

MULTIPLEXNÍ DETEKCE PSYCHOTROPNÍCH LÁTEK V LATERÁLNÍM TOKU NA MEMBRÁNĚ S NANOČÁSTICEMI ZLATA

BARBORA ĎURČIOVÁ, ARAM ZOLAL,
KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER

*Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
kacerp@vscht.cz*

Došlo 5.7.16, přijato 15.9.16.

Klíčová slova: multiplexní test, laterální tok na membráně, nanočástice zlata, imunochromatografie, psychotropní látky, deoxycholát sodný, přirozené sliny

Úvod

Během několika posledních desetiletí se vyvinula pozoruhodná škála vysoce sofistikovaných postupů pro detekci psychotropních látek. Imunologické testy využívající značené protilátky, jako např. enzymová immunoanalýza¹, se běžně používají pro prvotní „screening“ psychotropních látek v tělních tekutinách. Separční techniky, jako je kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií, mohou být použity k potvrzení předběžně pozitivních výsledků získaných semikvantitativními nebo kvalitativními imunologickými testy².

Z imunochromatografických metod se nejvíce používá metoda laterálního toku reagenčí na proužku s porézní membránou³ (angl. lateral flow immunoassay; zkr. LFIA). Pro malé analyty, jakými jsou i psychotropní látky, jsou imunoreagencie v daném testu konstruovány v kompetitivním uspořádání. Toto uspořádání využívá specifické interakce barevně značené protilátky s antigenem přítomným ve vzorku (pozitivní výsledek testu), nebo s antigenem imobilizovaným v detekční oblasti testu (negativní výsledek testu). V případě, že je LFIA proužek schopen detegovat vícero psychotropních látek z jednoho vzorku slin, jedná se o tzv. multiplexní LFIA test⁴. Kapalným vzorkem slin je aplikován na podložku pro nanášení vzorku, kde dochází k interakci psychotropní látky (sledovaný antigen) s příslušnou protilátkou. Vzorek slin spolu s komplexem protilátky a antigenu pak kapilárně vzlíná podél porézní membrány směrem k testovací linii. V případě pozitivního výsledku nedochází na testovací linii k žádné interakci a vzorek slin vzlíná dál podél membrány směrem ke kontrolní linii, kde dojde k interakci primárních a sekundárních protilátek a tím k zbarvení jen této linie. V případě negativního výsledku dochází k specifické interakci pri-

márních protilátek na testovací linii a také k interakci na kontrolní linii, dojde tedy ke zbarvení obou linií. V případě multiplexního testu je na jednom LFIA proužku imobilizováno násobné množství imunoreagencií, ale princip detekce zůstává stejný.

V literatuře je popsáno mnoho druhů barevných částic využívajících se pro multiplexní LFIA technologii^{2,4-6}. Značení protilátek je nevyhnutnou součástí testu, protože bez něj by nebyla možná vizualizace spojení protilátky s antigenem. Nejdůležitějšími kritérii výběru částic je jejich stabilita, požadovaná citlivost výsledného testu, krátká doba konjugace a přípravy částic, náklady na přípravu a hlavně způsob vizualizace výsledku. Zlaté nanočástice o velikosti 20–40 nm jsou široce oblíbené zejména pro jejich stabilitu, jednoduchou laboratorní přípravu a jednoduchý princip rychlé produkce signálu. Pro odečítání výsledku není potřebný zdroj světla ani fotometr, jako je tomu např. při použití enzymů^{7,8}, fluorescenčních substancí⁴, kvantových teček^{5,6} nebo částic využívající technologii „up-converting phosphor“^{4,2}. Jednoduchost tohoto testu tedy umožňuje aplikaci nejen ve specializovaných laboratořích, ale i v rukách laické veřejnosti.

Sliny jsou ultrafiltráty krve a bylo zjištěno, že korelace mezi koncentracemi v krvi a koncentracemi ve slinách je mnohem lepší než v moči⁹. Obrovskou výhodou použití slin pro detekci psychotropních látek je jejich snadné odbírání bez omezování soukromí osob poskytujících vzorek, což umožňuje využití testu přímo v terénu. Na druhou stranu, existuje řada problémů spojených s odběrem vzorků slin.

V literatuře^{2,10,11} je popsán nestimulovaný (rychlost 0,5–1,5 ml min⁻¹) a stimulovaný (rychlost 2–7 ml min⁻¹) odběr vzorků slin. Pro stimulaci toku slin se používá např. kyselina citrónová. Ta mění pH slin a ovlivňuje tím koncentraci drogy ve slinách. Bazické drogy, jako je např. amfetamin, metamfetamin, MDMA a opiáty, se při snížení pH slin ionizují a tím se jejich koncentrace ve slinách zvyšuje. Koncentrace drogy ve slinách je potom mnohonásobně vyšší než její koncentrace v plazmě. To může vést k falešně pozitivnímu výsledku při detekci drogy imunochromatografickým proužkem. Opak platí pro látky kyselé (benzodiazepiny), jejichž koncentrace ve slinách se snížením pH slin klesá. Proto je jejich koncentrace při odběru vzorku mnohonásobně nižší než koncentrace v plazmě. V tomto případě může dojít k falešně negativnímu výsledku. Další informace o poměru koncentrací psychotropních látek ve slinách a v plazmě lze najít v publikaci¹². Dalším problémem spojeným s odběrem vzorků slin je ztráta podílu drogy při použití komerčních přístrojů určených pro odběr slin, jako jsou PVA pěny, vatové válčky, nebo parařín¹¹. Lipofilní drogy, jako je např. PCP, vykazují vyšší přilnavost k různým materiálům v porovnání s drogami hydrofilními. K největším ztrátám dochází při odběru vzorku slin obsahujících kanabinoidy. Problematika detekce THC a jeho metabolitů ze slin je detailně popsána v práci¹¹.

