

**Sborník vybraných příspěvků**

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

**„CENA KARLA ŠTULÍKA 2018“**

**7. a 8. února 2018**

**VŠCHT Praha**



**Editoři sborníku:**  
Jiří Barek  
Vlastimil Vyskočil

Soutěž O Cenu Karla Štulíka 2018 byla organizována pod záštitou a s finanční podporou následujících partnerů, kterým patří naše díky a obdiv:



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ  
Univerzita Karlova



OSTRAVSKÁ  
UNIVERZITA



Mendelova  
univerzita  
v Brně



## 21. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentkou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2018“ úspěšně proběhl pod záštitou Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské Vysoké školy chemicko-technologické v Praze ve dnech 7. a 8. 2. 2018.

Letošní ročník této soutěže, která od roku 2015 nese jméno profesora Štulíka, opět důstojně připomenul památku tohoto vynikajícího analytického chemika, učitele i člověka. Díky bezchybné práci organizačního výboru z Ústavu analytické chemie FCHI VŠCHT Praha ve složení prof. Ing. Oto Mestek, CSc., doc. Ing. RNDr. Pavel Řezanka, Ph.D. a doc. Ing. Kamil Záruba, Ph.D., kterým patří vřelé díky všech účastníků soutěže, vše proběhlo v příjemné a přátelské atmosféře důstojného prostředí Konferenčního centra VŠCHT Praha na koleji Sázava v Praze 4 – Kunraticích. Soutěže se v tomto roce zúčastnilo celkem 20 studentů ze 7 českých vysokých škol a jedné slovenské vysoké školy uvedených na stránkách tohoto ročníku soutěže (<https://uanlch.vscht.cz/studium/souteze/stulik2018>). Stejně jako v minulých letech mohu s radostí konstatovat tradičně vysokou odbornou úroveň přihlášených studentských prací i jejich vynikající prezentaci. A rád bych za to poděkoval nejen soutěžícím studentům, ale i jejich školitelům a mateřským pracovištím, bez jejichž podpory a pomoci by tak kvalitní soutěžní práce těžko mohly vzniknout. Porota, která jako každoročně reprezentovala prakticky všechny zúčastněné školy, pracovala ve složení prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (Univerzita Karlova, Praha), prof. Ing. René Kizek, DrSc., MBA (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno), doc. Ing. Zdeňka Kolská, Ph.D. (Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem), prof. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D. (Masarykova univerzita, Brno), prof. Ing. Oto Mestek, CSc. (VŠCHT Praha, předseda komise), doc. Ing. David Milde, Ph.D. (Univerzita Palackého v Olomouci), Ing. Radmila Řápková (Chemické listy), doc. Ing. Lubomír Švorc, Ph.D. (Slovenská technická univerzita v Bratislavě), prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc. (VŠCHT Praha). Její práce byla letos opravdu těžká. Pro velkou vyrovnanost a rozmanitost soutěžních prací udělila komise dvě první místa, jedno druhé a jedno třetí místo a šest zvláštních cen poroty.

**1. místo získali** studentka 2. ročníku navazujícího magisterského studia **Bc. Dita Spálovská (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha)** za práci Studium struktury nové syntetické drogy butylonu v roztoku metodami molekulové spektroskopie a student 2. ročníku pětiletého studia **Michael Gargulák (VFU Brno)** za práci Aplikace SPION nanočástic a uhlíkových nanotrubic pro doručení doxorubicinu do nádorových buněk za využití analýzy peroxidase aktivity a FRET.

**2. místo získal** student 1. ročníku navazujícího magisterského studia **Bc. Oleksandr Volochanskyi (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha)** za práci Využití spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu pro detekci a identifikaci lékařsky významných alkaloidů.

**3. místo získala** studentka 2. ročníku navazujícího magisterského studia **Bc. Kateřina Kovaříková (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha)** za práci Elektrochemická syntéza stříbrných nanočástic.

Zvláštní cenu poroty získali (abecedně)

**Bc. Kinga Dobóová (STU Bratislava)** za práci Fluorescenční spektrometrie a chemometrie v klasifikaci slivovic,

**Bc. Kristína Kianičková (STU Bratislava)** za práci Stanovenie kyseliny močovej pomocou moderných elektrochemických senzorov,

**Bc. Barbora Rumlová (UK Praha)** za práci Vývoj a aplikace iontových zdrojů s mikrofluidním čipem pro hmotnostní spektrometrii,

**Bc. Diana Sokolovská (UP Olomouc)** za práci Nové extrakční postupy při analýze archeologických vzorků,

**Bc. Renáta Zátopková (UP Olomouc)** za práci Separace optických izomerů vybraných flavanonů pomocí nano-LC s využitím přídavku derivatizovaných cyklodextrinů do mobilní fáze a

**Lukáš Zima (MU Brno)** za práci IC studium retenčního chování aniontů

S radostí blahopřeji všem oceněným k mimořádným podaným výkonům. A srdečně děkuji i všem ostatním soutěžícím za kvalitní prezentace a vysoké osobní nasazení, které si zaslouží úctu všech českých analytických chemiků. Je mi milou povinností poděkovat zde i Ing. Radmile Řápkové, výkonné redaktorce časopisu Chemické listy, a doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za pečlivou přípravu zvláštního elektronického čísla časopisu Czech Chemical Society Symposium Series (<http://www.ccsss.cz/>) věnovaného této soutěži.



Vítězové soutěže „O cenu Karla Štulíka 2018“. Zleva: prof. Ing. Oto Mestek, CSc., předseda poroty, **Bc. Volochanskyi Olexandr (VŠCHT Praha, Ústav analytické chemie, 2. místo)**, **Bc. Kovaříková Kateřina (VŠCHT Praha, Ústav inženýrství pevných látek, 3. místo)**, **Bc. Spálovská Dita (VŠCHT Praha, Ústav analytické chemie, 1. místo)**, **Gargulák Michael (VFU Brno, 1. místo)**, prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., předseda odborné skupiny analytické chemie ČSCH

Velmi děkuji i vedoucím pracovníkům VŠCHT Praha za vynikající a účinnou podporu této soutěže, jmenovitě prof. Ing. Karlu Melzochovi, CSc. rektorovi VŠCHT Praha, prof. Ing. Zdeňku Bělohlavovi, CSc., prorektorovi VŠCHT Praha pro pedagogiku, prof. Dr. RNDr. Pavlu Matějkovi, prorektorovi VŠCHT Praha pro vnější vztahy a komunikaci, prof. RNDr. Marii Urbanové, CSc., děkance FCHI VŠCHT Praha a prof. RNDr. Štěpánu Urbanovi, CSc., vedoucímu Ústavu analytické chemie FCHI VŠCHT Praha, kteří i svou osobní účastí přispěli k lesku této soutěže.

Můj velký dík patří pochopitelně i všem sponzorům této soutěže, bez jejichž finančního přispění by se vůbec nemohla konat. Jejich zveřejněná loga necht' vyjadřují poděkování moje, soutěžících studentů i celé analytické komunity za jejich chvályhodnou podporu nastupující generace analytických chemiků jako představitelů disciplíny, bez níž si nelze představit další úspěšný rozvoj naší společnosti a našeho státu.

A na závěr s potěšením oznamuji naší odborné veřejnosti, že nelehkého úkolu zorganizovat další kolo soutěže „O cenu Karla Štulíka“ ve dnech 6. a 7. února 2019 se ujal tým kolegů z Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně pod vedením prof. RNDr. Viktora Kanického, DrSc.

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

## VYUŽITÍ SPION NANOČÁSTIC A UHLÍKOVÝCH NANOTRUBEK PRO DORUČENÍ DOXORUBICINU DO NÁDOROVÝCH BUNĚK

MICHAEL GARGULÁK<sup>a,b</sup>, DAGMAR UHLÍŘOVÁ<sup>a</sup>  
a RENÉ KIZEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Centrální laboratoře Farmaceutické fakulty, <sup>b</sup> Ústav humaní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého tř. 1, 612 42 Brno  
michaelgargulak@seznam.cz

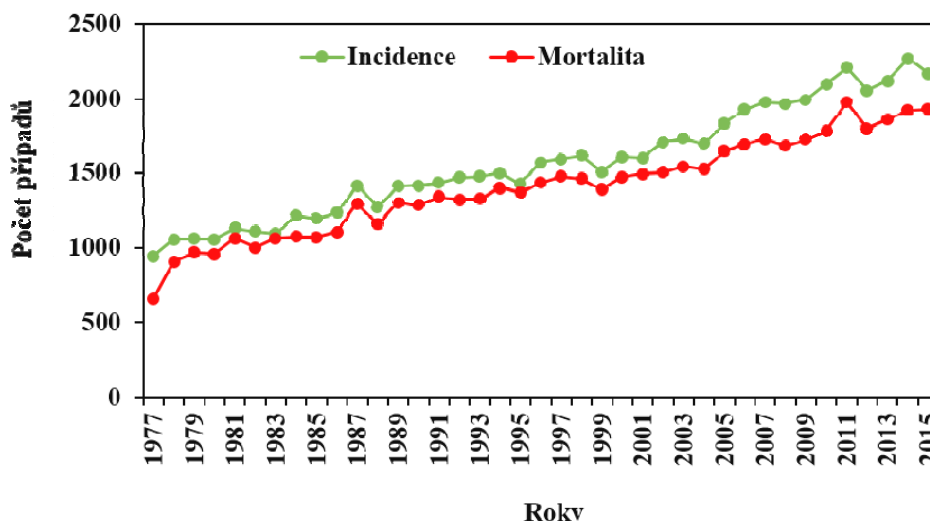
Klíčová slova: uhlíkové nanotrubičky, magnetické nanočástice, peroxidasová aktivita, doxorubicin

### Úvod

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí lidí v rozvinutých státech<sup>1</sup>. Je známo, že standardní protinádorová léčba vykazuje celou řadu závažných biologických efektů. Mezi nejzávažnější efekty je možné zařadit nedostatek selektivity k nádorové tkáni, což vede k nezanedbatelným vedlejším účinkům. Relativně nízká terapeutická koncentrace účinné látky vede často ke vzniku rezistence a multirezistence na léčbu zhoubného nádoru<sup>2-4</sup>. Z dostupných statistických údajů je známo, že karcinom pankreatu patří mezi nejobtížnější léčitelné typy zhoubných nádorů. Kvůli svému anatomickému uložení totiž bývá diagnostikován až ve značně pokročilém stadiu, navíc se jedná o velmi agresivní typ<sup>5</sup>. Mortalita rapidně

roste spolu s incidencí, kdy se obě hodnoty pohybují kolem 2000 případů ročně (obr. 1).

Nanomedicína pravděpodobně řadu z výše popsaných nedostatků bude schopna vyřešit včetně personalizovaného přístupu<sup>6</sup>. Nanotransportér pro léčbu zhoubných nádorů využívá: a) nespecifického pasivního zaměření efektem zvýšené permeability a retence (EPR)<sup>7</sup>, b) specifického cíleného zaměření na nádorové buňky (připojení dalších molekul: protilátky, albumin, kyselina listová a celé řady dalších)<sup>8</sup>. Dále lze transportér využít i k přenášení nukleových kyselin a imunoterapeutik<sup>7,8</sup>. Různé *in vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že mnoho funkcionalizovaných uhlíkových nanotrubeček (CNTs) je biologicky kompatibilních s biologickým prostředím s velmi nízkou toxicitou<sup>9,10</sup>. Největší pozornost je věnována modifikaci uhlíkových materiálů pro transport chemoterapeutik (doxorubicin<sup>11</sup>, methotrexát<sup>12</sup>, taxany<sup>13</sup>, platinové analogy<sup>14</sup>, kamptothecin<sup>15</sup> a gemcitabin<sup>16</sup>). Díky jejich velkému povrchu na sebe mohou navázat protinádorové léčivo v relativně vysoké lokální koncentraci. CNTs mohou vstoupit do buněk nezávisle na typu buňky a funkční skupině na povrchu trubice<sup>8</sup>. Superparamagnetické nanočástice oxidu železa (SPION) jako magnetit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nebo jeho oxidovaná forma maghemit (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) jsou pro své magnetické vlastnosti hojně užívány k purifikaci a navíc jejich povrch lze velmi dobře modifikovat zlatými nanočásticemi. Magnetické zlaté nanočástice (SPION/Au/NPs) jsou v nanotechnologii často využívány díky svým paramagnetickým vlastnostem umožňujícím snadnou purifikaci a také možnost detekce pomocí pseudoperoxidasové aktivity<sup>17,18</sup>.



Obr. 1. Incidence a mortalita karcinomu pankreatu v České republice v letech 1977–2015, meziroční nárůst 3 %, upraveno podle www.svod.cz

Cílem této práce je vyvinout uhlíkový nanotransportér modifikovaný doxorubicinem, protilátkou a zlatou nanočásticí, který by byl specifický pro léčbu karcinomu pankreatu<sup>8</sup>.

## Experimentální část

Veškeré chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v čistotě >99 %. CNTs s karboxylovou skupinou byly připraveny následujícím postupem: ke 2 mg uhlíkových nanotrubic (CNTs) byla přidána směs 65% kyseliny dusičné a 96% kyseliny sírové a roztok zahříván v topném hnízdě na 70 °C po dobu 7 hodin pod zpětným chladičem. Následně byly uhlíkové trubice získány centrifugací (16 000 g, 30 min, 20 °C, Eppendorf 5418R) a 3krát promyty 18 MΩ vodou pomocí automatické pipety<sup>19</sup>. SPION/Au/NPs byly připraveny termální syntézou, která probíhala na magnetické míchačce (Starlab, Velká Británie) s ohřevem za kontrolované teploty (60 °C) a míchání po dobu 120 min, promyty 3krát vodou na magnetu. Nanočástice byly modifikovány 0,09 M citrátem<sup>20</sup>, za vzniku Au/NPs.

Měření peroxidasové aktivity zlatých nanočástic 1 mg (Au/NPs) a 1 mg SPION/Au/NPs probíhalo tak, že nanočástice byly pipetovány do mikrotitrační destičky (Brand, Německo) se substrátovým roztokem s 5 mM TMB (cit.<sup>17,21</sup>). Fluorescence doxorubicinu byla měřena v UV mikrotitrační destičce (IAB, ČR). Pro všechna měření byl použit multifunkční reader Infinite M200 PRO (TECAN, Švýcarsko).

Vazba protilátky na CNTs a SPION/Au/NPs byla ověřena imunometodou DOT BLOT, kdy v místě vazby protilátek docházelo k agregaci zlatých částic. Na nitrocelulosovou membránu byl pipetován 1 µl protilátky

(1 mg ml<sup>-1</sup>) za sníženého tlaku (zDHM-96 Slot and Dot Blot Hybridisation Manifolds, Velká Británie). Následně byla membrána blokována 40 min roztokem 1% BSA v PBS a membrána vložena na 1 h do roztoku nanočástic námi připraveného nanotransportéru. Poté byla membrána vložena do roztoku protilátky značené zlatou nanočásticí (1 mg ml<sup>-1</sup>) a míchána 1 h na rotátorové míchačce.

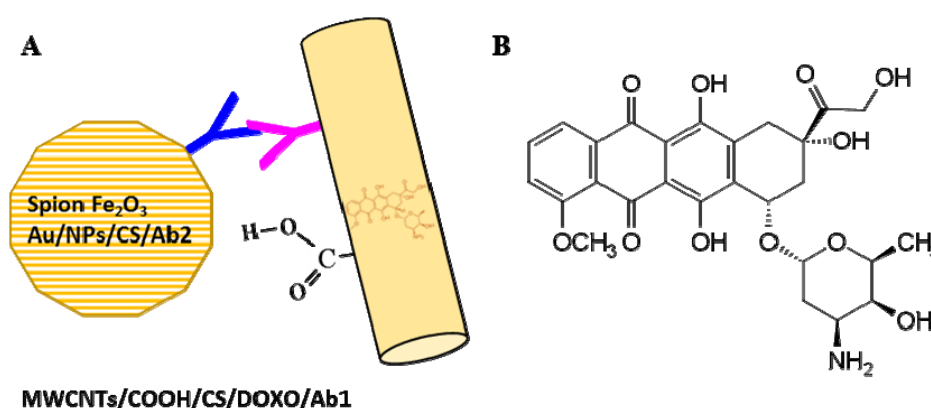
Analýza každého vzorku byla provedena 4krát. Získaná data jsou prezentována jako průměrná hodnota. Data byla zpracována, uložena a vyhodnocována matematicky a statisticky v laboratorním informačním systému Qinslab (Užitný vzor 26797).

## Výsledky a diskuse

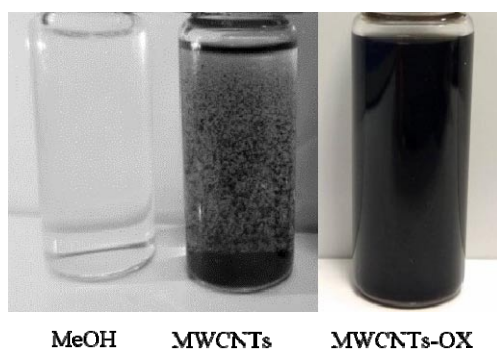
Navržený nanotransportér se skládá ze dvou částí, kdy první obsahuje oxidovanou uhlíkovou nanotrubici (1 mg ml<sup>-1</sup>) v chitosanové síti (1 mg ml<sup>-1</sup>) s enkapsulovaným doxorubicinem a navázanou protilátkou (Ab1). Druhou část tvoří magnetická zlatá nanočástice (40 mg ml<sup>-1</sup>) v chitosanové síti (1 mg ml<sup>-1</sup>) s navázanou protilátkou (Ab2). Chitosan je polysacharid, který obalil nanotrubici a magnetickou zlatou částici a sloužil pro ukotvení protilátek. Obě části jsou spojeny vazbou obecných protilátek (o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>) (obr. 2).

### Chemická modifikace povrchu nanotrubic

V experimentu byl navržen a následně studován biofyzikálními metodami CNTs nanotransportér antracyklinových antibiotik (obr. 2). Redukované víceštěnné nanotrubice (MWNTs) byly nejdříve upraveny oxidací směsí kyselinou dusičnou a sírovou za zvýšené teploty (detaily v experimentální části). Oxidací MWCNTs byly vytvořeny



Obr. 2. Praviděpodobné schéma pro uhlíkový nanotransportér doxorubicinu pro zacílení na nádorovou buňku. První část konstruktu obsahuje oxidovanou uhlíkovou nanotrubici (1 mg ml<sup>-1</sup>) v chitosanové síti (1 mg ml<sup>-1</sup>) a s enkapsulovaným doxorubicinem a navázanou protilátkou (Ab1). Druhou část tvoří magnetická zlatá nanočástice (40 mg ml<sup>-1</sup>) v chitosanové síti (1 mg ml<sup>-1</sup>) s navázanou protilátkou (Ab2). Obě části jsou spojeny vazbou obecných protilátek (Ab1 – Ab2 o koncentracích 1 mg ml<sup>-1</sup>). (A). Strukturální vzorec chemoterapeutika doxorubicinu. (B)

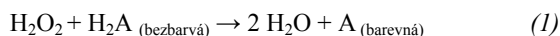


Obr. 3. Foto MWCNTs ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) před a po oxidaci (ve směsi 3:1  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ ), jako rozpouštědlo použit methanol (4 ml). Fotografie po 5 min po intenzivního protřepání. Další podrobnosti v Experimentální části

MWCNTs/COOH, což bylo možné zaznamenat lepší disperzí v použitém rozpouštědle, jak je zřejmé z obr. 3.

Modifikace povrchu nanočástic chitosanem a vytvoření komplexu se SPION nanočástic

Byl připraven nanokonstrukt s chitosanem (CS) a protilátkami (Ab1, Ab2) SPION/Au/NPs/CS/Ab2 a MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1. Následujícím krokem bylo ověření jednotlivých částí nanokomplexu. Nejdříve byla sledována peroxidasová aktivita křenové peroxidasy (HRP). V mnoha biologických procesech dochází k přeměně peroxidu vodíku na vodu. S tímto jsou spojeny oxidačně-redukční procesy popsané v rovnici (1), kdy  $\text{H}_2\text{A}$  je bezbarvá, ale reakcí s peroxidem vodíku z ní vzniká látka A, která je barevná a je možné měřit její absorpční<sup>22</sup>.



