

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2018-510
(22) Přihlášeno: 27.09.2018
(40) Zveřejněno: 08.04.2020
(Věstník č. 15/2020)
(47) Uděleno: 22.04.2022
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 01.06.2022
(Věstník č. 22/2022)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 2 133 689 A1.

(73) Majitel patentu:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ
(72) Původce:
Ing. Lukáš Nejdrl, Ph.D., Brno, CZ
prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D., Brno, CZ
doc. Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D., Brno, CZ
(74) Zástupce:
Čermák a spol., JUDr. Karel Čermák, Ph.D.,
LL.M., Elišky Peškové 735/15, 150 00 Praha 5,
Smíchov

(54) Název vynálezu:
**Způsob identifikace přírodních vzorků,
zejména kapalných**

(57) Anotace:
Řešení se týká způsobu identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných, jehož podstata spočívá v tom, že po změření fluorescenčního spektra přírodního vzorku v neozařeném stavu UV zářením dále zahrnuje:
- ozáření známého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval,
- změření fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku,
- ozáření neznámého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval,
- změření fluorescenčního spektra ozářeného neznámého přírodního vzorku,
- porovnání změřeného fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku nebo fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku, který byl dříve uložen v databance informací, s fluorescenčním spektrem ozářeného neznámého přírodního vzorku,
- určení, zda je neznámý přírodní vzorek shodný nebo odlišný od známého přírodního vzorku.



Způsob identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu identifikace přírodních vzorků, a to zejména kapalných, tedy včetně zkapalněných, včetně biologických vzorků, takže spadá do oblasti analytické chemie. Využívá pro identifikaci přirozených spektrálních vlastností látek, tedy absorpce a emise záření, které se mění v závislosti na UV ozáření. Spektrálním rozbořením těchto vzniklých změn a chemických reakcí se získávají cenné informace o fyzikálních, chemických nebo biologických vlastnostech vzorku v krátkém čase a to bez nutnosti jakékoli předchozí složité přípravy zkoumaného přírodního vzorku.

15

Dosavadní stav techniky

Různorodé složení farmakologických přípravků, především léků, drogových směsí, tedy návykových a psychotropních látek, potravin, nápojů a biologických či klinických vzorků, například krevní plazma či moč, je základním problémem ztěžujícím jejich analýzu během jednotek až desítek minut. Ve většině případů musí před analýzou proběhnout extrakční, izolační a/nebo separační proces. Takto upravený vzorek je podroben instrumentální analýze, kterou provádí vysoce kvalifikovaná osoba pomocí složité a nákladné instrumentace. Celý proces, byť precizní, je časově a finančně náročný. Rychlá determinace farmaka může být klíčová při záchraně pacienta předávkovaného neznámým léčivem během převozu do nemocnice. Mimořádně důležité je odhalení vadné či padělané šarže léčiva před jeho distribucí. Schopnost během několika minut rozpoznat důležité vlastnosti zkoumané látky se jeví jako klíčová pro průmysl nebo potravinářství. Zejména se může jednat o kontrolu původu sudových vín nebo kontrolu kvality technologického zpracování ovocných šťáv a zeleninových extraktů popřípadě nápojů obsahující tyto šťávy a extrakty.

30

V posledních letech můžeme zaznamenat snahu zejména v medicínských oborech o metody využívající typické tvary neboli patterny spekter, které jsou někdy označovány jako takzvané „otisky prstů“. Tyto metody vycházejí zejména ze spektrální analýzy, například Ramanovy spektroskopie, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a hmotnostní spektrometrie klinických vzorků, přičemž se hodnotí tvary zaznamenaných spekter. Takto nelze přesně určit kvantitativní a kvalitativní zastoupení jednotlivých analytů ve vzorku, ale lze tato spektra přiřadit k celé řadě fyziologických nebo patologických stavů organismu. Tímto způsobem lze vytvářet knihovny typických spekter, a mezi sebou je porovnávat. Navrhované metody identifikace vlastností látek využívají a hodnotí typické tvary spekter, na základě kterých lze zkoumaný vzorek přesně určit nebo studovat.

40

Mezi základní fyzikálně-chemické metody používané při analýze léčiv, drog, nebo potravin patří chromatografické metody, tedy kapalinová nebo plynová chromatografie, elektroforéza případně spektrální metody, tedy spektrofotometrie, infračervená nebo Ramanova spektroskopie. Extrakce analytu představuje jeden z kritických kroků analytického stanovení vlastností látek. Jako extrakční činidla se používají polární i nepolární rozpouštědla. Z polárních rozpouštědel se nejčastěji jedná o acetonitril, ethanol a methanol. Jedna z nejdůležitějších podmínek pro dosažení vysoké účinnosti extrakce je volba vhodného pH. Hodnota pH extrakčního činidla má vliv na rozpustnost a/nebo ionizaci analytu. Dalším krokem v analýze může být derivatizace vzorku. Derivatizační reakce vedou k tvorbě detekovatelných derivátů, zvýšení citlivosti a selektivity, zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec. Obecně platí, že spektroskopické metody mají menší nároky na přípravu vzorků v porovnání s chromatografickými metodami. Například Ramanova spektroskopie je jednou z metod vibrační molekulové spektroskopie, která se používá k chemické identifikaci analytů obsažených ve vzorku. Metoda využívá tak zvaný Ramanův jev neboli Ramanův rozptyl, ke kterému dochází při interakci laserového paprsku s elektrony zkoumaného vzorku. Vzhledem

55

k tomu, že každá látka vykazuje charakteristický posun vlnové délky, je možné tento jev využít k nedestruktivní identifikaci chemického složení vzorku, a to pomocí vytvoření souboru spekter typických pro dané analyty. Nevýhodou Ramanova rozptylu je jeho poměrně slabá intenzita zejména ve srovnání s absorpcí nebo emisí záření. Je tedy nutná značná čistota analyzovaného vzorku. Jakákoli fluorescenční příměs nebo případná fotochemická reakce znemožňuje provádění analýzy.