Lubrikační složkou slin jsou muciny, které jsou vylučovány malými slinnými žlázami. Muciny jsou polypepti-

dové řetězce s nízkou rozpustností, vysokou viskozitou, vysokou elasticitou a silnou adhezivitou (přilnavostí). Právě muciny svojí schopností vázat proteiny a mikroorganismy způsobují nespecifické vazebné interakce při testování slinných vzorků imunochromatografickými metodami^{13,14}.

Významným problémem při provádění testů v laterálním toku na membráně je prevence nespecifické vazby zlatých nanočástic navzájem (aglutinace), dále na absorpční podložku a na testovací linii. Nespecifická vazba (vazba, která není zprostředkována specifickým navázáním antigenu s příslušnou protilátkou) vede k falešně pozitivním výsledkům nebo ke snížení limitu detekce testů. V případě multiplexního testu je zamezení nespecifických interakcí, zejména na větším počtu testovacích linií, nutné pro funkčnost testu. Pro zamezení nespecifických interakcí se uplatňuje řada strategií, jako např. „blokování“ membrány nebo podložky pro nanášení vzorku. Jako blokační činidla se používají kasein, želatina, sérový albumin, polyethylenglykol, polyvinylalkohol a množství iontových a neiontových detergentů. V patentu¹⁴ je popsán způsob úpravy vzorku slin smícháním s deoxycholátem sodným před aplikací na LFIA test. Tento postup ale představuje dvoukrokovou aplikaci vzorku, která omezuje využití testu laickou veřejností. LFIA test využívající zlaté nanočástice, detegující 4 drogy najednou, zároveň schopný detekce z komplikované matrice, jakou jsou přirozené sliny, je unikátem na trhu. Doposud byly vyvinuty multiplexní LFIA proužky pro detekci 3 drog, jejich příprava je však patentově chráněná a nepřístupná.

V této práci popisujeme optimalizaci a sestavení multiplexního LFIA testu pro detekci morfinu, 3,4-methylen-dioxymethamfetaminu (extáze), fencyklidinu (andělský prach) a amfetaminu ze vzorku slin využívajícího nanočástice zlata pro jednoduchou vizuální kontrolu výsledku. Správná úprava podložky pro nanášení vzorku spolu s vhodnou metodou přípravy stabilních konjugátů zlatých nanočástic s protilátkami jsou klíčové pro přípravu jedнокrokového funkčního multiplexního testu pracujícího na principu LFIA. Test je neinvazivní a svojí jednoduchostí vhodný pro laickou veřejnost. Z hlediska použití zlatých nanočástic je test nenákladný, rychlý, dostatečně citlivý a vhodný i pro aplikaci v terénu.

Experimentální část

Chemikálie a materiály

Morfin-BSA, (BSA je hovězí sérový albumin) amfetamin-BSA a fencyklidin-BSA konjugáty, stejně jako monoklonální myší protilátka proti PCP (klon M12973) byly zakoupeny od firmy Fitzgerald (USA). MDMA-BSA dodala firma EastCoast Bio (Německo). Monoklonální myší protilátka proti morfinu (klon M03A2) byly zakoupeny od firmy AbD Serotec (USA), monoklonální myší protilátka proti MDMA (klon MDMA21B11H6C8) byly dodány firmou Pyxis (USA). Monoklonální myší protilátka proti

amfetaminu (klon M994299) a králičí protilátka proti myším (IgG) byly dodány firmou Antibodies-online GmbH (USA). Morfin, fencyklidin, amfetamin hydrochlorid, a 3,4-methylen-dioxymethamfetamin dodala Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Dále byly použity: kyselina boritá; chlorid sodný; hydroxid sodný (p.a., Penta, Česká republika); monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného a Tween 20 (Fluka, Švýcarsko); dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Riedel de Haen, Německo); azid sodný; sacharosa; dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan didraselný a BSA; polyvinylpyrrolidon; polyethylenglykol Mn 1305-1595; trihydrát kyseliny tetrachlorozlatité; dihydrát citrátu sodného; deoxychoát sodný; tris(hydroxymethyl)aminomethan (vše Sigma-Aldrich, Německo); Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, Velká Británie). Deionizovaná voda měla vodivost menší než $5,5 \mu\text{S cm}^{-1}$. Plastová výztuž proužku PN KN-V1080.39 byla dodána firmou Kenosha tapes (Amstelveen, Nizozemí). Nitrocelulosa membrána HiFlow Plus MILLHF12002XSS byla zakoupena od firmy Millipore (Bedford, Irsko). Dále byly použity tyto materiály: absorpční podložka ze skelných vláken Fusion 5 (GE Healthcare, USA); absorpční podložka – celuloza CSFP 223000; skelné vlákna GFPC 103000 (Millipore Corporation, USA); polyvinylalkoholová pěna (Ramer, Velká Británie).

Přístroje

Semiautomatický bezkontaktní nanášec vzorků CAMAG Linomat 5 (Camag AG, Švýcarsko), pH metr CyberScan pH 510 (Eutech Instruments, Nizozemsko), elektroda Orion Ross Sure Flow – 8175BNWP (ThermoFisher, USA), univerzální sušárna Memmert UFE400 (Mettler GmbH + Co.KG, Německo), UV/Vis spektrofotometr Lambda 35 (Perkin Elmer, USA), laminární box MSC Advantage (Thermo Scientific, USA).