Tyto procesy bylo možné využít v bioanalytických metodách s enzymy (peroxidasami)<sup>22</sup>. Zlaté nanočástice vykazují pseudoperoxidasovou aktivitu<sup>23</sup>, kterou jsme porovnávali s peroxidasovou aktivitou (PA) běžného enzymu HRP. Výpočet aktivity byl proveden podle rovnice (2), kdy PA HRP je 1U a PA SPION je 1 mg.

$$\text{Aktivita SPION} = \text{PA HRP} / \text{PA SPION} \times 100 (\%) \quad (2)$$

Tento fakt je možné využít pro hodnocení přítomnosti těchto nanočástic na nanotransportéru i pro další kvantifikaci. V další části práce byly připraveny magnetické SPION nanočástice, které byly následně pokryty zlatými nanočásticemi. Jako důkaz přítomnosti zlatých nanočástic na povrchu SPION nanočástic bylo využito pseudoperoxidasové aktivity. Zjistili jsme, že aktivita SPION nanočástic byla 45 % HRP. Tyto procesy se sledovaly jako oxidace TMB při 655 nm (cit.<sup>21</sup>).

Modifikace povrchu nanočástic pro zachycení DOXO a protilátek

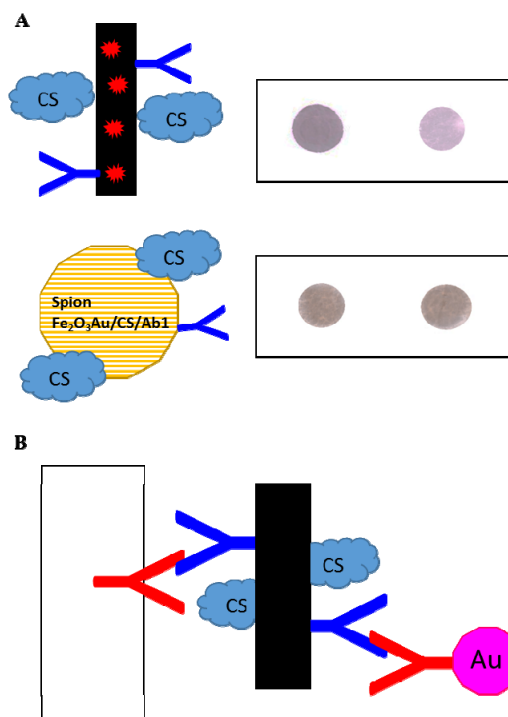
MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1. Specifickou vazbou mezi protilátkou Ab1 a Ab2 proteinem byl vytvořen nanotransportér pro zacílení na nádorovou buňku mechanismem EPR (SPION/Au/NPs/CS/Ab2/MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1). Zjistili jsme, že velikost MWCNTs/COOH/CS/DOXO se pohybovala v rozsahu 180–230 nm. Zeta potenciál ( $\xi$ ) vytvořeného komplexu se pohyboval mezi  $-10$  až  $-25$  mV. Množství doxorubicinu bylo analyzováno fluorimetricky ( $\lambda = E_x 480 \text{ nm}$ ,  $\lambda = E_m 600 \text{ nm}$ ).

Efektivita vazby DOXO byla stanovena podle rovnice (3):

$$\text{EE} = \text{DOXO aplikovaný} / \text{DOXO vázaný} \times 100 \quad (3)$$

Ve vytvořeném komplexu MWCNTs byl analyzován obsah elektrostaticky navázaného doxorubicinu uvnitř nanometrické struktury s efektivitou enkapsulace přibližně 25 %.

V následujícím experimentu byl MWCNTs/CS/DOXO modifikován protilátkou Ab1 (cit.<sup>24</sup>). Proto jsme se



Obr. 4. Imunodetekce uhlíkových nanokonstruktů na nitrocelulosové membráně. Zjednodušené schéma experimentu: na membránu jsou vázány protilátky Ab1, její zablokování proteinem a vazbou sekundární protilátky Ab2 a jejich značení zlatem, podrobnosti v Experimentální části. (B) Typické DOT BLOT analýzy jednotlivých testovaných nanokonstruktů MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1 a SPION Au/NPs/CS/Ab2 o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , době interakce 1 h, barvení zlatem 1 h, K – kontrola, VZ – testovaný nanokonstrukt. (A)

v další části experimentu rozhodli sledovat schopnost modifikovaných CNTs (MWCNTs/CS/DOXO) vázat se k proteinu Ab2 (magnetické zlaté nanočástice byly modifikovány chitosanem (CS) a Ab2,  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , SPION/Au/NPs). Vytvořený komplex (MWCNTs/CS/DOXO/SPION/Au/NPs/CS/Ab1-Ab2) byl následně potvrzen několika nezávislými metodami. Byla provedena optimalizace metody DOT BLOT pro detekci navázané protilátky (obr. 4). Nejlepší odezvy byly zjištěny, když byl na nitrocelulosoovou membránu pipetován  $1 \mu\text{l}$  protilátky ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) za sníženého tlaku. A poté vložena do roztoku protilátky značené zlatými nanočásticemi ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a míchána 1 h na rotačkové míchačce. Výsledkem je vytvoření tečky tvořené agregovanými zlatými nanočásticemi. Získaná data dokazují přítomnost modifikovaného uhlíkového nanotransportéru (jak je vidět na obr. 4A).

### Budoucí perspektiva a závěr

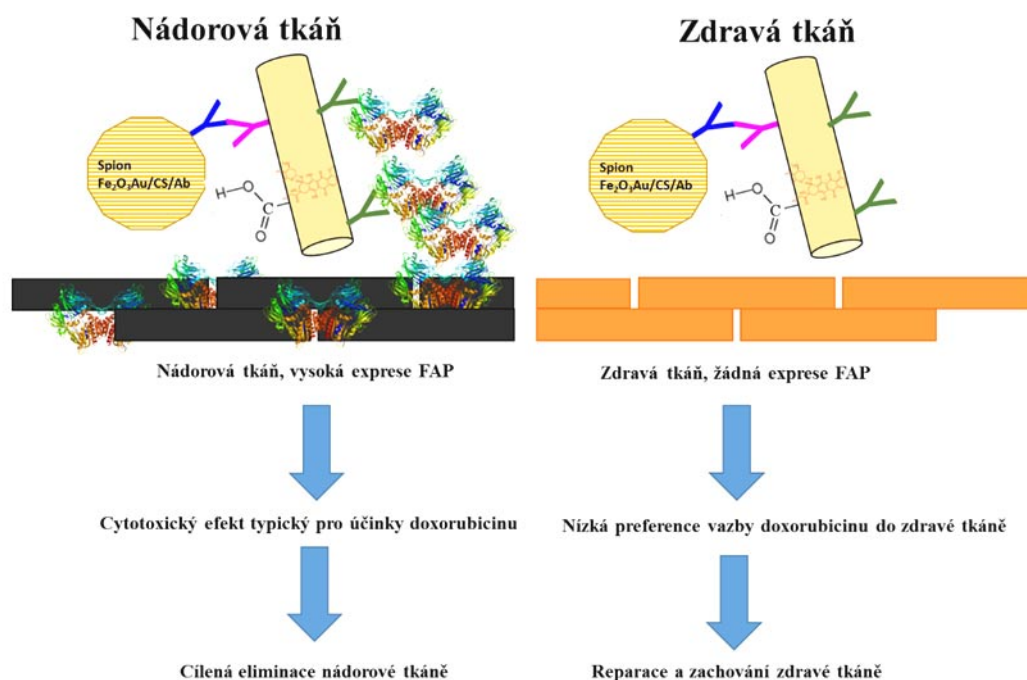
V této studii jsme prokázali modifikaci uhlíkové nanotrubic s antracyklinovým antibiotikem doxorubicinem k potenciálnímu využití v oblasti cílené léčby karcinomu pankreatu. Předpokládáme, že navržený uhlíkový nanotransportér DOXO bude vysoce selektivní k agresivním formám zhoubných nádorů pankreatu<sup>24,25</sup>. Je charakteris-

tický větší afinitou k nádoru pankreatu a lepší biodostupností (obr. 5).

*Tato práce byla finančně podpořena grantem Liga proti rakovině Praha 260/LPR/2018. Poděkování za technickou pomoc na experimentech patří: Ruttkay-Nedeckému B., Dočekalové M., Staňkové, M., Löffelmannovi M., Kepínské M.*

### LITERATURA

1. McGuire S.: Adv. Nutr.: An Inter. Rev. J. 7, 418 (2016).
2. Savard J., Ivers H., Savard M. H., Morin C. M.: Cancer 121, 1703 (2015).
3. Raschi E., Diemberger I., Cosmi B., De Ponti F.: Intern. Emerg. Med. 13, 1 (2018).
4. Tan D. S. W., Gerlinger M., Teh B. T., Swanton C.: Eur. J. Cancer 46, 2166 (2010).
5. Court C. M., Ankeny J. S., Sho S., Winograd P., Hou S., Song M., Wainberg Z. A., Girgis M. D., Graeber T. G., Agopian V. G., Tseng H. R., Tomlinson J. S.: Annal. Surg. Oncol. 25, 1000 (2018).
6. Jiang W., von Roemeling C. A., Chen Y. X., Qie Y. Q., Liu X. J., Chen J. Z., Kim B. Y. S.: Nat. Biomed. Eng. 1, (2017).



Obr. 5. Zjednodušené schéma cíleného uhlíkového nanotransportéru se zaměřením na nádorovou tkáň pankreatu. Je známo, že nádorové buňky pankreatu exprimují ve zvýšené míře molekuly fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) ve srovnání se zdravou tkání<sup>24,25</sup>. Modifikací nanotransportéru protilátkou proti FAP (anti-FAP) lze tedy nanokonstrukt cíleně zaměřit ke karcinomu pankreatu. V místě nádoru bude docházet k akumulaci nanočástic, zatímco u zdravé tkáně bude jejich výskyt zanedbatelný. Nanotransportér bude mít tedy větší afinitu k nádorové tkáni



7. Danhier F.: *J. Control. Release* 244, 108 (2016).
8. Fabbro C., Ali-Boucetta H., Da Ros T., Kostarelos K., Bianco A., Prato M.: *Targeting Carbon Nanotubes Against Cancer*, 2012.
9. Lara-Martinez L. A., Masso F., Gonzalez E. P., Garcia-Pelaez I., Contreras-Ramos A., Valverde M., Rojas E., Cervantes-Sodi F., Hernandez-Gutierrez S.: *Int. J. Nanomed.* 12, 7695 (2017).
10. Lacerda L., Ali-Boucetta H., Herrero M. A., Pastorin G., Bianco A., Prato M., Kostarelos K.: *Nanomedicine* 3, 149 (2008).
11. Ali-Boucetta H., Al-Jamal K. T., McCarthy D., Prato M., Bianco A., Kostarelos K.: *Chem. Commun.* 459 (2008).
12. Tripathi A. C., Saraf S. A., Saraf S. K.: *Materials* 8, 3068 (2015).
13. Chen J. Y., Chen S. Y., Zhao X. R., Kuznetsova L. V., Wong S. S., Ojima I.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16778 (2008).
14. Hampel S., Kunze D., Haase D., Kramer K., Rauschenbach M., Ritschel M., Leonhardt A., Thomas J., Oswald S., Hoffmann V., Buechner B.: *Nanomedicine* 3, 175 (2008).
15. Wu W., Li R. T., Bian X. C., Zhu Z. S., Ding D., Li X. L., Jia Z. J., Jiang X. Q., Hu Y. Q.: *ACS Nano* 3, 2740 (2009).
16. Yang D., Yang F., Hu J. H., Long J., Wang C. C., Fu D. L., Ni Q. X.: *Chem. Commun.* 4447 (2009).
17. Docekalova M., Uhlířová D., Stankova M., Kepinska M., Sochor J., Milnerowicz H., Babula P., Fernandez C., Brazdova M., Zidkova J., Suchy P., Kizek R., Czech Soc New M., Technol, Region Ctr Adv T., Mat, *Characterisation of peroxidase-like activity of thermally synthesized gold nanoparticles*, Tanger Ltd, Slezska, 2017.
18. Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 24 (2011).
19. Wepasnick K. A., Smith B. A., Schrote K. E., Wilson H. K., Diegelmann S. R., Fairbrother D. H.: *Carbon* 49, 24 (2011).
20. Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A.: *J. Phys. Chem. B* 110, 15700 (2006).
21. Fu S. Y., Wang S., Zhang X. D., Qi A. H., Liu Z. R., Yu X., Chen C. F., Li L. L.: *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 154, 239 (2017).
22. Veitch N. C.: *Phytochemistry* 65, 249 (2004).
23. Deng H. H., Hong G. L., Lin F. L., Liu A. L., Xia X. H., Chen W.: *Anal. Chim. Acta* 915, 74 (2016).
24. Feig C., Jones J. O., Kraman M., Wells R. J. B., Deonaraine A., Chan D. S., Connell C. M., Roberts E. W., Zhao Q., Caballero O. L., Teichmann S. A., Janowitz T., Jodrell D. I., Tuveson D. A., Fearon D. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 20212 (2013).
25. Dvorakova P., Busek P., Knedlik T., Schimer J., Etrych T., Kostka L., Sromova L. S., Subr V., Sacha P., Sedo A., Konvalinka J.: *J. Med. Chem.* 60, 8385 (2017).

**M. Gargulák<sup>b</sup>, D. Uhlířová<sup>b</sup>, and R. Kizek<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Department of Human Pharmacology and Toxicology, <sup>b</sup>Central Laboratory, Faculty of Pharmacy University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno):

**Application of Spion Nanoparticles and Carbon Nanotubes for Delivery Doxorubicin into Tumor Cells**

Tumor diseases are the second most common cause of death in developed countries. Standard anti-tumor therapy is known to show a number of serious biological effects. Nanomedicine and nanotechnology are likely to be able to solve a number of these deficiencies, including a personalized approach. A nanotransporter of anthracycline antibiotics was designed and subsequently studied by biophysical methods of the CNTs. For this purpose, the nanoconstruction of SPION/Au/NPs/CS/Ab2 and MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1 was prepared. A specific binding between Ab1 and Ab2 is a transporter targeting the tumor cell by the EPR mechanism (SPION/Au/NPs/CS/Ab2/MWCNTs/COOH/CS/DOXO/Ab1). We found that the size of MWCNTs/COOH/CS/DOXO ranged from 10 to 20 nm. The zeta potential of the complex formed ranged between -10 and -25 mV. Individual parts of the construct were analyzed by absorbance and fluorescence spectra. We assume that the new nanotransporter will be highly selective for aggressive forms of malignant pancreatic tumors.

**Keywords:** carbon nanotubes, magnetic gold nanoparticles, peroxidase activity, doxorubicin

## ELEKTROCHEMICKÁ SYNTÉZA STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC

KATEŘINA KOVAŘÍKOVÁ, JAKUB SIEGEL  
a VÁCLAV ŠVORČÍK

*Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
kovarikovakate@gmail.com*

Klíčová slova: stříbrné nanočástice, elektrochemická  
syntéza, charakterizace nanočástic

### Úvod

S rozvojem nanotechnologií se daří připravovat nano-sloučeniny vzácných kovů novými postupy, přičemž stále větší důraz je kladem na ekologičnost zvolených procesů<sup>1–3</sup>. Vlastnosti nanočástic se často výrazně liší od vlastností pozorovaných u jejich objemových protějšků. Stříbrné nanočástice (AgNPs) vynikají svými jedinečnými optickými, elektrickými<sup>4</sup>, biologickými vlastnostmi a speciálně svojí antibakteriální aktivitou<sup>5</sup>. Díky tomu našly uplatnění v široké škále oborů jako je medicína, katalýza, biotechnologie a bioinženýrství, elektronika, optika a mnoho dalších<sup>6</sup>. Existuje mnoho způsobů, jak nanočástice vzácných kovů syntetizovat. Každá z těchto metod má různé výhody i nevýhody, zejména s ohledem na cenu, časovou náročnost, stabilitu a distribuci velikosti částic<sup>7</sup>. Jednou z těchto metod je elektrochemická syntéza nanočástic, kterou jako první detailně popsali Reetz a Helbig<sup>8</sup>. V jejich práci byl kovový plíšek anodicky rozpouštěn a vzniklá kovová sůl byla redukována na katodě za vzniku kovových částic stabilizovaných tetraalkylamoniovými solemi. Hlavní výhody této metody spočívají ve vysoké chemické čistotě částic, v možnosti kontroly velikosti vznikajících nanočástic přizpůsobením proudové hustoty, bez potřeby drahého vybavení, vakua nebo vysokých tlaků<sup>6</sup>. Chemické a biologické syntézy nanočástic jsou většinou prováděny v přítomnosti redukčních a stabilizačních činidel<sup>9</sup>. V experimentální práci<sup>9,10</sup> byly stříbrné nanočástice úspěšně syntetizovány i bez jejich použití, z důvodu větší a větší potřeby syntetizovat nanočástice ekologicky přívětivou cestou, tedy bez použití toxických chemikálií. Jedinou nevýhodou této metody syntézy je depozice stříbra na katodě během elektrochemického procesu. Tento fakt snižuje efektivitu syntézy z důvodu snižování velikosti povrchu katody, která by byla jinak dostupná pro produkci nanočástic. Jakmile se celý povrch katody pokryje stříbrem, celý proces syntézy nanočástic se zastaví<sup>6</sup>. Nicméně tato nevýhoda se dá částečně obcházet, změnou polaritý stejnosměrného proudu mezi elektrodami, jak bylo popsáno v práci<sup>6</sup>.

### Experimentální část

Celý proces se dá jednoduše popsat pomocí elektrolýzy, tedy průchodem stejnosměrného elektrického proudu kapalinou, do které jsou ponořeny dvě elektrody, v našem případě stříbrné plíšky, kde na anodě probíhá oxidace a na katodě redukce. Při studiu vlivu napětí, vzdálenosti elektrod, teploty a pH elektrolytu při elektrolytickém rozpouštění stříbra na vznik nanočástic bylo použito jednoduché dvouelektrodové uspořádání, kde anoda i katoda byly tvořeny identickými stříbrnými plíškami s čistotou 99,95 % a rozměry (5 × 1,2 × 0,2) cm<sup>3</sup>. Elektrody byly ponořeny do 100 ml 0,4 mM roztoku citronanu sodného dihydrátu v destilované vodě. K syntéze byly použity chemikálie od firmy Sigma-Aldrich.

Jako zdroj napětí byl použit stabilizovaný zdroj PS 305D. Každý z roztoků byl míchán magnetickou míchačkou C MAG HS 7 (IKA) při otáčkách 600 rpm po dobu 30 min. Získané stříbrné nanočástice byly uchovávány ve tmě při pokojové teplotě. K charakterizaci připravených částic byly použity metody analýzy UV-Vis spektrometrie, transmisní elektronové mikroskopie (TEM), dynamického rozptylu světla (DLS) a atomové absorpční spektrometrie (AAS). V této práci byl k prokázání vzniku částic použit UV-Vis spektrofotometr Lambda 25 od firmy Perkin Elmer (deuteriová a halogenová lampa, rozsah 300–800 nm, skenovací rychlost 240 nm min<sup>-1</sup>, pokojová teplota). Od všech spekter byla odečtena absorbance referenčního roztoku, v našem případě 0,4 mM roztoku citronanu sodného dihydrátu. K získání údajů o velikosti a morfologii vzniklých částic byla využita metoda transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na přístroji JEOL JEM-1010 (JEOL Ltd., Japonsko). Snímky byly pořízeny při urychlovacím napětí 80 kV a analyzovány v programu AnalySIS 2.0. Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) byla využita ke zjištění velikosti částic a distribuce velikosti částic za použití přístroje Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments Ltd., England) v DLS režimu pro měření velikosti distribuce částic, který je vybaven lavinovou fotodiodou pro detekci signálu. Ke zjištění koncentrace Ag v roztoku byl použit atomový absorpční spektrometr (AAS) s plamenovou technikou atomizace Agilent 280 FS AA Spectrometer (Agilent Technologies Australia). Následně byly od každého roztoku tři identické vzorky podrobeny centrifugaci při otáčkách 17 500 rpm, po dobu 1 h. Analýza Ag iontů byla provedena na spektrometru Agilent 8800 triple-quadrupole (Agilent Technologies, Japonsko) s automatickým vzorkovačem. Nebulizace vzorku probíhala na zařízení MicroMist za použití peristaltického čerpadla. Nejistota stanovení koncentrace Ag byla menší než 3 %. Díky tomu je možné určit, jaká část koncentrace stříbra připadá na stříbrné ionty a jaká část na stříbro ve formě

nanočástic. Měření bylo provedeno třikrát, takže byla sledována i reprodukovatelnost přípravy.

