

Czech
Chemical
Society

Symposium
Series

5



Cena Karla Štulíka

9. února 2022

Mendelova univerzita v Brně

Sborník vybraných příspěvků

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

„CENA KARLA ŠTULÍKA 2022“

9. února 2022

Mendelova univerzita v Brně



Editoři sborníku:
Jiří Barek
Vlastimil Vyskočil

Partneři soutěže O cenu Karla Šulíka 2022:



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



analytika®
Výrobce referenčních materiálů



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
Univerzita Karlova

MERCK

Metrohm

MUNI Masarykova
univerzita

NICOLET CZ
MOLECULAR SPECTROSCOPY

Mendelova
univerzita
v Brně

Skalar

STU
SLOVENSKÁ TECHNICKÁ
UNIVERZITA V BRATISLAVE

Waters
THE SCIENCE OF
WHAT'S POSSIBLE.®

25. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie „O cenu Karla Štulíka 2022“

Jubilejní 25. ročník soutěže o Cenu Karla Štulíka 2022 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie proběhl dne 9. února 2022 na Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně (viz <https://ucb.af.mendelu.cz/vyuka/o-cenu-karla-stulika-2022/>).

Vzhledem k pandemii, která se v tomto případě nevyhnula ani některým osvědčeným členům poroty, proběhla soutěž v hybridním formátu, čehož využili nejen někteří soutěžící, ale i řada dalších zájemců o prezentované výsledky. Díky vynikající a obětavé práci místního organizačního týmu ve složení prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D., doc. Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D., RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D. a Bc. Veronika Pavlačková, proběhla soutěž bez nejmenších problémů a v tradiční příjemné atmosféře. Je proto mojí milou povinností všem těmto kolegům za dobře odvedenou práci ještě jednou vřele poděkovat. Navzdory problémům s pandemií a jejímu negativnímu dopadu na experimentální práci studentů na vysokých školách se sešlo 14 kvalitních soutěžních prací reprezentujících prakticky celé spektrum moderních analytických metod a dokumentující kvalitní vědecko-výzkumnou práci na příslušných vysokých školách v oblasti analytické chemie. Proto bych na tomto místě rád poděkoval Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Univerzitě Karlově, Masarykově univerzitě a Mendelově univerzitě za podporu vědecko-výzkumné práce studentů, bez které by soutěžní práce vůbec nemohly vzniknout. A můj dík je o to větší, že se tak děje v době, kdy práce se studenty není příliš zohledňována při současném scientometrickém hodnocení vysokoškolských učitelů. Jak je zvykem už 25 let, porota reprezentovala všechny zúčastněné vysoké školy a letos pracovala ve složení prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D. (předseda), prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., Ing. Radmila Řápková, RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D., doc. Ing. Katarína Hroboňová, Ph.D. a doc. RNDr. Dr. David Sýkora a všem jejím členům rovněž patří dík za nelehkou práci. Hlavně bych však rád poděkoval všem soutěžícím studentům za odvedenou práci a za ochotu pracovat více a lépe při vývoji nových analytických metod, bez kterých se moderní společnost nemůže úspěšně rozvíjet. A to bez ohledu na to, na jaké výsledné pozici se umístili. Je příjemné sledovat mladé zanéžené analytické chemiky, kteří mají rádi svůj obor a jsou ochotní pro něj obětovat i spoustu svého volného času. A vidět, že i u nás vyrůstají mladí talentovaní analytičtí chemici schopní dobře se uplatnit i na mezinárodním fóru. Následující oceněné práce to podle mého názoru jasně dokumentují. (Vyrovnanost soutěžících dokazuje i skutečnost, že letos byly uděleny dvě druhé ceny).



1. místo získala Bc. Eliška Macháčová (Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita) za práci *Detekce proteinových biomarkerů pomocí lateral flow testů s fotonupkonverzními nanočásticemi*.



2. místo získaly současně Bc. Monika Koptavá (Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita) za práci *Analýza lipidů pomocí MOLI MS v kombinaci s off-line ozonizací*.



a **Bc. Magdaléna Labiková** (Ústav organické chemie VŠCHT Praha) za práci *Chirální separace biologicky aktivních aminů v kapalinové chromatografii*.



Zvláštní cenu poroty sponzorovanou firmou Metrohm ČR za nejlepší práci v oblasti elektroanalytické chemie získala

Bc. Michaela Pejzlová (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova) za práci *Studium vlivu modifikace borem dopované diamantové elektrody na elektrochemické chování vybraných neurotransmiterů*.



Zvláštní cenu poroty sponzorovanou firmou Nicolet ČR za nejlepší práci v oblasti molekulární spektroskopie získala

Bc. Adéla Koryťáková (Ústav analytické chemie VŠCHT Praha) za práci *Vliv podkladového materiálu a přídavku komplexačního činidla na galvanickou přípravu SERS-aktivních vrstev a spektra riboflavinu*.

Zvláštní cenu poroty pro studenty bakalářského studia získal

Jakub Harvalík (Ústav analytické chemie VŠCHT Praha) za práci *Studium využitelnosti koloidních roztoků Au a Ag nanočástic pro povrchem zesílenou Ramanovou spektroskopii krevní plazmy*.

Zvláštní cenu poroty dále získaly

Bc. Eliška Birgusová (Ústav chemie a biochemie, Agromnická fakulta, Mendelova univerzita) za práci *Elektrochemická detekce jablečno-mléčné fermentace*.

a **Bc. Kateřina Hrůzová** (Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita) za práci *Nové možnosti dvourozměrné kapalinové chromatografie*.

Stejně jako loni se na předních místech umístily soutěžící studentky a dokázaly, že analytická chemie v žádném případě netrpí genderovou nevyvážeností. Což neznamena, že pánové by neměli dělat více pro zlepšení podmínek pro práci žen v analytických laboratořích.

Považuji za svou milou povinnost poděkovat na tomto místě Ing. Radmile Řápkové, technické redaktorce časopisu *Chemické listy*, a prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. vedoucímu redaktoru našeho časopisu za přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu *Czech Chemical Society Symposium Series* (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného letošnímu ročníku této soutěže. A jistě budou všichni naši čtenáři souhlasit s mým srdečným poděkováním všem partnerům a sponzorům soutěže, jejichž loga si dále dovoluujeme otisknout, za jejich podporu, bez které by tato soutěž nikdy neproběhla.

A na závěr bych rád oznámil, že v příštím roce proběhne tato soutěž 8. a 9. února 2023 na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v Ostravě.

Jiří Barek
předseda Odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické

APLIKACE TRANSESTERIFIKAČNÍ DERIVATIZAČNÍ REAKCE PRO GC-MS ANALÝZY

ADAM BŘEZINA^a, ADÉLA DOŘMANOVÁ^a,
PETR KUKUČKA^b, PŘEMYSL LUBAL^a
a MARTA FARKOVÁ^a

^a Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, ^b RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika
484382@mail.muni.cz

Klíčová slova: derivatizace, GC-MS, lipidy, oleje, transesterifikace

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220319>

Úvod

Derivatizace je běžně využívaná technika v chromatografických analýzách. Při derivatizaci dochází ke změně funkční skupiny (jako je třeba hydroxyl, karboxyl nebo thiol) dané sloučeniny na funkční skupinu, která má vlastnosti potřebné pro analýzu. Derivatizační postupy (např. silylace, acylace, alkylace a esterifikace/transesterifikace) se používají hlavně v GC-MS^{1,2}. Při GC-MS analýzách se u vzorků setkáváme s problémy, jako je nízká těkavost, malá tepelná stabilita anebo nedostatečná separace jednotlivých složek. S použitím derivatizace je možné tyto vlastnosti upravit.

Transesterifikace je proces, při kterém ester (v našem případě olej) chemicky reaguje s alkoholem za určitých podmínek. Obvykle se používá methanol nebo ethanol, a to pro jejich nízkou cenu a dobrou dostupnost.

Lipidy jsou estery vyšších karboxylových kyselin. Konkrétně se jedná o deriváty mastných kyselin jedno- nebo trojsytného alkoholu (nejčastěji glycerolu). Jednoduché lipidy se dělí na tuky, oleje a vosky. Hlavní složkou olejů jsou triacylglyceroly – sloučeniny, u nichž je glycerol esterifikován třemi mastnými kyselinami³.

Experimentální část

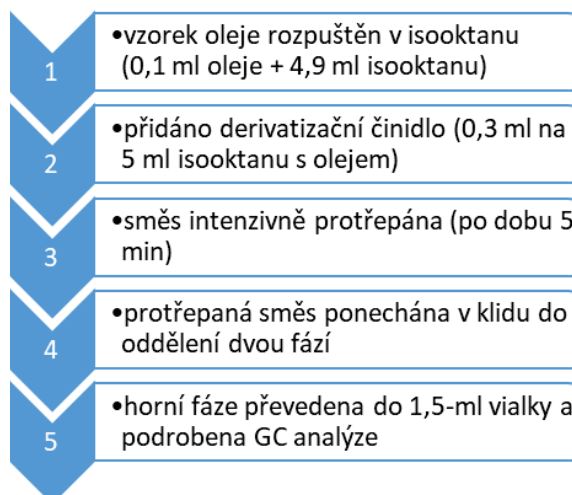
V této práci jsme analyzovali řepkový olej (vyrobený v EU, výrobce PALMA, Slovensko) metodou GC-MS. Vzorky byly derivatizovány transesterifikační reakcí za použití methanolu s bazickým katalyzátorem (KOH/NaOH jako methanolicke roztoky různých koncentrací) při konstantních experimentálních podmínkách (intenzita a doba třepání, množství vzorku a derivatizačního činidla a koncentrace oleje v rozpouštědle).

Olej byl rozpuštěn v isooktanu a poté byl přidán roztok derivatizačního činidla. Směs byla třepána po dobu 5 min, pak byla ponechána v klidu až do okamžiku, kdy došlo k oddělení dvou fází. Horní vrstva (isooktan s derivatizovaným olejem) byla přenesena do malé 1,5ml vialky a poté nastříknuta na kapilární kolonu DB-5 ms 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm s Rxi Guard kolonou 1 m × 0,53 mm pro separaci. Analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent HP 6890 Series s hmotnostním spektrometrem HP 5972 jako detektorem. Popsaný postup je znázorněn na obr. 1.

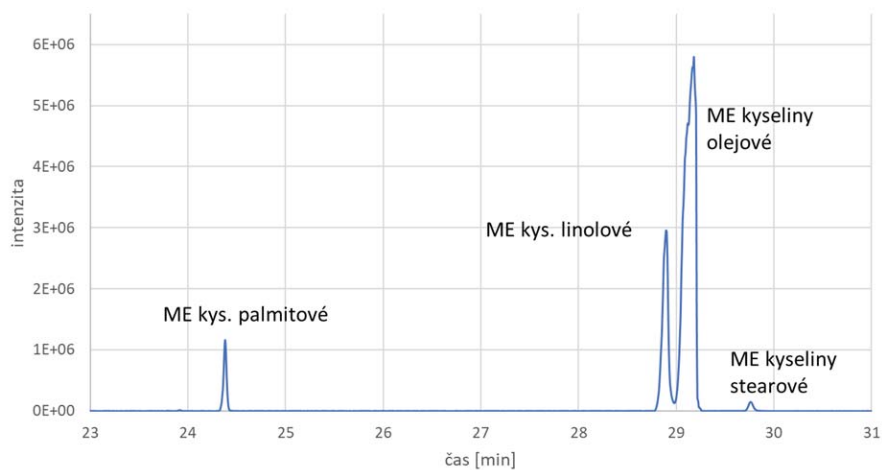
Výsledky a diskuse

Byly hledány koncentrace KOH/NaOH pro dosažení nejvyšších hodnot analytických signálů (intenzit) z MS detektoru pro methylestery (ME), ty vedou k nejvyšší citlivosti a nejnižším hodnotám LOD a LOQ. Ukázka naměřeného chromatogramu je na obr. 2, jedná se o analýzu oleje derivatizovaného pomocí 3M KOH. Hmotnostní spektra methylesterů sledovaných mastných kyselin jsou na obr. 3 jako průměr jednotlivých píků z chromatogramu, který je na obr. 2. Výsledky všech měření jsou prezentovány na obr. 4.

