

Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2021“

10. a 11. února 2021

VŠCHT Praha



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

24. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2021“

Ani pandemie nezabránila nadšencům z Odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické uspořádat již 24. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie a již 7. ročník, který nese jméno profesora Karla Štulíka, vynikajícího analytického chemika a vysokoškolského učitele. V letošním roce tato soutěž proběhla vzhledem k pandemickým opatřením v hybridní formě ve dnech 10. a 11. 2. 2021 na Ústavu analytické chemie FCHI VŠCHT v Praze a díky vynikající práci organizačního výboru pracujícího ve složení prof. Ing. Oto Mestek, CSc., Ing. Martin Člupěk, Ph.D., Ing. Antonín Kaňa, Ph.D. a doc. Ing. et RNDr. Pavel Řezanka, Ph.D. proběhla i letos tato soutěž v příjemné a tvůrčí atmosféře. Ani v letošním roce neměla lehkou práci hodnotící komise pracující ve složení prof. Ing. Oto Mestek, CSc. (VŠCHT Praha, FCHI – předseda komise), prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D. (Mendelova univerzita v Brně), prof. RNDr. Jiří Berek, CSc. (Univerzita Karlova, Praha), prof. Dr. Ing. Richard Koplík (VŠCHT Praha, FPBT), prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D. (Masarykova univerzita, Brno), Ing. Radmila Řápková (Chemické listy), doc. RNDr. Dr. David Sýkora (VŠCHT Praha, FCHI) a doc. Ing. Lubomír Švorc, PhD. (Slovenská technická univerzita v Bratislave). Soutěže se v roce 2021 zúčastnilo celkem 30 studentů z pěti českých vysokých škol uvedených na www stránkách soutěže <https://uanlch.vscht.cz/studium/stulik21>. A zde jsou výsledky této dnes již tradiční a respektované studentské soutěže (kurzivou je uveden název oceněné práce).

1. místo



Bc. Radka Bušovská
(Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova)
Metabolomika těkavých látek lidského pachu metodou GC x GC

2. místo



Bc. Anna Loučková (Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze)
Charakterizace biologicky aktivních látek v řepiku lékařském

3. místo



Bc. Zuzana Husáková
(Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita)
Inhalace nanočástic: kde a v jaké formě se ukládají v mozku?

Zvláštní cenu poroty získali (abecedně)



Bc. Polina Bainová
(Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze)
Plasmon-aktivní, COF-funkcionalizované optické vlákno pro detekce CO₂ v organických rozpouštědlech



Bc. Dominika Bezdeková
(Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita)
MALDI MS zobrazování izomerů lipidů pomocí off-line ozonizace



Bc. Eliška Birgusová
(Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně)
Elektrochemický biosenzor pro detekci metylace DNA

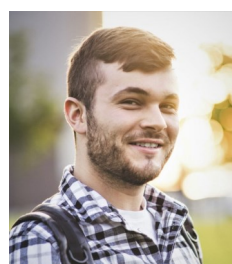


Kristína Štafurová
(Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova)
Vývoj analytických metod pro stanovení environmentálních polutantů pomocí stříbrné amalgámové elektrody obnovitelné mechanismem klikacího pera



Adam Reguli
(Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova)
UHPLC-MS/MS analýza ICRF-193, nového analógu dexrazoxanu

Zvláštní cenu sponzora – firmy Metrohm (abecedně):



Bc. Ondřej Mráček
(Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova)
Voltametrické stanovení metronidazolu pomocí stříbrné pevné pracovní elektrody



Bc. Andrea Špačková
(Fakulta chemické a potravinářské technologie, Slovenská technická univerzita v Bratislave)
Selektivní extrakce kumarinů z kosmetických přípravků - výběr typu adsorbentu a extračního postupu



Bc. Andrea Pečová
(Fakulta chemické a potravinářské technologie, Slovenská technická univerzita v Bratislave)
Sledování interakce DNA s vybranými nanočásticemi v prostředí matrice potu pomocí elektrochemického senzora

Zvláštní cenu poroty pro studenty bakalářského studia získali (abecedně):



Lenka Filipiaková
(Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze)
Detekce myricetinu pomocí pokročilých technik vibrační spektroskopie

Zvláštní cenu sponzora - firmy Nicolet CZ:



Bc. Ivan Kopal
(Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze)
Ex-situ analýza produktu fotochemické reakce 4-aminobenzethiolu na povrchích plasmonických substrátů

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. Mám opravdu radost, že Covid nepotlačil tvůrčího ducha studentů ani pracovišť, která je do této soutěže vyslala. Můj dík pochopitelně patří i všem členům poroty za obětavou a nezištnou práci ku prospěchu mladých analytických chemiků a Ing. Radmile Řápkové, technické redaktorce časopisu Chemické listy, a prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., vedoucímu redaktorovi časopisu Chemické listy za přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Czech Chemical Society Symposium Series (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného letošnímu ročníku této soutěže, který dokázal, jak dobře se řada pracovišť dokázala vyrovnat se záladnostmi pandemie. A jistě budou všichni analytičtí chemici i ostatní příznivci analytické chemie souhlasit s mým vřelým poděkováním všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga si dále dovolujeme otisknout, za jejich podporu, bez které by tato soutěž nikdy neproběhla, a která umožňuje přípravu budoucí generace analytických chemiků. A rád bych vyslovil přání, aby si význam analytické chemie pro celou naši společnost uvedomili i Ti, co ho ne zcela doceňují. Atypická následující fotografie komise bude připomínkou, jak se naše Odborná skupina analytické chemie dokázala vyrovnat se složitou pandemickou situací.



A na závěr bych rád oznámil, že – pokud tomu nezábrání viry či jiná vyšší moc – proběhne v příštím roce tato soutěž 9. a 10. února 2022 na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně.

Jiří Barek
předseda Odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické

Sponzoři a partneři soutěže O cenu Karla Štulíka 2021



VÝVOJ *IN VITRO* METODY PRO TRANSKORNEÁLNÍ PŘENOS KANABINOIDŮ

DENISA ADAMCOVÁ^a, MARTIN KUCHARŮ^a
a ADÉLA JENIŠTOVÁ^b

^a Ústav chemie přírodních látek, ^b Ústav fyzikální chemie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6 – Dejvice
adamcovd@vscht.cz

Klíčová slova: fytoKANABINOIDY, KANABIDIOL, ROHOVKA,
TRANSKORNEÁLNÍ PŘENOS, INFRACERVENÁ SPEKTROSKOPIE

Úvod

Přírodní kanabinoidy (fytoKANABINOIDY) jsou biologicky aktivní látky rostlin rodu konopí (*Cannabis L.*), které tvoří skupinu přibližně 66 dosud popsáných látek¹. V důsledku působení některých fytoKANABINOIDŮ na lidskou psychiku lze považovat konopí za nejkontroverznější rostlinu v historii lidstva. Podle poslední studie Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) se konopí nachází na první příčce seznamu zneužívaných nelegálních drog v Evropě².

Kanabinoidy v lidském těle působí skrze endokanabinoidní systém, který se v posledních desetiletích jeví jako možný potenciální terapeutický cíl při léčbě závažných onemocnění³.

V rámci oftalmologie by mohly kanabinoidy představovat velmi účinný způsob léčby zeleného zákalu (*Glaucoma*). Podle světové zdravotnické organizace (WHO) je glaukom druhou nejčastější příčinou nevratného poškození zraku na celém světě, jež může vést až k celkové slepotě⁴. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, mezi jehož rizikovými faktory je i zvýšení nitroočního tlaku (intraocular pressure, IOP) způsobující poškození gangliových buněk na sítnici⁵.

V rámci studie kanabinoidů bylo zjištěno, že uživatelé konopí mají nižší IOP, což vedlo k myšlence použít kanabinoidy jako potenciální lék při léčbě glaukomu. Při orálním podávání syntetického Δ^9 -tetrahydrokanabinolu bylo docíleno snížení IOP u sledovaných pacientů. V dalších studiích navíc kanabinoidy vykazovaly také neuroprotektivní účinek zabráňující smrti gangliových buněk sítnice³.

Experimentální část

Příprava rohovek

Tepelně neošetřené prasečí oční bulvy byly odebrány na Jatkách Český Brod a.s. Rohovky byly izolovány do

2–3 hodin po enukleaci. Preparační postup rohovek byl konzultován ve spolupráci s Oční tkáňovou bankou Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Poškozené rohovky či rohovky s viditelnou oční vadou byly vyřazeny. Izolované rohovky, které nebyly zpracovány hned po izolaci, byly uskladněny v médiu Eusol-C (Alchimia, Itálie) a uloženy do chladu (4 °C).

Transkorneální přenos

Pro metodu *in vitro* transkorneálního přenosu byly použity statické Franzovy difuzní cely. Receptorovou tekutinou byl sterilní zavlažovací roztok BSS[®] (Alcon Laboratories, USA). Tři různé emulze s označením POT_1, POT_10 a LNC-IPM-PS_1, obsahující vždy 2,5 hm.% kanabidiolu (CBD), byly dodány společností EcoFuel Laboratories s.r.o. Emulze se navzájem od sebe lišily především použitými posilovači transkorneálního přenosu, jejichž vliv na strukturu rohovky byl studován. CBD v této práci sloužil pouze jako modelový kanabinoid. Na rohovku bylo nanášeno vždy 100 mg dané emulze. Pro každou emulzi bylo provedeno 12 transkorneálních experimentů trvajících 24 h. Cely byly po celou dobu temperovány na teplotu simulující oční prostředí (32–34 °C).

Měření infračervených spekter rohovky

Pro určení strukturálních změn v rohovce, způsobených vlivem aplikované emulze, byl použit infračervený (IR) spektrometr s Fourierovou transformací s technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR) Nicolet iS50 FT-IR (ThermoFisher Scientific, USA) vybavený diamantovým krystalem. IR spektra byla měřena s rozlišením 2 cm⁻¹ při počtu 256 skenů na jedno spektrum. Každá rohovka (ošetřená i neošetřená) byla změřena 5× na horní a 5× na spodní straně. Spektra byla kompenzována na CO₂ a vzdušnou vlhkost. Pro potlačení vlivu strukturálních rozdílů byla podle typu ošetření spočtena průměrná spektra (a hodnota směrodatné odchylky).

Stanovení receptorové tekutiny

Ke stanovení CBD v receptorové tekutině byla využita metoda kapalinové chromatografie s ultrafialovou a tandemovou hmotnostní spektrometrickou detekcí (LC-UV/MS)⁶.

Výsledky a diskuse

Nejprve bylo změřeno pět spekter z horní i spodní strany neošetřených rohovek. Pro vyhodnocení spekter bylo nutné odečíst spektrální pásy vody, aby bylo možné

určit pásy náležící látkám v rohovce (obr. 1).

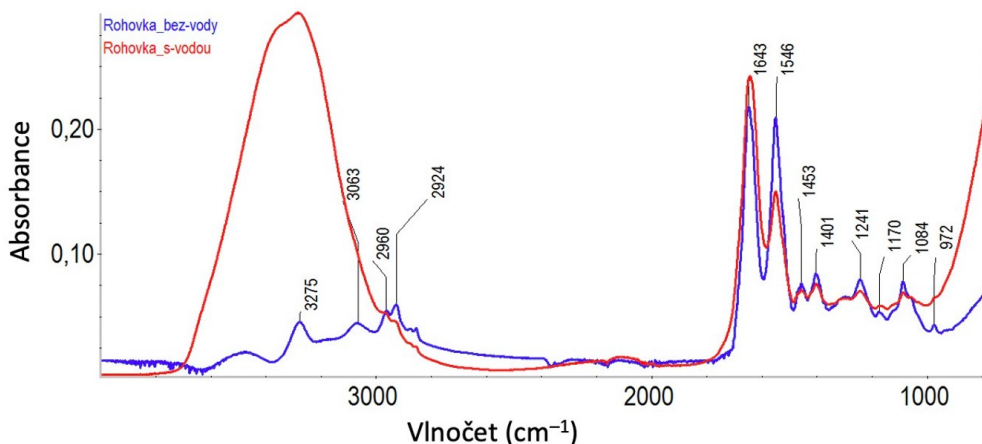
Ve spektrech se projeví pásy náležící alifatickým řetězcům (nasyceným i nenasyceným), amidům a esterům, což korespondovalo s chemickým složením rohovky. Při porovnání horních a spodních stran rohovky bylo možné pozorovat značné spektrální rozdíly vycházející z rozdílné distribuce chemických látek ve vrstvách rohovky (obr. 2). Vyšší intenzita pásů u spodní strany rohovky je pravděpodobně zapříčiněna lepší přilnavostí ke krystalu, jež je způsobena odlišnou strukturou vrstvy.

Pro určení vlivu jednotlivých emulzí na rohovku bylo nutné využít vícerozměrnou statistickou metodu, konkrétně analýzu hlavních komponent (principal component analysis, PCA). Metoda byla použita na dvou intervalech obsahujících pouze charakteristické pásy náležící rohovce, případně emulzím, kdy první interval byl v rozmezí 3370–2860 cm^{-1} a druhý interval byl v rozmezí 1760–900 cm^{-1} . Jako srovnávací vzorek (blank) byla použita neošet-

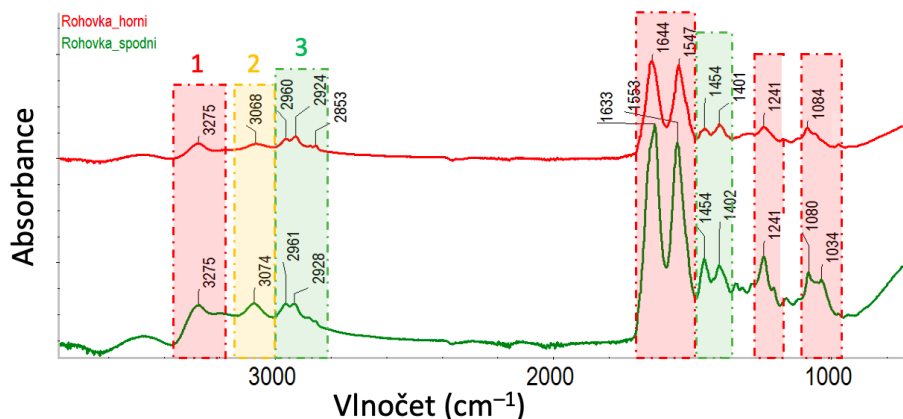
řená rohovka, která napomáhá určit vliv samotných emulzí. K popisu 100% variability mezi rohovkami ošetřenými emulzemi stačily pouze dvě hlavní komponenty (PC) (obr. 3). Každý bod zastupuje jeden typ ošetření rohovky. Vzdálenost mezi emulzí a neošetřenou rohovkou naznačuje, že složení jednotlivých emulzí interaguje s rohovkou a ovlivňuje její strukturu, díky čemuž jsou emulze od sebe dobře rozlišitelné.

Zátěžové křivky PC1 (99 % a 98 %) jsou u obou stran rohovky popsány klesajícími pásy kromě pásů -OH skupin náležících vodě (cca 3300 cm^{-1}). Naopak u PC2 (1 % a 2 %) lze pozorovat značný vliv klesajícího pásu vody, což poukazuje na fakt, že vysychání rohovky v průběhu měření má minoritní vliv na výsledné rozdělení dat (obr. 4).

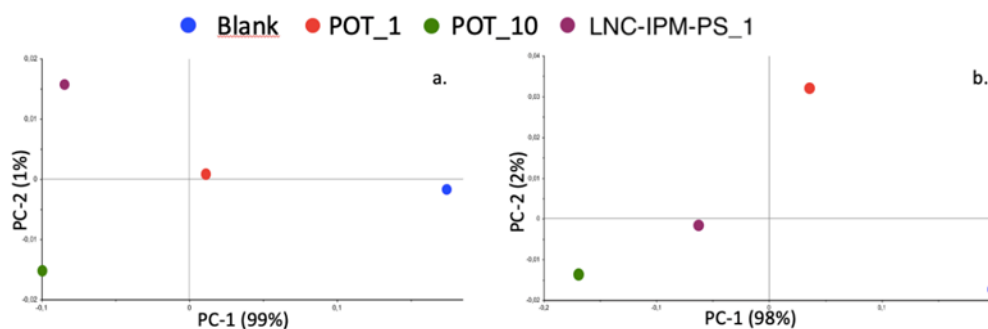
Ze stanovení CBD v receptorové tekutině pomocí LC-UV/MS bylo možné určit, jak dobře procházejí emulze rohovkou. Pro rozšíření intervalu detekce byly použity dva



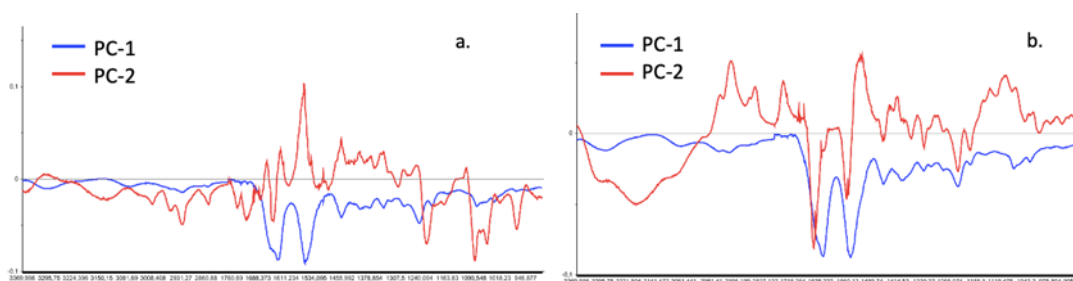
Obr. 1. IR spektrum neošetřené rohovky před a po odečtu spektra vody



Obr. 2. Srovnání spekter horní a spodní strany rohovky s vyznačenými charakteristickými pásy; 1 – amidy, 2 – C-H vibrace na sp^2 uhlíku indikující dvojnou vazbu, 3 – alifatické řetězce



Obr. 3. Rozložení dat podél PC; a – horní strana rohovky, b – spodní strana rohovky, Blank – neošetřená rohovka



Obr. 4. Grafy míry variabilit pro PC; a – horní strana rohovky, b – spodní strana rohovky

detektory, konkrétně spektrofotometrický a hmotnostní s trojitým kvadrupólem. Následné měření probíhalo ve třech opakováních pro každou receptorovou tekutinu. Přesná číselná kvantifikace byla ovšem obtížná vlivem možných deformací rohovek v průběhu transkorneálních experimentů na plochých částech Franzových difuzních cel. Porovnáním získaných dat lze konstatovat, že nejlépe procházela emulze LNC-IPM-PS_1 a nejhůře POT_1. Emulze POT_10 procházela rohovkou téměř srovnatelně jako emulze POT_1.

Závěr

V této práci byla vyvinuta metoda pro transkorneální přenos kanabinoidů za použití komerčně dostupných Franzových difuzních cel. Spoluprací s Oční tkáňovou bankou byly získány cenné informace a dovednosti týkající se manipulace s rohovkami. IR spektrometr s ATR nástavcem se ukázal jako vhodný nástroj pro vyšetření chemické struktury, vzájemné odlišnosti obou stran rohovky a spektrálních rozdílů v rohovkách způsobených prostupem emulzí. Vliv jednotlivých emulzí na strukturu rohovky bylo možné rozlišit pomocí metody PCA. V kombinaci s LC-UV/MS bylo možné určit, jak významně emulze procházely rohovkami.

Nyní se zabýváme vývojem vhodnější cely, která se svým tvarem lépe přizpůsobí tvaru rohovky, aby se zabránilo její případné deformaci během průchodu látek. Nové cely plánujeme sestavit do soustavy, čímž budou všechny cely ovládnuty společně. Toto zapojení značně urychlí manipulaci a zamezí vzniku případných odchylek v průběhu průchodu látek. Zabrání se tak různému času ohřevu i rozdílné rychlosti průtoku receptorové kapaliny.

Práce je součástí projektu TN0100048 – Národní centrum kompetence „Biorafinace jako oběhové technologie“ za spolufinancování státní podporou Technologické agentury. Poděkování dále patří Oční tkáňové bance Fakultní nemocnice Královské Vinohrady za spolupráci při izolování rohovek a firmě EcoFuel Laboratories s.r.o. za dodání stanovovaných emulzí.

LITERATURA

1. Hazekamp A.: *Dissertation*. Proefschrift Universiteit Leiden, Leiden 2007.
2. EMCDA: *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2019.
3. Fraguas-Sánchez A. I., Torres-Suárez A. I.: *Drugs* 78, 16 (2018).

4. Kingman S.: Bull. W. H. O. 82, 11 (2004).
5. Weinreb R. N., Aung T., Medeiros F. A.: JAMA 311, 18 (2014).
6. Nemeškalová A., Hájková K., Mikulů L., Sýkora D., Kuchař M.: Talanta 219, 121250 (2020).

D. Adamcová^a, M. Kuchař^a, and A. Jenišťová^b

^aDepartment of Chemistry of Natural Compounds;

^bDepartment of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague): **Development of In Vitro Method for Transcorneal Transport of Cannabinoids**

In the future, cannabinoid products could be used to treat glaucoma due to their positive effect on the human body. Glaucoma is the second most common cause of irreversible eye damage worldwide. Treatment of glaucoma involves the reduction of the intraocular pressure in the anterior segment of the eye. The main problem in the production of eye drops with cannabinoids is the poor solubility and high lipophilicity of cannabinoids. Therefore, eye drops must contain specific substances called enhancers which ensure the transfer of cannabinoids through the cornea to deeper eye tissues. This work is aimed at the char-

acterization of the cornea before and after cannabinoid transmission. The isolated porcine corneal tissues were used as models of the corneas for transcorneal experiments. *In vitro* experiments were simulated using Franz diffusion cells under the suitable ocular conditions. The trial preparations contain cannabidiol as a model cannabinoid and suitable enhancers. *In vitro* experiments run for 24 hours. FTIR spectrometer with ATR adapter is used for monitoring changes in the chemical composition of the cornea before and after transcorneal transport. The measured spectra were evaluated by multivariate statistical methods.

Keywords: phytocannabinoids, cannabidiol, cornea, transcorneal transport, infrared spectroscopy

Acknowledgements

This work is part of the project TN01000048 – National Competence Center „Biorafinace jako oběhové technologie“ co-financed by the Technology Agency state support. We would like to thank the Eye Tissue Bank – the Royal Vinohrady University Hospital for cooperation with corneal isolation, and company EcoFuel Laboratories s.r.o. for delivery of the measured emulsions.

METABOLOMIKA PRCHAVÝCH LÁTKOK ĽUDSKÉHO PACHU METÓDOU DVOJDI- MENZIONÁLNEJ PLYNOVEJ CHROMATOGRRAFIE

**RADKA BUŠOVSKÁ^{a,b}, PAVLINA KYJAKOVÁ^b,
ROBERT HANUS^b a JANA SOBOTNÍKOVÁ^a**

^a *Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2,* ^b *Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha
radka.busovska@gmail.com*

Kľúčové slova: ľudský pach, metabolomika, dvojdimenzionálna plynová chromatografia

Úvod

Čuch je evolučne najstarší zmysel. Zohráva významnú úlohu pri orientácii v prostredí, napríklad pri hľadaní potravy a úniku pred predátormi, a taktiež pri vnútrorodovej komunikácii (hľadanie partnera)¹. Súčasný človek je dominantne vizuálnym tvorom, a preto čuchu už nevenujeme takú pozornosť, no aj napriek tomu ostáva kľúčovým zmyslom v základných biologických procesoch. Ako jediný zo zmyslov neprechádza hypotalamom a nie je ničím regulovaný. Čuchová informácia prechádza rovno do limbického systému v mozgu, kde je spojená s príslušnou emóciou a ihneď zapamätaná². Je to teda zmysel, ktorý je najviac prepojený s emóciami. Čuchové vnímanie zohráva dôležitú úlohu pri výbere partnera najmä pre ženy³, tak ako aj iné atribúty ako napríklad črty tváre⁴.