Důležitou metodou, která využívá soubor typických spekter, pro identifikaci analytu je také hmotnostní spektrometrie. Tato metoda může být využita buď samostatně, nebo v kombinaci se separační technikou. Samostatné použití této metody pro určení vlastností látek bez předchozí separace vzorků může být problematické, protože složky směsi ionizované laserem a míra ionizace souvisí s řadou faktorů. Jedním z nich je například druh matrice, která se ke vzorku přidává v rámci analýzy. Ta absorbuje většinu energie ionizačního laseru a předá ji zkoumanému vzorku. Vzhledem k tomu, že operátor nezná složení vzorku, může vlivem nesprávně zvolené matrice dojít ke špatné nebo částečné ionizaci vzorku, což má za následek zkreslení nebo znemožnění analýzy.

Podstata vynálezu

Podstata způsobu identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných, podle vynálezu spočívá v tom, že po změření fluorescenčního spektra přírodního vzorku v neozářeném stavu UV zářením dále zahrnuje ozáření známého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval, změření fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku, ozáření neznámého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval, změření fluorescenčního spektra ozářeného neznámého přírodního vzorku, porovnání změřeného fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku nebo fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku, který byl dříve uložen v databance informací, s fluorescenčním spektrem ozářeného neznámého přírodního vzorku a určení, zda je neznámý přírodní vzorek shodný nebo odlišný od známého přírodního vzorku.

Přírodní vzorek obsahuje kovové ionty, zejména některé z Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2+} nebo Cd^{2+} či disulfidické vazby nebo thiolovou skupinu, zejména některé z cystein, homocystein, glutathion oxidovaný, glutathion redukovaný, S-Adenosyl-L-homocystein, S-Adenosyl-methionin, koenzym A, cystamin, acetylcystein, gamma-L-Glutamyl-L-cystein.

Spektrální změny vyvolané UV ozářením se projeví změnou absorpčního nebo emisního nebo excitačního spektra anebo jako nárůst či pokles absorpčního, emisního či excitačního signálu. Tyto změny souvisejí zejména s tvorbou kvantových nanokrystalů, nebo změnou tvorby radikálů, nebo změnou degradace násobných chemických vazeb, nebo změnou fotovybělování, případně kombinací těchto změn.

Předmět vynálezu představuje novou, unikátní a jedinečnou fluorescenční spektroskopickou metodu, která na základě typických spekter dokáže určit či rozlišit jednotlivé vzorky nebo jejich vlastnosti.

Velkou výhodou jsou nízké nároky na přípravu vzorku. Vzorek je nutno pouze alespoň částečně rozpustit v destilované vodě nebo jiném rozpouštědle, například v dimethylsulfoxidu nebo smíchat s vhodným pufrovacím roztokem. Metoda nemá speciální nároky na kvalitu vzorků, proto je univerzální a lze ji využít v průmyslu, zemědělství, potravinářství, farmacii a výzkumných pracovištích.

Mimořádnou výhodou je rychlost analýzy vzorků. Celou proceduru, včetně přípravy vzorku, analýzy a vyhodnocení lze uskutečnit do několika minut. Například analýza léčiv nepřesahuje 10 min.

Metoda nevyžaduje speciální úpravu analytických přístrojů a je kompatibilní s přístroji využívajícími pro svůj chod ultrafialové a viditelné záření.

- 5 Jednoduchost provádění analýz dovoluje využít kufříkové nebo ruční analyzátory, což umožňuje provádět analýzy všude tam, kde je zapotřebí.

Objasnění výkresů

- 10 Výsledky příkladných provedení a způsob identifikace přírodních vzorků podle vynálezu jsou znázorněny na přiložených obrázcích, kde obr. 1 schematicky znázorňuje podstatu metody podle vynálezu, kde vztahová značka 1 znázorňuje zdroj ultrafialového záření, které je definováno dobou trvání ozařování, což znázorňuje vztahová značka 2, vlnovou délkou, což znázorňuje vztahová značka 3 a jeho intenzitou působící na studovaný kapalný vzorek, který znázorňuje vztahová značka 4 a kde vztahová značka 5 znázorňuje zkoumaný vzorek, kde jsou vyvolány spektrální změny, které jsou způsobeny tvorbou fluorescenčních nanokrystalů podle vztahové značky 6, tvorbu volných radikálů, které znázorňuje vztahová značka 7, degradaci chemických vazeb, které znázorňuje vztahová značka 8 a fotovybělování, které znázorňuje vztahová značka 9, přičemž uvedené změny lze zaznamenat jako absorpční, fluorescenční a excitační spektra, jak znázorňuje vztahová značka 10, obr. 2 znázorňuje excitační spektra v rozsahu $\lambda_{\text{ex}} = 230$ až 470 nm a $\lambda_{\text{em}} = 500$ nm vybraných farmakologických přípravků, v tomto případě antihistaminik, rozpuštěných v destilované vodě (20 mg/ml): v případě vzorku A se jedná o přípravek Dithiaden – výrobce Zentiva, v případě vzorku B se jedná o přípravek Zenaro – výrobce Zentiva, v případě vzorku C se jedná o přípravek Aerius – výrobce SP Labo N.Va v případě vzorku D se jedná o přípravek Dasselta – výrobce Krka d.d. Křivka pod označením 1 představuje excitační spektrum vzorku po 6ti minutovém ozaření v UV ($\lambda_{\text{em}} = 254$ nm) transiluminátoru, křivka pod označením 2 představuje excitační spektrum vzorku v nativním stavu, tedy bez ozaření UV zářením. Data byla pořízena fluorescenčním analyzátozem Infinite M200 pro. Vzorky byly ozařeny a analyzovány po 100 μl v UV transparentní 96 jamkové destičce, obr. 3 znázorňuje emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 250$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 280$ až 600 nm) vybraných džusů, kde vzorek označený A představuje pomerančový džus od společnosti BASIC, označený výrobcem jako 100% koncentrát, vzorek označený B představuje grepový džus od stejné společnosti a vzorek označený C představuje jablečný džus, rovněž od stejné společnosti. Křivka 1 představuje výsledek, kdy 50 μl vzorku bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7, křivka 2 představuje výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:1 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7, křivka 3 představuje výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:2 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7 a křivka 4 představuje výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:4 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7. Vzorky byly ozařovány UV transiluminátorem ($\lambda_{\text{em}} = 254$ nm) po 100 μl v UV transparentní 96 jamkové destičce po dobu 10 minut. Data byla pořízena fluorescenčním analyzátozem Infinite M200 pro., obr. 4 znázorňuje emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 250$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 280$ až 600 nm) vybraných odrůdových vín, kde vzorek A představuje ryzlink rýnský, vzorek B představuje ryzlink vlašský, vzorek C představuje tramín červený a vzorek D představuje sauvignon. Křivka 1 uvádí výsledek, kdy 50 μl vzorku bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7, křivka 2 uvádí výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:1 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7, křivka 3 uvádí výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:2 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7 a křivka 4 uvádí výsledek, kdy 50 μl vzorku ředěného 1:4 destilovanou vodou bylo smícháno s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7. Vzorky byly ozařovány UV transiluminátorem ($\lambda_{\text{em}} = 254$ nm) po 100 μl v UV transparentní 96 jamkové destičce po dobu 15 minut. Data byla pořízena fluorescenčním analyzátozem Infinite M200 pro., a obr. 5 znázorňuje excitační spektra v rozsahu $\lambda_{\text{ex}} 230$ až 370 nm a $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm vybraných extraktů odrůd rajčat, kde vzorek A představuje odrůdu Sassari, vzorek B představuje odrůdu Grammy a vzorek C představuje odrůdu Tirrenico. Křivka 1 uvádí excitační spektrum vzorku po 20ti minutovém ozaření v UV ($\lambda_{\text{em}} = 254$ nm) transiluminátoru, křivka 2 uvádí excitační spektrum vzorku v nativním stavu, tedy neozařený UV zářením. Data byla pořízena