Příprava zlatých nanočástic

Zlaté nanočástice s absorpčním maximem při vlnové délce 521 nm (absorbance 1,204) byly připraveny metodou redukce trihydrátu tetrachlorozlatité kyseliny citrátem sodným, která byla vyvinuta roku 1951 Turkevitchem¹². Frens¹³ v roce 1973 dokázal, že velikost částic může být kontrolována poměrem přidaného zlata a redukčního činidla. K syntéze byl připraven vždy čerstvý 1,127% (m/v) roztok citrátu a 1,127% (m/v) roztok trihydrátu kyseliny tetrachlorozlatité, poté byly oba roztoky přefiltrovány přes filtr 0,22 μm . 342 ml deionizované vody bylo za stálého míchání přivedeno k varu. Následně bylo přidáno 3,6 ml roztoku kyseliny tetrachlorozlatité a po 2 min bylo přidáno 6,80 ml roztoku citrátu. Po 10 min byla baňka odstavena z míchačky a vložena do ledové lázně. K charakterizaci nanočástic byl použit UV-Vis spektrometr. Naměřené absorpční maximum 521 nm odpovídá průměru velikosti zlatých nanočástic 26 nm.

Příprava konjugátů protilátek s částicemi zlata

Jednotlivé kroky optimalizace konjugátů nejsou předmětem této práce. Stručný přehled kroků optimalizace lze nalézt v monografiích³ nebo v práci Göselové¹⁷. K 1 ml suspenze zlatých nanočástic (absorbance 1) byl přidán roztok 0,2 M K₂CO₃ tak, aby hodnota pH byla mírně vyšší než je izoelektrický bod dané protilátky. Množství přidaného pufru záviselo na počátečním pH roztoku zlatých nanočástic. Pro monoklonální myší protilátky proti morfinu (morphine monoclonal antibodies; morfin mAb) bylo pH upraveno na hodnotu 6,6 (MDMA mAb – pH 6,75, PCP mAb – pH 7,1, amfetamin mAb – pH 6,75). K této suspenzi bylo za míchání přidáno experimentálně zjištěné množství protilátek (morfin mAb – 3 μ l s koncentrací 1 mg ml⁻¹, MDMA mAb – 2,2 μ l s koncentrací 1 mg ml⁻¹, PCP mAb – 3,05 μ l s koncentrací 1 mg ml⁻¹, amfetamin mAb – 0,5 μ l s neznámou koncentrací). Suspenze byla důkladně promíchávána a ponechána reagovat po dobu 5 až 10 min. Následně bylo přidáno 50 μ l 10% roztoku BSA v 5 mM borátového pufru s pH 7,4. Po 10 min míchání byla suspenze odstředěna 20 min při teplotě 4 °C (11952 RCF). Veškerý supernatant byl opatrně odebrán, objem pelety byl změřen a doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 50 μ l (optická hustota výsledného konjugátu je 20). Výsledné konjugáty byly poté smíchány v experimentálně zjištěném poměru, kde 50 % (v/v) tvoří zředovací pufr (diluent 2X – 0,01 M Tris pufr pH 8,5, 0,2% BSA, 0,1% PVP, 0,1% PEG, 0,15% Tween 20, 10% sacharosa, 0,025% azid sodný), 25,83 % (v/v) deionizovaná voda, 5 % (v/v) amfetaminový konjugát, 8,33 % (v/v) PCP konjugát, 2,5 % (v/v) MDMA konjugát a 8,33 % (v/v) morfinový konjugát. Připravená suspenze měla optickou hustotu 4,3. Suspenze byla důkladně protřepána a ponechána 10 min odstát.

Příprava podložky pro nanášení vzorku a konjugační zóny

Jako pufr pro úpravu podložky pro nanášení vzorku byl použit roztok 0,1 M Tris pufru pH 9,0 a 0,5% (m/v) roztok deoxycholátu sodného (pokud není uvedeno jinak). 2,8 × 20 cm pás podložky (materiál Fusion 5) byl ponořen do pufru na 10 min. Poté byla podložka opatrně vyjmuta z roztoku a umístěna ve vodorovné poloze na síto, kde byla ponechána do úplného vyschnutí (cca 24 h). Konjugační zóna byla připravena metodou impregnace, při které je přesně stanovené množství směsi konjugátů rovnoměrně nanášeno na určitou plochu materiálu. Pro materiál Fusion 5 o velikosti 0,6 × 20 cm je potřeba 800 μ l směsi konjugátů. Konjugační zóna byla umístěna do sušárny na 60 min při teplotě 37 °C.

Příprava nitrocelulosové membrány

Pás nitrocelulosové membrány (20 × 3,1 cm) byl nalepen na plastovou výztuž do její střední části. Poté byly na membránu bezkontaktním dávkovačem nanášeny

4 testovací a kontrolní linie. Testovací linie 1 (Morfin-BSA, 0,5 mg ml⁻¹), testovací linie 2 (MDMA-BSA, 0,25 mg ml⁻¹), testovací linie 3 (PCP-BSA, 0,6 mg ml⁻¹), testovací linie 4 (Amfetamin-BSA, 0,5 mg ml⁻¹) a kontrolní linie (králičí protilátky proti myším, 0,5 mg ml⁻¹) byly na požadovanou koncentraci ředěny PBS pufrům pH 7,4 (0,2% sacharosa a 0,001% Brilliant Blue G). Testovací linie 1 byla nanášena přesně 11 mm od začátku membrány, testovací linie 2 14 mm od začátku membrány, testovací linie 3 17 mm od začátku membrány, testovací linie 4 20 mm od začátku a kontrolní linie byla nanášena o 7 mm dál od poslední testovací linie a tedy 27 mm od začátku membrány. Nanášené množství imunoreagencií bylo 1 μ l na cm šířky proužku. Membrána byla poté sušena při konstantní teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny.

Kompletace detekčního proužku

Proužky byly připraveny pomocí návodu firmy Millipore¹⁸ s jistými modifikacemi. Pás membrány byl nalepen do střední části platové výztuže. Na spodní okraj membrány byla přilepena konjugační zóna se sušenými konjugáty a dále podložka pro nanášení vzorku. Na vrchní okraj membrány byla přilepena celulosová absorpční podložka. Takto připravená deska byla nastříhána na jednotlivé proužky o šířce 3 mm (viz obr. 1).