## Výsledky a diskuse

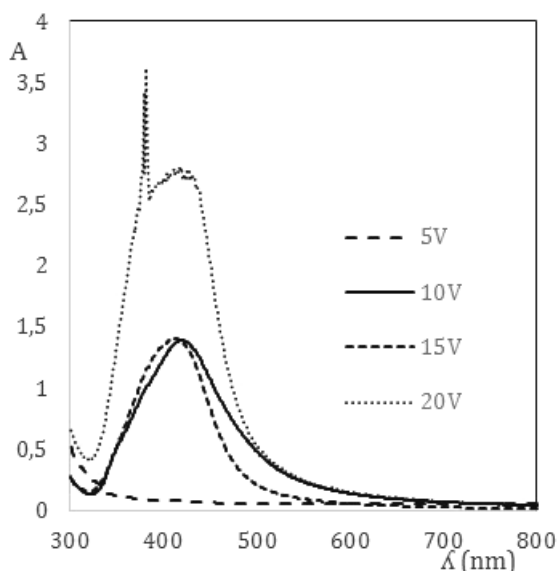
### Vliv napětí

V práci<sup>6</sup> poukazují na skutečnost, že se zvyšujícím se napětím roste koncentrace nanočástic a tudíž dochází k vzrůstu rychlosti reakce. Při studiu vlivu napětí na vznik AgNPs byl každý z roztoků vystaven různému napětí v rozmezí 5–20 V. Po 24hodinové depozici za nepřístupu světla bylo i bez použití analytických metod, pouhou vizuální kontrolou zřejmé, že při nejnižším napětí 5 V nanočástice nevznikly, což bylo potvrzeno i následnou UV-Vis spektrometrií.

Jak je vidět na obr. 1, při nastaveném vyšším napětí se v oblasti 420 nm vyskytuje maximum, které je charakteristické pro přítomnost stříbrných nanočástic. Na obr. 2 je snímek z TEM, který prokazuje vznik nanočástic převážně sférického tvaru s velikostí 5–50 nm. Tabulka I shrnuje výsledky analytického měření koncentrace Ag metodou AAS a poukazuje na skutečnost, že v roztoku, který byl připraven při napětí 5 V, se Ag vyskytuje ve formě  $\text{Ag}^+$ .

### Vliv vzdálenosti elektrod

V práci<sup>6</sup> poukazují na skutečnost, že zmenšením vzdálenosti elektrod roste koncentrace nanočástic a tudíž se rychlost reakce zvyšuje. Při studiu vlivu vzdálenosti elektrod na vznik AgNPs byla při každém experimentu změně-



Obr. 1. UV-Vis spektra AgNPs připravovaných při napětí 5–20 V

Tabulka I

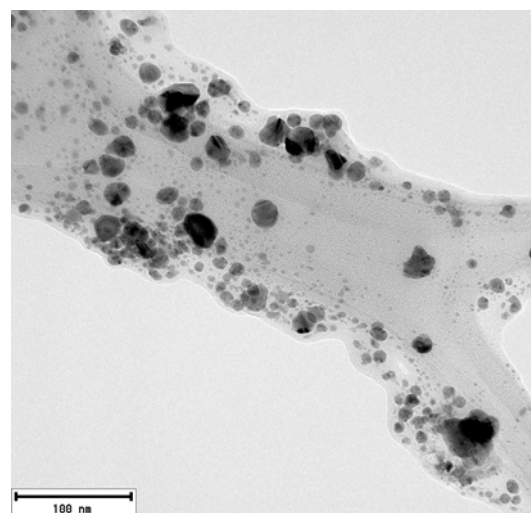
Souhrn výsledků stanovení koncentrace Ag metodou AAS

Napětí [V]	Koncentrace Ag [ mg l <sup>-1</sup> ]
5	25,9
10	47,1
15	46,1
20	65,4

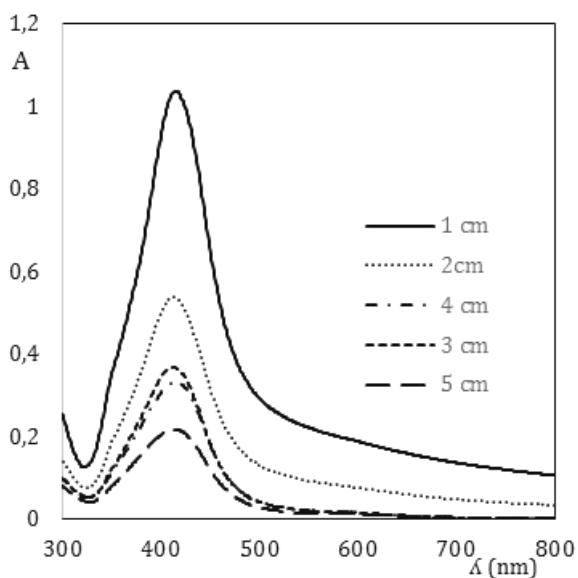
na vzdálenost elektrod postupně na 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm a 5 cm za pokojové teploty a při konstantním napětí 15 V. Výsledky z UV-Vis měření na obr. 3 prokazují vznik stříbrných nanočástic i zvyšující se koncentraci částic se snižující se vzdáleností elektrod, což bylo potvrzeno i pomocí AAS. Následnou centrifugací s analýzou supernatantu metodou ICP-MS byla zjištěna koncentrace  $\text{Ag}^+$  v jednotlivých vzorcích (výsledky jsou shrnuty v tab. II).

### Vliv teploty

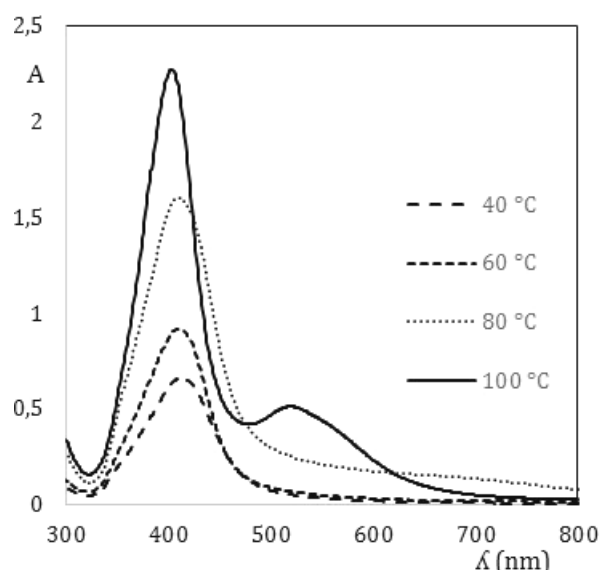
Množství nanočástic roste se zvýšenou teplotou<sup>11</sup>. Při zvýšené teplotě se reakce značně urychluje, a proto se zvyšuje i množství syntetizovaných částic<sup>12</sup>. Při studiu vlivu teploty na vznik AgNPs byla při každém experimentu navyšována teplota o 20 °C v rozmezí 40–100 °C, při konstantním napětí 15 V. UV-Vis metoda (obr. 4) prokázala vznik nanočástic. U vzorku, který byl připravován při 100 °C, se vyskytují dva vrcholy, první v oblasti 420 nm, který je charakteristický pro sférické stříbrné nanočástice a druhý v oblasti 520 nm, který poukazuje na vznik nanočás-



Obr. 2. TEM snímek AgNPs (aplikované napětí 15 V)



Obr. 3. UV-Vis spektra AgNPs (vzdálenost elektrod 1–5 cm)



Obr. 4. UV-Vis spektra AgNPs (teplota 40–100 °C)

Tabulka II

Souhrn výsledků stanovení koncentrace Ag metodou AAS a stanovení koncentrace Ag<sup>+</sup> metodou ICP-MS

Vzdálenost [cm]	AAS		ICP-MS	
	$\bar{C}$ [mg l <sup>-1</sup> ]	chyba měření	$\bar{C}$ [μg l <sup>-1</sup> ]	chyba měření
1	97,9	±17,9 %	577	± 5,6 %
2	53,3	± 10,4 %	607	± 14,3 %
3	36,2	± 4,4 %	53,7	± 8,4 %
4	47,4	± 4,1 %	2762,7	± 6,5 %
5	40,9	± 8,5 %	8293	± 5,3 %

Tabulka III

Souhrn výsledků stanovení koncentrace Ag metodou AAS a stanovení koncentrace Ag<sup>+</sup> metodou ICP-MS

Teplota [°C]	AAS		ICP-MS	
	$\bar{C}$ [mg l <sup>-1</sup> ]	chyba měření	$\bar{C}$ [μg l <sup>-1</sup> ]	chyba měření
40	59,8	± 7,0 %	147	± 13,9 %
60	71,4	± 6,5 %	235,3	± 22,4 %
80	132,3	± 10,4 %	193,7	± 7,6 %
100	297,3	± 13,4 %	277,7	± 6,7 %

tic, které jsou odlišné morfologie než sférické. Metoda AAS a ICP-MS (tab. III) prokázaly, že koncentrace se zvyšuje se zvyšující se teplotou.

#### Vliv pH

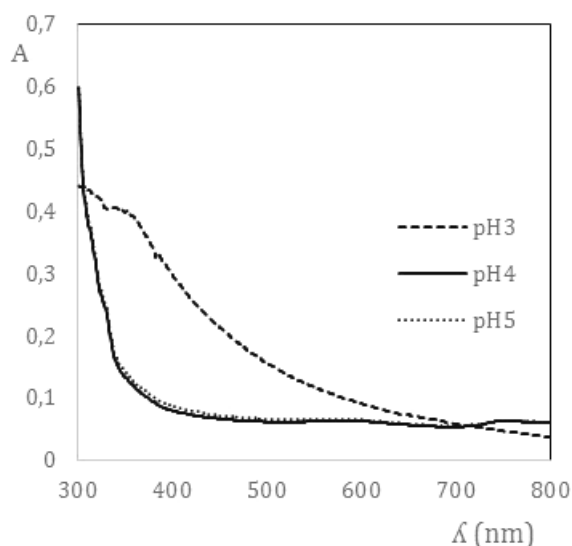
Při studiu vlivu pH na vznik AgNPs bylo pH měněno v rozmezí 3–9, k tomuto účelu byla použita 1 M kyselina citronová a 1 M roztok hydroxidu sodného. K měření pH byl použit digitální pH metr pH-100 TC (VOLCRAFT®).

Tabulka IV

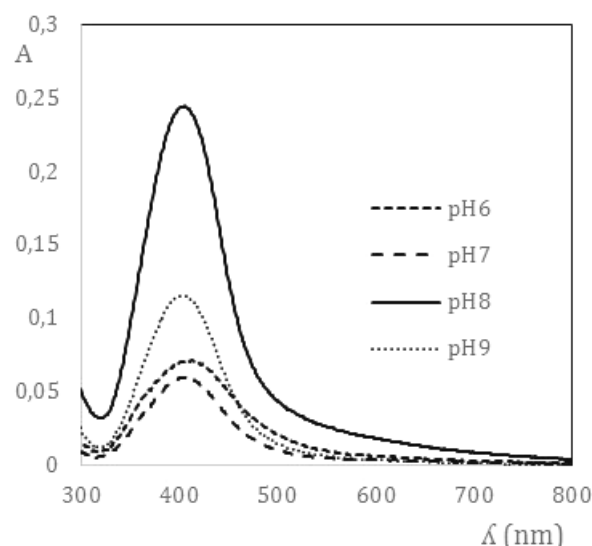
Souhrn výsledků stanovení koncentrace Ag metodou AAS a stanovení koncentrace  $\text{Ag}^+$  metodou ICP-MS

pH	AAS		ICP-MS	
	$\bar{C}$ [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	chyba měření	$\bar{C}$ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	chyba měření
3	144,5	$\pm 19,7 \%$	994,7	$\pm 4,0 \%$
4	65,4	$\pm 12,8 \%$	63945,7	$\pm 2,8 \%$
5	73	$\pm 12,3 \%$	69787,7	$\pm 1,2 \%$
6	85,3	$\pm 7,3 \%$	29600,3	$\pm 1,4 \%$
7	46,2	$\pm 9,0 \%$	10510,7	$\pm 5,3 \%$
8	75	$\pm 18,7 \%$	463,7	$\pm 18,2 \%$
9	43,1	$\pm 16,1 \%$	322,3	$\pm 6,3 \%$

A



B



Obr. 5. A) UV-Vis spektra AgNPs připravovaných při pH v rozmezí 3–5, B) UV-Vis spektra AgNPs připravovaných při pH v rozmezí 6–9

Elektrochemická syntéza probíhala při napětí 15 V. Před samotným provedením analýz bylo pouhou vizuální kontrolou zřejmé, že při silně kyselém pH nanočástice nevznikají. Roztoky nevykazovaly barvy v odstínech žluté a oranžové, které jsou charakteristické pro vzniklé stříbrné nanočástice. Výsledky UV-Vis (obr. 5A,B) tuto skutečnost potvrdily. AAS i následná ICP-MS analýza prokázaly, že stříbro se v těchto roztocích vyskytuje pouze ve formě  $\text{Ag}^+$  (tab. IV).

### Závěr

V rámci této práce byly úspěšně syntetizovány stříbrné nanočástice elektrochemickou cestou. Vznik částic byl prokázán UV-Vis spektrometrií, kde vykazují typický absorpční pás v oblasti 420 nm. Metodami AAS byla zjištěna koncentrace stříbra v roztoku a následnou centrifugací a analýzou vzniklého supernatantu bylo metodou ICP-MS stanoveno, jaká část koncentrace stříbra připadá na ionty a jaká na stříbrné nanočástice. Díky tomu bylo potvrzeno, že při příliš nízkém napětí a příliš kyselém pH nanočástice nevznikají a v roztoku se vyskytují pouze ve formě stříbrných iontů. Bylo prokázáno, že koncentrace AgNPs se

zvyšuje se snižující se vzdáleností elektrod, se zvyšujícím se napětím a zvyšující se teplotou. Metoda transmisní elektronové mikroskopie (TEM) prokázala vznik převážně sférických částic. Určení velikosti distribuce částic metodou dynamického rozptylu světla (DLS) ukázala, že částice jsou úzce disperzní a nevykazují agregaci.

*Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury České republiky v projektu č. 18-07619S.*

#### LITERATURA

1. Siegel J., Kvítek O., Ulbrich P., Kolská Z., Slepíčka P., Švorčík V.: *Mater. Lett.* 89, 47 (2012).
2. Staszek M., Siegel J., Rimpelová S., Lyutakov O., Švorčík V.: *Mater. Lett.* 158, 351 (2015).
3. Siegel J., Staszek M., Švorčík V., Rimpelova S., Kolarova K.: *IET Micro & Nano Letters* 9, 778 (2014).
4. Ma H., Yin B., Wang S., Jiao Y., Pan W., Huang S., Chen S., Meng F.: *ChemPhysChem* 5, 68 (2004).
5. Blandón-Naranjo L., Vazquez M. M., Benjumeab D., Cirob G.: *Port. Electrochim. Acta* 30, 135 (2012).
6. Khaydarov R. A., Khaydarov R. R., Gapurova O., Estrin Y., Scheper T.: *J. Nanopart. Res.* 11, 1193 (2009).
7. Thuc D. T., Huy T. Q., Hoang L. H., Tien B. C., Van Chung P., Thuy N. T., Le A.-T.: *Mater. Lett.* 181, 173 (2016).
8. Reetz M. T., Helbig W.: *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7401 (1994).
9. Sharma S., Choudhary K., Singhal I., Saini R.: *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 28, 272 (2014).
10. Ibrahim R. S., Ahmed S., Naje A. A. M., Suhail A. M. S.: *Indian J. Appl. Res.* 3, 54 (2011).
11. Sathishkumar M., Sneha K., Yun Y.-S.: *Bioresour. Technol.* 101, 7958 (2010).
12. Dhar Dwivedi A., Gopal K.: *Colloids Surf., A* 369, 27 (2010).

**K. Kovaříková, J. Siegel, and V. Švorčík**  
(*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles**

This work deals with synthesis of silver nanoparticles by electrochemical route. Choice of process conditions is a key for successful synthesis. In this work the influence of electrolyte pH, temperature, voltage and distance of electrodes was investigated during the electrolytic dissolution of silver to produce silver nanoparticles. In order to characterize the prepared particles, the methods of size analysis, size distribution analysis, morphology and nanoparticle concentration by means of Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), UV-Vis Spectrometry, and Atomic Absorption Spectrometry (AAS) were used. The best results in terms of AgNPs concentration were achieved at high temperatures at 15 V and distance of electrodes 4 cm.

**Keywords:** silver nanoparticles, electrochemical synthesis, characterization of nanoparticles

1.

## IDENTIFIKACE PADĚLKŮ PŘÍPRAVKŮ PRO LÉČBU EREKTILNÍ DYSFUNKCE RAMANOVOU SPEKTROMETRIÍ

JOHANNA KOZÁNKOVÁ<sup>a</sup>, FRANTIŠEK KRÁLÍK<sup>a</sup>, MARTIN KUCHAR<sup>b</sup>, VLADIMÍR SETNIČKA<sup>a</sup>

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

johanna.kozankova@vscht.cz

Klíčová slova: sildenafil, tadalafil, erektilní dysfunkce, padělky léčiv, Ramanova spektrometrie

### Úvod

Erektilní dysfunkce je ve světě běžnou sexuální poruchou, která se vyskytuje přibližně u 50 % mužské populace ve věkovém rozmezí 40–70 let (cit.<sup>1</sup>). Pro její léčbu byl vyvinut sildenafil, inhibitor fosfodiesterasy pátého typu (PDE-5), který se pod obchodní značkou Viagra<sup>®</sup> stal roku 1998 prvním orálně podávaným přípravkem tohoto typu<sup>2,3</sup>. V roce 2003 byly Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleny další inhibitory PDE-5: tadalafil (Cialis<sup>®</sup>) a vardenafil (Levitra<sup>®</sup>) (cit.<sup>4</sup>). Jelikož tyto léčivé látky mohou představovat vážné zdravotní riziko (např. pro pacienty s kardiovaskulárními poruchami<sup>1</sup>), jsou dostupné pouze na lékařský předpis. Především citlivá povaha zdravotních obtíží a relativně vysoká cena vede některé pacienty ke koupi těchto přípravků z nelegálních zdrojů, kterými jsou nejčastěji neregistrované internetové lékárny. Většina takto získaných přípravků jsou však padělky, které mnohdy obsahují adulteranty o neznámé toxicitě a jejich požití může mít až fatální následky<sup>5</sup>. K identifikaci těchto padělků se dnes používají např. chromatografické metody<sup>6</sup>, rentgenová fluorescence<sup>7</sup> nebo infračervená<sup>8</sup> a Ramanova spektrometrie<sup>9</sup>. Poslední jmenovaná metoda umožňuje při změně polarizovatelnosti molekul analyzované látky získat informace o jejich vibračních (případně i rotačních) přechodech<sup>10</sup>. Oproti ostatním analytickým metodám má Ramanova spektrometrie řadu výhod: lze s ní analyzovat vzorky v původním nezměněném stavu, je nedestruktivní, rychlá a uživatelsky nenáročná. Mimoto je možné provádět analýzu i přímo v terénu pomocí mobilních spektrometrů.

### Experimentální část

Originální přípravky pro léčbu erektilní dysfunkce Viagra<sup>®</sup> (O1) od firmy Pfizer s léčivou látkou sildenafil ve

formě citrátu o síle (tj. obsahu léčivé látky v jedné tabletě) 100 mg a Cialis<sup>®</sup> (O2) od firmy Eli Lilly s léčivou látkou tadalafil o síle 20 mg byly zakoupeny v rámci oficiální distribuce na území České republiky.

Standardy sildenafil citrátu (S1; deklarovaná čistota > 99 %) a sildenafilu ve formě báze (S2; deklarovaná čistota > 95 %) byly poskytnuty Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek (BAFA) na VŠCHT Praha. Standard tadalafilu (S3; deklarovaná čistota 99,9 %) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (USA).

Tři vzorky padělků (V1–V3) po jedné tabletě s obsahem sildenafil citrátu o deklarované síle 100 mg z reálných záchytů Policie České republiky byly poskytnuty Kriminologickým ústavem Praha (KUP). Jeden vzorek padělku (V4) po čtyřech tabletách s obsahem sildenafil citrátu o deklarované síle 100 mg byl poskytnut Forezním vědeckým institutem Spolkového kriminálního úřadu ve Wiesbadenu (Německo). Dva vzorky padělků (V5 a V6) po čtyřech tabletách s obsahem sildenafil citrátu o deklarované síle 100 mg a jeden vzorek padělku (C1) po čtyřech tabletách s obsahem tadalafilu o deklarované síle 20 mg pochází z online lékáren s internetovými stránkami v češtině. Padělky V5 a C1 byly odeslány z Vilniusu (Litva) a padělek V6 z Kowloonu (Hongkong).