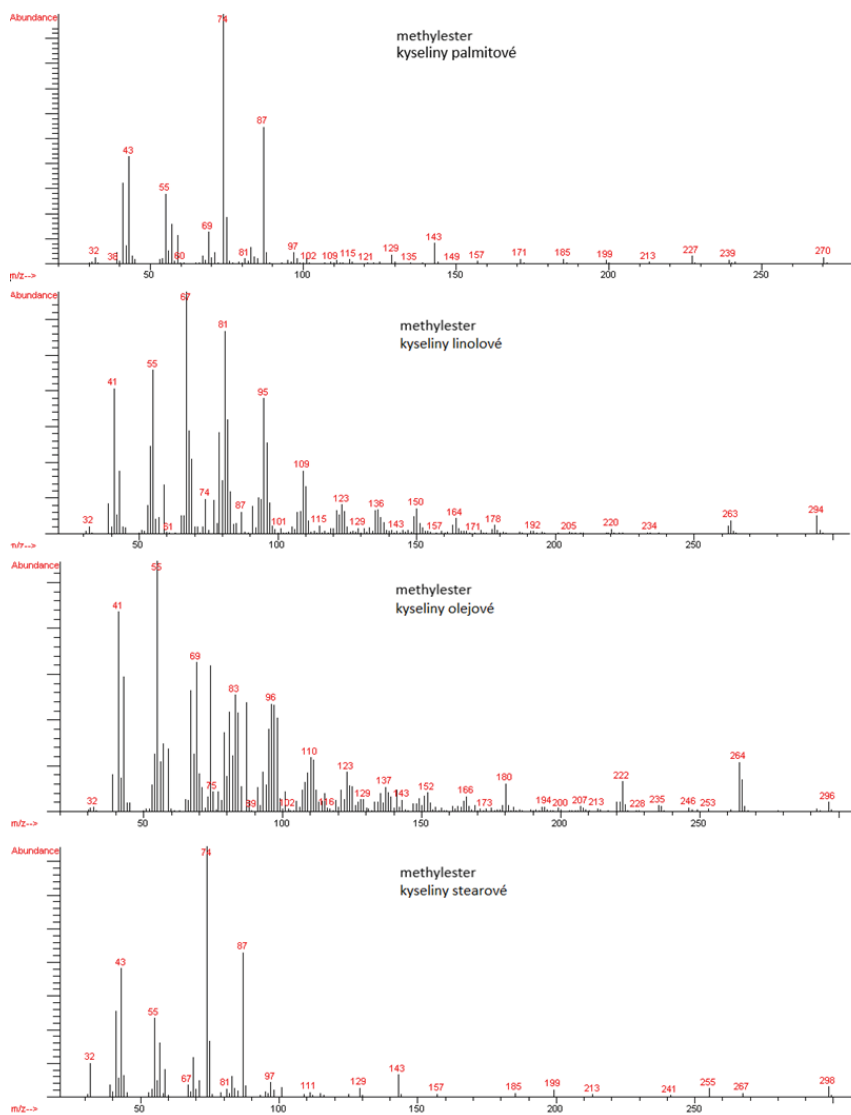
Jako optimální koncentrace methanolickeho roztoku pro dosažení nejvyšší výtěžnosti transesterifikace oleje byla pro KOH nalezena hodnota 3,0 mol dm⁻³ a pro NaOH 2,0 mol dm⁻³. Při vyšších koncentracích převažuje nad transesterifikací vedlejší chemická reakce – saponifikace,



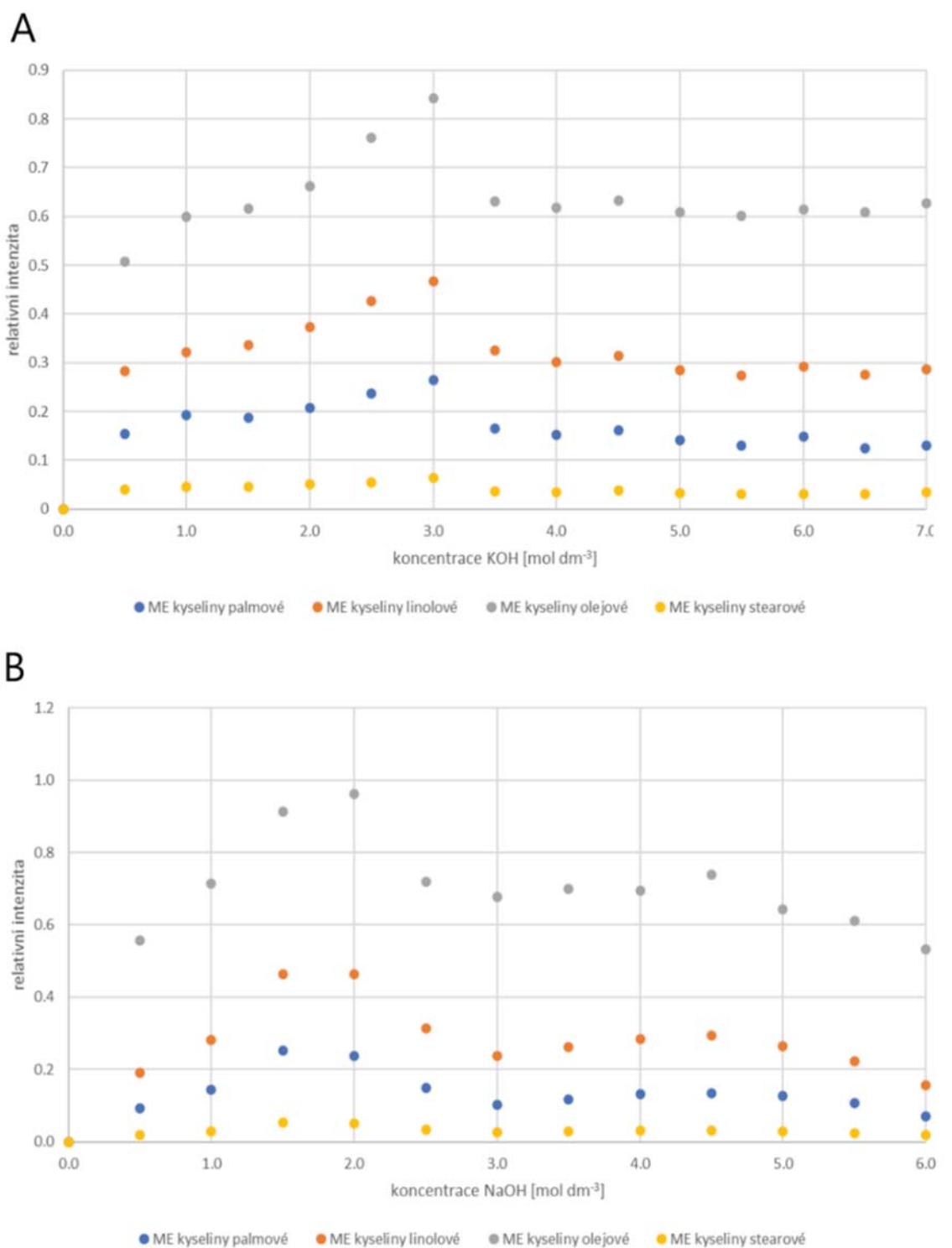
Obr. 1. Grafické znázornění postupu přípravy vzorku na analýzu



Obr. 2. Chromatogram směsi derivatizované pomocí 3M KOH



Obr. 3. Naměřená hmotnostní spektra methylesterů kyselin palmitové, linolové, olejové a stearové



Obr. 4. A – závislost relativní intenzity signálu methylesterů na koncentraci hydroxidu draselného; B – závislost relativní intenzity signálu methylesterů na koncentraci hydroxidu sodného

což způsobuje snížení výtěžku methylesterů mastných kyselin. To má za následek nízkou míru separace mezi nepolární a polární fází, zvýšenou viskozitu derivatizovaných vzorků a také nižší intenzitu MS signálů.

Práce vznikla za podpory Masarykovy univerzity (projekt MUNI/A/1539/2021).

LITERATURA

1. Moldoveanu C. S., David V.: IntechOpen, 2019, 1-33. doi:10.5772/intechopen.81954
2. Guide to Derivatization Reagents for GC. Bulletin 909A [online]. Sigma-Aldrich, 1997 [2021-08-20]. <https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/application::paper.paper/t196909.pdf>. Staženo 14. 10. 2022.
3. Baskar G., Kalvathy G., Aiswarya R., Abarnaebenezer I.: Advances in bio-oil extraction from nonedible oil seeds and algal biomass, in Azad, K. (Ed.). Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment. Elsevier, Amsterdam, 2019. doi:10.1016/B978-0-08-102728-8.00007-3.

A. Březina^a, A. Dořmanová^a, P. Kukučka^b, P. Lubal^a, and M. Farková^a (^a*Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno*, ^b*RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic*): **Application of Transesterification Derivatization Reaction for GC-MS Analysis**

This paper is focused on study of the concentration of the basic catalyst in methanol on the yield of the derivatization transesterification reaction of triacylglycerols. Potassium hydroxide and sodium hydroxide solutions were used as basic catalysts. Triacylglycerols were transesterified, rapeseed oil was used as a sample. Triacylglycerols were converted to methyl esters of fatty acids, which were subsequently determined by GC-MS where the peak areas were monitored, because they represent the yield of the formed fatty acid methyl esters, namely palmitic, oleic, linoleic and stearic acids. The highest yield of transesterification of the oil to methylesters of fatty acids was found for a concentration of 3.0 mol dm^{-3} for KOH and 2.0 mol dm^{-3} for NaOH. At higher catalyst concentrations, a predominant side-reaction, saponification, was observed, which decreased the overall yield of fatty acid methyl esters.

Keywords: derivatization, GC-MS, lipids, oils, transesterification

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220319>

VYUŽITIE EXTRAKCIE PODPORENEJ ULTRAZVUKOM PRE ANALÝZU ŠKORICE A POTRAVINOVÝCH VÝROBKOV

KRISTÍNA ČIŠOVSKÁ
a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

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

xcisovska@stuba.sk, katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: kumarín, škorica, extrakcia podporená ultrazvukom, extrakčné rozpúšťadlo

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220323>

Úvod

Kumaríny, deriváty benzopyrónu, sú látky prírodného pôvodu. Zdrojmi mnohých kumarínov, ako aj základného predstaviteľa podskupiny jednoduchých kumarínov, kumarínu, sú rastliny, niektoré huby a baktérie. Tieto zlúčeniny sú charakteristické vôňou sušeného sena a rôznymi biologickými účinkami. Kumarín sa pridáva do potravín a kozmetických výrobkov ako aromatická prísada na zvýraznenie a doplnenie vône¹. Vzhľadom na to, že vo vyšších dávkach môže spôsobovať bolesti hlavy, nevoľnosť, ospalosť a v niektorých prípadoch aj poškodenie pečene u človeka, maximálne povolené množstvo kumarínu v potravinách a nápojoch je 2 mg kg⁻¹ (s výnimkou pre určité karamelizované a alkoholické nápoje, kde je povolená maximálna koncentrácia kumarínu 10 mg kg⁻¹)².

Príprava vzorky je dôležitou časťou procesu chemickej analýzy. Na prípravu vzorky pre analýzu cielenú na stanovenie vybraných účinných látok v extraktoch, alebo aj na izoláciu látok z rastlinných materiálov sa využívajú viaceré extrakčné techniky. Na extrakciu kumarínu a jeho

derivátov z rastlín, korenín, potravinových výrobkov sú vhodné techniky, ako napr. extrakcia kvapalinou podporená miešaním, extrakcia podporená ultrazvukom (UAE) alebo mikrovlnným žiarením (MAE), extrakcia pri zvýšenom tlaku (ASE) a iné (tab. I). Primárne extrakty sú často zložitou zmesou látok, a preto na prečistenie alebo aj skoncentrovanie analytu je vhodné použiť extrakciu tuhou fázou (SPE)³.

Extrakcia podporená ultrazvukom využíva pri extrakcii látok z tuhých vzoriek pomocou vhodného rozpúšťadla aj ultrazvukové vlnenie, ktoré spôsobuje lepší prienik rozpúšťadla do štruktúry matrice. To spôsobí rozvíbrowanie častíc rozpúšťadla a tým sa zrýchli ich pohyb, čo vedie k rýchlejšiemu a účinnejšiemu uvoľneniu analytu zo vzorky do rozpúšťadla. Účinnosť extrakcie v systéme kvapalina-tuhá fáza je vo veľkej miere ovplyvnená typom extrakčného rozpúšťadla. Tradične sa používajú organické rozpúšťadla, napr. alkoholy (metanol, etanol, zmesi s vodou). Novou skupinou ekologických a bioodbornejších extrakčných rozpúšťadiel sú zmesi z nízkou prechodovou teplotou (LTTM, Low transition temperature mixture). LTTM predstavuje zmes minimálne dvoch zložiek, akceptor a donor vodíka, ktorá má menšiu teplotu tavenia ako každá z týchto látok, pričom vo výslednej kvapalnej zmesi sú zložky viazané vodíkovými väzbami. Vlastnosti LTTM závisia od typu a pomeru východiskových zložiek a z toho dôvodu je potrebné optimalizovať zloženie zmesi pre extrakciu cieľových látok⁴.

Cieľom práce bolo prešetriť vplyv zmeny podmienok UAE (typ rozpúšťadla, čas, teplota) na výtťažok kumarínu zo škorice a potravinového výrobku obsahujúceho škoricu.

Experimentálna časť

Chemikálie

Referenčná látka kumarín (98%) bola zakúpená od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Mobilnú fázu tvorili

Tabuľka I

Porovnanie výhod a nevýhod vybraných extrakčných techník vhodných na extrakciu kumarínu

Extrakčná technika	Extrakcia kvapalinou podporená miešaním	Extrakcia podporená ultrazvukom	Extrakcia podporená mikrovlnným žiarením
Výhody	- bežne používaná - najjednoduchšia metóda	- časovo nenáročná - malé náklady na vybavenie - vhodné pre termolabilné látky - ultrazvukové vlny zlepšujú prienik rozpúšťadla do matrice	- rýchlosť - nízka spotreba rozpúšťadiel - možnosť pracovať pri vysokých teplotách - automatizácia
Nevýhody	- prácnosť - časová náročnosť	- potrebná filtrácia - riedenie vzorky	- potrebná filtrácia - obmedzený výber rozpúšťadla

rozpúšťadlá, metanol (pre HPLC, VWR Chemicals) a kyselina octová (p.a., Centralchem). Deionizovaná voda (18,2 MW/cm) sa získala pomocou systému na čistenie vody AquaMax ultra (séria 370).

LTTM zmesi, cholín chlorid:L-kyselina mliečna (LTTM1: 1:2, LTTM2: 1:3, LTTM3: 1:4, LTTM4: 1:5, mol/mol), cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (LTTM5: 1:2:1, mol/mol/mol) alebo chlorid:L-kyselina mliečna:1,2-propándiol (LTTM6: 1:2:1, mol/mol/mol) (všetky chemikálie na prípravu boli čistoty p.a., Centralchem).

Vzorky mletej škorice a cereálií s obsahom škorice sa zaoštarali z obchodnej siete a boli skladované v pôvodnom obale na suchom a tmavom mieste pri laboratórnej teplote.

Extrakcia podporená ultrazvukom

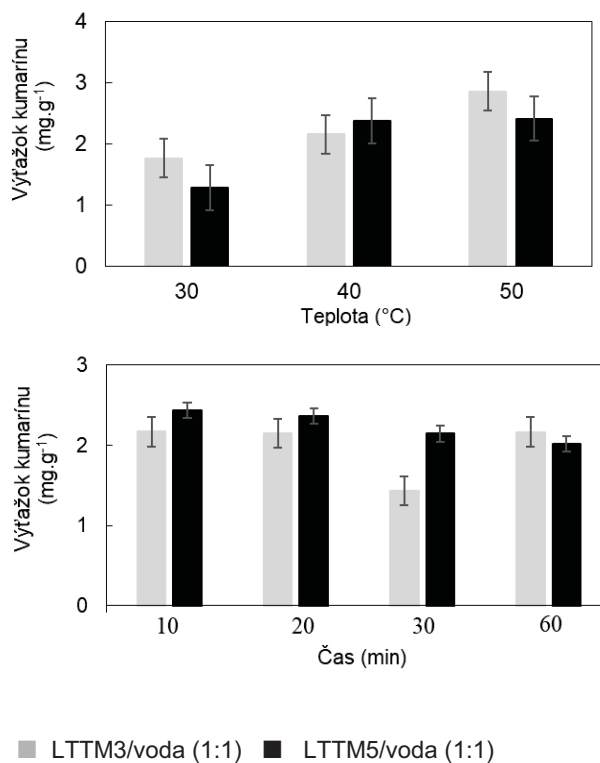
Vzorka (50 mg) sa extrahovala extrakčným rozpúšťadlom (1,5 ml; LTTM, deionizovaná voda, metanol) definovaný čas (10–60 min) v ultrazvukovom kúpeli pri konštantnej teplote (30–60 °C). Na záver sa zmes centrifugovala (5 min, 3000 rpm). Supernatant sa oddelil, prefiltravala cez 0,45 µm nylónový filter a dávkoval do HPLC.