Na obr. 2 je LFIA test pro detekci 8 druhů psychotropních zneužívaných látek. Test je tvořen z 2 LFIA proužků, kazety a podložky pro sběr vzorku. Na obrázku je tato podložka tvořená skelnými vlákny, které byly později vyměněny za PVA pěnu.



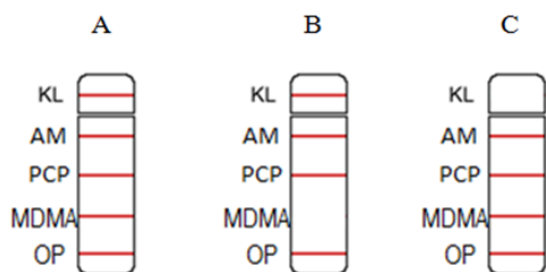
Obr. 1. Sestavený LFIA proužek: a – membrána se 4 testovacími liniemi a kontrolní linií, b – konjugační zóna, c – podložka pro nanášení vzorku, d – absorpční podložka



Obr. 2. Jednokrokový LFIA test pro detekci 8 druhů psychotropních látek ze vzorku slin

Provedení detekce LFIA testem

Výklopná část kazety LFIA testu byla vsunuta pod jazyk dobrovolníka po dobu 2–5 min, tak aby měla podložka čas nasát potřebné množství slin. Následně byla výklopná část zaklopena do kazety a test byl ponechán 10 min ve vodorovné poloze. Po 10 min byl vyhodnocen výsledek testu. Pro kvalitativní posouzení přítomnosti psychotropních látek ve slinách se intenzita zbarvení testovacích linií a kontrolní linie vyhodnocuje vizuálně. Vzor-ky, při jejichž analýze došlo k zbarvení všech linií, byly považovány za negativní (–) (viz obr. 3A), tudíž žádnou drogu neobsahovaly, nebo byla koncentrace drogy pod detekčním limitem (*LOD*). V případě, že jedna z testovacích linií nebyla zabarvena, byl vzorek slin hodnocen jako pozitivní (+) (viz obr. 3B). Pokud nebyla zabarvena kontrolní linie, test byl považován za neplatný (viz obr. 3C).

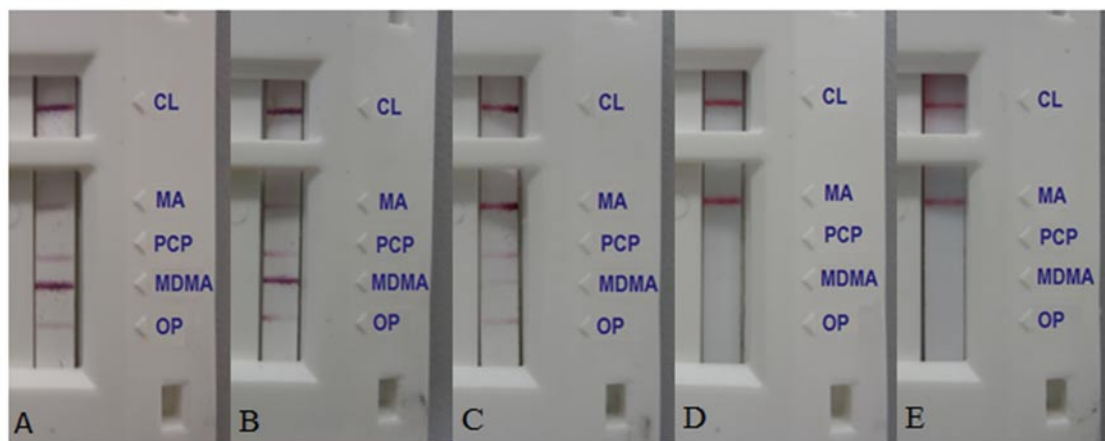


Obr. 3. A – negativní výsledek testu, B – pozitivní výsledek na MDMA, C – neplatný test

Výsledky a diskuse

Vývoj testu pro multiplexní detekci drog začínal vývojem 4 singletových proužků, přičemž každý konjugát protilátek a zlatých nanočástic a příslušné testovací linie byly optimalizovány na jednom LFIA proužku. Singletové proužky měly v počátečním stádiu vývoje podložku pro nanášení vzorku upravenou 50 mM borátovým pufrém, 2% Tween 80, 0,2% BSA. Tento postup byl převzat z bakalářské práce Zolala¹⁹, ve které byl popsán vývoj a optimalizace singletového proužku pro detekci amfetaminu z různých matic. Optimalizace singletových proužků proběhla bez významnějších problémů, ty však nastaly při snaze inkorporovat 4 konjugáty a 4 testovací linie na jeden LFIA proužek. Zatímco singletové proužky byly schopny detekce drog z moči, slin nebo z vodných roztoků s mírným rozdílem v limitu detekce²⁰, složený multiplexní proužek s upravenou podložkou pro nanášení vzorku byl schopný detekovat drogy z vodných vzorků, avšak ze vzorků přirozených slin proužek nebyl schopný detekce ani jedné z testovaných drog a to ani při použití vysoce koncentrovaných vzorků slin. Z toho vyplývá, že na rozdíl od jednoduchého proužku s jednou testovací linií, v multiplexním systému se 4 různými konjugáty a 4 testovacími liniemi dochází k mnoha interakcím, které znemožňují funkčnost testu, pokud je použit pro komplikovanější vzorek, jakým jsou právě sliny. Jednou z možností, jak zamezit nežádoucím nespecifickým interakcím mezi složkami přirozených slin a imunoreagenciemi testu, je optimalizace podložky pro nanášení vzorku v několika krocích:

- určení vhodného pH impregnačního roztoku,
- změna molarity impregnačního roztoku (pufr s vhodnou pufrací kapacitou),
- výběr vhodného detergentu,
- výběr materiálu podložky.



