

Cena firmy Merck

Naši čtenáři se v tomto čísle již tradičně setkávají s výběrem soutěžních prací studentů prezentovaných na soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck. Je na čtenáři, aby posoudil odbornou i formální úroveň těchto příspěvků vytvořených studenty magisterského studia - a v některých případech dokonce studia bakalářského - na špičkových analytických pracovištích našich vysokých škol. Za sebe mohu prohlásit, že sledování těchto příspěvků při vlastní soutěži i jejich příprava k tisku mne vede k přesvědčení, že se naši mladí kolegové rozhodně nemusí stydět. Je potěšující spolupracovat se studenty, kteří mají opravdu rádi analytickou chemii a věnují jí mnohem více než je předepsáno studijními osnovami. Je to dobře pro ně i pro nás - jejich učitele. Oni si ověřují své schopnosti a dovednosti, získávají zkušenosti potřebné pro jejich pozdější vystupování na nejrůznějších vědeckých setkání, bez nichž je jejich úspěšná kariéra v moderní vědě jen obtížně představitelná. Zbaví se neopodstatněné nedůvěry ve své schopnosti, trémy i občasného nedostatku sebedůvěry. My si uvědomíme, že i v době převládajících kvantitativních kritérií při hodnocení vědecké a pedagogické práce stojí za to věnovat svoji energii a čas početně sice méně významné skupině nadaných studentů s vyhraněným zájmem o studovaný obor, avšak skupině velmi důležité. Jedná se o studenty, kteří představují špičky ve svých ročnících a kteří možná jednou budou patřit ke špičkám ve svém oboru. A pocít, že jsme k tomu třeba nějakým způsobem dopomohli, je jistě velmi příjemný. Stejně příjemná byla a je atmosféra na těchto soutěžích, kde vznikají přátelské vztahy mezi studenty jednotlivých škol. A bylo by jistě nádherné, kdyby tyto vztahy byly zárodkem budoucí týmové spolupráce, která posune naši analytickou chemii k novým výšinám. V neposlední řadě přispívají podobné soutěže i ke zlepšení vzájemné informovanosti o pokrocích a trendech na jednotlivých

analytických pracovištích a nabízejí i srovnání s trendy světovými. Všechny tyto aspekty by měly být motivací jak pro studenty analytické chemie, tak i pro pracoviště, která je na tuto soutěž vysílají. Další motivací, kromě příjemné finanční odměny pro stupně vítězů, laskavě poskytnuté firmou Merck, je i nepsané pravidlo, že právě vítězové těchto soutěží reprezentují mladé členy naší společnosti na sjezdech spřátelených chemických společností na základě dohod mezi polskou, českou a slovenskou chemickou společností. To je jistě příjemný příspěvek k lidskému i odbornému růstu těch studentů, kteří jsou ochotni udělat něco navíc pro analytickou chemii, pro své katedry či ústavy i pro sebe samotné. Rovněž nabízená a využívaná možnost publikovat své výsledky v našem časopise jistě katalyzuje pohyb studentů směrem k jejich budoucí vědecké práci. Je proto jistě namístě poděkovat všem, bez nichž by nic z výše uvedených pozitiv neexistovalo. Ať už je to firma Merck, bez jejíž finanční podpory a iniciativy by tato soutěž neexistovala, pedagogové, kteří organizaci této soutěže věnují značné množství času a energie, školitelé soutěžících studentů, bez jejichž působení by většina soutěžních příspěvků vůbec nevznikla. A zejména studenti, kteří v době nadměru ekonomicky orientované, najdou čas a odvahu zahledět se do vědy a jejího dalšího rozvoje, bez ohledu na ekonomickou trestuhodnost a neuváženost takové naivity. A na závěr jedno přání a jednu prosbu. Přání, aby rostl počet takových studentů, neboť jedině oni mohou v budoucnu pečovat o další rozvoj naší analytické chemie. A prosbu, aby každý z nás na svém místě a podle svých možností pečoval právě o takovéto studenty, pomáhal jim při jejich práci a odborném i lidském růstu, pomáhal jim hledat nové a krásné cestičky a zážitky v půvabném a okouzlivém světě analytické chemie.

Jiří Barek

TERMOPLASTICKÉ VULKANIZÁTY

STANISLAV DUBININ
a VRATISLAV DUCHÁČEK

Ústav polymerů, Vysoká škola chemicko-technologická
v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
stasdu@gmail.com, Vratislav.Duchacek@vscht.cz

Došlo 28.5.07, přepracováno 16.10.07, přijato 26.10.07.

Klíčová slova: termoplastický elastomer, termoplastický vulkanizát

Obsah

1. Úvod
2. Dynamická vulkanizace
3. Morfologie TPV
4. Mechanické vlastnosti
5. Odolnost k agresivním prostředím a atmosféře
6. Místo TPV mezi elastomery a perspektivní typy TPV
7. Zpracování
8. Předpověď vlastností TPV podle charakteristik jejich složek
9. Závěr

1. Úvod

Termoplastické vulkanizáty (TPV) jsou díky svým vlastnostem nejdynamičtější se rozvíjející skupinou termoplastických elastomerů (TPE)^{1,2}. Prvním průmyslovým výrobkem byl Santopren od firmy Monsanto, uvedený na trh v roce 1981, který se vyrábí dosud^{3,4}. Je směsí polypropylenu a ethylen-propylen-dienového kaučuku (EPDM). Kaučuk je dispergován v termoplastu ve formě částic o velikosti 1 až 5 μm . Odlišně od široce používaných nevulkanizovaných směsí, tzv. termoplastických polyolefinů (TPO), je kaučuk v TPV zcela vulkanizován, což dává řadu výhod, jako větší odolnost proti rozpouštědlům, lepší mechanické vlastnosti a možnost použití přísad běžně zpracovávaných v průmyslu.

Požadované vlastnosti nemohou být dosaženy běžnými způsoby míchání složek (míchání tavenin, roztoků nebo emulze). Speciální způsob míchání byl vyvinut Gesslerem a Fischerem v roce 1978 a prakticky použit firmou Monsanto^{3,4}. Získal název dynamická vulkanizace. V současné době TPV vyrábí přes 20 firem. Nejběžnější termoplastické komponenty jsou polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyamidy (PA), polystyren (PS), kopolymery styrenu s akrylonitrilem (SAN), nebo jeho terpolymery s akrylonitrilem a butadienem (ABS), polyakryláty, polyestery,

polykarbonáty. Elastickými složkami jsou často kaučuky přírodní (NR), isoprenový (IR), butadienový (BR), butadien-styrenový (SBR) a butadien-akrylonitrilový (NBR), butylový (IIR), ethylen-propylenový (EPM) a ethylen-propylen-dienový (EPDM). Na první pohled se zdá, že výběr komponentů je omezen pouze jejich technologickou snášenlivostí, která, je-li špatná, nedovoluje získat požadované mechanické vlastnosti v důsledku slabé adheze mezi fázemi a dobré termodynamické snášenlivosti může být dosaženo jen při poměrně malé molární hmotnosti složek^{5,6}. Problematika je však složitější. Zejména je třeba počítat s významným vlivem zpracovatelských podmínek. Proto je účelem tohoto referátu posoudit vznik vhodné morfologie a vlastností TPV krok za krokem.

2. Dynamická vulkanizace

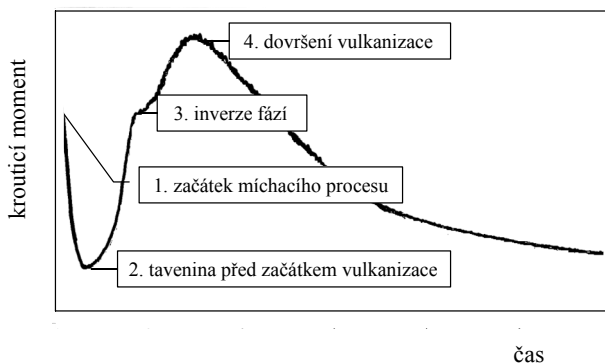
Přes své více než dvacetileté používání je proces dynamické vulkanizace ještě málo prozkoumán. Má několik stupňů. Prvním krokem je roztavení termoplastu, potom se postupně přidává v malých množstvích nevulkanizovaný kaučuk, nebo se kaučuk a termoplast míchají najednou. Způsob a parametry míchání jsou nejdůležitějšími faktory pro vytvoření správné morfologie směsi. Při míchání je nutno dosáhnout rovnoměrného rozložení složek v celém objemu materiálu. Během míchání se kontroluje teplota směsi, tlak, krouticí moment. Proces můžeme rozdělit na několik etap: příprava komponentů (sušení, ohřev apod.), předběžné míchání (suché míchání, homogenizace, rozbíjení aglomerátů), vlastní míchání a odplynění^{7,8}.