fluorescenčním analyzátozem Infinite M200 pro. Vzorky byly ozářeny a analyzovány po 100 μl v UV transparentní 96 jamkové destičce. Extrakty, tedy kousky rajčat byly lisovány a přefiltrovány přes 25 mm Syringe filter s 0.2 μm membránou, obr. 6 představuje porovnání vzorku moči zdravého člověka a pacienta s diagnostikovaným karcinomem prostaty. Vzorek moči byl naředěn vždy 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8 s fosfátovým pufrům pH 7 o koncentraci 0,1 mol/litr a napipetován do UV transparentní 96 jamkové destičky po 100 μl . Poté byla zaznamenána intenzita fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) vzorků bez UV ozáření a po 20 minutách ozáření UV transiluminátorem ($\lambda_{\text{em}} = 254 \text{ nm}$). Grafy označené A představují intenzitu fluorescence kontrolního vzoru moči zdravého člověka před ozáření (tečkované sloupce) a po UV expozici (křížem šrafované sloupce) grafy označené B představují podíl intenzity fluorescence (kostičkové sloupce) kontrolního vzorku po a před UV expozicí, přičemž vyjadřují signifikantně rostoucí trend, grafy označené C představují intenzitu fluorescence vzorku moči pacienta s karcinomem prostaty před ozáření (tečkované sloupce) a po UV expozici (křížem šrafované sloupce) a grafy označené D představují podíl intenzity fluorescence (kostičkové sloupce) vzorku moči pacienta s karcinomem prostaty po a před UV expozicí, kde je patrný nesignifikantně rostoucí trend. Data byla pořízena fluorescenčním analyzátozem Infinite M200 pro., obr. 7 znázorňuje schématické provedení vnitrobuněčné analýzy pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a fluorescenčního mikroskopu, kde vztahová značka 11 představuje 10 μl vzorku, který je nakápnut na podložní sklíčko 12, číslo 13 představuje vzorek, který je překryt z důvodu odstranění ambientního osvětlení stínícím obalem, číslo 14 představuje objektiv fluorescenčního mikroskopu zaostřený na konfokální objem (typicky 0,5 fL) do vybrané části studovaného vzorku 15, číslo 16 představuje excitační laser ($\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$), který v průběhu analýzy indukuje ve vzorku fluorescenční kvantové tečky, které jsou schématicky vyobrazené pod číslem 17 a vztahová značka 18 představuje detektor a obr. 8 se vztahovou značkou 19 znázorňuje reálné foto 2% agaróзовého gelu, který obsahoval zinek a cystein, zaznamenané fluorescenčním mikroskopem, kde došlo k vybělení neboli ztrátě autofluorescence, což znázorňuje vztahová značka 20 a k vytvoření fluorescenčních nanokrystalů, což znázorňuje vztahová značka 21. Vztahová značka 22 znázorňuje reálné foto jedné buňky pořízené fluorescenčním mikroskopem, kde došlo k vytvoření fluorescenčních nanokrystalů, které jsou označeny vztahovými značkami 23 a 24, jejichž spektrální rozbor poskytuje informace o daném místě v buňce. Fluorescenční nanokrystaly označené vztahovou značkou 21, 23 a 24 vznikly v průběhu analýzy excitačním laserem o $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$.

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález je dále blíže popsán pomocí příkladů provedení, které však žádným způsobem neomezují jiná možná provedení v rozsahu patentových nároků. Schematicky je způsob identifikace látek podle vynálezu znázorněn na obr. 1.