Obr. 4. Testování vlivu různého pH umělých slin na nespecifické interakce LFIA proužku: A – umělé sliny s pH 5,5, MDMA konjugát vs. AM, PCP, MDMA, OP testovací linie, B – umělé sliny s pH 6,5, MDMA konjugát vs. AM, PCP, MDMA, OP testovací linie, C – umělé sliny s pH 7,5, AM konjugát vs. AM, PCP, MDMA, OP testovací linie, D – umělé sliny s pH 8,44, AM konjugát vs. AM, PCP, MDMA, OP testovací linie, E – umělé sliny s pH 9,04, AM konjugát vs. AM, PCP, MDMA, OP testovací linie

Přirozené sliny mohou mít pH 6,3 až 8, a také jejich pufrací kapacita může kolísat v závislosti na tom, jestli je jejich odběr stimulovaný nebo nestimulovaný²¹. Podložka pro nanášení vzorku je důležitou částí testu, která má za úlohu přefiltrovat a upravit přirozené sliny tak, aby jejich rozdílné vlastnosti před aplikací neměly vliv na výsledek testu. Pufrací (tlumivá) kapacita vyjadřuje míru schopnosti pufru udržet pH po přidání kyseliny nebo báze. V našem případě byl hledán pufr, který je schopný udržet konkrétní pH po přidavku přirozených slin.

Určení vhodného pH

Pro pozorování vlivu pH na nespecifické interakce byla provedena řada experimentů s použitím umělých slin (1,4 mg ml⁻¹ chloridu sodného, 0,5 mg ml⁻¹ chloridu draselného, 0,1 mg ml⁻¹ chloridu vápenatého, 0,1725 mg ml⁻¹ monohydrátu dihydrogen-fosforečnanu sodného, 0,025 mg ml⁻¹ chloridu hořečnatého, 0,09 mg ml⁻¹ močoviny a 0,2 mg ml⁻¹ glukosy v deionizované vodě). Do výsledného roztoku byl přidán i azid sodný ((m/v) 0,1%). Pro zjednodušení těchto prvotních experimentů nebyly do umělých slin přidány enzymy a muciny. Postup byl převzat z práce Chou a Hee²² a poté modifikován pro naše účely. pH umělých slin bylo upraveno 1% HCl (případně 1 M NaOH) na 5,5, 6,5, 7,5, 8,44 a 9,04. Testy byly provedeny na LFIA proužku, který byl sestaven podle výše uvedené metody s rozdílem použitého materiálu pro podložku pro nanášení vzorku a konjugací zónu, kde v obou případech byla použita skelná vlákna GFCP 103000 (Millipore Corporation, USA). Aby bylo možné pozorovat nespecifické interakce, byl vždy použit jen jeden druh konjugátu, který spolu se vzorkem slin migroval membránou se 4 testovacími liniemi. Testy byly provedeny v kazetě s PVA houbičkou pro nasátí vzorku, která byla vždy ponořena do vzorku umělých slin a poté překlopena na podložku pro nanášení vzorku, v tomto případě upravené 50 mM borátovým pufrům pH 8,4, 0,2% BSA, 2% Tween80.

Z obr. 4 je patrné, že změna pH má obrovský vliv na eliminaci nežádoucích nespecifických interakcí mezi konjugátem a nepříslušnými liniemi. V případě použití umělých slin s pH 9,04 (ovšem bez přidavku mucinu a proteinů) se povedlo docílit jen specifického vázání amfetaminového konjugátu na jeho příslušnou linii. Proto bylo konstatováno, že je nutné změnit podložku pro nanášení vzorku tak, aby byla schopna upravit pH přirozených slin na hodnotu 8,5–9,0.

Výběr pufru a optimalizace jeho koncentrace

Pro optimalizaci koncentrace byly provedeny experimenty s reálnými slinami s různými pufrými. Prvním testovacím pufrům byl 50 mM borátový pufr s pH 8,4 (pufr A viz obr. 5). Do 450 µl přirozených slin odebraných od dobrovolníka č. 1 bylo postupně přidáváno jisté množství pufru a směs byla poté důkladně promíchána. Poté bylo změřeno

pH směsi. Následovalo přidání dalšího množství pufru a proces měření pH byl zopakován několikrát. Měření bylo provedeno pro 3 vzorky přirozených slin od různých dobrovolníků. Tyto experimenty byly provedeny pro řadu vybraných pufrů: pufr B – 100 mM borátový pufr, pH 7,4, pufr C – 100 mM borátový pufr, pH 8,4, pufr D – 100 mM borátový pufr, pH 9,04 a pufr E – 100 mM fosfátový pufr, pH 9,0, F – 100 mM Tris pufr, pH 9,0 vždy pro nejméně 3 vzorky přirozených slin od různých dobrovolníků. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 5.