Kaučuk a termoplast jsou nesnášenlivé látky. Z tohoto důvodu jejich směsi mají dva druhy morfologií. Jsou to diskrétní a ko-kontinuální fázové struktury. Existují dva názory na problém fázové rovnováhy a změny fázové struktury směsi během míchání. Jeden z nich, který zastával Utracki, posuzuje dvoufázové taveniny polymerů jako emulze^{8–13}. Mechanismus změn fázové struktury závisí na poměru viskozity, objemového poměru složek a úrovni namáhání. Existují určité poměry viskozity a objemových podílů polymeru, při jejichž překročení je za stálého namáhání fázová inverze neodvratná. Jiný názor, prezentovaný De Boerem¹³ a Weberem¹⁴, definuje proces vzniku fázové struktury jako důsledek stálého slučování a rozbíjení kapek roztavených polymerů během míchání, a fázová inverze závisí na poměru rychlosti obou procesů. Při míchání se nejdříve formují dlouhá vlákna. Ta při malé úrovni smykového napětí koagulují v poměrně velké kapky (o rozměru až 100 μm). Je-li úroveň napětí vyšší než určitá kritická hodnota, vlákna se rozpadnou na poměrně malé částice (o rozměru 5 až 10 μm). Platí, že větší kapky taveniny se rozbíjí snadněji než menší. Při určité úrovni napětí existuje určitá nejmenší velikost kapek, kterou můžeme získat. Další míchání vyvolává jen deformace kapek. K dosažení

co nejmenší velikosti kapek je nutno na větší kapky působit vysokým smykovým napětím, aby došlo k jejich rozbití. Přitom čím větší je poměr viskozity kapky a kontinuální fáze, tím těžší je rozbit kapku na menší^{8,9}. Pro zformování diskretní fázové struktury musí být čas potřebný pro koagulaci delší než čas nutný pro rozpad kapek polymeru ve směsi. Proti míchání se staví na odpor i síly povrchového napětí, které limitují minimální velikost kapek. Ověření těchto názorů si vyžádá další experimentální práce.

Teplota směsi musí být dostatečná k roztavení termoplastu a normálnímu průběhu vulkanizace. Když je směs dobře rozmíchána, přidává se vulkanizační systém. Dále míchání pokračuje do kompletního ukončení procesu vulkanizace. Čím rychlejší je vulkanizace, tím intenzivnější musí být míchání^{3,4,7,14}. Jinak může být získána obyčejná kaučuková směs bez vlastností termoplastického elastomeru, v důsledku vývoje vláknitých struktur kaučuku místo diskretních částic, nebo vznikne materiál s ko-kontinuálními fázemi, který také obvykle nemá vlastnosti termoplastického elastomeru^{14,15}. Oproti tomuto názoru Parke a Karger-Kocsis¹⁶ neodmítají výrobu TPV s ko-kontinuálními fázemi, o jejichž existenci v klasických TPV existují data. V každém případě je žádoucí, aby se fázová struktura zformovala před začátkem vulkanizace¹⁷.

Průběh vulkanizace se kontroluje krouticím momentem na rotorech míchacího stroje nebo spotřebou energie. Časová závislost krouticího momentu (obr. 1) má zvláštní tvar, každá část křivky odpovídá určité fázi procesu a určité morfologii materiálu^{17–19}. V průběhu tavení a homogenizace komponentů krouticí moment klesá a dosáhne minima při dosažení rovnovážné struktury taveniny^{17,18}. K fázové inverzi dochází stoupaním viskozity kaučuku vlivem vulkanizace. Je tím výraznější, čím více kaučuku je ve směsi. V bodě fázové inverze, která se projeví jistým plató na křivce, jsou domény kaučuku už natolik tuhé, že míchací stroj již nerozrušuje kapky kapaliny, ale drtí částice pryže. Například, podle Choplina¹⁷, pro kompozice typu kopolymer ethylenu s vinylacetátem (EVAC)/PP dochází k fázové inverzi, když kaučuk obsahuje 60 % nerozpustného podílu (gelu). Dál křivka roste do maxima, které znamená dovršení vulkanizace^{17,19}. Výška maxima



Obr. 1. Schematické znázornění časové závislosti krouticího momentu při dynamické vulkanizaci

souvisí s množstvím energie nutné k drcení vulkanizovaného kaučuku, zmenšuje se s růstem koncentrace termoplastu. Vysvětlení této skutečnosti není složité. Vyšší podíl taveniny termoplastu o nízké viskozitě musí zákonitě vést ke snížení viskozity celého systému a tudíž i krouticího momentu při míchání směsi polymerů. Po dosažení maxima hodnota krouticího momentu postupně klesá a ustálí se na určité úrovni odpovídající viskozitě systému po inverzi fází. Podle jiných údajů^{19,20} může vulkanizace pokračovat i po dosažení maxima, ale viskozitu systému již neovlivní. V každém případě však časová závislost krouticího momentu poskytuje důležité údaje o procesech probíhajících při dynamické vulkanizaci a možnost zdokonalení technologie i receptury.

Během prvních pokusů získat TPV se výzkumníci potkali s nepříjemným účinkem organického peroxidu použitého jako vulkanizační činidlo pro EPDM, který současně degradoval polypropylenovou matici. Bylo vyvinuto několik antidegradačních systémů, ale ty zmenšovaly dosažitelný stupeň vulkanizace²¹, což je pochopitelné, neboť ta také probíhá radikálovým mechanismem. Z toho vyplývá, že přidávaná vulkanizační činidla, aktivátory, urychlovače, katalyzátory, změkčovadla a plniva musejí být vybírána opatrně. Změkčovadla a plniva se mohou přidávat před nebo po vulkanizaci.

Vyšší dávkování složek vulkanizačního systému vyvolává větší stupeň vulkanizace^{18,19}, podobně jako vyšší teplota a rychlost míchání^{17–19}. Je pochopitelné, že za vyšších teplot je rychlost vulkanizace větší. Napětí působící na směs v důsledku míchání však vyvolává růst teploty. Obvykle platí, že rychlost míchání musí odpovídat rychlosti vulkanizační reakce, tj. čím nižší je rychlost reakce, tím pomaleji se musí směs míchat^{15,17,19,20}. Jinými slovy, před ukončením vulkanizace se musí ustálit konečná fázová struktura, jinak je výsledkem směs drtí kaučuku a termoplastu, která má horší mechanické vlastnosti.

Doba míchání a posloupnost přidávání komponentů jsou také důležité. Například je možno přidávat vulkanizační činidlo postupně, čímž zabráníme prudkému růstu viskozity kaučuku a dosáhneme lepší disperze jeho částic²².

V současné době se používají jako vulkanizační činidla síra s urychlovači (např. bis(benzothiazoly) disulfidem) a aktivátory (např. oxidem zinečnatým a kyselinou stearovou), organické peroxidy (např. dikumylperoxid) s aktivátory (např. triallylkyanurátem), různé druhy fenolických pryskyřic (např. resoly) s katalyzátory (např. chlorid zinečnatý, cínatý, dibutylcín) atd. Obecně platí, že komplexní vulkanizační systémy jsou účinnější než jednotlivá vulkanizační činidla²³.

Obvykle i nízký stupeň vulkanizace je dostatečný k výraznému zlepšení vlastností takových směsí. Pevnost a tažnost rostou a výrazně klesá trvalá deformace v porovnání s běžnými směsami elastomerů a termoplastů^{4,24}. Na druhou stranu u směsi kopolymeru ethylenu s methylakrylátem (EMA) a PP nebylo dosaženo snížení trvalé deformace v porovnání se směsí analogického složení bez dynamické vulkanizace¹⁹, ale došlo k výraznému

vzrůstu pevnosti a tažnosti²². Mezi tzv. plně vulkanizované TPV se počítají jen ty, které mají koncentraci elasticky účinných řetězců sítě (síťovou hustotu) kaučukové fáze větší než $7 \cdot 10^{-5}$ mol cm^{-3} . Ta se běžně kontroluje objemovým botnáním v rozpouštědlech příslušného kaučuku.

Kromě dynamické vulkanizace se občas používá míchání jemné drti vulkanizovaného kaučuku s taveninou termoplastu. Takovým způsobem se vyrábí např. materiál s polyethylentereftalátovou (PETP) maticí¹⁶. Z hlediska mechanických vlastností je však dynamická vulkanizace nejvhodnější³. Existuje také možnost výroby TPV z TPO, např. typu EPM/PP, přidáním vulkanizačního činidla a následující dynamickou vulkanizací²⁵. Výhodou je přítomnost Zeiglerova-Nattova katalyzátoru, který slouží jako aktivátor vulkanizace, přímo v materiálu a předem vytvořená struktura směsi. Zkoumán byl také poměrně exotický způsob získání TPV z roztoku směsi ethylen-butylenový kaučuk/PP v propanu²⁶. Směs se míchala v kapalném propanu za vysoké teploty a tlaku kolem 65 MPa. Dále se přidávalo vulkanizační činidlo. Potom se směs vstříkovala za stálé teploty do speciální komory s normálním tlakem, nebo se chladila izobaricky. V prvním případě byl získán TPV s vláknitou strukturou a vysokou rázovou houževnatostí. Ve druhém byly domény kaučuku pórovité a materiál měl nízkou hustotu. Při opakovaném roztavení materiál neztratil svou morfologii. Nicméně, k průmyslové realizaci tento způsob rozhodně vhodný není.