V prvním kroku je kapalný vzorek analyzován v nativním stavu, tedy neozařený UV. Poté je vystaven UV záření o přesně definované intenzitě po dobu několika vteřin nebo minut. Doba ozařování závisí na intenzitě UV, vlnové délce a objemu vzorku. UV záření vyvolá chemické změny ve vzorku, které se promítnou jako spektrální změny specifické pro dané složení. Fotony UV záření mají vysokou energii a mohou proto štěpit chemické vazby. Například chlor za běžných podmínek nereaguje s alkany. Po ozáření UV začne reagovat, protože UV záření štěpí chemickou vazbu v molekule Cl_2 , která se rozpadá na extrémně reaktivní radikály, ty pak reagují i s inertními alkany. Přítomnost iontů kovů, typicky Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2+} , Cd^{2+} a látek obsahujících disulfidickou vazbu (-S-S-) a nebo thiolovou skupinu (-SH), zejména cystein, homocystein, glutathion, S-Adenosyl-L-homocystein, S-Adenosyl-methionin, koenzym A, cystamin, acetylcystein, gamma-L-Glutamyl-L-cystein ve vzorku po interakci s UV způsobí tvorbu celé řady nano a mikro částic, komplexů nebo klastrů, které významným způsobem ovlivňují spektrální vlastnosti studované matrice. Koncentrace těchto prekurzorů, tedy iontů kovů a -SH, -S-S- obsahující sloučeniny, nutných pro vznik klastrů se pohybuje v rozsahu 1 nM až 3 mM. Rozbor spektrálních signálů takto vzniklých klastrů poskytuje cenné informace o fyzikálních, chemických nebo biologických vlastnostech vzorku. Hodnotí se tedy změny absorpčních a fluorescenčních,

tedy excitačních nebo emisních signálů, jejich tvar, průběh, intenzita, doba života fluorescence, fluorescenční anizotropie, photobleaching (vybělování), difuzní koeficienty fluoroforu před a po ozáření UV.

- 5 Dojde-li ke změně vzorku přidáním další komponenty, k záměně za jinou, anebo změně typu a koncentrace thiolových sloučenin (tj. -SH, -S-S- obsahující sloučeniny) nebo iontů kovů popisovaná metoda tuto změnu zachytí. Stejně tak metoda zachytí přirozené rozdíly ve vzorcích, například odrůdy rostlin nebo klinické změny vyvolané onemocněním.

- 10 Zamýšlené metodické postupy mohou být implementovány do klasického stolního spektrometru nebo dokonce do podoby ručního zařízení, což umožní provádět analýzy přímo na místě.

- Jako zdroj UV záření lze typicky využít stolní transiluminátor ($\lambda_{em} = 254 \text{ nm}$) nebo UV laserový paprsek ($\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$). Lze také použít i jiné zdroje světla o vhodné vlnové délce jako například elektroluminiscenční diody, LED či lampy. Změny vyvolané UV zářičem jsou typické pro chemické složení vzorku a lze je monitorovat běžnou spektroskopickou instrumentací, tedy spektrofotometrií, fluorescenční spektroskopií, korelační fluorescenční spektroskopií a podobně.

Příklad 1

- 20 Zkoumanou látkou je v tomto případě chemický přípravek, kterým je lék. Ten je nejdříve homogenizován na jemnou frakci drcením a navážen v daném případě na 10 až 20 mg. K navážce léku se přidá 1 ml destilované vody anebo jiného rozpouštědla, například dimethylsulfoxidu. Vzorek je minutu intenzivně míchán či protřepáván a po rozpuštění, alespoň částečném se 50 μl vzniklé suspenze smíchá s 50 μl 0,1 mol/litr fosfátového pufru pH 7 a nebo destilované vody v UV transparentní mikrotitrační destičce nebo spektroskopické kyvetě. Vzorek je nejdříve analyzován v nativním stavu pomocí spektroskopických metod absorpce excitace a/nebo emise záření. Příkladem může být absorpční sken v rozsahu 230 až 800 nm anebo excitační sken při $\lambda_{ex} = 230$ až 470 nm a $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ (popřípadě 450 nm). Poté je destička se vzorkem vystavena 6 minut UV záření ($\lambda_{em} = 254 \text{ nm}$) v transiluminátoru nebo pomocí jiného zdroje záření. Poté se spektrální analýza zopakuje za stejných parametrů. Výsledkem analýzy jsou unikátní spektra, která jsou typická pro daný analyt respektive pro složení vzorku.

- 35 Tento postup a jeho výsledky korespondují s obr. 2. Analogicky se postupuje i u jiných kapalných, rozpuštěných či suspenzních vzorků. Tímto způsobem lze provádět profilaci chemických směsí za účelem jejich ztotožnění.

Příklad 2

- 40 Zkoumanou látkou je v tomto případě ovocný nápoj nebo víno. Nápoj se naředí na čtyři koncentrace půlovým ředěním destilovanou vodou. Poté je smíchán v poměru 1:1 s 0,1 mol/litr fosfátovým pufrem pH 7 v mikrotitrační destičce nebo spektroskopické kyvetě. Destička je exponována 10 až 15 minut UV zářením ($\lambda_{em} = 254 \text{ nm}$) v transiluminátoru nebo pomocí jiného zdroje záření. Poté jsou zaznamenána emisní či excitační spektra. Příkladem může být emisní sken při $\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 280$ až 800 nm. Zaznamenaná emisní či excitační spektra jsou typická pro daný nápoj.

- 50 Tento postup a jeho výsledky korespondují s obr. 3 a 4. Tímto způsobem lze přesně determinovat, z jakého ovoce šťáva pochází, anebo jestli byla dodržena potřebná technologie při zpracování, skladování, odstranění slupky před lisováním, nebo podobnými operacemi v rámci přípravy nápoje.