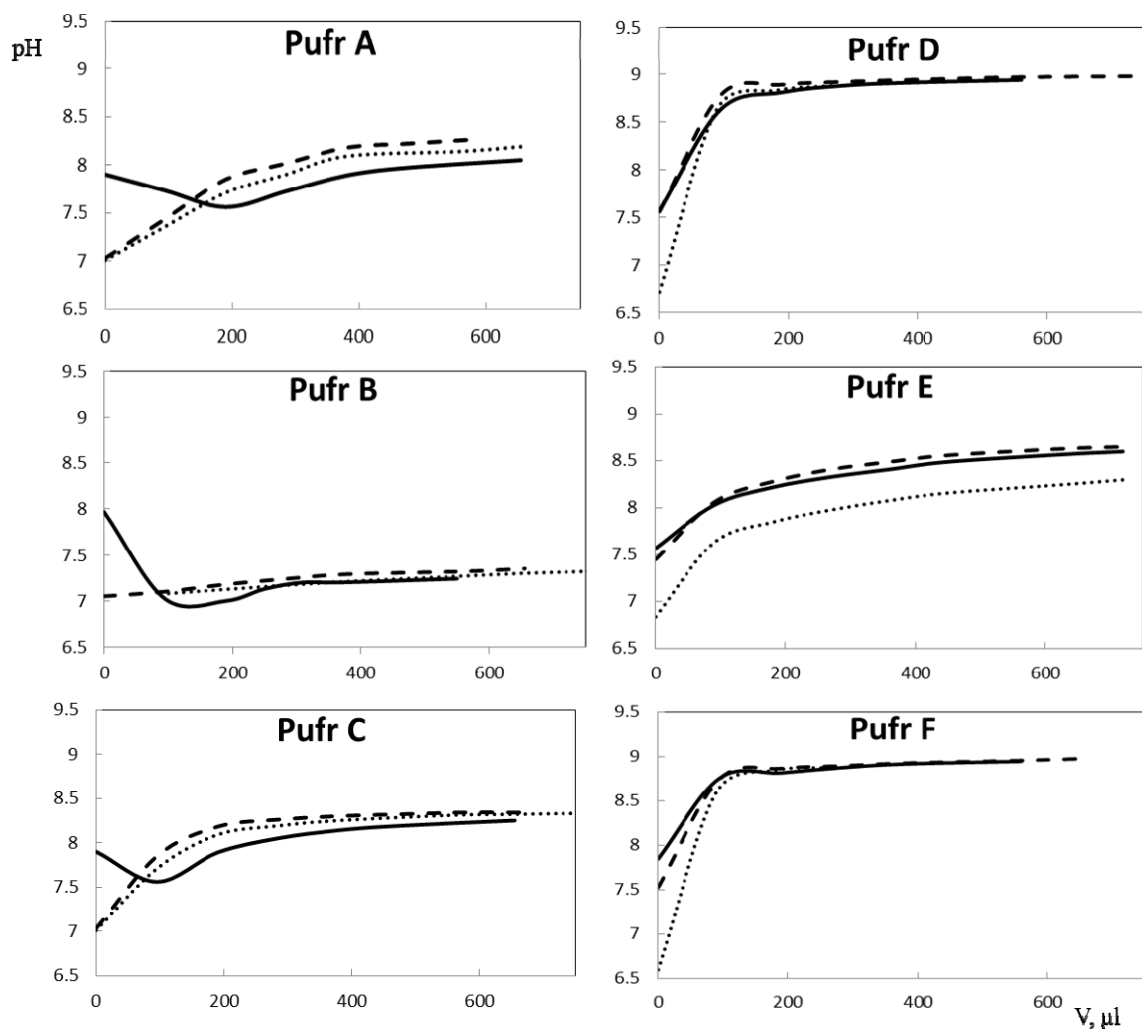
Pro úpravu podložky (2,8 × 10 cm) pro nanášení vzorku impregnační metodou se pro materiál skelná vlákna GFCP 103000 použil objem pufru 2 ml. Jednomu LFIA proužku širokému 3 mm tedy odpovídá množství 30 µl pufru nanášeného na této podložce. Jelikož pro jeden LFIA proužek je potřeba minimálně 100–150 µl přirozených slin, na množství 450 µl slin, které bylo využito pro pufrací experimenty, připadá 90–135 µl pufru, který by měl hypoteticky upravit hodnotu jejich pH na 8,5–9,0, jak bylo konstatováno v dřívější kapitole. Z obr. 5 je patrné, že 50 mM borátový pufr A s pH 8,4 disponuje velice nízkou pufrací kapacitou a vzorky slin po přidavku 90–135 µl mají pH 7,4–7,7. Dvakrát koncentrovanější 100 mM borátový pufr C s pH 8,4 dokázal lépe upravit pH vzorků slin a po přidavku 90–135 µl měly hodnoty pH 7,5–8,0. Jen pufr D a F dokázaly pH vzorků slin dobrovolníků upravit na požadovanou hodnotu a již po přidavku 90–135 µl měly hodnoty pH 8,5–8,8. Oba pufrы byly použity pro úpravu podložky pro nanášení vzorku LFIA proužku a patřičně testovány pro zjištění kompatibility s konjugáty a dalšími imunoreagenciemi. Pro úpravu podložky (skelná vlákna GFCP 103000, 2,8 × 10 cm) byly použity tyto pufrы: 100 mM borátový pufr pH 9, 0,2% BSA, 2% Tween 80 a 100 mM Tris pufr pH 9,0, 0,2% BSA, 2% Tween 80. Z těchto dvou se osvědčil pufr 100 mM Tris pufr pH 9, 0,2% BSA, 2% Tween 80. Proužky LFIA byly tentokrát testovány na přirozených slinách, ve kterých byly muciny a složky proteinového charakteru denaturovány zahřáním na 80 °C po dobu 2 h. Pro pozorování nespecifických interakcí byl použit opět jen amfetaminový konjugát, který migroval se vzorkem membránou se 4 liniemi OP, MDMA, PCP, AM (viz obr. 6).

Z obr. 6 vyplývá, že ačkoli má pufr Tris vhodně upravenou pufrací kapacitu a pH, při použití přirozených slin stále dochází k nežádoucím nespecifickým interakcím. Testovány byly proto i další pufrы, jako např. 200 mM fosfátový pufr pH 9, 0,2% BSA, 2% Tween 80, jehož molarita však byla příliš vysoká pro účely LFIA proužku. Pufr měl vliv na rozpad některých konjugátů, což se projevilo jako fialově-šedé zabarvení testovacích linií. Zvýšení pufrací kapacity většiny z testovaných pufrů, neboli zvýšení molarity pufrů nad 150 mM mělo většinou nežádoucí efekt na stabilitu konjugátů, a proto bylo nutné hledat vhodnější detergent než je Tween 80, a také vhodnější materiál pro podložku pro nanášení vzorku.

