po povrchové modifikaci“.

**Petr Musálek** (Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno) za soutěžní práci „Kolorimetrické stanovení antioxidantů pomocí pseudoperoxidázové aktivity zlatých nanočástic“.

**Michael Ručka** (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci) za soutěžní práci „Analýza uměleckých děl laserovou ablací ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem“.

Rád bych na tomto místě poděkoval všem soutěžícím za vynikající soutěžní práce a jejich příkladnou prezentaci bez ohledu na jejich umístění a také jejich školitelům a mateřským pracovištím, bez nichž by tyto soutěžní práce nevznikly. Můj dík pochopitelně patří i všem členům poroty za obětavou a nezištnou práci ku prospěchu mladých analytických chemiků.

Považuji za svou milou povinnost poděkovat také Ing. Radmile Řápkové, technické 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 letošnímu ročníku této soutěže. A jistě bude celá analytická komunita v České republice souhlasit s mým vřelým poděkováním všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga si dovoluujeme otisknout, za jejich podporu, bez které by tato soutěž nikdy neproběhla.



Foto: Ocenění soutěžící „O cenu Karla Štulíka 2020“ a zástupci České společnosti chemické. Zleva: Ing. R. Řápková (Chemické listy), Pavel Dvořák, Věra Kantorová, Tereza Navrátilová, Jitka Máchalová, Jiří Berek (předseda výboru Odborné skupiny analytické chemie), Jaroslava Jarolímková, Michael Ručka, Petr Musálek

A na závěr bych rád oznámil, že – pokud tomu nezábrání viry či jiná vyšší moc – proběhne v příštím roce tato soutěž opět v únoru a s největší pravděpodobností opět v Praze.

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

## STUDIUM STRUKTURY METHAMFETAMINU V ROZTOKU METODAMI MOLEKULOVÉ SPEKTROSKOPIE

KRISTÝNA DOBŠÍKOVÁ<sup>a</sup>, DITA SPÁLOVSKÁ<sup>a</sup>,  
MARTIN KUCHAR<sup>b</sup> a VLADIMÍR SETNIČKA<sup>a</sup>

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

Klíčová slova: methamfetamin, cirkulární dichroismus, *ab initio* výpočty, molekulová spektroskopie

### Úvod

Methamfetamin je považován za nejrozšířenější syntetický stimulant na světě a v mnohých zemích se stal druhou nejužívanější drogou hned po marihuaně. Dosud byl methamfetamin nejvíce užíván v Evropě, podle poslední studie Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) se však začíná šířit i do dalších zemí<sup>1</sup>.

Methamfetamin zadržený v Evropě se vyrábí především v České republice a v příhraničí. V roce 2017 bylo v Evropě odhaleno celkem 298 nelegálních laboratoří, z nichž se 264 nacházelo právě v České republice<sup>1</sup>. Většinou se jedná o malé laboratoře, které drogu vyrábějí především pro domácí trh, ale v posledních letech se objevují i rozsáhlá zařízení provozovaná zločineckými skupinami, které vyrábějí methamfetamin pro ostatní evropské země. V roce 2017 nahlásily členské státy Evropské unie 9000 záchytů, které představovaly celkem 0,7 t zachyceného methamfetaminu. Největší množství byla zachycena ve Francii (122 kg), v Německu (114 kg) a České republice (93 kg)<sup>2</sup>.

Vzhledem ke stále narůstajícímu množství různých syntetických drog je nutná rychlá a spolehlivá analýza. Infračervená (IR) a Ramanova spektroskopie patří mezi analytické metody, které mají velkou diskriminační sílu, proto se využívá jejich komplementarity ve forenzních laboratořích pro analýzu zabavených drog<sup>3,4</sup>. Pro zlepšení a zrychlení identifikace syntetických drog jsou v laboratořích (např. Cayman Chemical Company, USA, Tennessee Bureau of Investigation, USA a Thermo Fisher Scientific, USA) zavedeny knihovny referenčních spekter, které jsou neustále aktualizovány<sup>5</sup>. K identifikaci syntetických drog jsou v současnosti využívány především nukleární magnetická rezonance, plynová chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí<sup>6–8</sup>.

Chirální látky lze studovat pomocí metod chiroptické spektroskopie, např. vibračním cirkulárním dichroismem (VCD) a elektronovým cirkulárním dichroismem (ECD), které jsou citlivější k trojrozměrné struktuře látek než metody konvenční nepolarizované spektroskopie.

K detailnějšímu studiu struktury látek je možné využít i metody vibrační či chiroptické spektroskopie v kombinaci s kvantově chemickými výpočty. To umožňuje nejen detailnější interpretaci experimentálních spekter, ale i detailní popis struktury a konformačního uspořádání molekuly. V případě využití chiroptických metod s podporou kvantově chemických výpočtů lze také spolehlivě určit absolutní konfiguraci studovaných molekul<sup>9</sup>.

### Experimentální část

Standardy enantiomerů hydrochloridu methamfetaminu byly připraveny v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek (BAFA, VŠCHT Praha) s čistotou > 98 %. Jednotlivé vzorky methamfetaminu (označeny písmeny A–J) pochází z reálných záchytů a byly získány na základě spolupráce s Kriministickým ústavem České republiky.

Pro spektroskopii ECD byly roztoky obou enantiomerů hydrochloridu methamfetaminu připraveny rozpuštěním v demineralizované vodě (VŠCHT Praha), výsledná koncentrace byla 1,0 g l<sup>-1</sup>. Spektra ECD byla naměřena na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm. Spektra VCD a IR absorpční spektra byla měřena na spektrometru IFS-66/S s Fourierovou transformací (Bruker, Německo), který je vybavený VCD/IRRAS modulem PMA 37 (Bruker, Německo). Připravený vzorek, rozpuštěný v deuterované vodě (D<sub>2</sub>O, 99,9 % D) o výsledné koncentraci 400,0 g l<sup>-1</sup>, byl umístěn do kyvety BioCell s CaF<sub>2</sub> okny (BioTools, Inc., USA) s optickou drahou 27,3 μm a měřen s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup>. Možné konformace hydrochloridu (R)-methamfetaminu byly určeny systematickou změnou vybraných dihedrálních úhlů a získané konformery byly optimalizovány metodami založenými na teorii funkcionálu hustoty (density functional theory, DFT) na úrovni B3PW91/aug-cc-pVDZ. Porovnání experimentálních a simulovaných spekter bylo provedeno v programu CDSpecTech<sup>5</sup>, který kvantifikuje shodu pomocí indexu podobnosti. Solvatační efekt vody jako rozpouštědla byl zahrnut pomocí modelu polarizovatelného kontinua. Relativní rovnovážné zastoupení jednotlivých konformerů bylo odhadnuto na základě Boltzmannova rozdělení pomocí Gibbsovy volné energie při teplotě 298 K a díky němu bylo vypočteno spektrum váženého průměru konformerů. DFT výpočty byly realizovány pomocí sady Gaussian 09 a proběhly na počítačových clustrech virtuální organizace Metacentrum.



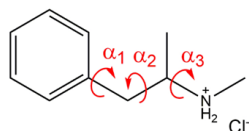
## Výsledky a diskuse

Pro studium struktury pomocí *ab initio* výpočtů byl vybrán hydrochlorid (*R*)-methamfetaminu. Možné geometrie této molekuly byly určeny otáčením třech dihedrálních úhlů  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $\alpha_3$  s krokem  $120^\circ$  (obr. 1).

Bylo získáno celkem 27 startovních geometrií, které byly dále optimalizovány metodou DFT na úrovni teorie B3LYP/6-31G(d). Konformační analýza odhalila celkem šest stabilních konformerů, které byly následně reoptimalizovány na vyšší úrovni teorie B3PW91/aug-cc-pVDZ v případě spektroskopie VCD a IR (obr. 2). Na základě Boltzmannova rozdělení využívajícího Gibbsovu volnou energii bylo odhadnuto relativní rovnovážné zastoupení jednotlivých konformerů (tab. I) a díky němu vypočteno spektrum váženého průměru konformerů.

Dihedrál ní úhel  $\alpha_1$  udává orientaci alifatického řetězce vůči aromatickému jádru a má hodnotu kolem  $100^\circ$  (konformery II, III, V), nebo dosahuje hodnoty  $-100^\circ$  (konformery I, VI) a v případě konformeru IV hodnoty  $-75^\circ$ . V případě dihedrálního úhlu  $\alpha_2$  pozorujeme tři možné orientace, a to kolem  $60^\circ$  (konformery I a VI),  $-60^\circ$  (konformery III a V) a hodnotu kolem  $170^\circ$  (konformery II a IV). Dihedrál ní úhel  $\alpha_3$  určuje orientaci aminoskupiny a dosahuje hodnot kolem  $-170^\circ$  (konformery I, II, III),  $-70^\circ$  (konformery V a VI) a v případě konformeru IV dosahuje dihedrální úhel hodnoty  $63^\circ$ .

Zrcadlová symetrie experimentálních spekter VCD (obr. 3, vlevo dole) potvrzuje, že se jedná o vzájemné enantiomery hydrochloridu methamfetaminu. Absolutní

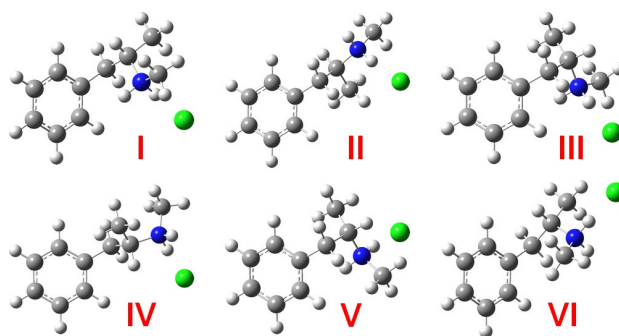


Obr. 1. Vzorec hydrochloridu methamfetaminu s vyznačenými dihedrálními úhly  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $\alpha_3$

konfigurace byla určena na základě porovnání experimentálních spekter se spektry simulovanými na úrovni B3PW91/aug-cc-pVDZ. Standard methamfetaminu (dodán jako methamfetamin 1) byl určen jako (*R*)-enantiomer (obr. 3, červené experimentální spektrum vlevo dole). Standard methamfetaminu 2 byl určen jako (*S*)-enantiomer (obr. 3, modré experimentální spektrum vlevo dole).

V experimentálním i simulovaném spektru VCD hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu bylo pozorováno ve spektrální oblasti  $1800\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$  celkem deset pásů (obr. 3, vlevo). Vysokou citlivost spektroskopie VCD k trojrozměrné struktuře molekuly dokazuje odlišnost pásů a celkový průběh v simulovaných spektrech jednotlivých konformerů. Nejvíce se od ostatních spekter odlišují spektra konformerů III a V, jejichž struktury se navzájem liší pouze polohou aminoskupiny. Zbylé konformery jsou si podobné nejen polohou pásů, ale i jejich relativními intenzitami. Při použití škálovacího faktoru 0,993 bylo dosaženo indexu podobnosti 0,46, což je podle Covingtona a Polavarapu<sup>16</sup> podobnost zcela dostačující k určení absolutní konfigurace molekuly.

Jednotlivé konformery v IR spektru (obr. 3, vpravo nahoře) mají s výjimkou konformeru V velmi podobný průběh. Ten má podobné geometrické uspořádání jako konformer III a liší se polohou aminoskupiny, která je

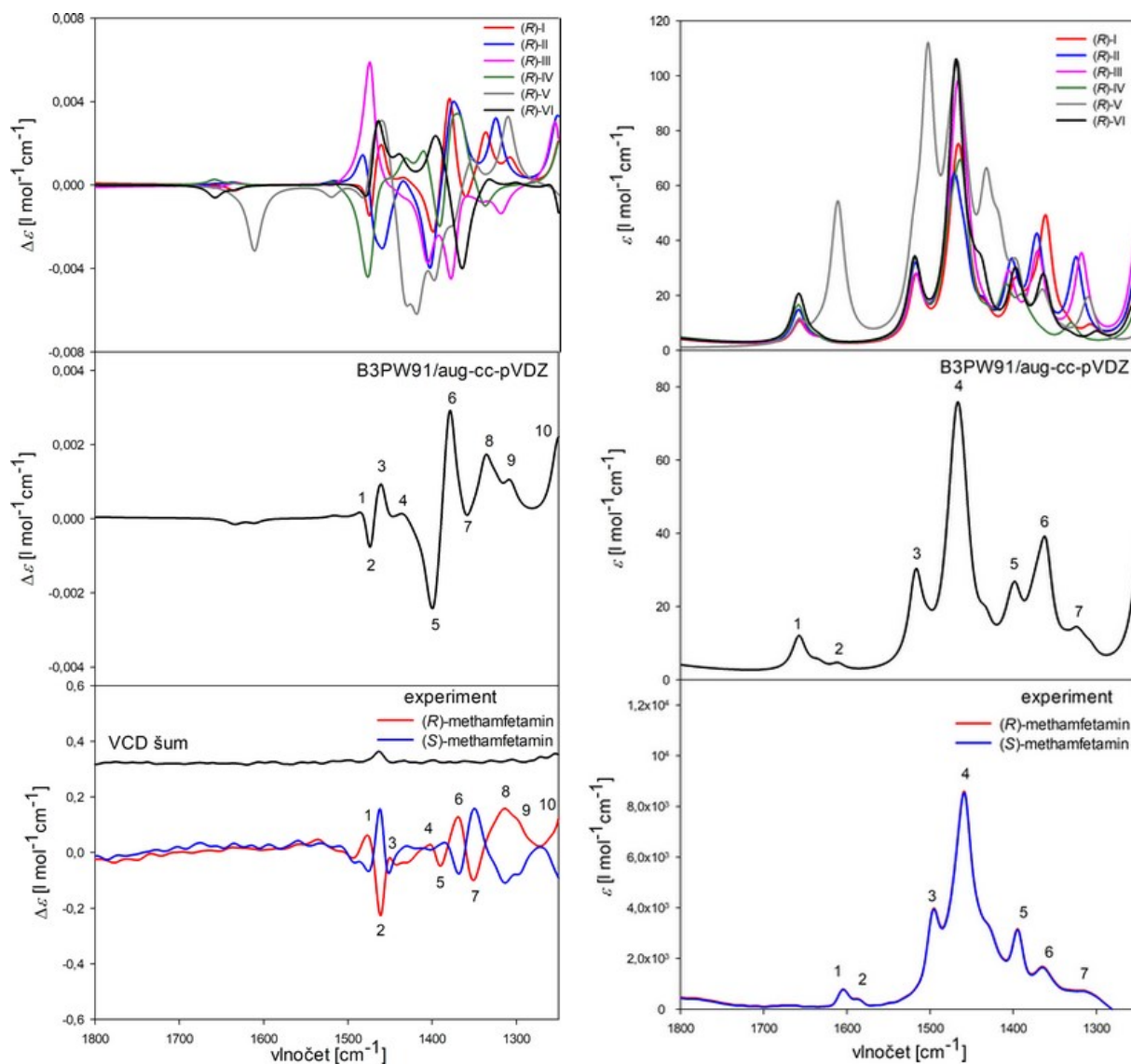


Obr. 2. Struktury šesti stabilních konformerů (*R*)-methamfetaminu simulovaných na úrovni B3PW91/aug-cc-pVDZ

Tabulka I

Stabilní konformery hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu, hodnoty jejich dihedrálních úhlů  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $\alpha_3$ , jejich relativní Gibbsovy volné energie a relativní rovnovážné zastoupení pro laboratorní teplotu  $20^\circ\text{C}$ . Výpočet byl proveden na úrovni B3-W91/aug-cc-pVDZ

Konformer	Dihedrál ní úhel [ $^\circ$ ]			$\Delta G$ [ $\text{kJ mol}^{-1}$ ]	Relativní zastoupení [%]
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$		
I	-105	60	-166	0	64
II	107	171	-172	0,8	17
III	91	-63	-176	1,2	8
IV	-75	166	63	1,3	7
V	91	-63	-70	1,7	3
VI	-127	77	-66	2,3	1



Obr. 3. Simulovaná spektra VCD (vlevo) a simulovaná IR spektra (vpravo) (na úrovni B3PW91/aug-cc-pVDZ) šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu (nahore), jejich vážený průměr (uprostřed) a experimentální spektra hydrochloridu methamfetaminu, včetně odpovídajícího spektra VCD šumu (dole). Spektra jsou zobrazená ve spektrální oblasti 1800–1250  $\text{cm}^{-1}$

určena dihedrálním úhlem  $\alpha_3$ . Kvůli svému relativnímu nízkému zastoupení (3 %) však nemá tento konformer velký vliv na průběh spektra váženého průměru konformerů.

V experimentálním IR spektru hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu je ve spektrální oblasti 1800–1250  $\text{cm}^{-1}$  patrných celkem sedm významných absorpčních pásů. Stejný počet absorpčních pásů byl správně predikován i ve spektru váženého průměru konformerů (obr. 3, vpravo) simulovaném na úrovni teorie B3PW91/aug-cc-pVDZ. Byl použit škálovací faktor 0,993 pro spolehlivější interpretaci naměřených spekter (tab. II), index podobnosti simulovaných a experimentálních spekter pak dosáhl přesvědčivé hodnoty 0,82.

V rámci této práce byla naměřena spektra ECD hydrochloridu methamfetaminu (obr. 4, vlevo). Zrcadlová symetrie i v tomto případě potvrzuje, že se jedná o vzájemné enantiomery. Průběh spektra hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu odpovídá dřívější studii, která se však soustředila pouze na určování enantiomerní čistoty vzorků methamfetaminu<sup>17</sup>.

V případě spektra s pozitivními pásy se jedná o (*R*)-enantiomer hydrochloridu methamfetaminu a v případě spektra s negativními pásy se jedná o (*S*)-enantiomer hydrochloridu methamfetaminu (obr. 4, vlevo). Můžeme pozorovat pásy při 247, 254, 260 a 266 nm, které odráží kombinace elektronových přechodů  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$  a  $n \rightarrow \pi^*$ .