Příklad 3

- 55 Zkoumaným předmětem jsou zeleninové nebo ovocné extrakty. Extrakt nebo šťáva vzniklá

- lisováním anebo výluhem z ovoce nebo zeleniny je přefiltrována z důvodu odstranění dužiny anebo jiných nečistot a pevné frakce. Poté je vzorek smíchán v poměru 1:1 s 0,1 mol/litr fosfátovým pufrům pH 7 v mikrotitrační destičce nebo spektroskopické kyvetě. Vzorek je nejdříve analyzován v nativním stavu, tedy bez UV ozáření pomocí spektroskopických metod, tedy absorpce, excitace a emise záření. Příkladem může být excitační sken při $\lambda_{\text{ex}} = 230$ až 370 nm a $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm. Poté je destička se vzorkem vystavena po dobu 20 minut UV záření ($\lambda_{\text{em}} = 254$ nm) v transiluminátoru nebo v jiném UV zařízení. Poté se spektrální analýza zopakuje za stejných parametrů. Výsledkem analýzy jsou unikátní spektra, která jsou typická pro danou odrůdu ovoce anebo zeleniny.
- 10 Tento postup a jeho výsledky korespondují s obr. 5. Tímto způsobem lze rozpoznat a identifikovat různé odrůdy zeleniny a ovoce.

Příklad 4

- 15 Zkoumaným předmětem jsou klinické vzorky. Stejně jako v předchozích příkladech lze postupovat i s biologickými či klinickými vzorky, jakými jsou obvykle krevní plazma anebo moč. U těchto vzorků lze popsanou metodou studovat fyziologické nebo patologické stavy organismu asociované s ionty kovů a -S-S-, -SH molekulami. Změna koncentrace iontů kovů a/nebo -S-S-, -SH sloučenin ve studovaném vzorku se projeví změnou emisního nebo excitačního spektra tvaru nebo jako nárůst
20 či pokles emisního nebo excitačního signálu při konkrétní vlnové délce (např. $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm) po UV ozáření.

- Tento postup a jeho výsledky korespondují s obr. 6. Tímto způsobem lze provádět kontrolní testy a odhalovat tak vážná onemocnění v raném stádiu.

25

Příklad 5

- V tomto případě je zkoumání zaměřeno na lokalizaci a identifikaci buněčných procesů. Buněčná linie popřípadě histologický řez je umístěna či nakápnuta 1 až 50 μl na podložní sklíčko a vložena
30 do fluorescenčního mikroskopu. Pomocí mikroskopu a příslušného softwaru jsou vybrána místa v buňce, která mají být analyzována. Dále se vybere laser s vhodnou vlnovou délkou (typicky $\lambda_{\text{em}} = 385$ nm), který po dobu několika vteřin popřípadě minut, nejčastěji v rozsahu 1 až 90 vteřin indukuje v místě analýzy vznik klastrů. Tyto klastry se vyhodnocují v reálném čase anebo po ukončení analýzy. Vzniklé klastry jsou typické pro dané místo v buňce, pro jeho složení a pro
35 biologické či chemické děje v něm probíhající. Příklad průběhu analýzy je uveden na obr. 7.

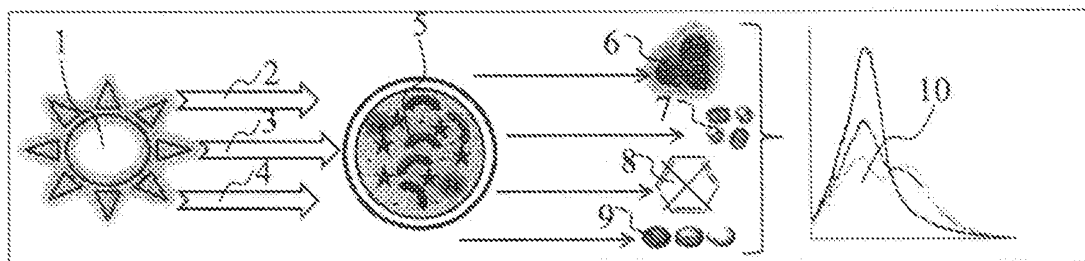
Průmyslová využitelnost

- 40 Uplatnění metody podle vynálezu lze očekávat v oblastech, kde je potřeba monitorovat složení farmakologických prostředků, kvalitu a složení nápojů či potravin či diagnostikovat vážná onemocnění z tělních tekutin nebo na úrovni histologického řezu nebo vzorků buněk. Metoda umožňuje například odhalovat padělání, nebo zjišťovat nelegální aditiva ve směsích, například
45 léků, potravin, a mnoha jiných druhů látek. Podobně lze metodu využít při odhalování celé řady přestupků spojených s paděláním potravin, nebo nedodržováním dané technologie nebo receptury při výrobě nápojů a potravin. Dále se může jednat o identifikaci léčiva záchrannou službou, během převozu pacienta do nemocnice. Nemocnicím nebo výzkumným pracovištím metoda poskytne levný a rychlý screeningový nástroj pro studium klinických vzorků. V případě využití pokročilých spektroskopických technik, jako je fluorescenční korelační spektroskopie, lze uvedenou metodou
50 lokalizovat či monitorovat buněčné procesy v rámci jedné buňky. Zamýšlená metoda je kompatibilní se všemi spektroskopickými metodami využívající elektromagnetické vlnění v klasickém rozsahu.