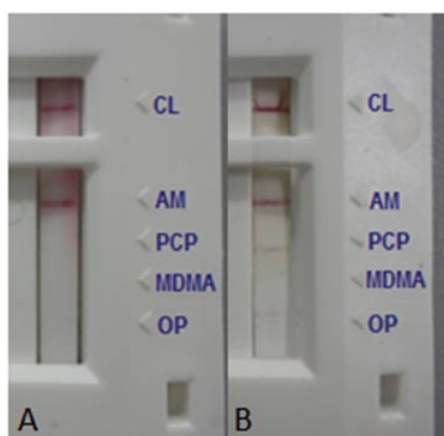
Výběr vhodného detergentu a materiálu podložky

Pro výběr vhodného detergentu byly využity informace získané z amerického patentu¹³, který popisuje metodu předúpravy přirozených slin přidávkem soli žlučové kyseliny a následně použití pro LFIA test. Pro ovlivnění nespecifických interakcí nebo zamezení falešně pozitivnímu výsledku sendvičového LFIA testu byl použit deoxycholát sodný. Tento aniontový detergent, který disponuje emulsi-fikačními a solubilizačními vlastnostmi, má také schopnost hydrolyzovat lipidy za vzniku glycerolu a mastných kyselin (tzv. lipolýza)²³. Pro naše účely našel deoxycholát sodný uplatnění jako složka pufru pro úpravu podložky pro nanášení vzorku. Testovány byly 3 různé koncentrace a to 0,5, 1 a 2 % deoxycholátu sodného v 100 mM pufru Tris pH 9,0. Již při použití koncentrace 0,5 % deoxycholátu

sodného bylo možné eliminovat veškeré nespecifické interakce způsobené muciny. Pro zlepšení tokových vlastností slin LFIA proužkem byl také proveden „screening“ materiálů použitých pro podložku a zároveň konjugální zónu. Z řady materiálů byl vybrán materiál Fusion 5 (cit.³). Z hlediska struktury je Fusion 5 tvořen skelnými vlákny, která obsahují umělé pojivo pro zvýšení mechanické pevnosti a udržení fyzikálních vlastností, jako je hydrofilnost a odvod vlhkosti v průběhu skladování. Další z výhod Fusion 5 v porovnání se skelnými vlákny GFCP 103000 je vyšší homogenita vláken a rychlejší nasákavost vzorku. Výsledky optimalizace podložky byly testovány na LFIA proužku v negativním vzorku slin a následně ve vzorku přirozených slin s přidávkou drogy. Všechny pozitivní vzorky přirozených slin byly namíchány v laboratoři, nepocházely tedy od dobrovolníků. Pozitivní vzorek slin



Obr. 5. Změna pH přirozených slin (vzorek slin 1 – plná čára, vzorek slin 2 – přerušovaná čára, vzorek slin 3 – tečkovaná čára) po přidání pufru: pufr A – 50 mM borátový pufr pH 8,4, pufr B – 100 mM borátový pufr, pH 7,4, pufr C – 100 mM borátový pufr, pH 8,4, pufr D – 100 mM borátový pufr, pH 9,04 a pufr E – 100 mM fosfátový pufr, pH 9,0, F – 100 mM Tris pufr, pH 9,0

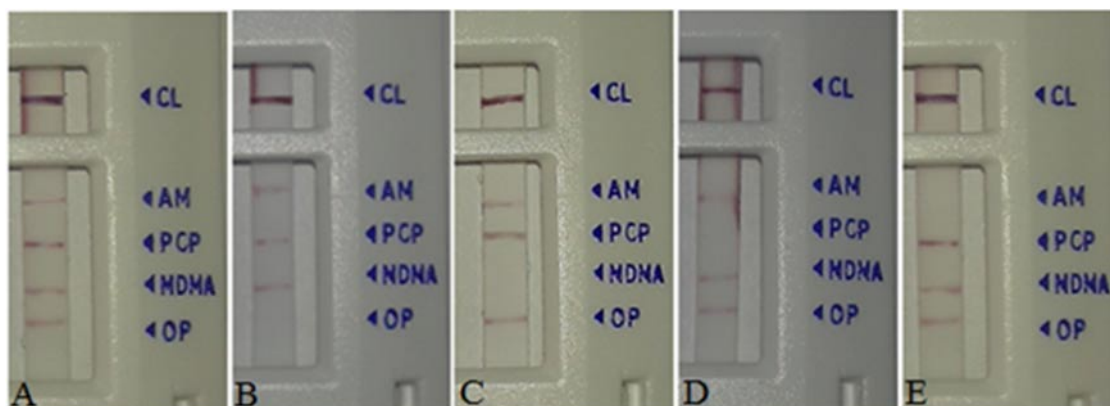


Obr. 6. Testování nespecifických interakcí způsobených přirozenými slinami; A – „denaturované“ přirozené sliny, B – přirozené sliny

s morfinem měl koncentraci 20 ng ml^{-1} ($LOD 15 \text{ ng ml}^{-1}$), pozitivní vzorek slin s MDMA měl koncentraci 150 ng ml^{-1} ($LOD 100 \text{ ng ml}^{-1}$), pozitivní vzorek slin s fencyklidinem měl koncentraci 300 ng ml^{-1} ($LOD 250 \text{ ng ml}^{-1}$), pozitivní vzorek slin s amfetaminem měl koncentraci 100 ng ml^{-1} ($LOD 75 \text{ ng ml}^{-1}$). Testovací linie byly tentokrát nanášeny manuálně hamiltonovou stříkačkou ($1 \mu\text{l mm}^{-1}$ proužku). Výsledky zobrazené na obr. 7 dokazují, že test není ovlivněn nespecifickými interakcemi a je tady plně funkční i pro takovou matici, jakou jsou přirozené sliny.