3. Morfologie TPV

Z výše uvedeného vyplývá, že TPV jsou mikroheterogenní směsi a liší se od TPO a jiných TPE. Výzkumy dokázaly, že TPV jsou jemnou disperzí vulkanizovaného kaučuku v termoplastické matici, čímž se liší od kopolymerních TPE, které mají naopak termoplastické domény rozptýleny v kaučukové matici, a TPO, jejichž struktura je tvořena ko-kontinuálními fázemi^{3–5}. Jemné disperze může být dosaženo za podmínky poměrně blízkých hodnot povrchového napětí (smáčivosti) kaučuku a termoplastu⁴. Nejsou-li tyto hodnoty blízké, dochází v důsledku nesnášenlivosti polymerů ke změně rozložení molekulárních hmotností v hraničních vrstvách a velkému vnitřnímu napětí. Potom je nutno použít spojovacích činidel (kompatibilizátorů), které jako povrchově aktivní látky snižují povrchové napětí, brání sloučení kapek kaučuku a tvoří stabilnější hraniční vrstvy. Používají se v koncentraci 0,5 až 1 %. Běžně to jsou blokové nebo roubované kopolymery obsahující polární a nepolární části. Ty zajišťují interakce mezi fázemi. Chemické složení kompatibilizátorů často odpovídá složkám TPV.

Nejoblíbenějším činidlem k modifikacím směsí polymerů je maleinanhydrid^{26–29} a dále chlorovaný polyethylen, nebo fenolové a epoxidové pryskyřice, kterými se ze základního termoplastu nebo kaučuku roubováním získávají kompatibilizátory. Modifikace výrazně zlepšuje vlastnosti směsi i poměrně snášenlivých polymerů, jako je EPDM/PP (cit.¹⁵) a zejména nesnášenlivých, např. EPDM/polyamid 6 (PA-6, cit.^{22,27}). Je nutno uvést, že kompatibili-

zace zužuje pásmo ko-kontinuálních fází a občas může posunout fázovou inverzi²⁸. Jedním ze způsobů stanovení snášenlivosti polymerů je diferenciální řádkovací kalorimetrie (DSC). Jsou-li komponenty směsi zcela nesnášenlivé, rozdíl mezi teplotami jejich skelného přechodu se po zamíchání zvětší, s rostoucí snášenlivostí polymerů se tento rozdíl naopak zmenšuje. Při přípravě směsi polymerů je nutno nejenom správně vybrat komponenty o vhodné struktury a vhodných molekulárních hmotnostech, ale i podmínky míchání zajišťující potřebnou strukturu směsi^{22,29}.

Je známo, že menší rozdíl hodnot viskozity kaučuku a termoplastu usnadňuje míchání směsi a podporuje vznik jemnějších částic. Příliš malý rozdíl však může vyvolat problémy s fázovou inverzí^{3–5,17,19,22,30}. Při správném poměru viskozit a objemových dílů složek jsou polymery před začátkem vulkanizace ko-kontinuálními fázemi, nebo už je kaučuk dispergován v termoplastu, což usnadňuje míchání a tvoří jemnější směs. Proces dynamické vulkanizace podporuje vytvoření disperze kaučuku v termoplastu tím, že zvyšuje viskozitu kaučuku. Vhodný poměr viskozit může být dosažen mastikací kaučuku²⁰ před dynamickou vulkanizací, nebo přidáním oleje ke směsi²², který navíc dovoluje získat měkčí a více elastické druhy TPV. Některé publikace^{3,4,31} obsahují údaje, že většina přidaného oleje po vulkanizaci opouští termoplastickou fázi a koncentruje se v kaučuku a jeho menší část je obsažena v mezifázové oblasti. Ale podle jiných zdrojů³² olej chybí jen v krystalických oblastech termoplastu, amorfni oblasti jej obsahují poměrně velké množství. S tím lze souhlasit za předpokladu podobnosti polarit složek polymerní směsi, neboť pak amorfni fáze termoplastů musí mít k olejům (změkčovadlům) podobnou afinitu jako amorfni fáze kaučuků. Pochopitelně, čím více je termoplastu ve směsi, tím menší je objemový podíl oleje v něm. V každém případě proto bude větší objemový podíl oleje obsahovat kaučuk. Obsahuje-li směs plniva, např. talek, vytvoří v oleji suspenzi, což usnadní zpracování. Olej nesmí být prchavý a náchylný k migraci uvnitř směsi. Její morfologii výrazně ovlivňuje hodnota napětí způsobovaného střížnými silami během míchání směsi.

Stupeň vulkanizace kaučuku výrazně ovlivňuje vlastnosti a morfologii TPV. S obsahem kaučuku stoupá teplota tání TPV, což lze vysvětlit skutečností, že s obsahem kaučuku vzrůstá také rychlost jeho síťování³³. Zřejmě stoupá i stupeň sesíťování, neboť při větším podílu kaučuku ve směsi bude relativně menší část vulkanizačního systému přítomna v termoplastické fázi. Čím větší bude stupeň vulkanizace, tím výraznější (díky snižující se plasticitě a zvyšující se elasticitě kaučuku) bude hranice mezi fázemi, menší rozměr kaučukových domén a lepší mechanické vlastnosti TPV, díky lepší interakci mezi fázemi. Je známo, že i poměrně malý nárůst koncentrace příčných vazeb způsobuje znatelný růst pevnosti v tahu, snížení trvalé deformace, botnání v rozpouštědlech atd. S růstem stupně vulkanizace stoupá viskozita taveniny a zmenšují se velikosti domén i rozdíly mezi nimi³⁴.

Vlastnosti TPV výrazně ovlivňuje i krystalizace mat-

rice. Zpravidla mají TPV menší stupeň krystalizace termoplastické fáze než původní termoplast, a to pro větší množství poruch struktury, které brání růstu krystalických oblastí. Bylo zjištěno, že vulkanizované směsi kaučuků a termoplastů mají větší stupeň krystalizace než nevulkanizované, neboť v nich brání rozšíření krystalických oblastí rozsáhlá kaučuková fáze. Množství přidaného vulkanizačního činidla neovlivňuje stupeň krystalizace^{22,35}, ale čím větší je množství kaučukové fáze, tím větší je stupeň krystalizace termoplastické matrice. V TPV jsou totiž centry krystalizace domény kaučuku, navíc mezifázová oblast pevně spojená s kaučukem má větší náchylnost ke krystalizaci. Použití kompatibilizátorů vyvolává výrazný růst stupně a teploty krystalizace^{22,24,36,37}. Obsahuje-li směs olej, vysoký stupeň krystalizace brání jeho migraci v materiálu¹⁴.

4. Mechanické vlastnosti

Rozmezí hodnot mechanických a některých dalších vlastností TPV, důležitých z hlediska jejich aplikací, uvádí tab. I. Podle své povahy, jako jiné TPE, projevují TPV vlastnosti kaučuků i termoplastů. Možnost snadného získání materiálu s nízkou tvrdostí je velkou výhodou TPV, jelikož ostatní druhy TPE jen zřídka mají tvrdost nižší než 90 ShA (cit.^{3,4}). Je známo, že materiály s nižší tvrdostí mají větší rázovou houževnatost. Podobá-li se závislost napětí na deformaci tvrdých druhů TPV analogické závislosti termoplastů, pak měkké druhy se chovají spíše jako pryže stejné tvrdosti, ale potřebují delší dobu k uvolnění napětí. Například během zkoušky tahem nevzniká u většiny TPV krček, což je chování typické pro pryže. Je zajímavé, že čím nižší je teplota, tím více se vlastnosti vulkanizovaných kaučuků projevují. U směsi EPDM/PP bylo zjištěno, že při obsahu EPDM kolem 20 % projevuje materiál jen termoplastické vlastnosti, při 50 % EPDM již vysokou elasticitu, ale s evidentním vlivem termoplastu. Dokonce i při 87 % EPDM má termoplastická složka výrazný vliv na mechanické vlastnosti směsi³⁸. Se zvyšová-

ním obsahu EPDM ztužení materiálu výrazně klesá, klesá však také trvalá deformace.