Na základe niektorých evolučných teórií sa predpokladalo, že si budeme vyberať partnera, ktorého telesný pach je čo najviac odlišný s našim telesným pachom a pachom našich rodičov, kvôli génovej rôznorodosti potomkov. Empirické výskumy však ukazujú, že je to naopak a máme tendenciu si vyberať partnera, ktorého telesný pach je podobný s pachom nášho rodiča opačného pohlavia.

Komprehenzívna plynová chromatografia v spojení s hmotnostným detektorom doby letu (GC×GC-TOFMS) je v súčasnosti najpoužívanejšia metóda pre separovanie a identifikáciu veľkého množstva analytov zo vzoriek s komplexnou maticou, ako je telesný pach⁵. Pomocou dvoch kolón o rôznej polarite sme schopní dosiahnuť lepšiu separáciu analytov s podobnými vlastnosťami oproti plynovej chromatografii klasickej.

Táto práca je zameraná na vyvinutie metodického postupu pre robustnú charakterizáciu jednotlivých jedincov podľa ich telesného pachu a oddelenie týchto jedincov pomocou dvojdimenzionálnej plynovej chromatografie s následným štatistickým spracovaním.

Experimentálna časť

Pre vzorkovanie bola použitá sterilná vatová tyčinka, ktorou sa 20× v podpaзуši otočilo, potom bola vložená do 2ml vialky, uzavretá a chladená na –20 °C až do extrakcie. Bola prevedená extrakcia do 400 µl destilovaného *n*-hexánu po dobu 24 h pri 8 °C s následným 10min pôsobením ultrazvuku. K extraktom boli pridané vnútorné štandardy (10 ng 1-bromnonánu a 100 ng 1-bromeikosánu) a boli skladované pri –80 °C až do doby analýzy.

Vzorky boli analyzované pomocou GC×GC-TOFMS prístroja Pegasus 4D (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). Prvá bola nepolárna kolóna Rxi-5Sil MS (30 m, ID 0,25 mm, df 0,25 µm, Restek, Bellefonte, PA, USA) a v druhej dimenzii bola semi-polárna kolóna Rxi-17Sil MS (1,5 m, ID 0,1 mm, df 0,1 µm, Restek, Bellefonte, PA, USA). Medzi nimi bol teplotný modulátor s dvoma chladiacimi a dvoma horúcimi tryskami. Modulačná perióda činila 5 s a horúci pulz trval 600 ms. Teplotný program bol 50 °C (1 min), 8 °C/min až do 320 °C (20 min). Sekundárna kolóna bola o 10 °C a modulátor o 20 °C teplejší ako primárna kolóna. Mobilnou fázou bolo hélium (1 ml min⁻¹). Celkový čas jednej analýzy bol 54,75 min.

1 µl extraktu bol nadávkovaný pomocou automatickeho dávkovača do injektora o teplote 250 °C v splitless režime. Skenovanie začalo po uplynutí 400 s, rýchlosťou 100 skenov za sekundu a zbierané boli hmoty v rozmedzí 29–600 Da. Napätie detektora bolo 1500 V.

Štúdie sa zúčastnilo 6 mužov, ktorí po dobu niekoľkých dní pred odberom dodržovali rovnaké pravidlá životosprávy. Každý poskytol triplikát vzorky z oboch podpaзуší, čo dokopy činilo 36 vzoriek. Získané chromatogramy boli primárne spracované v LECO ChromaTOF software v. 4.72 a ChromaTOF-Tile (v. 0.27) (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA) s cieľom odstrániť píky, ktoré nepochádzajú zo samotných vzoriek človeka, ale sú to napríklad analyty vymyté z kolóny. To bolo docielené vylúčením klasifikačných oblastí, kde sa vyskytujú najmä siloxány. Pre vzájomné porovnanie 36 chromatogramov bol použitý program ChromaTOF-Tile (v. 0.27), ktorý používa tzv. „dlaždicovú“ metódu. Tento nový algoritmus umožňuje píky ďalej triediť podľa kvantitatívneho odstupe od šumu a podľa ich zastúpenia v porovnaní s referenčnou skupinou pomocou *F* pomeru. Ako referenčná skupina boli použité alkány (C7–C40, 1 ng µl⁻¹, Sigma-Aldrich) v roztoku hexánu.

Identita jednotlivých analytov z výslednej sady bola určená za pomoci knižníc s následnou manuálnou kontrolou. Relatívne zastúpenie každého z analytov bolo porovnané pomocou analýzy hlavných komponentov – PCA (z angl. Principal Component Analysis) a vzájomná chemická zhoda vzoriek bola interpretovaná z prvých troch komponentov.

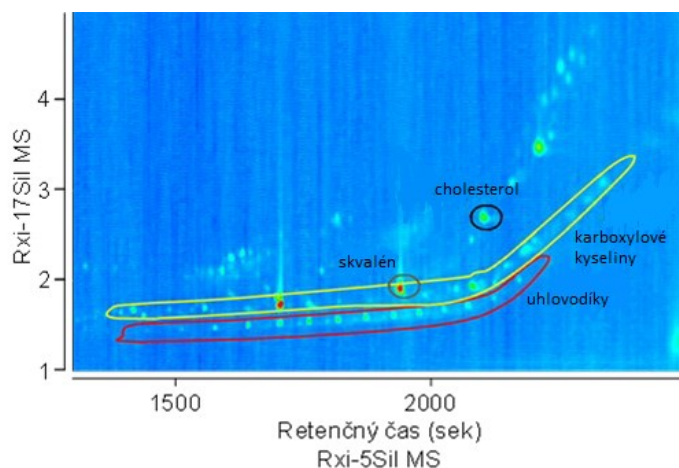
Výsledky a diskusia

Odstránenie nežiaducich píkov a uplatnenie vstupných kritérií (signál ku šumu 50, F pomer 2) zredukovalo pôvodnú sadu niekoľko tisíc detegovaných analytov na 474 látok. Tieto látky patrili do tried charakteristických pre ľudský pach, tj. uhľovodíky, karboxylové kyseliny, alkoholy, estery, steroidy (obr. 1). Chromatogramy rôznych ľudí sa v niektorých prípadoch dajú vzájomne rozlíšiť už na prvý pohľad (obr. 2), vzájomné kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely v zastúpení analytov sú zrejmé zo štatistického spracovania dát. Graf na obr. 3 znázorňuje chemickú variabilitu medzi 36 vzorkami za pomoci troch hlavných komponentov, ktoré pokrývajú 65 % variability. Z grafu je vidieť, že medzi vzorkami každého jednotlivca a každého podpazušia je relatívne malý rozptyl, z čoho

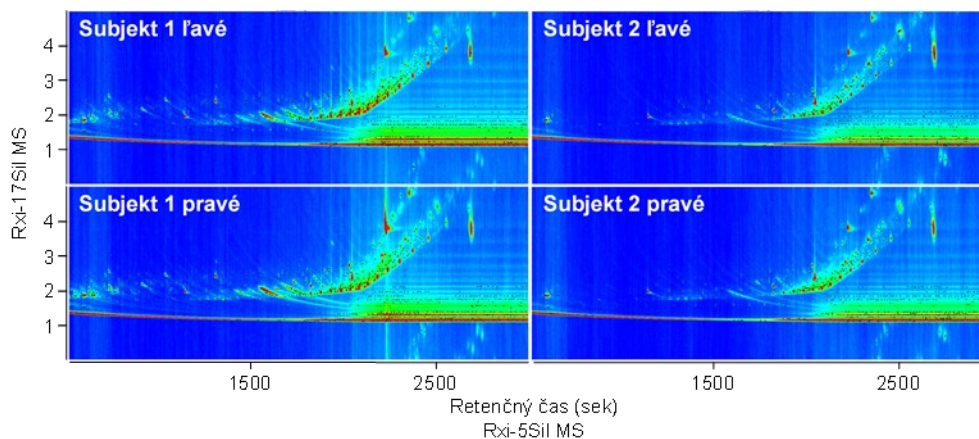
vyplýva, že ľavé a pravé podpazušie sú zameniteľné. Zároveň je možné pozorovať, že medzi jedincami sú významné vzdialenosti, ktoré umožňujú ich jednoznačne rozlíšiť.

Záver

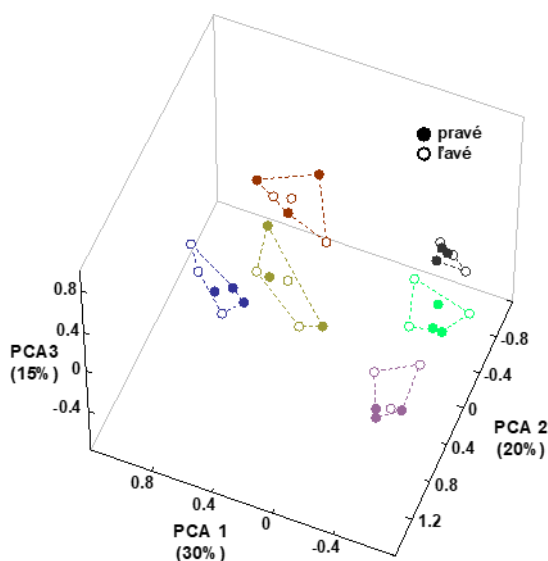
Bola vypracovaná vhodná metóda pre analýzu ľudského telesného pachu využitím GC×GC-TOFMS od vzorkovania, až po štatistické spracovanie výsledkov. Výsledky ukazujú, že použitá metodika je opakovateľná a zároveň vhodná pre rozlíšenie jednotlivých ľudí na základe ich telesných pachov (obr. 3). Bolo ukázané, že ľavé a pravé podpazušie u jednotlivcov sú zameniteľné a je teda možné pracovať s ich priemernou hodnotou. Takto optimalizovaná metóda je používaná pre porovnanie podob-



Obr. 1. Charakteristické skupiny látok a významné analyty ľudského pachu vyznačené v chromatograme



Obr. 2. Porovnanie chromatogramov pre ľavé a pravé podpazušie u dvoch vybraných subjektov



Obr. 3. Vynesenie hodnôt prvých troch komponentov pre 36 vzoriek ľudského pachu. Jednotliví ľudia sú vyznačení rôznymi farbami

nosti pachových profilov medzi 164 vzorkami v našom bežiacom projekte, ktorý študuje úlohu čuchu pri voľbe partnera.

LITERATÚRA

- Wyatt T. D., v knihe: *Neurobiology of Chemical Communication* (Mucignat-Caretta C., ed.), kap. 1, str. 1. CRC Press, Baton Rouge 2014.
- Kadohisa M.: *Front. Syst. Neurosci.* 7, 66 (2013).
- Havlicek J., Saxton T. K., Roberts S. C., Jozifkova E., Lhota S., Valentova J., Flegr J.: *Pers. Individ. Differ.* 45, 565 (2008).
- Allen C., Havlíček J., Williams K., Roberts S. C.: *Physiol. Behav.* 210, 112541 (2019).
- de la Mata A. P., McQueen R. H., Nam S. L., Harynyuk J. J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1905 (2017).

R. Bušovská^{a,b}, P. Kyjaková^b, R. Hanus^b, and J. Sobotníková^a (^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, ^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Metabolomics of Volatile Substances from Human Body Odour by GC×GC Method**

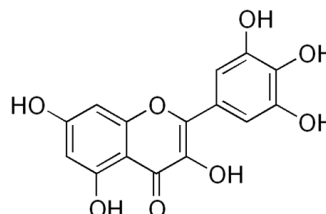
Body odour perception plays an important role in human mate choice, especially in women. It was previously proposed that women select partners whose body odour resembles that of woman's fathers. Our aim was to test this hypothesis instrumentally using comprehensive GC×GC-TOFMS and subsequent multidimensional analyses of body odour chemical profiles of male partners and fathers of adult women. Our aim was to develop a methodology of sampling, chromatographic analysis and data treatment in a pilot study consisting of six male subjects, each sampled three times at left and right axilla. Typical human volatile substances, such as hydrocarbons, carboxylic acids, esters, alcohols, aldehydes, ketones, sterols and terpenes, were detected in all examined samples. Using a recently released "tile-based" 2D chromatographic alignment algorithm, we obtained a set of 474 compounds systematically occurring in male axillary odour. We used the principal component analysis to estimate the chemical distances among the six male subjects and observed a desired low variability among the six samples from each subject accompanied with a clear separation among individual subjects. We concluded that the methodology is suitable for discriminating individual males based on body odour. The optimized method will be applied for comparing similarities of body odour in 41 father-partner pairs.

Keywords: axillary odour, human volatiles, partner choice, GC×GC-TOFMS, comprehensive two-dimensional gas chromatography, principal components analysis

DETEKCIA MYRICETÍNU POMOCOU POKROČILÝCH TECHNÍK VIBRAČNEJ SPEKTROSKOPIE

LENKA FILIPIAKOVÁ^a, MARTIN KRÁL^b,
OLEKSANDR VOLOCHANSKYI^{a,b} a MARIE
ŠVECOVÁ^a

^a Ústav analytickej chémie, ^b Ústav fyzikálnej chémie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Prahe, Technická 5,
166 28, Praha 6
filipial@vscht.cz



Obr. 1. Štruktúra myricetínu

Kľúčové slová: SERS, SEIRA, galvanické vylučovanie, elektrochemická depozícia, AFM, SEM, myricetín

Úvod

Klasická Ramanova a infračervená spektroskopia sú bežné vibračné techniky, ktoré nemajú dostatočnú odozvu pre stopovú analýzu, pretože nedosahujú patričných limitov detekcie. Tento nedostatok sa dá riešiť povrchovým zosilnením, kedy je skúmaný analyt adsorbovaný na plazmonický substrát. V dôsledku elektromagnetického a chemického mechanizmu je následne zosilnená optická odozva študovanej látky. Techniky sa následne označujú ako povrchom zosilnený Ramanov rozptyl (SERS – Surface-Enhanced Raman Scattering) a povrchom zosilnená infračervená absorpcia (SEIRA – Surface-Enhanced Infrared Absorption).

Rôzne postupy prípravy zosilňujúcich substrátov, poprípade meniace sa parametre môžu viesť k rozdielnym morfológiám zosilňujúceho substrátu. V tejto práci boli pre porovnanie použité postupy galvanického vylučovania a elektrochemickej depozície na vhodné podklady. Galvanická depozícia v porovnaní s elektrochemickou je pomerne nová metóda pre prípravu zosilňujúceho substrátu, ktorá vyniká v rýchlej príprave zosilňujúcej vrstvy a cenovej dostupnosti. Pomocou oboch priprav boli pripravené substráty tvorené kovovými vrstvami ušľachtilých kovov (Ag, Au alebo Cu) a následne zmapované prostredníctvom mikroskopických metód: mikroskopiou atomárnych síl¹ (AFM – Atomic Force Microscopy) a skenovacou elektrónovou mikroskopiou² (SEM – Scanning Electron Microscopy).

Adsorbovaným analytom v tejto práci je prírodná látka myricetín, ktorý patrí do skupiny flavonoidov. Človek prijíma flavonoidy prevažne z ovocia, zeleniny, kávy či vína. Z týchto zdrojov, hlavne z bobúľ, orechov či citrusov, získavame tiež myricetín, ktorý obsahuje viacero fenolických skupín (obr. 1), ktoré z neho robia molekulu so silnými antioxidantnými vlastnosťami³. Vďaka týmto vlastnostiam je myricetín skúmaný ako vhodný kandidát

pre boj s rakovinou. Používa sa aj v boji so zápalmi, cukrovkou alebo Alzheimerovou chorobou⁴. Na druhú stranu má v tele aj prooxidačné účinky, môže spôsobovať mutácie či degradáciu DNA, čo sa deje predovšetkým pri nízkej hladine kyseliny askorbovej.

Cieľom tejto práce je zvoliť vhodný plazmonický kov pre účinné zosilnenie optickej odozvy myricetínu. Zloženie depozičného kúpeľa a zvolený postup prípravy ovplyvňujú morfológiu pripraveného zosilneného povrchu a vo výsledku i intenzitu a celkovú podobu spektra myricetínu. Na konečné výsledky je možné naviazať určením limitov detekcie analytu, čo môže pomôcť v detekcii myricetínu v reálnych vzorkách, ako sú potraviny či umelecko-historické predmety, pretože flavonoidy sú súčasťou prírodných pigmentov.

Experimentálna časť

Platinové terčíky a hliníkové pliešky používané ako nosiče boli najskôr dôkladne mechanicky a chemicky ošetrované v súlade so skoršie publikovanými postupmi⁵. Pre nanosenie Ag, Au a Cu vrstiev boli využité príslušné komplexné kúpele a roztoky vybraných solí, ktoré poslúžili pre elektrodepozíciu a tiež pre galvanickú prípravu zosilňujúcich substrátov. Elektrodepozícia prebiehala v dvojelektrodovom usporiadaní, kedy ako anóda bol zapojený Pt terčík, na ktorý bola redukovaná Ag, Au alebo Cu vrstva z príslušného kúpeľa^{5,6}. Ako katóda bol použitý príslušný pliešok. Jednotlivé prúdové sekvencie sú zaznamenané v tab. I.

Galvanická depozícia prebiehala tak, že vyčistený Al pliešok bol ponorený do roztoku príslušnej soli alebo komplexného kúpeľa na dobu 10 min, len v prípade mediaceho komplexného kúpeľa bola doba depozície 15 min. Všetky substráty boli po príprave opláchnuté ultračistou vodou a ponorené na približne 18 h do metanolového roztoku myricetínu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} (cit.⁷).

Charakterizácia povrchu bola prevedená pomocou mikroskopie atomárnych síl (AFM) za využitia mikroskopu

Tabuľka I

Sekvencia prúdu pri konkrétnych elektroprípravách povrchu

Strieborný kúpeľ		Mediaci kúpeľ	
Čas [min]	Prúd [mA]	Čas [min]	Prúd [mA]
10	5	2	10
5	15	2	20
Zlatiaci kúpeľ		2	30
Čas [min]	Prúd [mA]	2	40
5	5	2	50
5	10	2	60
5	15	15	70

neaSNOM (Neaspec, Nemecko), kedy skenujúcou sondou bol Si hrot ARROW-NCpt (NanoWorld, Švajčiarsko) potiahnutý 23 nm vrstvou zliatiny z Pt a Ir. Hrot bol použitý v poklepovom móde a bola sledovaná oblasť $1 \times 1 \mu\text{m}$ až $10 \times 10 \mu\text{m}$ podľa členitosti povrchu.

SEM snímky boli získané na mikroskope s vysokým rozlíšením HS-4800 (Hitachi, Japonsko), ktorý detekuje sekundárne elektróny. Urýchľovacie napätie bolo nastavené na 10 kV a na každom vzorku bolo pozorovaných 5 miest.

Pripravené vzorky boli merané pomocou disperzného Ramanovho spektrometru DXR Smart Raman (Thermo Scientific, USA), ktorý umožňuje meranie vzorky pri dvoch vlnových dĺžkach (780 nm diódový laser a pevnolátkový Nd:YAG laser so zdvojenou frekvenciou emitujúci žiarenie o vlnovej dĺžke 532 nm). Výkon laseru a doba merania boli upravované samostatne pre každú vzorku (tab. II). Druhým používaným prístrojom bol spektrometer s Fourierovou transformáciou (FT) EQUINOX 55S s modulom pre Ramanovu spektroskopiu FRA106/S (Bruker, Nemecko). Spektrometer využíva ako zdroj budiaceho žiarenia (vlnová dĺžka 1064 nm) pevnolátkový laser Nd:YAG a rozptýlené žiarenie je detekované Ge diódou chladenou kvapalným dusíkom. Pre každú vzorku bolo nameraných 6 spektier.

SEIRA spektrá boli merané pomocou FT-spektrometru Nicolet iS10 (Thermo Scientific, USA). Spektrometer má ako zdroj žiarenia zhavenú keramickú tyčinku a reflektované žiarenie bolo zaznamenané DTGS detektorom. Spektrá boli získané technikou difúznej reflektancie v rozsahu $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$. Bolo meraných 128 skenov s rozlíšením 4 cm^{-1} v 3 bodoch vzorky.

Výsledky a diskusia

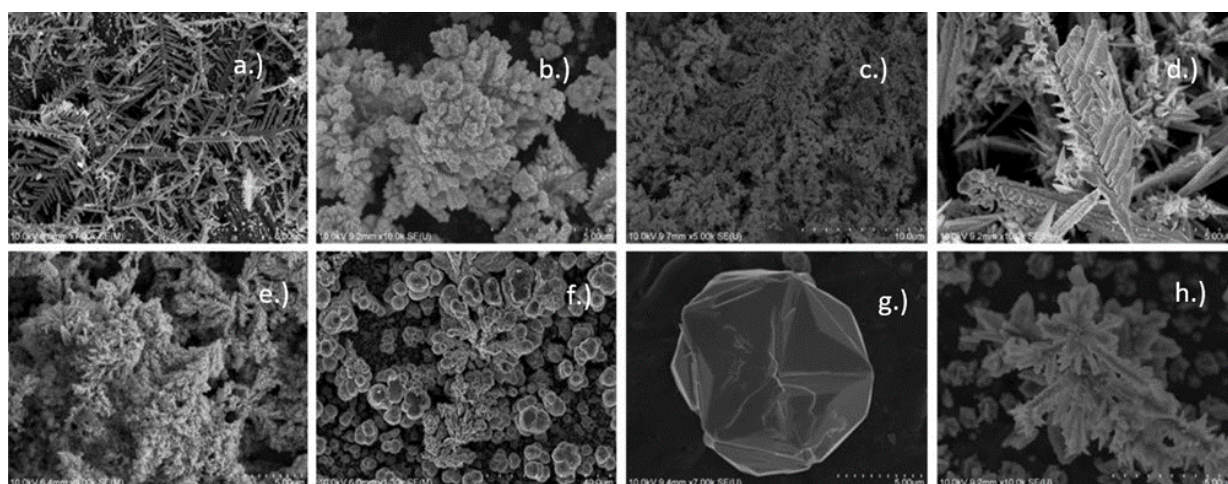
Charakterizácia povrchu

Povrchy substrátov pripravených galvanickým a elektrochemickým postupom boli charakterizované pomocou mikroskopických metód AFM a SEM. SEM metóda bola v charakterizácii morfológie povrchu vhodnejšia a podarilo sa zmapovať povrch všetkých meraných substrátov (obr. 2). Ag a Au povrchy z komplexného kúpeľa boli tvorené dendritickými útvarmi pripomínajúcimi papradie, aj keď štruktúra jednotlivých útvarov sa líši. Dendritické útvary boli tiež zaznamenané na povrchu pripravenom galvanicky z roztoku CuCl_2 . V prípade povrchu pripraveného z Cu komplexného kúpeľa vznikli sférické či karfiolové štruktúry a v prípade prípravy galvanickou depozíciou

Tabuľka II

Experimentálne podmienky merania SERS spektier

Excit. vlnová dĺžka [nm]	Výkon laseru [mW]	Rozlíšenie [cm^{-1}]	Počet skenov/ dĺžka merania
532	3	5	10×10 s AgNO_3 (Al) 5×30 s Ag (Pt, Al), Cu (Pt, Al) 10×5 s Au (Pt, Al)
780	20	5	5×30 s AgNO_3 (Al), Cu (Al, Pt), Au (Al) 10×10 s Ag (Al), Au (Pt) 10×1 s Ag (Pt)
1064	300	4	1024 skenov



Obr. 2. SEM snímky povrchu pripravené elektrochemicky (Pt) alebo galvanicky (Al): a) Ag (Pt) povrchu, b) Ag (Al) povrchu, c) Au (Al) povrchu, d) Cu (Al) povrchu, e) Au (Pt) povrchu, f) Cu (Pt) povrchu, g) v roztoku AgNO_3 (Al), h) v roztoku CuCl_2 (Al)

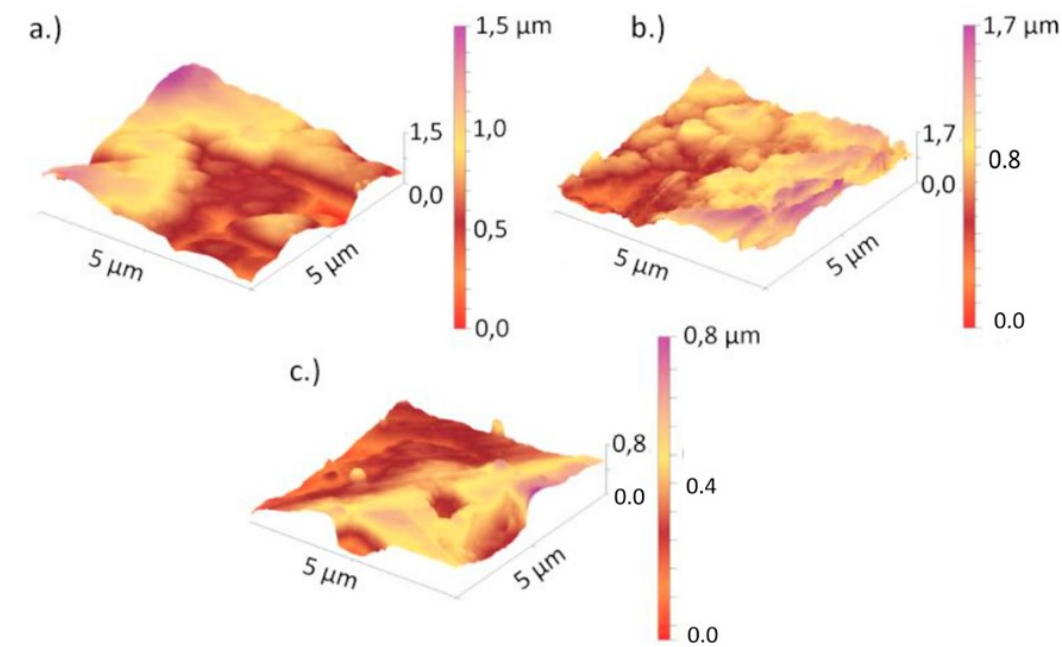
v roztoku AgNO_3 boli pozorované sférické štruktúry.