## Tabulka II

Polohy maxim pásů simulovaného a experimentálního spektra a přiřazené vibrační módy IR absorpčních pásů hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu. IR spektrum bylo simulováno na úrovni teorie B3PW91/aug-cc-pVDZ

Číslo pásu	Experimentální spektrum [cm <sup>-1</sup> ]	Simulované spektrum [cm <sup>-1</sup> ]	Vibrační mód
1	1654	1642	δ (N–H)
2	1639	1628	ν (C=C), Ar
3	1515	1504	δ (C–H)
4	1493	1483	δ (C–H)
5	1474	1464	δ (C–H), ν (C=C)
6	1443	1433	δ (C–H), ν (C–C)
7	1415	1405	δ (C–H), –CH <sub>3</sub>
8	1388	1378	δ (C–H), ν (C–C), Ar
9	1370	1360	δ(C–H), ν (C–C), Ar

δ – deformační vibrace, ν – valenční vibrace

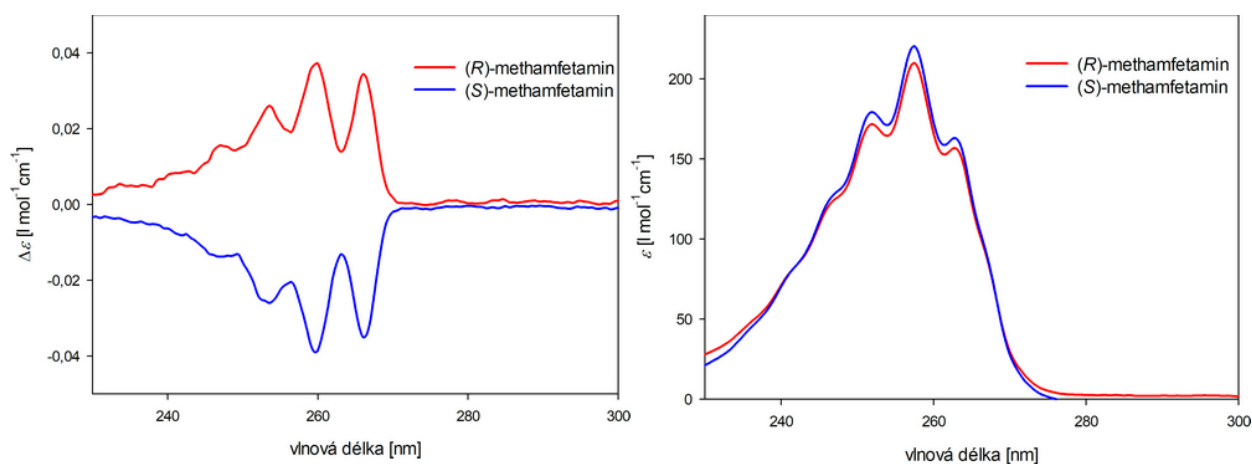
V UV absorpčních spektrech (obr. 4, vpravo) pozorujeme pásy s podobným průběhem a polohou maxim. Spektra jednotlivých konformerů se od sebe výrazně neliší intenzitou ani polohou, což značí, že UV spektroskopie je méně citlivá ke změně trojrozměrné struktury molekuly než spektroskopie ECD.

Při analýze reálných vzorků byla naměřená spektra ECD vzorků methamfetaminu (obr. 5) porovnána s ECD spektry standardů hydrochloridu methamfetaminu (obr. 3). Bylo určeno, že se v případě všech vzorků jedná o (*R*)-enantiomer. Ve spektrech vzorků D a G pozorujeme nižší intenzitu signálů, což je pravděpodobně způsobeno nízkou čistotou těchto vzorků. Z experimentálních spekter je patrné, že reálné vzorky neobsahují žádnou další opticky

aktivní příměs.

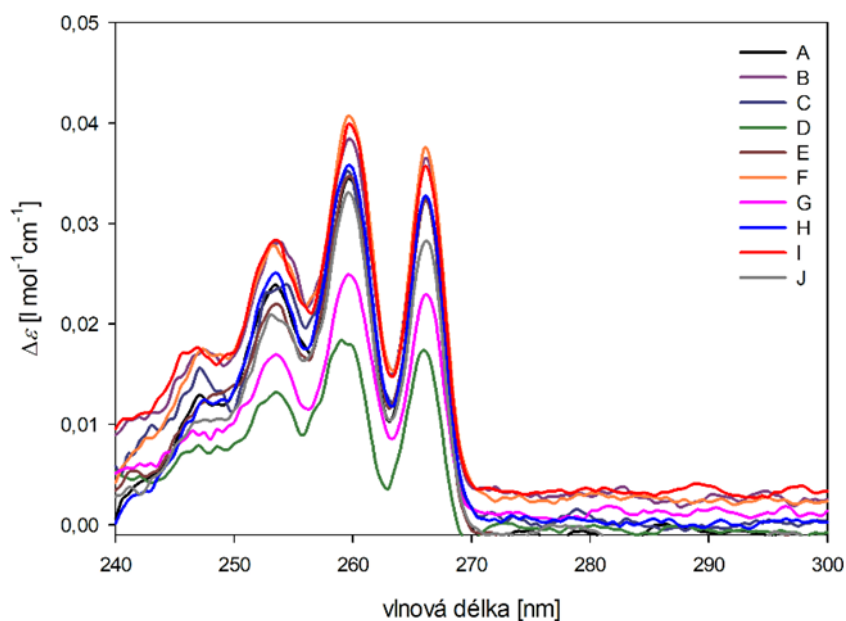
Naměřená UV absorpční spektra reálných vzorků (obr. 6) mají velmi podobný průběh a polohu maxim jako již naměřený standard hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu. Navzájem se liší svou intenzitou. Největší intenzitu pásů pozorujeme ve spektru vzorku D a nejnižší intenzitu u vzorku G. Nižší intenzita může poukazovat na nižší čistoty vzorků, ale i na jejich odlišnou barvu. V případě vzorku D se jednalo o nažloutlé krystalky. U vzorku D navíc pozorujeme pás u 270 nm, který je nejspíše způsoben přítomností nečistoty, která však dosud nebyla určena.

Na základě porovnání IR absorpčních spekter jednotlivých vzorků (obr. 7) lze říci, že většina z naměřených vzorků je methamfetamin v relativně vysoké čistotě. Vý-



Obr. 4. Experimentální spektra ECD (vlevo) a experimentální UV spektra (vpravo) enantiomerů hydrochloridu methamfetaminu. Spektra jsou zobrazená ve spektrální oblasti 230–300 nm



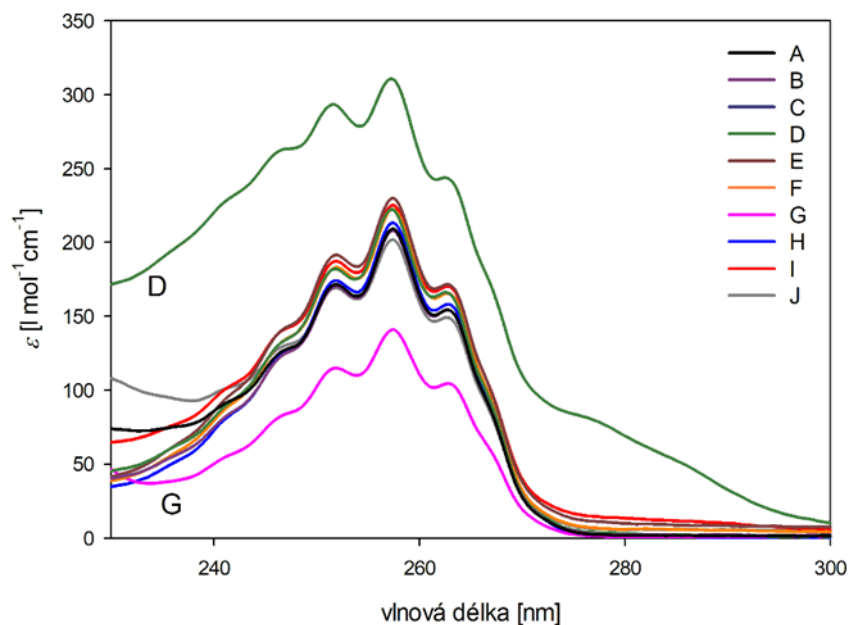


Obr. 5. Spektra ECD reálných vzorků methamfetaminu zobrazená v oblasti 240–300 nm

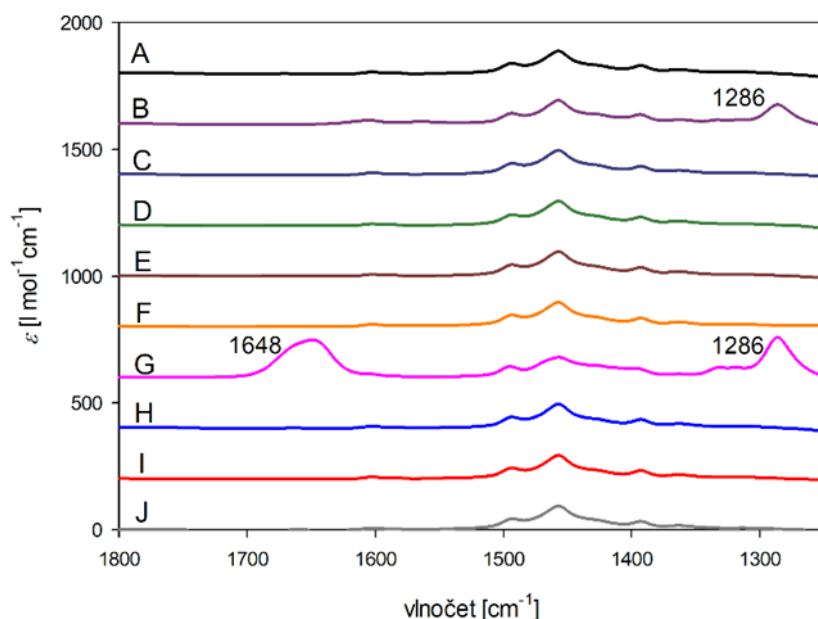
jimku tvoří zejména vzorky B a G, u kterých se vyskytují pásy odrážející vibrace skupin určité příměsi. V IR spektru vzorku B se navíc vyskytuje pás  $1286\text{ cm}^{-1}$ . V IR spektru vzorku G se vyskytuje stejný pás jako ve vzorku B, tj.  $1286\text{ cm}^{-1}$ , a navíc pozorujeme široký pás  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Látky, které jsou v případě těchto vzorků přidány k methamfetaminu, se však zatím nepodařilo identifikovat.

Může jít o látky vznikající během syntézy nebo o přidání adulteranty.

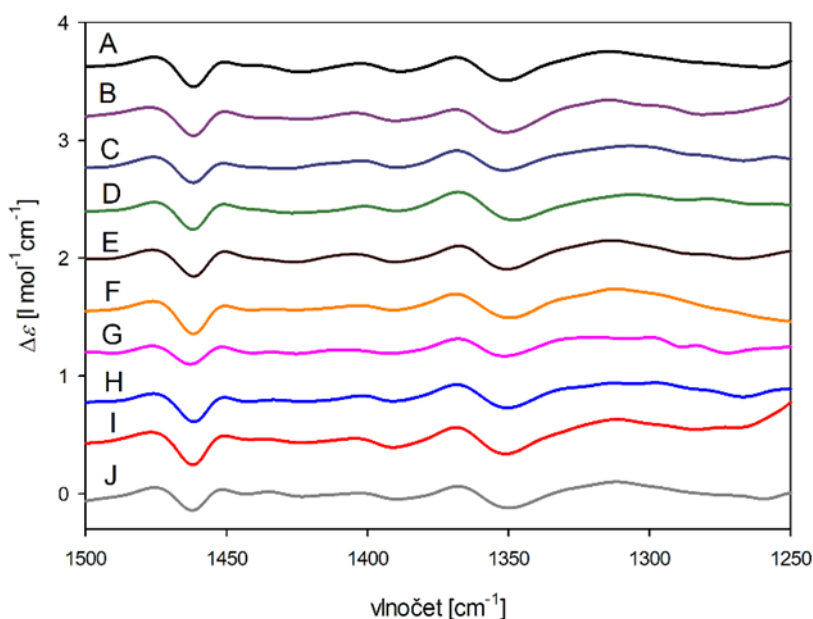
Naměřená spektra VCD reálných vzorků (obr. 8) jsou vyobrazena ve spektrální oblasti  $1500\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ , neboť v oblasti  $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  se neobjevují žádné významné pásy. V zobrazeném spektrálním rozsahu je pozorován shodný průběh i počet pásů jako v případě spektra VCD



Obr. 6. UV absorpční spektra reálných vzorků methamfetaminu zobrazená ve spektrální oblasti 230–300 nm



Obr. 7. IR absorpční spektra reálných vzorků methamfetaminu zobrazená ve spektrální oblasti 1800–1250  $\text{cm}^{-1}$ . Spektra jsou pro větší názornost offsetována



Obr. 8. Spektra VCD reálných vzorků methamfetaminu zobrazená ve spektrální oblasti 1800–1250  $\text{cm}^{-1}$ . Spektra jsou pro větší názornost offsetována

hydrochloridu (*R*)-methamfetaminu (obr. 3). Nejnižší intenzity významných pásů můžeme pozorovat ve spektru vzorku G, což je pravděpodobně způsobeno nižší čistotou látky. Méně čistý je nejspíše i vzorek C, který vykazuje méně intenzivní signály, ale v porovnání se vzorkem G jsou však jeho pásy intenzivnější.

## Závěr

Syntetická stimulační droga methamfetamin je vyráběna především pro evropský trh, kde jsou ročně odhalovány stovky varen. Z České republiky je dále distribuována do dalších zemí, a zadržena množství této látky tak v rámci

Evropy stále rapidně narůstají. Vzhledem k velkému rozšíření a vývoji syntetických drog je nutná rychlá a spolehlivá analýza, kterou nabízejí metody molekulové spektroskopie. Nástrojem molekulové spektroskopie jsou i metody chiroptické, které jsou citlivé k trojrozměrné struktuře molekul.

V rámci konformační analýzy molekuly methamfetaminu bylo systematickým otáčením tří dihedrálních úhlů s krokem 120° nalezeno celkem 27 startovních geometrií, které byly optimalizovány na úrovni B3PW91/aug-cc-pVDZ. Takto bylo nalezeno celkem šest stabilních konformerů. Na základě Boltzmannova rozdělení bylo odhadnuto jejich relativní rovnovážné zastoupení: 64 % (konformer I), 17 % (konformer II), 8 % (konformer III), 7 % (konformer IV), 3 % (konformer V) a 1 % (konformer VI). Na stejné úrovni teorie byla následně simulována spektra VCD a IR jednotlivých konformerů, z kterých pak bylo vypočteno spektrum váženého průměru. Toto spektrum bylo dále porovnáno se spektrem experimentálním a díky jejich dobré shodě byla určena absolutní konfigurace a detailně interpretováno experimentální IR spektrum.

Pokud je nám známo, tato práce je první systematická strukturní studie hydrochloridu methamfetaminu v roztoku, která kombinuje metody vibrační spektroskopie s chiroptickými.

*Tato práce byla realizována za finanční podpory Ministerstva vnitra ČR (MV0/VI20172020056), částečně také Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/24503 a CZ.2.16/3.1.00/21537), Národního programu udržitelnosti (NPU MŠMT – LO1601; 43760/2015) a Specifického vysokoškolského výzkumu (MŠMT č. 21-SVV/2020, č. A2\_FCHI\_2020\_016).*

## LITERATURA

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *European Drug Report 2018: Trends and Developments*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2018.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2019.
- Jones L. E., Stewart A., Peters K. L., McNaul M., Speers S. J., Fletcher N. C., Bell S. E.: *Analyst* 141, 902 (2016).
- Lobo Vicente J., Chassigne H., Holland M. V., Reniero F., Kolar K., Tirendi S., Vandecasteele I., Vinckier I., Guillou C.: *Forensic Sci. Int.* 265, 107 (2016).
- Lowry S., Bradley M., Jalenak W.: *Spectrosc. Solutions Mater. Anal.* 29, e8 (2014).
- Dunne S. J., Rosengren-Holmberg J. P.: *Drug Test. Anal.* 9, 734 (2017).
- Maher S., Elliott S. P., George S.: *Drug Test. Anal.* 10, 1483 (2018).
- Misailidi N., Athanaselis S., Nikolaou P., Katselou M., Dotsikas Y., Spiliopoulou C., Papoutsis I.: *Forensic Toxicol.* 37, 238 (2019).
- Covington C. L., Raghavan V., Smuts J. P., Armstrong D. W., Polavarapu P. L.: *Chirality* 29, 670 (2017).
- Goodwin J. S., Larson G. A., Swant J., Sen N., Javitch J. A., Zahniser N. R., De Felice L. J., Khoshbouei H.: *J. Biol. Chem.* 284, 2978 (2009).
- Larkin P., v knize: *Infrared and Raman Spectroscopy* (Larkin P., ed.), kap. 2, Elsevier, Oxford 2011.
- Chalmers J. M., Edwards H. G. M., Hargreaves M. D. E., v knize: *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*, kap. 3. J. Wiley, Chichester 2012.
- Perdew J. P., Chevary J. A., Vosko S. H., Jackson K. A., Pederson M. R., Singh D. J., Fiolhais C.: *Phys. Rev.* 46, 6671 (1992).
- Tománková Z., Setnička V., Urbanová M., Matějka P., Král V., Volka K., Bouř P.: *J. Org. Chem.* 69, 26 (2004).
- Frisch M. J. a 72 spoluautorů: *Gaussian 09*. Gaussian, Wallingford 2009.
- Covington C. L., Polavarapu P. L.: *Chirality* 29, 178 (2017).
- JASCO: *Applications Book: Circular Dichroism & Polarimeters*, aplikace CD-01-04, str. 17. JASCO, Cremella 2016.

**K. Dobšíková<sup>a</sup>, D. Spálovská<sup>a</sup>, M. Kuchař<sup>b</sup>, and V. Setnička<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>b</sup>Department of Natural Compounds and Forensic Laboratory of Biologically Active Substances, University of Chemistry and Technology, Prague): **Structural Study of Methamphetamine in Solution by Molecular Spectroscopy Methods**

This work presents the first systematic study of synthetic drug methamphetamine. The density functional theory calculations were applied at B3pw91/aug-cc-pVDZ level. As a result, six stable conformers of (*R*)-methamphetamine hydrochloride with Boltzmann weights of 64 %, 17 %, 8 %, 7 %, 3 % and 1 % were found. Simulated VCD and IR spectra were compared with experimental ones and because of the good agreement, it was possible to assign the absolute configuration and describe precisely the molecular structure of methamphetamine in solution.

Keywords: methamphetamine, circular dichroism, *ab initio* calculation, molecular spectroscopy

## STUDIUM VLIVU EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK NA SERS-AKTIVITU MĚDĚNÝCH NANOČÁSTIC

IVAN KOPAL<sup>a</sup>, MILAN PLICKA<sup>a</sup>, MARIE ŠVECOVÁ<sup>b</sup> a MARCELA DENDISOVÁ<sup>a</sup>

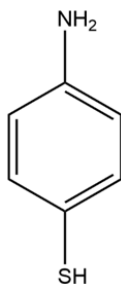
<sup>a</sup> Ústav fyzikální chemie, <sup>b</sup> Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice  
kopali@vscht.cz

**Klíčová slova:** povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, měděné nanočástice, stabilita nanočástic, 4-aminobenzenthiool

### Úvod

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) je technika, pomocí které lze provádět kvalitativní analýzu rozličných chemických, ale i biologických individuí, a to díky zesílení odezvy stanovené látky. K tomuto zesílení dochází vlivem interakce analytu s kovovými plasmonickými nosiči<sup>1</sup>. Jejich uplatnění se nachází např. při zkoumání mezimolekulárních interakcí, nanoobjektů, medicínálně významných látek nebo při sledování výskytu žádoucích i nežádoucích látek v lidském organismu<sup>2</sup>. Vzhledem k rozdílným podmínkám při sledování SERS signálu v jednotlivých aplikacích je třeba provádět u nově připravovaných kovových substrátů jejich charakteristiku, jejímž cílem je posoudit SERS-aktivitu nosiče v závislosti na experimentálních podmínkách a konkrétním analytu. Pro určité aplikace se jako vhodný nosič jeví měděný povrch, který je, narozdíl od častěji užívaných stříbrných a zlatých povrchů, mnohem reaktivnější a levnější, na druhou stranu optické vlastnosti měděných nanočástic (CuNP) jsou poměrně nestálé<sup>3</sup>.