HPLC analýza extraktov

Na analýzu extraktov sa použila HPLC s DAD detekciou. Na separáciu sa použila kolóna Kinetex C18 (100 × 4,6 mm, 5 µm) a mobilnou fázou bola zmes kyseliny octovej (1%, zložka A) a metanolu s prídavkom kyseliny octovej (1%, zložka B). Priebeh gradientu mobilnej fázy bol nasledovný: 0–12 min 20–45 % zložky B, 12–13 min 45–100 % B, 13–15 min 100 % B. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml min⁻¹, teplota kolóny 23 °C a dávkovací objem 20 µl. Chromatogramy sa snímali pri vlnovej dĺžke 280 nm a UV spektrá sa snímali v rozsahu vlnových dĺžok 190–400 nm.

Výsledky a diskusia

Dvojzložkové a trojzložkové LTTM zmesi na základe cholín chloridu a kyseliny mliečnej v rôznych pomeroch sa prešetrili ako extrakčné rozpúšťadlá pre extrakciu kumarínu zo škorice. Samotné zloženie LTTM malo vplyv na účinnosť extrakcie. Zvyšovaním podielu L-kyseliny mliečnej sa zvyšoval výtťažok kumarínu. Prídavok 1,3-propándiolu, ako tretej zložky, do extrakčnej zmesi mal pozitívny vplyv na výtťažok kumarínu. Z testovanej skupiny sa vybrali dve extrakčné rozpúšťadlá, pri ktorých sa získal najvyšší výtťažok kumarínu zo škorice, zmesi cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol). LTTM zmesi sa vyznačujú vyššou viskozitou, a preto sa prešetroval vplyv prídavku vody na účinnosť extrakcie kumarínu. Výsledky ukázali, že prídavok vody mal pozitívny vplyv na extrakčný výtťažok kumarínu. Najvhodnejší pomer vody a LTTM bol 1:1 (v/v)⁵. Okrem zloženia extrakčného rozpúšťadla sa prešetril vplyv teploty a času na



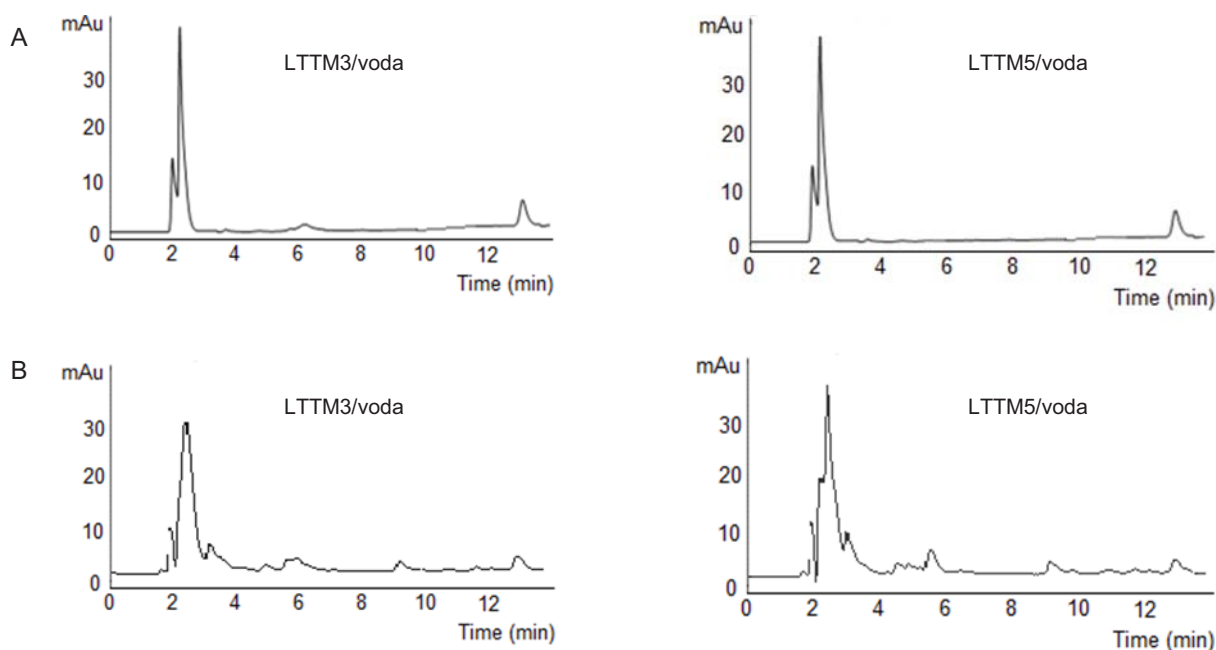
Obr. 1. Výťažky kumarínu zo škorice získané pre UAE pomocou LTTM extrakčných rozpúšťadiel pri rôznych teplotách a časoch extrakcie

účinnosť UAE extrakcie. Z výsledkov vyplynulo, že vhodná teplota a čas extrakcie boli 50 °C a 10 min (obr. 1).

Zvolené podmienky UAE sa aplikovali pri analýze vzorky škorice a cereálií s obsahom škorice. Na analýzu extraktov sa využila metóda HPLC-DAD v systéme

Tabuľka II
Chromatografické charakteristiky a niektoré validačné parametre metódy

Parameter	Kumarín	
t_R (min)	12,71	
k	5,49	
n	80042	
H (µm)	1,25	
Opakovateľnosť (RSD %)	1 deň	3 dni
t_R (min)	0,82	1,55
A	1,17	4,91
LOD (mg ml ⁻¹)	0,0022	
LOQ (mg ml ⁻¹)	0,0067	
Linearita (c , mg ml ⁻¹)	179,8+134433,2.c	
R^2	0,9959	
Koncentračný rozsah (mg ml ⁻¹)	0,007–0,05	



Obr. 2. Chromatografické záznamy UAE extraktov škorice (A) a cereálií (B) získané pomocou extrakčných rozpúšťadiel cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol; LTTM3) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol; LTTM5) v zmesi s vodou (1:1, v/v). Legenda: 1-kumarín

s obrátenými fázami. Čas analýzy bol 16 min. Metóda bola overená pre separáciu a stanovenie kumarínu pomocou chromatografických charakteristík a niektorých validačných parametrov (medza detekcie a medza stanovenia boli $2,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $6,7 \mu\text{g ml}^{-1}$, koncentračný rozsah $7,0\text{--}50,0 \mu\text{g ml}^{-1}$; tab. II). V škorici boli stanovené množstvá kumarínu $2,2 \text{ mg g}^{-1}$ a $2,4 \text{ mg g}^{-1}$ (pre zvolené extrakčné rozpúšťadlá). V porovnaní s tradičnými extrakčnými rozpúšťadlami sa dosiahol väčší (voda) alebo mierne nižší výťažok kumarínu (metanol). V cereáliách sa stanovili množstvá kumarínu $3,7 \mu\text{g g}^{-1}$ a $3,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (pre zvolené extrakčné rozpúšťadlá). Obr. 2 dokumentuje chromatografické záznamy UAE extraktov škorice a cereálií získané pomocou extrakčných rozpúšťadiel cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol) v zmesi s vodou (1:1, v/v).

Záver

Z výsledkov vyplynulo, že LTTM na základe cholín chloridu a kyseliny mliečnej sú perspektívne rozpúšťadlá pre extrakciu kumarínu zo škorice a testovaných potravinových výrobkov. Okrem zloženia extrakčného rozpúšťadla mala na účinnosť extrakcie podporné ultrazvukom vplyv aj teplota a čas extrakcie.

Práca bola finančne podporená grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (grant č. VEGA

1/0412/20). Autori ďakujú doc. Ing. M. Jablonskému za prípravu LTTM zmesi.

LITERATÚRA

1. Kumar S., Kumari R., Mishra S.: *J. Pharm. Pharmacol.* 71, 1735 (2019).
2. European Parliament and Council, 2008 European Parliament and Council Regulation (EC) no 1334/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending council regulation (EEC) no 1601/91.
3. Huie C. W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23 (2002).
4. Khandelwal S., Tailor Y.K., Kumar M.: *J. Mol. Liq.* 215, 345 (2016).
5. Čišovská K.: *Bakalárska práca*, STU v Bratislave. 1–53, 2020.

K. Čišovská and K. Hroboňová (*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava, Slovak Republic*): **The Application of Ultrasonic Assisted Extraction in Analysis Cinnamon and Food Products**

The objective of this study was to select suitable experimental conditions for extraction of coumarin by Ultrasonic Assisted Extraction (UAE). Type of extraction solvent, extraction time and temperature were optimized to

increase the extraction yield of coumarin from samples of cinnamon and foods containing cinnamon. Optimal UAE conditions include extraction time of 10 min, temperature of 50 °C and extraction solvent based on choline chloride and L-lactic acid. The extraction yields were comparable to traditional solvents – water and methanol.

Keywords: coumarin, cinnamon, ultrasonic assisted extraction, extraction solvent

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220323>

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (grant No. Vega 1/0412/20). The authors thank assoc. prof. M. Jablonský for the preparation of LTTM mixtures.

STUDIUM VYUŽITELNOSTI KOLOIDNÍCH ROZTOKŮ ZLATÝCH A STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC PRO POVRCHEM ZESÍLENOU RAMANOVU SPEKTROSKOPII KREVŇÍ PLAZMY

JAKUB HARVALÍK, KATEŘINA HRUBEŠOVÁ,
ONDŘEJ VRTĚLKA a VLADIMÍR SETNIČKA

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

Klíčová slova: povrchem zesílený Ramanův rozptyl, krevní plazma, medicínální diagnostika, koloidní substrát, riboflavin

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220327>

Úvod

Krevní plazma je tekutá složka krve, která je z největší části tvořena vodou (91 %), dále pak organickými látkami (8 %) a anorganickými solemi (1 %). Složení krevní plazmy může být ovlivněno patobiochemickými procesy probíhajícími v organismu při rozvoji onemocnění a sledování těchto změn může být využito ke stanovení klinické diagnózy. Na vývoj nových postupů analýzy krevní plazmy využitelných v diagnostice závažných onemocnění se v současnosti zaměřuje řada výzkumných skupin^{1–5}. Jednou z metod často uplatňovaných v těchto studiích je Ramanova spektroskopie^{4,6}, a to především díky nízké intenzitě Ramanova rozptylu vody či možnosti rychlé a nedeštruktivní analýzy vzorku bez jeho předchozí složité přípravy. Její nevýhodou je ale obtížná detekce analytů o nízkých koncentracích⁷.

Přínosem by tak mohla být spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), která využívá kovových substrátů vykazujících lokální povrchovou plazmonovou rezonanci^{7,8} za účelem několikanásobného zesílení Ramanova rozptylu analytu navázaného na vhodný substrát. Díky tomu mohou být detegovány i látky o velice nízkých koncentracích. V této práci byly optimalizovány experimentální parametry pro spektroskopii SERS krevní plazmy využívající koloidních roztoků zlatých (AuNP) a stříbrných nanočástic (AgNP). Získané poznatky rozvíjí současnou metodiku analýzy krevní plazmy využívanou v Laboratoři medicínální diagnostiky na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha a mohly by posunout hranice možností klinické diagnostiky obecně.

Experimentální část

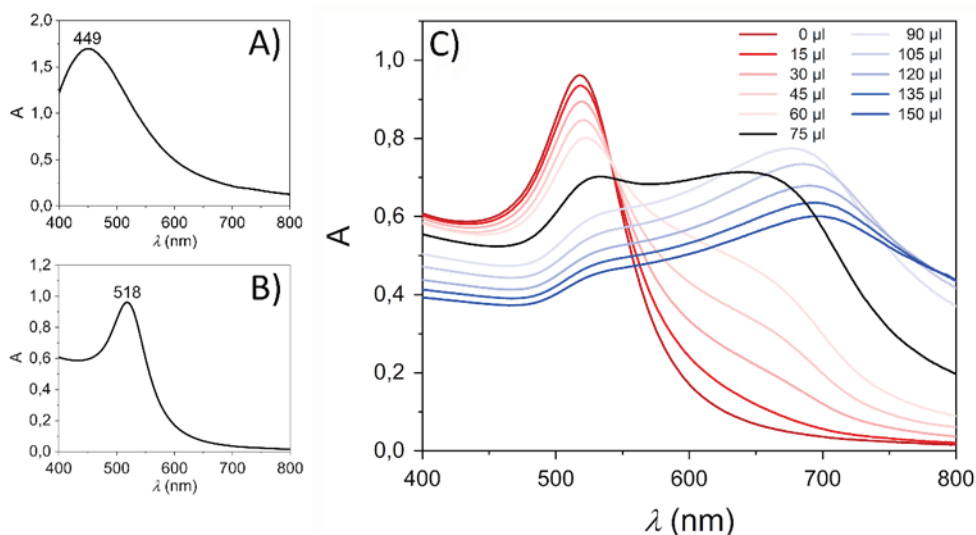
Koloidní roztoky nanočástic byly připraveny citrátovou redukcí $K[AuCl_4]$, resp. $AgNO_3$ (cit.⁹). Roztoky modelového analytu riboflavinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, použité pro ověření zesilujících schopností připravených nanočástic, byly získány naředěním zásobního roztoku riboflavinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ odpovídajícím objemem demineralizované vody, resp. suspenze AuNP či AgNP. Analyzované vzorky krevní plazmy byly získány v souladu s etickými pravidly v rámci spolupráce s Oddělením gastrointestinální endoskopie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice v Praze. Vzorky byly skladovány při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Před analýzou byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a 10 min odstředovány při přetížení $13\,000 \times g$ za použití filtru s polyvinylidendifluoridovou membránou s póry o velikosti $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Poměry mísení krevní plazmy s nanočásticemi byly 1:1, 1:5, resp. 1:9 (v:v). V případě všech experimentů s AuNP byl jako agregační činidlo dále přidán roztok NaCl o koncentraci $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ v poměru 15–150 μl NaCl na 1 ml suspenze nanočástic.