Substráty majú veľmi členitý povrch, čo hlavne pre metódu AFM nie je vhodné. Touto mikroskopickou metódou sa podarilo úspešne zmapovať len povrch pripravený elektrochemickou depozíciou v Ag a Au kúpeli a galvanickou prípravou v roztoku AgNO_3 . Z máp je zjavné, že jednotlivé vrstvy sú tvorené drobnými útvarmi. Výškové rozdiely v týchto prípadoch sú $1,5 \mu\text{m}$ (elektrochemicky pripravená Ag vrstva), $1 \mu\text{m}$ (elektrochemicky pripravená Au

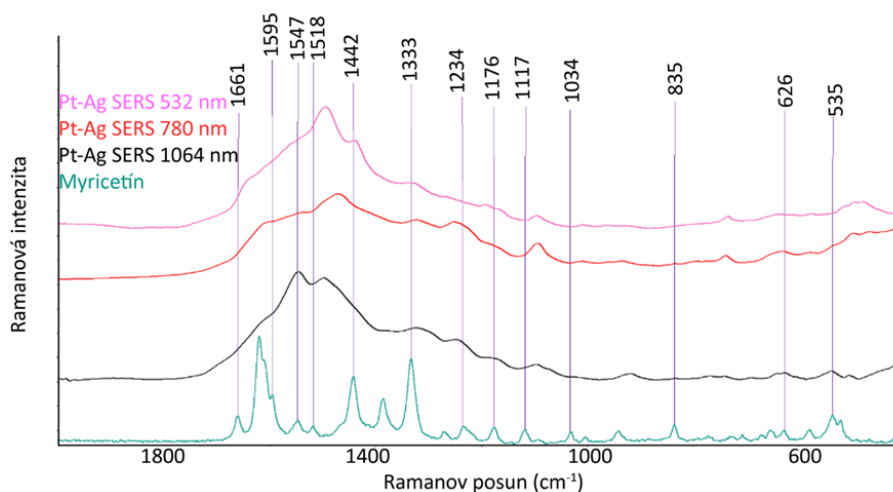
vrstva) a $0,6 \mu\text{m}$ (galvanicky pripravený Ag povrch). Výsledky AFM metódy sú zobrazené v 3D projekcii na obr. 3.

SERS spektrá myricetínu

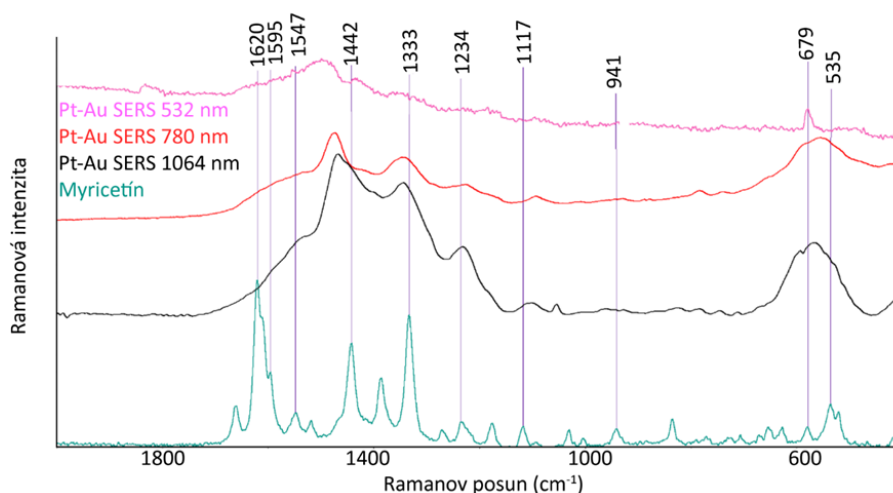
Pomocou priradených charakteristických pásov pre čistú látku bolo možné porovnať a následne interpretovať namerané SERS spektrá myricetínu. Charakteristické pásy



Obr. 3. 3D mapa povrchu substrátu pripraveného a) v Ag kúpeli elektrochemickou depozíciou, b) v Au kúpeli elektrochemickou depozíciou, c) v roztoku AgNO_3 galvanickou depozíciou



Obr. 4. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v Ag kúpeli s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1})



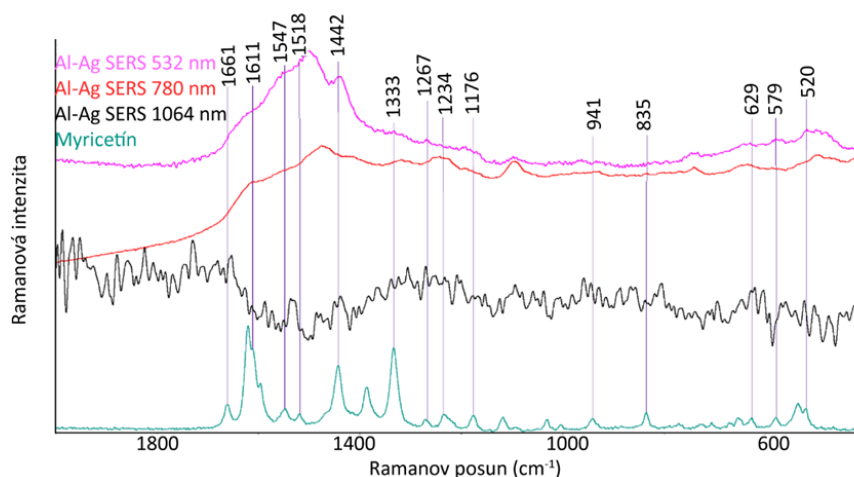
Obr. 5. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v Au kúpeli s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1})

vibračných skupín myricetínu boli priradené pomocou odbornej literatúry⁸.

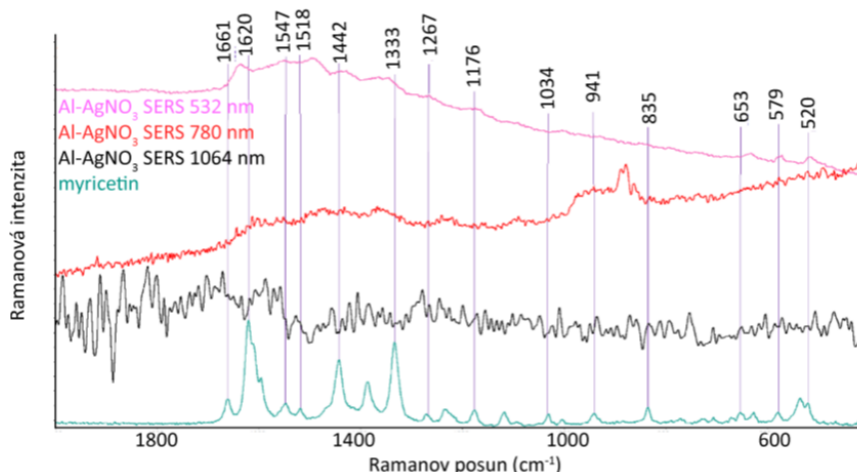
V nasledujúcom bloku budú porovnané spektrá myricetínu s jeho SERS spektrami na základe rozdielnej excitačnej vlnovej dĺžky. Rozdiel v SERS spektrách je patrný aj pri použití rôznych plazmonických kovoch (Ag, Au, Cu), či tiež postupov prípravy. V tejto práci nebude diskutovaná depozícia Cu na platine a na hliníku z roztoku $CuCl_2$, pretože substrát nevykazoval žiadnu signálovú odozvu pre myricetín. Na obrázkoch je uvedené porovnanie spektier čistej látky a SERS spektier analytu adsorbovaného na Ag a Au substrátoch pripravených pomocou elektrochemickej prípravy. Strieborný substrát (obr. 4)

zosilnil oblasť 1500 cm^{-1} čo odpovedá vibráciám aromatického kruhu. Na Au substráte (obr. 5) je pozorovaný nárast intenzity signálu aj v oblasti 600 cm^{-1} , čo odpovedá vibráciám hydroxylových skupín a vibráciám CH skupín na aromatickom jadre. V tejto oblasti sa tiež prejavuje interakcia analytu s kovovým povrchom.

Strieborná vrstva nanosená na Pt terčík je vhodným substrátom pre detekciu myricetínu s využitím všetkých testovaných vlnových dĺžok. Jednotlivé spektrá sa vyznačujú dobrým pomerom signálu a intenzívnymi pásmi analytu (obr. 4). Patrný je tiež vplyv excitačnej vlnovej dĺžky, pretože v uvedených spektrách dochádza ku zmenám relatívnych intenzít jednotlivých pásov, čo súvisí s rozdielnym



Obr. 6. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v Ag kúpeli s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1})



Obr. 7. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v $AgNO_3$ roztoku s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1})

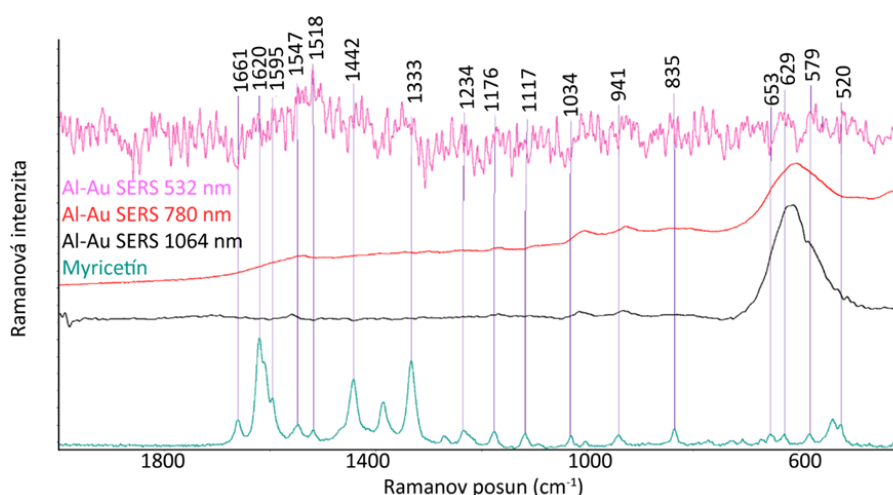
príspevkom jednotlivých mechanizmov zosilnenia.

Zrovnateľné spektrá boli zaznamenané aj na Au substrátoch pripravených elektrodepozíciou (obr. 5). Veľmi dobrý pomer signálu k šumu vykazujú hlavne spektrá získané s excitačnými vlnovými dĺžkami 780 a 1064 nm. Pre Au substráty nie je vhodná vlnová dĺžka budiaceho žiarenia 532 nm, lebo plazmónová rezonancia substrátu je cieleňá k vyšším vlnovým dĺžkam.

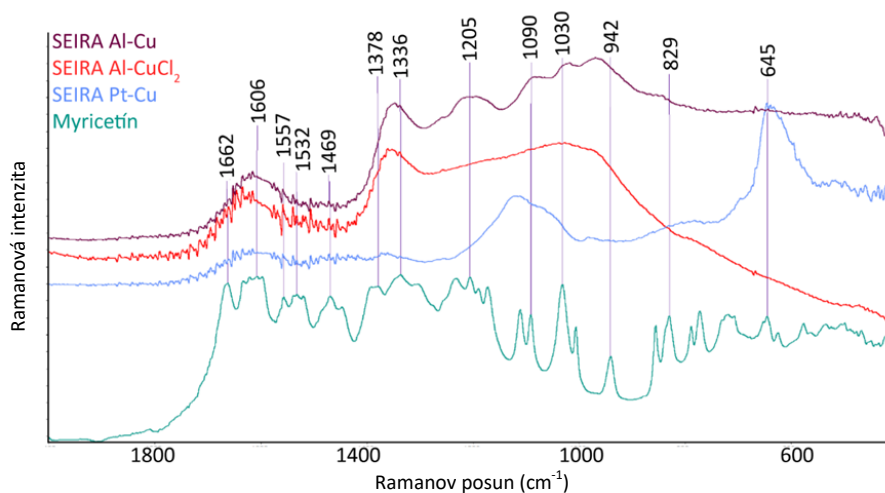
V nasledujúcom odstavci (obr. 6–9) sú pre porovnanie spektrá myricetínu deponovaného na substráty pripravené galvanickou depoziáciou. Na substráty boli deponované vrstvy z Ag, Au, Cu kúpeli a roztoku $AgNO_3$. Na obr. 7 je viditeľné zosilnenie na substráte $AgNO_3$ v oblasti 1400 cm^{-1} , za čo zodpovedajú vibrácie dvojných väzieb

aromatického skeletu s využitím žiarenia z viditeľnej oblasti. Naproti tomu pri vlnovej dĺžke 1064 nm sa charakteristické pásy strácajú v šume, čo môže súvisieť s drobnejšou štruktúrou vzniknutých nanoútvarov a plazmónovou rezonanciou prejavujúcou sa pri kratších vlnových dĺžkach. Vysvetliť sa to dá tiež pomocou dominantného príspevku molekulárnej rezonancie k výslednému zosilneniu signálu. Obdobný priebeh spektier bol pozorovaný na oboch typoch Ag substrátov pripravených galvanickou depoziáciou.

Substrát pripravený vo zlatiacom kúpeli pomohol zosilniť signál v oblasti okolo 600 cm^{-1} , ktorá odpovedá vibráciám hydroxylových skupín a CH skupín v aromatickom skelete (obr. 8). Pri excitačnej vlnovej dĺžke 532 nm



Obr. 8. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v Au kúpeli s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1})



Obr. 9. Porovnanie Ramanovho spektra čistej látky a SERS spektier myricetínu získaných na substrátoch pripravených v Cu kúpeli s využitím excitačných vlnových dĺžok 532 nm, 780 nm a 1064 nm (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1})

zlato nie je vhodné pre zosilnenie signálu, pretože plazmónová rezonancia spôsobená zlatom nie je optimálna pri krátkych excitačných vlnových dĺžkach.

Ako vhodný pro detekciu myricetínu sa ukázal medený povrch pripravený v komplexnom kúpeli galvanickou depozíciou (obr. 9). Tento substrát dokázal zosilniť predovšetkým oblasť okolo 1400 cm^{-1} , ktorá odpovedá vibráciám aromatického skeletu. V oblasti okolo 600 cm^{-1} sa prejavujú oxidy medi. Spektra majú dobrý pomer signálu k šumu pri všetkých testovaných vlnových dĺžkach.

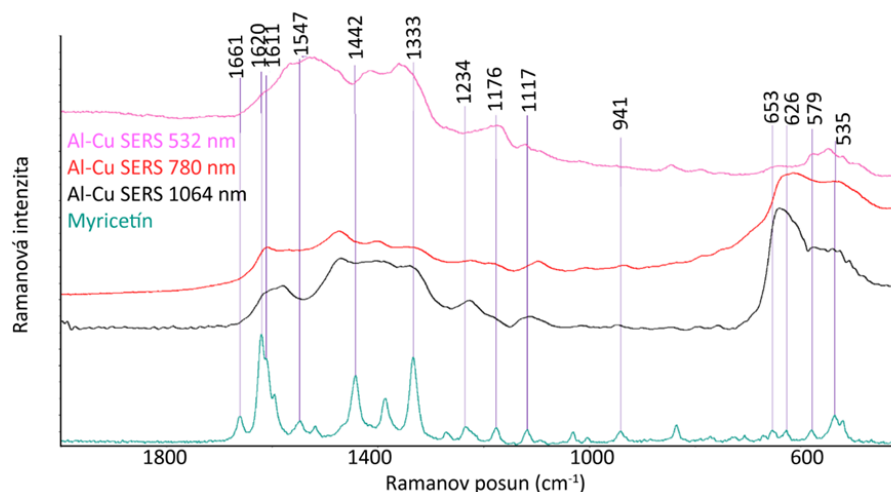
SEIRA spektrá myricetínu

SEIRA signál myricetínu bol pozorovaný len na všetkých typoch Cu substrátov (obr. 10). Pásky sú pomerne

široké, zle rozlíšené a vykazujú isté rozdiely od čistej látky. Napriek tomu v oblasti pod 1300 cm^{-1} je možné identifikovať myricetín na substráte pripravenom v komplexnom kúpeli galvanickým vylučovaním.

Záver

Cieľom tejto práce bolo preukázať vhodnosť SERS a SEIRA metód pre detekciu flavonoidu myricetínu. SEM zachytilo na povrchoch podľa daného kúpeľa rôzne útvary ako ihličky či hubovité tvary spôsobené experimentálnymi podmienkami. Práve tento členitý povrch nebol vhodný pre druhú mikroskopickú metódu – AFM, pretože pripravený povrch spôsobuje zasekávanie hrotu a môže ho aj



Obr. 10. Porovnanie IČ spektra čistej látky a SEIRA spektier myricetínu získaných na všetkých typoch Cu substrátoch (koncentrácia základného roztoku myricetínu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹)

poškodiť. Obecne sa dá konštatovať, že substráty pripravené elektrodepozíciou sú vhodnejšie pre zosilnenie Ramanova rozptylu myricetínu ako substráty pripravené galvanickým vylučovaním z dôvodu vyššej intenzity pozorovateľného signálu. Z kovov sa veľmi osvedčil strieborný substrát, zlatý povrch sa ukázal ako nie vhodný pre meranie pri krátkych vlnových dĺžkach, čo súvisí s maximom plazmónovej rezonancie substrátu. Medené povrchy sa obecné ukázali ako vhodnejšie substráty pre SEIRA spektroskopiu, oproti zlatým a strieborným povrchom. Na konečné výsledky je možné naviazovať určením limitov detekcie analytu, čo môže pomôcť v detekcii myricetínu v reálnych vzorkách, ako sú potraviny či umelecko-historické predmety.

LITERATÚRA

1. Magonov S. N.: *Surface Analysis with STM and AFM. Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis*. VCH 1996.
2. Leng Y.: *Materials Characterization. Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. John Wiley & Sons 2009.
3. Semwal D. K., Semwal R. B., Combrinck S. a Viljoen A.: *Nutrients* 8, 90 (2016).
4. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F.: *Life Sciences* 65, 337 (1999).
5. Švecová M., Palounek D., Volochanskyi O., Prokopec V.: *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 229 (2020).
6. Prokopec V., Dendisová M., Kokaislová A., Čejková J., Člupek M., Matějka P.: *J. Mol. Structure* 993, 410 (2011).
7. Volochanskyi O.: *Diplomová práca*. Vysoká škola chemicko-technologická v Prahe, Praha 2019.
8. Baranović G., Šegota S.: *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 192, 473 (2018).

L. Filipiaková^a, M. Král^b, O. Volochanskyi^b, and M. Švecová^a (^a *Department of Analytical Chemistry,* ^b *Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Detection of Myricetin Using Advanced Vibrational Spectroscopic Techniques**

Myricetin is a natural flavonoid with antioxidant properties that helps prevent certain types of cancer, carcinogenic mutations, or cardiovascular diseases. On the other hand, under specific conditions, it can show mutagenic activity along with degradation of DNA after their interaction. In a natural environment, myricetin is often found in small amounts, which may be detected by surface-enhanced vibrational spectroscopic techniques due to the enhancement of the optical response following the interaction of the analyte with plasmonic metal.

The main goal of this work was to choose the right type of enhancing substrate (plasmonic metal, suitable surface preparation, morphology) and then use appropriate experimental conditions (especially excitation wavelength) to detect and identify myricetin. In addition to modern vibrational spectroscopy, which can prove the analyte itself, microscopic methods were utilized to collect information about the surface morphology.

After evaluating the results of microscopic techniques, a relatively rugged surface with specific structures is seen on all enhancing layers, prepared by the galvanic or electrochemical preparation procedure. The enhancing layer of copper proved to be the best substrate for increasing the optical response of myricetin in the SEIRA spectra. In general, the best signal enhancement in the SERS spectrum was provided by the silver layer, which indicates its potential for further experiments and research in the search for detection limits for the mentioned analyte.

Keywords: SERS, SEIRA, galvanic deposition, electrochemical deposition, AFM, SEM, myricetin

EX-SITU ANALÝZA PRODUKTU FOTOCHEMICKÉ REAKCE 4-AMINOBENZENTHIOLU NA POVRŠÍCH PLASMONICKÝCH SUBSTRÁTŮ

IVAN KOPAL^a, MARIE ŠVECOVÁ^b, TEREZA
ČAPKOVÁ^c a MARCELA DENDISOVÁ^a

^a Ústav fyzikální chemie, ^b Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6 – Dejvice, ^c Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Třída Tomáše Bati 5678, 760 01 Zlín
kopali@vscht.cz

Klíčová slova: povrchem zesílený Ramanův rozptyl, 4-aminobenzenthionol, plasmonické substráty, vliv excitace, fotochemie

Úvod

Od objevu vlivu plasmonických kovů na zesílení Ramanova rozptylu uplynuly již desítky let. Tento jev byl poprvé zaznamenán (ačkoli nesprávně interpretován) Martinem Fleischmannem při pozorování intenzivnějšího signálu molekul pyridinu adsorbovaných na stříbrné elektrody¹. Od té doby se spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (Surface-Enhanced Raman Scattering – SERS) stala technikou, která je využívána v mnoha oblastech chemického^{2,3}, fyzikálního^{4,5} i biomedicínského výzkumu^{6–9}. Ruku v ruce s rozvojem možností aplikace SERS spektroskopie jde i nezbytný vývoj nanostrukturovaných plasmonických substrátů, které svojí strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi nejlépe odpovídají svému konkrétnímu způsobu využití^{9–11}. Při vývoji těchto kovových nosičů se jako modelové analyty používají molekuly s dobrou spektrální odezvou a potenciálem tvořit rovnoměrné vrstvy na povrchu substrátů. Takovou látkou je například 4-aminobenzenthionol (4-ABT), oblíbený hlavně díky jeho tendenci tvořit samoskladné

monovrstvy^{12–14}. V povrchem zesílených spektrech 4-ABT se ovšem často objevují pásy, které nelze přiřadit jeho charakteristickým normálním vibracím¹⁵. Z mnoha teorií nakonec převládá ta, podle které na povrchu plasmonických kovů dochází k fotochemické reakci na 4,4'-dimerkaptoazobenzen (4,4'-DMAB)^{16,17}. Doposud bylo zkoumáno nemálo faktorů ovlivňujících průběh této fotochemické reakce, např. vliv excitační vlnové délky^{17,18}, pH depozičního roztoku¹⁹, užitého plasmonického kovu nebo vkládaného potenciálu²⁰. Často se ovšem jedná o studie neúplné.