Vysokou elasticitu TPV je možno vysvětlit následovně. Částice kaučuku různé velikosti ve formě blízké elipsoidu jsou rozptýleny v termoplastické matici a spojeny poměrně tenkými můstky termoplastu (tloušťka můstků je výrazně menší než poloměr částic kaučuku)³⁹, které však významně ovlivňují mechanické vlastnosti TPV. Mezi částicemi kaučuku jsou také celkem velké a tvrdé domény termoplastu. Při prvním namáhání rozlišujeme několik etap. Zpočátku se můstky pružně deformují. Potom se za zvýšeného napětí začínají plasticky deformovat a dosahovat meze ztužení. Během namáhání se ovšem částice kaučuku také deformují. Jejich deformace je omezena tvrdými termoplastickými doménami, které fungují jako tvrdé plnivo, nedeformují se, jen se pohybují ve směru deformační síly a přenášejí napětí dál. Protážení můstků dovoluje částicím kaučuku deformovat se ještě více. Po zrušení deformační síly se kaučukové částice navracejí k původnímu tvaru, můstky částečně relaxují, částečně se ohýbají. Tento ohyb můstků přispívá k menší trvalé deformaci tělesa v důsledku pevných vazeb mezi kaučukem a termoplastem v materiálu. Různé velikosti částic kaučuku jsou následovány různými velikostmi trvalé deformace můstků; proto čím menší budou rozdíly ve velikostech částic kaučuku, tím lepší budou mechanické vlastnosti směsi. Při prvním namáhání odporuje napětí většinou kaučuková fáze. S tím je spojen jev změkčení TPV po prvním namáhání za poměrně malých napětí⁴⁰. Pokles tuhosti při opakovaném namáhání byl pozorován i u pryže a nazván Mullinsovým efektem, ale v případě TPV má jinou podstatu.

TPV mají poměrně dobrou odolnost proti zvýšeným teplotám, zejména ve srovnání s TPO, ale horší, než mají teplotvzdorné pryže. Hodnota modulu pružnosti v ohybu a modulu pružnosti v tahu se podle tvrdosti TPV mění od hodnoty typické pro tvrdé pryže do hodnoty typické pro měkké plasty. Strukturální pevnost a odolnost vůči oděru mají TPV srovnatelnou s pryžemi na základě EPDM nebo chloroprenového kaučuku (CR). Také dynamické vlastnos-

Tabulka I
Přehled mechanických a některých dalších vlastností TPV

Vlastnosti	Rozpětí hodnot
Hustota, g cm ⁻³	0,94 až 0,97
Modul pružnosti v tahu, MPa	40 až 900
Pevnost v tahu, MPa	2 až 30
Tažnost, %	200 až 600
Trvalá deformace, %	6 až 60
Rázová houževnatost Charpy, kJ m ⁻²	>20
Tvrdost, Shore	28 A až 65 D
Tvarová stálost Vicat 5 kg, °C	40 až 80
Teplota použití, °C	-60 až 130
Měrný povrchový odpor, Ω m	10 ¹² až 10 ¹⁵
Nasákavost (za 24 h při 23°C a relativní vlhkosti 50 %), %	0,1

ti mají podobné jako běžné vulkanizované kaučuky. Lepší vlastnosti vykazují jen pryže na základě NR (cit.⁴). Teplotu křehnutí však mají mnohé TPV nižší. Podobně jako pryže mají TPV vysokou rázovou houževnatost a vynikající odolnost vůči trvalému namáhání, která je vyšší než u vulkanizátů některých běžných kaučuků. Údaje o trvalé deformaci materiálu jsou důležité např. pro výrobu různých těsnění, vložek apod. Trvalá deformace TPV je kolem 25 až 50 %, což je více, než mají pryže podobné tvrdosti. Je zřejmé, že čím větší je tvrdost TPV, tím větší je jeho trvalá deformace, což je spojeno s obsahem termoplastu a také s jemností směsi a stupněm vulkanizace částic kaučuku^{3,4}.

5. Odolnost k agresivním prostředím a atmosféře

Různé druhy TPV projevují v závislosti na jejich složení různou odolnost proti agresivním látkám a rozpouštědlům. Nicméně je zřejmé, že i nejběžnější kompozice EPDM/PP má odolnost vůči rozpouštědlům lepší než IR nebo NR. Teplotní odolnost takové kompozice je až 135 °C, což odpovídá teplotní odolnosti běžně používaných pryží. Směsi NBR/polyamid mají vynikající teplotní odolnost a odolnost proti horkým olejům. Jejich vlastnosti úplně odpovídají požadavkům, které jsou kladeny na pryže z NBR a epichlorhydrinových kaučuků. Většina TPV projevuje lepší odolnost proti mrazu, ozonu, UV záření a jiným vlivům atmosféry než běžně používané pryže^{4,41}.

6. Místo TPV mezi elastomery a perspektivní typy TPV

Na základě výše uvedených informací můžeme dospět k závěru, že TPV z hlediska ceny i fyzikálních a chemických vlastností mohou být ekvivalentní pryžím na základě BR, EPDM a CR nebo dokonce lepší. Některé druhy TPV mohou dlouhodobě pracovat v horkých olejích i při jiných nepříznivých podmínkách za stejnou nebo nižší cenu než analogické pryže. Výhodou je, že můžeme snadno regulovat jejich vlastnosti a vybírat nejvhodnější typy^{3,4}.

V současné době se rozšiřuje vývoj nových perspektivních typů TPV. Rozvoj probíhá ve směrech použití nově vyvinutých komponentů, modernizace technologie, získání nových vlastností, vývoje nových směsí. V poslední době byly provedeny experimenty s kopolymery EVAC, EMA a silikonovými kaučuky. Šíří se použití modifikátorů. Zkoumají se nová vulkanizační činidla, např. směsi silanů a diolů.

V roce 1999 byl vyvinut TPV na základě ethylenoktenového kaučuku modifikovaného organosilanem a PP, který nepotřebuje sušení komponentů během výroby ani produktu během zpracování¹⁴, což dovoluje odstranit značnou nevýhodu TPV.

Zajímavý materiál byl získán na základě směsi SBR/PA. Má poměrně dobré mechanické vlastnosti a vysokou

rázovou houževnatost, podle své elasticity se nachází na hranici mezi termoplastickými elastomery a vysoce houževnatými termoplasty. Je zajímavé, že sesítování kaučuku proběhlo bez vulkanizačního činidla a směs neobsahuje kompatibilizátory^{20,42}.

Perspektivní jsou TPV na základě NR a polyolefinů z důvodu dobré snášenlivosti a dobrých mechanických vlastností^{43,44}. Velmi zajímavé vlastnosti má Zeotherm od firmy Zeon Chemicals, vyrobený na základě směsi akrylátový kaučuk (ACM)/PA. Má vynikající odolnost proti olejům a zvýšeným teplotám. Vysokopevnostní materiály byly získány na základě polyethylenmethakrylátu a polybutylentereftalátu²⁸. Nicméně je nutno říci, že v současné době se většinou používají TPV na základě EPDM, EPM a NBR a termoplastickou maticí je obvykle PP nebo PA. Takovýto stav je pravděpodobně důsledkem širokého použití jmenovaných složek a jejich poměrně nízké ceny.

7. Zpracování

Zpracování TPV má výhody a nedostatky zpracování termoplastů. K výhodám patří, že se snadno zpracovávají jako termoplasty, což je levnější a rychlejší než vulkanizace. Navíc je možné použít zařízení, která se používají při zpracování termoplastů. TPV může být také snadno barven přidáním speciální barvy pro termoplasty. Je to obvykle koncentrát pigmentu v termoplastu snášenlivém s materiálem matrice. Samozřejmě, je zde možnost recyklovat technologický odpad a nekvalitní výrobky. Vážným nedostatkem valně většiny TPV je nutnost opatrného sušení surovin před zpracováním, opět podobně jako u termoplastů. Stupeň sušení většinou záleží na materiálu matrice, například polypropylen může být zpracován při větším obsahu vody než polyamid. Běžně platí, že matrice vyrobené polymerací jsou méně náchylné k degradaci než polykondzáty; maximální opatrnosti je zapotřebí při zpracování polyesterů. Různé způsoby zpracování také potřebují různý stupeň sušení, např. vytlačování je k obsahu vlhkosti tolerantnější než vstřikování. Nejdůležitější výhodou je, že TPV se dodává ve formě granulátu, který po sušení může být snadno použit, zatímco při výrobě vulkanizátů musejí být složky kaučukové směsi napřed smíchány a směs potom vulkanizována, což spotřebuje hodně času a energie^{3,4}.

Často se přidávají plniva za účelem zlepšení vlastností nebo snížení ceny. Zatím je málo zkoumán vliv nanočástic na vlastnosti TPV. Wu a Chu⁴⁵ uvedli údaje o možnosti výroby nanokompozitu na základě TPV (EPDM/PP) a nanočástic oxidu křemíku. PP byl modifikován malein-anhydridem a oxid křemíku hexadecyltrimethylamoniumbromidem. Došlo ke zvětšení hodnot pevnosti a modulu pružnosti v tahu a snížení hodnoty tažnosti. Zjištěný vzrůst stupně krystalizace byl přičten vlivu malein-anhydridu, zatímco nanočástice stupeň krystalizace neovlivnily^{45,46}. Nagatani a spol.⁴⁷ přidávali modifikovanou celulosu, což výrazně zvýšilo rázovou houževnatost. Bez modifikace složek nemá kompozice dobré mechanické vlastnosti. Zvýšení množství malein-anhydridu vedlo k usnadnění disper-

gace nanočástic a zlepšení mechanických vlastností. Proti tomu však svědčí některé údaje Mírzazadeha a Katbaba⁴³. Ti našli na analogické kompozici (EPDM/PP), že přidávkou celulosového plniva stupeň krystalizace a také stupeň vulkanizace kaučuku klesly, možná v důsledku adsorpce síry nanočásticemi. Toto plnivo vyvolalo mírný růst tvrdosti a modulu pružnosti, výrazný růst rázové houževnatosti a mírně snížilo pevnost. Byl vyvinout zajímavý způsob recyklace pneumatik⁴⁸. Drčená a termicky degradovaná pryž se přidávala do směsi EPDM/polyethylen o nízké hustotě (PE-LD) nebo NR/PE-LD a vulkanizovala se sírou nebo dikumylperoxidem. Přídavek surového kaučuku dovolil získat dobrou adhezi mezi maticí a pryží.