Cílem této práce bylo u připravených koloidních sys-



Obr. 1. Strukturální vzorec 4-aminobenzenthioolu

témů CuNP se 4-aminobenzenthiolem (4-ABT), jehož struktura je uvedena na obr. 1, posoudit SERS-aktivitu v závislosti na koncentraci 4-ABT ( $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) a stáří systému. Za účelem charakterizace čistých nanočástic byly pořízeny jejich TEM snímky, pro určení maxim plasmonové rezonance koloidních systémů byla měřena jejich UV/Vis spektra.

### Experimentální část

Pro přípravu CuNP byl nejprve připraven zásobní roztok CuCl<sub>2</sub> ( $c = 2 \cdot 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>). 2,5 ml tohoto roztoku bylo za současného probublávání dusíkem přidáno do 30 ml roztoku citrátu sodného ( $c = 3,2 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>). Následně bylo připraveno 15 ml roztoku NaBH<sub>4</sub> ( $c = 2 \cdot 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>), ke kterému byl přidán 1 ml roztoku NaOH ( $c = 0,25$  mol dm<sup>-3</sup>). Tento vzniklý redukční roztok byl přidán do reakční směsi, stále za probublávání dusíkem. Vzniklý koloidní systém byl 10 min míchán při laboratorní teplotě a následně uchovávan po dobu čtyř hodin při 0 °C. Následně byly přidavkem různých množství 4-ABT připraveny modifikované koloidní systémy o výsledných koncentracích analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Ramanova spektra byla měřena pomocí disperzního Ramanova spektrometru Advantage NIR (DeltaNu, USA) s excitační vlnovou délkou 785 nm. Zdrojem záření byl diodový laser o maximálním výkonu 80 mW, přístroj měří ve spektrálním rozsahu 100 až 2000 cm<sup>-1</sup> s rozlišením lepším než 8 cm<sup>-1</sup>. Spektra byla měřena od doby přidavku analytu každé čtyři minuty po dobu osmi hodin nebo do ztráty signálu analytu (degradace soustavy) s dobou expozice 60 s při maximálním výkonu laseru (80 mW).

UV/Vis spektra byla měřena pomocí UV/Vis spektrometru CARY 50 (Varian, USA). Přístroj měří v rozsahu vlnových délek 190 až 1100 nm, zdrojem záření byla xenonová výbojka pracující v pulzním režimu. Rozlišení přístroje bylo nastaveno na 1,5 nm, maximální skenovací rychlost 360 nm min<sup>-1</sup>. Spektra byla měřena v 5mm křemenné kyvetě ve spektrálním rozsahu 400 až 800 nm bez ředění studovaných koloidů.

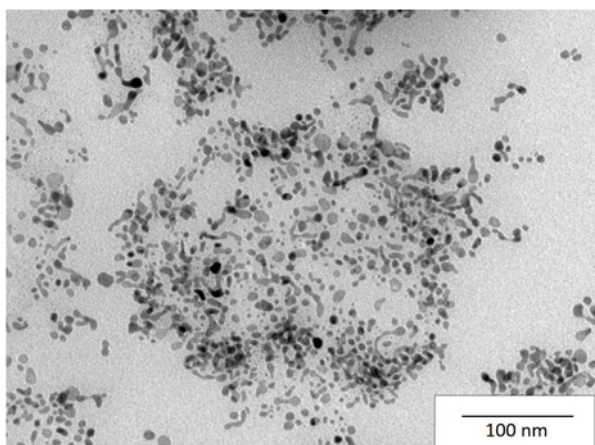
Pro pořízení TEM snímků nanočástic před aplikací analytu byl použit mikroskop JEM-1010 (JEOL, Japonsko), který pracuje s urychlovacím napětím 80 kV. Nanočástice byly deponovány na uhlíkem pokrytou měděnou mřížku, načež byl filtračním papírem odstraněn přebytečný roztok.

### Výsledky a diskuse

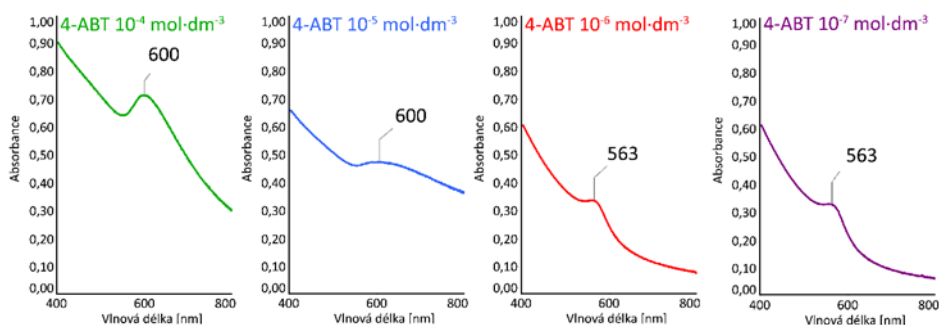
Z pořízených TEM snímků čtyři hodiny starých čistých nanočástic je patrné, že systém před aplikací analytu

obsahoval sférické nanočástice, jejichž velikost se pohybovala v průměru mezi 6 až 12 nm. Ze snímku uvedeném na obr. 2 je zjevné, že částice jsou obklopeny citrátem sodným, který plní funkci stabilizátoru, a že do jisté míry dochází ke tvorbě agregátů.

UV/Vis spektra jednotlivých systémů byla měřena za účelem zjištění výskytu maxima plasmonové rezonance (MPR) ve viditelné oblasti. Na obr. 3 je patrné, že všechny čtyři druhy systémů mají ve viditelné oblasti záření své MPR. Konkrétní hodnoty pro jednotlivé systémy jsou 600 nm pro koncentrace 4-ABT  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  a 563 nm pro systémy s koncentrací analytu  $1 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Vzhledem k excitační vlnové délce, použité pro měření SERS-spekter (785 nm), předurčuje vyšší hodnota MPR první dva jmenované systémy k vyšší SERS-aktivitě<sup>1</sup>. Široký pás MPR u systému s koncentrací analytu  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  s největší pravděpodobností svědčí o široké distribuci velikosti částic v tomto systému, což je možný důvod pro pozorování nejvyšší SERS-aktivity právě u tohoto systému<sup>1</sup>.



Obr. 2. TEM snímek čistých CuNP v době čtyř hodin od přípravy systému



Obr. 3. UV/Vis spektra jednotlivých systémů CuNP o různé koncentraci 4-ABT ( $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Na jednotlivých spektech jsou čísla vyznačena maxima plasmonové rezonance

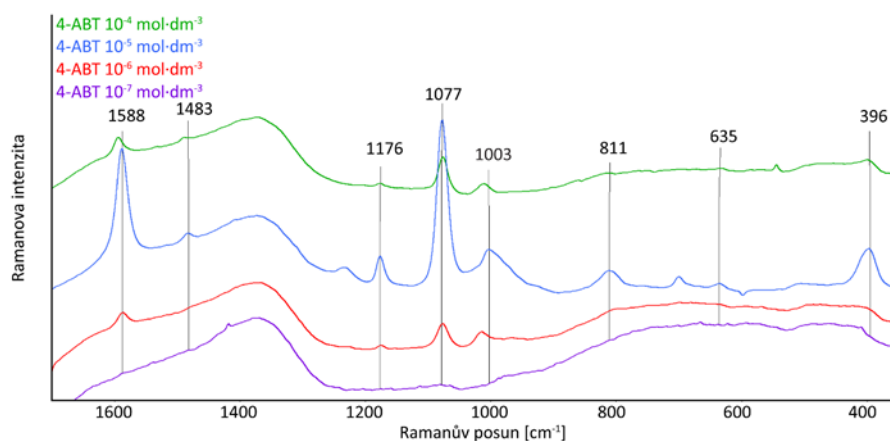
Naměřená SERS spektra byla nejprve porovnána s literaturou za účelem potvrzení signálu 4-ABT a identifikace jednotlivých vibrací (tab. I). Na obr. 4, kde jsou uvedena SERS spektra CuNP/4-ABT, je patrné, že nejvíce SERS-aktivní je systém o koncentraci 4-ABT  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , aktivita dále klesá v řadě koncentrace analytu  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Kromě relativně velkého rozdílu mezi MPR posledních dvou jmenovaných systémů a vlnovou délkou použitého excitačního záření lze nižší SERS-aktivitu těchto systémů s největší pravděpodobností odůvodnit menším množstvím molekul analytu schopných vázat se na povrch CuNP. Dle literatury se 4-ABT váže na měděné nanočástice přes thiolovou skupinu (obr. 5, cit.<sup>3</sup>).

Ve všech systémech byly nejintenzivnější pásy rovinných vibrací  $1077 \text{ cm}^{-1}$  a  $1588 \text{ cm}^{-1}$ . V průběhu měření byly u všech čtyř druhů systému pozorovány tyto pásy, jejichž plocha byla následně normalizována k nejvyšší dosažené hodnotě. Závislost takto normalizované velikosti plochy na čase je zobrazena na obr. 6, přičemž průběh

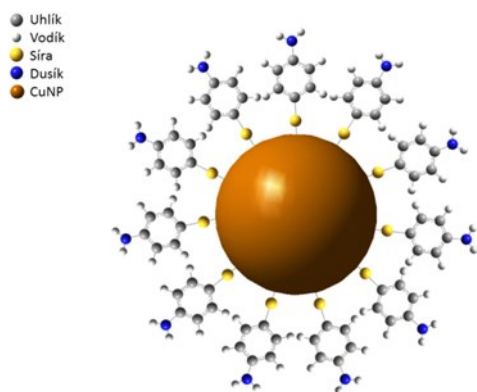
Tabulka I  
Přehled charakteristických pásů 4-ABT

Ramanův posun [ $\text{cm}^{-1}$ ]		Přiřazení vibrací
Lit. <sup>3</sup>	experimentální	
396	396	$\nu(\text{C-S}) + \delta(\text{C-C})_{\text{Ar}}$
636	635	$\delta(\text{C-C})_{\text{Ar}} + \nu(\text{C-S}) + \delta(\text{C-H})_{\text{Ar}}$
817	811	$\gamma(\text{C-C})_{\text{Ar}} + \gamma(\text{C-H}) + \nu(\text{C-N})$
1007	1003	$\gamma(\text{C-H})$
1079	1077	$\nu(\text{C-S})$
1176	1176	$\delta(\text{C-H})$
1488	1483	$\delta(\text{C-C})_{\text{Ar}} + \delta(\text{C-H}) + \nu(\text{C-N})$
1594	1588	$\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$





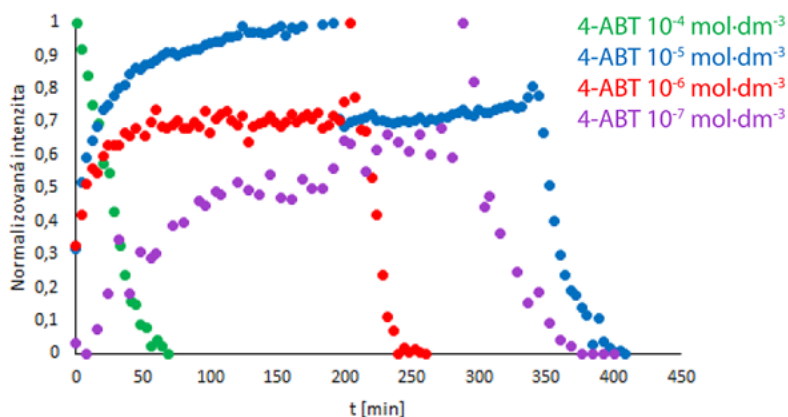
Obr. 4. Porovnání SERS spekter jednotlivých systémů CuNP o různé koncentraci 4-ABT ( $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Zobrazena jsou spektra v době své maximální intenzity. Spektra byla měřena s excitační vlnovou délkou 785 nm a jsou zobrazena v „offset scale“ režimu



Obr. 5. Grafické znázornění interakce molekul 4-ABT a povrchu měděné nanočástice (CuNP)

těchto závislostí byl pro oba sledované pásy stejný. Posouzení průběhu u ostatních vibrací nebylo možné z důvodu jejich nízkých intenzit.

V systémech o koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  došlo zpočátku k postupnému nárůstu intenzity, který je pravděpodobně způsoben postupným uspořádáním adsorbovaných molekul analytu na povrchu nanočástic. Po dosažení ustálené hodnoty odezvy došlo v určitých časech (tab. II) k úplné ( $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) nebo částečné ( $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) degradaci systému. „Skoková“ změna v SERS signálu u druhého jmenovaného systému by mohla být způsobena postupnou sedimentací větších, a tedy i použité excitační vlnové délce lépe odpovídajících částic. Nejméně stabilní byl systém o koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , u kterého nejspíše vlivem vysoké koncentrace analytu docházelo k rychlé degradaci. Nejméně konzistentní hodnoty vykazoval systém  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , u kterého do do-



Obr. 6. Závislost normalizované plochy na stáří jednotlivých systémů CuNP/4-ABT. Uvedené hodnoty plochy byly získány normalizací aktuální hodnoty plochy pásu valenční vibrace C–S ( $1077 \text{ cm}^{-1}$ ) vztahem k nejvyšší hodnotě této plochy u zkoumaného systému. Legenda značí koncentraci 4-ABT v konkrétním systému

## Tabulka II

Doby dosažení maximální odezvy a doby SERS-aktivity jednotlivých systémů

$c_{(4\text{-ABT})}$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-5</sup>	1·10 <sup>-6</sup>	1·10 <sup>-7</sup>
$t_{\text{max}}$ [min] <sup>a</sup>	0	192	204	288
$t_{\text{deg}}$ [min] <sup>b</sup>	68	409	260	400

<sup>a</sup>  $t_{\text{max}}$  – doba dosažení maximální odezvy analytu, <sup>b</sup>  $t_{\text{deg}}$  – doba, která uběhne do degradace systému

by degradace nedošlo k ustálení hodnoty odezvy. Doby stability systémů znázorňuje tab. II.

## Závěr

Cílem této práce bylo posoudit vliv koncentrace a stáří systémů na SERS-aktivitu měděných nanočástic. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší odezvu vykazují systémy o koncentraci 1·10<sup>-5</sup> mol dm<sup>-3</sup> 4-ABT, a to díky široké distribuci velikosti částic v měřeném systému. SERS-aktivita byla pozorována u systémů všech koncentrací, ačkoliv u systémů s koncentrací analytu 1·10<sup>-7</sup> mol dm<sup>-3</sup> byla odezva systému již relativně nízká. Vlivem další optimalizace přípravy nanočástic a aplikace použitého analytu by však měla být možná spolehlivá detekce 4-ABT až do koncentrace analytu 1·10<sup>-7</sup> mol dm<sup>-3</sup>.

U všech sledovaných systémů byly nejintenzivnější rovinné vibrace při 1077 a 1588 cm<sup>-1</sup>, na jejichž plochách byla pozorována míra odezvy jednotlivých systémů v čase. Bylo zjištěno, že v systémech o koncentracích analytu 1·10<sup>-5</sup>, 1·10<sup>-6</sup> a 1·10<sup>-7</sup> mol dm<sup>-3</sup> je možno SERS signál pozorovat po relativně dlouhou dobu, kdežto systémy o koncentraci analytu 1·10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup> jsou poměrně nestabilní. V době maximální optické odezvy analytu bylo u některých systémů možné spolehlivě pozorovat také jeho další charakteristické vibrace. Vzhledem ke skutečnosti, že se analyt váže na měděný substrát přes thiolovou skupinu, nabízí se možnost využít takto připravené nanočástice i pro měření dalších látek obsahujících tuto funkční skupinu.

## LITERATURA

1. Aroca R.: *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. J. Wiley, Chichester 2006.
2. Procházka M.: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Bioanalytical, Biomolecular and Medical Applications*. Springer, Cham 2016.
3. Dendisová M., Havránek L., Ončák M., Matějka P.: *J. Phys. Chem. C* 117, 21245 (2013).

**I. Kopal<sup>a</sup>, M. Plicka<sup>a</sup>, M. Švecová<sup>b</sup>, and M. Dendisová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Physical Chemistry, <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Study of the Influence of Experimental Conditions on SERS-Activity of Copper Nanoparticles**

Spectroscopy of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) is a technique which can be used for qualitative analysis of different types of chemical or biological substances. Raman signal is enhanced due to the interaction between the adsorbed analyte and plasmonic metal substrate. This technique is applied in investigation of intermolecular interactions, nanoobjects, medicinally important substances or in the monitoring of metabolites in the human organism. Because of different experimental conditions of various application fields, it is important to develop new plasmonic substrates and characterize them. It was found out that there are fields where it is appropriate to use copper nanoparticles (CuNPs) instead of gold or silver, which are mostly better enhancers, but they are not as reactive as copper. On the other hand, CuNPs do not exhibit such great stability and their optical properties are quite time-dependent.

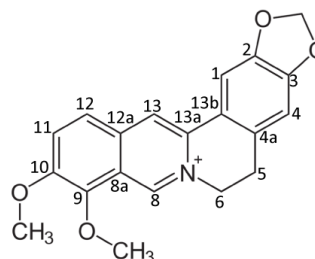
The goal of this study was to prepare and characterize colloid systems containing CuNPs and different concentrations (from 1·10<sup>-4</sup> to 1·10<sup>-7</sup> mol dm<sup>-3</sup>) of model analyte, 4-aminobenzenethiol (4-ABT), and to test its SERS-activity. For characterization, transmission electron microscopy (TEM) and UV/Vis spectroscopy were used.

**Keywords:** surface-enhanced Raman spectroscopy, copper nanoparticles, stability of nanoparticles, 4-aminobenzenethiol

## SERS SPEKTRA BERBERINU: VLIV EXCITAČNÍ VLNOVÉ DÉLKY A PLASMONICKÉHO SUBSTRÁTU

ADÉLA KORYŤÁKOVÁ<sup>a</sup>, MARIE ŠVECOVÁ<sup>a</sup>,  
OLEKSANDR VOLOCHANSKYI<sup>b</sup> a VADYM  
PROKOPEC<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Ústav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
korytaka@vscht.cz



Obr. 1. Strukturální vzorec berberinu. Převzato z cit.<sup>3</sup>

Klíčová slova: berberin, Ramanova spektroskopie, SERS, Ag a Au substráty

### Úvod

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) umožňuje účinné znásobení optické odezvy analytů, jež jsou adsorbovány na povrchu plasmonických kovů. Nejčastějšími typy analytů pro SERS spektroskopii jsou látky vykazující velkou afinitu k povrchu ušlechtilého kovu, neboť se na ně snadno adsorbují díky tomu, že ve své struktuře obsahují heteroatomy. Většinou se jedná o přírodní látky, jako jsou alkaloidy obsahující např. dusík, jenž disponuje volným elektronovým párem.