Cílem této práce bylo na připravených Ag, Au a Cu velkoplošných substrátech, charakterizovaných pomocí optické a elektronové mikroskopie, sledovat pásy 4-ABT a 4,4'-DMAB a s jejich pomocí posoudit vliv použitého plasmonického kovu a excitační vlnové délky (455, 532, 633, 780 a 1064 nm) na průběh fotochemické reakce 4-ABT. Získané výsledky byly v neposlední řadě porovnány s již dříve publikovanými závěry^{17,18,21}.

Experimentální část

Příprava nanostrukturovaných substrátů

V této práci byly použity velkoplošné Ag, Au a Cu SERS substráty připravené elektrodepozicí na platinové terčíky²⁰. Pt nosiče byly nejprve zbroušeny metalografickými papíry, vyleštěny Al₂O₃ a CaCO₃ a vyčištěny ponořením do směsi H₂SO₄ a H₂O₂ v poměru 3:1 (v/v) na 30 minut. Následně byly vysušeny a pomocí různých proudových sekvencí elektrolyticky pokoveny v příslušných elektrochemických lázních (tab. I). Připravené substráty byly poté ponořeny do depoziční lázně 4-ABT (o koncentraci 1·10⁻⁵ mol dm⁻³), ve které byly ponechány 24 hodin. Následně byly připravené terčíky z roztoků vyjmuty a osušeny v proudu dusíku.

Tabulka I
Proudové sekvence použité k pokovení platinových terčků

[Ag(NH ₃) ₂] ⁺		[Au(NH ₃) ₄] ³⁺		[Cu(NH ₃) ₄] ²⁺	
<i>I</i> [mA]	<i>t</i> [min]	<i>I</i> [mA]	<i>t</i> [min]	<i>I</i> [mA]	<i>t</i> [min]
5	10	5	5	10	10
10	5	10	5	20	10
		15	5	30	10
				40	10
				50	10

Optická a elektronová mikroskopie

Pro pořízení snímků substrátů byl použit disperzní konfokální Ramanův mikroskop DXR (Nicolet, Thermo-Fisher Scientific, USA). Snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Olympus, vybaveného čtyřmi objektivy (10×/0,25 BD (Bright/Dark Field), 20×/0,40 BD, 50×/0,50 BD a 100×/0,90 BD), jenž je součástí Ramanova mikroskopu. Bylo využito objektivu se 100násobným zvětšením.

Pro přesnější studium morfologie substrátů byl použit skenovací elektronový mikroskop (Scanning Electron Microscope – SEM) S-4800 (Hitachi, Japonsko). Snímky byly pořízeny při nastaveném urychlovacím napětí elektronů 10 kV.

SERS spektroskopie

Pro měření SERS spekter s blízkou infračervenou excitací byl použit infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FT-spektrometr) EQUINOX 55 (Bruker, Německo), propojený s Ramanovým modulem FRA 106/S, a disperzní Ramanův mikroskop DXR (Nicolet, Thermo-Fisher Scientific, USA). Jako budící zdroje emitující záření o různých vlnových délkách využívá diodový laser (455 nm), Nd:YAG (Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet) laser buzený laserovými diodami (532 nm), plynový He:Ne laser (633 nm) nebo diodový laser (780 nm). Rozptýlené záření je detekováno pomocí CCD detektoru. Parametry měření pro oba přístroje jsou uvedeny v tab. II. Spektra byla měřena ve 12 různých bodech substrátů a následně zpracována a průměrována programem Omnic 9.

Výsledky a diskuse

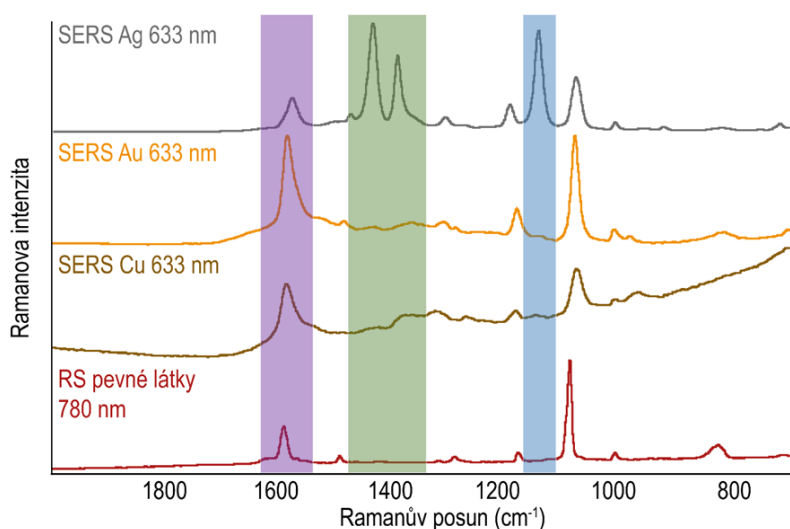
Průběh fotochemické dimerizace byl posuzován pomocí SERS spekter naměřených na jednotlivých plasmnických kovech. Na základě dříve publikovaných prací lze konstatovat, že vznik 4,4'-DMAB se projevuje výskytem několika vybraných pásů ve spektru (obr. 1)^{17,18,20}. V obrázku jsou barevnými pruhy vyznačeny spektrální oblasti, ve kterých se tyto pásy vyskytují a kterým bude dále věnována pozornost.

Tvorba 4,4'-DMAB má vliv na pozici a tvar pásu při 1594 cm⁻¹ (obr. 1, fialový pruh). Jedná se o pás valenční vibrace C=C vazby aromatického kruhu monomeru, tento typ vibrace dimerizované molekuly se vyskytuje okolo 1580 cm⁻¹. Z tohoto důvodu většinou není tato vibrace dimeru ve spektru samostatně pozorovatelná, ale projevuje se deformací intenzivnějšího pásu monomeru. Ve spektrální oblasti 1450 až 1350 cm⁻¹ (obr. 1, zelený pruh) lze při vzniku 4,4'-DMAB pozorovat pásy valenční vibrace N=N vazby (obvykle ≈ 1434 a 1390 cm⁻¹). Tyto pásy bývají v důsledku velké změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu molekuly velmi intenzivní. Obdobně intenzivní pás se nachází okolo 1141 cm⁻¹ (obr. 1, modrý pruh), který přísluší deformační vibraci C-H vazby *ortho*-vodíků na aromatických kruzích dimeru. V zobrazených spektrech se ve všech případech vyskytuje relativně intenzivní pás valenční C–S vibrace 4-ABT (≈ 1080 cm⁻¹)²⁰. Plocha tohoto pásu byla porovnáována s plochou vybraného pásu dimeru za účelem posouzení relativního množství molekul dimeru na površích substrátů.

Tabulka II

Parametry měření jednotlivých SERS spekter 4-ABT na různých površích

	Excitační vlnová délka [nm]	Rozlišení [cm ⁻¹]	Kov	Výkon laseru [mW]	Počet skenů/ Počet expozič	Doba expozice [s]
FT-spektrometr	1064	4	Ag Au Cu	300	1024	1800
Disperzní spektrometr	780	< 5	Ag	1	20	2
			Au	5	20	2
			Cu	5	20	2
	633	< 5	Ag	0,1	20	2
			Au	5	20	2
			Cu	5	20	2
	532	< 5	Ag	0,1	20	2
			Au	5	20	10
			Cu	5	20	2
	455	< 5	Ag	1	20	2
			Au	5	20	10
			Cu	5	20	2



Obr. 1. Srovnání SERS spekter 4-ABT naměřených na Ag, Au a Cu površích při nastavení uvedeném v tab. II a RS spektra pevného 4-ABT měřeného s excitační vlnovou délkou 780 nm, výkonem 80 mW a expoziční 10×1 s. Barevnými pruhy jsou vyznačeny spektrální oblasti, ve kterých lze prokazatelně pozorovat pásy 4,4'-DMAB

Stříbrný zesilující substrát

Na obr. 2 jsou znázorněny snímky stříbrného povrchu pořízené pomocí optické a elektronové mikroskopie. Je patrné, že došlo k vytvoření dendritických Ag struktur. Stříbrný povrch byl relativně souvislý a až na několik menších ploch byl povrch Pt terčíku pokryt zobrazenými nanostrukturami.

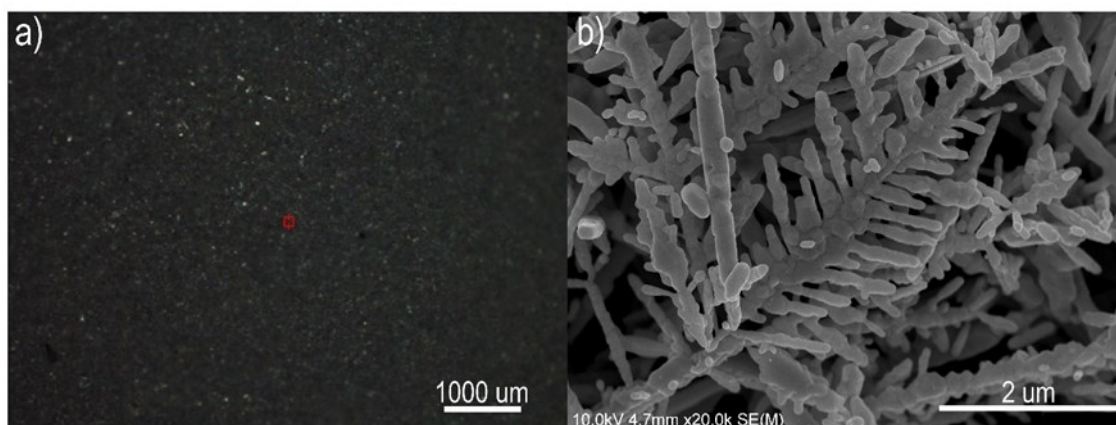
Obr. 3 zobrazuje SERS spektra 4-ABT na Ag povrchu pořízená s užitím rozdílných excitačních vlnových délek. V nejvyšší sledované spektrální oblasti je patrné, že dochází k deformaci pásu při 1594 cm^{-1} . Ve spektru naměřeném s excitační vlnovou délkou 780 nm jsou dobře pozorovatelná dvě maxima, způsobená přítomností 4,4'-DMAB. Spolu s dalším posunem k nižším vlnovým délkám dochází k posunu maxima k nižším hodnotám Ramanova posu-

nu. Ve spektru jsou také přítomny pásy s maximem při 1437, 1394 a 1146 cm^{-1} . Díky nim je možné s jistotou prohlásit, že na Ag povrchu dochází ke vzniku 4,4'-DMAB.

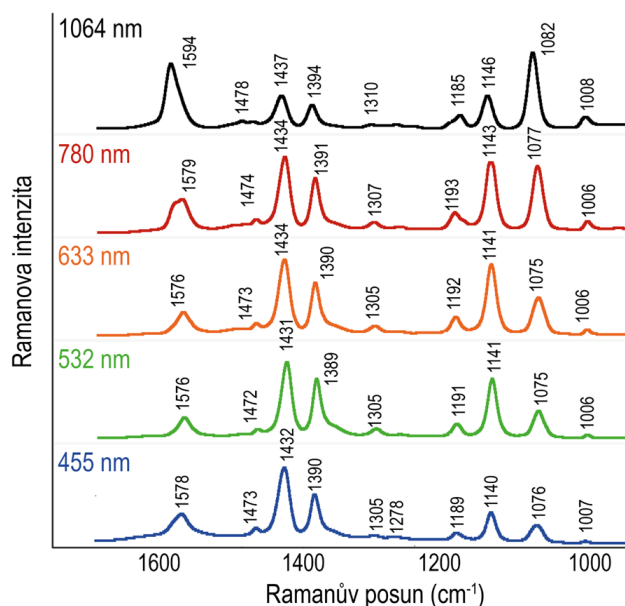
Ze závislosti poměru ploch pásů 1437/1082 cm^{-1} (4,4'-DMAB/4-ABT) na vlnové délce a energii záření je evidentní, že s klesající vlnovou délkou (rostoucí energií) dochází ke vzniku 4,4'-DMAB ve větší míře (obr. 4), což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky^{17,19}.

Zlatý zesilující substrát

Snímky Au povrchu z optického a elektronového mikroskopu jsou zobrazeny na obr. 5. Na Pt terčíku došlo k vytvoření dendritických Au struktur, do určité míry drobnějších a odlišně uspořádaných než v případě Ag sub-



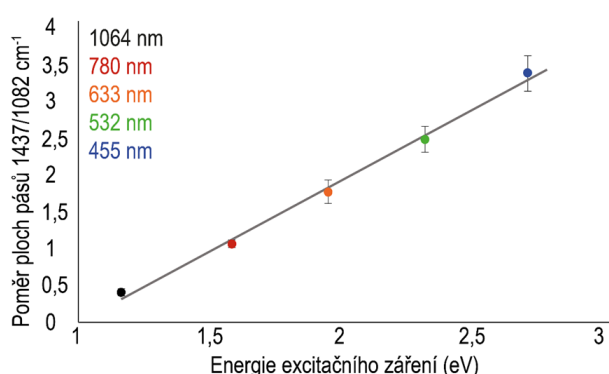
Obr. 2. Snímek Ag povrchu pořízený a) optickým a b) skenovacím elektronovým mikroskopem. Červený čtverec označuje stopu laseru



Obr. 3. SERS spektra 4-ABT/4,4'-DMAB na Ag povrchu, měřená s nastavením uvedeným v tab. II

strátu. Oproti stříbrnému povrchu ovšem nedošlo k zcela rovnoměrnému pokrytí Pt terčíku a na jeho povrchu došlo k vytvoření zlatých „ostrůvků“. Při měření SERS spekter byla stopa laseru směřována právě do těchto oblastí.

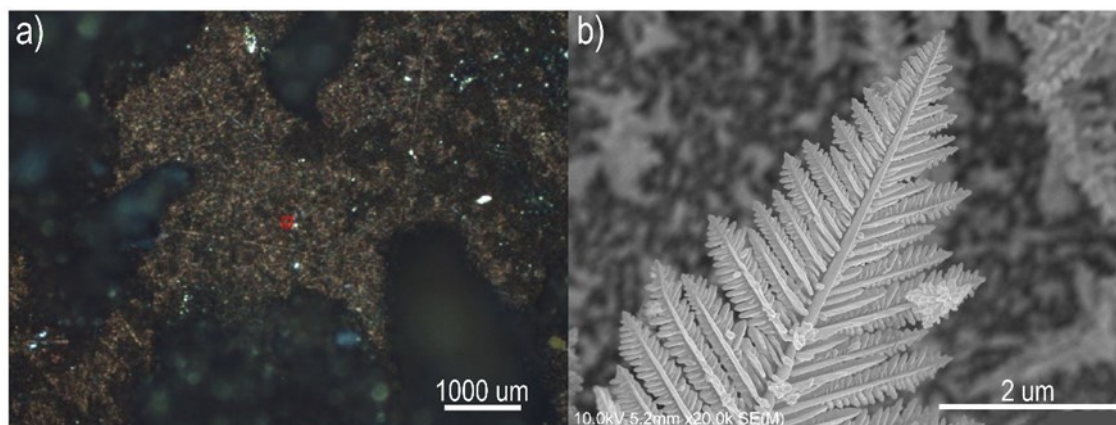
SERS spektra 4-ABT na Au povrchu jsou uvedena na obr. 6. V tomto případě nebyly pásy 4,4'-DMAB na první pohled patrné a prokazatelné. Ze zjištěných skutečností je ale možné usuzovat, že ke tvorbě malého množství molekul dimeru na Au povrchu dochází. Například u pásu 1590 cm^{-1} dochází postupně spolu s klesající hodnotou excitační vlnové délky k rozšiřování tohoto pásu, což svědčí o navyšování množství dimeru. U spektra měřeného s excitační vlnovou délkou 633 nm můžeme také pozorovat



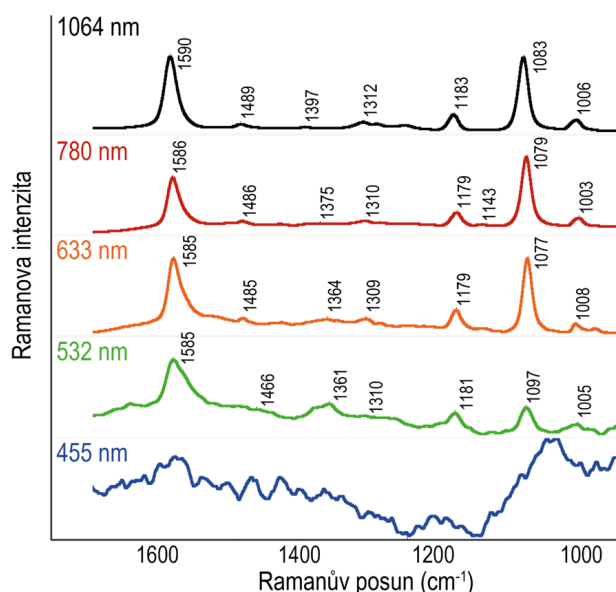
Obr. 4. Závislost poměru ploch pásů $1437/1082\text{ cm}^{-1}$ na energii záření

vat mírně zvýšené pozadí při 1430 , 1364 a 1140 cm^{-1} , tedy právě v místech, kde jsou pásy 4,4'-DMAB očekávatelné. Je pravděpodobné, že ve spektrech měřených s excitačními vlnovými délkami 455 a 532 nm by byly pásy dimeru již dobře patrné. Pro takto připravené zlaté povrchy už ale tyto vlnové délky nejsou vhodné, k zesílení Ramanova rozptylu zde dochází již v mnohem menší míře³⁰. I přesto můžeme ve spektru měřeném s budícím zářením 532 nm tušit další rozšíření pásu 1590 cm^{-1} a nárůst intenzity pásů 1430 a 1364 cm^{-1} . Je také patrné, že při vlnové délce dopadajícího záření 455 nm zde již k SERS jevu vůbec nedochází, neboť nejsou pozorovatelné ani pásy analytu v monomerní formě. Z vyjmenovaných důvodů nebylo možné zjistit exaktní závislost množství dimeru na charakteru dopadajícího záření, ačkoliv je pravděpodobný podobný trend jako v případě Ag substrátu, tedy že se zvyšující energií záření dochází k reakci častěji.

Tvorba dimeru na Au povrchu byla dříve v literatuře již zaznamenána, a to s mnohem intenzivnějším signálem²⁰. Je možné, že k rozdílným výsledkům dochází z důvodu odlišné nanostruktury zde připraveného substrátu



Obr. 5 Snímek Au povrchu pořízený a) optickým a b) skenovacím elektronovým mikroskopem. Červený čtverec označuje stopu laseru



Obr. 6. SERS spektra 4-ABT/4,4'-DMAB na Au povrchu, měřená s nastavením uvedeným v tab. II

tu. Jiným postupem mohly být připraveny struktury rozdílných tvarů i velikostí, které mohly lépe vyhovovat podmínkám fotochemické reakce, a zároveň také mohly být SERS-aktivní i při použití nižších vlnových délek laseru.

Měděný zesilující substrát

Na obr. 7 můžeme pozorovat mikroskopické snímky Cu povrchu. Oproti Ag a Au povrchům zde dochází ke tvorbě sférických („květákových“) struktur, které tvoří objekty rozličné výšky. Rozdíly ve výškách jednotlivých struktur jsou poměrně značné, v případě obr. 7, kdy byl laser fokusován na jednu z nejvyšších struktur na povrchu, je v pozadí vidět množství nižších objektů. Nejlepších

SERS spekter bylo dosaženo při fokusaci laseru na místa styku vyvýšených objektů, při fokusaci na vrcholky těchto struktur byl výsledný signál nepoměrně slabší.

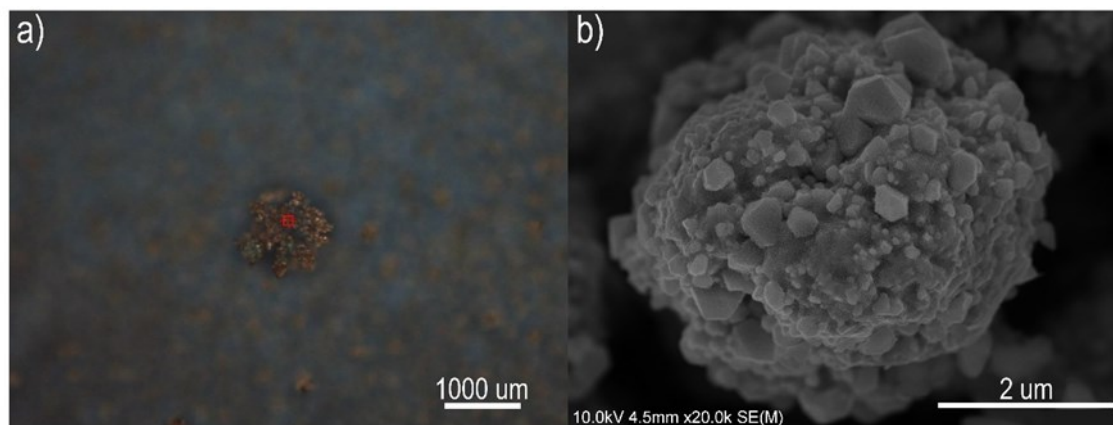
Ze SERS spekter naměřených na Cu povrchu (obr. 8) je patrné, že u tohoto substrátu nedocházelo k zesílení signálu v takové míře, jako u Ag a Au povrchů, což je dáno optickými vlastnostmi kovu^{7,14}. Kvůli slabé intenzitě rozptýleného záření nebyl ve spektru měřeném s excitací vlnovou délkou 1064 nm pozorován žádný signál. Pásky 4-ABT byly pozorovatelné ve spektrech měřených s vlnovými délkami budícího záření 780 a 633 nm, ačkoliv signál v prvním jmenovaném spektru byl poměrně slabý. V případě spektra měřeného s excitací vlnovou délkou 633 nm opět vidíme relativně široký pás při 1587 cm^{-1} . Je tedy možné, že k tvorbě dimeru zde dochází také, ačkoliv opět ve velmi malé míře, více při dopadu záření o nižších vlnových délkách (532 a 455 nm). V těchto spektrech ovšem nebylo možné signál analytu přes vysokou intenzitu šumu pozorovat. Z těchto důvodů není v případě Cu povrchu možné mluvit o jakémkoliv trendu týkajícím se vzniku 4,4'-DMAB na jeho nanostrukturách.

V literatuře byl vznik dimeru na Cu povrchu zaznamenán²³, ačkoliv výsledky z jeho měření jsou v literatuře někdy odlišné^{18,20}. Příklad spekter 4-ABT, ve kterých jsou patrné pásy 4,4'-DMAB, je uveden na obr. 9 (cit.²³). Je tak pravděpodobné, že u Cu povrchů hraje velmi významnou roli v průběhu fotochemické dimerizace právě struktura konkrétně připraveného povrchu a vlnová délka (energie) zvoleného záření.