K identifikaci adulterantů, případně chybějící pomocné látky, v padělcích V1–V3 byly použity následující standardy: síran vápenatý ve formě dihydrátu (p. a., Penta, ČR), mikrokrytalická celulóza (Sigma-Aldrich, USA) a sacharosa (puriss., Sigma-Aldrich, USA).

K získání Ramanových spekter byl využit disperzní Ramanův spektrometr DXR SmartRaman (Thermo Fisher Scientific, USA) s diodovým excitačním laserem o vlnové délce 780 nm a výkonem 45 mW na vzorku. Měření probíhalo s rozlišením 2,4–4,4 cm<sup>-1</sup> a ve spektrálním rozsahu 700–1800 cm<sup>-1</sup>. Pro všechna měření bylo nastaveno 10 expozičních po 30 s.

Standardy a adulteranty byly analyzovány v původní práškové formě. Jejich analýza probíhala přes stěny skleněných vialek. Od každého vzorku byla spektrometricky analyzována jedna tableta v nezměněné formě, tedy bez jakýchkoliv úprav. Tablety byly měřeny z přední i zadní strany (dvacet měření na každé straně).

### Výsledky a diskuse

Tablety originálních a padělaných přípravků byly nejdříve analyzovány na základě vzhledu, hmotnosti a rozměrů. Při porovnání originální tablety O1 s tabletami padělků V1–V6 byla dle tvaru, barevného odstínu a označení nápisem originálu nejbližší tableta V3. Tablety V1 a V6 se lišily zejména ostrými hranami a světlejší barvou povrchu. Tableta V2 byla z hlediska barvy i tvaru poměrně

zdařilou imitací, měla však na povrchu vyražený jiný nápis. Z padělků obsahujících sildenafil citrát se hmotností tableť originálu O1 podobala nejvíce tableta V3 (tab. I). U ostatních tablet byly rozdíly hmotností větší, přičemž nejvyšší odchylku od hmotnosti tablety O1 bylo možné sledovat u tablety V1. Při porovnání tablety O1 s tabletami V1–V6 se základní rozměry lišily nejméně u tablety V5 a nejvíce u tablety V4 (tab. II). Při dostupnosti blistru s více tabletami byly zjištěny rozměry každé tablety a k výsledné hodnotě byl uveden interval spolehlivosti (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ) (cit.<sup>11</sup>).

V rámci spektrometrické analýzy byla nejdříve naměřena Ramanova spektra standardů sildenafil citrátu (S1) a sildenafilu ve formě báze (S2) (obr. 1A) a tadalafilu (S3) (obr. 2A). U spekter jsou též vyznačeny charakteristické pásy (1–7 pro sildenafil a 1–6 pro tadalafil). Spektra standardů S1 a S3 byla interpretována pomocí tabulek vlnočtů pro charakteristické vibrace<sup>12</sup>.

Ve spektrech originálních tablet O1 (obr. 1B) a O2 (obr. 2B) byly na základě srovnání se spektry standardů S1

a S3 nalezeny charakteristické pásy vibračních přechodů molekuly sildenafil citrátu (1–7), resp. tadalafilu (1–6), čímž byla jednoznačně potvrzena jejich přítomnost. Ve spektru tablety O2 je možné v oblasti kolem 1500 až 1000  $\text{cm}^{-1}$  pozorovat pásy reflektující přítomnost pomocných látek. Pro tabletu O1 byly navíc na základě porovnání se spektrem standardu mikrokrytalické celulosy identifikovány pásy 8–10 příslušející vibracím tohoto běžně používaného excipientu.

Ve spektrech padělků V1–V5 (obr. 1C a 1D) byly identifikovány pásy 1–7 odpovídající charakteristickým vibracím molekuly sildenafil citrátu. U padělku V6 (obr. 1D) byla identifikována pouze valenční vibrace C=C (pás 2), tudíž nelze s jistotou tvrdit, že tento padělek obsahuje deklarovanou léčivou látku. Ve spektrech padělků V5 a V6 se navíc nachází intenzivní pás 16, jehož identifikace bude předmětem dalších analýz.

Ve spektru padělku V1 (obr. 1C) se v porovnání se spektrem tablety O1 objevil navíc intenzivní pás 11 charakteristický pro vibraci molekuly síranu vápenatého ve formě dihydrátu<sup>13</sup>. Ve spektru tablety V2 (obr. 1C) naopak nebyly pozorovány pásy 8–10 vyskytující se ve spektru originální tablety. Tyto pásy přísluší vibracím mikrokrytalické celulosy<sup>13</sup>, která je v originálním přípravku O1 deklarována jako pomocná látka a v tableť V2 pravděpodobně chybí. Spektrum tablety V3 (obr. 1C) vykazovalo oproti spektru tablety O1 navíc pásy 12–15, kterými se projevuje molekula sacharosy<sup>13</sup>. Přítomnost adulterantů (dihdrátu síranu vápenatého a sacharosy) i absence pomocné látky (mikrokrytalické celulosy) byly ověřeny analýzou standardů těchto látek.

Ve spektru padělku C1 (obr. 2C) byly identifikovány pásy 1–6 příslušející charakteristickým vibracím molekuly tadalafilu. V oblasti 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  lze stejně jako u spektra originální tablety O2 pozorovat matriční efekt.

Tabulka I

Hmotnosti tablet originálů přípravků Viagra® (O1) a Cialis® (O2) a jejich padělků

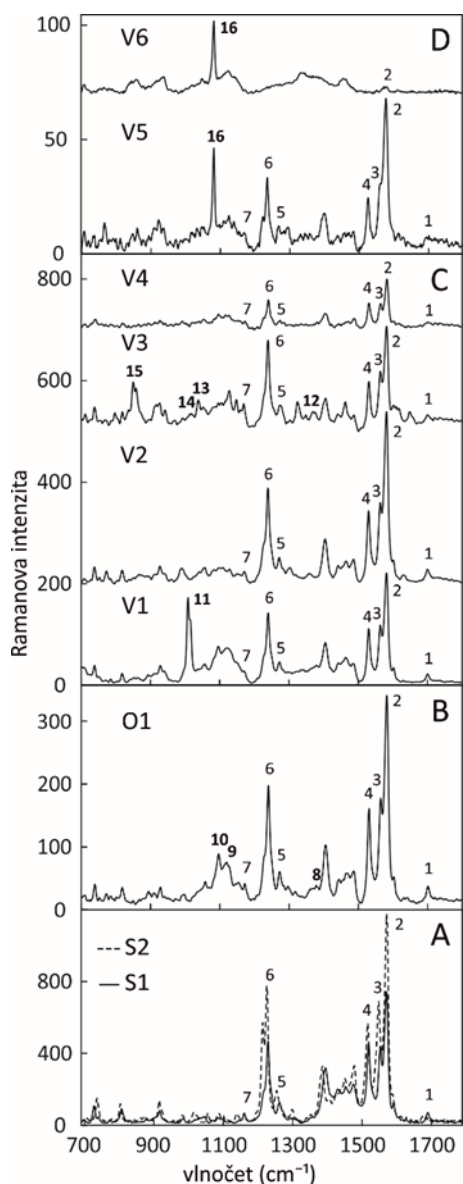
Kód přípravku	Hmotnost [g]	Interval spolehlivosti [g]
O1	0,632	0,011
O2	0,3635	0,0026
V1	0,7472	–
V2	0,5999	–
V3	0,6267	–
V4	0,744	0,028
V5	0,680	0,039
C1	0,480	0,020
V6	0,69	0,21

Tabulka II

Základní rozměry tablet originálů přípravků Viagra® (O1) a Cialis® (O2) a jejich padělků

Kód přípravku	Šířka [mm]	Interval spolehlivosti [mm]	Délka [mm]	Interval spolehlivosti [mm]	Výška [mm]	Interval spolehlivosti [mm]
O1	10,4025	0,0080	14,288	0,048	5,453	0,069
O2	7,585	0,021	12,313	0,020	4,920	0,013
V1	10,90	–	15,05	–	6,05	–
V2	10,48	–	14,44	–	5,24	–
V3	10,37	–	14,40	–	5,76	–
V4	10,895	0,072	15,04	0,14	6,38	0,21
V5	10,418	0,030	14,303	0,053	5,60	0,13
C1	7,658	0,020	12,670	0,023	5,43	0,19
V6	10,45	0,12	14,47	0,10	5,53	0,19

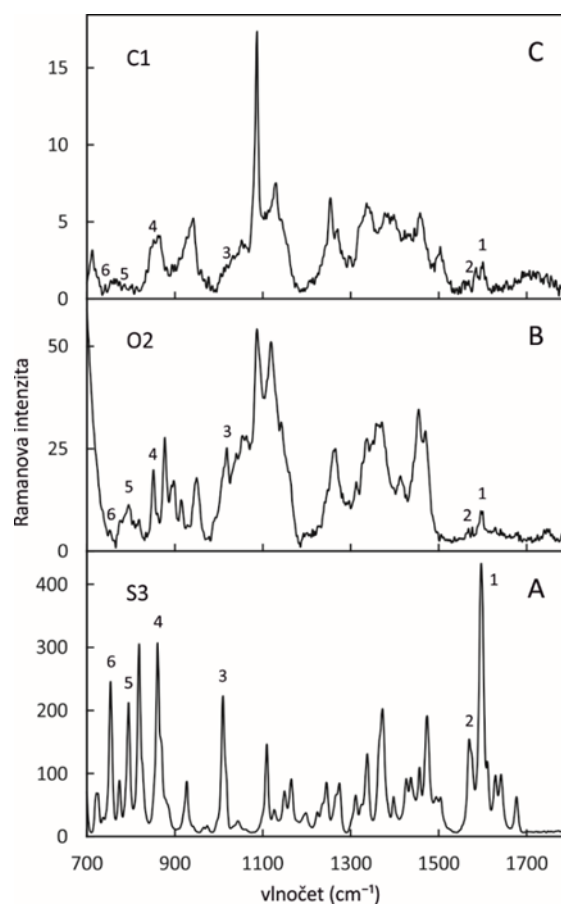




Obr. 1. Ramanova spektra standardů sildenafilu citrátu S1 a sildenafilu ve formě báze S2 (A), originálního přípravku Viagra® O1 (B), padělků V1–V4 (C) a padělků V5 a V6 (D). Spektra v rámečcích C a D byla pro lepší přehlednost offsetována

## Závěr

V rámci této práce byly studovány vybrané originální a padělané přípravky pro léčbu erektilní dysfunkce obsahující léčivou látku sildenafil ve formě citrátu o síle 100 mg (Viagra®) či tadalafilu o síle 20 mg (Cialis®). Nejprve byly analyzovány jejich vizuální, hmotnostní a rozměrové vlastnosti. Na základě jejich srovnání s originálním léčivým přípravkem bylo těmito metodami možné padělky identifikovat. Dalším krokem byla vibračně spektrometrická ana-



Obr. 2. Ramanova spektra standardu tadalafilu S3 (A), originálního přípravku Cialis® O2 (B) a padělku C1 (C)

lyza Ramanovou spektrometrií. Při interpretaci spekter standardů léčivých látek byly identifikovány charakteristické pásy jednotlivých funkčních skupin. Dle interpretace Ramanových spekter standardů byla až na jednu výjimku prokázána přítomnost léčivých látek ve všech spektrech padělaných přípravků. Bylo zjištěno, že potahované tablety, jejichž spektra nevykazují zvýšenou fluorescenci, mohou být úspěšně analyzovány technikou Ramanovy spektrometrie bez jakýchkoliv úprav. Nakonec byla porovnána spektra padělků se spektry originálních přípravků. U padělků V1 a V3 typu Viagra® byly identifikovány příměsi, zatímco padělek V2 neobsahoval mikrokrytalickou celulosu, která se u originálního léčiva používá jako excipient. Kombinace výše uvedených metod vedla k jednoznačné identifikaci originálních i padělaných přípravků. Výsledky této práce mohou posloužit při analýze dalších léčivých přípravků určených k léčbě erektilní dysfunkce. Ze získaných Ramanových spekter byla vytvořena spektrální knihovna a ucelená databáze s výše uvedenými údaji, o které již projevil zájem Ministerstvo vnitra ČR a orgány Policie ČR zabývající se touto problematikou.

Práce byla realizována za podpory grantu Ministerstva vnitra České republiky (VI20152020048), částečně také “Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/24503 a CZ.2.16/3.1.00/21537), “Národního programu udržitelnosti I” – NPU I (LO1601-č.: MSMT-43760/2015) a Specifického vysokoškolského výzkumu (MŠMT č. 20-SVV/2017 a 21-SVV/2018).

## LITERATURA

- Hsu J. C., Tang D. H., Lu C. Y.: *Int. J. Clin. Pract.* 69, 436 (2015).
- Pěntáková M., Jampílek J.: *Chem. Listy* 109, 415 (2015).
- Bell A. S., Brown D., Terrett N. K. (Pfizer Inc.): US 5,250,534 (1993).
- Fejős I., Neumajer G., Béni S., Jankovics P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98, 327 (2014).
- Orizio G., Rubinelli S., Schulz P. J., Domenighini S., Bressanelli M., Caimi L., Gelatti U.: *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 19, 970 (2010).
- Rebiere H., Guinot P., Chauvey D., Brenier C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142, 286 (2017).
- Ortiz R. S., Mariotti K. C., Schwab N. V., Sabin G. P., Rocha W. F. C., de Castro E. V. R., Limberger R. P., Mayorga P., Bueno M. I. M. S., Romão W.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58, 7 (2012).
- Coelho Neto J., Lisboa F. L. C.: *Sci. Justice* 57, 283 (2017).
- Kwok K., Taylor L. S., v knize: *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science* (Chalmers J. M., Edwards H. G. M., Hargreaves M. D., ed.), kap. 9. J. Wiley, Chichester 2012.
- Záruba K.: *Analytická chemie 2. díl*. VŠCHT Praha, Praha 2016.
- Záruba K.: *Analytická chemie 1. díl*. VŠCHT Praha, Praha 2016.
- Socrates G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. J. Wiley, Chichester 2001.
- de Veij M., Deneckere A., Vandenabeele P., de Kaste D., Moens L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 303 (2008).

**J. Kozánková<sup>a</sup>, F. Králík<sup>a</sup>, M. Kuchař<sup>b</sup>, and V. Setnička<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague; <sup>b</sup>Forensic Laboratory of Biologically Active Substances and Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague): **Identification of Counterfeit Drugs for the Treatment of Erectile Dysfunction with Raman Spectroscopy**

Phosphodiesterase type 5 inhibitors Viagra<sup>®</sup> and Cialis<sup>®</sup> for the treatment of erectile dysfunction and their presumed counterfeits were studied in this work. After measuring the weight and dimensions of each tablet the spectral analysis of tablets and standards was performed using Raman spectroscopy as a rapid and non-destructive method. By interpretation of Raman spectra of sildenafil (active ingredient in Viagra<sup>®</sup>) and tadalafil (active ingredient in Cialis<sup>®</sup>) standards the characteristic bands of the individual functional groups were identified. These characteristic bands were found in each Raman spectra of the studied preparations with one exception. Finally, Raman spectra of presumed counterfeits were compared with Raman spectra of genuine products. In the most Raman spectra of suspect tablets, additional or missing bands were observed. The combination of above described methods led to the reliable distinction of genuine tablets and their counterfeits.

Keywords: sildenafil, tadalafil, erectile dysfunction, counterfeit drugs, Raman spectroscopy

## OPTIMALIZACE POSTUPŮ PRO $^1\text{H}$ NMR ANALÝZU METABOLITŮ V KREVNÍ PLAZMĚ

LENKA MICHÁLKOVÁ<sup>a</sup>, JAN SÝKORA<sup>b</sup>  
a VLADIMÍR SETNIČKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

<sup>b</sup> Ústav chemických procesů AV, Rozvojová 1/135, 165 02 Praha 6  
michalkl@vscht.cz

Klíčová slova: metabolomika, NMR, krevní plazma, kvantitativní analýza, optimalizace metody

### Úvod

Metabolomická analýza tělních tekutin je rychle se rozvíjející oblastí klinického výzkumu, jejímž cílem je sledovat výkyvy endogenních metabolitů a určit tak jejich vztah se specifickými patofyziologickými podmínkami. Jednou z hlavních profilovacích technik této oblasti je spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), která je účinným nástrojem při identifikaci metabolitů drog nebo biomarkerů rozličných onemocnění<sup>1,2</sup>.

Mezi nejčastěji analyzované vzorky patří krev a její deriváty, následně moč a další tělní tekutiny či extrakty tkání<sup>2,3</sup>. Nedílnou součástí mnoha biologických matric jsou proteiny a jiné biologické makromolekuly, jejichž široké NMR signály mohou znesnadňovat detekci menších metabolitů. Nežádoucí signály makromolekul lze potlačit na základě jejich krátkých relaxačních časů  $T_2$  pomocí vhodných pulsních sekvencí. Tento princip využívá pulsní sekvence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), pomocí které jsou sledovány rezonance pouze nízkomolekulárních látek obsažených v krevní plazmě<sup>4</sup>. Další možností analýzy malých metabolitů je separace proteinů a lipidů z krevní plazmy ještě před NMR měřením<sup>5</sup>.

Cílem této práce je především vývoj metodiky pro kvantitativní analýzu nízkomolekulárních metabolitů v krevní plazmě s následnou aplikací při hledání nových krevních biomarkerů karcinomu slinivky břišní. Nalezení optimálních podmínek přípravy vzorku a následných parametrů měření je klíčovým úkolem pro splnění daného cíle. V práci je hodnocen a porovnáván přístup měření  $^1\text{H}$  NMR spekter plné plazmy a deproteinizované plazmy pomocí filtrů s hmotnostní hranou.

### Experimentální část

Měření všech  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo prováděno na spektrometru Varian INOVA 500 MHz (Varian, USA) při 25 °C. Používaná pulsní sekvence vznikla modifikací sekvence CPMGT2br (součást softwaru VnmrJ od firmy Agilent, USA), zahrnující 10 000 skenů, dobu akvizice 2,7 s, saturační čas 4 s a 128 cyklů.

Vzorky plné krve byly odebrány na Oddělení gastroenterologie a hepatologie, Ústřední vojenské nemocnice v Praze za použití 9ml odběrníků obsahujících tridraselnou sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) jako anti-koagulant. Ihned po odběru byly vzorky podrobeny centrifugaci při 1500 g po dobu 10 min a získaná frakce krevní plazmy byla okamžitě zamrzána a uchovávána při – 80 °C.

Zpracování a vyhodnocení naměřených spekter bylo provedeno softwarem ChenomX (Chenomx Inc., Kanada), který umožňuje celkovou analýzu metabolitů v  $^1\text{H}$  NMR spektrech komplexních biologických směsí. Základní knihovna ChenomX zahrnuje přes 350 metabolitů, u nichž je stanovena závislost chemického posunu na pH. V nejnovější aktualizaci softwaru je knihovna propojena s databází projektu Human Metabolome Database<sup>6</sup>.

### Výsledky a diskuse

Nejprve bylo změřeno  $^1\text{H}$  NOESY spektrum plné plazmy, pro které jsou typické široké rezonance proteinů a lipidů<sup>7</sup>, a proto není tato technika vhodná pro kvantifikaci nízkomolekulárních metabolitů. Následovalo použití spin-echo pulsní sekvence CPMG, která díky potlačení signálů protonů proteinů a mastných kyselin vázaných na albumin umožňuje sledování metabolitů s nižší molekulovou hmotností<sup>7</sup>.

Jelikož  $^1\text{H}$  NOESY i  $^1\text{H}$  CPMG měření probíhala v  $\text{D}_2\text{O}$ , byla použitým referenčním standardem chemického posunu sodná sůl kyseliny trimethylsilylpropionové (TSP). Nevýhodou při měření plné krevní plazmy je fakt, že používaný referenční standard se váže na bílkoviny krevní plazmy, čímž se zkrátí jeho relaxační čas  $T_2$  a dojde k rozšíření jeho signálu<sup>2</sup>. To je také důvod, proč není možné tento signál využít ke kvantitativnímu vyhodnocení spekter. V případě analyzovaných vzorků dosahovala šířka signálu TSP v  $^1\text{H}$  NOESY spektrech hodnoty až 13,5 Hz, přičemž standardně se pohybuje okolo 0,7 Hz.