Zajímavou vlastností TPV je, že viskozita taveniny výrazně závisí na smykovém napětí. Růst smykového napětí vyvolává značné snížení viskozity, zatímco stoupání teploty způsobí jen její mírné klesání. Tento jev se projevuje výrazněji u TPV než u běžných termoplastů, zřejmě kvůli aglomerátům částic vulkanizovaného kaučuku, které jsou spojeny společnou termoplastickou maticí. Proto při malých namáháních projevují TPV výrazně vyšší viskozitu. Při větších se aglomeráty rozrušují a viskozita poměrně prudce klesá, což dovoluje zpracování při nižších teplotách a široce se proto tohoto jevu využívá^{3,4,49}. Ve směsi obsahující do 40 % kaučuku je vliv termoplastické matrice na reologické vlastnosti dominantní. S narůstáním obsahu kaučuku stoupá viskozita směsi a její závislost na smykovém napětí.

Nejběžnějšími způsoby zpracování TPV jsou vytlačování, lisování, válcování, vstřikování a vyfukování. TPV projevují dobrou adhezi k podobným materiálům, což dovoluje vyrábět dvou a vícevrstvé výrobky. Pro spojování s jinými materiály (např. kovy) se používají různé druhy lepidel¹⁴. Zpracování TPV musí probíhat za stejné nebo poněkud vyšší teploty, než za které probíhala jejich výroba. Morfologie materiálu se nemění, jen částice kaučuku mění svůj tvar (např. na elipsoidní). Po zpracování občas narůstá stupeň krystalizace termoplastické matrice^{22,50}.

8. Předpověď vlastností TPV podle charakteristik jejich složek

Na základě diskutovaných údajů můžeme vyvodit vztahy mezi vlastnostmi základních složek směsi a získaného výsledného materiálu^{4,30}. Je zřejmé, že hodnoty takových veličin, jako jsou pevnost v tahu, modul pružnosti a tažnost, ukazují alespoň hranice, uvnitř kterých se mohou nacházet mechanické vlastnosti předpokládaného TPV. Samozřejmě, že pevnost nebude vyšší než pevnost termoplastu a elasticita bude nižší než pryže.

Poměrně silně na mechanické vlastnosti působí stupeň krystalizace termoplastické složky. Jeho vzrůst zlepšuje jak mechanickou integritu materiálu, tak jeho elastické zotavení⁴.

Při výběru páru elastomer-termoplast je nutno věnovat pozornost rozdílu hodnot kritického povrchového napětí, resp. smáčivosti (některé zdroje používají hodnotu měrné energie koheze). Obě dvě odpovídají energii in-

terakce makromolekul složek a vyjadřují hodnotu napětí mezi fázemi materiálu při míchání. Pochopitelně, že čím nižší je napětí mezi fázemi při míchání, tím větší homogenitu materiál získá. Při rozdílu hodnot kritického povrchového napětí 10 mN m^{-1} už nemohou být žádané mechanické vlastnosti dosaženy a je nutno použít spojovacích činidel (kompatibilizátorů)^{3,4}.

Délky segmentů makromolekul uvažovaných materiálů jsou také důležité. Pochopitelně, čím kratší je segment, tím pohyblivější je makromolekula. Vysoká pohyblivost makromolekuly dovoluje vznik vláknitých struktur, které pronikají do druhé fáze a tím zlepšují mechanické vlastnosti výsledného materiálu⁴.

9. Závěr

Termoplastické elastomery jsou poměrně mladou, ale už široce využívanou skupinou polymerních materiálů^{1,2}. Jejich různé druhy mají velmi různé chemické složení a morfologii. Jejich používání stále stoupá díky jednoduché a poměrně levné technologii zpracování. Nejvíce je to zřejmé u velmi dynamicky se rozvíjející podskupiny termoplastických vulkanizátů, které nepotřebují drahá zařízení k výrobě a mají široký rozsah svých vlastností, vhodných pro nejrůznější aplikace. Právě z tohoto důvodu však lze v oblasti TPV očekávat další významné výzkumné aktivity, zejména na poli zpracování polymerů.

Tato práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT ČR č. MSM 6046137302.

Použité zkratky

ABS	kopolymer akrylonitrilu s butadienem a styrenem
ACM	akrylátový kaučuk
BR	butadienový kaučuk
CR	chloroprenový kaučuk
EMA	kopolymer ethylenu s methylmethakrylátem
EPDM	ethylen-propylen-dienový kaučuk
EPM	ethylen-propylenový kaučuk
EVAC	kopolymer ethylenu s vinylacetátem
IIR	isobutylem-isoprenový kaučuk (butylkaučuk)
IR	isoprenový kaučuk
NBR	butadien-akrylonitrilový kaučuk (nitrilkaučuk)
NR	přírodní kaučuk
PA	polyamid
PA-6	polyamid 6
PE	polyethylen
PE-LD	polyethylen o nízké hustotě (rozvětvený)
PETP	polyethylentereftalát
PP	polypropylen
PS	polystyren
SAN	kopolymer styrenu s akrylonitrilem
SBR	butadien-styrenový kaučuk
TPE	termoplastický elastomer
TPO	termoplastický polyolefin
TPV	termoplastický vulkanizát

LITERATURA

1. Ducháček V.: Chem. Listy 91, 23 (1997).
2. Ducháček V.: Chem. Listy 92, 656 (1998).
3. Rader C., v knize: *Handbook of Thermoplastic Elastomers* (Walker B., Rader C., ed.), str. 85. Reinhold, New York 1988.
4. Coran A. Y., v knize: *Thermoplastic elastomers* (Legge N. R., Holden G., Schroeder H. E., ed.), str. 146. Hanser, Munich 1987.
5. Švarc A., Dinzburg B.: *Sovmesčenie kaučukov s plastikami i sintetičeskimi smolami*, kap. 1. Chimija, Moskva 1989.
6. Solodovnik V.: *Mikrokapsulirovanie*, kap. 2. Chimija, Moskva 1980.
7. Bussink J., Hendrik T., van de Gram P. E. L. (ed.): *Polymer Blends*. Wiley, Weinheim 2005.
8. Utracki L. A., v knize: *Two-Phase Polymer Systems* (Utracki L. A., ed.), kap. 1. Hanser, Munich 1991.
9. Khayat R. E., Luciani A., Utracki L. A.: Eng. Anal. Bound. Elem. 19, 279 (1997).
10. Khayat R. E., Huneault M. A., Utracki L. A., Duquette R.: Eng. Anal. Bound. Elem. 21, 155 (1998).
11. Grmela, M., Ait-Kadi A., Utracki L. A.: J. Non-Newtonian Fluid Mech. 77, 253 (1998).
12. Khayat R. E., Luciani A., Utracki L. A., Godbilled F., Picot J.: Int. J. Multiphase Flow 26, 17 (2000).
13. Lyngaae-Jørgensen J., Utracki L. A.: Polymer 44, 1661 (2003).
14. Fritz H. G., Bolz U., Cai Q.: Polym. Eng. Sci. 39, 1087 (1999).
15. Murillo E. A., López B. L.: Macromol. Symp. 242, 131 (2006).
16. Papke N., Karger-Kocsis J.: Polymer 42, 1109 (2001).
17. Choplin L.: Polym. Eng. Sci. 11, 2222 (2002).
18. Verbois A., Cassagnau P., Michel A., Guillet J., Raveyre C.: Polym. International 53, 523 (2004).
19. Pesneau I., Champagne, M. F.: Polym. Eng. Sci. 42, 2016 (2002).
20. Ducháček V., Součková M.: J. Polym. Eng. 13, 305 (1994).
21. Naskar K., Kokot D., Noordermeer J. W. M.: Polym. Degrad. Stab. 85, 831 (2004).
22. Oderkerk J., Groeninckx G.: Polymer 43, 2219 (2002).
23. Nakason C., Wannavilai P., Kaesaman A.: Polym. Test. 25, 34 (2006).
24. Dolinskaja R., Migal S.: Kauch. Rezina 1998 (2), 10.
25. Bacci D., Marchini R., Scrivani M.: Polym. Eng. Sci. 44, 131 (2004).
26. Han S. J., Lohse D. J., Radosz M., Sperling L. H.: J. Appl. Polym. Sci. 77, 1478 (2000).
27. Liu X., Huang H., Xie Z., Zhang Yong, Zhang Yin Xi, Sun K., Min L.: Polym. Test. 22, 9 (2003).
28. Martin P., Maquet C., Legras R., Bailly C., Leemans L., van Gurp M., van Duin M.: Polymer 45, 5111 (2004).
29. van Duin M., Machado A.: Polym. Degrad. Stab. 90, 340 (2005).
30. Volfson S., Potapova G.: Kauch. Rezina 1996 (2), 34.
31. Winters R., Lugtenburg J.: Polymer 42, 9745 (2001).
32. Sengers W. G. F., Wübbenhorst M., Picken S. J., Gottsis A.D.: Polymer 46, 6391 (2005).
33. Machado A. V., van Duin M.: Polymer 46, 6575 (2005).
34. Ellul M. D., Tsubo A. H., Hu W.: Polymer 45, 3351 (2004).
35. Lai S. M., Chiu F. C., Chiu T. Y.: Eur. Polym. J. 41, 3031 (2005).
36. Huang H., Liu X., Ikehara T., Nishi T.: J. Appl. Polym. Sci. 90, 824 (2003).
37. Migal S.: Kauch. Rezina 1999 (1), 9.
38. Boyce M. C., Kear K., Socrate S., Shaw K.: J. Mech. Phys. Solids 49, 1073 (2001).
39. Boyce M. C., Socrate S., Kear K., Yeh O., Shaw K.: J. Mech. Phys. Solids 49, 1323 (2001).
40. Boyce M. C., Yeh O., Socrate S., Kear K., Shaw K.: J. Mech. Phys. Solids 49, 1343 (2001).
41. Migal S.: Kauch. Rezina 1999 (2), 7.
42. Součková M.: *Disertační práce*. VŠCHT, Praha 1995.
43. Mirzazadeh H., Katbab A.: 8th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies, Budapest, 13 – 16 Sept. 2005, Book of Abstracts (Marosi G., ed.), Poster no. 2.
44. Nakason C., Nuansomsri K., Kaesaman A., Kiatkamjornwong S.: Polym. Test. 25, 782 (2006).
45. Wu T., Chu M.: J. Appl. Polym. Sci. 98, 2058 (2005).
46. Chow W. S., Bakar A. A., Ishak M., Karger-Kocsis J., Ishiaku U. S.: Eur. Polym. J. 45, 687 (2005).
47. Nagatani A., Endo T., Hirotsu T., Furukawa M.: J. Appl. Polym. Sci. 95, 144 (2005).
48. Kumar C., Fuhrmann I., Karger-Kocsis, J.: Polym. Degrad. Stab. 76, 137 (2002).
49. Goharpey F., Nazockdast H., Katbab, A. A.: Polym. Eng. Sci. 45, 84 (2005).
50. He H., Zou H., Zhao S.: J. Appl. Polym. Sci. 102, 1374 (2006).