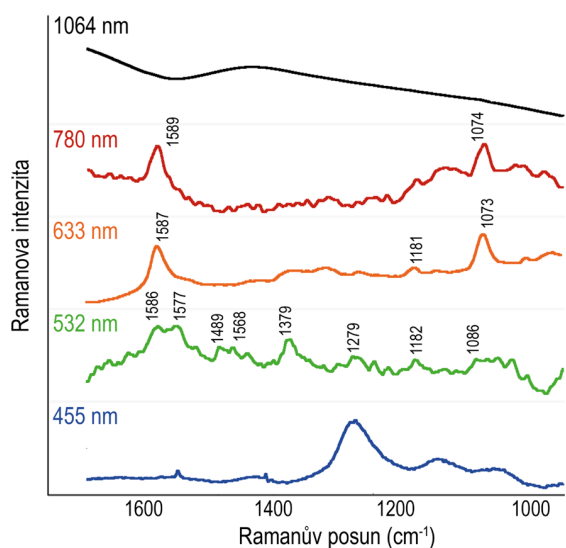
Závěr

V rámci této práce byl SERS spektroskopii sledován průběh fotochemické dimerizace 4-ABT na velkoplošných Ag, Au a Cu povrchích, připravených elektrolytickým pokováním. Kromě vlivu kovu byl posuzován i vliv vlnové délky dopadajícího budícího záření.

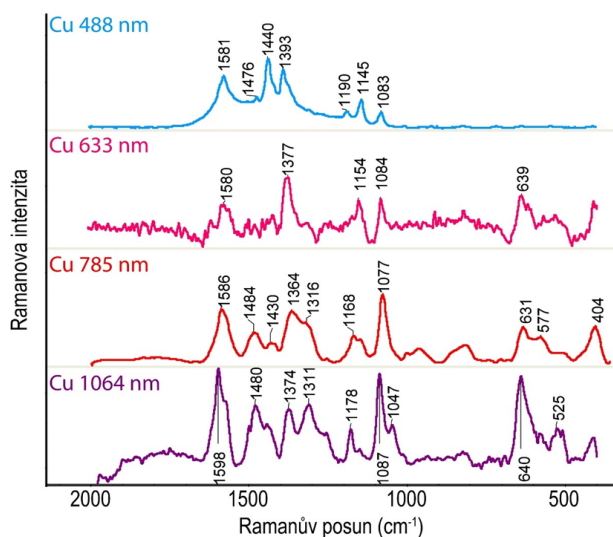
V souladu s dřívějšími experimenty bylo zjištěno, že k reakci dochází v největší míře na stříbrných substrátech,



Obr. 7. Snímek Cu povrchu pořízený a) optickým a b) skenovacím elektronovým mikroskopem. Červený čtverec označuje stopu laseru



Obr. 8. SERS spektra 4-ABT/4,4'-DMAB na Cu povrchu, měřená s nastavením uvedeným v tab. II



Obr. 9. SERS spektra 4-ABT na Cu substrátu s patrnými pásy 4,4'-DMAB. Převzato a upraveno z cit.²³

o poznání méně pak na zlatých substrátech. Průběh reakce lze očekávat i na Cu substrátu, v jehož spektrech naměřených s viditelnou excitací je patrný vznik nových pásů. Vzhledem k relativně velkým rozdílům mezi publikovanou literaturou a zde zkoumaným substrátem lze usuzovat, že v případě Cu substrátů hraje významnou roli velikost a tvar vytvořené nanostruktury.

Zároveň byl potvrzen předpoklad, že stupeň přeměny fotochemické reakce roste s energií dopadajícího záření, tedy s klesající vlnovou délkou. U Ag substrátu, v jehož spektrech byl signál 4,4'-DMAB velmi dobře pozorovatelný,

byla zjištěna lineární závislost množství dimeru na energii dopadajícího záření.

V rámci dalších experimentů bude zkoumána také závislost míry dimerizace na rozdílně připravených plasmonických nanostrukturách, například na kovových koloidních systémech nebo velkoplošných substrátech připravených galvanickou deposicí. Spolu s postupným posuzováním vlivu pH, vkládaného napětí a dalších reakčních proměnných by pak mělo být možné sestavit přibližný model reakce, který by mohl sloužit k odhadu dimerizace na dosud nezkoumaných substrátech.

LITERATURA

1. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J.: *Chem. Phys. Lett.* 26, 163 (1974).
2. Švecová M., Ulbrich P., Dendisová M., Matějka P.: *Spectrochim. Acta, Part A* 195, 236 (2018).
3. Markina N. E., Markin A. V., Zakharevich A. M., Goryacheva I. Y.: *Microchim. Acta* 184, 3937 (2017).
4. Ek Weis J., Costa S., Frank O., Fridrichová M., Vlčková B., Vejpravova J., Kalbac M.: *J. Phys. Chem. C* 121, 11680 (2017).
5. Honma I., Sano T., Komiyama H.: *J. Phys. Chem.* 97, 6692 (1993).
6. Schlücker S.: *ChemPhysChem* 10, 1344 (2009).
7. Procházka M.: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, Springer 2016.
8. Stepula E., Wang X.-P., Srivastav S., König M., Levermann J., Kasimir-Bauer S., Schlücker S.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 32321 (2020).
9. Schütz M., Steinigeweg D., Salehi M., Kömpe K., Schlücker S.: *Chem. Commun.* 47, 4216 (2011).
10. Kalachyova Y., Erzina M., Postnikov P., Svorcik V., Lyutakov O.: *Appl. Surf. Sci.* 458, 95 (2018).
11. Guselnikova O., Kalachyova Y., Hrobonova K., Trusova M., Berek J., Postnikov P., Svorcik V., Lyutakov O.: *Sens. Actuators, B* 265, 182 (2018).
12. Dendisová M., Vyškovská M., Prokopec V., Člupek M., Matějka P.: *J. Raman Spectrosc.* 43, 181 (2012).
13. Kokaislová A., Brazdova S., Prokopec V., Člupek M., Čejková J., Matějka P.: *Chem. Listy* 103 (2009).
14. Čejkova J., Prokopec V., Brazdova S., Kokaislova A., Matějka P., Štěpánek F.: *Appl. Surf. Sci.* 255, 7864 (2009).
15. Huang Y.-F., Zhu H.-P., Liu G.-K., Wu D.-Y., Ren B., Tian Z.-Q.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9244 (2010).
16. Vidal-Iglesias F. J., Solla-Gullón J., Rodes A., Feliu J. M., Pérez J.: *Surf. Sci.* 631, 213 (2015).
17. Kim K. L., Lee S. J., Kim K.: *J. Phys. Chem. B* 108, 9216 (2004).
18. Vidal-Iglesias F. J., Solla-Gullón J., Orts J. M., Rodes A., Pérez J. M.: *J. Phys. Chem. C* 119, 12312 (2015).
19. Kim K., Kim K. L., Shin D., Choi J.-Y., Shin K. S.: *J. Phys. Chem. C* 116, 4774 (2012).
20. Dendisová M., Havránek L., Ončák M., Matějka P.: *J. Phys. Chem. C* 117, 21245 (2013).
21. Shin D.: *J. Raman Spectrosc.* 48, 343 (2017).
22. Volochanský O.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha,

Praha 2019.

23. Dendisová M.: *Dizertační práce*. VŠCHT Praha, Praha 2014.

I. Kopal^a, M. Švecová^b, T. Čapková^c, and M. Dendisová^a (^a*Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague;* ^b*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague;* ^c*Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University in Zlín, Zlín*): **Ex-situ Analysis of the Product of the Photochemical Reaction of 4-Aminobenzenethiol on the Surfaces of Plasmonic Substrates**

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is currently a technique used in many areas of chemical, physical, and biomedical research. The necessary development of nanostructured plasmonic substrates goes hand in hand with the development of SERS spectroscopy. In the development of these metal plasmonic surfaces, molecules with

a good spectral response and the potential to form uniform layers on the surface of the substrates are selected as model analytes. Such a compound is, for example, 4-aminobenzenethiol (4-ABT). However, vibrational modes that cannot be attributed to its characteristic normal vibrations often appear in the surface-enhanced spectra of 4-ABT. According to current knowledge, this is because of a photochemical reaction to 4,4'-dimercaptoazobenzene (4,4'-DMAB) catalysed on the surfaces of plasmonic substrates. This fact is a complication in testing the SERS activity of newly prepared substrates.

This work aimed to monitor bands of 4-ABT and 4,4'-DMAB on prepared Ag, Au, and Cu large-scaled substrates, characterized by electron microscopy, and to assess the influence of used plasmonic metal and excitation wavelength (455, 532, 633, 780, and 1064 nm) on the course of the photochemical reaction of 4-ABT.

Keywords: surface-enhanced Raman scattering, 4-aminobenzenethiol, plasmonic substrates, effect of excitation, photochemistry

SERS DETEKCE VYBRANÝCH AMINOKYSELIN POMOCÍ GALVANICKY PŘIPRAVENÝCH SUBSTRÁTŮ

ADÉLA KORYŤÁKOVÁ^a, OLEKSANDR VOLOCHANSKYI^b a MARIE ŠVECOVÁ^a

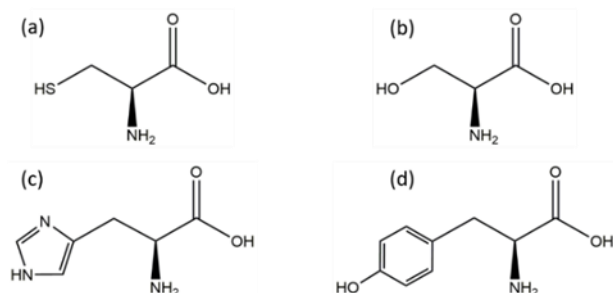
^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Ústav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
korytaka@vscht.cz

Klíčová slova: cystein, histidin, serin, tyrosin, Ramanova spektroskopie, SERS, galvanická depozice

Úvod

Jedním z možných analytů, které lze studovat pomocí SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) spektroskopie jsou aminokyseliny (AMK). Jedná se o přírodní látky, jež mají rozmanitou strukturu a různorodou biologickou funkci. Jednou z nich je tvorba proteinů ve všech živých organismech. Avšak tuto funkci má pouze 21 aminokyselin, které se nazývají proteinogenní. Dále se jedná o důležité prekurzory pro jiné látky těla vlastní (např. pro neurotransmitery). Z této skupiny látek byly vybrány čtyři AMK s rozdílným typem skeletu (alifatický, aromatický, heterocyklický) a obsahující různé další funkční skupiny ovlivňující afinitu látek k zesilujícímu substrátu. Jedná se o cystein (Cys), serin (Ser), histidin (His) a tyrosin (Tyr). Strukturální vzorce vybraných AMK jsou uvedeny na obr. 1. Cílem této předkládané práce je především volba vhodného plasmonického kovu pro zesílení Ramanova signálu aminokyselin. K přípravě SERS substrátů byla použita bezproudová galvanická depozice na hliníkový podklad, která umožňuje snadnou a rychlou přípravu účinných zesilujících substrátů. Dále byl sledován vliv excitační vlnové délky na celkovou spektrální odezvu vybraných aminokyselin a orientace jednotlivých aminokyselin vůči zesilujícímu substrátu. Získaná data byla interpretována pomocí dostupné literatury doplněné o kvantově chemické výpočty.



Obr. 1. Strukturální vzorce (a) L-cysteinu, (b) L-serinu, (c) L-histidinu, (d) L-tyrosinu

Experimentální část

Jednotlivé hliníkové podložky o rozměrech 5×5 mm byly galvanicky pokoveny v roztocích CuCl₂, AgNO₃ a Au, Ag a Cu komplexních lázních po dobu 10 nebo 15 min (v případě Cu lázně), optimální depoziční časy pro jednotlivé lázně vychází z předchozí studie¹. Takto připravené zesilující substráty byly ponořeny na 18 h do roztoku příslušných analytů o koncentraci 1·10⁻⁴ mol l⁻¹. Po adsorpci analytu na plasmonický substrát byly hliníkové plíšky osušeny v proudu dusíku. Amoniakální depoziční lázně byly připraveny podle již dříve publikovaných studií^{1,2}. Roztoky solí byly připraveny rozpuštěním příslušného množství pevné látky v ultračisté vodě (viz tab. I).

Pro měření SERS spekter byl využit přenosný Ramanův spektrometr iRamanTMPlus (B&W Tek, USA) s excitační vlnovou délkou 785 nm a spektrometr s Fourierovou transformací EQUINOX 55/S vybavený Ramanovým modulem FRA 106/S (Bruker Optik, Německo) s excitační vlnovou délkou 1064 nm. Spektra byla získána v 6 různých bodech vzorku. Konkrétní nastavení přístrojů je uvedeno v tab. II.

Kvantově chemické výpočty pro predikci vibračních spekter byly provedeny v softwaru Gaussian 16W na úrovni teorie funkcionálu hustoty (DFT, Density Functional

Tabulka I

Depoziční lázně použité pro bezproudovou depozici galvanickým vylučováním

Substrát	Ag		Au		Cu
Forma	[Ag(NH ₃) ₂] ⁺	AgNO ₃	[Au(NH ₃) ₄]Cl ₃	[Cu(NH ₃) ₄]Cl ₂	CuCl ₂
Koncentrace [mol l ⁻¹]	0,01	0,1	0,1	0,1	0,04
pH	10,347	8,168	2,304	12,724	4,441

Tabulka II
Nastavení použitých přístrojů

Excitační vlnová délka [nm]	Rozlišení [cm^{-1}]	Výkon laseru [mW]	Expozice/počet skenů
785	5	105	5×30 [s]
1064	4	300	1064 skenů

Theory). Struktury aminokyselin byly nejdříve optimalizovány do minima jejich energií a následně byla predikována Ramanova spektra s využitím stejných parametrů. Byl použit funkcionál B3LYP a sada bazových funkcí 6-311g⁺⁺.

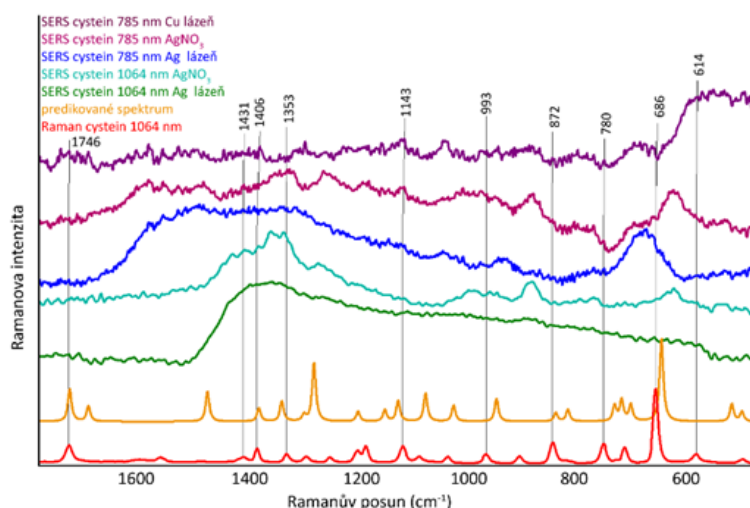
Výsledky a diskuse

Na základě dostupné literatury³⁻⁷ byly v Ramanových spektrech čisté látky přiřazeny charakteristické pásy jednotlivým vibracím. Tyto údaje byly dále porovnány s predikovanými hodnotami Ramanova posunu. Následně byla porovnána SERS spektra AMK s příslušným Ramanovým spektrem čisté látky. Přehled charakteristických vibrací je vždy uveden v tabulce u odpovídající aminokyseliny. V následující části předkládané práce budou diskutovány výsledky získané na substrátech připravených v Ag lázni, Cu lázni a roztoku AgNO₃ při různých excitačních vlnových délkách. Ve výsledcích nejsou zmíněna SERS spektra substrátů deponovaných v Au lázni a roztoku CuCl₂, neboť bylo zjištěno, že neposkytují odezvu žádné ze studovaných aminokyselin a nejsou tedy vhodné pro jejich detekci.

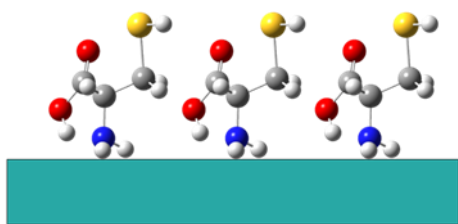
SERS spektra cysteinu

Na obr. 2 je uvedeno porovnání Ramanova spektra cysteinu, predikovaného spektra a jeho SERS spekter získaných depozicí na substrátech připravených v roztoku AgNO₃, Ag lázni a Cu lázni při různých excitačních vlnových délkách (785 a 1064 nm). Je možné si povšimnout, že zesíleny jsou pouze některé pásy v porovnání se spektrem čisté látky. Z pohledu průběhu SERS spekter lze soudit, že vhodnější excitační vlnovou délkou pro detekci cysteinu je 1064 nm, při které je největší poměr signálu k šumu. Avšak i u substrátů připravených v roztoku AgNO₃ měřených při excitační vlnové délce 785 nm jsou zesílené jednotlivé charakteristické pásy cysteinu. U substrátů připravených v Cu lázni jsou jednotlivé pásy zesíleny nejméně. To může být způsobené tím, že analyt se váže různým způsobem na jednotlivé plasmonické kovy a míra zesílení se tím může lišit. Další možný důvod je ten, že obecně měď zesiluje méně v porovnání s Ag a Au povrchy.

Nejvýraznějším pásem je v tomto spektru pás, jenž odpovídá interakci analytu s kovem. Cystein ve své struktuře obsahuje atom síry, která se velmi silně váže na zesilující substráty a tím poskytuje velmi dobrou odezvu v SERS spektrech všech analytů, jež tento atom obsahují, avšak v tomto případě je možné, že jednotlivé dvojice molekul cysteinu tvoří mezi sebou disulfidické můstky



Obr. 2. Porovnání Ramanova spektra čisté látky, predikovaného spektra a SERS spekter cysteinu (koncentrace depozičního roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) získaných na substrátech připravených v Ag lázni, Cu lázni a roztoku AgNO₃ s využitím excitačních vlnových délek 785 nm a 1064 nm. Spektra jsou uvedena v „off-set scale“ režimu



Obr. 3. Orientace molekuly cysteinu vůči substrátu

a tím vzniká molekula cystinu. Tato molekula již nemá volný atom S a to způsobuje menší míru afinity k zesilujícímu substrátu a i jinou orientaci cysteinu k substrátu (obr. 3). V tomto případě je pravděpodobná interakce přes karboxylovou skupinu a aminoskupinu se substrátem (nejvíce zesílené pásy). V tab. III je uveden přehled charakteristických vibrací cysteinu.

SERS spektra serinu

Obr. 4 zobrazuje porovnání SERS spekter serinu získaných na substrátech připravených v Ag lázni, AgNO_3 a Cu lázni a predikovaného spektra. Z obrázku je patrné, že vhodnější depoziční lázni pro přípravu substrátu v případě detekce serinu je roztok AgNO_3 . Nastává zde zesílení většiny vyznačených charakteristických pásů čisté látky, které napovídají, jak bude molekula orientována vůči substrátu – opět karboxylovou skupinou a aminoskupinou k povrchu, samotná hydroxylová skupina interaguje se substrátem méně z důvodu menší afinity (obr. 5). Naopak nejméně vhodný plasmonický kov pro detekci serinu je Cu, jelikož zde nejsou zesíleny žádné pásy a ve spektru je možné pozorovat pouze charakteristické pásy oxidů

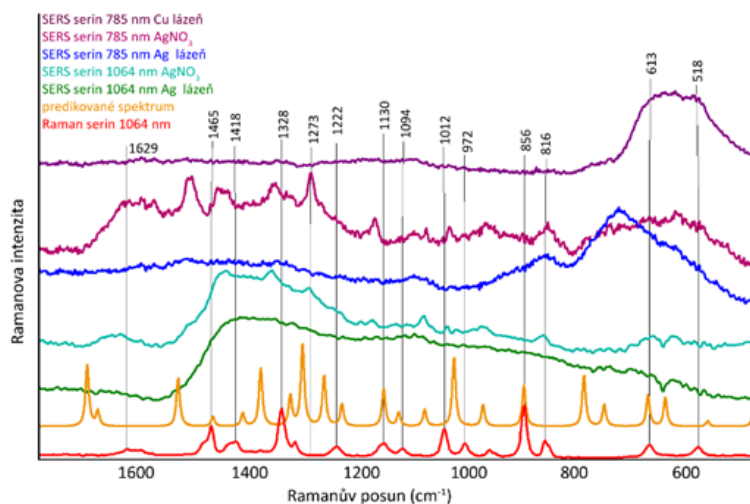
Tabulka III

Přehled charakteristických vibrací cysteinu (1064 nm)

Experiment	Ramanův posun [cm^{-1}]		Přiřazení ^a
	DFT predikce	cit. ³	
614	–	623	$\delta_{\text{oop}}(\text{C}=\text{O})$
686	676	688	$\nu(\text{C}-\text{S})$
780	760	782	$\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$
872	867	879	$\delta(\text{S}-\text{H})$
993	–	997	$\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1143	1151	1145	$\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1353	1361	1355	$\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$
1406	1402	1405	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1431	–	1433	$\delta(\text{CH}_2)$
1746	1744	–	$\nu(\text{C}=\text{O})$

^a ν – valenční vibrace, ν_s – symetrická valenční vibrace, δ – deformační vibrace, δ_{rock} – kývavá deformační vibrace, δ_{oop} – deformační mimorovinná vibrace

mědi v oblasti cca 550 cm^{-1} . V případě SERS spekter substrátů připravených v Ag lázni je zde také pás značící interakci kovu s analytem (cca 700 cm^{-1}) a při použití excitační vlnové délky 1064 nm jsou ve spektrech slabé náznaky charakteristických pásů. Z pohledu vlivu excitační vlnové délky je výhodnější záření o vlnové délce 785 nm z toho důvodu, že dochází k lepšímu vykreslení jednotlivých pásů ve spektru, na druhou stranu se zde objevuje větší šum na úrovni základní linie. Celková špatná odezva

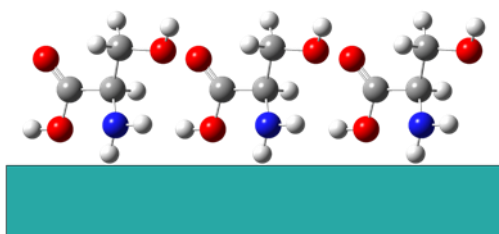


Obr. 4. Porovnání Ramanova spektra čisté látky, predikovaného spektra a SERS spekter serinu (koncentrace depozičního roztoku $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) získaných na substrátech připravených v Ag lázni, Cu lázni a roztoku AgNO_3 s využitím excitačních vlnových délek 785 nm a 1064 nm. Spektra jsou uvedena v „off-set scale“ režimu

Tabulka IV
Přehled charakteristických vibrací serinu (1064 nm)

Experiment	Ramanův posun [cm^{-1}]		Přiřazení ^a
	DFT predikce	cit. ⁴	
518	582	539	$\delta_{\text{wag}}(\text{COO}^-)$
613	616	620	$\delta(\text{COO}^-)$
816	–	811	$\delta_{\text{rock}}(\text{COO}^-)$
856	857	852	$\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{C}-\text{C})$
972	993	976	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1012	1050	1043	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1094	1100	1086	$\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1130	1129	1134	$\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1222	1211	1242	$\delta(\text{C}-\text{OH})$
1273	1287	1287	$\delta_{\text{rock}}(\text{C}-\text{H})$
1328	1368	1312	$\delta_{\text{wag}}(\text{CH}_2)$
1418	1462	1411	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1465	1529	1468	$\delta(\text{CH}_2)$
1629	1712	1610	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$

^a ν – valenční vibrace, ν_{s} – symetrická valenční vibrace, δ – deformační vibrace, δ_{rock} – kývavá deformační vibrace, δ_{as} – deformační asymetrická vibrace, δ_{wag} – deformační vějířová vibrace



Obr. 5. Orientace molekuly serinu vůči substrátu

tohoto analytu na všech zesilujících substrátech může být způsobena tím, že serin ve své struktuře neobsahuje mnoho heteroatomů, přes které by se mohl vázat na zesilující substráty, a pravděpodobně tak dochází ke kontaktu s povrchem pouze v důsledku nevazebných interakcí. Charakteristické vibrace serinu jsou uvedeny v tab. IV.