Akvizice spekter SERS proběhla na přístroji i-Raman[®] Plus (B&W Tek, USA) s excitační vlnovou délkou 785 nm. Optimální podmínky pro měření byly zvoleny na základě jejich testování takto: 5 akumulací po 60 s, 50% výkon laseru (max. výkon 340 mW). Byla zaznamenávána spektra v rozsahu $200\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením lepším než $4,5 \text{ cm}^{-1}$. Pro analýzu krevní plazmy bylo využito spojení Ramanova spektrometru s mikroskopem BAC151 (B&W Tek, USA) s objektivem se $100\times$ zvětšením a numerickou aperturou 0,80. Krevní plazma byla analyzována ve formě zaschlé kapky (20 μl ; na vzduchu za laboratorní teploty). Roztoky riboflavinu byly měřeny ve skleněných víalkách za využití sondy s vláknovou optikou BAC102 (B&W Tek, USA). Zpracování spekter probíhalo v programu OMNIC (verze 9.2.98, Thermo Scientific, USA). Byla provedena manuální korekce základní linie spekter a vyhlazení pomocí Savitzkého Golayova algoritmu s oknem 15 bodů.

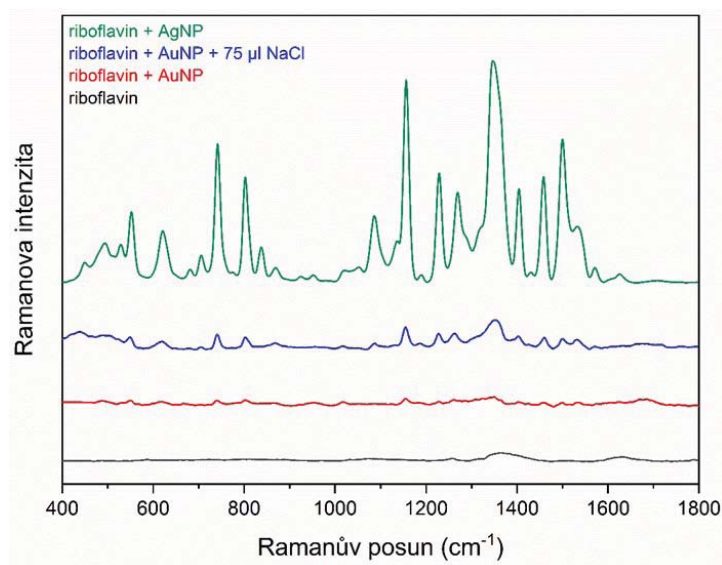
Absorpční UV-Vis spektra připravených nanočástic byla získána na přístroji Cary 60 (Agilent, USA) v rozsahu 400–800 nm při rychlosti skenování 600 nm min^{-1} . Analýza probíhala v kyvetách z optického polystyrenu s délkou optické dráhy 1 cm. Při měření AgNP byl roztok naředěn demineralizovanou vodou v poměru 1:3 (v/v), aby absorbance nedosahovala hodnot vyšších než 2. Byl prováděn odečet pozadí, které bylo získáno změřením absorpčního spektra demineralizované vody.

Výsledky a diskuse

Připravené roztoky nanočástic byly nejprve charakterizovány pomocí absorpční UV-Vis spektroskopie (obr. 1) za účelem nalezení maxima plazmonové rezonance. Maximum plazmonové rezonance pro AuNP se nacházelo při 518 nm, zatímco pro AgNP nastalo již při 449 nm. Nalezená maxima jsou ve shodě s literaturou⁷, což potvrzuje úspěšnost přípravy substrátů.

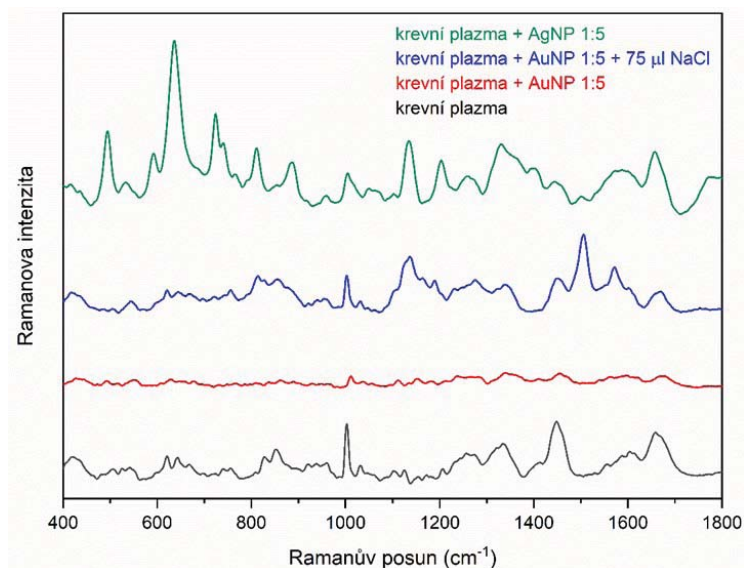


Obr. 1. Absorpční UV-Vis spektra koloidních roztoků nanočástic; A) AgNP; B) AuNP; C) AuNP s přidavky roztoku NaCl. Koncentrace roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přidavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic



Obr. 2. Srovnání Ramanových spekter roztoku riboflavínu a směsi riboflavínu s AgNP, AuNP, resp. AuNP s přidavkem NaCl. Koncentrace riboflavínu je ve všech vzorcích $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Koncentrace přidávaného roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přidavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic. Spektra jsou pro lepší názornost posunuta

Zesilující schopnosti připravených substrátů byly následně ověřeny analýzou roztoku riboflavínu, jako modelového analytu (obr. 2). Zatímco AgNP spektra SERS riboflavínu efektivně zesilovaly, AuNP nevykazovaly zesílení téměř žádné. Z toho důvodu bylo přistoupeno k experimentům, kdy byl do roztoku AuNP přidáván různý objem roztoku NaCl ($c = 1 \text{ mol l}^{-1}$), který způsobuje agregaci nanočástic a napomáhá tak tvorbě tzv. hot-spotů a zesílení signálu. Přidavek roztoku NaCl způsobil zesílení



Obr. 3. Srovnání Ramanových spekter krevní plazmy, krevní plazmy s AgNP, AuNP, resp. AuNP s přidavkem NaCl. Koncentrace roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přidavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic. Spektra jsou pro lepší názornost posunuta

signálu riboflavinu, nicméně při srovnání obou typů nanočástic je patrné, že k výrazně vyššímu zesílení dochází v případě použití AgNP. Intenzita pozorovaných pásů se pro jednotlivé výše přidavku NaCl nijak výrazně nelišila.

Efekt přidavku roztoku NaCl k AuNP byl sledován také pomocí absorpční UV-Vis spektroskopie. S rostoucím objemem přidaného agregačního činidla byl pozorován posun maxima plazmonové rezonance k vyšším vlnovým délkám (obr. 1C), přičemž největší skokový posun způsobil přidavek $75 \mu\text{l}$ NaCl na 1 ml nanočástic, kdy došlo k vytvoření výraznějšího maxima u 640 nm.

Pro experimenty s krevní plazmou byl s ohledem na výsledky UV-Vis spektroskopie a spekter SERS riboflavinu zvolen přidavek roztoku NaCl v poměru $75 \mu\text{l}$ NaCl na 1 ml AuNP. Z porovnání získaných spekter krevní plazmy a spekter SERS krevní plazmy s AgNP, resp. AuNP v různých poměrech, včetně přidavku roztoku NaCl v případě AuNP, vyplývají následující skutečnosti (obr. 3): (a) k zesílení intenzity signálu při použití AuNP musí být v roztoku přítomno agregační činidlo; (b) AgNP dosahují vyššího zesílení signálu než AuNP; (c) AgNP poskytují zesílení signálu při všech poměrech, zatímco v případě AuNP bylo úspěšně naměřeno pouze jedno dobře rozlišené spektrum SERS krevní plazmy; (d) při využití AgNP jsou spektra více zesílena v oblasti nižších vlnových délek ($400\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$), AuNP dosahují lepšího zesílení při vyšších vlnových délkách ($1100\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$).

Závěr

V této práci byla úspěšně testována schopnost zlatých a stříbrných koloidních substrátů zesilovat Ramanův signál krevní plazmy. Využitelnost obou typů nanočástic pro

spektroskopii SERS krevní plazmy byla zkoumána pro různé poměry mísení krevní plazmy s nanočásticemi a pro různé přidavky agregačního činidla (NaCl). Prvotní výsledky ukazují, že při využívané excitační vlnové délce (785 nm) je výrazně větších zesilujících účinků dosaženo při použití AgNP, které zvyšovaly intenzitu signálu pro všechny testované poměry, a to i bez přidavku NaCl. V případě AuNP bylo zesílení pozorováno pouze v jednom konkrétním případě a pro jejich následné použití při analýze krevní plazmy bude potřeba další optimalizace měřicího procesu. Výsledky získané v této práci naznačují, že koloidní roztoky plazmonických nanočástic poskytují účinné zesílení signálů v Ramanových spektrech krevní plazmy a získané poznatky tak budou dále rozvíjeny a v rámci dalšího výzkumu potenciálně využity pro analýzu krevní plazmy za účelem diagnostiky různých onemocnění.

LITERATURA

1. Lin D., Feng S. Y., Pan J. J., Chen Y. P., Lin J. Q., Chen G. N., Xie S. S., Zeng H. S., Chen R.: *Opt. Express* 19, 13565 (2011).
2. Lin D., Pan J. J., Huang H., Chen G. N., Qiu S. F., Shi H., Chen W. W., Yu Y., Feng S. Y., Chen R.: *Sci. Rep.* 4, 4751 (2014).
3. Ryzhikova E., Ralbovsky N. M., Halamkova L., Celmins D., Malone P., Molho E., Quinn J., Zimmerman E. A., Lednev I. K.: *Appl. Sci.* 9, 3256 (2019).
4. Gurian E., Di Silvestre A., Mitri E., Pascut D., Tiribelli C., Giuffre M., Croce L. S., Sergo V., Bonifacio A.: *Anal. Bioanal. Chem* 413, 1303 (2021).
5. Premasiri W. R., Lee J. C., Ziegler L. D.: *J. Phys. Chem. B* 116, 9376 (2012).
6. Bonifacio A., Dalla Marta S., Spizzo R., Cervo S.,

- Steffan A., Colombatti A., Sergio V.: *Anal. Bioanal. Chem* 406, 2355 (2014).
7. Procházka M.: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Springer, Cham 2016.
 8. Fujieda R., Yang M.: *Adv. Mat. Res.* 403, 4411 (2011).
 9. Lee P. C., Meisel D.: *J. Phys. Chem.* 86, 3391 (1982).

J. Harvalík, K. Hruběšová, O. Vrtělka, and V. Setnička (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Study of the Applicability of Colloidal Solutions of Gold and Silver Nanoparticles for Surface-enhanced Raman Spectroscopy of Blood Plasma**

This work focuses on the preparation of colloidal solutions of Au and Ag nanoparticles and verification of their applicability for surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of blood plasma. The composition of blood plasma may change due to pathobiochemical processes associated with disease development. Analysis of blood plasma might reveal these changes and thus help in the diagnostics process of various diseases. Raman spectroscopy appears to be an ideal method for rapid and non-destructive analysis of blood plasma. Moreover, surface-enhanced Raman scattering spectroscopy might allow the detection of very low levels of potential disease-specific markers. In this work, the prepared colloidal solutions of Au and Ag nanoparticles were first characterized by UV-VIS absorption spectroscopy and their enhancing capabilities were verified using riboflavin as a model analyte. Subsequently, optimization of the measurement conditions for surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma was performed. The results show that at the excitation wavelength of 785 nm, significantly higher enhancement is achieved when using Ag nanoparticles. In the case of Au nanoparticles, the enhanced blood plasma spectrum was successfully detected only once, and the addition of an aggregating agent (NaCl) was required.

Keywords: surface-enhanced Raman scattering, blood plasma, medical diagnosis, colloid substrate, riboflavin

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220327>

VLIV PODKLADOVÉHO MATERIÁLU A PŘÍDAVKU KOMPLEXAČNÍHO ČINIDLA NA GALVANICKOU PŘÍPRAVU SERS-AKTIVNÍCH VRSTEV A SPEKTRA RIBOFLAVINU

ADÉLA KORYTÁKOVÁ^a, OLEKSANDR VOLOCHANSKYI^b, MARTIN KRÁL^b
a MARIE ŠVECOVÁ^a

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

Klíčová slova: riboflavin, SERS spektroskopie, Ag substrát, galvanická depozice, podkladový materiál, EDTA

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220331>

Úvod

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) je velmi účinná technika např. pro stopovou analýzu¹. Avšak samotná příprava vzorků je náročná a jejich reprodukovatelnost je většinou nízká. Proto je kladen veliký důraz na vývoj nových, jednodušších SERS-aktivních nosičů. Pro potřeby optimalizace přípravy zesilujících substrátů se využívají tzv. modelové analyty za účelem ověření účinnosti zesílení signálu, opakovatelnosti a spolehlivosti přípravy jednotlivých nosičů. Jedním z těchto analytů je riboflavin (Rf) (cit.²). Jako vhodný způsob přípravy SERS-aktivních nosičů se jeví galvanická depozice, pomocí které lze jednoduše připravit relativně uniformní a účinné substráty. Za využití daného přístupu lze výslednou morfologii těchto substrátů snadno upravovat změnou složení depoziční lázně, přidávkou aditiv, či změnou teploty nebo pH při jejich přípravě³.