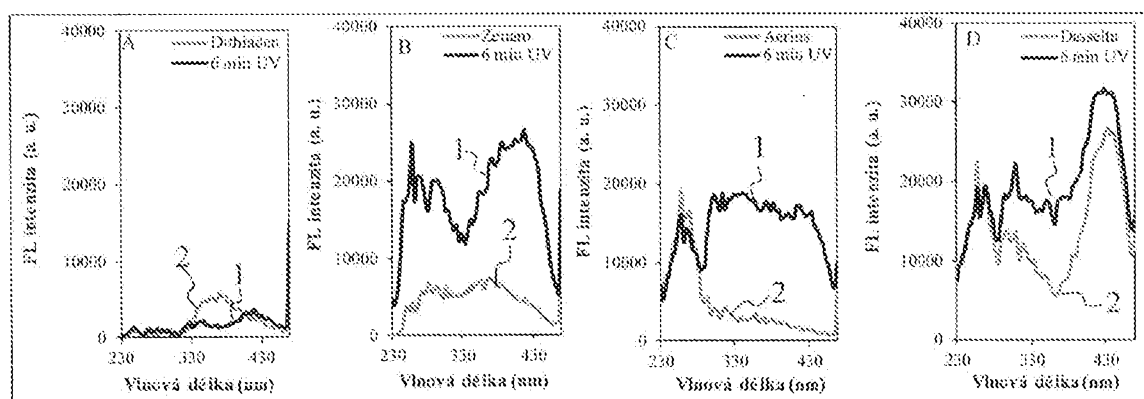
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných, **vyznačující se tím**, že po změření fluorescenčního spektra přírodního vzorku v neozářeném stavu UV zářením dále zahrnuje
- 5 - ozáření známého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval,
- změření fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku,
- ozáření neznámého přírodního vzorku UV zářením o vlnové délce 250 až 400 nm, po předem stanovený časový interval,
- 10 - změření fluorescenčního spektra ozářeného neznámého přírodního vzorku,
- porovnání změřeného fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku nebo fluorescenčního spektra ozářeného známého přírodního vzorku, který byl dříve uložen v databance informací, s fluorescenčním spektrem ozářeného neznámého přírodního vzorku,
- určení, zda je neznámý přírodní vzorek shodný nebo odlišný od známého přírodního vzorku.
- 15 2. Způsob identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že přírodní vzorek obsahuje kovové ionty zejména některé z Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2+} nebo Cd^{2+} .
3. Způsob identifikace přírodních vzorků, zejména kapalných, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že přírodní vzorek obsahuje thiolovou skupinu zejména některé z: cystein, homocystein, glutathion oxidovaný, glutathion redukováný, S-Adenosyl-L-homocystein, S-Adenosyl-methionin, koenzym
- 20 A, cystamin, acetylcystein, gamma-L-Glutamyl-L-cystein.