SERS spektra histidinu

Na obr. 6 jsou uvedena SERS spektra histidinu získaná po depozici na substráty připravené v Ag lázni, roztoku AgNO_3 a Cu lázni a porovnaná s predikovaným spektrem a spektrem čisté látky. SERS spektra histidinu připravené-

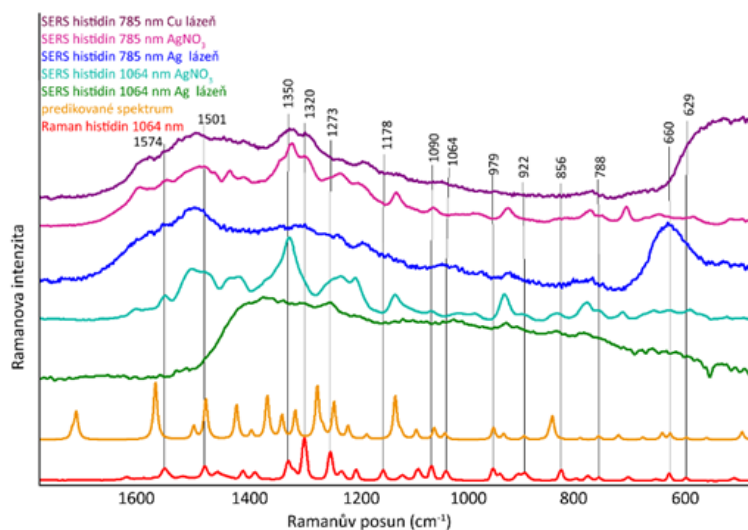
ho na substrátech připravených v roztoku AgNO_3 mají velice podobný průběh zesílení jednotlivých pásů při obou vlnových délkách. Avšak při excitační vlnové délce 1064 nm je pozorována vyšší intenzita zesílených pásů. U substrátů připravených v Ag lázni nejsou rozlišitelné jednotlivé pásy, a tedy splývají do jednoho širokého pásu. Také se u těchto spekter projevuje větší šum na úrovni základní linie. Velmi podobný průběh zesíleného spektra vykazují i substráty připravené v Cu lázni, s tím rozdílem, že jednotlivé pásy jsou méně intenzivní, a tedy jsou jednotlivé pásy hůře rozlišitelné.

Celkově dobrá odezva histidinu na vybraných substrátech je způsobena tím, že histidin ve své struktuře obsahuje imidazolový kruh, obsahující dva atomy dusíku, které se snadno váží na povrch zesilujících substrátů (nejintenzivnější ve spektru jsou pásy heterocyklu, což značí kolmou interakci se substrátem, obr. 7). Z pohledu použití různé vlnové délky budícího záření není mnoho rozdílů, avšak z pohledu plasmonických substrátů je nevhodnější v tomto případě substrát připravený v roztoku AgNO_3 . V tab. V jsou uvedeny jednotlivé vibrace histidinu.

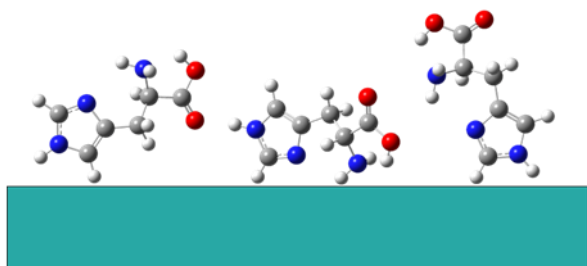
Tabulka V
Přehled charakteristických vibrací histidinu (1064 nm)

Experiment	Ramanův posun [cm^{-1}]		Přiřazení ^a
	DFT predikce	cit. ⁵	
629	630	621	δ_{ip} kruhu
660	659	652	δ_{ip} kruhu
788	791	781	$\delta(\text{COOH})$
856	–	850	$\nu(\text{C}-\text{C})$, δ kruhu
922	922	917	$\nu(\text{C}-\text{H})$
979	978	972	$\nu(\text{C}-\text{H})$, δ kruhu
1064	1066	1057	$\delta(\text{N}-\text{H})$
1090	1085	1084	$\nu(\text{C}-\text{N})$, $\delta(\text{C}-\text{H})$
1178	1155	1171	$\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$, $\delta_{\text{ip}}(\text{N}-\text{H})$
1273	1266	1267	$\delta(\text{C}-\text{H})$
1320	1336	1315	$\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$
1350	1360	1345	$\nu(\text{C}=\text{N})$
1501	1520	1496	$\delta_{\text{ip}}(\text{N}-\text{H})$
1574	1589	1568	$\nu(\text{C}=\text{C})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$

^a ν – valenční vibrace, δ – deformační vibrace, δ_{ip} – deformační rovinná vibrace



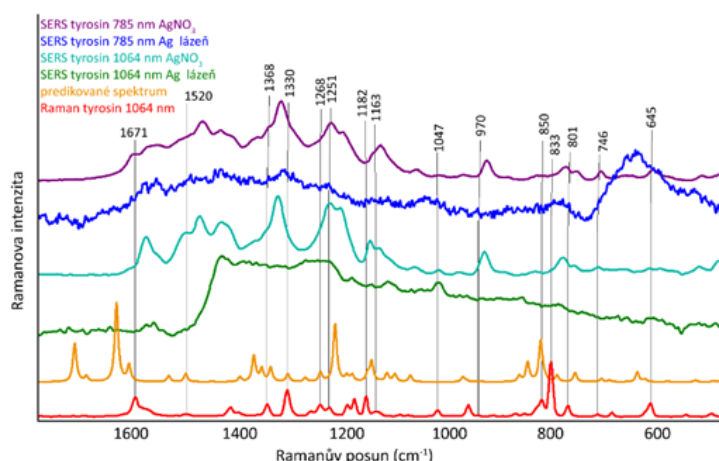
Obr. 6. Porovnání Ramanova spektra čisté látky, predikovaného spektra a SERS spekter histidinu (koncentrace depozičního roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1}) získaných na substrátech připravených v Ag lázni, Cu lázni a roztoku AgNO_3 s využitím excitačních vlnových délek 785 nm a 1064 nm. Spektra jsou uvedena v „off-set scale“ režimu



Obr. 7. Možnosti orientace molekuly histidinu vůči substrátu

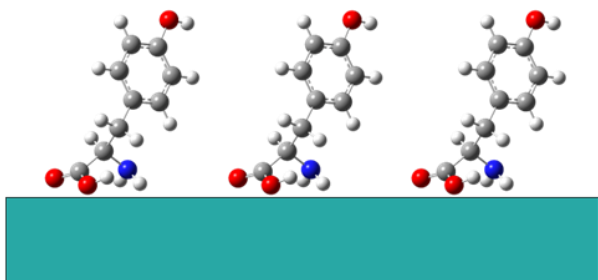
SERS spektra tyrosinu

Obr. 8 udává porovnání SERS spekter tyrosinu získaných na substrátech připravených v Ag lázni a roztoku AgNO_3 při obou testovaných excitačních vlnových délkách. V případě tohoto analytu ani substráty připravené v Cu lázni neposkytovaly žádnou odezvu. Označené charakteristické pásy jsou zesíleny téměř ve všech SERS spektrech. U substrátů připravených v roztoku AgNO_3 jsou jednotlivé charakteristické pásy lépe rozlišitelné než u substrátů připravených v Ag lázni. Při porovnávání sub-



Obr. 8. Porovnání Ramanova spektra čisté látky, predikovaného spektra a SERS spekter tyrosinu (koncentrace depozičního roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ mol Γ^{-1}) získaných na substrátech připravených v Ag lázni a roztoku AgNO_3 s využitím excitačních vlnových délek 785 nm a 1064 nm. Spektra jsou uvedena v „off-set scale“ režimu

strátů připravených v roztoku AgNO_3 z hlediska výhodnější použité excitační vlnové délky je možné si povšimnout, že při vlnové délce 1064 nm jsou některé pásy více zesíleny (např. pás 1617 cm^{-1} nebo 1163 cm^{-1}) a prokresleny, proto tato vlnová délka bude vhodnější pro detekci tyrosinu. V případě substrátů připravených v Ag lázni nenastává takové zesílení, díky kterému by bylo možné rozlišit od sebe jednotlivé pásy tyrosinu, a navíc se u nich projevuje ve větší míře šum na úrovni základní linie. V případě detekce tyrosinu jsou patrné změny v relativních intenzitách vybraných pásů při použití různých vlnových délek pro excitaci systému. To znamená, že volbou budícího záření může docházet k ovlivnění příspěvku chemického



Obr. 9. Orientace molekuly tyrosinu vůči substrátu

Tabulka VI

Přehled charakteristických vibrací tyrosinu (1064 nm)

Experiment	Ramanův posun [cm^{-1}]		Přiřazení ^b
	DFT predikce	cit. ⁶	
645	655	642	δ kruhu
746	738	715	$\tau(\text{O}-\text{C}-\text{C}_\alpha-\text{C})$
801	787	810	δ_{wag} alif., $\delta_{\text{sc}}(\text{O}-\text{C}-\text{O})$
833	822	823	δ_{wag} kruhu, $\delta_{\text{sc}}(\text{O}-\text{C}-\text{O})$
850	852	853	δ kruhu, $\tau(\text{C}-\text{C}_\alpha-\text{CH})$
970	–	965	$\nu(\text{C}_\alpha-\text{C})$, $\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1047	–	1042	$\delta_{\text{rock}}(\text{NH}_3^+)$
1163	1171	1140	δ kruhu
1182	1180	1164 ^a	ν alif.
1251	1239	1249 ^a	$\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$
1268	1267	1284 ^a	ν alif.
1330	1329	1327 ^a	$\delta_{\text{ip}}(\text{C}-\text{C}_\alpha-\text{H})$
1368	1361	1365 ^a	$\delta_{\text{ip}}(\text{COO}^-)$
1520	1521	1558	$\delta_{\text{wag}}(\text{NH}_3^+)$
1617	1628	1614	ν kruhu

^a převzato z cit.⁷, ^b ν – valenční vibrace, δ – deformační vibrace, δ_{rock} – kývavá deformační vibrace, δ_{wag} – deformační vějířová vibrace, δ_{sc} – deformační nůžková vibrace, δ_{ip} – deformační rovinná vibrace, τ – torsní vibrace, alif. – alifatický řetězec

mechanismu k celkovému zesílení signálu tyrosinu. Podle intenzity zesílených pásů lze odvodit, že se molekula tyrosinu orientuje vůči substrátu karboxylovou skupinou a aminoskupinou (viz obr. 9). Tabulka VI udává charakteristické vibrace tyrosinu.

Závěr

V rámci této práce byly uskutečněny experimenty, které měly za cíl porovnat vliv excitační vlnové délky a vliv plasmonického substrátu na SERS spektra vybraných aminokyselin. Ze SERS spekter aminokyselin bylo zjištěno, že nejvhodnějším substrátem z hlediska celkové intenzity charakteristických pásů pro všechny studované AMK je substrát připravený v roztoku AgNO_3 . Naopak nejméně vhodnými substráty byly ty, které byly připraveny v roztoku CuCl_2 a Au lázni. Vliv použité excitační vlnové délky na průběh SERS spekter byl méně významný než vliv použitého plasmonického substrátu, avšak lepších výsledků z hlediska poměru signálu k šumu bylo dosaženo při použití excitační vlnové délky 1064 nm. Lépe lze detekovat pomocí SERS spektroskopie aminokyseliny s cyklickou strukturou (pozorována i vyšší intenzita pásů), jako jsou histidin a tyrosin, z důvodu vyšší afinity molekul k zesilujícímu povrchu.

LITERATURA

1. Volochanskyi O., Švecová M., Bartůněk V., Prokopec V.: *Colloids Surf., A* 616, 126310 (2021).
2. Dendisová-Vyškovská M., Kokaislová A., Ončák M., Matějka P.: *J. Mol. Struct.* 1038, 19 (2013).
3. Yaffe N. R., Blanch E. W.: *Vib. Spectrosc.* 48, 196 (2008).
4. Jarmelo S., Carey P. R., Fausto R.: *Vib. Spectrosc.* 43, 104 (2007).
5. Lim J. K., Kim Y., Lee S. Y., Joo S.-W.: *Spectrochim. Acta, Part A* 69, 286 (2008).
6. Dos Santos C., Carvalho J., Da Silva Filho J., Rodrigues J., Lima R., Pinheiro G., Freire P., Façanha Filho P.: *Phys. B (Amsterdam, Neth.)* 531, 35 (2018).
7. Yadav R., Dixit V., Yogesh M., Santhosh C.: *Pharm. Anal. Acta* 6, 1000439 (2015).

A. Korytářková^a, O. Volochanskyi^b, and M. Švecová^a
^a Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague, ^b Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague): **SERS Detection of Selected Amino Acids using Galvanically Prepared Substrates**

The aim of this study is the detection of selected amino acids using SERS spectroscopy. Amino acids are vital organic compounds with various functions and structures. They form proteins in every alive organism. Beyond this role, amino acids are crucial in biosynthesis as a precursor

for neurotransmitters. Four amino acids were selected (cysteine, histidine, serine, tyrosine) based on a variation of aliphatic, aromatic, heterocyclic, and other functional groups that affect the analyte's affinity to the enhancing substrates. The substrates were prepared by galvanic displacement of plasmonic metals (Au, Ag, Cu) on the aluminum plates, allowing effortless and fast preparation of SERS-active surface. The best signal of the amino acids was observed using substrates prepared in AgNO_3 solution and excitation wavelength 1064 nm.

Keywords: cysteine, histidine, serine, tyrosine, Raman spectroscopy, SERS, galvanic displacement

UHPLC-MS/MS ANALÝZA ICRF-193, NOVÉHO ANALÓGU DEXRAZOXANU

ADAM REGULI, HANA BAVLOVIČ PISKÁČKOVÁ
a PETRA ŠTERBOVÁ-KOVAŘÍKOVÁ

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
regulia@faf.cuni.cz

Klíčové slová: dexrazoxan, ICRF-193, UHPLC-MS, SPE, kardioprotektívne látky

Úvod

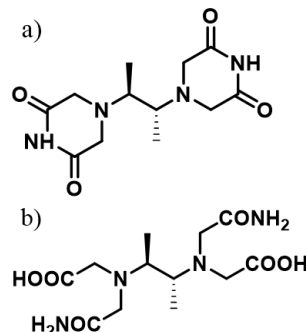
Dexrazoxan (ICRF-187) je jediné registrované liečivo využívané na prevenciu kardiotoxicity spôsobenej antracyklínovými chemoterapeutikami, ktoré sa radia medzi najúčinnnejšie liečivá využívané pri terapii širokého množstva nádorových ochorení¹. Mechanizmus účinku dexrazoxanu nie je stále úplne objasnený. Pôvodná teória predpokladá, že kardioprotektívny účinok je daný metabolitom dexrazoxanu (ADR-925), ktorý je vďaka svojej podobnosti s kyselinou etyléndiamintetraoctovou (EDTA) schopný chelatovať voľné železo a predchádzať tak zvýšenej tvorbe oxidačného stresu v bunke. Súčasná štúdia však naznačujú, že za kardioprotektívny účinok je pravdepodobne zodpovedné parentné liečivo a jeho interakcia s topoizomérázou II (cit.²).

Jedným z analógov dexrazoxanu je ICRF-193 (obr. 1a), pričom *in vitro*³ a pilotné *in vivo* štúdie naznačujú, že ide o analóg s lepším kardioprotektívnym pôsobením. V molekule ICRF-193 sa nachádzajú dve chirálne centrá. Ide o symetrickú štruktúru, ktorá poskytuje dva diastereoizoméry – *R,S*-diastereoizomér (mezoforma ICRF-193, obr. 1a) alebo zmes *R,R*- a *S,S*-enantiomérov (racemát, obr. 2). Bolo zistené, že pre inhibíciu topoizomérázy II je potrebná mezoforma, pričom racemát je takmer bez účinku⁴. Pri *in vitro* štúdiu zameranej na kardioprotektívu oboch látok bol ale pri vyšších koncentráciách ($c \geq 30 \mu\text{M}$) pozorovaný kardioprotektívny efekt aj u racemátu. Pre hodnotenie čistoty štandardu a tiež pre štúdium osudu ICRF-193 v organizme je potrebné vyvinúť vhodné analytické metódy.

Cieľom tejto práce bolo:

1. Vyvinúť analytickú metódu pre detekciu racemátu a ICRF-193 (mezoforma) a použiť túto metódu na overenie čistoty štandardu racemátu.

2. Zvýšiť citlivosť súčasnej metódy využívanej na stanovenie ICRF-193 a jeho metabolitu ICRF-193_{met} (obr. 1b) v plazme, nakoľko podľa pilotných *in vivo* farmakoki-



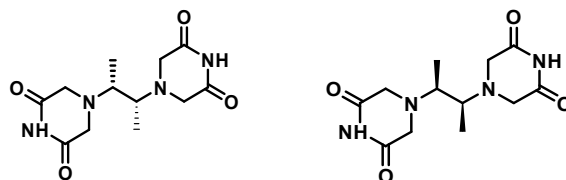
Obr. 1. Štruktúrny vzorec nového analógu dexrazoxanu: ICRF-193 (a) a jeho metabolitu ICRF-193_{met} (b)

netických štúdií bola súčasná citlivosť metódy nedostatočná pre stanovenie farmakokinetického profilu v plazme.

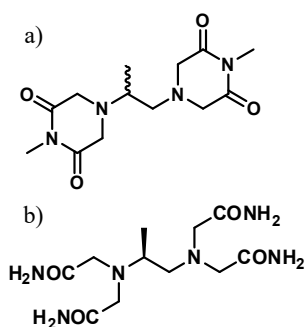
Experimentálna časť

Všetky vzorky boli analyzované s využitím UHPLC systému (Nexera X2, Shimadzu, Japonsko) spojeného s hmotnostným spektrometrom s analyzátorom typu trojitý kvadrupól a ESI⁺ iónovým zdrojom (LCMS 8030, Shimadzu, Japonsko). Pre kvantifikáciu látok boli využité SRM prechody.

Použité chemikálie (získané od spoločnosti Merck, Nemecko): metanol, acetonitril, kyselina mravčia, mravčan amónny (všetky LC-MS čistota), dimetylsulfoxid (DMSO, HPLC čistota). Prázdna králičia plazma (s heparínom ako antikoagulačnou prísadou) bola získaná z komerčného zdroja (ITEST plus, Česká republika). Milli-Q voda bola pripravovaná pomocou Millipore čistiaceho systému (Merck Millipore, Nemecko). ICRF-193, racemát, ICRF-193_{met} a vnútorné štandardy I.S._{ICRF-193} (GK-627) a I.S._{ICRF-193met} (4AMD) boli pripravené na našej fakulte



Obr. 2. Racemát: zmes *R,R*- a *S,S*-enantiomérov odvodených zo štruktúry ICRF-193



Obr. 3. Vnútrotný štandard pre ICRF-193 – GK-627 (a) a pre ICRF-193_{met} – 4AMD (b)

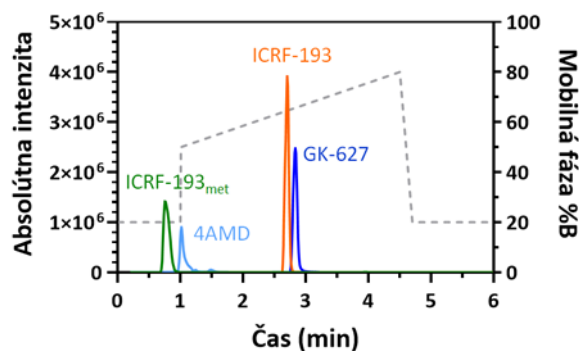
(Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova).

Zásobné roztoky (koncentrácia 1 mg ml⁻¹) boli pripravené rozpustením potrebného množstva látky v nasledujúcich rozpúšťadlách: metanol (4AMD), zmes metanol/voda 1:1 (v/v; ICRF-193_{met} a GK-627) a DMSO (ICRF-193).

Metóda na separáciu ICRF-193 a racemátu bola vyvinutá na základe modifikácie už validovanej metódy používanej pre analýzu dexrazoxanu a jeho metabolitu (ADR-925). Na separáciu bola použitá kolóna ZORBAX Bonus RP (100 × 3,0 mm, 1,8 μm, Agilent, USA) a ako mobilná fáza bola testovaná zmes 0,25% kyseliny mravčej (A) a metanolu (B) v rôznych pomeroch pri izokratickej a gradientovej elúcii. Optimálna separácia bola dosiahnutá pri nasledujúcich podmienkach: prietok 0,3 ml min⁻¹, teplota na kolóne 30 °C, nástrek 1 μl a dĺžka analýzy 6 min. Pre zistenie prítomnosti ICRF-193 v racemáte bol na kolónu nastreknutý štandardný roztok racemátu o koncentrácii 200 μg ml⁻¹. Koncentrácia ICRF-193 bola stanovená metódou vonkajšieho štandardu ($c = 0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Pre stanovenie ICRF-193 a jeho metabolitu ICRF-193_{met} boli použité nasledujúce analytické podmienky: kolóna Luna Omega Polar (100 × 3,0 mm, 2,5 μm, Phenomenex, USA) spolu s predkolónou; mobilnou fázou bola zmes 1 mM mravčanu amónneho (A) a acetonitrilu (B) (boli testované rôzne pomery izokratickej aj gradientovej elúcie); prietok 0,25 ml min⁻¹; gradient: 0,0–1,0 min (20 % B), 1,01–4,5 min (50–80 % B), 4,7–6,0 min (20 % B); teplota na kolóne 30 °C, nástrek 1 μl, dĺžka analýzy 6 min. Ako vnútrotný štandard bol pre ICRF-193 použitý GK-627 (obr. 3a), pre ICRF-193_{met} to bol 4AMD (obr. 3b). Reprezentatívny chromatogram je zobrazený na obr. 4.

Optimalizácia SPE extrakcie prebiehala z vodného štandardu alebo zo spikovanej plazmy (100 μM). Testované boli 4 typy SPE kolóniek (Discovery DSC-PH (100 mg/1 ml, Supelco), Select HLB SPE (30 mg/1 ml, Supelco), Discovery DSC-18 (100 mg/1 ml, Supelco) a Hypersep Verify AX (130 mg/1 ml, Thermo Scientific). Na aktiváciu kolóniek bol použitý 1 ml acetonitrilu alebo metanolu, na kondicionáciu 1 ml Milli-Q vody. Boli testované



Obr. 4. Reprezentatívny chromatogram pre stanovenie ICRF-193 a ICRF-193_{met}

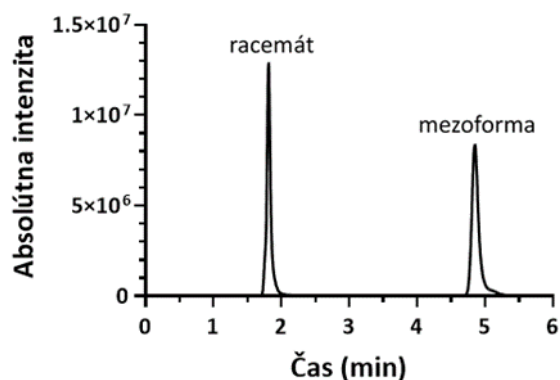
vané rôzne premývacie roztoky (voda, 5% metanol alebo 0,25% kyselina mravčia) o objemoch 300–500 μl. Testovanými elučnými činidlami boli: metanol, acetonitril a acetonitril s kyselinou mravčou. Optimalizované metódy boli čiastočne validované pre stanovenie ICRF-193 a tiež jeho metabolitu ICRF-193_{met} v plazme – bola hodnotená linearita, výťažnosť a matricové efekty ($n = 3$). Výťažnosť z plazmy bola vypočítaná v percentách ako priemerná hodnota pomeru plochy pod píkom spikovanej prázdnej plazmy pred a po extrakčnom procese. Matricové efekty boli vypočítané ako priemerná hodnota pomeru plochy pod píkom spikovanej prázdnej plazmy po extrakčnom procese a plochy pod píkom čistého štandardného roztoku.