S. Dubinin and V. Ducháček (Department of Polymers, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic): **Thermoplastic Vulcanizates**

Thermoplastic vulcanizates, dispersions of fully vulcanized rubber in a thermoplastic matrix, are a young but already widely used group of thermoplastic elastomers. Although a special mixing process is needed for their production, their processing is easy. Thermoplastic vulcanizates show properties suitable for various applications.

ELEKTRÓNOVÝ TRANSFER V AMPÉROMETRICKÝCH BIOSENZOROCH

VLADIMÍRA POLOHOVÁ
a MAJA ŠNEJDÁRKOVÁ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
vladimira.polohova@savba.sk

Došlo 23.10.06, prepracované 21.3.07, prijaté 21.6.07.

Kľúčové slová: ampérometrický enzýmový biosenzor, priamy elektrónový transfer, nanoštruktúry

Obsah

1. Úvod
2. Ampérometrické biosenzory – definícia a delenie
3. Sprostredkovaný a priamy elektrónový transfer
 - 3.1. Prvá a druhá generácia ampérometrických biosenzorov
 - 3.2. Priamy elektrónový transfer – tretia generácia ampérometrických biosenzorov
4. Použitie nanočastíc na uľahčenie elektrónového transferu

1. Úvod

Začiatok vývoja biosenzorov môžeme datovať od roku 1962 keď Clark a Lyons¹, Updike a Hicks², Guilbault³ a ďalší autori v oblasti bioelektrochemického výskumu využili katalytické vlastnosti enzýmov k vývoju biosenzorov. Podstatu biosenzora tvorí spojenie biologickej látky schopnej na molekulárnej úrovni špecificky rozoznávať analyzovaný biologický element a fyzikálneho prevodníka schopného detegovať chemický signál a premeniť ho na fyzikálny. Biosenzory sú analytické nástroje, ktoré môžu byť použité na selektívne stanovenie koncentrácie rôznych látok v zložitých roztokoch a predstavujú potenciálne uplatnenie v širokej oblasti výskumu a praxe, kde je dopyt po rýchlej, lacnej a presnej analýze. V prípade ampérometrických techník je základným procesom elektrónový transfer medzi analytom reagujúcim s biologickou rozpoznávacou molekulou (napr. oxidačno-redukčným enzýmom) a prevodníkom, ktorým je elektródový materiál. Rýchlosť elektrónového transferu však môže byť ovplyvnená viacerými faktormi ako napríklad uložením redoxného centra hlboko vo vnútri terciárnej štruktúry polypeptidov⁴, a tým aj jeho efektívnou izoláciou

od okolitého prostredia bielkoviny⁵, alebo denaturáciou bielkoviny pri absorpcii na povrch elektródy⁶, ako aj nevhodnou orientáciou bielkoviny na povrchu elektródy⁷. Spôsoby, ktorými je možné dosiahnuť účinnú elektrickú komunikáciu a nábojový prenos, v značnej miere závisia na postupe prípravy aktívneho povrchu elektródy. Z tohto hľadiska sa môžu rozdeliť ampérometrické biosenzory na tri generácie, ktoré budú charakterizované v predkladanej práci, pričom hlavný dôraz bude kladený na postupy pri konštrukcii tretej generácie biosenzorov s možnosťou priameho elektrónového transferu a bude načrtnuté aj možné využitie nanotechnológií v tejto oblasti.

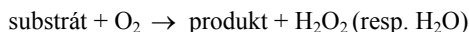
2. Ampérometrické biosenzory – definícia a delenie

Biosenzorová technológia je oblasť, ktorá spája viaceré vedecké disciplíny ako biológiu, chémiu, fyziku a matematiku, ktoré sa navzájom prelínajú a dopĺňajú, pričom výsledným produktom je biosenzor. Pre biosenzor je charakteristické a súčasne nevyhnutné spojenie biologicky citlivého materiálu s prevodníkom. Najrozšírenejšia a akceptovaná definícia charakterizuje biosenzor ako analytické zariadenie pozostávajúce z biologického rozpoznávacieho elementu (napr.: enzým, protilátka, antigén, receptor, oligonukleotid, biomembrána, bunková organela, tkanivo, celá bunka), ktorý je v tesnom kontakte s vhodným meničom (napr.: elektrochemický, optický, piezoelektrický, termálny) a ktorý konvertuje biologickú rozpoznávaciu reakciu alebo biokatalytický proces na merateľný signál⁸.

Najčastejšie použitý prístup pri návrhu biosenzorov predstavujú ampérometrické enzýmové biosenzory⁹, ktoré patria do skupiny enzýmových elektród, keďže kombinujú elektrochemický prevodník s enzýmovým biokomponentom. Ampérometria je metóda založená na meraní prúdu generovaného z elektrochemickej oxidácie alebo redukcie elektroaktívnych látok. Oxidáciu alebo redukciu spôsobuje aplikované konštantné napätie, ktoré predstavuje elektrochemickú riadiacu silu a elektroaktívne látky sú produktom oxidačno-redukčných enzýmov (tzv. oxidoreduktáz).

Oxidoreduktázy katalyzujú elektrónový transfer v oxidačno-redukčných reakciách¹⁰, pričom oxidovaný substrát je považovaný za donora vodíka alebo elektrónov. Medzi všeobecne používané patria oxidázy, nikotínamidadeníninukleotid (NAD⁺) dependentné dehydrogenázy, pyrolochinolínchinón (PQQ) dependentné dehydrogenázy, peroxidázy a multikofaktorové enzýmy obsahujúce primárne redoxné centrum (flavínadeníninukleotid (FAD) alebo PQQ) vnútorne prepojené s elektrónovým akceptorom (hémovými centrami)¹¹. V ampérometrických biosenzoroch sú najčastejšie používané oxidázy¹², ktoré katalyzujú oxidáciu substrátu, pričom v tomto procese akceptujú

elektróny a menia sa na redukovanú formu. Pri navrátení sa do ich aktívneho oxidovaného štádia prenášajú elektróny na svoj prirodzený kosubstrát a elektrónový akceptor molekulu kyslíka, pričom vzniká peroxid vodíka alebo voda¹³:



Keďže kyslík aj peroxid vodíka sú elektroaktívne molekuly, biochemickú reakciu a tým aj koncentráciu reagujúceho substrátu môžeme sledovať prostredníctvom koncentračných zmien¹⁴:

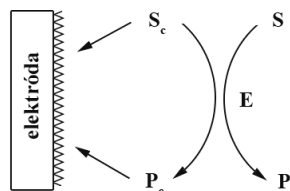
- zvyšujúcou sa koncentráciou H_2O_2 (oxidácia H_2O_2 na pracovnej elektróde),
- znižujúcou sa koncentráciou, spotrebou O_2 (redukcia O_2 na pracovnej elektróde).