Berberin (obr. 1) je benzylisochinolinový přírodní alkaloid žluté barvy, který se nachází v rostlinách rodu dřívěšálovitých (*Berberis vulgaris*, *Berberis aristata*). Nejběžněji se vyskytuje v kmenové kůře, kořenech a oddencích rostlin. Veliký potenciál tohoto alkaloidu se nachází v možnostech jeho využití v moderní medicíně především díky jeho antipyretickým, antiflogistickým a antimikrobiálním účinkům. Nedávné studie prokázaly, že berberin je víceúčelový lék s příznivými účinky na širokou škálu chronických onemocnění, mezi které patří metabolické poruchy, obezita a další<sup>1</sup>. Bylo také prokázáno, že má velmi specifické účinky na rakovinné buňky různých typů. V neposlední řadě zvyšuje mitochondriální funkci buněk a zabraňuje oxidativnímu stresu, který je hlavní příčinou procesu stárnutí<sup>2</sup>.

Tato práce je zaměřena na zkoumání vlivu excitační vlnové délky (532, 780, 1064 nm) a plasmonického kovu použitého pro přípravu substrátu (Au, Ag, Cu plasmonické vrstvy) na spektrální odezvu analytu berberinu (Brbr) s využitím SERS spektroskopie. K přípravě substrátů byla použita bezproudová depozice galvanickým vylučováním na hliníkovou podložku, jež umožňuje snadnou a rychlou přípravu SERS-aktivních vzorků. Cílem těchto měření bylo určit vhodný plasmonický substrát a excitační vlnov-

ou délku pro následující experimenty zaměřené na postupné snižování koncentrace Brbr a nalezení jeho limitu detekce.

### Experimentální část

Pro přípravu zesilujících substrátů byla použita hliníková destička (5×5 mm), na které byla vyzkoušena galvanická depozice plasmonických kovů ze 3 různých lázní a roztoků solí. Do příslušných roztoků plasmonických kovů byly destičky ponořeny na dobu 10 min. Následně byly deponované destičky umístěny do methanolového roztoku berberinu o molární koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> na dobu 18 hodin, poté byly vyndány a osušeny v proudě dusíku.

Roztoky jednotlivých solí vznikly rozpuštěním příslušného množství soli (0,03397 g AgNO<sub>3</sub> a 0,01076 g CuCl<sub>2</sub>) ve 2 ml ultračisté vody. Roztoky byly připravovány vždy čerstvé. Komplexní zlatíci, stříbríci a mědicí lázně byly připravovány dle již dříve publikovaných studií<sup>4,5</sup>.

Pro měření SERS spekter s excitační vlnovou délkou z viditelné oblasti byl využit disperzní spektrometr DXR SmartRaman (Thermo Scientific, USA; 532 a 780 nm). FT-Ramanův spektrometr EQUINOX 55/S (Bruker Optik, Německo) byl využit pro měření SERS spekter s excitační vlnovou délkou 1064 nm. Tabulka I udává nastavení použitých přístrojů.

Naměřená data byla zpracována v programu OMNIC 9. Z naměřených 6 bodů na každém substrátu byla vytvořena průměrná spektra a vzájemně porovnána.

### Výsledky a diskuse

Naměřená SERS spektra byla při interpretaci porovnána s dříve publikovanými, naměřenými a predikovanými

Tabulka I  
Nastavení použitých přístrojů

Excitační vlnová délka [nm]	Rozlišení [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Výkon laseru [mW]	Expozice/počet skenů
532	5	5	10×30 s
780	5	60	10×30 s
1064	4	300	1064 skenů

hodnotami charakteristických pásů berberinu<sup>3</sup>. Dále byla porovnána SERS spektra s nezesíleným spektrem čisté látky. Přiřazení jednotlivých pásů k charakteristickým vibračním je uvedeno v tab. II.

#### Vliv excitační vlnové délky

##### *SERS spektra Brbr adsorbovaného na Au a Ag substrátu (Au lázeň a roztok soli AgNO<sub>3</sub>)*

Obr. 2 zobrazuje porovnání SERS spekter při různých excitačních vlnových délkách a Ramanovo spektrum čisté látky. Z obrázku je patrné, že vybrané a označené pásy v SERS spektrech jsou intenzivnější než ve spektru čisté látky. Avšak u SERS spekter získaných na Au substrátu, která byla měřena s excitační vlnovou délkou 780 nm, a u SERS spekter ze stříbrného substrátu (příprava v roztoku AgNO<sub>3</sub>) měřených s excitační vlnovou délkou 532 nm nejsou vibrační pásy tak viditelné z důvodu zvýšeného pozadí, které zpřičiňuje fluorescence. Komentované SERS spektrum Brbr z Ag substrátu je také zatíženo poměrně intenzivním šumem na úrovni základní linie. U SERS spekter je vidět nepatrný posun maxima pásů cca o 5  $\text{cm}^{-1}$  oproti čisté látce, což značí interakci analytu se

substrátem. Pomocí tzv. povrchových výběrových pravidel pro SERS spektroskopii lze odhadnout, že nejvíce zesílené vibrační pásy (1571, 1399, 773, 756 a 734  $\text{cm}^{-1}$ ) odpovídají kolmému uspořádání Brbr vůči povrchu plasmonického kovu.

Vhodnější excitační vlnovou délkou pro substrát připravený v Au lázni je 1064 nm. Hlavním důvodem je skutečnost, že energie záření z blízké infračervené oblasti nestačí na excitaci molekuly do vyšší elektronové hladiny, ale zároveň stačí na vybudování efektivní povrchové plasmonové rezonance na zlatém povrchu (v NIR oblasti se nachází maximum), což vede k potlačení fluorescence, a v důsledku toho jsou pásy od sebe lépe oddělené, nesplývají a nepřekrývají se. Nejvhodnější excitační vlnovou délkou pro substráty deponované v roztoku AgNO<sub>3</sub> je z pohledu poměru signálu k šumu vlnová délka 780 nm.

#### Vliv plasmonického substrátu

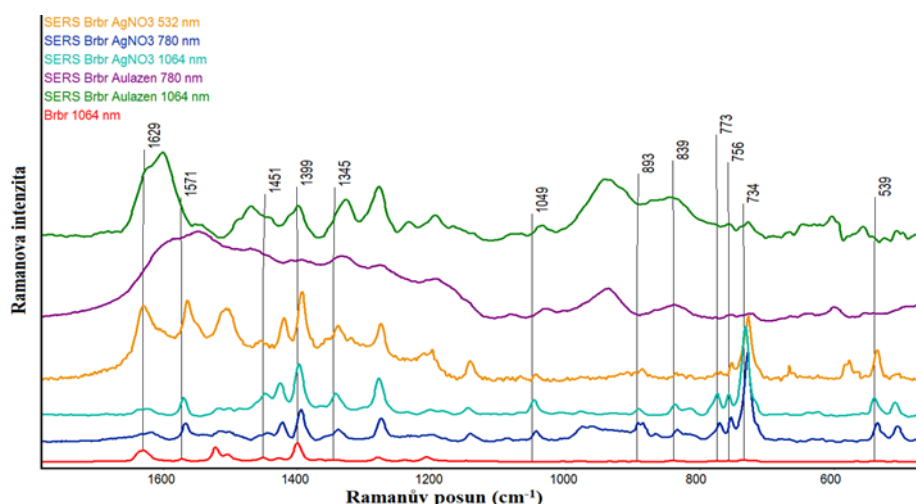
##### *SERS spektra Brbr – excitační vlnová délka 780 nm*

Obr. 3 zobrazuje SERS spektra analytu připraveného na zlatém a stříbrném substrátu měřená při excitační vlnové délce 780 nm. U SERS spekter si lze všimnout, že oproti čisté látce jsou zesílené pásy posunuty k nižším hodno-

Tabulka II  
Charakteristické vibrace berberinu (1064 nm)

Ramanův posun [ $\text{cm}^{-1}$ ]		Přiřazení vibrací <sup>a</sup>
experiment	cit. <sup>3</sup>	
539	533	asym oop CN, deformace kruhu, C4-H <sub>2</sub> a C5-H <sub>2</sub> rock
734	729	oop kruhu
756	754	kruh A, dioxolanový kruh, breath
773	770	ip, asym dioxolanu – OCH <sub>2</sub> O
839	836	ip CO, C13-H, C1-H ip, C6-H <sub>2</sub> , wag, C5-H <sub>2</sub> rock
893	888	dioxolanový kruh, C11-H, C12-H oop
1049	1044	C11-H, C12-H, C13-H oop
1345	1342	ip C4-H <sub>2</sub> , C5-H <sub>2</sub> wag oop
1399	1398	ip kruhů
1451	1445	ip kruhů
1571	1569	ip kruhu, sym OCH <sub>3</sub>
1629	1620	ip kruhu, dioxolanové CH <sub>2</sub> scissor

<sup>a</sup> ip – rovinná (in-plane), oop – mimorovinná (out-of-plane), wag – vějířová (wagging), breath – dýchací (breathing), rock – kývavá (rocking), scissor – nůžková vibrace (scissoring), asym – asymetrická, sym – symetrická



Obr. 2. SERS spektra berberinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na substrátech připravených v Au lázni a roztoku  $\text{AgNO}_3$  při excitačních vlnových délkách 532 nm, 780 nm a 1064 nm porovnána s Ramanovým spektrem berberinu v pevném stavu při excitační vlnové délce 1064 nm. Spektra jsou zobrazena v „offset scale“ režimu

tám vlnočtů (cca  $5 \text{ cm}^{-1}$ ). Špatná odezva analytu na zlatých substrátech může být způsobena tím, že se analyt váže na povrch substrátu jiným způsobem než u ostatních kovů, jelikož různé funkční skupiny molekul mají odlišnou afinitu k různým kovům. Nejintenzivněji je zesílena část spektrální oblasti okolo  $734 \text{ cm}^{-1}$ , kde se projevují mimo-rovinné vibrace aromatického kruhu.

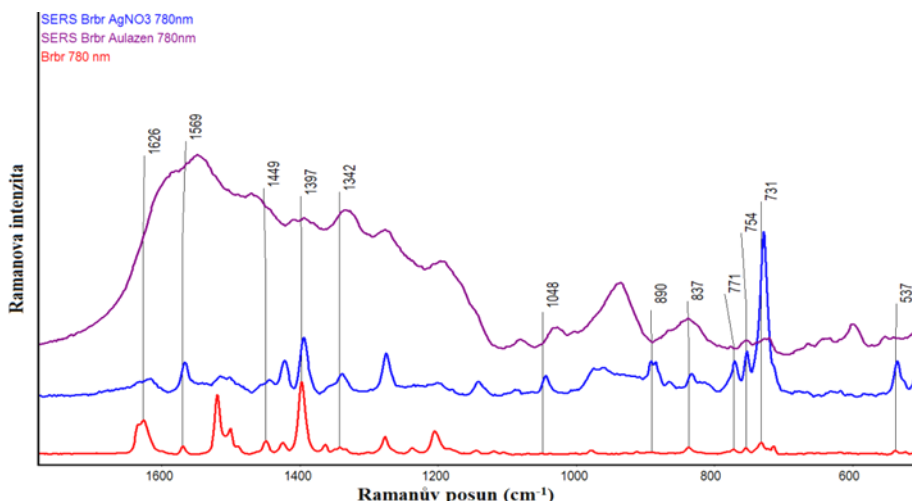
#### SERS spektra Brbr – excitační vlnová délka 1064 nm

Na obr. 4 jsou zobrazena SERS spektra berberinu adsorbovaného na substrátech připravených v Au lázni a roztoku  $\text{AgNO}_3$  měřená při excitační vlnové délce

1064 nm. Všechny vyznačené charakteristické pásy v SERS spektrech jsou zesíleny. Avšak je patrné, že SERS spektra na zlatých substrátech vykazují horší rozlišení některých pásů (např.  $893, 539 \text{ cm}^{-1}$ ). Nejvíce zesílené pásy oproti čisté látce se objevují v okolí vlnočtů  $1399, 750$  a  $530 \text{ cm}^{-1}$  a odpovídají vibracím aromatického kruhu.

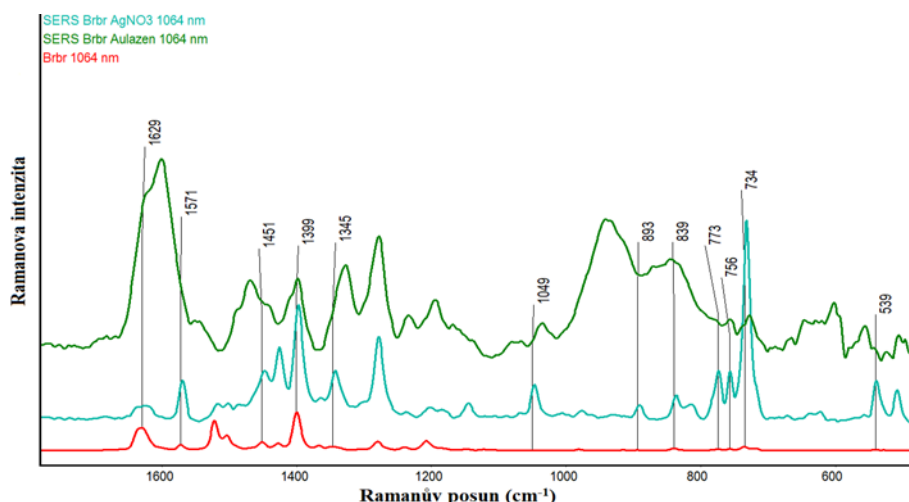
#### Závěr

Cílem této práce bylo nalezení vhodné kombinace plasmonického substrátu a excitační vlnové délky pro stanovení berberinu (o základní koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ )



Obr. 3. SERS spektra berberinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na substrátech připravených v roztoku  $\text{AgNO}_3$  a Au lázni při excitační vlnové délce 780 nm v porovnání s Ramanovým spektrem berberinu v pevném stavu při excitační vlnové délce 780 nm. Spektra jsou zobrazena v „offset scale“ režimu





Obr. 4. SERS spektra berberinu ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ ) na substrátech připravených v roztoku  $AgNO_3$  a Au lázni při excitační vlnové délce 1064 nm v porovnání s Ramanovým spektrem berberinu v pevném stavu při excitační vlnové délce 1064 nm. Spektra jsou zobrazena v „offset scale“ režimu

pomocí SERS spektroskopie. Bylo zjištěno, že optimálním substrátem z hlediska celkové intenzity charakteristických pásů byl substrát připravený v roztoku  $AgNO_3$ . Naopak nejhorším substrátem z hlediska intenzity pásů byl roztok  $CuCl_2$ , u kterého nebylo možné pozorovat žádné pásy vyjma charakteristického pásu pro Cu povrch. Při porovnávání vlivu excitační vlnové délky bylo zjištěno, že vlnová délka má menší vliv na celkový průběh získaných SERS spekter než volba kovu. Nicméně patrný rozdíl byl u vlnové délky 780 nm, kde se při měření objevuje zvýšené pozadí způsobené fluorescencí analytu. Nejvíce zesíleny jsou v SERS spektrech pásy mimorovinných vibrací aromatického kruhu, kterým se Brbr orientuje k povrchu.

#### LITERATURA

1. Wang C., Wang Y., Ma S.-R., Zuo Z.-Y., Wu Y.-B., Kong W.-J., Wang A.-P., Jiang J.-D.: *Sci. Rep.* 9, 13415 (2019).
2. Mohammadinejad R., Ahmadi Z., Tavakol S., Ashrafizadeh M.: *J. Cell. Physiol.* 234, 14914 (2019).
3. Leona M., Lombardi J. R.: *J. Raman Spectrosc.* 38, 853 (2007).
4. Švecová M., Palounek D., Volochanskyi O., Prokopec V.: *Spectrochim. Acta, Part A* 229, 117969 (2020).
5. Volochanskyi O., Švecová M., Prokopec V.: *Spectrochim. Acta, Part A* 207, 143 (2019).

#### A. Koryťáková<sup>a</sup>, M. Švecová<sup>a</sup>, O. Volochanskyi<sup>b</sup>, and V. Prokopec<sup>a</sup> (<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup> Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague): SERS Spectra of Berberine: The Influence of Excitation Wavelength and Plasmonic Substrate

The study is focused on testing the influence of excitation wavelength (532 nm, 780 nm, and 1064 nm) and plasmonic metals (Au, Ag, Cu) on the spectral response of the analyte berberine using SERS spectroscopy. Berberine has great potential which can be appreciated by modern medicine mainly due to its antipyretic, antiphlogistic, and antimicrobial effects. Recent studies have shown that berberine is a multipurpose drug with beneficial effects on a wide range of chronic diseases such as metabolic disorders, obesity, etc. The substrate was prepared by electroless deposition on the aluminium surface, which allows easy and fast preparation of SERS-active samples. The aim of these measurements was to find an appropriate plasmonic substrate and excitation wavelength for subsequent experiments aimed at finding the detection limit of berberine.

Keywords: berberine, Raman spectroscopy, SERS, Ag and Au substrates

## STRESOVÉ TESTOVÁNÍ STABILITY CANAGLIFLOZINU

JITKA MÁCHALOVÁ a TOMÁŠ KRÍŽEK

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
machalovaj@natur.cuni.cz

Klíčová slova: canagliflozin, chemická oxidace, degradace, stresové studie, HPLC, testování stability

### Úvod

Stresové testování léčiv je nedílnou součástí procesu jejich vývoje. Stresové testování je hlavním nástrojem, který slouží k objasnění vnitřní stability léčivé látky a k identifikování produktů z degradačních drah<sup>1</sup>. Důležitou součástí testování je mimo studia účinků teploty, vlhkosti a fotolýzy také studium oxidativního stresu<sup>2</sup>. Takovéto testování je však časově náročné, a proto je snaha ho nahradit rychlejším elektrochemickým testováním. Tato práce je součástí většího projektu, který usiluje o dosažení zkrácení doby experimentu pomocí elektrochemické oxidace při stresovém testování léčiv.

Canagliflozin stimuluje močovou exkreci glukosy potlačením reabsorpce glukosy z proximálního tubulu v ledvinách. Používá se k řízení hladiny glukosy v krvi u pacientů s diabetem typu 2 (cit.<sup>3</sup>).

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat analytické metody HPLC tak, aby canagliflozin mohl být stanoven pomocí UV i MS detektoru a vyvinutá metoda pak mohla být použita pro studium stability této sloučeniny a identifikaci hlavních degradačních produktů vzniklých vystavením canagliflozinu oxidativnímu stresu.