Jako podkladový materiál pro bezproudovou depozici může být použit např. hliník nebo zinek (a jejich slitiny s malým obsahem příměsí). Oba tyto kovy vyhovují potřebám galvanické depozice, jelikož mají dostatečně záporný elektroodový potenciál ($E^0[\text{Al}^{3+}/\text{Al}] = -1,66 \text{ V}$; $E^0[\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}] = -0,76 \text{ V vs. SHE}$)⁴. Kromě již používaných depozičních lázní byl dále testován přidávek komplexačního činidla (EDTA), které zvyšuje rychlost tvorby povlaků a může napomáhat k tvorbě rovnoměrných a uniformních povrchů⁵.

Předmětem této předkládané práce je sledování vlivu složení podkladového materiálu a přidavku komplexačního činidla do depoziční lázně pro galvanickou přípravu stříbrné SERS-aktivní vrstvy na výslednou spektrální odezvu

Rf. Nejvhodnější podkladový materiál je následně použit pro sledování vlivu EDTA v depoziční lázni na SERS spektra Rf. Jednotlivé spektrální sady dat jsou finálně interpretovány na základě analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA).

Experimentální část

V rámci této práce byly odzkoušeny jako možné podkladové materiály: Al-1 (99,999%, Goodfellow), Al-2 (komerčně běžně dostupný Al plech obsahující ~ 2,4 % Mg, 1,8 % Si a 12,5 % C), AlMg (~ 1,5 % Mg; 98,5 % Al, Primapol-Metal-Spot s.r.o.) a Zn (99,99%, Sigma-Aldrich). Tyto podkladové materiály byly zbroušeny metalografickým papírem a dále byly pokoveny buďto ve vodném roztoku AgNO_3 ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$; Zn substrát $0,01 \text{ mol l}^{-1}$), anebo v lázni tvořené komplexem $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ ($0,01 \text{ mol l}^{-1}$) – dále jen Ag lázeň – po dobu 10 min. Dále byl ozkoušen přidávek komplexačního činidla EDTA do depozičního roztoku AgNO_3 ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$) v koncentracích 0,1; 0,35; 0,55; 0,75; 1 mM na vybraný podkladový materiál. Připravené substráty byly deponovány v roztoku Rf ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) po dobu 18 h.

Morfologie připravených SERS substrátů byla charakterizována skenovacím elektronovým mikroskopem S-4800 (Hitachi), který deteguje sekundární elektrony. Jednotlivé snímky byly získány při urychlovacím napětí 10 kV.

SERS spektra Rf byla zaznamenána pomocí spektrometru s Fourierovou transformací EQUINOX 55/S vybaveného Ramanovým modulem FRA 106/S (Bruker Optik) s využitím excitační vlnové délky 1064 nm. Výkon laseru byl nastaven na 300 mW a rozlišení každého měření bylo 4 cm^{-1} . Počet skenů byl 1024 (studie porovnávající různé druhy plechu) a 512 (studie s přidávkou EDTA jako komplexačního činidla) a pro každý substrát byla změřena mapa šesti bodů se vzdáleností jednotlivých bodů 500 μm . Výpočet modelů PCA byl proveden algoritmem nelineárních iterativních částečných nejmenších čtverců ve spektrálním rozsahu $1700\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$, k jehož ověření byla použita plná křížová validace.

Výsledky a diskuse

U změřeného spektra čistého Rf byly na základě dostupné literatury^{6,7} přiřazené charakteristické pásy jednotlivým vibracím (tab. I). Dále bylo spektrum čisté látky porovnáváno s naměřenými SERS spektry Rf deponovaného na různé typy Cu, Au a Ag substrátů s využitím všech studovaných podkladových materiálů (Al-1, Al-2, AlMg a Zn).

Tabulka I
Přehled charakteristických vibrací čistého riboflavinu (1064 nm)

Experiment	Ramanův posun [cm^{-1}]		Přiřazení ^a
	Cit. ⁶²	Cit. ³⁴	
746	738	743	δ N ₁₃ -H
811	804	810	δ_{ip} C-N ₁₀ , C-N ₁₁
1085	1075	1085	δ_{ip} kruh III, δ C _{alif} -H
1158	1153	1157	δ_{ip} kruh II, III; δ_{ip} N ₁₃ -H; δ_{twist} C _{alif} -H
1227	1221	1222	δ_{ip} Ar
1349	1344	1347	δ_{ip} Ar, II, III
1404	1394	1405	δ_s deštníková CH ₃
1467	1435	1458	δ_{as} CH ₃
1501	1499	1496	δ_{ip} kruh III; N ₁₃ -H; δ_{scis} C ₁₅ -H
1539	1536	1534	δ_{ip} Ar C ₂ -C ₃ ; C ₆ -C ₅ ; δ_{as} CH ₃
1581	1586	1571	δ_{ip} kruh II; δ N ₁₃ -H; ν C ₁₂ =O
1626	–	1627	ν kruh I

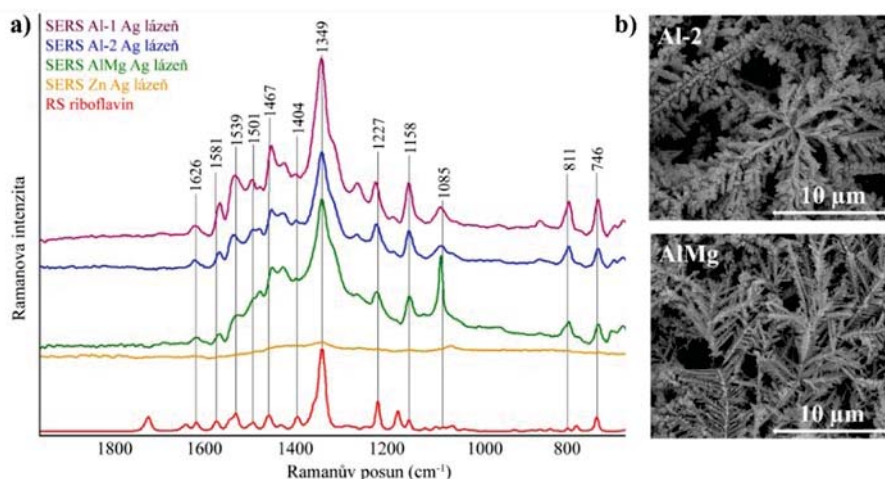
^a δ – deformační vibrace, ν – valenční vibrace, δ_{ip} – deformační rovinná vibrace, δ_{as} – deformační asymetrická vibrace, δ_{scis} – deformační nůžková vibrace, δ_{twist} – deformační krouživá vibrace, C_{alif} – vibrace alifatického řetězce

Výběr podkladového materiálu

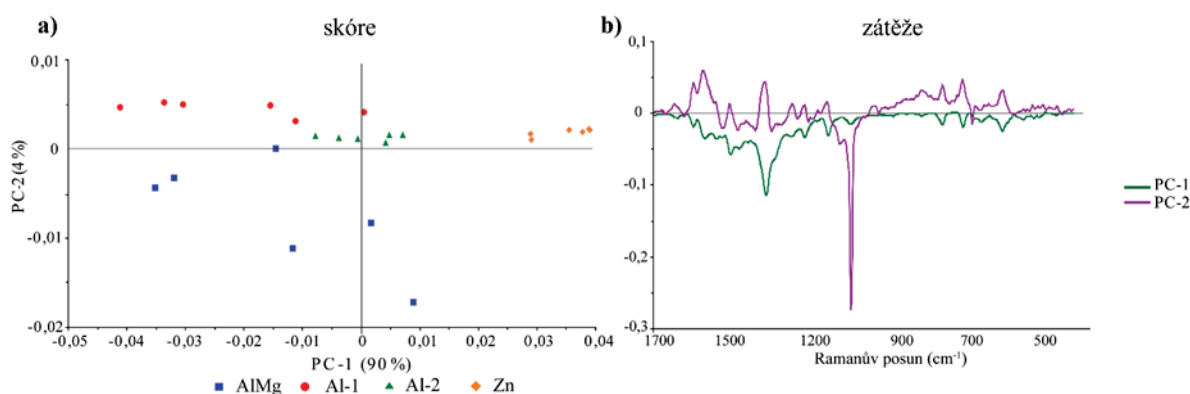
SERS spektra Rf na různých typech podkladového materiálu byla získána z obou depozičních lázní, avšak ve výsledcích budou zmíněny pouze výsledky z komplexní Ag lázně. Zesílená spektra Rf byla zprůměrována a porovnána s Ramanovým spektrem Rf (obr. 1a). Průběh SERS spekter Rf u substrátů Al-1 a Al-2 vykazuje velmi podobný charakter zesílení pásů (např. 1467, 1349, 746 cm^{-1}), ovšem u spektra Rf na substrátu Al-1 je pozorována vyšší intenzita charakteristických pásů. Zesílené spektrum získa-

né na substrátu AlMg má oproti ostatním spektrům na Al podkladech intenzivnější pás při 1085 cm^{-1} , který může značit odlišnou orientaci Rf vůči zesilujícímu substrátu, jelikož jsou pozorovatelné další, ale méně patrné změny intenzit v oblasti 1600–1400 cm^{-1} . Podobnost v SERS spektrech na Al-2 a AlMg substrátech je ve shodě se SEM snímky, kdy byly na těchto substrátech pozorované podobné dendritické struktury (obr. 1b).

Za účelem zjištění statisticky významných rozdílů ve spektrech, a tím určení vhodného podkladového materiálu pro SERS-aktivní substráty, byla na všech získaných da-



Obr. 1. a) Průměrná SERS spektra Rf získaná na substrátech připravených v Ag lázni v porovnání s Ramanovým spektrem čisté látky, b) SEM snímky povrchu substrátů připravených v Ag lázni na Al-2 a AlMg podkladech. Spektra jsou zobrazena v „common scale“ režimu se vzájemně posunutou základní linií spekter



Obr. 2. a) Rozptylový diagram komponentního skóre, b) křivky zátěží pro PC-1 a PC-2 pro SERS spektra Rf ze substrátů připravených v Ag lázni

tech provedena PCA. Pro příklad jsou zobrazeny výsledky PCA pro substráty získané v Ag lázni (obr. 2). Z PCA vyplývá, že SERS odezva Rf na substrátu AlMg dosahuje nejvyšších intenzit v porovnání s ostatními substráty.

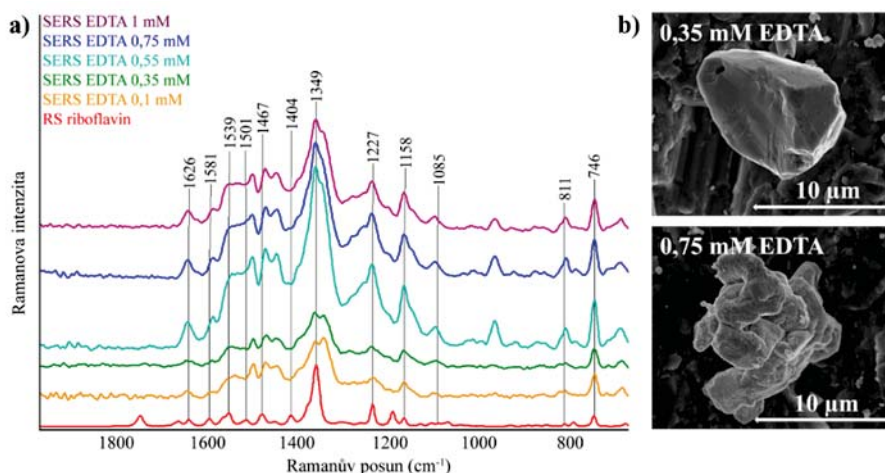
Přidavek komplexačního činidla

Ramanovo spektrum čistého Rf bylo porováno s průměrnými SERS spektry získanými na substrátech AlMg připravených v roztoku AgNO₃ s přidavkem EDTA o různé koncentraci (obr. 3a). Z pohledu průběhu jednotlivých zesílených spekter není zaznamenáno mnoho rozdílů. Avšak z pohledu celkové intenzity spekter byly získány odlišné výsledky. Se zvyšující se koncentrací přidavku EDTA narůstá intenzita jednotlivých zesílených spekter. Zároveň byla pomocí SEM (obr. 3b) pozorována jemnější struktura na připravených površích, která pravděpodobně podporuje vyšší zesílení signálu Rf.

Rozdílná morfologie pozorovaná na substrátech v komplexních lázních [Ag(EDTA)] (objemné krystaly) a [Ag(NH₃)₂]⁺ (dendritická struktura) je pravděpodobně zapříčiněna použitím odlišných komplexačních činidel. Ovšem z pohledu intenzity signálu Rf bylo dosaženo velmi podobných hodnot zesílení na substrátech připravených v obou typech lázní.

Závěr

V rámci této práce byl zkoumán vliv různých typů podkladového materiálu (Al-1, Al-2, AlMg a Zn) a přidavku komplexačního činidla do depoziční lázně pro galvanickou výměnu. Na základě průběhu zesílených spekter Rf a PCA analýzy byl jako nejvhodnější a nejvíce univerzální nosič vybrán podkladový materiál AlMg (při použití excitační vlnové délky 1064 nm). V důsledku použití rozdíl-



Obr. 3. a) Průměrná SERS spektra Rf získaná na substrátech připravených v roztoku AgNO₃ s přidavkem EDTA v porovnání s Ramanovým spektrem čisté látky, b) SEM snímky povrchu substrátů připravených v komplexní lázni [Ag(EDTA)] o koncentraci 0,35 a 0,75 mM EDTA na AlMg podkladu. Spektra jsou zobrazena v „common scale“ režimu se vzájemně posunutou základní linií spekter

ných komplexačních činidel vznikaly dendritické struktury (v případě lázně obsahující $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$) nebo objemné krystaly (v případě lázně obsahující $[\text{Ag}(\text{EDTA})]$), které byly pozorovány pomocí SEM. Přídavek EDTA do pokovovací lázně měnil morfologii deponovaného kovu a nejintenzivnější spektrální odezvy Rf bylo dosaženo při přidávku 0,55 mM EDTA. Spektrální intenzita Rf deponovaného na substrátu připraveném v lázni s přidávkou 0,55 mM EDTA byla srovnatelná s dosaženou intenzitou spekter Rf získaných na substrátech připravených v Ag lázni. Substráty deponované v roztoku AgNO_3 vykazovaly nejslabší spektrální odezvu Rf.

Autoři děkují výzkumné infrastruktuře NanoEnviCz podporované Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. Projekt č. LM2018124.