Jako pH standard byl ke vzorku přidáván imidazol, jehož signály se s rostoucím pH pohybují směrem k nižšímu chemickému posunu. Dalším cílem přidáváním imidazolu bylo využít jeho signály k vyhodnocení koncentrací metabolitů. Od tohoto záměru bylo nicméně upuštěno, neboť v přidávaném roztoku imidazolu docházelo k výměně vodíku za deuterium a tím ke snižování jeho

signálu. Tento problém by mohl být vyřešen přípravou čerstvého roztoku imidazolu pro každé měření, což by však nebylo ekonomicky ani časově výhodné.

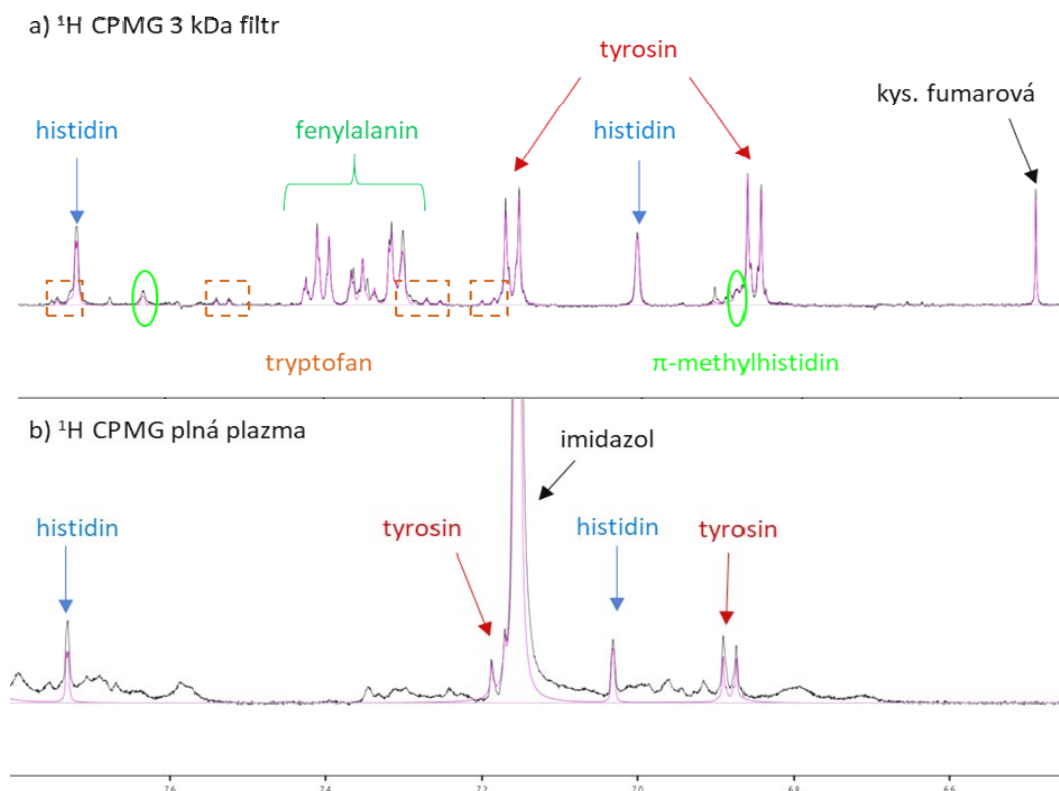
Alternativou ke spin-echo sekvencím pro kvantifikaci látek s nižší molekulovou hmotností je odstranění proteinů. Pro separaci metabolitů z tělních tekutin obsahujících proteiny lze využít různé metody – filtraci, extrakci rozpouštědlem a sušení<sup>5</sup>. Filtrace přes membránu s hmotnostní hranou (Amicon Ultra 3 nebo 10 kDa) byla navržena jako vhodný způsob pro separaci makromolekulárních metabolitů (proteinů, lipidů). Při porovnání naměřených <sup>1</sup>H spekter plné a filtrované krevní plazmy (obr. 1) je patrný rozdíl ve tvaru základní linie i šířce signálu. Navíc spektrum naměřené po filtraci je bohatší a je identifikováno větší množství metabolitů.

Před filtrací vzorků bylo nutné filtry několikrát promýt pro odstranění glycerolu, který slouží k ochraně membrány filtru během skladování. Dle doporučení výrobce je k promývání vhodná voda, případně roztok hydroxidu sodného (0,1 mol l<sup>-1</sup>). Dostupná literatura<sup>5</sup> se odkazuje na využití 50% vodného roztoku methanolu. Ani jedna z metod však nebyla schopna odstranit glycerol úplně a do výsledků je tedy při použití filtrů zanášena systematická chyba nadhodnocující jeho koncentraci. Nejvhodnějším a nadále používaným řešením byl zvolen postup zahrnující

promytí filtru roztokem NaOH (0,1 mol l<sup>-1</sup>), přestože účinnější by bylo promývání methanolem. Methanol však patří mezi stanovované látky a při jeho používání by docházelo k zanášení další systematické chyby do vyhodnocení.

Vzorek plazmy určený k analýze byl rozmrazen při pokojové teplotě a odebraný podíl 300 μl byl následně filtrován při 12 000 rpm přes membránu promytou roztokem 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaOH. Filtrát byl v dalším kroku promyt 300 μl fosfátového pufru o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup> v D<sub>2</sub>O (pH 7,4; 30 mmol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mmol l<sup>-1</sup> TSP) při stejných podmínkách jako u plazmy. Tímto promytím došlo k uvolnění metabolitů, které jsou slabě vázány na plazmatické bílkoviny, případně lipidy, a zároveň byl zajištěn dostatečný objem vzorku pro NMR analýzu. V případě tohoto postupu sloužilo TSP zároveň i jako standard pro vyhodnocení koncentrace metabolitů.

Odstraněním bílkovin z krevní plazmy došlo k podstatné změně pH a některé rezonance bylo obtížné vyhodnotit (např. glutamin, citrát), protože databáze softwaru ChenomX má pro některé metabolity omezený rozsah závislosti hodnot chemického posunu na pH. Bylo proto nutné zajistit konstantní hodnotu pH, čehož bylo dosaženo přidávkou fosfátového pufru o pH 7,4, která odpovídá fyziologické hodnotě krevní plazmy.



Obr. 1. Srovnání aromatických oblastí <sup>1</sup>H CPMG spekter krevní plazmy s vyznačenými signály metabolitů; a) 3 kDa filtr; b) plná nefiltrovaná plazma

Na základě dostupné literatury<sup>8–10</sup> byl pro další měření zvolen pouze filtr s hmotnostní hranou 3 kDa. Z hlediska účinnosti separace proteinů a lipidů nebyly mezi filtry s hranou 3 kDa a 10 kDa pozorovány výrazné rozdíly. Taktéž identifikované metabolity se nijak významně nelišily při srovnání těchto dvou filtrů. Po odstranění proteinů bylo mimo jiné možné stanovit např. fenylalanin a tryptofan (obr. 1) a dále také pyruvát a cholin. Zmíněné látky jsou v některých studiích<sup>11–13</sup> považovány za možné biomarkery onemocnění např. karcinomu pankreatu.

## Závěr

V práci byly zkoumány různé postupy přípravy vzorku a parametry analýzy krevní plazmy. Nejprve byla <sup>1</sup>H NMR analýza metabolitů krevní plazmy prováděna pomocí CPMG pulsní sekvence, která selektivně tlumí signály velkých molekul (proteinů). Omezením této metody však byla obtížná kvantifikace metabolitů, jelikož při analýze docházelo k vazbě NMR standardu na proteiny krevní plazmy a tím k rozšíření signálu. Vhodnějším přístupem pro kvantitativní analýzu je odstranění proteinů před měřením, a to filtrací vzorku plazmy přes filtr s hmotnostní hranou 3 kDa, který byl promýván roztokem NaOH. Tento postup vedl k identifikaci většího počtu metabolitů v porovnání s analýzou nefiltrované krevní plazmy.

*Vývoj metodiky byl realizován za podpory grantů Ministerstva zdravotnictví ČR (16-31028A) a Grantové agentury ČR (17-05292S), částečně také za podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018), Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/24503 a CZ.2.16/3.1.00/21537) a Národního programu udržitelnosti (NPU MŠMT – LO1601; 43760/2015).*

## LITERATURA

- Gowda G. A. N., Raftery D.: *J. Magn. Reson.* 260, 144 (2015).
- Emwas A.-H. M., Salek R. M., Griffin J. L., Merzaban J.: *Metabolomics* 9, 10480 (2013).
- Emwas A. H.: *Methods Mol. Biol.* (N. Y., NY, U. S.) 1277, 161 (2015).
- Wevers R. A., Engelke U., Heerschap A.: *Clin. Chem.* (Washington, DC, U. S.) 40, 1245 (1994).
- Daykin C. A., Foxall P. J. D., Connor S. C., Lindon J. C., Nicholson J. K.: *Anal. Biochem.* 304, 220 (2002).
- Jung Y.-S., Hyeon J.-S., Hwang G.-S.: *Anal. Chim. Acta* 934, 194 (2016).
- Nicholson J. K., O'Flynn M. P., Sadler P. J., Macleod A. F., Juul S. M., Sonksen P. H.: *Biochem. J.* 217, 365 (1984).
- Nagana Gowda G. A., Gowda Y. N., Raftery D.: *Anal. Chem.* 87, 706 (2015).
- Sheedy J. R., Ebeling P. R., Gooley P. R., McConville M. J.: *Anal. Biochem.* 398, 263 (2010).
- Schicho R., Shaykhtudinov R., Ngo J., Nazyrova A., Schneider C., Panaccione R., Kaplan G. G., Vogel H. J., Storr M.: *J. Proteome Res.* 11, 3344 (2012).
- Cocco E., Murgia F., Loreface L., Barberini L., Poddighe S., Frau J., Fenu G., Coghe G., Murru M. R., Murru R., Del Carratore F., Atzori L., Marrosu M. G.: *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 3, e185 (2016).
- Nahon P., Amathieu R., Triba M. N., Bouchemal N., Nault J. C., Ziol M., Seror O., Dhonneur G., Trinchet J. C., Beaugrand M., Le Moyec L.: *Clin. Cancer Res.* 18, 6714 (2012).
- Xie G., Lu L., Qiu Y., Ni Q., Zhang W., Gao Y.-T., Risch H. A., Yu H., Jia W.: *J. Proteome Res.* 14, 1195 (2015).

**L. Michálková<sup>a</sup>, J. Sýkora<sup>b</sup>, and V. Setnička<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague; <sup>b</sup> Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, Prague): **Optimalization of Procedures for <sup>1</sup>H NMR Analysis of Metabolites in Blood Plasma**

NMR-based metabolomics is promising way in disease diagnosis and biomarker discovery, because it allows nondestructively identify and quantify large numbers of metabolites in biofluids, eg. blood plasma. In this work the quantification of low molecular metabolites in blood plasma is based on removal of proteins and lipids by ultrafiltration (membrane with 3 kDa cut-off limit). Before using, filter is washed with sodium hydroxide to eliminate glycerol from the membrane. It is necessary to add phosphate buffer to stabilize pH of the plasma sample after ultrafiltration. In <sup>1</sup>H NMR spectra of deproteinized blood plasma, it is possible to identify and quantify more than 55 low molecular metabolites.

Keywords: metabolomics, NMR, blood plasma, quantitative analysis, method optimization

## PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KŘEMIČITÝCH NANOČÁSTIC PRO STANOVENÍ pH

ANETA MOTYČKOVÁ a PAVEL ŘEZANKA

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

Klíčová slova: fluorescenční látky, křemičité nanočástice, povrchová modifikace, stanovení pH

### Úvod

Křemičité nanočástice se jeví díky svým vlastnostem jako vhodné nosiče pro transport léků či jiných látek do buněk<sup>1</sup>. Jsou vyvíjeny různé modifikace povrchu i možnosti navázání určitých látek do nanočástic s aplikacemi v medicíně za účelem diagnostiky a cílené léčby<sup>2</sup>. Modifikace povrchu nanočástic fluorescenčními látkami umožňuje pomocí zobrazovacích metod poskytnout požadované informace pro diagnostiku a terapii určitých onemocnění<sup>3</sup>.

Tato práce byla věnována přípravě křemičitých nanočástic, jejich povrchové modifikaci různými fluorescenčními látkami a následné charakterizaci připravených nanočástic. Dále byly studovány fluorescenční vlastnosti připravených modifikovaných nanočástic v závislosti na pH. Křemičité nanočástice byly připraveny alkalickou hydrolyzou tetraethoxysilanu a na jejich povrch byly navázány fluorescenční látky. Připravené nanočástice byly charakterizovány transmisním elektronovým mikroskopem, Ramanovou a infračervenou spektrometrií a termogravimetrickou analýzou. Bylo zjištěno, že intenzita fluorescenčního záření nanočástic modifikovaných fluoresceinem a rhodaminem závisí na pH vodného roztoku v rozmezí od 5 do 7,5 a nezávisí na koncentraci nanočástic, čehož může být využito pro zjištění pH uvnitř buněk.

### Experimentální část

Použité chemikálie, fluorescein isothiokyanát isomer I (FITC, 98 %), 4,4',4'',4'''-(porfin-5,10,15,20-tetrayl) tetrakis(benzová kyselina) (porfyrin; 75 %), rhodamin B (rhodamin), tetraethoxysilan (99 %), *N*-hydroxysukcinimid (98 %), (3-aminopro-pyl)triethoxysilan (98 %), kyselina octová (99 %) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (98 %), byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Dále byl použit bromid draselný (PIKE technologies), kyselina fosforečná (Fluka Analytical, 50%), methanol (Lach-Ner, 99,99 %), amoniak (Penta, 25–29 % p.a.), hydroxid sodný (Merck, 1 mol l<sup>-1</sup>) a chlorid

sodný (Penta, p.a.).

Fluorescenční spektra byla měřena na fluorescenčním spektrometru FluoroMate FS-2 firmy SCINCO. Všechna spektra byla měřena s krokem 0,1 nm v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

Měření nanočástic bylo provedeno na Ramanově spektrometru s Fourierovou transformací (FT-Raman) od firmy BRUKER, model Equinox s vlnovou délkou excitace laseru 1064 nm a na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací (FT-IR), model Nicolet IS50 od firmy Thermo Scientific.

Analýzu nanočástic na transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) provedl Ing. Jakub Koktan. Byl použit mikroskop Philips CM 120 s urychlovacím napětím 120 kV a se zdrojem elektronů LaB6. Pro každý typ nanočástic bylo ke zjištění poloměru změřeno minimálně 200 nanočástic.

Termogravimetrickou analýzu (TGA) nanočástic provedla RNDr. Mgr. Jana Ederová, CSc. na VŠCHT Praha v Laboratořích termické analýzy na přístroji TG-750 od firmy Stanton-Redcroft. Navážka nanočástic v platinové nádobce byla ohřívána rychlostí 2 °C min<sup>-1</sup> do 150 °C, pak 10 °C min<sup>-1</sup> do 750 °C za proudění vzduchu 10 ml min<sup>-1</sup>.

### Modifikace SiNH<sub>2</sub> fluorescenční látkou FITC

Při modifikaci aminokřemičitých nanočástic (SiNH<sub>2</sub>) připravených dle publikovaného postupu<sup>4</sup> fluorescenční látkou FITC bylo ve skleněné vialce o objemu 4 ml sonikováno 10,0 mg SiNH<sub>2</sub> ve 2 ml methanického roztoku FITC o příslušné koncentraci (*c* = 1,7; 1; 0,5; 0,1; 0,03; 0,01; 0,005 mmol l<sup>-1</sup>). Vialka byla zabalena do alobalu a suspenze byla intenzivně míchána přes noc. Suspenze byla poté převedena do 2ml plastových zkumavek a centrifugována 10 min (8609 g). Promývání nanočástic methanolem, sonikace a centrifugace byla provedena 4×. Modifikované nanočástice (SiNH-FITC) byly proměřeny na fluorescenčním spektrometru. V případě analýz na přístrojích FT-Raman, FT-IR, TGA a TEM, nebo pokud byly SiNH-FITC dále modifikovány, byl methanol odpařen na rotační vakuové odparce.

### Modifikace SiNH-FITC porfyrinem, resp. rhodaminem

K modifikaci SiNH-FITC porfyrinem byly použity SiNH<sub>2</sub> modifikované roztoky FITC o koncentracích 0,01; 0,03; 0,005 mmol l<sup>-1</sup>. Nejdříve byl připraven roztok NaCl navážením 58,4 mg NaCl a rozpuštěním ve 2 ml vody, ve kterém byl rozpuštěn porfyrin (resp. rhodamin) o látkovém množství 2 mmol. K tomuto roztoku bylo přidáno 40 μl roztoku NaOH (1 mol l<sup>-1</sup>) a poté 29 μl 50% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. pH tohoto roztoku bylo upraveno na 5–6. Dále bylo rozpuště-

no 5,7 mg *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu v 1,5 ml tohoto roztoku o pH 5 až 6. Poté bylo rozpuštěno 5,8 mg *N*-hydroxysukcinimidu v 1 ml roztoku připraveného v minulém kroku. Vzniklý roztok byl 15 min třepán a následně bylo jeho pH upraveno na 7,2–7,5 roztokem NaOH (1 mol l<sup>-1</sup>). Do 2ml plastové zkumavky bylo naváženo 5 mg SiNH-FITC. Navážené nanočástice byly třepány v 1 ml roztoku o pH 7,2–7,5 po dobu 2 hodin. Po centrifugaci (10 min, 8609 g) byly nanočástice promývány vodou, sonikovány a následně centrifugovány 5 min (4×). Vzniklé nanočástice (SiNH-FITC-PORFB, resp. SiNH-FITC-RHD) byly proměřeny na fluorescenčním spektrometru v pufrch o pH 5–7,5.

## Výsledky a diskuse

### Příprava a charakterizace nanočástic

Analýzou nanočástic na TEM mikroskopu bylo zjištěno, že průměrný poloměr připravených sférických nanočástic se pohybuje v rozmezí 69–74 nm. Z TGA analýz bylo zjištěno množství navázaných aminopropylových skupin (0,7 % (m/m)) a množství FITC (1,5 % (m/m)), což odpovídá menšímu než monomolekulárnímu pokrytí povrchu nanočástic FITC. Při tomto výpočtu byla použita hustota SiNP 2,0 g cm<sup>-3</sup> (cit.<sup>5</sup>).

Ramanova spektra nanočástic jsou uvedena na obr. 1. Po navázání FITC na povrch nanočástic chybí ve spektru pás v oblasti 2000 cm<sup>-1</sup>, který je charakteristický pro isothiokyanátovou skupinu<sup>6</sup>, což nasvědčuje tomu, že se FITC váže na nanočástice kovalentně právě přes tuto skupinu<sup>7</sup>. Ve spektrech je také patrný pás okolo 1025 cm<sup>-1</sup>, který je charakteristický pro valenční symetrickou vibraci skupiny Si-O-Si (cit.<sup>5</sup>). Pásky v oblasti mezi 1180–1650 cm<sup>-1</sup> přísluší vibracím FITC (cit.<sup>8</sup>).

V infračervených spektrech nanočástic byly patrné pouze pásky příslušející vibracím křemičitých skupin, tj. valenční vibrace Si-O (1095 cm<sup>-1</sup>), deformační vibrace Si-OH (953 cm<sup>-1</sup>) a valenční vibrace Si-O (793 cm<sup>-1</sup>) (cit.<sup>9</sup>).

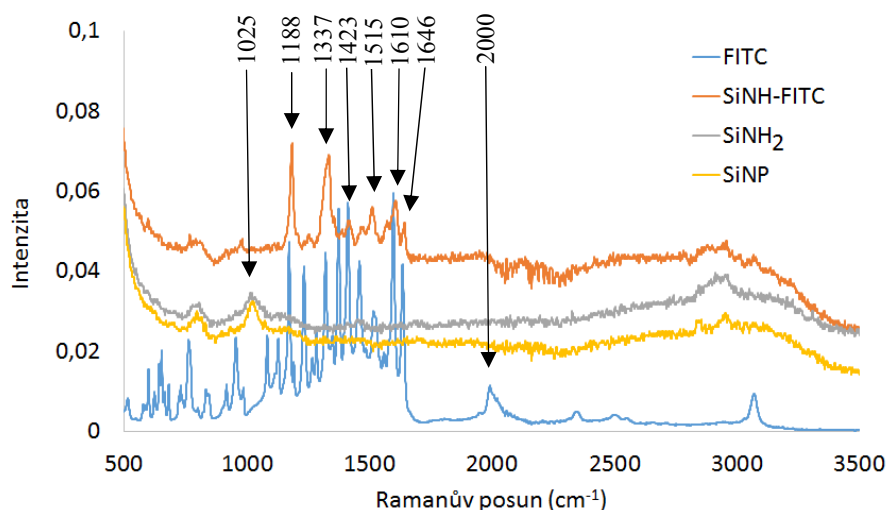
### Studium fluorescenčních vlastností připravených nanočástic

Pro stanovení pH v určitém rozmezí nezávisle na koncentraci nanočástic bylo potřeba navázat na povrch nanočástic fluorescenční látku, která je závislá na pH, a další, která na pH závislá není. Jako fluorescenční látka, která je závislá na pH, byl zvolen FITC. Fluorescenční látkou, která na pH v rozmezí od 4 do 10 závislá není<sup>10</sup>, byl zvolen rhodamin.