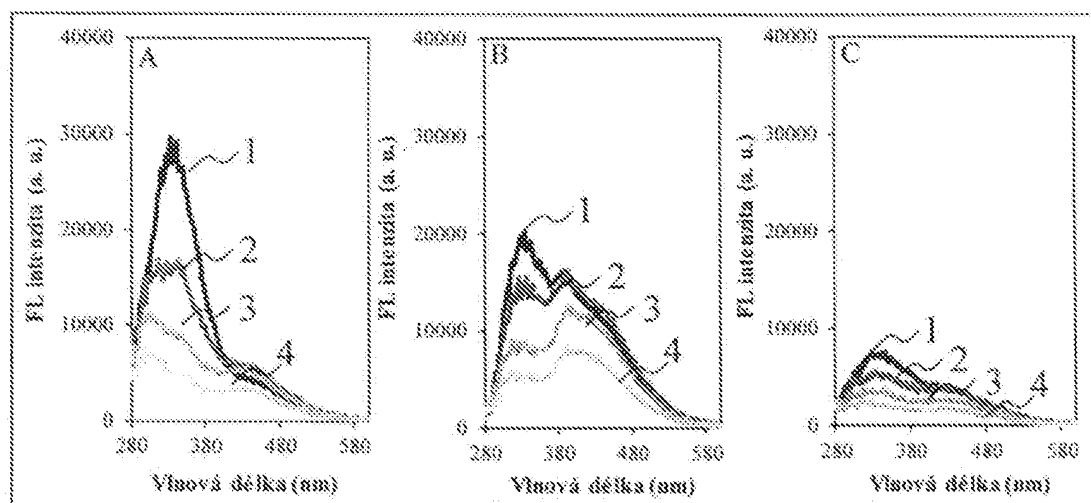
8 výkresů



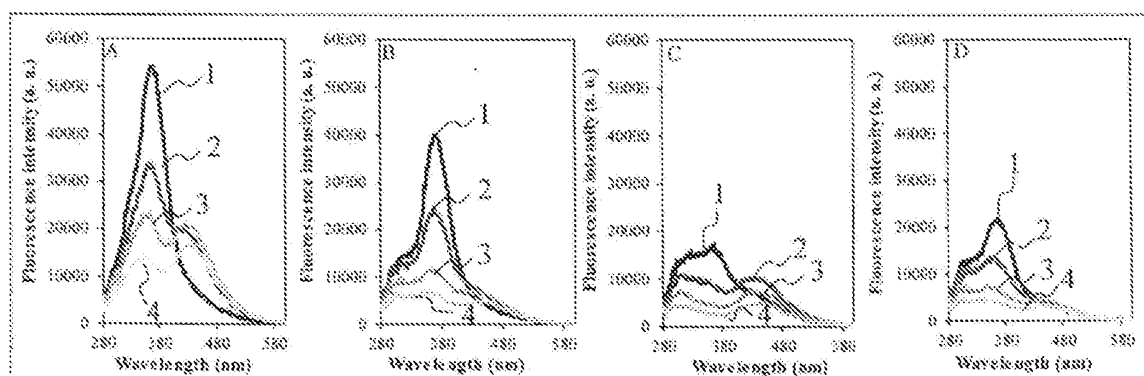
Obr. 1



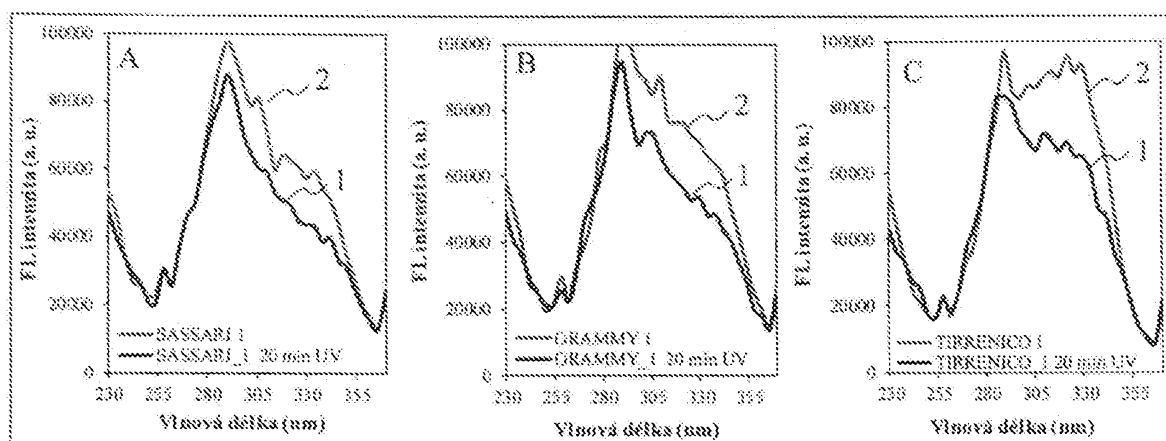
Obr. 2