LITERATURA

1. Procházka M.: *Surface-enhanced Raman Spectroscopy*. Springer International Publishing, Switzerland 2016.
2. Aroca R.: *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester 2006.
3. George M., Vaidyan V.: *J. Appl. Electrochem.* 12, 359 (1982).
4. Ahmad Z.: *Principles of Corrosion Engineering and Corrosion Control*. Elsevier Oxford 2006.
5. Djokić S. S., Nikolić N., Živković P., Popov K., Djokić N. S.: *218th ECS Meeting* (Djokić S. S., Stickney J. L., ed.), str. 7. The Electrochemical Society, New Jersey 2011.
6. Dendisová-Vyškovská M., Kokaislová A., Ončák M., Matějka P.: *J. Mol. Struct.* 1038, 19 (2013).
7. Liu F., Gu H., Lin Y., Qi Y., Dong X., Gao J., Cai T.: *Spectrochim. Acta, Part A* 85, 111 (2012).

A. Korytářová^a, O. Volochanskyi^b, M. Král^b, and M. Švecová^a (^a *Department of Analytical Chemistry,* ^b *Department of Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Influence of Base Material and Addition of Complexing Agent to Deposition Bath for Galvanic Preparation of SERS-active Layers and Spectra of Riboflavin**

SERS spectroscopy remains not a well-established analytical technique mainly because of the complicated preparation of SERS-active substrates, which often have low reproducibility. For this reason, the development of new or optimization of existing substrates is important. For testing the SERS activity of these substrates, the so-called model analytes are commonly used. One of them is riboflavin, which is utilized for its non-toxicity and suitable optical properties.

This work is focused on optimizing the enhancing properties of galvanically prepared silver substrates. The influence of the base material (Al and its alloys, Zn) and of the addition of a complexing agent (EDTA) into the Ag deposition bath on the spectral response of riboflavin was evaluated. Each prepared substrate was characterized by scanning electron microscopy, and the SERS spectra were collected using an excitation wavelength of 1064 nm. All data were subsequently processed and interpreted using multivariate statistics, namely principal component analysis. The most universal and suitable base material for the preparation of Ag substrate for riboflavin detection was the AlMg alloy. The addition of a complexing agent to the deposition bath changed the morphology of the prepared substrates and the highest spectral response of riboflavin was obtained by adding 0,55 mM EDTA. The intensity of riboflavin spectral response was comparable to the value obtained using substrates prepared in the Ag bath, but the substrates prepared in the AgNO_3 solution achieved a weaker enhancement of the spectral response.

Keywords: riboflavin, SERS spectroscopy, Ag substrate, galvanic displacement, base material, EDTA

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220331>

Acknowledgement

The authors acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2018124.

DETEKCE PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ POMOCÍ LATERAL FLOW TESTŮ S FOTON-UPKONVERZNÍMI NANOČÁSTICEMI

ELIŠKA MACHÁČOVÁ a ZDENĚK FARKA

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 625 00 Brno, Česká republika
machacova@mail.muni.cz

Klíčová slova: foton-upkonverzní nanočástice, UCNPs, imunostanovení, ELISA, ULISA, lidský sérový albumin, HSA, diagnostický proužek, LFIA

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220335>

Úvod

Citlivá detekce klinicky významných analytů je důležitá pro včasné odhalení onemocnění a zahájení léčby. Díky vysoké specifitě jsou v dnešní době pro zjištění přítomnosti a koncentrace biomarkerů v klinických vzorcích často využívána imunochemická stanovení založená na interakci protilátky s antigenem. Mezi nejrozšířenější patří enzymové stanovení ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), které využívá enzymem značené protilátky poskytující po reakci se substrátem barevný signál. Značky na bázi enzymů mají ovšem řadu nevýhod, jako jsou vysoké náklady na jejich přípravu, omezená stabilita nebo nedostatečná citlivost. Pro překonání těchto nedostatků se v dnešní době hledají alternativní značky; jako jedna z vhodných možností se jeví použití nanomateriálů, např. foton-upkonverzních nanočástic (UCNPs).

UCNPs jsou nanokrystaly složené z anorganické matrice (nejčastěji NaYF_4), která je dopovaná lanthanoidy. Díky této struktuře vykazují anti-Stokesovu luminiscenci (excitaci pomocí blízkého infračerveného záření a emisi ve viditelné oblasti), která zajišťuje detekci s minimálním autofluorescenčním pozadím. Pro biologické aplikace je nutné UCNPs modifikovat připojením specifické protilátky. Připravené biokonjugáty mohou být využity jako alternativa k enzymovým značkám ve stanovení ULISA (upconversion-linked immunosorbent assay). S využitím metody ULISA lze dosáhnout 10–100× citlivější detekce než v případě metody ELISA¹, nevýhodou obou těchto metod je ovšem časová náročnost. Proto je třeba využít výhodných vlastností ULISA stanovení a převést je do podoby rychlého diagnostického imunotestu.

V současné době většina rychlých diagnostických testů využívá principu laterálního toku (lateral flow immunoassay, LFIA). Takový test má typicky podobu diagnostického proužku a jako značku používá konjugáty zlatých nanočástic. Zlaté nanočástice ovšem často omezují výslednou citlivost, použitím konjugátu UCNPs může být citlivost detekce zvýšena. Mezi největší výhody LFIA testů

patří rychlost a jednoduchost provedení analýzy, jejich nízká cena a spotřeba malého množství vzorků. Vzhledem k tomu, že k provedení analýzy není potřeba sofistikovaného vybavení, lze analýzu provádět i mimo laboratoř a jedná se o tzv. „point-of-care“ diagnostickou metodu. Diagnostický proužek se skládá z několika membránových segmentů – oblast pro vzorek a konjugátová, migrační a absorpční část. Každý segment je založen na odlišném typu membrány, přičemž nejdůležitější je nitrocelulosaová membrána nacházející se v migrační oblasti, kde jsou imobilizovány protilátky specificky vázající analyt. Skleněná membrána v konjugátové oblasti pak slouží pro zachycení konjugátu nanočástic s protilátkou, který zajišťuje signál pro vyhodnocení analýzy.

Cílem naší práce je vyvinout LFIA test s využitím konjugátů UCNPs pro detekci lidského sérového albuminu (human serum albumin, HSA). Nízké koncentrace HSA v moči se vyskytují u tzv. mikroalbuminurie, která značí počínající diabetickou nefropatii u dlouhodobého nebo nekontrolovatelného diabetu². Jednoduchá a citlivá detekce HSA je tak důležitá pro včasné odhalení nemoci a zabránění nevratného poškození ledvin. Pro průběh analýzy je třeba optimalizovat jednotlivé kroky – volba reagensů a jejich vhodná koncentrace, různé druhy membrán, porovnání rozdílného blokování atd. Na základě získaných informací bude sestaven LFIA test, který bude dále optimalizován pro detekci HSA v reálných vzorcích.

Experimentální část

Materiál

NHS-dPEG₈-azid a SuperBlock TBS (SB) byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific (USA), alkyln-PEG-NHS od firmy Iris Biotech (Německo). Lidský sérový albumin (HSA) a polyklonální králičí anti-HSA protilátka od firmy Sigma-Aldrich (USA), monoklonální myší anti-HSA protilátka (AL-01) od firmy EXBIO (ČR), a polyklonální kozi anti-myší protilátka od firmy Jackson ImmunoResearch (Velká Británie).

Dále byl použit fosfátový pufr (PB; 50mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4), fosfátem pufrovaný solný roztok (PBS; 50mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4, 150 mM NaCl), Tris pufr (50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , pH 7,5), Trisem pufrovaný solný roztok (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% NaN_3 , pH 7,5), promývací pufr (WASH; 50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , 0,05% Tween 20, 1 mM KF, pH 7,4), pufr pro adsorpci reagensů (coating buffer, CB; 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, 0,05% NaN_3 , pH 9,6), pufr pro provedení jednotlivých kroků imunostanovení (assay buffer, AS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM KF, 0,5% PEG, 0,05% Tween 20, 0,05% NaN_3 , 10% SB, pH 7,5) a dialyzační

pufr (50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , 1 mM KF, pH 7,4).
Příprava konjugátů UCNPs s protilátkou

Syntéza nanočástic – Zárodečné nanočástice (NaYF_4 dopovaný 18% Yb^{3+} a 2% Tm^{3+} , 250 mg) byly rozpuštěny v 5,5 ml kyseliny olejové a 17 ml oktadek-1-enu a zahřívány na 300 °C v dusíkové atmosféře. Do horké disperze byly poté vstříkovány prekurzory trifluoroctanu, které iniciovaly růst nanočástic.

Příprava alkyn-PEG-Ner linkeru – 30 mg neridronátu v NaOH (1 M, 128 μl) bylo po přidání 368 μl PB smícháno s 500 μl alkyn-PEG-NHS v PB a směs byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla provedena dialýza proti destilované vodě pomocí dialyzačního zařízení Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 500–1000 Da; Carl Roth, Německo), lyofilizace roztoku a jeho uchování při 4 °C.

Příprava konjugátu alkyn-PEG-Ner-UCNP – 10 mg UCNPs bylo rozpuštěno v cyklohexanu a smícháno s 200 mM HCl v poměru 1:1 (v/v). Po sonikaci, odebrání horní fáze, přidání acetonu a následné centrifugaci byl pelet UCNPs rozpuštěn v destilované vodě (500 μl) a smíchán s rozpuštěným alkyn-PEG-Ner linkerem. Směs byla inkubována přes noc při 38 °C. Poté byl konjugát purifikován proti destilované vodě s 1 mM KF pomocí Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 100 kDa) a uchován při 4 °C.

Příprava click-reaktivních proteinů – S využitím NHS-dPEG₈-azid linkeru byla připravena azidem modifikovaná protilátka AL-01. Byla připravena reakční směs obsahující 1,96 μl NHS-dPEG₈-azidu (200 mM) v DMF, 200 μl protilátky rozpuštěné v PB (2,5 mg ml^{-1}) a 150 μl PB. Po 2 h inkubace byla reakce zastavena přidáním 50 μl Tris pufru a výsledný konjugát byl purifikován pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra (MWCO: 30 kDa, Carl Roth, Německo).

Click-konjugace s protilátkou – Do roztoku konjugátu alkyn-PEG-Ner-UCNPs (10 mg v 1,4 ml destilované vody) bylo přidáno 100 μl Tris pufru (375 mM, pH 7,5) a 20 μl vodného roztoku askorbátu sodného (20 mg ml^{-1}). Po probublání směsi pomocí argonu bylo přidáno 100 μl azidem modifikované protilátky AL-01 v PB (1 mg ml^{-1}). Click-reakce byla zahájena přidáním 10 μl vodného roztoku CuSO_4 (6,25 mM) a po probublání směsi argonem bylo přidáno dalších 10 μl CuSO_4 . Nakonec byla provedena dialýza (MWCO: 300 kDa) proti dialyzačnímu pufru.

Sestavení diagnostických proužků a provedení LFIA stanovení

Pro vytvoření diagnostických proužků byly použity membrány od firmy Cytiva (Německo), které byly nastříhány na optimalizované délky: celulosová membrána pro aplikaci vzorku (Fusion5) – 1 cm, celulosová absorpční membrána (CF5) – 3 cm, skleněná membrána (ST17, ST14 nebo Fusion5) – 0,5 cm a nitrocelulosová membrána (120 HP Plus Thick nebo jiná dle optimalizace) – 2,5 cm. Nitrocelulosová membrána a celulosová membrána pro absorpci byly připevněny pomocí oboustranné lepicí pásky

na plastový podklad, skleněná membrána a celulosová membrána pro aplikaci vzorku byly nalepeny dodatečně po blokovacím kroku. Při sestavování proužků se dbalo na dodržení překryvů jednotlivých membrán o 1 mm. Splepené membrány byly nastříhány na jednotlivé proužky o šířce 0,5 cm.

Na nitrocelulosovou membránu byl nanesen testovací spot 1 μl anti-HSA protilátky (0,5 mg ml^{-1}) a kontrolní spot 1 μl anti-myši protilátky (0,4 mg ml^{-1}) v CB pufru nebo v pufru dle optimalizace. Membrána byla následně inkubována přes noc za pokojové teploty. Pro vyvážení volných vazebních míst bylo provedeno blokování membrány pomocí 50% SB ve WASH, testy byly vysušeny 1 h při 37 °C. Mezitím bylo na skleněnou membránu nanášeno 10 μl UCNPs konjugátu (500 \times zředěného v Tris pufru s 5% sacharosu nebo v pufru dle optimalizace), následovala inkubace 1 h při 37 °C.

Hotové testy byly ponořeny do 100 μl AS obsahující HSA (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, koncentrace stejná pro všechny optimalizace) na 15 min. Následně byly testy dvakrát promyty pomocí WASH (100 μl , 15 min) a vysušeny při 37 °C. Pro vyhodnocení analýzy byla použita foton-upkonverzní čtečka Upcon S-Pro (Labrox, Finsko).

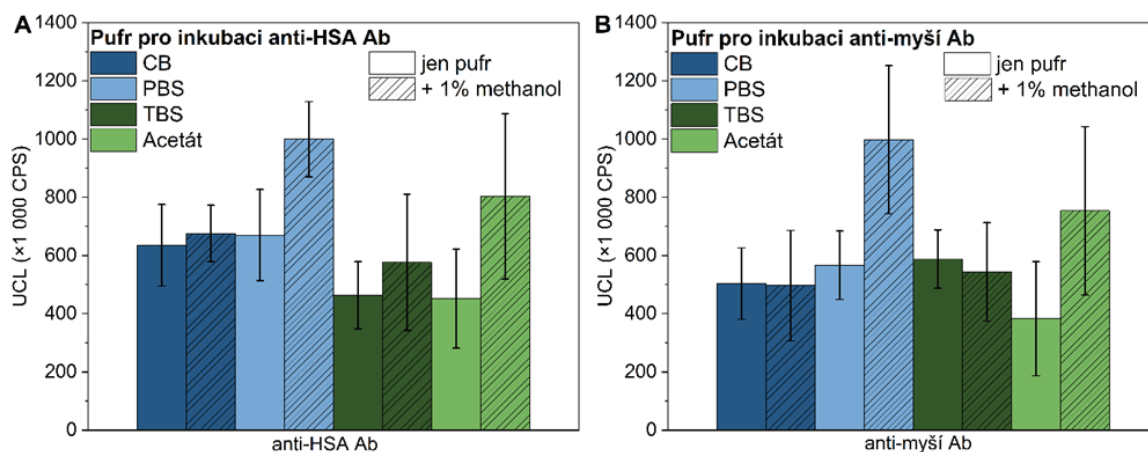
Výsledky a diskuse

Optimalizace podmínek pro imobilizaci protilátek

Vhodné podmínky imobilizace protilátek jsou pro provedení imunostanovení zásadní, proto mezi první optimalizace patřilo právě porovnání pufrů pro vazbu protilátek na nitrocelulosovou membránu. Všechny pufrы byly sledovány i s přidavkem methanolu (1 %), který by měl přispívat k lepšímu zachycení konjugátu na membráně³. CB a TBS vykazovaly pro protilátku v případě LFIA stanovení nízké signály. Jednoznačně nejvyšší signály byly dosaženy s PBS a acetátovým pufrém ovšem v obou případech pouze v kombinaci s 1% methanolem (obr. 1). Acetátový pufr s 1% methanolem byl proto zvolen jako nejvhodnější varianta pro další experimenty.