Výsledky a diskusia

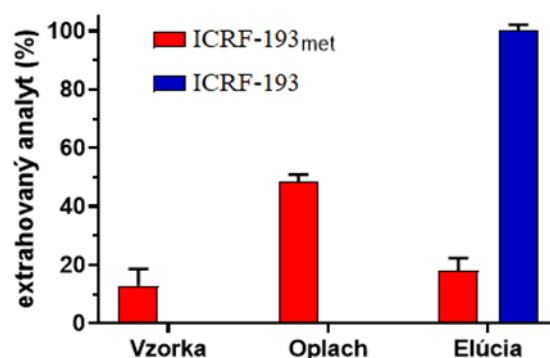
Pri vývoji metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu bolo dôležité zohľadniť fakt, že v analyzovanej vzorke racemátu sme v prípade jej kontaminácie očakávali len stopové množstvo mezoformy. Preto bolo potrebné analyzovať vzorku o vysokej koncentrácii (200 μg ml⁻¹). Z tohto dôvodu muselo byť rozlíšenie optimalizovanej metódy dostatočne vysoké. Najlepšie rozlíšenie (23,3) bolo dosiahnuté pri izokratickej elúcii 80:20 (A:B, v/v) a súčasne bol zachovaný symetrický tvar píkov (A_s (racemát) = 1,13; A_s (mezoforma) = 1,20). Referenčný chromatogram je uvedený na obr. 5.

Pri analýze samotnej vzorky bol celý pík látky eluovanej v retenčnom čase racemátu odvádzaný do odpadu (do 4,2 min), aby nedošlo k presýteniu detektora. ICRF-193 (mezoforma) bol detegovaný v čase 4,2–6,0 min. Vo vzorke racemátu sme detegovali iba 0,035 % ICRF-193 (mezoformy).

Pri zvýšení citlivosti metódy stanovenia ICRF-193 a jeho metabolitu v plazme sme sa zamerali na úpravu vzorky, konkrétne na možnosť využitia SPE. Súčasná analýza a tiež úprava vzorky ICRF-193 a jeho metabolitu je komplikovaná ich rozdielnou polaritou. Ako úprava vzorky pri analýze dexrazoxanu, prípadne jeho analógov



Obr. 5. Reprezentatívny chromatogram separácie ICRF-193 (mezoforma) a racemátu



Obr. 6. SPE extrakcia ICRF-193 a ICRF-193_{met} na kolónkach „Select HLB SPE“

a metabolitov bola vo väčšine štúdií použitá proteínová precipitácia^{5–8}. Podľa našich zistení boli SPE extrakcie doposiaľ použité len raz a extrahovaný bol iba dexrazoxan a jeho analógy, nie polárny metabolit⁹.

Pri vývoji SPE podmienok sme sa najprv zamerali na analýzu samotného ICRF-193. Na všetkých troch SPE kolónkach (Discovery DSC-PH, Select HLB SPE a Discovery DSC-18) boli jednotlivé kroky extrakcie rovnaké. Aktivácia prebiehala pomocou metanolu a na kolónku sme nanášali 100 μ l plazmy spikovanej ICRF-193 a I.S.-ICRF-193. Najväčšiu odozvu detektoru sme dosiahli použitím kolónky Select HLB SPE. Po optimalizácii bolo na oplach použitých 400 μ l 0,25% kyseliny mravčej a na elúciu 300 μ l metanolu. Linearita metódy bola overená v koncentračnom rozmedzí 0,02–1 μ M ($R^2 = 0,9995$), výťažnosť bola 98,7 % a maticový efekt bol 99,7 %.

Na základe týchto výsledkov sme skúšali na rovnakej kolónke extrahovať súčasne ICRF-193 aj ICRF-193_{met}. Keďže metabolit je veľmi polárna látka ($\log P$ štruktúrne podobného ADR-925 je $-6,7$ (cit.¹⁰)), pre overenie, či bude na kolónke držať, sme namiesto plazmy nanášali vodný štandard analyzovaných látok a analyzovali každý krok SPE extrakcie. V priebehu extrakcie dochádzalo k výrazným stratám ICRF-193_{met}, tento sorbent teda nebol dostačujúci pre súčasnú extrakciu ICRF-193 a ICRF-193_{met} (obr. 6).

V dôsledku toho sme pre túto extrakciu použili kolónku s reverznou fázou (C8) a iónomeničom – Hypersep Verify AX. Na aktiváciu bol použitý acetonitril, nanášali sme 100 μ l vodného štandardu ICRF-193 a ICRF-193_{met}, oplach 300 μ l vody a na elúciu bolo použitých 500 μ l 10% kyseliny mravčej v acetonitrile. Voľba tak silnej kyseliny ako elučného činidla bola potrebná, pre elúciu silno naviazaného ICRF-193_{met} na iónomeničový sorbent. Za týchto podmienok nedochádzalo k stratám metabolitu v skorších fázach extrakcie. Eluát bol následne odfúkaný a rekonštituovaný do 200 μ l 20% acetonitrilu. Napriek vysušeniu a rekonštitúcii dochádzalo pravdepodobne prítomnosťou kyseliny mravčej k výraznej supresii signálu u ICRF-193_{met}. Analytická metóda teda bola na základe

predchádzajúcich skúseností optimalizovaná. Testovali sme rôzne mobilné fázy (metanol, acetonitril, mravčian amónny a kyselinu mravčiu), pričom najlepšia bola kombinácia 0,25% kyseliny mravčej (A) a metanolu (B) pri použití nasledujúceho gradientu: 0,0–1,0 min (20 % B), 1,01–3,0 min (50–65 % B), 3,01–4,5 min (65–90 % B), 4,51–6,0 min (20 % B). Prietok bol 0,2 ml min⁻¹, teplota na kolóne 30 °C a nástrek 1 μ l. Linearita bola overená v koncentračnom rozmedzí 0,05–1 μ M, pričom hodnota R^2 bola pre ICRF-193 $\geq 0,999$ a pre ICRF-193_{met} = 0,9967. Pre ICRF-193 bola výťažnosť 99,8 % a maticový efekt bol 104,4 %. Pre ICRF-193_{met} bola výťažnosť 47,4 % a maticový efekt bol 75,9 %.

Záver

Podarilo sa nám vyvinúť metódu na separáciu ICRF-193 (mezoforma) a jeho diastereoizoméneho racemátu, pričom sme zistili, že vzorka racemátu obsahovala < 0,035 % mezoformy. Ďalšie štúdie by mali overiť, či táto miera kontaminácie štandardu racemátu môže byť zodpovedná za pozorovaný kardioprotektívny účinok.

Taktiež sa nám podarilo vyvinúť a optimalizovať SPE podmienky pre extrakciu ICRF-193 a ICRF-193_{met} z plazmy. S využitím kolóniek Select HLB SPE bolo možné stanoviť iba samotný ICRF-193. Pomocou tejto metódy sa nám podarilo spodný limit kvantifikácie (LLOQ) znížiť 25násobne. Eluáty boli bez rekonštitúcie priamo nastrekované na kolónu. V prípade ďalšieho zakonzentrovania vzorky by však ešte bolo možné tento limit znížiť.

Na kolónkach Hypersep Verify AX bola možná súčasná extrakcia ICRF-193 a ICRF-193_{met}, pričom LLOQ sa nám podarilo znížiť 10násobne. V tomto prípade už bolo nutné zaradiť krok vysušenia a rekonštitúcie vzorky.

Táto práca bola realizovaná za podpory Univerzity Karlovy (GAUK 1204120 a projekt SVV 260547).

LITERATÚRA

1. Cvetković R. S., Scott L. J.: *Drugs* 65, 1005 (2005).
2. Vavrova A., Jansova H., Mackova E., Machacek M., Haskova P., Tichotova L., Sterba M., Simunek T.: *PLoS One* 8, 3480 (2013).
3. Hasinoff B. B., Patel D., Wu X.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 399, 115038 (2020).
4. Snapka R. M., Woo S. H., Blokhin A. V., Witiak D. T.: *Biochem. Pharmacol.* 52, 543 (1996).
5. Kollárová-Brázdová P. a 14 spoluautorov: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 373, 402 (2020).
6. Reimerová P., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P.: *Sci. Rep.* 9, 4524 (2019).
7. Kovarikova P., Pasakova-Vrbatova I., Vavrova A., Stariat J., Klimes J., Simunek T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 76, 243 (2013).
8. Bures J., Jirkovska A., Sestak V., Jansova H., Karabanovich G., Roh J., Sterba M., Simunek T., Kovarikova P.: *Toxicology* 392, 1 (2017).
9. Lewis R. C., Phillips B. A., Baldwin J. R., Rossi D. T., Narang P. K.: *Pharm. Res.* 9, 101 (1992).
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10402764#section=Computed-Properties>, stiahnuté 12. 1. 2021.

A. Reguli, H. Bavlovič Piskáčková, and P. Štěrbová-Kovaříková (*Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic*)
UHPLC-MS/MS Analysis of ICRF-193, the Novel Analogue of Dexrazoxane

Dexrazoxane is a cardioprotective drug clinically used against anthracycline induced cardiotoxicity. ICRF-193 was synthesized as a novel, more effective analogue of dexrazoxane. It was reported that inhibition of topoisomerase II, which seems to be crucial for cardioprotective effect, is mediated by an *R,S* diastereomer (ICRF-193), while the racemic mixture of *R,R* and *S,S* enantiomers is almost ineffective. Nevertheless, our *in vitro* experiments with racemic mixture showed some cardioprotective effect. The aim of this work was: (1) to examine the possible role of contamination of standard of racemic mixture with the ICRF-193 and (2) to develop solid phase extraction (SPE) for ICRF-193 and its metabolite (ICRF-193_{met}) from plasma. Less than 0,035% of ICRF-193 was detected in the racemic mixture. Further studies should verify if the contamination of the racemic mixture could be responsible for the observed cardioprotective effect. The SPE procedure was optimized and the highest recovery of both ICRF-193 and ICRF-193_{met} from plasma was achieved on Hypersep Verify AX column. Nevertheless, the elution of target analytes required strongly acidified acetonitrile (10% HCOOH), which resulted into the signal suppression. Therefore, the sensitivity of the current method was increased only 10 times. When focusing is only on the active compound ICRF-193, more effective SPE extraction (25 times lower LLOQ without pre-concentration step) employing HLB sorbent can be used.

Keywords: dexrazoxane, ICRF-193, UHPLC-MS, SPE, cardioprotective drugs

SELEKTÍVNA EXTRAKCIA KUMARÍNOV Z KOZMETICKÝCH VÝROBKOV – VÝBER TYPU SORBENTU A EXTRAKČNÉHO POSTUPU

ANDREA ŠPAČKOVÁ a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

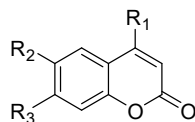
spackova.andrea@gmail.com, katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: extrakcia tuhou fázou, selektívne sorbenty, kumaríny, deodorant

Úvod

Kumaríny (deriváty kumarínu, 2-*H*-1-chromén-2-on) sú zlúčeniny prirodzene sa nachádzajúce v rastlinách mnohých čeľadí, hubách, ovoci a iných prírodných zdrojoch. Do skupiny jednoduchých kumarínov prírodného charakteru možno zaradiť kumarín, eskulín, umbeliferón, 4-metylumbeliferón, skoparón, herniarín a iné (obr. 1). Zlúčeniny sú charakteristické výraznou vôňou podobnou sušenému senu a z biologického hľadiska sú známe ich účinky ako napr. antibakteriálne, protizápalové, ochrana pred UV žiarením (účinky sú rozdielne pre jednotlivé kumaríny)¹. Kumaríny sa často používajú pri výrobe parfumov a ako vonné prísady do kozmetických výrobkov (napr. mydiel, šampónov, krémov), pričom doporučená koncentrácia kumarínu je v rozsahu od 0,08 % do 5,8 % (cit.²). Niektoré z kumarínov (v závislosti aj od ich koncentrácie) môžu mať nežiaduce účinky na ľudský organizmus, ako napr. alergické reakcie³, a preto je v EÚ zakázané používanie siedmich kumarínov (herniarín, dikumarol, 7-etoxy-4-metylkumarín, dihydrokumarín, 7-metylkumarín, acenokumarol a pyranokumarín) ako zložiek kozmetických výrobkov (nariadenie (ES) č. 1223/2009).

Dôležitou súčasťou procesu chemickej analýzy je príprava vzoriek, ktorej hlavným cieľom je odstránenie nežiaducich zložiek z matrice a získanie frakcie vzorky



Kumarín: $R_1, R_2, R_3 = H$
 Umbeliferón: $R_1, R_2 = H, R_3 = OH$
 4-Metylumbeliferón: $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH$
 Skoparón: $R_1 = H, R_2, R_3 = OCH_3$
 Eskulín: $R_1 = H, R_2 = \text{glukóza}, R_3 = OH$
 Herniarín: $R_1, R_2 = H, R_3 = OCH_3$

Obr. 1. Štruktúry vybraných kumarínov prírodného pôvodu

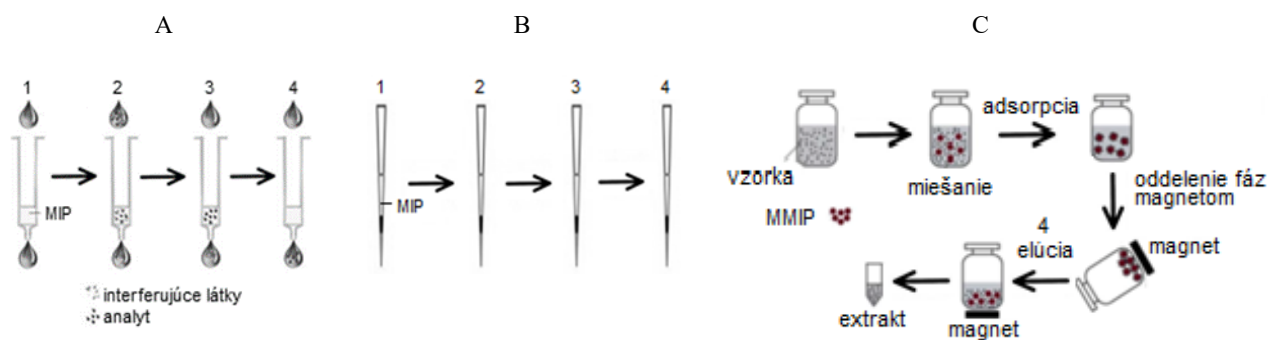
alebo konečného extraktu v rozpúšťadle, ktoré je kompatibilné s použitou analytickou technikou, napr. s mobilnou fázou v HPLC. V prípade stopových koncentrácií je potrebné aj skoncentrovanie cieľových analytov. Najčastejšie používanou technikou prípravy kvapalných vzoriek je extrakcia na tuhej fáze (SPE, Solid Phase Extraction). Existuje široká škála SPE sorbentov, no vo väčšine postupov sa používa iba niekoľko typov (napr. typ C18). Výskum z oblasti SPE techník je zameraný na vývoj sorpčných materiálov so zvýšenou selektivitou pre cieľové analyty. Do tejto skupiny možno zaradiť aj selektívne polymérne adsorbenty s odtlačkom molekuly (MIP, Molecularly Imprinted Polymers), ktoré využívajú pri extrakcii látok špecifické interakcie medzi funkčnými skupinami cieľového analytu a väzbovými centrami v MIP. Aplikácie MIP v analýze kozmetických výrobkov sa zameriavajú na extrakciu parabénov, antimikrobiálnych látok⁴⁻⁶, ale uplatňujú sa aj na selektívnu extrakciu toxických zlúčenín, napr. bisfenolu⁷.

Práca je zameraná na porovnanie aplikovateľnosti rôznych typov adsorbentov, laboratórne pripravené MIP a MIP na povrchu magnetického nosiča (MMIP) selektívne pre kumaríny, komerčný MIP selektívny pre fenolové látky. Extrakčné postupy s využitím MIP adsorbentov, klasická SPE, SPE s MIP v pipetovacej špičke a extrakcia s využitím MMIP sa testovali pre vzorky vôní a deodorantov.

Experimentálna časť

Referenčné látky, kumarín (99%), eskulín (6,7-dihydroxykumarín-6- β -D-glukozid, 98%), umbeliferón (7-hydroxykumarín, 99%), 4-metylumbeliferón (4-metyl-7-hydroxykumarín, 98%), skoparón (6,7-dimetyloxykumarín, 98%), herniarín (7-metoxykumarín, 98%) boli zakúpené od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Rozpúšťadlá metanol, etanol (čistota HPLC gradient grade) a kyselina octová (99%) boli zakúpené od Merck (Darmstadt, Nemecko). Deionizovaná voda ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) sa získala pomocou systému na čistenie vody AquaMax Ultra (séria 370). MIP-fenolové látky sa získali od spoločnosti Affinisep (Petit-Couronne, Francúzsko). Vzorky deodorantov boli získané v miestnej sieti drogérii (Vzorka I – deodorant s arómou zeleného čaju a alkoholu obsahujúci agáve; Vzorka II – deodorant na citlivú pokožku bez alkoholu; Vzorka III – prírodný kozmetický deodorant, pri ktorom výrobca udáva, že k výrobku neboli vedome prídavané sporné látky). V zozname zložiek testovaných vzoriek nebol uvedený kumarín. Vzorky sa uchovávali pri laboratórnej teplote.

Polymérne adsorbenty s odtlačkom molekuly (laboratórne pripravené pre templát umbeliferón⁸)



Obr. 2. Extrakčné postupy použité pre extrakciu kumarínov: MIP-SPE s adsorbentom v kolónke (A), MIP-SPE s adsorbentom v pipetovacej špičke (B), extrakcia pomocou MIP adsorbentu na povrchu magnetického nosiča (C); 1 – kondicionovanie rozpúšťadlami metanol a etanol/voda (1/9, v/v), 2 – dávkovanie vzorky, 3 – premývanie vodou, 4 – elúcia zmesou metanol/kyselina octová (9/1, v/v)

sa použili pre klasickú SPE extrakciu na kolónke (obr. 2A) a SPE so sorbentom v pipetovacej špičke (obr. 2B). Sorbent pripravený na povrchu magnetického nosiča pre templát umbeliferón⁹ bol použitý na extrakciu v systéme tuhá fáza-kvapalina s oddeľovaním fáz pomocou externého magnetu (obr. 2C). Na kondicionovanie adsorbentov sa použil metanol a zmes etanol/voda (1/9, v/v), premývacím činidlom bola voda a na elúciu analytov sa použila zmes metanol/kyselina octová (9/1, v/v). Objemy premývacích a elučných činidiel ako aj množstvo sorbentov použitých pre extrakciu je uvedené v tab. I.

HPLC analýzy sa uskutočnili pomocou kvapalinového chromatografu Agilent Technologies, séria 1260, ktorý obsahoval vysokotlakové čerpadlo, dávkovací ventil (Rheodyne), termostat kolón, detektor s diódovým poľom a fluorescenčný detektor. Na HPLC separáciu kumarínov (eskulín, kumarín, skoparón, herniarín, 4-metyumbeliferón, umbeliferón) sa použila kolóna Kinetex C18 (100 × 4,6 mm, 5 μm) a mobilná fáza tvorená zmesou 1% kyselina octová a metanol s prídavkom 1% kyseliny octovej, s gradientovou elúciou pri prietoku 1 ml min⁻¹. Gra-

dientová elúcia sa uskutočnila podľa programu: od 0 do 12 min lineárny gradient B od 20 % do 45 %, od 12 do 12,5 min lineárny gradient B od 45 % do 100 %, od 12,5 min 100 % B. Na detekciu kumarínu sa použil detektor s diódovým poľom (snímanie chromatogramov pri vlnovej dĺžke 280 nm) a na detekciu eskulínu, skoparónu, herniarínu, 4-metyumbeliferónu, umbeliferónu sa použil fluorescenčný detektor (snímanie chromatogramov pri excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke 320 nm a 450 nm). Teplota kolóny bola 25 °C a dávkovaný objem bol 20 μl.

Výsledky a diskusia

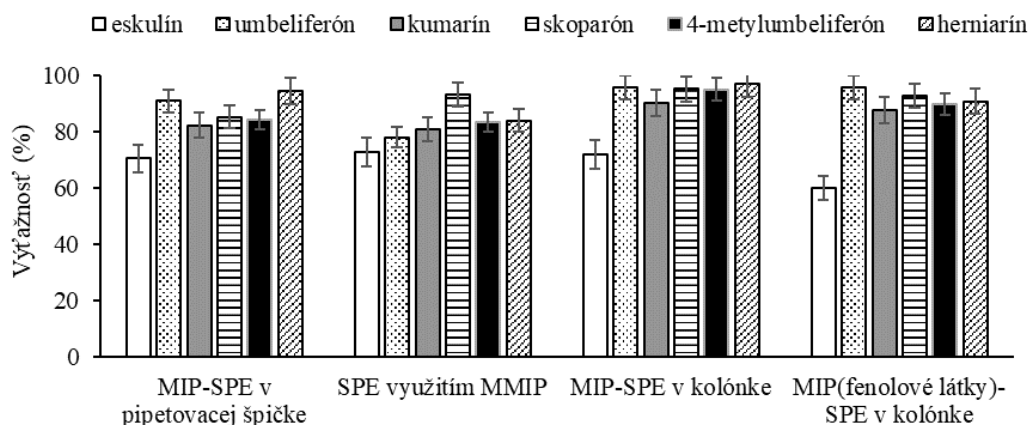
Na SPE kumarínov zo vzorky kozmetického prípravku sa testovali adsorbenty pripravené v laboratóriu technológiou odtlačania molekúl umbeliferónu. Tieto adsorbenty boli skupinovo selektívne aj pre skupinu ďalších kumarínov^{8,9}. Pre porovnanie sa testovali aj komerčne dostupné SPE kolónky s MIP adsorbentom pripraveným pre templát zo skupiny fenolových látok. Extrakčné postupy pre použí-

Tabuľka I

Experimentálne podmienky pre extrakciu kumarínov pomocou MIP-SPE v kolónke a v pipetovacej špičke a pomocou sorbentu pripraveného na povrchu magnetického nosiča (MMIP)

Parameter	MIP-SPE	MIP-SPE	MMIP ^c
Množstvo sorbentu, mg	100	20	200
Objem vzorky, ml	2	0,5	3
Objem rozpúšťadiel, ml			
1. Kondicionovanie (metanol)	3	1	
(etanol/voda, 1/9, v/v)	3	1	
3. premývanie (H ₂ O)	2	0,5	3
4. elúcia (metanol/kyselina octová (9/1, v/v))	2	0,5	3
Čas spracovania vzorky, min	15–20	<10	90

^a MIP-kumaríny, ^b MIP(fenolové látky), ^c MMIP-kumaríny

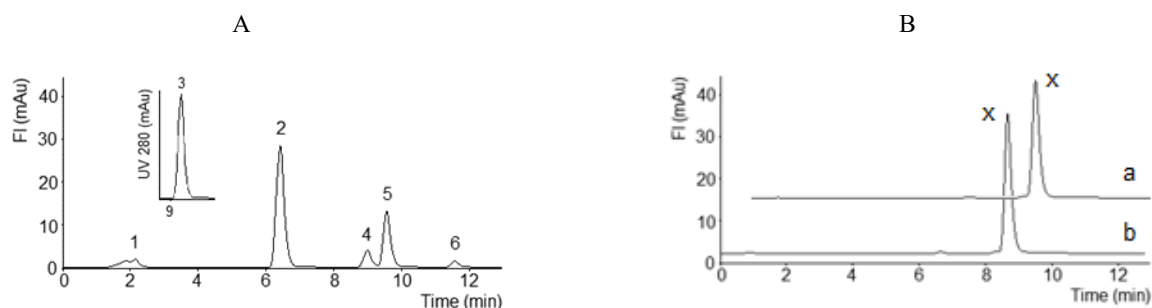


Obr. 3. Výťažností extrakcie kumarínov pre testované typy adsorbentov a spôsoby extrakcie ($n = 3$)

té kolónky boli rovnaké. Výťažnosti extrakcie kumarínov pre testované SPE adsorbenty a postupy dokumentuje obr. 3. Použitie MIP pripraveného na povrchu magnetického nosiča bolo vhodné pre extrakciu kumarínov z viskóznějších vzoriek a využitie magnetického poľa umožnilo jednoduché oddelenie sorbentu od kvapalnej fázy. Nevýhodou však bola časová náročnosť spracovania vzorky (~90 min, tab. I) a väčšia spotreba rozpúšťadiel a vzoriek. V prípade extrakcie s MIP v pipetovacej špičke bola výhodou malá spotreba rozpúšťadiel a taktiež menšia časová náročnosť (<10 min) aj v porovnaní s klasickou SPE v kolónke. Výťažnosti sa pohybovali v rozsahu od 82 % do 97 % pre MIP-SPE v kolónke a v pipetovacej špičke, kým mierne nižšie výťažnosti pre väčšinu zo sledovaných látok sa dosiahli použitím MMIP (80–84 %) (výťažnosti boli určené pre koncentračnú hladinu kumarínu $10,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, ostatné látky $10,0 \text{ ng ml}^{-1}$). V prípade eskulínu bola výťažnosť nižšia 70–73 % pri všetkých testovaných MIP-kumarínov. Pravdepodobne to súvisí s nižšou selektivitou pripravených MIP pre túto látku vzhľadom na jeho odlišnú štruktúru v porovnaní so štruktúrou odtlačaného templátu^{8,9}.