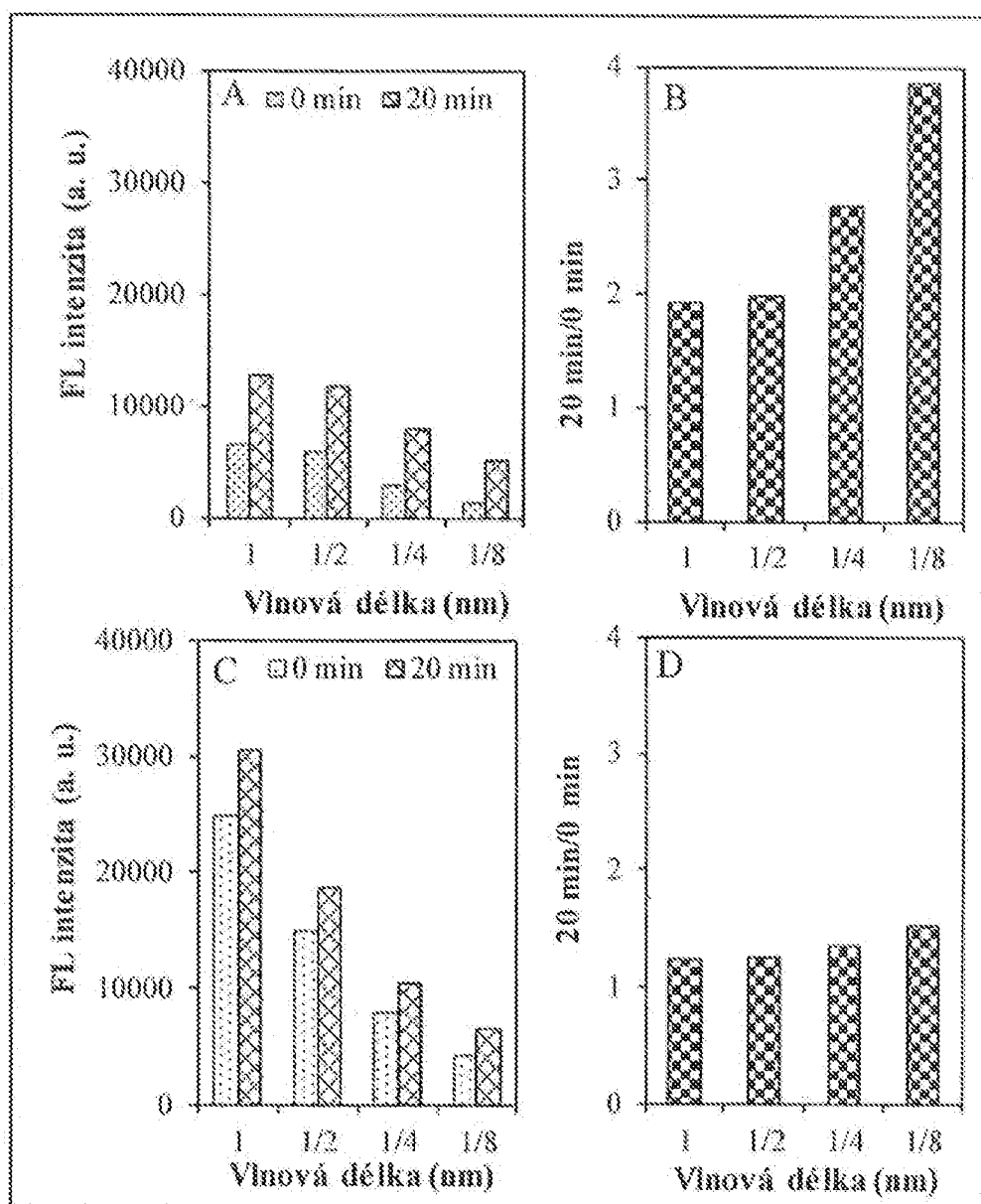
Obr. 3



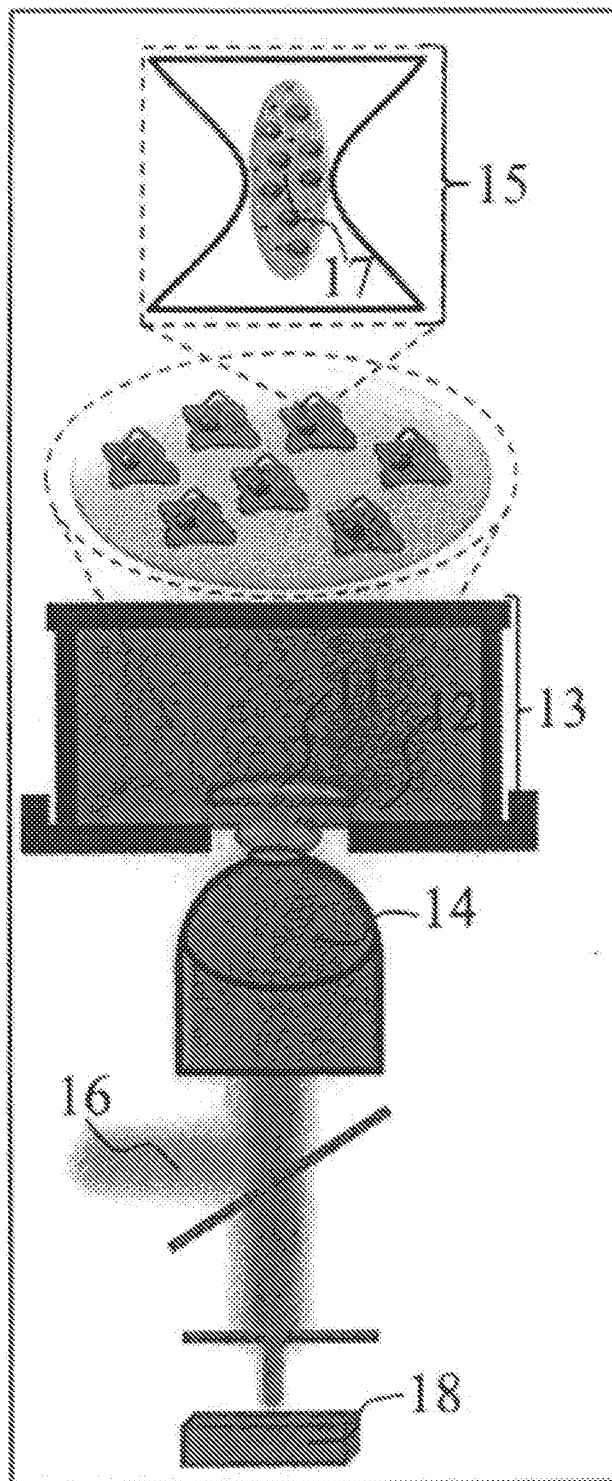
Obr. 4



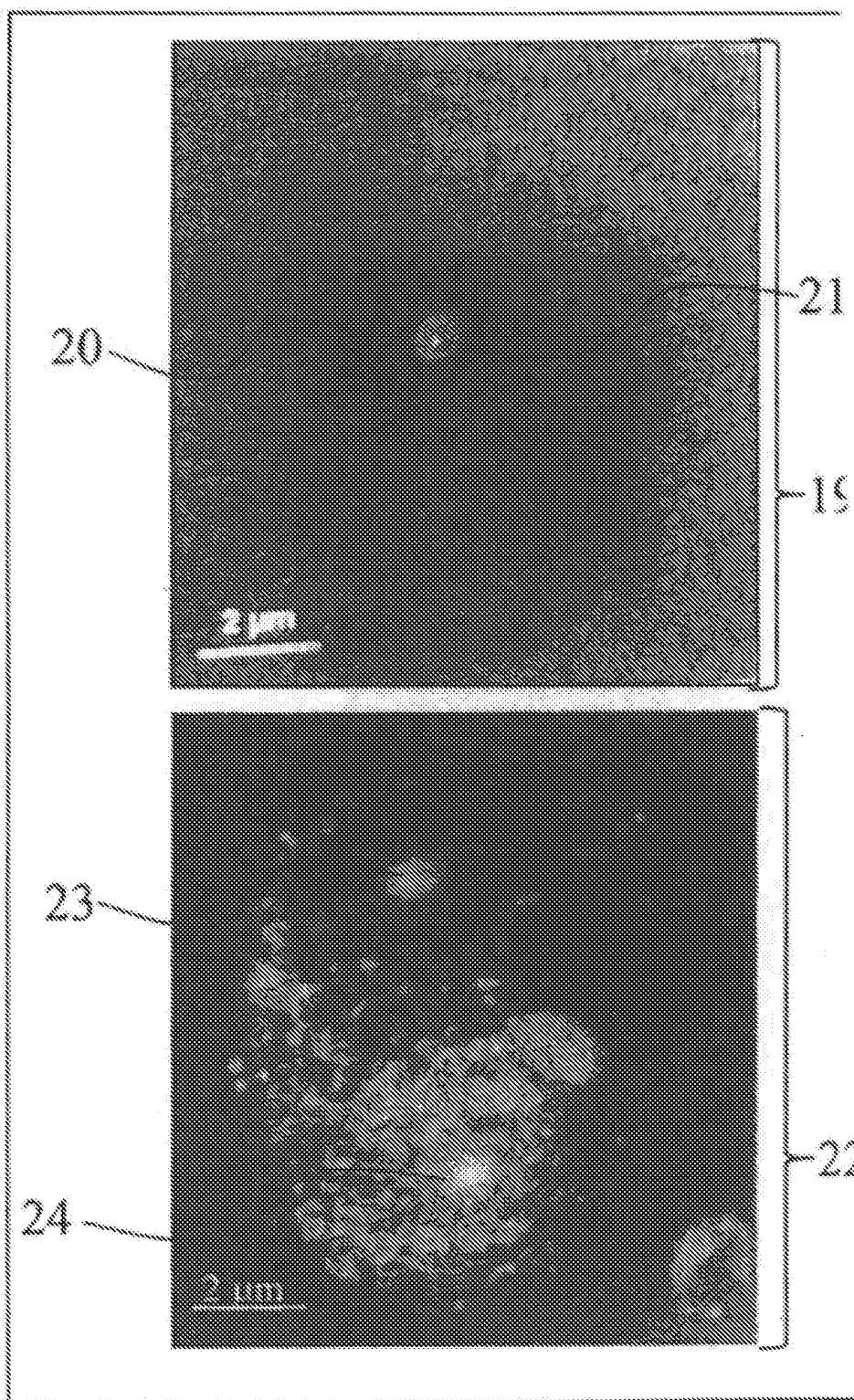
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8