Pro přípravu výše uvedených nanočástic bylo nejprve potřeba proměřit kalibrační křivku FITC, přičemž byly zjištěny koeficienty ( $a = (124,6 \pm 2,9) \text{ l mmol}^{-1}$ ,  $b = 488 \pm 362$ ) pro lineární závislost intenzity fluorescenčního záření ( $I$ ) na koncentraci FITC ( $c$ ):  $I = a \times c + b$ . Koeficient determinace ( $R^2$ ) byl 0,9962. Kalibrace byla měřena při  $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$ .

Poté bylo nutné zjistit vhodnou koncentraci FITC k modifikaci SiNH<sub>2</sub>, neboť bylo potřeba, aby na výsledných nanočásticích zbyly volné aminoskupiny pro modifikaci rhodaminem. Jako modelový případ byla zvolena modifikace SiNH-FITC porfyrinem. Na základě experimentů s koncentracemi FITC 1; 0,5; 0,1; 0,03; 0,01; 0,005 mmol l<sup>-1</sup> byla jako vhodná koncentrace FITC k modifikaci SiNH<sub>2</sub> zvolena 0,03 mmol l<sup>-1</sup>.

Dále byla proměřena závislost intenzity fluorescenčního záření SiNH-FITC-RHD na pH. Tato závislost má tvar sigmoidní křivky, který je dán ionizací hydroxylové a karboxylové skupiny FITC v roztoku v závislosti na stoupajícím pH. Pro závislost poměru intenzit fluorescenčního



Obr. 1. Ramanova spektra fluorescein isothiokyanátu (FITC), křemičitých nanočástic (SiNP), aminokřemičitých nanočástic (SiNH<sub>2</sub>) a aminokřemičitých nanočástic modifikovaných fluorescein isothiokyanátem (SiNH-FITC)

záření FITC/RHD, tj.  $I_{518}/I_{578}$  na pH byla získána následující rovnicí:

$$\frac{I_{518}}{I_{578}} = 0,86 \cdot \left( \frac{1 + e^{\frac{14,14 - \text{pH}}{0,413}}}{1 + e^{\frac{16,77 - \text{pH}}{0,413}}} \right)$$

Z poměru intenzit fluorescenčního záření FITC a rhodaminu lze tedy stanovit pH vodného roztoku v rozmezí od 5 do 7,5 nezávisle na koncentraci nanočástic.

## Závěr

V rámci této práce byly připraveny křemičité nanočástice s navázanými aminopropylými skupinami, které byly modifikovány FITC o koncentraci 0,03 mmol l<sup>-1</sup>. Tato koncentrace byla zvolena tak, aby zbyly volné aminogrupy pro následnou modifikaci rhodaminem. Pro přípravu nanočástic, jejichž využití je směřováno na stanovení pH, byl zvolen FITC, jehož intenzita fluorescenčního záření je závislá na pH, a rhodamin, jehož intenzita fluorescenčního záření není závislá na pH v rozmezí od 5 do 7,5. Ze závislosti poměru intenzit fluorescenčního záření FITC a rhodaminu na pH lze stanovit pH vodného roztoku v rozmezí 5–7,5 nezávisle na koncentraci nanočástic. Takto modifikované nanočástice lze využít ke stanovení pH v buňkách nezávisle na tom, kolik nanočástic se dostane do buněk.

*Tato práce byla realizována za podpory grantu IGA A2\_FCHI\_2017\_021.*

## LITERATURA

1. Li Z., Barnes J. C., Bosoy A., Stoddart J. F., Zink J. I.: Chem. Soc. Rev. 41, 2590 (2012).
2. Feng Y., Panwar N., Tng D. J. H., Tjin S. C., Wang K., Yong K.-T.: Coord. Chem. Rev. 319, 86 (2016).
3. Wang L., Zhao W., Tan W.: Nano Res. 1, 99 (2008).

4. Tang W., Xu H., Kopelman R., Philbert M. A.: Photochem. Photobiol. 81, 242 (2005).
5. Mangos D. N., Nakanishi T., Lewis D. A.: Sci. Technol. Adv. Mater. 15, 015002 (2014).
6. Socrates G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. Wiley, Chichester 2004.
7. Jiang L., Li X., Liu L., Zhang Q.: Int. J. Nanomed. 8, 1825 (2013).
8. Wang L., Roitberg A., Meuse C., Gaigalas A. K.: Spectrochim. Acta, Part A 57, 1781 (2001).
9. Beganskienė A., Sirutkaitis V., Kurtinaitienė M., Juškėnas R., Kareiva A.: Mater. Sci. Medzg. 10, 287 (2004).
10. Goncalves M. S. T.: Springer Ser. Fluoresc. 8, 27 (2010).

**A. Motyčková and P. Řezanka** (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Preparation and Characterization of Silica Nanoparticles for Determination of pH**

This work deals with preparation of silica nanoparticles, their surface modification by fluorescent compounds and characterization of such prepared nanoparticles. It also studies fluorescent properties of fluorescent compounds in solutions with different pH. Nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy, infrared and Raman spectroscopy and thermogravimetric analysis. Rhodamine, fluorescein isothiocyanate and porphyrin were used as fluorescent compounds. Fluorescent intensity of nanoparticles modified by fluorescein isothiocyanate and rhodamine depends on the pH of solution in the range from 5 to 7.5 and does not depend on the concentration of nanoparticles which can be used for pH determination inside cells.

Keywords: fluorescent compounds, silica nanoparticles, surface modification, determination of pH



## STUDIUM STRUKTURY NOVÉ SYNTETICKÉ DROGY BUTYLONU V ROZTOKU METODAMI MOLEKULOVÉ SPEKTROMETRIE

DITA SPÁLOVSKÁ<sup>a</sup>, FRANTIŠEK KRÁLÍK<sup>a</sup>,  
BRONISLAV JURÁSEK<sup>b</sup>, MICHAL KOHOUT<sup>c</sup>,  
LUCIE HABARTOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN KUCHAR<sup>b</sup>  
a VLADIMÍR SETNIČKA<sup>a</sup>

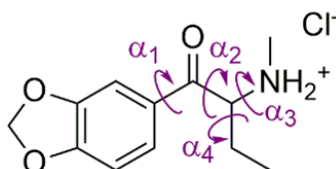
<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek a Ústav chemie přírodních látek, <sup>c</sup> Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Dita.Spalovska@seznam.cz

Klíčová slova: butylon, nové syntetické drogy, *ab initio* výpočty, molekulová spektrometrie

### Úvod

Počet monitorovaných nových psychoaktivních látek (NPS – new psychoactive substances) v Evropě je v současné době vyšší než 620 (cit.<sup>1</sup>). Významnou skupinou jsou nové syntetické drogy, které představují látky strukturně podobné již známým omamným a psychotropním látkám (OPL) a díky tomu jsou jejich účinky na lidský organismus často analogické či dokonce silnější. Jde o farmakologicky neidentifikovaná xenobiotika s neznámým efektem a toxicitou, což pro uživatele představuje značné zdravotní riziko<sup>1</sup>. Butylon (obr. 1) je chirální látka, která patří mezi syntetické katinony, a na evropském drogovém trhu byl poprvé zachycen v roce 2008 (cit.<sup>2</sup>). Způsobuje vzrůst mimobuněčné koncentrace dopaminu a je inhibitorem dopaminového, norepinefrinového a serotoninového transportéru<sup>3</sup>.

Spektrometrické metody představují účinnou, rychlou, dostupnou a spolehlivou možnost identifikace neznámých látek<sup>4</sup>. Metody vibrační spektrometrie – infračervená (IR) a Ramanova – představují v kombinaci s kvantově chemickými výpočty účinný nástroj pro studium a identifi-



Obr. 1. Struktura hydrochloridu butylonu s vyznačenými dihedrálními úhly  $\alpha_1$  až  $\alpha_4$

kaci NPS. *Ab initio* výpočty založené na teorii funkciónálu hustoty (DFT) umožňují nejen detailní interpretaci experimentálních spekter, ale také popis struktury a konformačních možností látek na úrovni blízké atomárnímu rozlišení, což bylo jedním z cílů této práce. Jelikož butylon patří mezi chirální látky, lze k jeho studiu využít metody chiroptické spektrometrie, konkrétně vibrační (VCD) a elektronový cirkulární dichroismus (ECD). Tyto metody jsou mnohem citlivější k trojrozměrné struktuře chirálních látek než metody konvenční molekulové spektrometrie a v kombinaci s metodami DFT umožňují navíc spolehlivě určit absolutní konfiguraci, která hraje významnou roli při studiu biologické aktivity<sup>5</sup>.

### Experimentální část

Standard racemického butylonu ve formě hydrochloridu s deklarovanou čistotou > 99 % byl dodán firmou Alfarma (Česká republika). Následně byla provedena enantioseparace tohoto racemátu se získáním dvou produktů – butylonu 1 (čistota 99,5 %) a butylonu 2 (čistota 98,7 %), které byly taktéž ve formě hydrochloridu. K měření spekter ECD byl použit spektrometr J-815 (Jasco, Japonsko) a křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm, ve které byl analyzován vzorek butylonu o koncentraci 15 mg l<sup>-1</sup> v demineralizované vodě. K měření spekter VCD a IR absorpčních spekter bylo využito spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S vybaveného VCD/IRRAS modulem PMA 37 (Bruker, Německo)<sup>6</sup> a měření probíhala s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup>. Vzorek o koncentraci 100 g l<sup>-1</sup> v D<sub>2</sub>O byl umístěn do kyvety BioCell (BioTools, Inc., USA) s CaF<sub>2</sub> okny a optickou dráhou 27,3 μm. Pro měření Ramanových spekter byl použit spektrometr DXR SmartRaman (Thermo Scientific, USA) vybavený laserem o excitační vlnové délce 532 nm a s nastaveným výkonem 10 mW. Měření vzorku o koncentraci 100 g l<sup>-1</sup> v demineralizované vodě probíhalo v optické cele o rozměrech 3×4×10 mm s antireflexní vrstvou (BioTools, Inc., USA). Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

Startovní geometrie pro konformační analýzu byly získány systematickými změnami vybraných dihedrálních úhlů hydrochloridu (*R*)-butylonu. Tyto startovní geometrie byly optimalizovány na úrovni B3LYP/6-31G a získané energeticky výhodné konformery pak byly reoptimalizovány na úrovni B3LYP/6-311++G(d,p) se zahrnutím vlivu rozpouštědla pomocí modelu polarizovaného kontinua. Při DFT výpočtech spekter VCD a IR byl taktéž zahrnut vliv výměny atomů vodíku aminoskupiny za atomy deuteria. Relativní zastoupení nalezených stabilních konformerů bylo vypočteno pomocí Boltzmannova rozdělení na základě Gibbsovy volné energie při teplotě 298 K. DFT výpočty byly prováděny pomocí sady programů Gaussian 09

a probíhaly za pomoci virtuální organizace Metacentrum na počítačových clusterech v Brně a v Jihlavě. Škálovací faktory pro simulovaná spektra byly určeny programem CDSpecTech<sup>7</sup>.

## Výsledky a diskuse

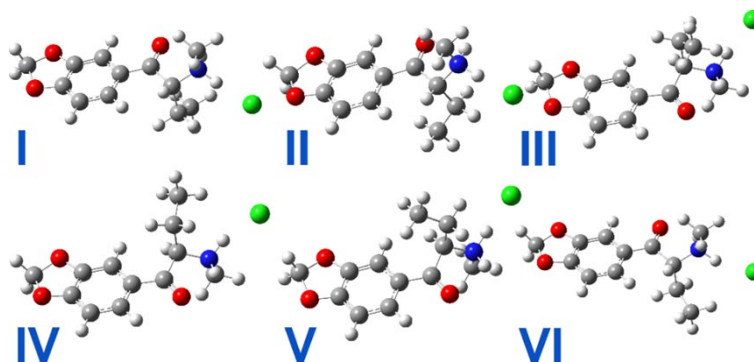
Pro teoretické simulace byl vybrán (*R*)-enantiomer hydrochloridu butylonu. Možné konformace této molekuly jsou určeny velikostí čtyř dihedrálních úhlů  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$  (obr. 1). Úhel  $\alpha_1$  byl systematicky měněn s krokem  $180^\circ$ , úhly  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$  pak s krokem  $120^\circ$ . Výsledkem bylo 54 startovních geometrií, které byly následně optimalizovány na úrovni B3LYP/6-31G(d).

Jelikož většina startovních struktur konvergovala ke stejné geometrii nebo jejich populace byla příliš nízká, konformační analýza odhalila šest stabilních konformerů (obr. 2). Reoptimalizace geometrií těchto konformerů proběhla na úrovni B3LYP/6-311++G(d,p). Na základě Boltzmannova rozdělení bylo následně určeno jejich relativní rovnovážné zastoupení (tab. I).

Následně byla simulována ECD, UV, VCD, IR a Ramanova spektra jednotlivých konformerů na B3LYP/6-311++G(d,p) úrovni a výsledná spektra byla vypočítána jako jejich vážený průměr. Simulovaná spektra byla škálována a porovnávána se spektry experimentálními (obr. 3, obr. 4 a obr. 5), přičemž u všech spektrometrických metod bylo dosaženo velmi dobré shody. Na základě porovnání simulovaného spektra ECD se spektrem experimentálním (obr. 3 vlevo) bylo možné jednoznačně určit absolutní konfiguraci butylonu 1 jako (*S*)-enantiomer a butylonu 2 jako (*R*)-enantiomer. Ze spekter jednotlivých konformerů (obr. 3 a obr. 4 nahoře) je patrná výrazně vyšší citlivost chiroptických metod k trojrozměrné struktuře molekul, než je běžné u metod konvenční absorpční IR a UV spektrometrie.

## Závěr

Pomocí DFT výpočtů na úrovni B3LYP/6-311++G(d,p) se zahrnutím vlivu rozpouštědla (vody) bylo nalezeno šest stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu. Na

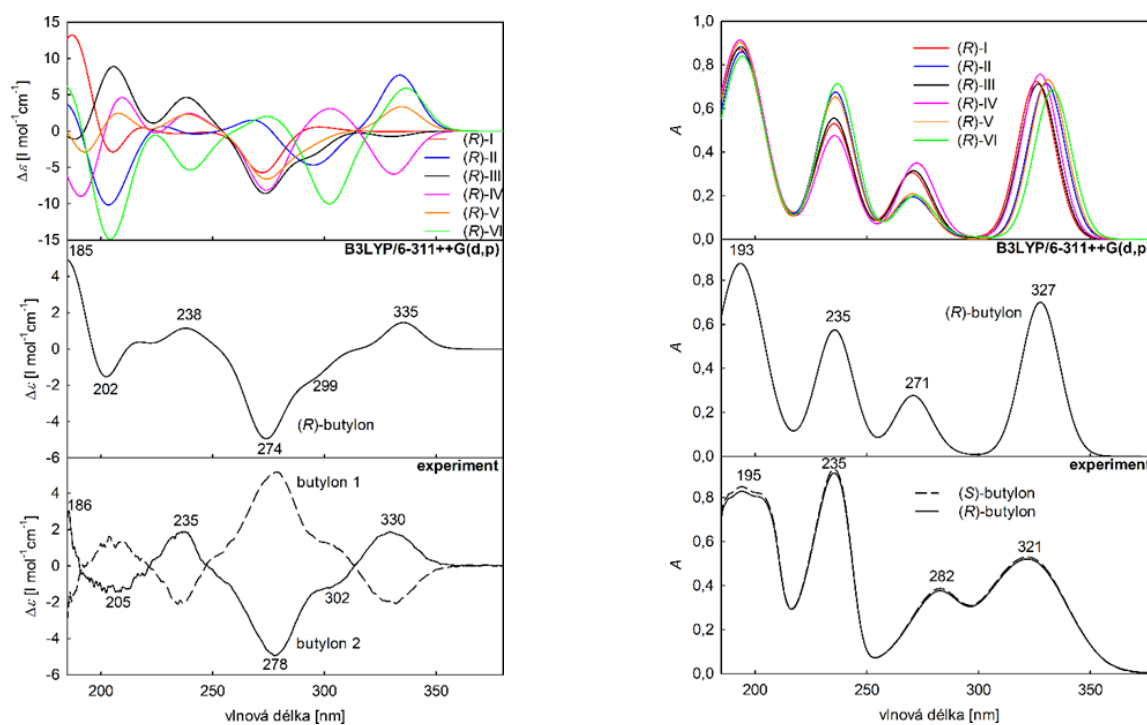


Obr. 2. Struktury šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu optimalizované na úrovni B3LYP/6-311++G(d,p). Struktury jsou vyobrazeny se stejnou orientací aromatického kruhu

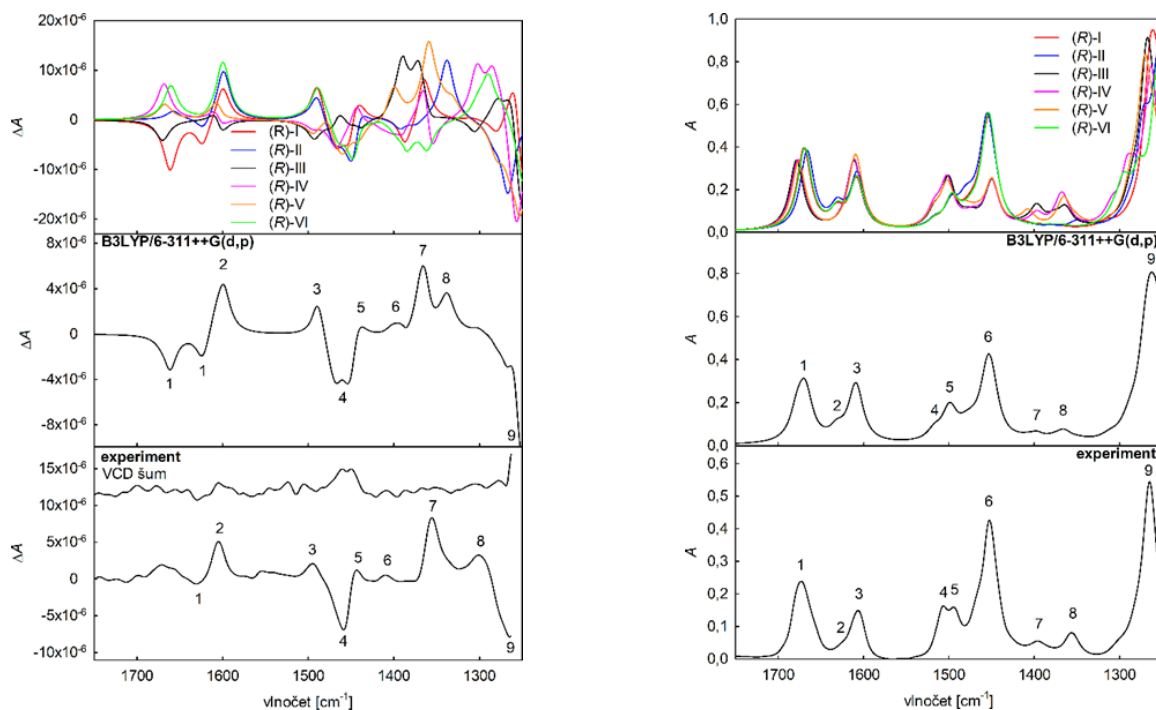
Tabulka I

Relativní Gibbsovy energie, relativní rovnovážné zastoupení a hodnoty dihedrálních úhlů  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$  šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu

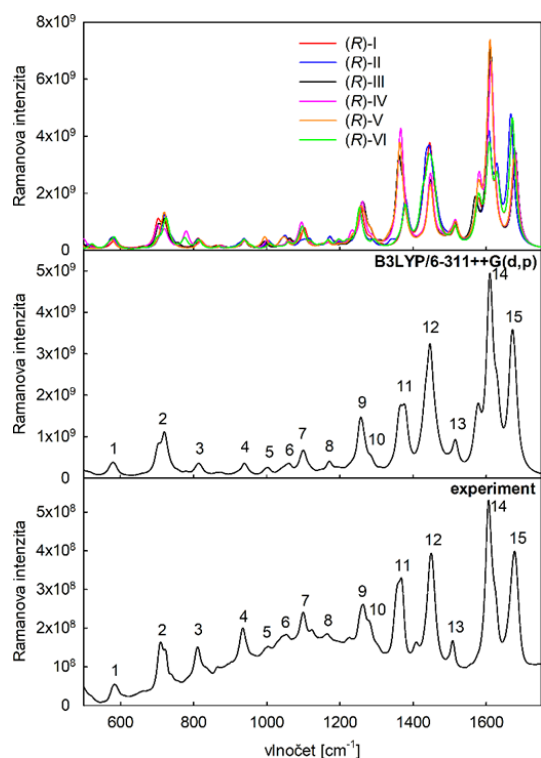
Konformer	$\Delta G$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Relativní zastoupení [%]	Dihedrální úhel [°]			
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$
I	0	37	8	-101	83	57
II	1,1	24	7	-83	73	-68
III	1,4	21	-170	-101	83	58
IV	3,3	10	-172	-101	89	-165
V	4,3	7	-168	-85	75	-67
VI	8,6	1	7	-98	85	-166



Obr. 3. Simulovaná spektra ECD (vlevo) a UV spektra (vpravo) šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu (nahore), jejich vážený průměr (uprostřed) a experimentální spektra butylonu 1 a butylonu 2 (dole)



Obr. 4. Simulovaná spektra VCD (vlevo) a IR spektra (vpravo) šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu (nahore), jejich vážený průměr (uprostřed) a experimentální spektrum (*R*)-butylonu (dole). V případě VCD je též prezentováno spektrum VCD šumu



Obr. 5. Simulovaná Ramanova spektra šesti stabilních konformerů hydrochloridu (*R*)-butylonu (nahore), jejich vážený průměr (uprostřed) a experimentální spektrum (*R*)-butylonu (dole)

základě Boltzmannova rozdělení pak bylo určeno jejich relativní rovnovážné zastoupení při laboratorní teplotě: 37 % (konformer I), 24 % (konformer II), 21 % (konformer III), 10 % (konformer IV), 7 % (konformer V) a 1 % (konformer VI). Následovala simulace ECD, UV, VCD, IR a Ramanových spekter jednotlivých konformerů. Pro všech pět spektrometrických metod bylo dosaženo velmi dobré shody mezi simulovanými a experimentálními spektry, která umožnila nejen detailní interpretaci pásů, ale i spolehlivé určení absolutní konfigurace a detailní popis trojrozměrné struktury butylonu v roztoku na úrovni blízké atomárnímu rozlišení. Pokud je nám známo, jde o první systematickou strukturní studii nových syntetických drog, která kombinuje metody chiroptické a vibrační spektrometrie *ab initio* výpočty.