Výsledky extrakcie pomocou MIP-fenolové látky naznačili, že tento adsorbent je tiež vhodný na extrakciu zvolenej skupiny zlúčenín. Výťažnosti boli v rozsahu 88–96 %, s výnimkou eskulínu (výťažnosť 60 %).

Výsledky prvého screeningu postupov MIP-SPE v kolónke a v pipetovacej špičke sa využili pre extrakciu kumarínov zo vzoriek deodorantov. Na analýzu sa použila RP-HPLC metóda s UV a fluorescenčnou detekciou¹⁰. Vhodnou stacionárnou fázou pre separáciu vybranej skupiny kumarínov bol sorbent typu C18 s časticami pripravenými „core-shell“ technológiou, čím sa dosahovala vysoká účinnosť kolóny a separácie látok (hodnoty výškového ekvivalentu teoretickej priehradky 3–7 μm). HPLC separácia kumarínov (eskulín, umbeliferón, kumarín, skoparón, 4-metylumbeliferón, herniarín) sa uskutočnila gradientovou elúciou s mobilnou fázou jednoduchého zloženia (metanol/voda s prídavkom kyseliny octovej). Použitá metóda bola overená pre stanovenie kumarínov s dosiahnutými charakteristikami: rozlíšenie látok $R \geq 1,5$, čas analýzy kratší ako 13 minút, RSD opakovateľnosti elučných časov menšie ako 0,8 % a plôch píkov menšie ako 9 %. Medze detekcie (LOD) pre fluorescenčný detek-



Obr. 4. Chromatografické záznamy separácie referenčnej zmesi kumarínov (A) a extraktu vzorky II (B) po MIP-SPE (a), MIP-SPE v pipetovacej špičke (b), SPE so sorbentom MIP(umbeliferón), HPLC s DAD a fluorescenčnou detekciou; 1 – eskulín, 2 – umbeliferón, 3 – kumarín, 4 – skoparón, 5 – 4-metylumbeliferón, 6 – herniarín, x – neznáma látka

tor (detekcia eskulínu, skoparónu, herniarínu, 4-metylumbeliferónu, umbeliferónu) boli 0,3–4,0 ng ml⁻¹ a pre UV spektrofotometrický detektor (detekcia kumarínu) bola 0,2 µg ml⁻¹.

V testovaných vzorkách I–III neboli detegované kumaríny na koncentračných hladinách vyšších ako LOD metódy. Chromatografické záznamy separácie referenčnej zmesi vybraných kumarínov a extraktov vzorky II dokumentuje obr. 4.

Záver

Moderné trendy v analytickej chémii sú zamerané na zvyšovanie selektivity extrakcie aj separácie a tiež na ekologickosť postupov. Použitím testovaných extrakčných postupov s laboratórne pripraveným adsorbentom selektívnym pre deriváty kumarínu sa dosiahli výťažnosti väčšie ako 80 %. Z hľadiska spotreby rozpúšťadiel aj vzoriek je najvýhodnejší MIP-SPE v pipetovacej špičke. Výhodou MIP sorbentov je aj opakované použitie. MIP-kumaríny adsorbenty boli použité viac ako päťkrát bez významnej zmeny účinnosti extrakcie (RSD ≤ 8 %). Extrakčné prístupy s využitím selektívnych adsorbentov môžu nájsť uplatnenie v analýze viacerých typov vzoriek, MIP-SPE v kolónke a pipetovacej špičke pre málo viskózne a nepenivé kvapalné vzorky, extrakcia s MIP na povrchu magnetického nosiča s využitím magnetu na oddeľovanie fáz pre viskóznejšie vzorky.

Práca vznikla s finančnou podporou projektu č. VEGA 1/0159/20 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Pan T. L., Wang P. W., Aljuffali I. A., Leu Y. L., Hung Y. Y., Fang J. Y.: *Toxicol. Lett.* 226, 173 (2014).
2. Guidance for the Use of IFRA Standards, The International Fragrance Association, December 12, 2019.
3. Srikrishna D., Godugu C., Dubey P. K.: *Mini Rev. Med. Chem.* 16, 1 (2016).

4. Figuerido L., Erny G. L., Santos L., Alves A.: *Talanta* 146, 754 (2016).
5. Vicario A., Solari M., Felici E., Aragón L., Bertolino F., Gomez M. R.: *Microchem. J.* 142, 329 (2018).
6. Wang F., Li X., Li J., Zhu C., Liu M., Wu Z., Liu L., Tan X., Lei F.: *J. Colloid Interf. Sci.* 527, 124 (2018).
7. Zhu R., Zhao W., Zhai M., Wei F., Cai Z., Sheng N., Hu Q.: *Anal. Chim. Acta* 658, 209 (2010).
8. Machyňáková A., Hroboňová K.: *Chromatographia* 80, 1015 (2017).
9. Machyňáková A., Hroboňová K.: *Anal. Methods* 9, 2168 (2017).
10. Hroboňová K., Brokešová K.: *Food Chem.* 332, 127404 (2020).

A. Špačková and K. Hroboňová (*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava, Slovak Republic*): **Selective Extraction of Coumarins from Cosmetics – Selection of Sorbent Type and Extraction Procedure**

Modern trends in analytical chemistry are focused on increasing selectivity of extraction and separation and also on ecology. The goal of this study was to verify the suitability of adsorbents based on molecularly imprinted polymers in three application forms (MIP-SPE in column, pipette tip MIP-SPE, batch extraction with MIP coated on magnetite) for extraction of coumarins from deodorants. Recoveries greater than 80% were achieved using tested extraction procedures with a laboratory-prepared sorbents selective for coumarin derivatives. The advantage of MIP sorbents is also reusability. MIP-coumarins sorbents were used more than five times without a significant decreasing in extraction efficiency (RSD ≤ 8%).

Keywords: solid phase extraction, selective sorbents, coumarins, deodorants

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic (Project No. 1/0159/20).

VÝVOJ ANALYTICKEJ METÓDY NA MONITOROVANIE KONTAMINANTOV V PRIEMyselNEJ VODE Z VÝROBY FARBÍV A LAKOV

NICOLETTE VIKTORYOVÁ^a, AGNEŠA SZARKA^a, SVETLANA HROUZKOVÁ^a a GABRIEL HORVÁTH^b

^a Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR, ^bHOFI-TECH s.r.o., Čukáraboň 7382/73, 929 01 Dunajská Streda, SR
nika.viktoryova@gmail.com

Kľúčové slová: GC-MS, kontaminanty, farby a laky, extrakcia, LLE

Úvod

Nekontrolované vypúšťanie priemyselných vôd do životného prostredia môže spôsobiť vážnu a dlhodobú kontamináciu povrchových i podzemných vôd¹. Keďže sa pri bežnom čistení priemyselných vôd neodstraňuje značné množstvo znečisťujúcich a toxických látok, dostávajú sa do kanálov a sú považované za potenciálne nebezpečné pre organizmy sladkovodných ekosystémov².

Látky, detegované v priemyselných vodách, môžu byť napríklad pesticídy, farmaceutiká, glykoly, ktoré sa nachádzajú v čistiacich prostriedkoch, a karboxylové kyseliny z mydiel, masť a kozmetických prípravkov^{3,4}. Z dôvodu negatívnych ekotoxických vplyvov kontaminantov je v záujme ochrany životného prostredia tieto látky monitorovať v priemyselných odpadových vodách².

Priemyselné vody predstavujú veľmi komplexné vzorky. Problematickým krokom v analýze takýchto vzoriek je samotná úprava vzorky. Z tohto dôvodu je potrebný vývoj extrakčných metód, ktoré poskytnú extrakciu čo

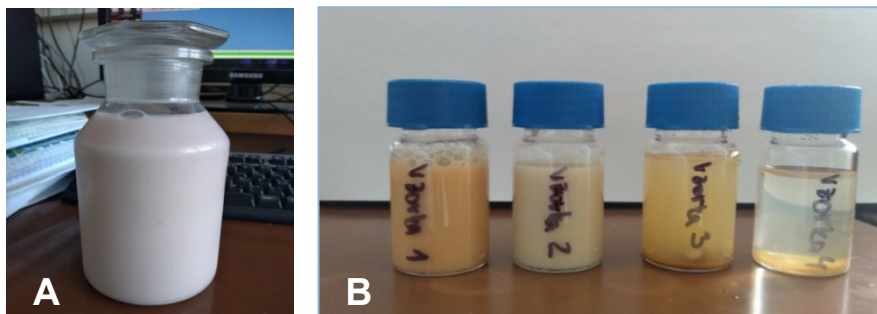
najviac druhov polutantov s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Táto časť analytického procesu má zásadný vplyv na celkový čas procesu a kvalitu získaných výsledkov. Na úpravu vzoriek vôd sa využívajú rôzne extrakčné techniky, medzi najčastejšie používané patrí extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE).

Pri analýze priemyselných vôd sú dve základné požiadavky: nízke medze detekcie a multireziduálny charakter metódy. Záverečnou fázou analytických metód je identifikácia a stanovenie analytov pomocou vhodných inštrumentálnych techník. Najčastejšie využívanými analytickými metódami na stanovenie prechavých organických toxínov v odpadových vodách sú metódy založené na plynovej (GC) a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii (HPLC) v spojení s hmotnostným (MS) alebo tandemovým hmotnostným spektrometrom (MS-MS).

Táto práca je zameraná na vývoj analytickej metódy na monitorovanie prítomnosti kontaminantov v zdrojovej priemyselnej vode a vo vode spracovanej technológiou, ktorá používa kovový šrot na prečistenie vôd. Výskum sa zaoberal vypracovaním a optimalizáciou extrakčného postupu na izoláciu znečisťujúcich látok z priemyselných odpadových a technologicky spracovaných vôd a následnou analýzou extraktov metódou (GC-MS).

Experimentálna časť

Analyzovala sa priemyselná voda, ktorá vzniká pri výrobe farieb a náterových hmôt (Slovlak, Košeca, Slovensko), a štyri druhy prečistenej vody. Čistenie priemyselnej odpadovej vody sa realizovalo modifikáciami technologického postupu firmou Hofitech, s.r.o. Na obr. 1A je uvedená fotografia vzorky pôvodnej priemyselnej vody a na obr. 1B sú vzorky prečistenej priemyselnej vody rôznymi modifikáciami pracovných parametrov. Všetky vzorky sa pred analýzou upravili metódou LLE (extrakcia kvapalinou), ktorá sa použila na izoláciu kontaminujú-



Obr. 1. A – Fotografia vzorky priemyselnej vody, B – vzorky prečistených priemyselných vôd

cích látok (sledovaných markerov) z vôd.

Extrakty boli analyzované plynovým chromatografom (Agilent 7890N) s detekciou hmotnostným spektrometrom (Agilent 5975). Plynový chromatograf bol vybavený dávkovačom s programovanou teplotou vyparovania (PTV). Separácia analytov prebiehala na kapilárnej kolóne CP-Sil 8 CB (Agilent Technologies), 15 m × 0,15 mm I.D. × 0,15 μm. Hmotnostný spektrometrický detektor bol vybavený kvadrupólovým analyzátorom. Tvorba iónov sa uskutočnila elektrónovou ionizáciou a MS pracoval v dvoch módoch: skenovanie iónov (FS) a snímanie vybraných iónov (SIM).

Výsledky a diskusia

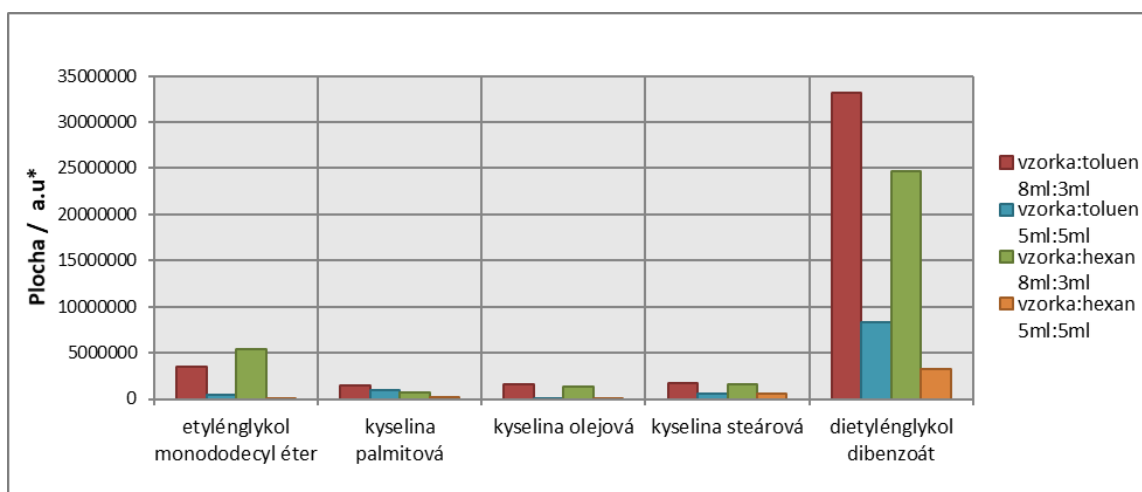
Účinnou technikou na úpravu priemyselných vôd je LLE. Pri vývoji metódy bol optimalizovaný typ extrakčného rozpúšťadla. Porovnali sa výsledky po aplikácii štyroch organických rozpúšťadiel, a to toluénu, hexánu, dichlórmetánu a acetonitrilu. Ukázalo sa, že najúčinnšie extrakčné rozpúšťadlo na izoláciu znečisťujúcich látok z priemyselnej vody je toluén. Následne sa testovali rôzne pomery objemu vzorky k objemu extrakčného rozpúšťad-

la. Testoval sa pomer 5 ml vzorky ku 5 ml rozpúšťadla a 8 ml vzorky k 3 ml rozpúšťadla, porovnávala sa účinnosť extrakcie s využitím toluénu a hexánu (obr. 2). Zistilo sa, že najlepšie výsledky poskytne extrakcia pomocou toluénu v pomere k objemu vzorky : rozpúšťadlo 8 ml : 3 ml. Pri úprave vzorky sa použil malý objem vzorky a organického rozpúšťadla, čím sa produkuje menšie množstvo chemického odpadu, a tým je metóda aj šetrná k životnému prostrediu.

Extrakty priemyselnej odpadovej vody boli následne analyzované metódou GC-MS vo FS móde, aby sme identifikovali kontaminanty.

Identifikácia sa uskutočnila porovnaním hmotnostných spektier s dátami knižnice NIST. Identifikované analyty sa zoradili do SIM skupín podľa ich elučných časov (tab. I) a pre každý analyt sa vybral jeden kvantifikačný a dva kvalifikačné ióny. Na potvrdenie identity vybraných analytov sme používali referenčné materiály.

Skúmaná priemyselná voda obsahovala veľké množstvo polyetylén glykolov, ktoré sa používajú pri výrobe lepidiel, čistiacich prostriedkov a farbív. Tieto látky sú dobre rozpustné vo vode a ich chemická a biologická degradácia je pomerne zložitá. Pri vzorke priemyselnej vody



Obr. 2. Vplyv pomeru objemu extrakčného rozpúšťadla a vzorky na plochy píkov vybraných analytov; *a. u. – z ang. area units, jednotky plochy

Tabuľka I

Identifikované látky v priemyselnej vode, ich elučné časy, molekulový vzorec a vybrané ióny pre SIM metódu

Analyt	Elučné časy [min]	Molekulový vzorec	Ióny pre SIM metódu [<i>m/z</i>]		
Etylénglykol monododecyl éter	4,990	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OCH ₂ CH ₂ OH	140	111	97
Kyselina palmitová	6,008	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	213	129
Kyselina olejová	6,677	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	264	111	95
Kyselina steárová	6,757	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	241	185
Adipát	7,500	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	129	147	112
Dietylénglykol dibenzoát	7,922	(C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₂ CH ₂) ₂ O	149	105	77

bolo pozorované intenzívne penenie spôsobené povrchovo aktívnymi látkami (kyselina stearová, palmitová, olejová), ktoré nemusia byť nebezpečné, avšak vo vode vytvárajú micely, v ktorých môžu byť uzavreté toxické látky nepolárneho a mierne polárneho charakteru. Tieto micely sú vo vode rozpustné a môžu spôsobiť rýchlejšiu migráciu látok, ktoré by za normálnych podmienok nemigrovali, alebo by migrovali veľmi pomaly.

Na prečistenie priemyselnej vody sa použila technológia firmy HOFITECH, využívajúca javy vyvolané elektrickým prúdom, ktoré na molekulárnej úrovni extrahujú rozpustené a nerozpustné organické látky, anorganické látky a kovy z odpadových vôd. Na izoláciu analytov z prečistených vzoriek vôd sa použila vyvinutá LLE metóda a extrakty sa následne analyzovali GC-MS v SIM (monitorovanie jednotlivých iónov) móde. Vo vzorkách prečistenej odpadovej vody bol zaznamenaný výrazný pokles obsahu vybraných markerov.

Záver

Štúdium bolo zamerané na výber extrakčných parametrov LLE pre izoláciu rôznych druhov kontaminantov z priemyselnej vody. Extrakty boli analyzované GC-MS metódou vo FS a SIM móde. Ukázalo sa, že priemyselná odpadová voda obsahuje značné množstvo glykolov a povrchovo aktívnych látok. Navrhovaná metóda bola použitá na stanovenie cieľových zlúčenín aj v prečistených priemyselných vodách.

Autori ďakujú Ministerstvu hospodárstva SR za podporu v rámci Schémy na podporu spolupráce podnikateľských subjektov a vedecko-výskumných pracovísk formou Inovačných voucherov (2017–2020) (schéma pomoci de minimis) na základe zmluvy č. 125/2020-2060-3410-23/B. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0149 a Programom na podporu excelentných tímov mladých výskumníkov STU.

LITERATÚRA

1. World's Worst Pollution Problems, Green Cross Switzerland and Pure Earth Report, <http://www.worstpolluted.org> (2016), stiahnuté 15. 8. 2021.

2. Croce R., Cinà F., Lombardo A., Crispeyn G., Cappelli C. I., Vian M., Maiorana S., Benfenati E., Baderna D.: *Ecotoxicol. Environ. Safety* 144, 79 (2017).
3. Münze R., Hannemann C., Orlinskiy P., Gunold R., a ďalších 10 spoluautorov: *Sci. Total Environ.* 599–600, 387 (2017).
4. Friha I., Karray F., Feki F., Jlaiel L., Sayadi S.: *Int. Biodeterior. Biodegradation* 88, 125 (2014).

N. Viktoriová^a, A. Szarka^a, S. Hrouzková^a, and G. Horváth^b (^a*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava, SR*, ^b*HOFITECH s.r.o., Dunajská Streda, SR*): **Development of Analytical Method for Monitoring Contaminants in Industrial Water from the Paints and Varnishes Manufacturing**

Routine industrial wastewater treatment does not remove significant amounts of pollutants and toxic substances that are considered potentially dangerous to freshwater ecosystem organisms. Industrial wastewater samples have very complex matrices, so the treatment of the sample itself is a problematic step in the analysis of such samples. Various extraction techniques, such as liquid-liquid extraction (LLE), are used to treat industrial water samples. There are two basic requirements for industrial water analysis: low limits of detection and the multiresidual character of the method. The final phase of analysis is identification and determination of analytes using appropriate instrumental techniques. This paper is focused on the development of an analytical method for monitoring the presence of contaminants in source industrial water and in water treated by technology that uses scrap metal to purify industrial wastewater and developing and optimizing an extraction process to isolate pollutants from industrial wastewater and process water and subsequent analysis of extracts by GC-MS.

Keywords: industrial wastewater, extraction techniques, LLE, GC-MS

OBSAH

<i>D. Adamcová, M. Kuchař, A. Jenišťová</i>	Vývoj <i>in vitro</i> metody pro transkorneální přenos kanabinoidů	69
<i>R. Bušovská, P. Kyjaková, R. Hanus, J. Sobotníková</i>	Metabolomika prchavých látek lidského pachu metodou dvojdimenzionální plynové chromatografie	73
<i>L. Filipiaková, M. Král, O. Volochanskyi, M. Švecová</i>	Detekcia myricetínu pomocou pokročilých techník vibračnej spektroskopie	76
<i>I. Kopal, M. Švecová, T. Čapková, M. Dendisová</i>	<i>Ex-situ</i> analýza produktu fotochemické reakce 4-aminobenzenthionu na površích plasmonických substrátů	83
<i>A. Koryťáková, O. Volochanskyi, M. Švecová</i>	SERS detekce vybraných aminokyselin pomocí galvanicky připravených substrátů	90
<i>A. Reguli, H. Bavlovič Piskáčková, P. Šterbová-Kovaříková</i>	UHPLC-MS/MS analýza ICRF-193, nového analógu dexrazoxanu	97
<i>A. Špačková, K. Hroboňová</i>	Selektivná extrakcia kumarínov z kozmetických výrobkov – výber typu sorbentu a extrakčného postupu	101
<i>N. Viktorová, A. Szarka, S. Hrouzková, G. Horváth</i>	Vývoj analytickej metódy na monitorovanie kontaminantov v priemyselnej vode z výroby farbív a lakov	105

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Adamcová D. 69

Bavlovič Piskáčková H. 97
Bušovská R. 73

Čapková T. 83

Dendisová M. 83

Filipiaková L. 76

Hanus R. 73
Horváth G. 105
Hroboňová K. 101
Hrouzková S. 105

Jeništová A. 69

Kopal I. 83
Koryťáková A. 90
Král M. 76
Kuchař M. 69
Kyjaková P. 73

Reguli A. 97

Sobotníková J. 73
Szarka A. 105

Špačková A. 101
Šterbová-Kovaříková P. 97
Švecová M. 76, 83, 90

Viktoryová N. 105
Volochanskyi O. 76, 90

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 19 (2021), čís./no. 3 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) • evidenční číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva; Webové stránky: P. Drašar • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚV-KŮ/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., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2021 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 10.8.2021.