Optimalizace podmínek pro nanášení konjugátu UCNPs na skleněnou membránu

Aby byl signál pro vyhodnocení LFIA testů dostatečný, bylo nutné zajistit ideální podmínky pro uvolnění konjugátu UCNPs ze skleněné membrány. Proto byly pro inkubaci konjugátu porovnány různé druhy pufrů a skleněných membrán. Jako nevhodné se ukázalo použití membrány Fusion 5, u které nedocházelo k téměř žádnému uvolnění konjugátu do dalších částí proužku. Kvůli tomu zde byl pozorovatelný výrazný signál zakoncentrovaného konjugátu na počátku proužku a nízké signály spotů protilátek (obr. 2A). U membrány ST14 docházelo k nerovnoměrnému uvolnění konjugátu, což způsobovalo vysoké pozadí analýzy. Nejvhodnější variantou proto bylo použití membrány ST17, kde bylo pozorováno jak nízké pozadí, tak i dostatečné uvolnění konjugátu.

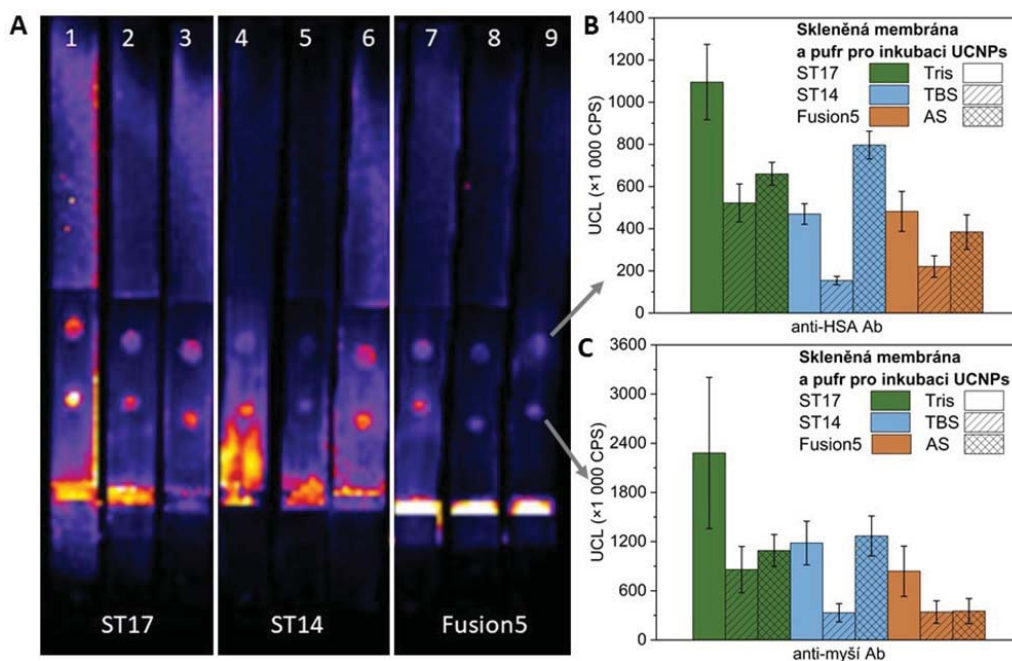


Obr. 1. **Optimalizace podmínek pro imobilizaci protilátek.** Signály testovaných pufrů bez nebo s přidavkem 1% methanolu pro imobilizaci (A) anti-HSA a (B) anti-myší protilátky

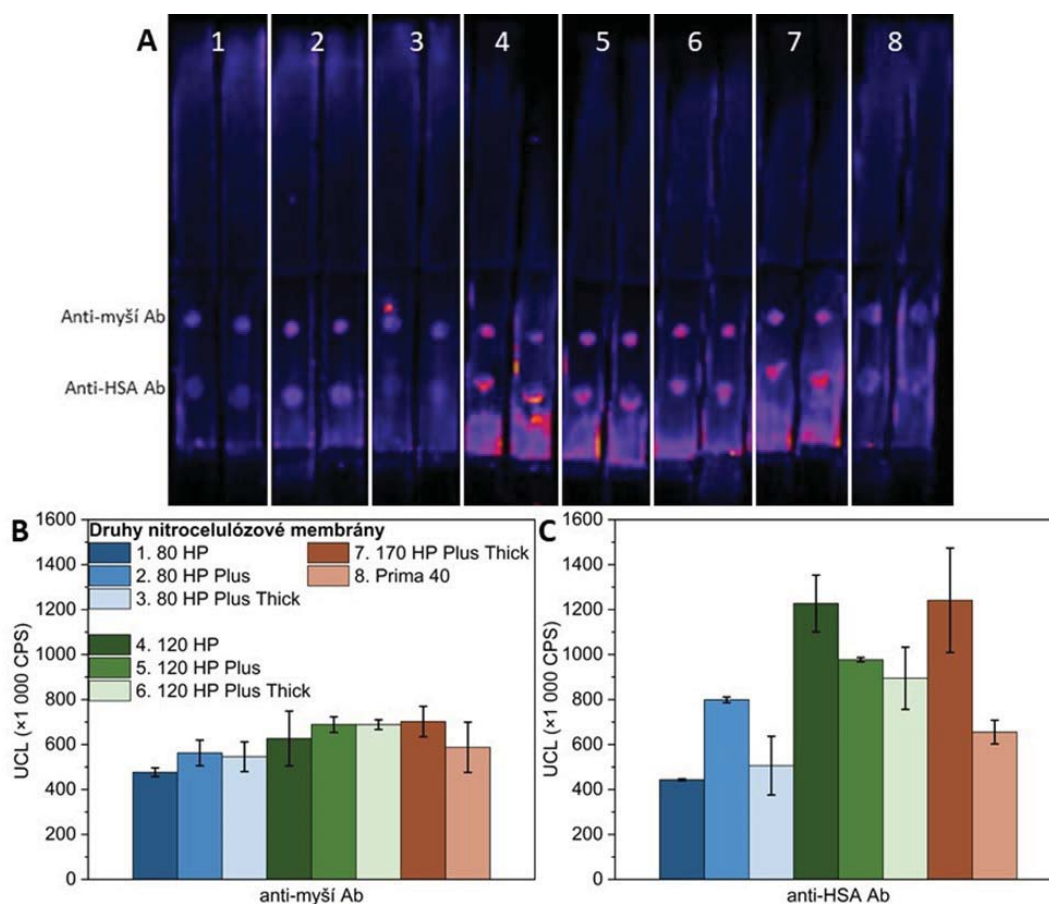
Dále byla provedena optimalizace pufrů pro nanesení konjugátu UCNPů na skleněnou membránu. Všechny testované pufrы obsahovaly přidavek sacharosu (5 %), která přispívá k lepšímu uvolnění konjugátu z membrány⁴. Na obr. 2B a 2C je možné pozorovat v případě membrány ST17 nejvyšší signál pro Tris pufr. Pro další experimenty byl tak pro ředění a inkubaci konjugátu UCNPů použit Tris pufr s přidavkem sacharosu.

Optimalizace nitrocelulosové membrány

S využitím dříve optimalizovaných podmínek byly porovnány různé druhy nitrocelulosových membrán. U analýzy se podařilo snížit pozadí (obr. 3A), slabě zvýšené pozadí je pozorovatelné pouze u membrán 120 HP a 120 HP Plus, které se ale – kvůli špatnému laterálnímu toku – stejně ukázaly jako nevhodné. Vzhledem k větším pórům u membrán typu 80 HP docházelo k lepšímu toku konjugátu UCNPů do absorpční oblasti na konci testu, což



Obr. 2. **Porovnání skleněných membrán a pufrů pro inkubaci UCNPů.** (A) Upkonverzní sken LFI proužků se skleněnou membránou ST17 pro pufr Tris (1), TBS (2), AS (3), ST14 pro pufr Tris (4), TBS (5) a AS (6) a Fusion5 pro pufr Tris (7), TBS (8), AS (9). Integrované signály spotů při použití odlišných pufrů pro inkubaci UCNPů pro (B) anti-HSA a (C) anti-myší protilátku



Obr. 3. **Optimalizace nitrocelulóзовé membrány pro LFIA stanovení.** (A) Upkonverzní sken LFIA proužků s různými druhy nitrocelulóзовých membrán (čísla membrán v panelu A odpovídají číslům v panelu B) a výsledné signály pro (B) anti-myší a (C) anti-HSA protilátka

mělo pozitivní vliv na pozadí analýzy. Zároveň ale také docházelo ke snížení signálu, jak je pozorovatelné na obr. 3B a 3C. Pro finální podobu LFIA proužku je tedy výhodné využití membrány 120 HP Plus Thick, případně 170 HP Plus Thick, které poskytují kompromis mezi dostatečnou intenzitou signálu a nízkým pozadím. Volba nitrocelulóзовé membrány ovšem neměla na LFIA stanovení tak velký vliv jako zbylé parametry.

Závěr

S využitím konjugátů UCNP se podařilo optimalizovat LFIA stanovení pro detekci HSA. Pro analýzu byla využita specifická anti-HSA protilátka a kontrolní anti-myší protilátka. Jako vhodný pufr pro imobilizaci protilátek byl zvolen acetátový pufr s přídatkem 1% methanolu. Pro výsledné vyhodnocení analýzy bylo potřeba zajistit vhodné podmínky pro inkubaci a uvolnění konjugátu UCNP ze skleněné membrány, zde se jako nejlepší kombinace ukázalo využití skleněné membrány ST17 a Tris

pufru s 5% sacharosu. Volba odlišné nitrocelulóзовé membrány pak měla na vývoj imunostanovení relativně malý vliv, nejvýhodnější se ukázalo použití membrány 120 HP Plus Thick. S optimalizovanými podmínkami LFIA došlo ke snížení pozadí analýzy a dostatečné odezvě signálu, což ukazuje na potenciál využití UCNP jako alternativní značky v LFIA stanoveních. Dále byla úspěšně demonstrována schopnost detegovat HSA, a proto bude dalším krokem analýza reálných vzorků obsahujících různé koncentrace HSA, aby byl ověřen praktický potenciál metody pro klinické účely.

LITERATURA

- Peltomaa R., Farka Z., Mickert M. J., Brandmeier J. C., Pastucha M., Hlaváček A., Martínez-Orts M., Canales Á., Skládal P., Benito-Peña E., Moreno-Bondi C. M., Gorris H. H.: *Biosens. Bioelectron.* **170**, 112683 (2020).
- Zangheri M., Di Nardo F., Mirasoli M., Anfossi L., Nascetti A., Caputo D., De Cesare G., Guardigli M.,

- Baggiani C., Roda A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8869 (2016).
- Geballa-Koukoulou A., Gerssen A., Nielen M. W. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 7547 (2020).
 - Koczula K. M., Gallotta A.: *Essays Biochem.* 60, 111 (2016).

E. Macháčová and Z. Farka (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic*): **Detection of Protein Biomarkers Using Lateral Flow Tests with Photon-upconversion Nanoparticles**

Rapid and sensitive detection of clinically important analytes is crucial for early disease diagnosis and initiation of treatment. Immunochemical assays are widely used to determine the presence and concentration of analytes in various complex media due to their high specificity provided by antibodies. Recently, lateral flow immunoassays (LFIAs) are becoming one of the most popular forms of immunochemical assays. LFIAs are test strips based on nitrocellulose membranes, and their most significant advantage is that there is no need for laboratory equipment to perform the assay enabling their use for point-of-care testing. Most LFIAs are based on gold nanoparticles; howev-

er, they often limit the resulting sensitivity of LFIAs. Our work focused on photon-upconversion nanoparticles (UCNPs) as a sensitive alternative label. UCNPs are lanthanide-based nanocrystals exhibiting anti-Stokes luminescence (excitation by the NIR laser and detection in the Vis region), which allows detection without optical background interference. We have developed an LFIA assay for human serum albumin (HSA) with UCNPs as a label. Using a specific anti-HSA antibody and a control anti-mouse antibody, various LFIA parameters were optimized. The immobilization of antibodies was done using acetate buffer with 1% methanol, glass membrane ST17 was used as a conjugate pad, and Tris buffer with 5% sucrose was used to stabilize the particles within the conjugate pad. The choice of a different nitrocellulose membrane had a relatively small effect on assay performance; the best results were achieved with membrane 120 HP Plus Thick. Our work has successfully demonstrated the potential of using UCNPs as sensitive labels in LFIA tests.

Keywords: photon-upconversion nanoparticle, UCNP, immunoassay, human serum albumin, HSA, diagnostic strip, LFIA

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220335>

VÝBER ROZPŮŠŤADLA PRE EXTRAKCIU PANTENOLU ZO VZORIEK TELOVÝCH MLIEK

BARBORA ŠIMKOVÁ, KATARÍNA HROBOŇOVÁ
a ANDREA ŠPAČKOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37, Bratislava
xsimkova@stuba.sk, katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: D-pantenol, extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina, extrakcia tuhou fázou, HPLC

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220340>

Úvod

D-pantenol-((2*R*)-2,4-dihydroxy-*N*-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimetylbutanamid; dexpantenol) je vďaka svojim priaznivým účinkom dôležitou biologicky aktívnou zložkou farmaceutických výrobkov (lieky, výživové doplnky, atď.) a kozmetických výrobkov (telové mlieka, šampóny, kondicionéry, atď.) na ošetrovanie pokožky, na zmiernenie svrbenia alebo na podporu hojenia rán¹. Obsah D-pantenolu v kozmetických výrobkoch určených na telo, ako napr. telové mlieka, krémy, býva maximálne do 5,3 % (cit.²).