Koncentračné zmeny sú elektrochemicky detegované a priamo úmerné koncentrácii substrátu. Takýto typ ampérometrických biosenzorov, kde je sledovanie detegovanej látky založené na prirodzených podmienkach enzýmovej reakcie oxidáz, radíme do ampérometrických biosenzorov prvej generácie. V prípade druhej generácie ampérometrických biosenzorov je prirodzený elektrónový akceptor kyslík, nahradený tzv. mediátorom – redoxnou látkou, zvyčajne s nízkou molekulovou hmotnosťou. Ak je elektrón priamo prenášaný z enzýmu na elektródu (alebo naopak), hovoríme o priamom elektrónovom transfere a tretej generácii ampérometrických biosenzorov.

3. Sprostredkovaný a priamy elektrónový transfer

3.1. Prvá a druhá generácia ampérometrických biosenzorov

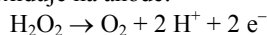
Prvá generácia je založená na elektroaktivite produktu (alebo substrátu) enzýmovej reakcie, ktorý sa voľne rozptýli k elektróde a spôsobí vznik elektrického signálu (obr. 1). Najjednoduchšie ampérometrické biosenzory sú založené na Clarkovej kyslíkovej elektróde, ktorá sa používa na meranie koncentrácie kyslíka. Kyslík sa pri negatívnom potenciáli redukuje a redukčný prúd je priamo úmerný jeho koncentrácii v roztoku¹⁵. Výhodou tohto usporiadania je, že sa pracuje pri negatívnom potenciáli,



Obr. 1. Princíp prvej generácie biosenzorov; S – substrát, P – produkt, E – enzým, S_c – kosubstrát, P_c – koprodukt

pri ktorom interferuje len veľmi málo endogénnych látok. Limitujúcim faktorom je koncentrácia kyslíka, jednak jeho nedostatočné množstvo vo vzorke a jednak jeho meniaci sa koncentrácia počas merania, čo má vplyv na lineárny merací rozsah biosenzora, na jeho presnosť a reprodukovateľnosť^{16–19}.

Ďalšia alternatíva pri sledovaní biochemickej reakcie je založená na detekcii oxidácie peroxidu vodíka. Aplikáciu potenciálu 0,6–0,7 V na elektródu zo vzácného kovu (napr. Pt, Au) oproti referenčnej elektróde sa peroxid vodíka oxiduje na anóde:



a dochádza ku generovaniu signálu. Na tomto princípe pracuje aj prvý komerčne dostupný elektrochemický biosenzor, ktorý uviedla na trh v roku 1975 americká spoločnosť Yellow Springs Instruments²⁰. Tento glukózový biosenzor sa osvedčil ako vysoko úspešný a získal si priaznivé prijatie v klinických aj nemocničných laboratóriách pre jeho spoľahlivosť a presnosť merania koncentrácie krvnej glukózy²¹. Niektoré ďalšie príklady biosenzorov prvej generácie a ich parametre sú uvedené v tabuľke I.

K pozitívam tohto typu biosenzora patrí rýchlejšia odpoveď, vyššia citlivosť ako pri detekcii kyslíka a tiež lepšia možnosť miniaturizácie¹². Nevýhody sú v aplikácii vysokého pracovného napätia, pri ktorom sa oxidujú aj rôzne iné elektroaktívne látky ako napr. kyselina askorbová, kyselina močová, glutatión a cysteín^{17,29}. Kvôli týmto interferenciám sa používajú ochranné membrány na pracovnej elektróde, ich stúpajúca hrúbka však predlžuje čas odpovede systému. Ďalšou nevýhodou je závislosť na fluktuáciách kyslíka ako v prípade biosenzorov založených na detekcii kyslíka.

V snahe predísť hlavným nedostatkom prvej generácie ampérometrických biosenzorov boli navrhnuté ako elektrónové prenášače nové redoxné látky, schopné recyklovať molekulu enzýmu pri nižšom pracovnom napätí. Tieto látky sa nazývajú mediátory. Mediátory sú umelé elektrónové prenášače, zvyčajne s nízkou molekulovou hmotnosťou, schopné preniknúť k aktívnemu miestu enzýmu, reagovať tam a následne sa rozptýliť von a reagovať s povrchom elektródy³⁰ (obr. 2). Mediátory sú molekuly s rôznorodou štruktúrou a vlastnosťami, so širokým rozsahom redoxných potenciálov (tab. II).

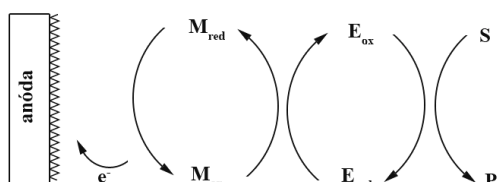
Použitie mediátorov má veľký význam aj v prípade enzýmov, ktorých kosubstráty sa regenerujú na povrchu elektród pri veľmi vysokých napätiach. Napríklad NAD^+ -dependentné dehydrogenázy na rozdiel od oxidáz neobsahujú aktívne redoxné centrum zabudované priamo v molekule enzýmu, ale plnia svoju katalytickú funkciu pomocou voľne rozptýleného kofaktora NAD^+ . Pre regeneráciu NADH na platinovej elektróde je potrebné napätie až 1,1 V, čo spôsobuje počas dlhšieho používania elektródy jej neúmerne zanášanie oxidačnými produktmi vysokej molekulovej hmotnosti a vznik dimérov³¹. Prostredníctvom mediátora sa zabezpečí oxidácia NADH a jeho elektrokatalytická regenerácia pri nižších potenciáloch (blízkyh potenciálu redoxnej dvojice mediátora).

Molekuly mediátora by mali vykazovať nasledovné

Tabuľka I
Príklady glukózových biosenzorov prvej generácie s GOx bioreceptorom

Systém	E_W [mV]	S	LR [mmol l ⁻¹]	K_m [mmol l ⁻¹]	T [s]	D_L [μmol l ⁻¹]	Lit.
Uhlíková elektróda modifikovaná Pt, Pd s adsorbovanou GOx	0	0,044 A(mol/l) ⁻¹	0,3	0,320±0,03	120	10	22
Uhlíková elektróda modifikovaná Pt, Pd s adsorbovanou GOx	50	0,041 A(mol/l) ⁻¹	0,3	–	–	–	22
Polypyrolová matica so zachytenou GOx	650	0,23·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	10	–	2	–	23
Polymérová matica z dopaminovej oxidácie so zachytenou GOx	600	–	0,05–9	9,6	15	3	24
Biotinylovaná fosfolipidová dvojvrstva na pevnom povrchu so streptavidín-GOx	670	–	7	10	45	100	25
Porózna polymerická matica so zachytenou GOx	600	6,82·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,005–3	7,3	30	0,5	26
Biotinylovaná fosfolipidová membrána na pevnom podklade s avidín-GOx	670	–	10	0,66±0,18	40	100	27
Tiolová SAM s kovalentne naviazanou GOx	670	6,88·10 ⁻⁶ A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	–	6,84±0,73	149 ± 17	200	28
Tiolová SAM s dendrimérom s kovalentne naviazanou GOx	670	0,53·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	1,5	1,01±0,27	74 ± 7	6	28

Pozn: E_W – pracovný potenciál, S – citlivosť alebo špecifická citlivosť podľa referencie, LR – lineárny rozsah, K_m – zdanlivá Michaelis-Mentenovej konštanty, D_L – detekčný limit, T – čas odozvy systému. Pt, Pd modifikovaná uhlíková elektróda s adsorbovanou GOx zachytenou želatínou



Obr. 2. Operačný princíp sprostredkovaného elektrónového transferu v druhej generácii biosenzorov; S – substrát, P – produkt, E_{ox} , E_{red} – oxidovaný, redukovaný enzým, M_{ox} , M_{red} – oxidovaný, redukovaný mediátor

dôležité vlastnosti^{20,31–33}:

- rýchlu homogénnu kinetiku pre enzýmovú reakciu v roztoku,
- reverzibilnú kinetiku elektrónového transferu na povrchu elektródy,
- nízky a na pH nezávislý potenciál na regeneráciu

Tabuľka II
Niektoré mediátory používané s glukózooxidázou

Mediátor	Redox potenciál (oproti SCE) [mV]
1,1'-Dimetylferecén	100
Ferecén	165
Vinylferecén	250
Ferecénkarboxylová kyselina	275
(Hydroxymetyl)ferecén	185
Hexakyanidrubenát [Ru(CN) ₆] ⁴⁻	685
Benzochinón	39
N-Metylfenazínium (NMP)	-161
Tetratiafulvalén (TTF)	300
Tetrakyanchinodimetán (TCNQ)	127
Ferokyanid [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180