### Experimentální část

Pro HPLC s UV detekcí byl použit přístroj HPLC, 1200 Series, Agilent Technologies, Německo, pro HPLC s MS/MS detekcí byl použit přístroj UHPLC 1290, Infinity 6460, QqQ, Agilent Technologies, Německo. Vodnou složkou mobilní fáze byl mravenčanový pufr – 10mM kyselina mravenčí zneutralizovaná hydroxidem amonným na hodnotu pH 3,5. Organickou složku tvořil acetonitril (ACN). Byla použita gradientová eluce (čas, min/obsah org. složky, %): 0/30, 1/30, 10/40, 12/80, 13/80, 14/30, 20/30. Měření byla prováděna na koloně Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2,1 × 100 mm, 2,7 μm), dávkovaný objem vzorku byl 1 μl, průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>, teplota kolony 30 °C. Detekce byla prováděna na detektoru

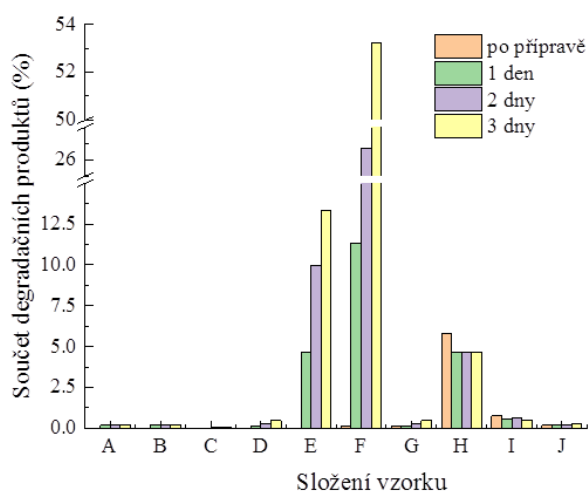
s diodovým polem (vlnová délka 292 nm), pro identifikaci hlavních degradačních produktů byl použit MS detektor. Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej (teplota dusíku 300 °C, průtok dusíku 8 l min<sup>-1</sup>, tlak zmlžovače 275 790 Pa, napětí na vstupní kapiláře 4000 V). Pro fragmentaci prekurzorových iontů byly použity hodnoty kolizních energií 5, 8, 10, 15, 20, 30 a 35 V.

Stresové testování canagliflozinu bylo prováděno v degradační komoře při teplotě 50 °C po dobu 1, 2 a 3 dnů. Testování bylo prováděno v následujících roztocích o koncentraci canagliflozinu 0,5 mg ml<sup>-1</sup>. Kontrolní vzorek A: ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v; kontrolní vzorek B: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v; kontrolní vzorek C: MetOH:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v; vzorek D: MetOH:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vzorek E: ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vzorek F: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vzorek G: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vzorek H: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vzorek I: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; vzorek J: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH. Následně byl testován vzorek s excipienty: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vzorek v přítomnosti 0,1M HCl + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a vzorek v 0,1M HCl. Zároveň byl testován vliv chemické oxidace při laboratorní teplotě po dobu 4–7 dnů – vzorek canagliflozinu o koncentraci 0,5 mg ml<sup>-1</sup> v následujících roztocích: ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a MetOH:H<sub>2</sub>O, 50:50 % v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Výsledky a diskuse

Po optimalizaci chromatografických podmínek měření byla provedena validace metody. Opakovatelnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka 7 měření v procentech. Pro koncentraci 0,3 mg ml<sup>-1</sup> byla opakovatelnost retenčního času 0,17 % a plochy píku 0,75 %. Pro koncentraci 5 · 10<sup>-3</sup> mg ml<sup>-1</sup> byla opakovatelnost retenčního času 0,18 % a plochy píku 1,58 %. Metoda měla mez detekce 8,9 · 10<sup>-5</sup> mg ml<sup>-1</sup> (2,0 · 10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup>), mez kvantifikace 3,0 · 10<sup>-4</sup> mg ml<sup>-1</sup> (6,8 · 10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup>), koeficient determinace 0,9997 a lineární dynamický rozsah 3,0 · 10<sup>-4</sup>–0,5 mg ml<sup>-1</sup>. Testováním robustnosti bylo zjištěno, že mírné změny teploty, obsahu acetonitrilu v mobilní fázi a pH mobilní fáze nemají významný vliv na plochu píku canagliflozinu, jeho symetrii ani rozlišení píků nečistot od píku canagliflozinu.

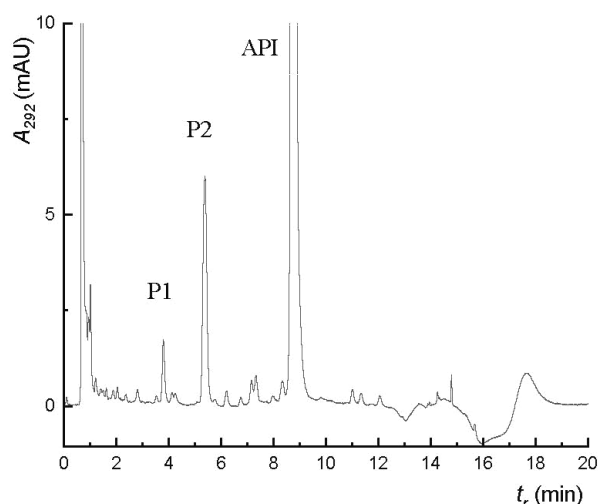
Vyvinutá metoda byla použita ke stresovému testování canagliflozinu. Na obr. 1 lze vidět nárůst obsahu degradačních produktů v čase při teplotě 50 °C. V kontrolních vzorcích (vzorky A, B, C) ani v přítomnosti kyselého (vzorek I) či zásaditého prostředí (vzorek J) k výrazné degradaci nedocházelo. V přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v neutrálním



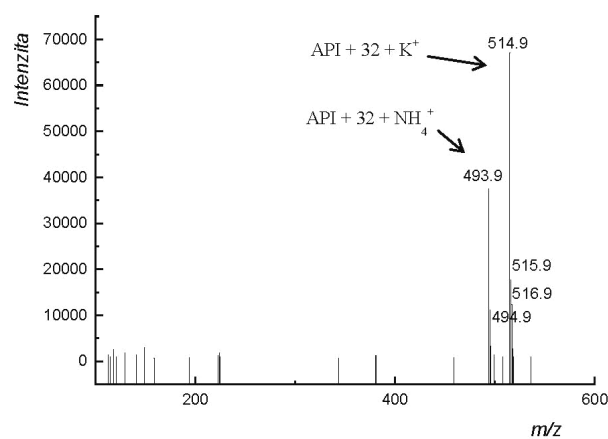
Obr. 1. Nárůst obsahu degračních produktů v čase při různém složení vzorku. A: ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50 % v/v; B: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v; C: MetOH:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v; D: MetOH:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; E: ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; F: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; G: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; H: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; I: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; J: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH

prostředí (vzorky D, E, F) docházelo k degradaci v rozsahu 0,1 až 53,2 %. Přítomnost kyseliny sirové oxidaci potlačila (vzorek G). V přítomnosti 0,1M NaOH a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vzorek H) docházelo ke vzniku degračních produktů již po přípravě vzorku a jejich obsah se v průběhu testu významně neměnil. Na obr. 1 lze vidět, že vyšší obsah vody v rozpouštědle vzorku vedl k vyššímu obsahu degračních produktů (vzorky D, E, F). V přítomnosti methanolu docházelo k menší degradaci vzorku než ve vzorku s acetonitrilem. Ve vzorku s excipienty, které se přidávají do tablety Invokana během výroby, docházelo ke vzniku většího množství degračních produktů než ve vzorku se stejným složením rozpouštědla, ale bez excipientů. Během testování oxidativního stresu při laboratorní teplotě byla pozorována výrazně pomalejší degradace, a to v rozsahu 0,2–1,5 %, přičemž větší množství degračních produktů vznikalo ve vzorku s vyšším obsahem vody a v methanolu vznikalo menší množství degračních produktů než v acetonitrilu, stejně jako v případě degradace při 50 °C. Vzorek s 0,1M HCl a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byl původně použit pro testování vlivu kyselého prostředí na rychlost degradace, docházelo však k výraznému nárůstu obsahu degračních produktů již po 1 dnu (obsah degračních produktů byl 99,2 %). V tomto případě došlo vlivem působení kyseliny chlorovodíkové a peroxidu vodíku ve vzorku ke chloraci molekuly canagliflozinu, a tudíž ke vzniku nežádoucího nereálného oxidačního produktu. Chlorace molekuly byla potvrzena analýzou na hmotnostním spektrometru. Pro zjištění oxidačních degračních produktů v kyselém prostředí byla proto použita 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (výsledky jsou popsány výše a na obr. 1).

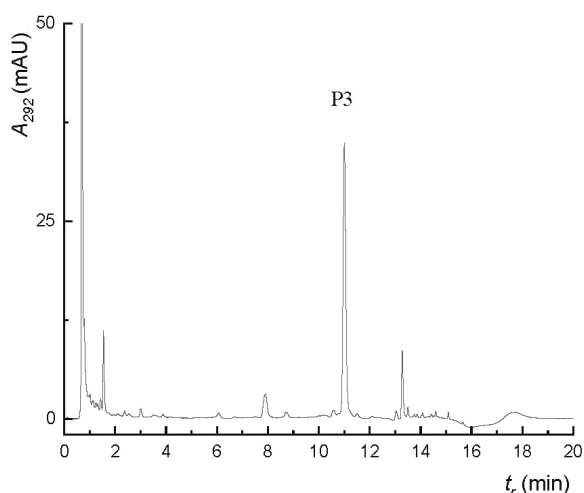
Pro identifikaci degračních produktů byl použit MS detektor. Na obr. 2 lze vidět chromatogram vzorku o koncentraci 0,5 mg ml<sup>-1</sup> v rozpouštědle vzorku: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při ponechání v degrační komoře při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. V chromatogramu jsou patrné dva hlavní degrační produkty, které byly separovány vyvinutou analytickou meto-



Obr. 2. Chromatogram vzorku API (canagliflozinu) o koncentraci 0,5 mg ml<sup>-1</sup> v rozpouštědle vzorku: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při ponechání v degrační komoře při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. V chromatogramu jsou patrné dva degrační produkty, které byly separovány vyvinutou analytickou metodou



Obr. 3. Hmotnostní spektrum (pozitivní mód) piku P1 z obr. 2. Na obrázku lze vidět molekulové adukty s draselným a amonným iontem, které se nacházely v mobilní fázi. Hodnoty *m/z* jsou posunuty o hmotu 32 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Tato hmota odpovídá 2 atomům kyslíku, které se navázaly na molekulu canagliflozinu během oxidativního stresu

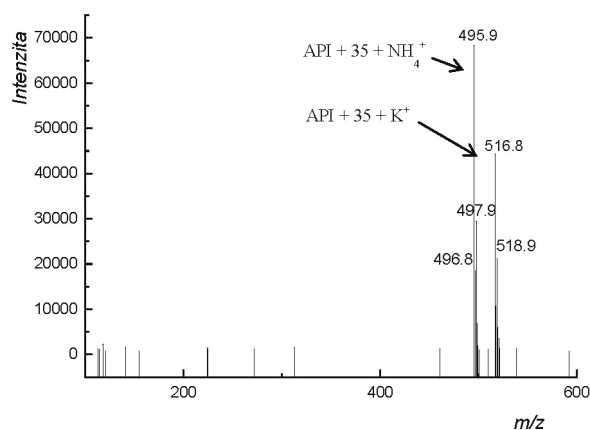


Obr. 4. Chromatogram vzorku API (canagliflozinu) o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  v rozpouštědle vzorku: ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při ponechání v degrační komoře při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. V chromatogramu je patrný jeden degrační produkt s vysokou hodnotou absorbance. Účinná látka se v kyselém prostředí a v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zcela rozložila nebo se přeměnila na třetí degrační produkt

dou. Na základě hmotnostních spekter bylo zjištěno, že degrační produkty P1 a P2 vznikly navázáním dvou atomů kyslíku během oxidace na různá místa molekuly canagliflozinu (obr. 3). Dále byl pomocí hmotnostního spektrometru analyzován vzorek canagliflozinu o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  v rozpouštědle vzorku ACN:H<sub>2</sub>O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na chromatogramu (obr. 4) lze vidět pik degračního produktu, který vznikl v tomto rozpouštědle vzorku při ponechání v degrační komoře při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Na základě vyhodnocení hmotnostních spekter (obr. 5) bylo zjištěno, že na molekulu canagliflozinu byl během oxidačních podmínek navázán atom chloru, a došlo tak ke vzniku nežádoucího nereálného oxidačního produktu.

## Závěr

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení canagliflozinu a jeho degračních produktů pomocí HPLC s UV a MS detektorem. Během validace metody byla zjištěna opakovatelnost, kalibrační závislost, meze detekce a kvantifikace, linearita měření a lineární dynamický rozsah a robustnost metody. Vyvinutá metoda byla použita ke studiu oxidačního stresu canagliflozinu. Na základě výsledků bylo zjištěno, že na rychlost degradace má vliv obsah vody v rozpouštědle vzorku a kyselost prostředí. Vzniklé degrační produkty byly dále zkoumány pomocí MS. Vlivem oxidačního stresu došlo k navázání dvou atomů kyslíku na molekulu canagliflozinu. V přítomnosti kyseliny chlorovodíkové byla molekula



Obr. 5. Hmotnostní spektrum (pozitivní mód) píku P3 z obr. 4. V hmotnostním spektru lze vidět molekulové adukty s draselným a amonným iontem, které byly přítomny v mobilní fázi. Jednotlivé hodnoty  $m/z$  jsou posunuty o hodnotu 35 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Hmotnost 35 odpovídá atomu chloru, který se navázal na strukturu canagliflozinu během oxidačního stresu, a tím došlo ke vzniku nereálného degračního produktu. Ze spektra je patrné, že poměr intenzity signálů o  $m/z$  496 a 498 a signálů o  $m/z$  517 a 519 odpovídá přírodnímu zastoupení izotopů chloru <sup>35</sup>Cl a <sup>37</sup>Cl, který je 3:1

canagliflozinu obohacena o atom chloru, a došlo tak ke vzniku nereálného oxidačního produktu.

## LITERATURA

1. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*, str. 1–10, Informa Healthcare, London 2011.
2. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*, str. 142. Informa Healthcare, London 2011.
3. PubChem Database: *Canagliflozin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Canagliflozin>, staženo 8. 10. 2019.

**J. Máchalová and T. Křížek** (*Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague*): **Stress Stability Testing of Canagliflozin**

In this work, a method for determination of canagliflozin and its degradation products by HPLC with UV and MS detector was developed. During the method validation, repeatability, calibration dependence, limits of detection and quantification, linearity of measurement, linear dynamic range and robustness of the method were assessed. The developed method was used to study the oxidative stress of canagliflozin and to investigate its degradation products. Based on the results, it was found that the rate of degradation is affected by the water content in the sample solvent and pH. The main degradation products were stud-

ied by MS. Due to oxidative stress, two oxygen atoms were bound to the molecule of canagliflozin. In the presence of hydrochloric acid, a chlorine atom was bound to the molecule of canagliflozin and formed thus an unrealistic oxidation product.

Keywords: canagliflozin, chemical oxidation, degradation, stress study, HPLC, stability testing



## KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ PSEUDOPEROXIDASOVÉ AKTIVITY ZLATÝCH NANOČÁSTIC

PETR MUSÁLEK<sup>a,b,c</sup>, MICHAELA VŠETIČKOVÁ<sup>b,c,d</sup>, ZUZANA TÓTHOVÁ<sup>b,c</sup>, MARTINA STAŇKOVÁ<sup>b,c,d</sup>, DAGMAR UHLÍŘOVÁ<sup>b,c,d</sup>, DOMINIK BANÁŠ<sup>b,c,e</sup>, KAREL SEHNAL<sup>a,b,c,d</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a,b,c,d</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> CONEM Metallomics Nanomedicine Research Group, Studentská 6, 625 00 Brno, <sup>d</sup> Ústav vinohradnictví a vinařství, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Valtická 337, 691 44 Lednice, <sup>e</sup> Ústav biochemie, Masarykova Univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno-Bohunice  
kizek@sci.muni.cz

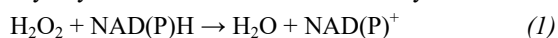
Klíčová slova: zlaté nanočástice, askorbová kyselina, fenolické sloučeniny, biofyzikální charakterizace, pseudoenzymová aktivita

### Úvod

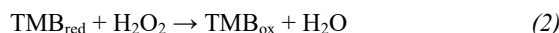
Zlaté nanočástice (AuNP) lze připravit redukcí kyseliny tetrachlorzlatité (HAuCl<sub>4</sub>) na zlato (Au<sup>0</sup>) působením řady sloučenin<sup>1</sup>. K zabránění agregace nanočástic jsou využívána různá stabilizační činidla (kyselina merkaptosukcinová, propionová, citronová, citronan a řada dalších). Průběh chemické syntézy AuNP je znázorněn na obr. 1. Z řady studií je známo, že velikost AuNP se obvykle pohybuje od 10 do 40 nm (cit.<sup>2</sup>), mají sférický tvar<sup>3</sup> a jsou barevné<sup>4</sup>. UV/Vis spektrum AuNP (o velikosti 5 nm) poskytuje absorpční maximum okolo 520 nm (cit.<sup>5</sup>). S rostoucím průměrem AuNP je pozorován červený posun spektra<sup>6</sup>. AuNP vykazují aktivitu podobnou enzymům<sup>7,8</sup>. Nanočástice se od větších částic ze stejných materiálů mohou lišit fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Vyšší počet nanočástic má větší aktivní povrch, což ovlivňuje rychlost chemických reakcí<sup>9</sup>. Díky těmto vlastnostem bývá v analytických aplikacích dosaženo výrazně lepších limitů detekce<sup>10</sup>. Nanočástice lze modifikovat biomolekulami, jako jsou DNA<sup>11</sup>, enzymy<sup>12</sup> a protilátky<sup>10</sup>. Takové úpravy umožňují jejich využití v biologii a medicíně<sup>13</sup>. Rostlinami inspirovaná nová léčiva jsou výzvou pro moderní biotechnologie a nanomedicínu<sup>14</sup>. Zelená syntéza představuje velmi zajímavou alternativu využití redoxního potenciálu rostlinného extraktu a je spojena se vznikem unikátních struktur. Zcela nedávno Lee a spol. syntetizovali zlatý nanokompo-

zit (z banánové slupky). Získané AuNP byly ve tvaru dendrimeru a vykazovaly celou řadu unikátních vlastností<sup>15</sup>. Připravené nanokompozity Au-dendrimeru měly lepší biokompatibilitu než některé klasické nanočástice zlata<sup>16</sup>.