Detailní znalost trojrozměrné struktury látek může do budoucna umožnit nejen podrobné studium vazebných vlastností, možnosti metabolismu, transportu či distribuce těchto látek v organismu, ale také vývoj antagonistických léčiv pro případy předávkování, závislosti či otravy.

*Tato práce byla realizována s podporou Ministerstva vnitra ČR (MV0/VI20172020056), za účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017 a 21-SVV/2018), Operačního programu Praha – Konk-*

*renceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/24503*

*a CZ.2.16/3.1.00/21537) a Národního programu udržitelnosti (NPU MŠMT – LO1601; 43760/2015).*

## LITERATURA

1. Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA): *Evropská zpráva o drogách 2017: Trendy a vývoj*. Úřad pro publikace Evropské unie, Lucemburk 2017.
2. European monitoring centre for drugs and drug addiction (EMCDDA): *The internet and drug markets, Insights 21*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2016.
3. López-Arnau R., Martínez-Clemente J., Pubill D., Escubedo E., Camarasa J.: *Br. J. Pharmacol.* 167, 407 (2012).
4. Chalmers J. M., Edwards H. G. M., Hargreaves M. D.: *Infrared and Raman spectroscopy in forensic science*. J. Wiley, Chichester 2012.
5. Berova N., Polavarapu P. L., Nakanishi K., Woody R. W.: *Comprehensive chiroptical spectroscopy: Applications in stereochemical analysis of synthetic compounds, natural products, and biomolecules*. J. Wiley, New Jersey 2012.
6. Urbanová M., Setnička V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
7. Covington C. L., Polavarapu P. L.: *Chirality* 29, 178 (2017).

**D. Spálovská<sup>a</sup>, F. Králík<sup>a</sup>, B. Jurásek<sup>b</sup>, M. Kohout<sup>c</sup>, L. Habartová<sup>a</sup>, M. Kuchař<sup>b</sup>, and V. Setnička<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>b</sup> Forensic Laboratory of Biologically Active Substances and Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>c</sup> Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague): **Structural Study of a New Psychoactive Substance Butylone in Solution Using Molecular Spectroscopy**

This work presents the first systematic study of a new psychoactive drug butylone. According to the density functional theory calculations at B3LYP/6-311++G(d,p) level, six stable conformers of (*R*)-butylone hydrochloride with the Boltzmann weights of 37 %, 24 %, 21 %, 10 %, 7 % and 1 % were found. After the simulation of ECD, UV, VCD, IR and Raman spectra, the comparison with the experimental spectra followed. Because of very good agreement between the experimental and the simulated spectra it was possible not only to assign the absolute configuration, but also describe precisely the molecular structure of butylone in solution.

Keywords: butylone, new psychoactive substances, *ab initio* calculations, molecular spectroscopy

## VYUŽITÍ SPEKTROMETRIE POVRCHEM ZESÍLENÉHO RAMANOVA ROZPTYLU PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH ALKALOIDŮ

OLEKSANDR VOLOCHANSKYI, MARIE ŠVECOVÁ a VADYM PROKOPEC

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
volochao@vscht.cz

Klíčová slova: Ramanova spektrometrie, SERS, atropin, pergolid

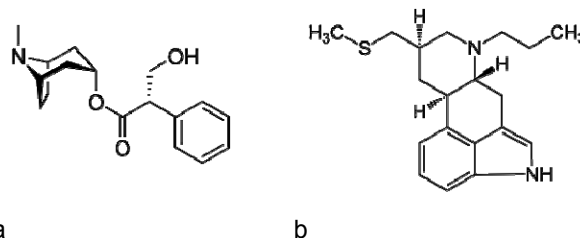
### Úvod

Alkaloidy představují různorodou skupinu látek většinou přírodní povahy, která patří mezi sekundární rostlinné metabolity. Mají výrazné účinky na živočišné i lidské organismy a mnohé z nich jsou v dnešním lékařství nepostradatelné. V současné době patří stopová detekce léků, léčivých přípravků, drog, jedů a dalších látek přírodní nebo syntetické povahy v těle člověka mezi významné oblasti zájmu medicíny, toxikologie a forenzního zkoumání. Z důvodu rychlého vývoje nanotechnologií, uplatnění ve forenzních i biologických vědách, umění a také potravinářství v současné době stoupá zájem o spektroskopii povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS)<sup>1</sup>.

V této práci byly studovány dva rostlinné alkaloidy – atropin a pergolid. Jejich strukturální vzorce jsou uvedeny na obr. 1. Atropin je tropanový alkaloid s lékařským potenciálem, který se v současnosti používá např. v očním lékařství, k léčbě bradykardie, slouží také jako protijed při otravách organofosfátovými insekticidy<sup>2,3</sup> a v neposlední řadě také k léčení Parkinsonovy choroby<sup>4,5</sup>. Pergolid je derivátem ergolinu a působí jako agonista na dopaminových a serotoninových receptorech, což indikuje jeho využití jako léčiva k potlačení Parkinsonovy choroby. Současně se ale používá ve veterinářství k léčení Cushingova syndromu u koní<sup>6</sup>. Tato práce je zaměřena na detekci a identifikaci těchto vybraných alkaloidů pomocí spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu s využitím velkoplošných kovových substrátů.

### Experimentální část

Pro zesílení signálu Ramanova rozptylu byly využity zlaté velkoplošné zdrsňené substráty na nano/mikro úrovni. Dané substráty byly připravovány katodickou redukcí na platinových terčích v elektrochemické lázni, kde jako anoda byl použit platinový terčík, jako katoda zlatý plíšek. Zdrojem stejnosměrného elektrického proudu byl BS 525 (Tesla, ČSR). Použitá proudová sekvence pro přípravu SERS-aktivního substrátu je uvedena v tab. I.



Obr. 1. Strukturální vzorce atropinu (a), pergolidu (b)

Elektrochemická zlatíci lázeň byla připravena přidáním 0,5 ml 0,1M roztoku  $H[AuCl_4]$  do 25 ml 1M roztoku  $NH_4Cl$ . Roztoky byly připraveny v ultračisté vodě. Lázeň obsahuje komplex chloridu diamminzlatitého  $[Au(NH_3)_2]^{3+}$ . Daný roztok je možné uchovávat za laboratorní teploty po dobu několika týdnů až měsíců, avšak na tmavém místě s minimálním přístupem světla.

Po vyndání z elektrochemické lázně byl platinový terčík se zlatým povrchem opláchnut ultračistou vodou, zředěnou kyselinou sírovou 1/4 (v/v) a opět ultračistou vodou. Následně byl připravený substrát ponořen minimálně na 20 hodin do methanolického roztoku jednoho z alkaloidů (atropin, pergolid). V této práci bylo studováno adsorpční chování analytů s ohledem na jejich koncentrace. Byla změřena menší sada koncentrací obou látek v rozsahu  $10^{-3} - 10^{-6}$  mol  $l^{-1}$ . Po vyndání z depozičního roztoku byl terčík s adsorbovaným analytem důkladně osušen v proudu dusíku a uchováván ve tmě při laboratorní teplotě.

Ramanova spektra byla měřena na disperzním Ramanově spektrometru Advantage NIR (DeltaNu, USA) s kamerovým nástavcem NuScope vybaveném diodovým laserem chlazeným Peltierovým článkem s excitační vlnovou délkou 785 nm. Nejvyšší výkon laseru byl 100 mW. Doba expozice zlatých substrátů byla 10 až 15 sekund s rozlišením  $8\text{ cm}^{-1}$ . Výsledné spektrum bylo získáváno průměrováním 15 akumulací na každém z 9 bodů na povrchu substrátu pro každou změřenou koncentraci. Rama-

Tabulka I

Proudová sekvence použitá při přípravě zlatých substrátů

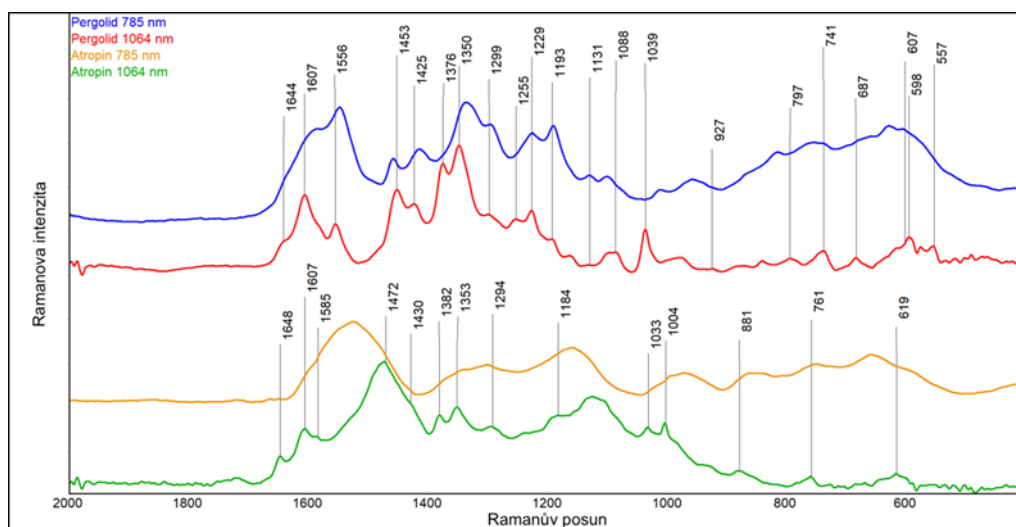
Zlaté substráty	
proud [mA]	čas [min]
5	5
10	5
15	5

nova spektra byla také měřena na FT-Ramanově spektrometru Equinox 55/S (Bruker Optik, Německo), který obsahuje Nd:YAG laser (Coherent, USA) o excitační vlnové délce 1064 nm. Součástí přístroje je detektor s germaniovou diodou chlazenou kapalným dusíkem. Každé spektrum na FT-spektrometru bylo získáno průměrováním 1024 scanů s rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

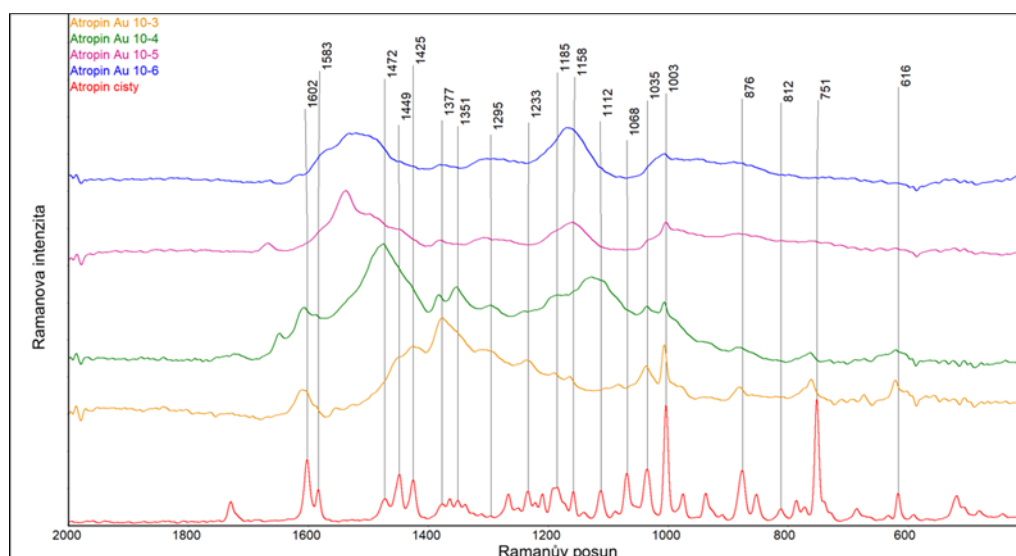
## Výsledky a diskuse

V Ramanových spektrech čistých látek byly přiřazeny charakteristické vibrační pásy na základě porovnání s tabulkami charakteristických vibrací. Následně byla SERS spektra zkoumaných analytů porovnávána se spektry čistých látek v pevném stavu za účelem identifikace charakteristických vibrací.

Na obr. 2 je uvedeno porovnání spekter atropinu a pergolidu získaných pomocí FT-Ramanova spektrometru s excitační vlnovou délkou 1064 nm a disperzního Rama-



Obr. 2. Porovnání spekter atropinu a pergolidu získaných na FT-Ramanově a disperzním spektrometru s různou excitační vlnovou délkou. Spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu



Obr. 3. Porovnání spektra čistého atropinu a SERS spekter měřených při různých koncentracích deponovaného roztoku získaných na FT-Ramanově spektrometru s excitační vlnovou délkou 1064 nm. Spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu

Tabulka II

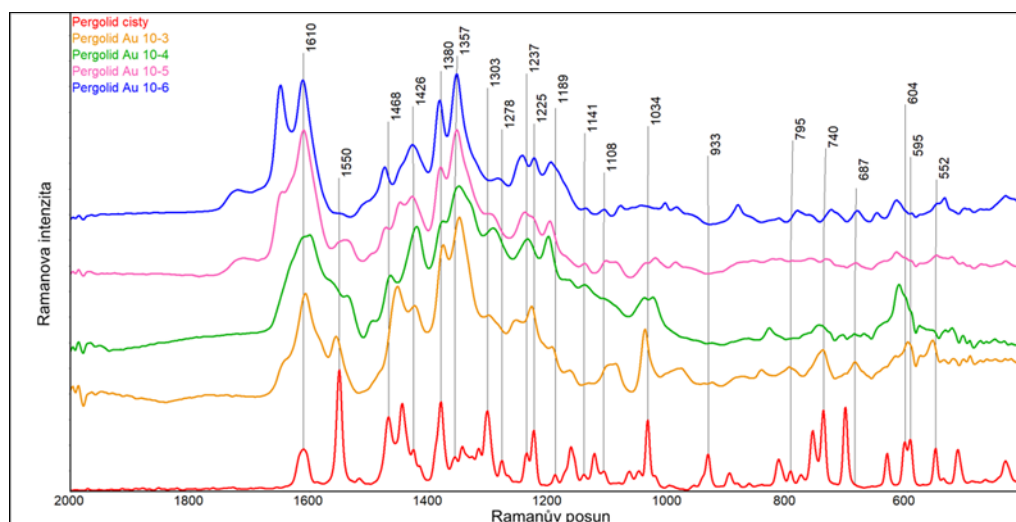
Přehled vybraných vlnočtů ( $\text{cm}^{-1}$ ) v Ramanových a SERS spektrech atropinu a pergolidu a jejich přiřazení k typu vibrace

Čistá látka [ $\text{cm}^{-1}$ ]	SERS [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Intenzita pásů	Přiřazení
Pergolid			
1610	1607	m-s	$\nu(\text{C}=\text{C})$ , Ar
1550	1556	v	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1426	1425	w	$\delta(\text{CH}_2)$
1189	1193	m	$\nu_{\text{as}}(\text{CNC})$ , $\text{R}_2\text{NH}$
1141	1131	m-w	$\nu_{\text{s}}(\text{CNC})$ , $\text{R}_2\text{NH}$
933	927	m-s	$\nu(\text{CCC})$
740	741	w, br	$\omega(\text{NH})$
595	598	m-s	$\gamma(\text{CC})$
Atropin			
1602	1607	m-s	$\nu(\text{C}=\text{C})$ , Ar
1583	1585	v	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1377	1382	w-m	$\delta_{\text{s}}(\text{CH})$
1351	1353	w	$\delta(\text{CH})$
1185	1184	m-s	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ , $\text{R-CO-O-R}'$
1003	1004	s-m	$\delta(\text{CH})$
876	881	s-m	$\nu(\text{CCO})$ , prim. (R-OH)
751	761	s	$\nu_{\text{as}}(\text{C-N-C})$

nova spektrometru s výstupní vlnovou délkou 785 nm. Obecně lepších výsledků z hlediska celkové spektrální odezvy a získané informace bylo dosaženo u spekter měřených na FT-spektrometru s maximem excitační vlnové délky 1064 nm. Z důvodu silného fluorescenčního pozadí nebylo možné použít spektra atropinu získaná prostřednictvím disperzního Ramanova spektrometru pro identifikaci. V případě pergolidu obě excitační vlnové délky byly vhodné pro získání relevantních výsledků za účelem identifikace látky. Avšak Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací umožňuje získat SERS spektra s větší intenzitou signálů odpovídajících jednotlivým vibračním přechodům oproti disperznímu spektrometru. Přehled vybraných charakteristických vibrací atropinu a pergolidu je uveden v tab. II.

Nejintenzivnější pásy v SERS spektrech pergolidu odpovídají valenčním vibracím aromatického kruhu a deformačním vibracím alifatických skupin. Nejintenzivnější spektrální pásy atropinu odpovídají valenčním vibracím aromatického kruhu, deformačním vibracím alifatických skupin a vibracím trojanového kruhu.

Atropin je příkladem analytu, jehož identifikace pomocí SERS je komplikovaná v důsledku uplatnění tzv. povrchových výběrových pravidel. Většina charakteristických vibrací čisté látky byla přiřazena konkrétním pásům ve spektrech, nicméně celkový průběh povrchem zesílených spekter je odlišný. V jednotlivých spektrech docházelo k zesílení různých pásů v závislosti na koncentraci měřené látky. Důvodem je nejspíše přeuspořádání molekuly na nanostrukturovaném povrchu SERS-substrátu a vznik povrchových komplexů s odlišnou geometrií vůči povrchovým speciím substrátů. Na obr. 3 jsou vidět dva intenzivní vibrační pásy ve spektru čisté látky kolem  $1000 \text{ cm}^{-1}$  a  $751 \text{ cm}^{-1}$ . Vibrační pás v okolí  $1000 \text{ cm}^{-1}$ , jenž se projevil ve všech měřeních koncentrací, odpoví-



Obr. 4. Porovnání spektra čistého pergolidu a jeho SERS spekter měřených s excitační vlnovou délkou 1064 nm. Spektra jsou zobrazena v „off set“ režimu

dá deformační rovinné vibraci kruhu. Další vibrační pás v okolí  $750\text{ cm}^{-1}$  je dán asymetrickou vibrací mezi atomy N a C tropanového kruhu, který je charakteristický pro atropin (viz obr. 1). Intenzita některých vibrací pozorovatelných v čisté látce s klesající koncentrací analytu také klesá (např. vibrační pás v okolí  $1600\text{ cm}^{-1}$ ).