Kozmetické výrobky, napr. krémy, telové mlieka, sú mnohוזložkové zmesi, ktoré okrem účinných látok obsahujú ďalšie zložky, napr. konzervačné látky (parabény), parafíny a minerálne oleje, glykoly, vonné látky vo forme prírodných alebo syntetických prídavných látok. Z hľadiska chemickej analýzy sú to zložité vzorky a pri chromatografickej analýze môžu negatívne ovplyvniť výsledok separácie a stanovenia cieľovej látky (môže napr. dochádzať ku koelúcii matricových zložiek a sledovaných analytov). Takéto vzorky je potrebné pred analýzou upraviť, napr. použitím extrakčných techník, ktorých cieľom je čo najúčinnejšie izolovať alebo aj skoncentrovať analyt. Najčastejšie sa používa extrakcia analytu z komplexnej matrice v systéme kvapalina-kvapalina alebo tuhá fáza-kvapalina. Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE, liquid-liquid extraction) je proces oddeľovania látok pozostávajúci z prenosu rozpustenej látky z jedného rozpúšťadla do druhého, pričom tieto dve rozpúšťadlá sú navzájom nemiešateľné alebo čiastočne miešateľné. Extrakcia tuhou fázou (SPE, solid phase extraction) je extrakčný postup založený na zachytávaní analytov vhodným adsorbentom. Interferujúce látky sa odstránia z adsorbentu premývaním rozpúšťadlom a následne sa adsorbované analyty desorbujú pomocou vhodného elučného rozpúšťadla³⁻⁵. V prípade kozmetických výrobkov je vhodné kombinovať obe extrakčné techniky.

Cieľom práce je prešetriť vplyv zloženia extrakčného rozpúšťadla na výťažnosť LLE D-pantenolu zo vzoriek vybraných kozmetických výrobkov a zvoliť vhodný typ SPE adsorbentu na prečistenie extraktu pred HPLC analýzou.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

D-pantenol (98 %, Alfa Aesar), acetonitril (pre HPLC, Centralchem), *n*-hexán (pre HPLC, VWR Chemicals), chloroform (Mikrochem), etanol (pre HPLC, Merck), metanol (pre HPLC, VWR Chemicals), deionizovaná voda, 15% roztok hexakynožeľznanu draselného (Carrez I), 30% roztok síranu zinočnatého (Carrez II).

Vzorky mliek na opaľovanie a po opaľovaní sa zaoštarali v obchodnej sieti drogérií a lekární (štyri vzorky od rôznych výrobcov). Pred analýzou boli uskladnené v pôvodnom obale na suchom a tmavom mieste pri laboratórnej teplote.

Postupy

Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina: Vzorka (0,2 g telového mlieka) sa zmiešala s extrakčným rozpúšťadlom (3 ml; zmes chloroform/voda a *n*-hexán/voda v pomeroch 1:3, 2:2, 3:1, v/v) a zmes sa miešala na laboratórnej miešačke (200 rpm) 10 min pri teplote 23 °C. Následne sa oddelila vodná vrstva. K vodnému podielu sa pridalo 0,2 ml roztoku Carrez I a 0,2 ml roztoku Carrez II, zmes sa premiešala a následne centrifugovala (10 min, 3000 rpm). Tekutina sa oddelila, prefiltrovala cez 0,45 µm nylónový filter a následne sa prečistila pomocou SPE a analyzovala pomocou HPLC.

Extrakcia tuhou fázou: SPE kolónka sa kondicionovala metanolom (2 ml) a vodou (2 ml), dávkoval sa roztok referenčnej látky D-pantenolu pre vyhodnotenie výťažnosti (0,5 ml, koncentrácia 1 mg ml⁻¹) alebo vodný podiel po LLE pre analýzu reálnych vzoriek. Kolónka sa vysušila vákuom (5 min) a analyt sa eluoval etanolom (1 ml). Extrakt sa dávkoval do HPLC kolóny. Testovali sa nasledujúce typy SPE kolóniek: C8 (100 mg, Chromabond), Sep-Pak C18 (200 mg, Waters), C18 Hydra (100 mg, Chromabond), HR-P (100 mg, Chromabond), HR-X (100 mg, Chromabond), Sep-Pak Aminopropyl-NH₂ (100 mg, Waters), Silica-CN (100 mg, Tessek).

HPLC analýza extraktov

Na analýzu extraktov sa použila metóda HPLC s DAD detekciou. Separácia sa uskutočnila na kolóne typu

C18 (Nucleosil 100-5 C18 (125 × 4 mm, 5 μm)) s mobilnou fázou acetonitril:voda (10:90, v/v). Prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml min⁻¹. Chromatogramy sa snímali pri vlnovej dĺžke 210 nm a UV spektrá sa snímali v rozsahu vlnových dĺžok 190–400 nm.

Výsledky a diskusia

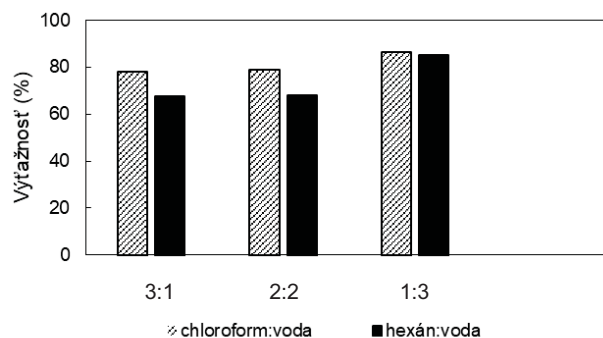
Neexistuje univerzálne riešenie na prípravu vzoriek, pretože extrahované látky majú odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti. Podmienky pre extrakciu cieľovej látky zo vzorky sa volia na základe zložitosti matrice a typu látky. Pre LLE D-pantenolu zo vzoriek telových mliek sa testovali ako extrakčné činidlá zmesi chloroform/voda a *n*-hexán/voda v rôznych pomeroch. Týmto spôsobom bolo možné oddeliť látky vo vode rozpustné zahrňujúce aj D-pantenol, od iných nerozpustných zložiek. Na vyčistenie extraktov sa použila zmes roztoku Carrez I a Carrez II. Z výsledkov hodnotenia vplyvu typu extrakčného rozpúšťadla na výťažnosť extrakcie vyplynulo, že ako vhodné rozpúšťadlo sa javí zmes chloroform/voda (1:3, v/v). Pre toto rozpúšťadlo sa dosiahla výťažnosť 86,6 % (testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹). Porovnanie výťažností LLE v závislosti od typu a pomeru zložiek v extrakčnom rozpúšťadle je zobrazené na obr. 1.

Na prečistenie D-pantenolu od ďalších zložiek vo vodnom extrakte je vhodná SPE. Testovali sa viaceré typy SPE kolónok s adsorbentami s rozdielnou polaritou (typ C8, C18, NH₂, CN a polymérny typ HR-P a HR-X), avšak pre všetky bol vhodný mechanizmus sorpcie v systéme

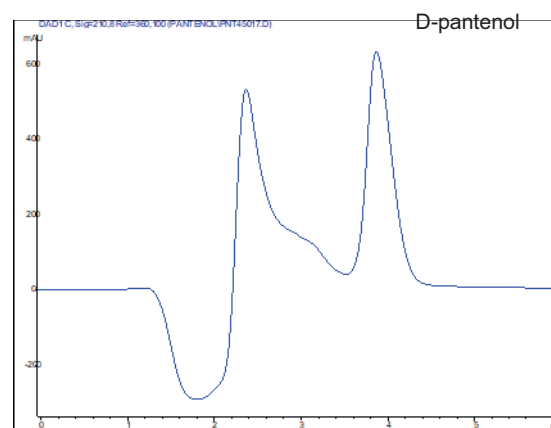
Tabuľka I
Chromatografické charakteristiky a niektoré validačné parametre metódy

Chromatografické charakteristiky ^a	
t_R (min)	3,81 ± 0,07
RSD % (1 deň)	2,03
RSD % (3 dni)	1,73
k	0,69 ± 0,07
A	12123,60 ± 679,03
RSD % (1 deň)	0,23
RSD % (3 dni)	5,60
n	2298 ± 147
H (μm)	54
Validačné parametre	
Linearita (mg ml ⁻¹)	0,25-5,00
R ²	0,9991
LOD (mg ml ⁻¹)	0,04
LOQ (mg ml ⁻¹)	0,14

a – určené pre koncentračnú hladinu 0,2 mg ml⁻¹



Obr. 1. Výťažnosti LLE D-pantenolu použitím testovaných extrakčných rozpúšťadiel (RSD % menej ako 6 %, $n=3$, testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹)



Obr. 2. Chromatografický záznam separácie D-pantenolu v extrakte vzorky mlieka na opaľovanie

s obrátenými fázami. Uspokojivá výťažnosť D-pantenolu (viac ako 85 %) sa dosiahla pri použití adsorbentu typu NH₂, ktorý sa zvolil ako najvhodnejší.

Pre extrakciu D-pantenolu z kozmetických vzoriek, ako sú telové mlieka, sa kombinovali obe techniky, LLE a následne SPE. Použitím najvhodnejších podmienok zistených v jednotlivých krokoch (chloroform/voda (1:3, v/v) pre LLE; adsorbent typu NH₂ pre SPE) sa dosiahla výťažnosť 79,7 % (RSD % menej ako 6 %, $n=3$, testované pre telové mlieko s prídavkom D-pantenolu na koncentračnej hladine 1,5 mg g⁻¹).

HPLC metóda v systéme s obrátenými fázami so spektrofotometrickou detekciou sa použila na analýzu extraktov. Celkový čas HPLC analýzy bol 6 min. Metóda bola hodnotená na základe parametrov vhodnosti HPLC podmienok (opakovateľnosť časov a plôch elučných vln, počet teoretických priehradiek, výškový ekvivalent teoretickej priehradky) a niektorých validačných parametrov (lineárny koncentračný rozsah, LOD, LOQ), ktoré sú uvedené v tab. I.

Zvolené podmienky extrakcie a HPLC separácie sa aplikovali pre analýzu vzoriek mliek na opaľovanie a po opaľovaní. Obr. 2 dokumentuje chromatografický záznam extraktu vzorky mlieka na opaľovanie. V testovaných vzorkách bol stanovený obsah D-pantenolu v rozsahu 0,2–1,5 %.

Záver

Práca sa zaoberala výberom vhodného rozpúšťadla na extrakciu D-pantenolu zo vzoriek opaľovacích mliek a výberom vhodného adsorbentu pre jeho prečistenie, prípadne aj skoncentrovanie. Zvolené podmienky extrakcie a HPLC stanovenia boli vhodné pre analýzu reálnych vzoriek s obsahom D-pantenolu. Navrhnuté extrakčné podmienky sa môžu využiť aj pre prípravu vzoriek mliek pre následnú chirálnu HPLC analýzu.

Práca bola finančne podporená grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (grant č. VEGA 1/0159/20).

LITERATÚRA

1. Bregnbak D., Johansen J. D., Zachariae C.: Contact Dermatitis. 75, 48, (2016).
2. *Safety Assessment of Panthenol, Pantothenic Acid, and Derivatives as Used in Cosmetics*. <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PANTS012017.pdf>, informácie získané 10. 3. 2022.
3. Abedi G., Talebpour Z., Jamechenarboo F.: TrAC Trends Anal. Chem. 102, 41 (2018).

4. Berk Z.: *Liquid-liquid extraction. Food process engineering and technology*. 3. vyd. Elsevier, Amsterdam 2018.
5. Labuda J., Špánik I., Tarapčík P., Hrouzková S., Vrábel V., Benická E., Hroboňová K., Sádecká J., Belnrohr E., Liptaj T.: *Analytická chémia*. STU, Bratislava 2019.

B. Šimková, K. Hroboňová, and A. Špačková (Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava): **The Choice of Solvent for the Extraction of D-panthenol from Samples of Body Milks**

The work dealt with the choice of a suitable solvent for extraction of D-panthenol from body milk samples and the choice of SPE adsorbent for its purification and pre-concentration. The suitable extraction and HPLC conditions were applied for analysis of body milks containing D-panthenol.

Keywords: D-panthenol, liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, HPLC

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220340>

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (grant no. VEGA 1/0159/20).

OBSAH

<i>A. Březina, A. Dořmanová, P. Kukučka, P. Lubal, M. Farková</i>	Aplikace transesterifikační derivatizační reakce pro GC-MS analýzy	319
<i>K. Čišovská, K. Hroboňová</i>	Využitie extrakcie podporenej ultrazvukom pre analýzu škorice a potravinových výrobkov	323
<i>J. Harvalík, K. Hrubešová, O. Vrtělka, V. Setnička</i>	Studium využitelnosti koloidních roztoků Au a Ag nanočástic pro povrchem zesílenou ramanovu spektroskopii krevní plazmy	327
<i>A. Koryťáková, O. Volochanskyi, M. Král, M. Švecová</i>	Vliv podkladového materiálu a přídavku komplexačního činnidla na galvanickou přípravu SERS-aktivních vrstev a spektra riboflavinu	331
<i>E. Macháčková, Z. Farka</i>	Detekce proteinových biomarkerů pomocí lateral flow testů s foton- upkonverzními nanočásticemi	335
<i>B. Šimková, K. Hroboňová, A. Špačková</i>	Výber rozpúšťadla pre extrakciu pantenolu zo vzoriek telových mliek	340

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Březina A. 319

Čišovská K. 323

Dořmanová A. 319

Farka Z. 335

Farková M. 319

Harvalík J. 327

Hroboňová K. 323, 340

Hrubešová K. 327

Koryťáková A. 331

Král M. 331

Kukučka P. 319

Lubal P. 319

Macháčová E. 335

Setnička V. 327

Šimková B. 340

Špačková A. 340

Švecová M. 331

Volochanskyi O. 331

Vrtělka O. 327

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 20 (2022), čís./no. 5 • 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 UOCHB 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, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Webové stránky: P. Drašar • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wolkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2022 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 20.10.2022.