Závěr

Byl sestaven jednokrokový multiplexní imunochemický membránový test pro rychlou detekci morfinu, 3,4-methyldioxyamfetaminu, fencyklidinu a amfetaminu z jednoho vzorku přirozených slin. Pro vizualizaci



Obr. 7. Možné výsledky: A – negativní vzorek, B – pozitivní vzorek s morfinem ($LOD 15 \text{ ng ml}^{-1}$), C – pozitivní vzorek s MDMA ($LOD 100 \text{ ng ml}^{-1}$), D – pozitivní vzorek s PCP ($LOD 250 \text{ ng ml}^{-1}$), E – pozitivní vzorek s amfetaminem ($LOD 75 \text{ ng ml}^{-1}$)

protilátek byly použity zlaté nanočástice, což umožňuje snadnou vizuální kontrolu výsledku bez nutnosti použití fotometru. Na jeho funkčnost měla největší vliv správná úprava podložky pro nanášení vzorku. Podložka byla upravená vhodným pufrům, jehož pufrací kapacita a pH byly optimalizovány. Dále pufr obsahoval detergent (deoxycholát sodný) pro solubilizaci mucinů přítomných v přirozených slinách, které jsou jinak důvodem vzniku nespecifických interakcí imunoreagencií na LFIA proužku. Podložka pro nanášení vzorku a konjugační zóna byly tvořeny materiálem Fusion 5, který v kombinaci s daným pufrům výrazně zlepšil tokové vlastnosti slin LFIA proužkem. Výsledek testu je možno odečítat již po 10 min. Sestavený test je možné použít k terénní kontrole osob např. řídicích automobilů pod vlivem psychotropních látek.

Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT – 34870/2013).

LITERATURA

1. Loo R., Lingenfelter C., Wason P. P., Tang K., Davoudzadeh D.: *J. Anal. Toxicol.* 26, 267 (2002).
2. Wong R. C., Tse H. Y.: *Drugs of Abuse*. Humana Press, Totowa NJ, 2005.
3. Wong R. C., Tse H. Y.: *Lateral Flow Immunoassay*. Humana Press, New York City 2009.
4. Tao J., Huang H. G.: US Patent 20100304471 A1 (2007).
5. Lambert J., Fisher A.: US Patent 20050250141 A1 (2005).
6. Chan W., Maxwell D., Gao X., Bailey R., Nie S.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 40 (2002).
7. Litman D. J., Hanlon T. M., Ullman E. F.: *Anal. Biochem.* 106, 223 (1980).
8. Zuk F. F., Ginsberg V. K., Houts T., Rsbbe J., Merrick H., Ullman E., Fisher M. M., Sizto C. C., Stixo S. N., Litman D. J.: *Clin. Chem.* 31, 1144 (1985).
9. Yacoubian G. S., Wish E. D., Perez D. M.: *J. Psycho-*

- act. Drugs 33, 289 (2001).
10. Karch S. B. (Eds): *Drug Abuse Handbook*. CRC Press LLC., San Francisco 1998.
 11. Crouch D. J.: Výzkumná zpráva č. 203569. Univesity of Utah, Salt Lake City 2005.
 12. Schramm W., Smith R. H., Craig P. A., Kidwell D. A.: *J. Anal. Toxicol.* 16, 1 (1992).
 13. Thieme T., Klimkow N.: US Patent 5,871,905 A (1999).
 14. Withersa C. A., Cookb M. T., Methvena L., Gosneyed M. A., Khutoryaskiy V. V.: *Food Funct.* 4, 1668 (2013).
 15. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier, J.: *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55 (1951).
 16. Frens G.: *Nature (London, U. K.)* 241, 20 (1973).
 17. Göselová S., Holubová B., Blažková M., Fukal L.: *Chem. Listy* 107, 875 (2013).
 18. Merck Millipore Corporation: *Rapid Lateral Flow Test Strip* 2008 (USA), str. 28
 19. Zolal A.: *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2012.
 20. Peng J., Wang Y., Liu L., Kuang H., Lib A, Xu C.: *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.* 6, 7798 (2016).
 21. Bardow A., Moea D., Nyvad B., Nauntoftea B.: *Arch. Oral Biol.* 45, 1 (2005).
 22. Chou Ch. C., Hee S. S. Q. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1177 (1994).
 23. Duncan D., Rotunda A. M.: *Clin. Plast. Surg.* 38, 489 (2011).

B. Ďurčiová, A. Zolal, K. Syslová, and P. Kačer
(Department of Organic Technology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Gold Nanoparticles Based Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Detection of Drugs of Abuse**

One step multiple test line lateral flow immunoassay was designed in a competitive format for the detection of drugs of abuse (namely morphine, 3,4-methylen-dioxy-methamphetamine, phenycyclidine and amphetamine) from oral fluids. For the labeling of antibodies, gold nanoparticles produced by the Turkevich method were used. It was found that saliva contains mucin glycoproteins which cause non-specific interactions on test lines. These undesirable interactions can be influenced by higher pH, higher buffer capacity, and a choice of suitable detergent for the sample pad buffer in combination with suitable sample pad material. Optimized sample pad buffer contained 100 mM Tris and 0.5% sodium deoxycholate to yield pH 9.0. Screening of all the materials (mainly sample pad, conjugate pad) was performed and Fusion 5 was selected in order to develop rapid test able to provide results within 10 minutes. The other key advantage of this format of the test, as compared to other immunoassays, is its low cost and simplicity requiring no sample or reagent preparation and no photodetector for its measurement.