Pergolid je výbornou látkou pro analýzu pomocí SERS, jelikož vibrační přechody ve spektrech mají relativně vysokou intenzitu pro obě excitační vlnové délky (viz obr. 2, obr. 4). Ve spektrech této látky stejně jako u atropinu docházelo ke fluktuacím intenzity jednotlivých vibrací v závislosti na koncentraci (např. vibrace kolem  $1035\text{ cm}^{-1}$ ). V nejnižších změřených koncentracích daného analytu se v okolí nad  $1700\text{ cm}^{-1}$  projevil vibrační pás, který není přítomen ve spektru čisté látky. Za zmínku také stojí valenční vibrace sekundárního aminu přítomného ve struktuře zkoumané látky kolem  $1190\text{ cm}^{-1}$ . Celkový průběh vibračních přechodů ve spektrech byl obdobný ve všech koncentracích, z toho lze usoudit, že pro pergolid nedocházelo k významným reorientacím molekul analytu na povrchu substrátu. Pergolid měl velmi dobrou spektrální odezvu i v nejnižší změřené koncentraci, tj.  $1\cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ . Předpokladem je, že limit detekce daného analytu lze snížit až na hodnotu  $1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-8}\text{ mol l}^{-1}$ .

## Závěr

Cílem této práce bylo naměřit povrchem zesílená Ramanova spektra vybraných alkaloidů (atropin, pergolid) do nejnižší detegovatelné koncentrace a přiřadit zesílené vibrační pásy v naměřených spektrech charakteristickým vibračním funkčním skupin na základě porovnání s literárními zdroji. Z experimentálních dat lze učinit několik závěrů. Bylo zjištěno, že pergolid a atropin jsou vhodné látky pro analýzu pomocí SERS spektroskopie, neboť je bylo možné identifikovat ve všech měřených koncentracích. Lepších výsledků měření, tzn. vyšší intenzity a průběhu charakteristických vibračních pásů měřených analytů, bylo dosaženo pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie s Fourierovou transformací s excitační vlnovou délkou  $1064\text{ nm}$ . Vibrační pásy ve spektrech analytů získaných pomocí disperzního spektrometru s excitační vlnovou délkou  $785\text{ nm}$  byly špatně rozlišitelné. Pergolid měl lepší spektrální odezvu ve všech změřených koncentracích oproti

atropinu a vyznačil se dobrou spektrální odezvou i ve své nejnižší změřené koncentraci, proto se předpokládá, že limit detekce této látky pomocí SERS může být snížen až na koncentraci  $1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-8}\text{ mol l}^{-1}$ . V SERS spektrech atropinu byla pozorována jeho reorientace vůči zesilujícímu povrchu a tvorba povrchových komplexů s různou geometrií.

## LITERATURA

1. Sharma B., Frontiera R. R., Henry A. I., Ringe E., Van Duyne R. P.: *Mater Today* 15, 16 (2012).
2. Shih T. M., McDonough J. H. Jr.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 147 (1999).
3. Wilhelm C. M., Snider T. H., Babin M. C., Jett D. A., Platoff G. E. Jr., Yeung D. T.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 281, 254 (2014).
4. Hyson H. C., Johnson A. M., Jog M.S.: *Mov. Disord.* 17, 1318 (2002).
5. Srivanitchapoom P., Pandey S., Hallett M.: *Parkinsonism Relat Disord.* 20, 1109 (2014).
6. Donaldson M. T., LaMonte B. H., Morresey P., Smith G., Beech J.: *J. Vet. Intern. Med.* 16, 742 (2002).

**O. Volochanskyi, M. Švecová, and V. Prokopec**  
(*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Use of Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy for the Detection and Identification of Medically Important Alkaloids**

Different excitation wavelengths ( $785\text{ nm}$  and  $1064\text{ nm}$ ) were used to find the appropriate conditions for the detection and identification of medically significant alkaloids – atropine and pergolide. Surface-enhanced Raman spectra of selected alkaloids were measured reaching the lowest detectable concentration. Identification was based on the assignment of enhanced characteristic vibrational bands and comparing them with specific vibrations of functional groups.

Keywords: Raman spectroscopy, SERS, atropine, pergolide



## IC STUDIUM RETENČNÍHO CHOVÁNÍ ANIONTŮ

LUKÁŠ ZIMA<sup>a</sup>, MARTA FARKOVÁ<sup>a</sup>  
a PŘEMYSL LUBAL<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
luksa.zima@seznam.cz

Klíčová slova: anionty, iontová chromatografie, optimalizace analytické metody

### Úvod

Iontová chromatografie (IC) se řadí do velké skupiny separačních metod, jejichž podstatou je rozdělení složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: mobilní a stacionární<sup>1,2</sup>. Látky jsou separovány vlivem jejich různě silných coulombovských interakcí se stacionární fází. Díky krátké době analýzy, vysoké účinnosti a selektivitě, výborné reprodukovatelnosti výsledků a nízkým nákladům na spotřební materiál našla IC široké uplatnění v průmyslu<sup>3</sup>, v klinických laboratořích (testování léčiv<sup>4</sup>), při kontrole potravin (detekce kyseliny fytové v potravinách<sup>5</sup>) a v neposlední řadě také pro analýzy vzorků životního prostředí (např. detekce dusičnanů a dusitanů ve vodách<sup>6</sup>).

Tato práce se zabývá studiem retenčního chování iontů a vlivu rozdílných podmínek (teplota, pH) na sepa-

rační účinnost. Tyto parametry jsou důležité pro optimalizaci experimentálních parametrů iontového chromatografu pro analýzu vybraných aniontů ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$  a  $\Gamma$ ). Optimalizovaná analytická metoda pak byla použita pro analýzu reálných vzorků vod.

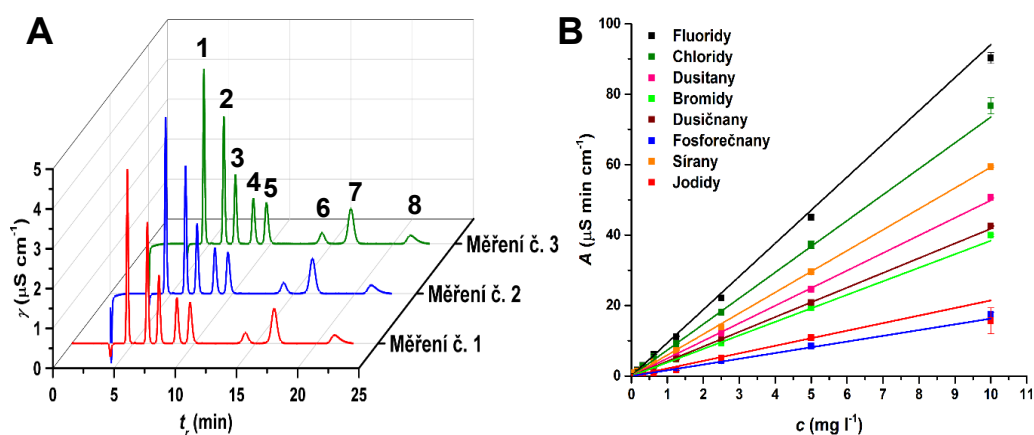
### Experimentální část

Pro přípravu roztoků byly použity tyto chemikálie: fluorid sodný, dusičnan draselný, jodid draselný (LACHEMA, ČR), chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA), dusitan draselný, heptahydrát fosforečnanu draselného (Merck, Německo), bromid sodný (Fluka, Švýcarsko), síran sodný (Lach-Ner, ČR). Pro přípravu mobilní fáze byla použita směs uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného (Sigma-Aldrich, USA) v molárním poměru 1,2:2,3, 1,8:1,7 a 2,3:1,2 ( $c_{carb} = 3,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Všechny chemikálie byly čistoty p. a.

Experimenty byly provedeny na iontovém chromatografu Metrohm 861 Advanced Compact IC (Metrohm, Švýcarsko) s vodivostní detekcí a anexovou kolonou Metrosep A Supp4 –250/4.0. Průtok  $F$  byl nastaven na  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Hodnoty pH byly měřeny pomocí pH metru MU 6100 L (VWR, USA).

### Výsledky a diskuse

Experimentální podmínky byly optimalizovány pro IC analýzu směsi aniontů ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$  a  $\Gamma$ ) v koncentračním rozpětí  $0,08\text{--}10 \text{ mg l}^{-1}$ , kdy jednotlivé roztoky byly připraveny postupným ředěním



Obr. 1. A) Chromatogramy směsi aniontů  $F^-$  (1),  $Cl^-$  (2),  $NO_2^-$  (3),  $Br^-$  (4),  $NO_3^-$  (5),  $PO_4^{3-}$  (6),  $SO_4^{2-}$  (7) a  $\Gamma$  (8), ( $c = 5 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $F = 1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $t = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $n = 3$ ). B) Kalibrační závislosti pro jednotlivé anionty ( $c = 0,08\text{--}10 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $F = 1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $t = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $n = 3$ ), chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám,  $A$  je plocha piku

Tabulka I  
Parametry kalibrace pro jednotlivé anionty

Parametr <sup>a</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	I <sup>-</sup>
$b$ [ $\mu\text{S min l cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]	9,02(3)	7,61(5)	5,02(2)	3,96(1)	4,23(1)	1,73(1)	5,92(2)	1,94(3)
$b$ [ $\mu\text{S min l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ]	0,1713 (5)	0,270(2)	0,2311 (9)	0,317(1)	0,2620 (8)	0,164(1)	0,569(2)	0,246(4)
$R^2$	0,9998	0,9991	0,9997	0,9997	0,9998	0,9986	0,9997	0,9941
LOD [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	4	3	9	20	20	100	9	200
LOQ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	10	10	30	50	50	400	30	600
LOD [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	0,2	0,2	0,5	0,9	0,8	6	0,5	9
LOQ [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	0,7	0,6	2	3	3	20	2	31

<sup>a</sup>  $b$  je směrnice,  $R^2$  je koeficient determinace, LOD je mez detekce a LOQ je mez stanovení

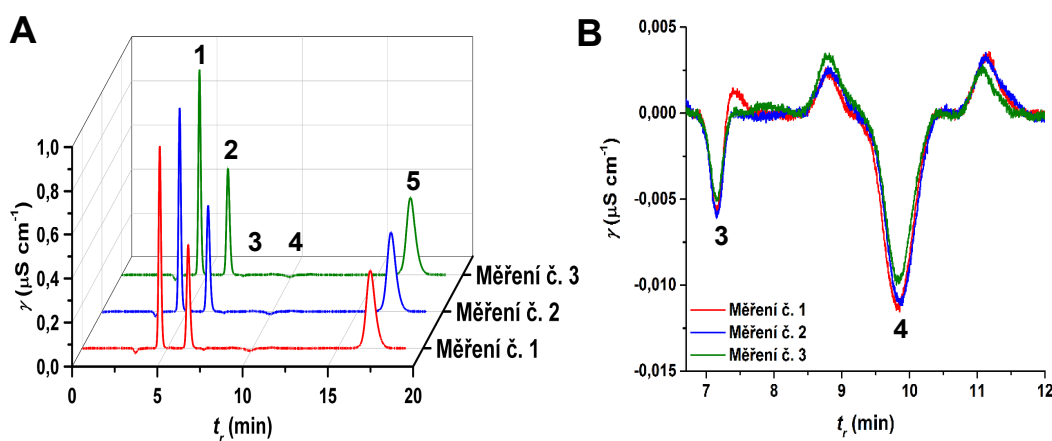
zásobního roztoku (koncentrace aniontů 10 mg l<sup>-1</sup>) v poměru 1:1. Analýza pro každý roztok byla opakována třikrát. Na obr. 1A je uveden příklad chromatogramů pro roztok o koncentraci aniontů 5 mg l<sup>-1</sup>. Obr. 1B zobrazuje kalibrační přímky pro jednotlivé anionty, z jejichž parametrů byly určeny citlivost stanovení (směrnice) a limity detekce a kvantifikace, které jsou uvedeny v tab. I.

Z dosažených výsledků je patrné, že IC analýzy poskytují vynikající reprodukovatelnost výsledků pro kalibrační roztoky o různých koncentracích. Vysoce reprodukovatelné byly i analýzy reálných vzorků (obr. 2 – analýza vzorku Dobré vody neperlivé), kdy dosažené výsledky jsou v dobré shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem (tab. II).

Klíčovou částí práce bylo studium vlivu experimentálních podmínek (pH, teplota) na retenční chování sledovaných aniontů. Bylo zjištěno, že vyšší pH výrazně snižuje

retenční čas  $t_r$ , především pro fosforečnany, sírany a jodidy, kdežto nižší pH jej výrazně zvyšuje. Hodnoty retenčních časů jsou rovněž ovlivňovány změnami teploty, kdy s rostoucí teplotou klesají. Nejvýraznější účinek měla teplota na retenční čas jodidového iontu, kdy došlo k posunu z 22 na 14 min při zvýšení teploty z 22 na 50 °C a zároveň byla pozorována změna pořadí pík některých iontů. Z hodnot retenčních časů aniontů a mrtvého času byly vypočteny retenční faktory  $k_A$ , jejichž závislost na pH a teplotě je zobrazena na obr. 3.

Je zřejmé, že s rostoucím pH a teplotou se retenční faktory pro všechny studované ionty snižují. Zatímco vliv pH má podobný trend pro všechny zkoumané anionty, pro teplotu to pozorováno nebylo. Hodnoty retenčních faktorů fluoridů, fosforečnanů a síranů se výrazně nemění v širokém teplotním rozsahu, pro jodidy způsobila vyšší teplota výrazný pokles jeho retence.

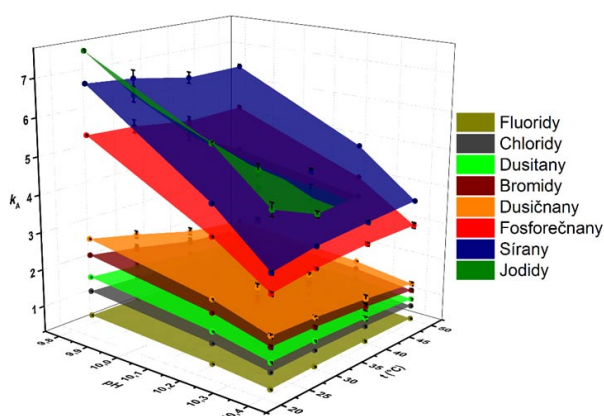


Obr. 2. A) Chromatogramy vzorku Dobrá voda neperlivá, F<sup>-</sup> (1), Cl<sup>-</sup> (2), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (3), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (4), SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (5), ( $F = 1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $t = 22 \text{ °C}$ ,  $n = 3$ ). B) Detailní část chromatogramů zobrazující píky dusitanů (3) a dusičnanů (4)

Tabulka II

Porovnání nalezených ( $c_A$ ) a deklarovaných ( $c_D$ ) hodnot koncentrací aniontů ve vzorku Dobrá voda neperlivá

Parametr <sup>a</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
$c_D$ [mg l <sup>-1</sup> ]	0,70	1,01	<0,01	<0,50	2,03
$c_A$ [mg l <sup>-1</sup> ]	1,07(7)	0,87 (1 <sub>5</sub> )	< LOQ	0,07 <sub>8</sub> (7 <sub>6</sub> )	2,32(9)
$s_r$ [%]	0,37	1,1	59	11	0,33

<sup>a</sup>  $s_r$  je relativní směrodatná odchylkaObr. 3. Závislost retenčního faktoru jednotlivých aniontů na změně pH a teploty ( $F = 1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 9,82\text{--}10,39$ ,  $t = 22\text{--}50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c = 10 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $n = 3$ ), chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám

## Závěr

V této práci byla prováděna separace vybraných aniontů ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\Gamma^-$ ) metodou iontové chromatografie, která vyniká vysokou reprodukovatelností i pro analýzy reálných vzorků. Také bylo zjištěno, že retenční chování aniontů výrazně závisí na pH a teplotě mobilní fáze, proto se pro zkrácení doby analýzy nabízí možnost modifikace metody použitím zvýšením pH a teploty, avšak může dojít k snížení rozlišení jednotlivých piků, např. v případě jodidu dochází k zastínění sírany nebo fosforečnany. Tyto výsledky mohou najít uplatnění v rutinní analýze vzorků životního prostředí (např. kontroly kvality pitné nebo povrchové vody), dále kontroly jakosti potravin, aj.

Práce byla finančně podpořena projekty MUNI/A/1237/2016 a CEITEC 2020 (LQ 1601).

## LITERATURA

- Haddad P. R., Jackson P. E.: *Ion chromatography: principles and applications*. New York, Elsevier 1990.
- Janos P.: *J. Chromatogr. A* 789, 3 (1997).
- Cummins P. M., Rochfort K. D., O'Connor B.F.: *Protein Chromatography: Methods and Protocols 1485*, 209 (2017).
- Cassidy S.A., Demarest C. W., Wright P.B., Zimmerman J. B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 255 (2004).
- Chen Q. C.: *J. Agr. Food Chem.* 52, 4604 (2004).
- Iskandarani Z., Pietrzyk D. J.: *Anal. Chem.* 54, 2601 (1982).

L. Zima, M. Farková, and P. Lubal (*Department of Chemistry, Faculty of Science & CEITEC, Masaryk University, Brno*): **Study of Retention Behavior of Anions Using Ion Chromatography**

This contribution deals with the study of retention behaviour of anions by ion chromatography. The mixtures of selected anions:  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\Gamma^-$  were analysed on the Metrohm 861 Advanced Compact IC ion chromatograph. The influence of temperature and pH on anion separation was studied. Under the optimal conditions, the calibration was performed, and real water samples were finally analysed.

Keywords: anions, ion chromatography, optimization of analytical method

## OBSAH

<i>M. Gargulák, D. Uhlířová, R. Kizek</i>	Využití spion nanočástic a uhlíkových nanotrubeček pro doručení doxorubicinu do nádorových buněk	273
<i>K. Kovaříková, J. Siegel, V. Švorčík</i>	Elektrochemická syntéza stříbrných nanočástic	278
<i>J. Kozánková, F. Králík, M. Kuchař, V. Setnička</i>	Identifikace padělků přípravků pro léčbu erektilní dysfunkce Ramanovou spektrometrií	283
<i>L. Michálková, J. Sýkora, V. Setnička</i>	Optimalizace postupů pro $^1\text{H}$ NMR analýzu metabolitů v krevní plazmě	287
<i>A. Motyčková, P. Řezanka</i>	Příprava a charakterizace křemičitých nanočástic pro stanovení pH	290
<i>D. Spálovská, F. Králík, B. Jurásek, M. Kohout, L. Habartová, M. Kuchař, V. Setnička</i>	Studium struktury nové syntetické drogy butylonu v roztoku metodami molekulové spektrometrie	293
<i>O. Volochanskyi, M. Švecová, V. Prokopec</i>	Využití spektrometrie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu pro detekci a identifikaci lékařsky významných alkaloidů	297
<i>L. Zima, M. Farková, P. Lubal</i>	IC studium retenčního chování aniontů	301

## AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Farková M. 301

Gargulák M. 273

Habartová L. 293

Jurásek B. 293

Kizek R. 273

Kohout M. 293

Kovaříková K. 278

Kozánková J. 283

Králík F. 293

Králík F. 283

Kuchař M. 283

Kuchař M. 293

Lubal P. 301

Michálková L. 287

Motyčková A. 290

Prokopec V. 297

Řezanka P. 290

Setnička V. 283, 287, 293

Siegel J. 278

Spálovská D. 293

Sýkora J. 287

Švecová M. 297

Švorčík V. 278

Uhlířová D. 273

Volochanskyi O. 297

Zima L. 301

**CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 16 (2018), 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: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, Z. Kolská, J. Masák, J. Podešva, V. Vyskočil; Webové stránky: V. Vyskočil • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) J. Barek, V. Vyskočil • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/ MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2018 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 10.5.2018.**