Peroxidase podobná aktivita (pseudoperoxidasová) byla pozorována u řady nanomateriálů<sup>8</sup>. Na rozdíl od enzymů jsou anorganické částice odolnější vůči vysokým i nízkým teplotám, širokému spektru hodnot pH a nepodléhají denaturaci<sup>17</sup>. Principem peroxidasové aktivity je schopnost katalyzovat rozklad peroxidu vodíku za vzniku hydroxylových radikálů •OH a následně vody:



Reakce (1) je široce využívána v chemii, biochemii a molekulární biologii pro detekci mnoha analytů<sup>8</sup>. Běžně se ke sledování peroxidasové aktivity používá peroxid vodíku a vhodný barevný substrát, který vlivem oxidace změni barvu. Do této skupiny lze zařadit řadu používaných sloučenin OPD (*o*-fenylendiamin), DAB (diazaminobenzen) nebo ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)] a TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)<sup>18</sup>. Průběh reakce s TMB je možné sledovat i vizuálně:

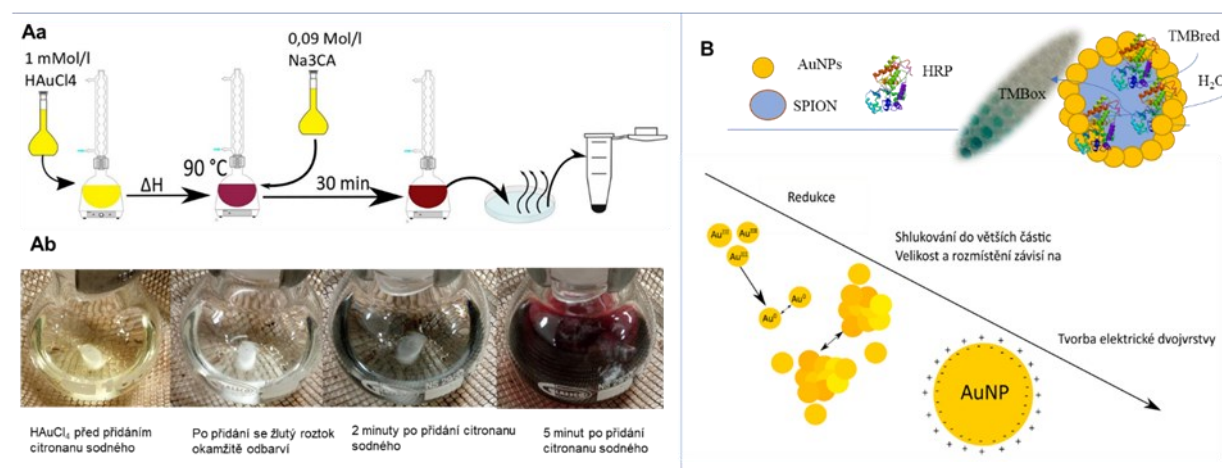


V několika publikovaných pracích bylo využito Gold-Mag nanokompozitu s ABTS (cit.<sup>19</sup>), Au/Cu nanodrátků s TMB (cit.<sup>20</sup>), BSA AuNP s TMB (cit.<sup>21</sup>), Au@Pt nanodrátky<sup>22</sup>, DNA AuNP (cit.<sup>23</sup>) a TiO<sub>2</sub> AuNP (cit.<sup>24</sup>) s pseudoperoxidasovou aktivitou pro stanovení kyseliny askorbové (AA). Cílem této práce bylo připravit AuNP s výraznou pseudoperoxidasovou aktivitou a využít této aktivity pro detekci AA a antioxidačních vlastností rostlinných extraktů.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Pro přípravu nanočástic byl použit trihydrát kyseliny tetrachlorzlatité (HAuCl<sub>4</sub>); dihydrát citronanu sodného (Na<sub>3</sub>CA); askorbová kyselina (AA); křenová peroxidasa (HRP); dihydrát octanu sodného; citronová kyselina; octová kyselina; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB); dimethylsulfoxid (DMSO); 2,6-dichlorfenolindofenol (DCF), chlorid sodný; 2-merkaptosukcinová kyselina (MSA); dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnan sodný, hydroxid sodný, sacharosa. Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od společnosti (Merck, Německo).



Obr. 1. Schéma přípravy a aplikace AuNP. (Aa) Příprava AuNP za zvýšené teploty: 50 ml vodného roztoku kyseliny tetrachlorzlatité ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) bylo pod zpětným chladičem přivedeno k varu za míchání (200 rpm), poté byl přidán roztok citronanu sodného. (Ab) Roztok byl refluxován po dobu 30 min a po zchlazení na  $25 \text{ °C}$  převeden na Petriho misku a vysušen. (B) Předpokládaný mechanismus oxidace TMB v přítomnosti AuNP a využití v testech antioxidačních vlastností (nahore). Zjednodušené schéma syntézy zlatých částic (AuNP) (dole)

## Přístroje

K navažování byly použity analytické váhy BXX 31 (Boeco, Německo). Spektrofotometrie: UV/Vis na přístroji UV-3100PC (VWR, USA) v plastových kyvetách s optickou dráhou 1 cm. Infinite F50 (Tecan, Švýcarsko) byl použit pro měření absorbance v polystyrenové mikrotitrační destičce od firmy Gama Group a.s. (ČR). Termální syntéza byla uskutečněna v topném hnízdě EMA/CE, Electrothermal (Velká Británie). Používané laboratorní sklo bylo zakoupeno od firmy VWR (USA). K vysoušení vzorků byla použita sušárna Dry-line 115 (VWR, USA). Při purifikaci byla využita centrifuga Rotofix 32 (Hettich, Německo) a magnetická míchačka VMS-C4 Advanced (VWR, USA). Částice byly dispergovány za pomoci ultrazvukové lázně USC600TH (VWR, USA). pH bylo měřeno pH metrem Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific, USA). K promývání mikrotitračních destiček byla použita promývačka HydroFlex (Tecan, Švýcarsko). Ultračistá voda byla připravena pomocí výrobku ELGA PURELAB flex (ELGA, Velká Británie). Při charakterizaci částic byl využit zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Velká Británie).

## Syntéza AuNP

Pro syntézu nanočástic byl připraven  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  roztok kyseliny tetrachlorzlatité rozpuštěním  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  v ultračisté vodě a jako redukční a stabilizační činidlo byl použit  $0,09 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok citronanu sodného. Roztok kyseliny tetrachlorzlatité byl převeden do varné baňky a za stálého míchání (200 rpm a  $100 \text{ °C}$ ) přiveden k varu pod zpětným chladičem v topném hnízdě EMA/CE (Electrothermal). Po dosažení varu byl přidán

$\text{Na}_3\text{CA}$ . Do 2 min po přidání  $\text{Na}_3\text{CA}$  se žluté zbarvení roztoku změnilo na fialové. Roztok byl pod zpětným chladičem 20 min a po vychladnutí byl vysušen na Petriho misce v sušárně při  $60 \text{ °C}$  po dobu 24 h. Vysušené částice byly převedeny do mikrozkušavky a zváženy.

## Charakterizace AuNP

Bylo změřeno Vis spektrum nepurifikované a ethanolem purifikované disperze AuNP (300–750 nm). Byl změněn  $\zeta$  potenciál a pomocí dynamického rozptylu světla byla stanovena velikost částic. Suspenze nanočástic byla centrifugována 20 min při 4000 g v sacharosovém gradientu (80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 %). Poté byly jednotlivé vrstvy odebrány a analyzována intenzita jejich zbarvení.

## Pseudoperoxidasová aktivita

Pro měření pseudoperoxidasové aktivity byl připraven pracovní roztok  $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  acetátového pufru (pH 4), TMB ( $5 \text{ mol dm}^{-3}$ ) a 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Roztok TMB ( $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) byl připraven rozpuštěním v DMSO. Z vysušených AuNP byla v ultračisté vodě připravena disperze o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  za pomoci ultrazvukové lázně (30 min, 5 mW). Do jedné jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno  $10 \mu\text{l}$  roztoku AuNP a  $200 \mu\text{l}$  pracovního roztoku. Pseudoperoxidasová aktivita nanočástic byla porovnávána s HRP (1 U). Absorbance byla měřena po jedné minutě při vlnové délce 620 nm po dobu 30 min ( $n = 3$ ). Do jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno  $30 \mu\text{l}$  roztoku AuNP ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ),  $20 \mu\text{l}$  roztoku AA a  $250 \mu\text{l}$  pracovního roztoku pro měření pseudoperoxidasové aktivity.

### Testování vzorků

Pro analýzu byl vybrán léčivý přípravek Celaskon tablety 250 mg od výrobce Sanofi-Aaventis (Praha) a rostlinné extrakty (*Salvia officinalis*, *Thymus serpyllum*), které byly připraveny podle postupu Sehnala a spol.<sup>25</sup>. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 30  $\mu\text{l}$  roztoku AuNP ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{l}$  vzorku a 250  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku pro měření pseudoperoxidasové aktivity ( $n = 3$ ). Jako srovnávací metoda k fotometrickému stanovení AA byla zvolena titrace 2,6-dichlorfenolindofenolem (DCF). Byl připraven odměrný roztok DCF ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Do titrační baňky bylo převedeno 5 ml roztoku kyseliny octové (2%) a 5 ml roztoku AA. Byla provedena titrace roztokem DCF a vizuálně odečtena spotřeba.

### Kontrola dat a statistická analýza

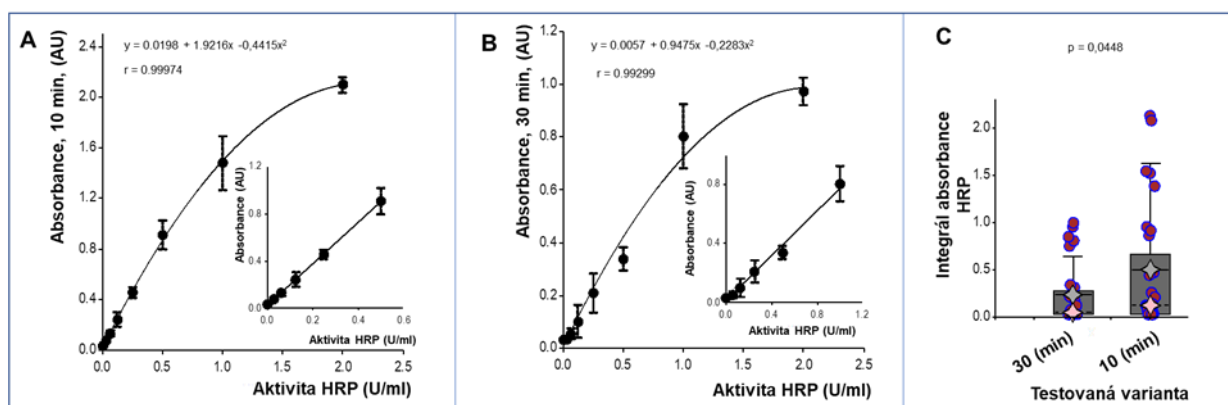
Všechna experimentální data byla evidována a ukládána do laboratorního informačního systému Qinslab (Prevention Medicals s.r.o., Česká republika). Dostupná experimentální data byla zpracována a vyhodnocena matematicky a statisticky přímo v databázi Qinslab. Vyloučení extrémních hodnot u souborů dat bylo provedeno Grubbsovým testem. Experimentální práce byla vždy provedena minimálně ve třech nezávislých experimentech ( $n = 3$ ). Získaná data prezentovaná v této práci jsou uvedena jako průměrné hodnoty. Pro hodnocení rozdílů byla vypočtena pravděpodobnost  $P$ . Hodnoty  $LOD$  (limit detekce) a  $LOQ$  (limit kvantifikace) a další statistické parametry byly stanoveny na hladině významnosti 95 %.

### Výsledky a diskuse

Je známo, že povrch AuNP je ovlivněn přítomností funkčních skupin z reaktantů. Na povrchu se utváří elek-

trická dvojvrstva, která výrazným způsobem ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti AuNP a tedy i dispergovatelnost ve vodném prostředí. Proto jsou intenzivně hledány co nejhodnější úpravy povrchu AuNP. AuNP byly připravovány z  $\text{HAuCl}_4$  ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) a  $\text{Na}_3\text{CA}$  ( $0,09 \text{ mol dm}^{-3}$ ) při různých podmínkách (obr. 1). Při 20 °C připravené AuNP byly po vysušení prakticky ve vodě nedispergovatelné. AuNP připravené při 100 °C byly ve vodě dispergovatelné dobře. Pro zvýšení dispergovatelnosti ve vodě byly AuNP připravené při 20 °C modifikovány  $\text{Na}_2\text{MSA}$  ( $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  připravený neutralizací MSA hydroxidem sodným) po dobu 24 h při 300 rpm.

Po vysušení byly AuNP ( $\lambda_{\text{max}}$  kolem 520 nm) ve vodě dobře dispergovatelné. Pro purifikaci AuNP byly testovány dvě metody (vysrážení  $\text{NaCl}$  a ethanolem). Při vysolování roztokem  $\text{NaCl}$  ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) byly AuNP v poměru 1:1 míchány 2 h při 200 rpm a následně centrifugovány (4000 g, 20 min). Supernatant byl odebrán a AuNP byly vysušeny v sušárně (24 h při 60 °C). Průměrný výtěžek AuNP činil  $0,30 \text{ mg ml}^{-1}$  roztoku. Další metodou purifikace bylo srážení ethanolem (90 %) (poměr 1:1), kdy byl použit stejný postup a byly získány výtěžky AuNP  $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$  roztoku. Dispergovatelnost takto připravených částic byla vyšší. Pseudoperoxidasová aktivita AuNP byla srovnávána s aktivitou enzymu HRP ( $r = 0,9929$ ,  $s_r 2 \%$ ,  $LOD 10$ ,  $LOQ 32 \text{ mU ml}^{-1}$ ) (obr. 2). Byla testována pseudoperoxidasová aktivita nepurifikovaných částic (AuNPM) (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,025; 0,013; 0,008; 0,004 a 0,002  $\text{mg ml}^{-1}$ ) ( $r = 0,99312$ ,  $s_r 20,07 \%$ ,  $LOD 0,15$ ,  $LOQ 0,49 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a purifikovaných částic (AuNPX) (2000, 1000, 500, 250, 125, 60, 25, 13, 8, 4 a 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ( $r = 0,9979$ ,  $s_r 11,74 \%$ ,  $LOD 0,13$ ,  $LOQ 0,42 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Test byl proveden po 10 a 30 min. Získané výsledky ukázaly, že závislosti jsou lineární ( $r = 0,99$ ), rozdíl mezi časy nebyl statisticky významný ( $P = 0,26$ ) (obr. 3). Měření pseudoperoxidasové aktivity AuNP po 10 min poskytovalo reprodukovatelné výsledky. Z dat bylo



Obr. 2. Hodnocení peroxidasové aktivity za využití oxidace TMB. Změna barevné reakce TMB v závislosti na koncentraci HRP (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,006; 0,003  $\text{U ml}^{-1}$ ). Změna zbarvení TMB ( $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) byla odečtena při 620 nm v 10 min (A), ve 30 min (B). Zmenšené obrázky ukazují lineární úseky závislosti. Krabicový graf integrálů absorpčních signálů AuNPs v 10 a 30 min (C). Chybové úsečky jsou zobrazeny jako konfidenční intervaly (CI), analýza byla provedena minimálně s počtem opakování  $n = 3$ . Kontroly: pozitivní  $\text{TMB}_{\text{ox}}$  ( $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), negativní reakční pufr

zjištěno, že AuNP ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) vykazovaly aktivitu jako  $0,6 \text{ U ml}^{-1}$  HRP. Námi navržená metoda byla využita pro detekci AA. Typická závislost AA (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64,  $125 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) po 10 min byla lineární ( $r = 0,99785$ ,  $s_r$  9,1 %,  $LOD$   $13 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $LOQ$   $43 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (obr. 4). Jako srovnávací metoda pro detekci AA byla zvolena titrace DCF (korelace mezi metodami byla hodnocena Youden regresní analýzou, rozdíl párových hodnot byl nevýznamný (t-test  $P = 0,295$ ;  $r = 0,9979$ ;  $y = 10,572 - 13,43x$ ) (obr. 5). Získané výsledky stanovení AA byly uspokojivé. Navržená metoda byla dále ověřena na sérii náhodných vzorků AA ( $n = 40$ ). Výsledné koncentrace ( $0,1\text{--}1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) byly odečteny z kalibrační křivky,  $s_r$  byla do 5 %. Metoda byla využita pro určení koncentrace AA v léčivém přípravku. Koncentrace AA byla stanovena ( $0,100 \pm 0,003 \text{ mg}$ ) s dobrou shodou k množství deklarovanému výrobcem (do 5 %). Následně byla metoda využita pro hodnocení antioxidačních vlastností vybraných léčivých rostlin (materiáduška a šalvěj). U materiádušky (*Thymus serpyllum*) byla získána typická kinetická křivka (0–30 min) TMB vyjádřená rovnicí:  $y = 0,1001 + 0,0077x$ ,  $r = 0,9988$ ,  $A_m = 0,31$ ,  $k = 8,7 \text{ mAU min}^{-1}$ , a u šalvěje (*Salvia officinalis*) vyjádřená rovnicí:  $y = 0,1088 + 0,0049x$ ,  $r = 0,9997$ ,  $A_m = 0,24$ ,  $k = 8,4 \text{ mAU min}^{-1}$ .

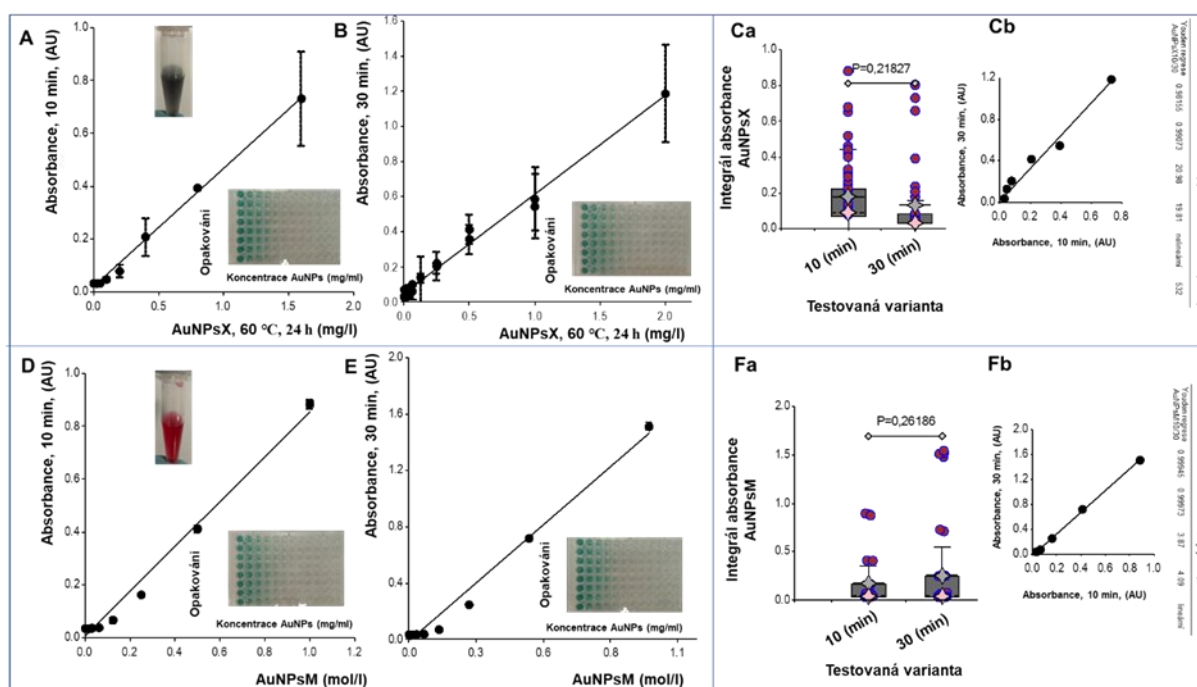
## Závěr

Chemickou syntézou byly připraveny AuNP za účelem hodnocení jejich pseudoperoxidasové aktivity. Pseudoperoxidasová aktivita byla potvrzena a aplikována pro analytické stanovení AA. Kromě toho byla metoda využita pro detekci AA v léčivém přípravku. Metoda byla testována při sledování antioxidační aktivity u vodných extraktů z materiádušky (*Thymus*) a šalvěje (*Salvia*).

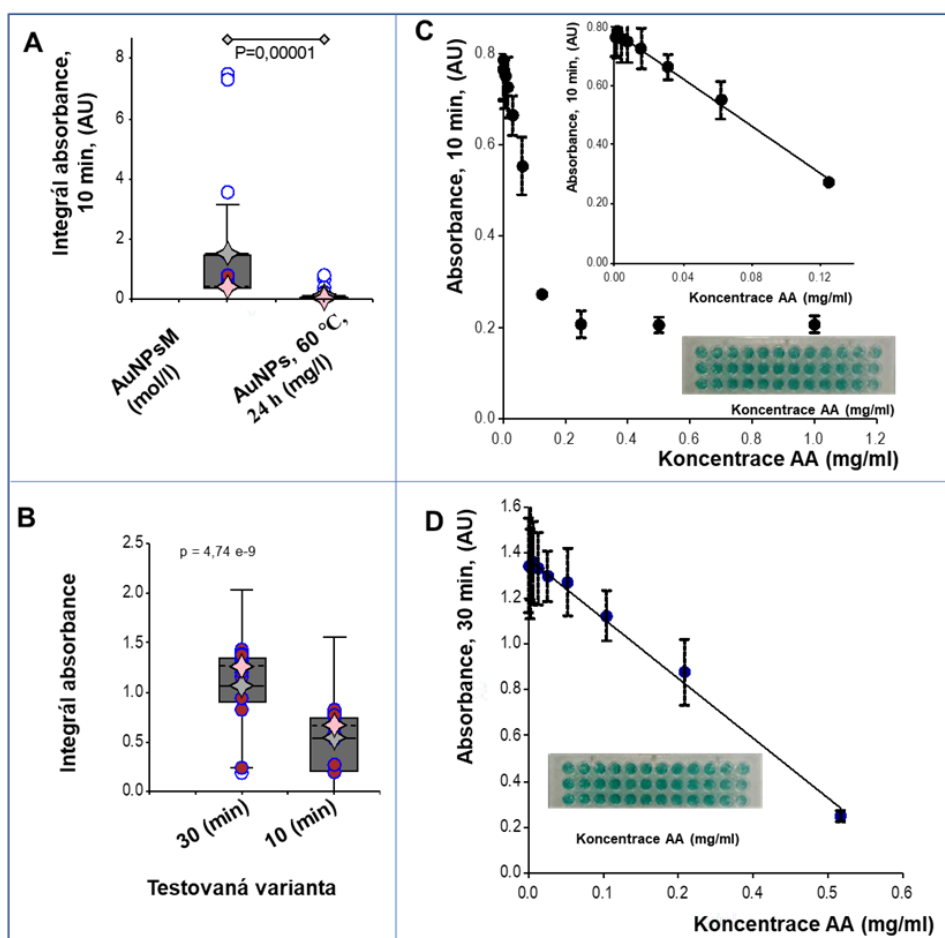
Experimentální práce byla podpořena projektem CALTC18002 a projektem Liga proti rakovině Praha (LPR\_273/2019). Speciální poděkování patří RNDr. Josefovi Růžičkovi za vývoj laboratorního informačního systému (Qinslab) a Anně Novotné z Centra léčivých rostlin MU za poskytnutí rostlinného materiálu.

## LITERATURA

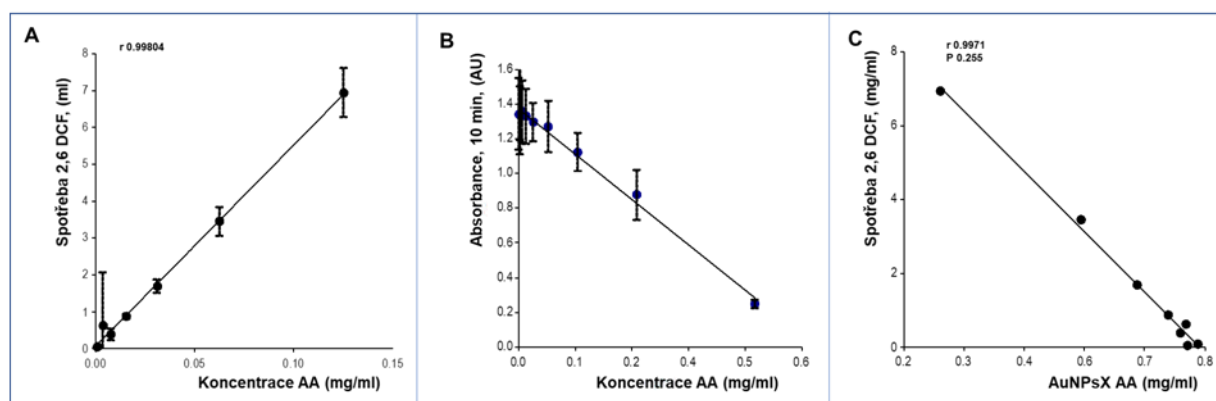
- Ji X., Song X., Li J., Bai Y., Yang W., Peng X.: J. Am. Chem. Soc. 129, 13939 (2007).
- De Souza C. D., Nogueira B. R., Rostelato M. E. C. M.: J. Alloys Comp. 798, 714 (2019).
- Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A.: J. Phys. Chem. B 110, 15700 (2006).



Obr. 3. Pseudoperoxidasová aktivita u AuNPsM a AuNPsX. Změny pseudoperoxidasové aktivity AuNPsX (přesrážených 90% EtOH a vysušených při  $60 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 24 h). Závislost aktivity AuNPsX (2000, 1000, 500, 250, 125, 60, 25, 13, 8, 4 a  $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) na oxidaci TMB ( $0,45 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) v 10 min (A) a 30 min (B). Krabicový graf integrálů absorpčních signálů AuNPsX v 10 a 30 min (Ca), regresní analýza podle Youdena (Cb). Závislost aktivity AuNPsM po jejich přímé syntéze (bez purifikace) na oxidaci TMB v 10 min (D) a 30 min (E). Krabicový graf integrálů absorpčních signálů AuNPsM v 10 a 30 min (Fa), regresní analýza podle Youdena (Fb). Chybové úsečky jsou zobrazeny jako konfidenční intervaly (CI), analýza byla provedena pro  $n = 3$



Obr. 4. Vývoj metody pro detekci AA s AuNPX. Porovnání integrálu absorbcí nepurifikovaných částic (AuNPM) a ethanolem purifikovaných částic (AuNPX) po 10 min v přítomnosti TMB (A). Krabicový graf integrálů absorbcí v 10 a 30 min pro detekci AA (B) Změna signálu TMB v přítomnosti AA (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 62, 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) po 10min reakci (ve vloženém obrázku je ukázána lineární část závislosti). (C), po 30min reakci (D). Chybové úsečky jsou zobrazeny jako konfidenční intervaly (CI), analýza byla provedena pro  $n = 3$



Obr. 5. Reprodukovanost a regresní stanovení askorbové kyseliny titrací a AuNPX. Závislost spotřeby DCF na koncentraci AA (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 62, 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Bod ekvivalence určen vizuálně. (A) Změna signálu TMB při reakci s AuNP, 30 min. Chybové úsečky jsou zobrazeny jako konfidenční intervaly (CI), analýza byla provedena pro  $n = 3$ . (B) Korelace titrační a fotometrické metody hodnocena Youden regresní analýzou (C)



4. Link S., El-Sayed M. A.: *J. Phys. Chem. B* 103, 8410 (1999).
5. Ishida T., Murayama T., Taketoshi A., Haruta M.: *Chem. Rev.* 120, 464 (2020).
6. Jana N. R., Gearheart L., Murphy C. J.: *Langmuir* 17, 6782 (2001).
7. Drozd M., Pietrzak M., Parzuchowski P. G., Malinowska E.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8505 (2016).
8. Shen J. W., Li Y. B., Gu H. S., Xia F., Zuo X. L.: *Chem. Rev.* 114, 7631 (2014).
9. Naito M., Yokoyama T., Hosokawa K., Nogi K.: *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier, Heidelberg 2018.
10. Lin M. H., Song P., Zhou G. B., Zuo X. L., Aldalbahi A., Lou X. D., Shi J. Y., Fan C. H.: *Nat. Protoc.* 11, 1244 (2016).
11. Niu L. M., Liu Y., Lian K. Q., Ma L., Kang W. J.: *Arab. J. Chem.* 11, 655 (2018).
12. Nirala N. R., Saxena P. S., Srivastava A.: *Spectr. Chim. Acta A* 190, 506 (2018).
13. Giljohann D. A., Mirkin C. A.: *Nature* 462, 461 (2009).
14. Li F. S., Weng J. K.: *Nat. Plants* 3, 7 (2017).
15. Lee K. X., Shameli K., Yew P. Y., Teow S.-Y., Jahangirian H., Moghaddam R. R., Webster T. J.: *Int. J. Nanomed.* 15, 275 (2020).
16. Liu Y., Song X., Cao F., Li F., Wang M., Yang Y., Liu M., Liu A., Xin H., Wang X.: *Int. J. Nanomed.* 15, 2315 (2020).
17. Jampaiah D., Reddy T. S., Kandjani A. E., Selvakannan P., Sabri Y. M., Coyle V. E., Shukla R., Bhargava S. K.: *J. Mater. Chem. B* 4, 3874 (2016).
18. Zhang B., Zhao M., Qi Y., Tian R., Carter B. B., Zou H., Zhang C., Wang C.: *Sci. Rep.* 9, 1 (2019).
19. Guan H. N., Han B. L., Gong D. Z., Song Y., Liu B., Zhang N.: *Spectrosc. Acta, Part A* 222, 9 (2019).
20. Xu S. Y., Dong X. J., Chen S. Q., Zhao Y. Y., Shan G. Y., Sun Y. C., Chen Y. W., Liu Y. C.: *Sens. Actuators, B* 281, 375 (2019).
21. Cui W. W., Wang Y. Y., Yang D. D., Du J. X.: *Microchim. Acta* 184, 4749 (2017).
22. Zhou Y. T., He W. W., Wamer W. G., Hu X. N., Wu X. C., Lo Y. M., Yin J. J.: *Nanoscale* 5, 1583 (2013).
23. Malashikhina N., Pavlov V.: *Biosens. Bioelectron.* 33, 241 (2012).
24. Babu T. G. S., Suneesh P. V., Ramachandran T., Nair B.: *Anal. Lett.* 43, 2809 (2010).
25. Sehnal K., Staňková M., Dočekalová M., Uhlířová D., Gargulák M., Tóthová Z., Ruttikay-Nedecký B., Kizek R.: *Czech Chem. Soc. Symp. Ser.* 17, 66 (2019).

**P. Musálek<sup>a,b,c</sup>, M. Všeticková<sup>b,c,d</sup>, Z. Tóthová<sup>b,c</sup>, M. Staňková<sup>b,c,d</sup>, D. Uhlířová<sup>b,c,d</sup>, D. Banáš<sup>b,c,e</sup>, K. Sehnal<sup>a,b,c,d</sup>, and R. Kizek<sup>a,b,c,d</sup>** (<sup>a</sup> Department of Human Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, <sup>b</sup> Department of Research and Development, Prevention Medicals, Studénka-Butovice, <sup>c</sup> CONEM Metallomics Nanomedicine Research Group, Brno, <sup>d</sup> Department of Viticulture and Enology, Faculty of Horticulture, Mendel University in Brno, Brno, <sup>e</sup> Department of Biochemistry, Masaryk University, Brno): **Colorimetric Determination of Antioxidants by Pseudoperoxidase Activity of Gold Nanoparticles**

It is generally known that nanomaterials show a whole spectrum of interesting physical and chemical properties. It was found out that gold nanoparticles (AuNPs) have an ability to catalyse decomposition of hydrogen peroxide to form water and oxygen molecules. This type of catalytic reaction can be practically used in bioanalytical methods, where enzymes can be replaced with nanoparticles. AuNPs were synthesised in a chemical way. If AuNPs are present in the reaction mixture, the hydrogen peroxide is decomposed and simultaneously tetramethylbenzidine (TMB) is oxidized. Typical dependence of the concentration of TMB<sub>ox</sub> on the concentration of AuNPs is linear ( $r = 0.9979$ ,  $RSD$  11.7 %,  $LOD$  0.1,  $LOQ$  0.4 mg ml<sup>-1</sup>). This method was used for the determination of ascorbic acid (AA). The dependence of signal TMB on concentration of AA was linear ( $r = 0.9979$ ,  $RSD$  9.1 %,  $LOD$  13 µg ml<sup>-1</sup>,  $LOQ$  43 µg ml<sup>-1</sup>). This method was also used for the determination of AA in medicinal products. The concentration of AA (0.100 ± 0.003 mg) was calculated in good compliance with the amount declared by the producer (maximum difference to 5 %). Subsequently, this methodology was used for the determination of antioxidant abilities of sage and thyme plants. The kinetic curve for TMB in time 0–30 minutes for the plant extract from the thyme (*Thymus serpyllum*) is expressed by the equation  $y = 0.1001 + 0.0077x$ ,  $r = 0.9988$ ,  $A_m = 0.31$ ,  $k = 8.7$  mAU min<sup>-1</sup> and for the plant extract from the sage (*Salvia officinalis*) the equation is  $y = 0.1088 + 0.0049x$ ,  $r = 0.9997$ ,  $A_m = 0.24$ ,  $k = 8.4$  mAU min<sup>-1</sup>. The paper shows that AuNPs can be used for pseudoenzymatic determination of ascorbic acid and as a new method for evaluation of the antioxidant activity of biological extracts.

**Keywords:** gold nanoparticles, ascorbic acid, phenolic compounds, biophysical characterization, pseudoenzymatic activity

#### Acknowledgements

Experimental work was supported by CA LTC18002 project and "Liga proti rakovině" project (LPR\_273/2019). Special thanks belongs to RNDr. Josef Růžička for the development of laboratory information system (Qinslab) and Anna Novotná from the Medicinal Herbs Centre MU for the delivery of plant material.

## VYUŽITÍ INADEQUATE A ADEQUATE SPEKTER NMR KE STANOVENÍ UHLÍKOVÉ KOSTRY MOLEKUL

TEREZA NAVRÁTILOVÁ a BOHUMIL DOLENSKÝ

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

Klíčová slova: uhlíková kostra,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie, INADEQUATE, ADEQUATE

### Úvod

Jednoznačná identifikace uhlíkové kostry je klíčovým krokem strukturální analýzy organických molekul<sup>1</sup>. K jejímu určení lze využít spektroskopii NMR, kde uhlíkovou kostru charakterizují chemické posuny ( $\delta$ )  $^{13}\text{C}$  jader a interakční konstanty proton-uhlík ( $^nJ_{\text{CH}}$ ) a uhlík-uhlík ( $^nJ_{\text{CC}}$ ) přes jednu či více vazeb ( $n \geq 1$ ). Interakční konstanty  $^1J_{\text{CC}}$  jsou velmi silným nástrojem analýzy uhlíkové kostry molekul, jelikož umožňují přímé studium vazeb  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Experimenty NMR, pomocí nichž lze tyto interakce studovat, jsou však obecně málo citlivé, jelikož přirozené zastoupení molekul obsahujících dva  $^{13}\text{C}$  isotopy<sup>2</sup> (tzv.  $^{13}\text{C}_2$  isotopolog látky<sup>1</sup>) ve vzorku je pouze ~0,01 % (tj. cca jedna molekula z 10 000)<sup>2</sup>.

Mezi experimenty umožňující studium  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  interakcí patří INADEQUATE a ADEQUATE. Experiment INADEQUATE (z angl. Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment) pro detekci využívá jader  $^{13}\text{C}$ . Jeho základem je tzv. dvoukvantová (DQ) filtrace umožňující potlačení dominantních signálů  $^{13}\text{C}_1$  isotopologu a zvýraznění signálů  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu látky<sup>2</sup>. Ve spektru 1D INADEQUATE se signály  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu látky zobrazují jako antifázové dublety kvůli  $^nJ_{\text{CC}}$  interakci příslušných  $^{13}\text{C}$  jader. 2D INADEQUATE poskytuje dvourozměrné spektrum krospektrů ve formě antifázových dubletů, které má na svislé ose (f1) sumu chemických posunů interagujících  $^{13}\text{C}$  jader (tzv. DQ osa) a na horizontální ose (f2) chemické posuny jader z  $^{13}\text{C}$  NMR spektra<sup>3</sup>. Experiment ADEQUATE (z angl. Adequate Double Quantum Transfer Experiment) koreluje dva interagující uhlíky  $^{13}\text{C}$  s protonem přímo vázaným na jeden z těchto uhlíků. Jádra  $^{13}\text{C}$  jsou pak detegována prostřednictvím jader  $^1\text{H}$ , což řádově zvyšuje citlivost detekce<sup>2</sup>. 2D DQ ADEQUATE poskytuje dvourozměrné spektrum s DQ osou na ose f1 a chemickými posuny jader z  $^1\text{H}$  NMR spektra na ose f2 (cit.<sup>3</sup>).

Cílem této práce bylo připravit látku ethyl-2-(2-(di-(1*H*-pyrrol-2-yl)-methyl)-fenoxy)acetát, provést úplné přiřazení jejích  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  signálů NMR a s pomocí

INADEQUATE a ADEQUATE spekter NMR charakterizovat uhlíkovou kostru této molekuly.

### Experimentální část

NMR měření probíhala na přístroji JEOL JNM-ECZR (Jeol Resonance) s pracovní frekvencí 500 MHz (11,75 T) a multinukleární sondou 5 mm FG/RO Autotune Probe, ovládaným softwarem Delta (verze 5.1.2). Spektra byla zpracována v programu MestReNova (verze 14.1.0). V  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR byl pro referenci použit zbytkový signál rozpouštědla. Vzorky byly měřeny při teplotě 27,0 °C.

Studovaná látka, tj. ethyl-2-(2-(di(1*H*-pyrrol-2-yl)-methyl)fenoxy)acetát (dále jen DP), byla připravena dvoukrokovou syntézou, kterou shrnuje schéma 1. Východní látky pro syntézu, tj. 2-hydroxybenzaldehyd ( $\leq 98\%$ ), ethyl-bromacetát ( $\leq 98\%$ ) a 1*H*-pyrrol ( $\leq 98\%$ ), byly zakoupeny od firmy Merck a použity bez dalších úprav.

Prvním krokem byla příprava ethyl-2-(2-formylfenoxy)acetátu kondenzací 2-hydroxybenzaldehydu (7,21 g, 59 mmol) a ethyl-bromacetátu (10,00 g, 60 mmol) v acetonu (60 ml) s přidávkou  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (12,31 g). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 h a následně odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl zpracován extrakcí mezi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . K organické frakci bylo přidáno sušidlo (bezvodý  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Suspenze byla filtrována přes vatku a roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Celkem bylo získáno 12,00 g (58 mmol) produktu ve formě žluté viskózní kapaliny, což činí výtěžek reakce 98 %. TLC analýza (toluen:ethyl-acetát v poměru 5:2 (v/v)) potvrdila vznik jediného majoritního produktu. Vzorek pro NMR analýzu byl připraven odpařením 1 ml roztoku surového produktu, následným rozpuštěním v 600  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$  a převedením do NMR kvety. Produkt byl identifikován a plně charakterizován pomocí naměřených spekter NMR.

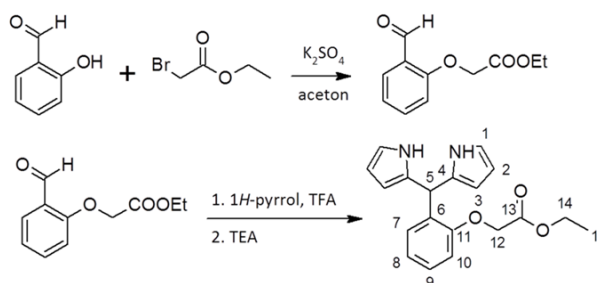


Schéma 1. Příprava DP. Číslování uhlíkové kostry DP v textu odpovídá schématu



Druhým krokem byla reakce ethyl-2-(2-formyl-fenoxy)acetátu (5,01 g, 24 mmol) a 1*H*-pyrrolu (8,4 ml, 120 mmol). Po 5 min míchání byla k roztoku při laboratorní teplotě po kapkách přidána kyselina trifluoroctová (TFA; 0,18 ml). Za dalších 20 min byla reakce ukončena přidávkem triethylaminu (TEA; 0,5 ml) a odpařením roztoku na rotační vakuové odparce. Celkem bylo získáno 9,26 g surového produktu hnědé barvy. TLC analýza (petrolether:ethyl-acetát v poměru 3:1 (v/v) + 2 % TEA) indikovala vznik dvou majoritních produktů reakce. Z části surového produktu ( $m = 3,42$  g) byla provedena sloupcová chromatografie (mobilní fáze stejná jako u TLC). Frakce DP byla odpařena na vakuové odparce. Bylo izolováno 1,26 g DP (3,88 mmol) ve formě žluté viskózní kapaliny, což činí celkový výtěžek reakce 37 %.

Molekula DP byla charakterizována NMR spektroskopii. Pro NMR analýzu uhlíkové kostry byly připraveny 3 vzorky. Vzorek č. 1 o  $\rho = 62$  g l<sup>-1</sup> (40 mg DP, 650  $\mu$ l DMSO-*d*<sub>6</sub>) byl využit pro úplné přiřazení <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a <sup>15</sup>N NMR signálů molekuly pomocí spekter <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, LR COSY a NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC a HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC, 1D NOE, TOCSY, 1D a 2D INADEQUATE a ADEQUATE. Pro měření lépe rozlišených INADEQUATE spekter byl připraven vzorek č. 2 o  $\rho_{DP} = 217$  g l<sup>-1</sup> (108 mg DP, 500  $\mu$ l DMSO-*d*<sub>6</sub>). Kvůli překryvu signálů H8 a H10 v DMSO-*d*<sub>6</sub> byl připraven vzorek č. 3 v benzen-*d*<sub>6</sub> o  $\rho = 25$  g l<sup>-1</sup> (15 mg DP, 600  $\mu$ l C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-*d*<sub>6</sub>).

## Výsledky a diskuse

Úplné přiřazení <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a <sup>15</sup>N NMR signálů DP

Vzorek č. 1 ( $\rho = 62$  g l<sup>-1</sup>): <sup>1</sup>H NMR (500,16 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10,45 (2H, t,  $J = 1,65$  Hz, NH), 7,17 (1H, ddd,  $J = 8,25; 7,32; 1,77$  Hz, H9), 7,09 (1H, ddd,  $J = 7,82; 1,77; 0,43$  Hz, H7), 6,94 – 6,89 (2H, m, H8, H10), 6,60 (2H, td,  $J = 2,65; 1,65$  Hz, H1), 5,90 (2H, dt,  $J = 3,40; 2,65$  Hz, H2), 5,84 (1H, d,  $J = 0,75$  Hz, H5), 5,64 (2H, dt,  $J = 3,40; 1,65; 0,75$  Hz, H3), 4,72 (2H, s, H12), 4,20 (2H,

q,  $J = 7,12$  Hz, H14), 1,24 (3H, t,  $J = 7,12$  Hz, H15) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125,77 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 168,99 (C13); 154,73 (C11); 132,70 (C4); 132,38 (C6); 129,20 (C7); 127,29 (C9); 121,18 (C8); 116,66 (C1); 112,63 (C10); 106,67 (C2); 106,18 (C3); 65,71 (C12); 60,67 (C14); 36,28 (C5); 14,02 (C15) ppm. <sup>15</sup>N NMR (50,68 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 151,70 ppm. Parametry vzorku č. 2 se od vzorku č. 1 nepatrně lišily. V případě měření DP v deuterovaném benzenu se podařilo odlišit signály vodíků H8 a H10.

## Experimenty INADEQUATE

Parametry měření a výsledky získané pomocí INADEQUATE spekter shrnuje tab. I. Experimenty byly optimalizovány nastavením  $J_{CC}$  konstant.

Pomocí 1D spekter vzorku č. 2 se podařilo odečíst hodnoty  $^1J_{CC}$  těch párů uhlíků, které mají pouze jeden sousední atom uhlíku (viz obr. 1, zeleně C14-C15, modře C12-C13). Interakce párů sousedících se dvěma uhlíky nebylo možné z 1D spektra jednoznačně určit. K jejich určení byla využita 2D spektra, z nichž se podařilo odečíst hodnoty všech interakčních konstant  $^1J_{CC}$  s výjimkou interakce uhlíků 3-2, která nebyla určena z důvodu blízkého chemického posunu uhlíků v DQ ose (viz obr. 1).

Ačkoliv INADEQUATE spektra poskytují přímé informace o  $^1J_{CC}$  interakcích, tato spektra se podařilo v dostatečném rozlišení naměřit pouze u nejkonzentrovanejšího vzorku. Za účelem získání obdobných výsledků při nižších koncentracích a kratších dobách měření byla měřena spektra ADEQUATE.

## Experimenty ADEQUATE

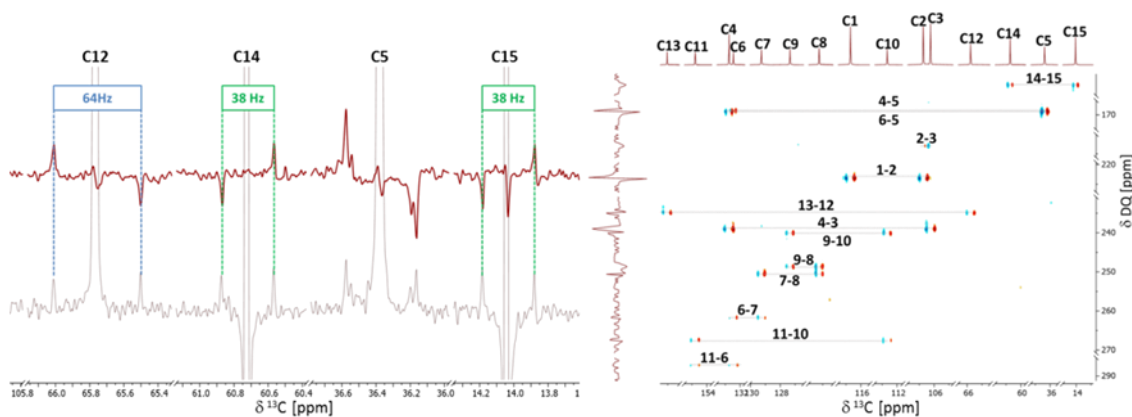
Parametry měření a výsledky získané pomocí ADEQUATE spekter shrnuje tab. II. Pomocí spekter vzorku č. 2 se podařilo přiřadit signály C8 a C10, jejichž příslušné protony byly v <sup>1</sup>H NMR překryty. U vzorku č. 3 se podařilo dosáhnout rozlišení signálů C6-C5 a C5-C4 (viz tab. II, červený rám) s velmi podobnými chemickými posuny v DQ ose, které byly při měření v DMSO-*d*<sub>6</sub> překryty.

Tabulka I

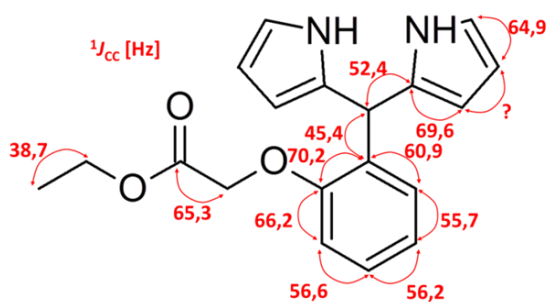
Interakční konstanty  $^1J_{CC}$  [Hz] odečtené z 1D a 2D INADEQUATE spekter

Experiment/číslo vzorku/ $J_{CC}$ [Hz]/ počet skenů/ doba měření [h_min]	Interakce C-C přes jednu vazbu												
	15-14	13-12	11-10	10-9	9-8	8-7	7-6	6-11	6-5	5-4	4-3	3-2	2-1
1D/1/40/4960/14_55	39	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
1D/2/65/12384/13_44	38	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
2D/1/50/13824/19_54	38	-	-	55	56	56	-	-	46*	52*	71	*	65
2D/2/05/16320/29_52	39	64	67	57	56	56	-	-	43*	51*	-	*	66
2D/2/65/9792/17_43	39	65	66	57	56	56	61	70	45*	52*	70	*	65

\* překryv píků (6-5 a 5-4; 3-2), modře označená spektra viz obr. 1.



Obr. 1. Nalevo:  $^{13}\text{C}$  NMR (dole) a 1D INADEQUATE (nahore) spektra vzorku č. 2 v oblasti uhlíků C15-C12. Napravo: 2D INADEQUATE spektrum s přiřazením naměřených signálů



Obr. 2. Molekula DP s přiřazením naměřených interakčních konstant  $^1J_{\text{CC}}$  [Hz]. Interakci C2-C3 se nepodařilo odečíst, jelikož uhlíky C2-C3 tvoří silný AB systém, tj. rozdíl chemických posunů těchto uhlíků je srovnatelný s velikostí jejich interakční konstanty  $^1J_{\text{CC}}(\text{C2-C3})$

Žádné z naměřených spekter neposkytovalo veškeré očekávané interakce (viz tab. II). Spektra proto byla optimalizována pomocí  $^nJ_{\text{CC}}$  konstant. Při nastavení  $J_{\text{CC}} = 65$  Hz se podařilo naměřit všechny interakce přes jednu vazbu s výjimkou interakce C2-C3 (H2, H3), zatímco spektrum měřené při  $J_{\text{CC}} = 12$  Hz poskytovalo chybějící interakce (viz obr. 3, červený rám), navíc pak i interakce uhlíků přes dvě vazby (viz obr. 3).

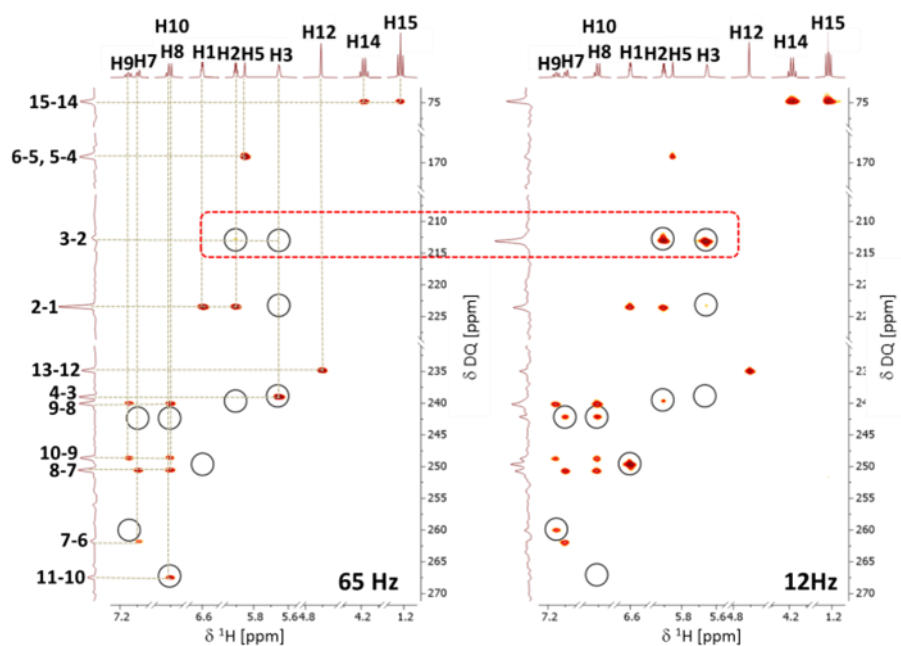
Výhody experimentu ADEQUATE spočívají především v potřebě menších množství vzorku a kratších časů pro analýzy. Zatímco ADEQUATE spektra byla s dostatečným rozlišením naměřena v řádu hodin již při 40mg množství DP, experiment INADEQUATE vyžadoval desítky hodin měření a i při vyšší koncentraci DP dosahoval pouze nízké citlivosti.

Tabulka II

Souhrn interakcí  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  pozorovaných ve spektrech ADEQUATE

Experiment: č. vzorku/ $^1J_{\text{CC}}$ [Hz]/ $^1J_{\text{CH}}$ [Hz]/ počet skenů/ doba měření [h_min]	Interakce C-C přes jednu vazbu (příslušný proton)																	
	15-14	15-14	13-12	11-10	10-9	10-9	9-8	9-8	8-7	8-7	7-6	6-5	5-4	4-3	3-2	3-2	2-1	2-1
1/146/40/16384/15_40	●	●	●	-	●	●	●	●	●	●	●	*	*	○	-	-	○	○
1/146/65/16384/15_34	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	*	*	●	-	○	●	●
1/175/09/16512/16_34	●	○	●	○	○	-	-	●	-	-	-	*	*	○	●	●	●	●
2/175/09/2352/1_27	●	●	●	○	●	●	-	-	-	-	●	*	*	○	●	●	●	●
2/175/12/2352/2_21	●	●	-	●	●	●	●	●	●	●	●	*	*	-	●	●	●	●
2/175/65/2352/2_36	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	*	*	●	-	○	●	●
2/175/65/512/0_31	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	*	*	●	-	○	●	●
3/175/40/7680/7_21	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●	●	-	-

Pík: ● vysoké intenzity, ○ nízké intenzity, - nepřítomen, \* překryv (6-5 a 5-4)



Obr. 3. Porovnání 2D DQ ADEQUATE spekter vzorku č. 2 měřených při  $J_{CC} = 65$  Hz a  $J_{CC} = 12$  Hz (viz tab. II zeleně). Kroužkovány jsou interakce ovlivněné nastavením  $J_{CC}$

## Závěr

U připraveného ethyl-2-(2-(di(1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)fenoxy)acetátu bylo provedeno úplné přiřazení  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  signálů NMR. S využitím optimalizovaných experimentů INADEQUATE a ADEQUATE byly určeny všechny interakční konstanty  $^1J_{CC}$  této molekuly s výjimkou interakce C2-C3, jelikož tyto uhlíky tvoří silný AB systém.

Autoři děkují projektu FRINGE (No. 828922) za finanční podporu výzkumu.

## LITERATURA

- Buddrus J., Bauer H.: *Int. Ed. Engl.* 26, 625 (1987).
- Claridge T. D. W., v knize: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (Claridge T. D. W., ed.), kap. 6, str. 203. Elsevier, Boston 2016.
- Berger S., Braun S.: *200 and More NMR Experiments: A Practical Course*, 3. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2004.

**T. Navrátilová and B. Dolenský** (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Usage of INADEQUATE and ADEQUATE NMR Spectra for Determining the Carbon Skeleton**

A key step in determining the structure of the molecules is an identification of their carbon skeleton. In this

work, the possibility of NMR experiments studying  $^{13}\text{C}_2$  isotopological substance usage for carbon skeleton evaluation is examined. In general, these experiments show very low sensitivity, because the natural distribution of the  $^{13}\text{C}_2$  isotopologue in the sample is only about 0.01 %. A generally known experiment suitable for studying  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  interactions is INADEQUATE, which uses  $^{13}\text{C}$  nuclei for the detection. Despite the high sensitivity of contemporary NMR spectrometers, this experiment requires tens of milligrams of the sample for measuring, which is a problem in case of limited sample quantities. To study  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  interactions at milligram amounts of the sample, one can use ADEQUATE experiment that uses  $^1\text{H}$  nuclei for detection. The aim of this work was to present the advantages and disadvantages of using both the INADEQUATE and ADEQUATE experiments in the study of a molecule ethyl-2-(2-(di(1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)phenoxy)acetate, which was prepared as an intermediate in the development of solvatochromic compound. For this substance, all  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR signals were first fully assigned. Subsequently, the carbon skeleton of this molecule was studied by 1D and 2D INADEQUATE, and 2D DQ 1,1- and 1,*n*-ADEQUATE spectra of NMR. Using the optimized INADEQUATE and ADEQUATE experiments, all  $^1J_{CC}$  coupling constants were determined, except of  $^1J_{CC}(\text{C2-C3})$  coupling constant, because these carbons form a strong AB system.

Keywords: carbon skeleton,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, INADEQUATE, ADEQUATE



## OBSAH

<i>K. Dobšíková, D. Spálovská, M. Kuchař, V. Setnička</i>	Studium struktury methamfetaminu v roztoku metodami molekulové spektroskopie	5
<i>I. Kopal, M. Plicka, M. Švecová, M. Dendisová</i>	Studium vlivu experimentálních podmínek na SERS-aktivitu měděných nanočástic	12
<i>A. Koryťáková, M. Švecová, O. Volochanskyi, V. Prokopec</i>	SERS spektra berberinu: Vliv excitační vlnové délky a plasmonického substrátu	16
<i>J. Máchalová, T. Křížek</i>	Stresové testování stability canagliflozinu	20
<i>P. Musálek, M. Všeticková, Z. Tóthová, M. Staňková, D. Uhlířová, D. Banáš, K. Sehnal, R. Kizek</i>	Kolorimetrické stanovení antioxidantů pomocí pseudoperoxidasové aktivity zlatých nanočástic	24
<i>T. Navrátilová, B. Dolenský</i>	Využití INADEQUATE a ADEQUATE spekter NMR ke stanovení uhlíkové kostry molekul	30

## AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Banáš D. 24

Dendisová M. 12  
Dobšíková K. 5  
Dolenský B. 30

Kizek R. 24  
Kopal I. 12  
Koryťáková A. 16  
Křížek T. 20  
Kuchař M. 5

Máchalová J. 20  
Musálek P. 24

Navrátilová T. 30

Plicka M. 12  
Prokopec V. 16

Sehnal K. 24  
Setnička V. 5  
Spálovská D. 5  
Staňková M. 24

Švecová M. 12  
Švecová M. 16

Tóthová Z. 24

Uhlířová D. 24

Volochanskyi O. 16  
Všetičková M. 24

**CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 18 (2020), čís./no. 1 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) •** evidenční číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: 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. Drašar • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wolkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2020 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 22.5.2020.