- oxidovanej formy,
 - stabilitu v oxidovanej aj redukovanej forme,
 - redukovaná forma by nemala reagovať s kyslíkom.
- Ďalším dôležitým faktorom, ktorý by sa mal brať do

úvahy pri použití elektrónového mediátora je jeho imobilizácia do enzýmovej vrstvy. V najjednoduchších usporiadaniach sú enzým aj mediátor voľne rozptýlené v roztoku, vtedy ide o tzv. homogénny transfer³⁴. Táto konfigurácia ale nie je vhodná pri aplikácii v biosenzoroch³⁵ a používa sa skôr na určenie rýchlostných konštánt pri enzým-mediátorovej reakcii a na meranie reakčnej rýchlosti medzi mediátorom a redoxným centrom enzýmu^{36,37}. O heterogénnom transfere hovoríme, keď je imobilizovaný buď enzým alebo mediátor, alebo sú imobilizované oba komponenty súčasne. V tomto prípade dochádza k početným kombináciám usporiadania biosenzora. Mediátor môže byť imobilizovaný nekovalentnými metódami (napr. v uhlíkovej paste alebo na jej povrchu³⁸, alebo fyzikálne zachytený v matrixe kombinovaných elektród⁴³, či vo vodivých polyméroch⁴⁴), ktorých hlavnou nevýhodou, obmedzujúcou ich praktické použitie, je uvoľňovanie mediátora z elektródy. Aby nedochádzalo ku kontaminácii vzorky, často sa pristúpi ku kovalentnému naviazaniu mediátora. Takéto usporiadania biosenzora, kde sú oba komponenty (enzým aj mediátor) pevnou súčasťou aktívnej vrstvy, neuvolňujú sa z nej a nie je potrebné ani pridanie ďalšieho činidla, sa nazývajú tzv. bezreagenčné biosenzory a javia sa z hľadiska použiteľnosti biosenzora veľmi vý-

hodné. Konštrukcia bezreagenčných biosenzorov je možná len s enzýmami s pevne viazaným redoxným centrom a elektrónový transfer sa uskutočňuje buď priamym elektrónovým tunelovaním (bude opísané v časti 3.2.) alebo prostredníctvom pevne imobilizovaných redoxných prenášačov („redox relays“)⁴⁵.

Mediátory môžu byť kovalentne imobilizované buď na povrch elektródy, do matrixu alebo na samotný enzým. V poslednom prípade hovoríme o tzv. elektroenzýmoch^{46–48}. Pri tomto prístupe sa predpokladá, že naviazaný mediátor skráti vzdialenosť elektrónového transferu medzi hlboko uloženým redoxným centrom enzýmu a povrchom elektródy. Elektroenzýmy rozpustené v roztoku zvyčajne aj vykazujú rýchlu kinetiku elektrónového transferu s elektródou^{49,50}. Ale ich kovalentná imobilizácia na kostru vodivého polyméru – polypyrolu má za následok len malé prúdové signály⁵¹. A to aj napriek tomu, že mediátory boli na enzým naviazané prostredníctvom flexibilných reťazcov („spacer chains“), čím bola zvýšená ich pohyblivosť vo vrstve. Predpokladá sa, že naviazaný mediátor sa „prehupne“ tesne k aktívnemu centru enzýmu („whip-mechanism“) a po tomto prvom kroku elektrónového transferu je elektrón prenášaný *I*) buď na ďalšie mediátory naviazané na susediacich enzýmoch („electron-hopping

Tabuľka III
Príklady senzorov druhej generácie

Systém a mediátor	E_w [mV]	S	LR [mmol l ⁻¹]	K_m [mmol l ⁻¹]	T [s]	D_L [μmol l ⁻¹]	Lit.
Fenoxazínom modifikovaná GOx	400	–	3–8	65,6 ± 8,1	120	3000	2
Zlaté NP s GOx, s rozpustným Fc	300	8,8±0,2 A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,02–5,7	4,3	8	8,2	4
Polypyrolová matica so zachytenou GOx a Fc	400	1,5·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	10	–	2	–	23
Kobaltový pentamér s imobilizovanou GOx	400	–	11	14,91 ± 0,46	5	10	8
Zlaté NP s dendrimérom s imobilizovanou HRP s rozpustným hydrochinómom	–	530 A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,01–2,5	0,52	–	2	9
Grafit teflónová matica so zachytenými LOD a HRP s Fc	0	(2,98±0,06)·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹	0,005–0,1	–	–	0,9	43
polymérová matica modifikovaná Os komplexom s imobilizovanou QH-ADH	300	0,336±0,025 A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,001–0,25	183 ± 11	–	1	52
Os-Modifikovaný vodivý polymér s imobilizovanou HRP	-50	0,12·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹	0,13	–	75	–	54
Os-Modifikovaný vodivý polymér s imobilizovanou TOP	-50	0,06·10 ⁻³ A(mol/l) ⁻¹	0,05	–	25	–	54

Pozn: E_w – pracovný potenciál, S – citlivosť alebo špecifická citlivosť podľa referencie, K_m – zdanlivá Michaelis-Mentenovej konštanta, D_L – detekčný limit, T – čas odozvy systému, NP – nanočastice, Fc – ferocén, HRP – chrenová peroxidáza, LOD – laktát oxidáza, QH-ADH – chinoxhemoproteín alkoholdehydrogenáza, TOP – tabaková peroxidáza

mechanism⁴⁾ až k povrchu elektródy 2) alebo sa transfer elektrónu uskutoční cez vodivý polymér, ktorý predstavuje molekulárny drôt medzi enzýmom a povrchom elektródy⁵¹.

Hlavným dôvodom neefektívneho elektrónového transferu pri elektroenzýmoch imobilizovaných vo vodivom polyméri je zrejme nízka lokálna koncentrácia mediátorov. Predpokladá sa, že polymér, na ktorého kostre budú kovalentne a pritom flexibilne naviazané redoxné prenášače, bude elektricky spájať enzým s povrchom elektródy, čím sa zvýši miera elektrónového transferu. Takýmto redoxným polymérom môžu byť napr. hydrogély alebo vodivé polyméry. Hydrogély sú dobre priliehavé hydrofilné filmy, ktoré vo vodnom prostredí vykazujú zvýšenú flexibilitu. Zabudovaním chinoximoproteín-alkoholdehydrogenázy (QH-ADH, multikofaktorový enzým s primárnym PQQ redoxným centrom a hémovými kofaktormi) do hydrogélu poly(1-vinylimidazolu) s naviazaným osmiovým komplexom vznikol citlivý etanolový biosenzor s dlhodobou stabilitou⁵². Vodivé polyméry vznikajú elektrochemickou polymerizáciou presne na ploche pracovnej elektródy, majú kontrolovateľnú hrúbku a aj schopnosť zabráňovať niektorým interferujúcim látkam v prístupe k elektróde. Ich nevýhodou je však menšia flexibilita, čo sa dá zlepšiť napríklad naviazaním redoxných prenášačov cez dlhšie reťazce („spacer chains“)^{53,54}. Tento prístup sa úspešne použil aj v prípade redoxných hydrogelov^{55,56}. Vybrané príklady biosenzorov druhej generácie s rôznymi mediátormi a ich parametre sú uvedené v tabuľke III.

Výhodou použitia mediátorov v biosenzoroch je ich menšia závislosť na koncentrácii kyslíka a zvýšenie lineárnej odpovede pri vyšších koncentráciách¹⁶. Takisto sa zníži pracovný potenciál na elektróde na úroveň redoxného potenciálu mediátora, čím možno značne obmedziť interferencie. Aj tento sprostredkovaný prenos elektrónov má niektoré nedostatky ako napr. uvoľňovanie mediátora z povrchu elektródy alebo enzýmovej vrstvy a tiež toxicitu v biologických tkanivách³³. Treba brať do úvahy, že redoxné mediátory nie sú selektívne, ide skôr o všeobecné redoxné katalyzujúce látky, ktoré uľahčujú nielen transfer elektrónov medzi enzýmom a elektródou, ale aj rôzne interferujúce reakcie²⁹, napr. oxidované ferocény môžu byť redukované kyselinou askorbovou³³ a niektoré mediátory často súťažia s prirodzeným enzýmovým kosubstrátom oxidáz – kyslíkom²⁹.

3.2. Priamy elektrónový transfer – tretia generácia ampérometrických biosenzorov

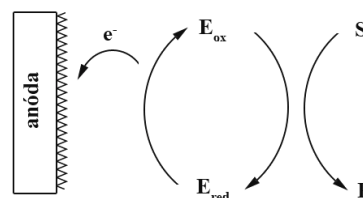
Priamy elektrónový transfer medzi enzýmom a elektródou bez použitia mediátorov sa javí ako najvhodnejší prístup pri konštrukcii biosenzorov. Biosenzory využívajúce tento princíp tvoria tretiu generáciu ampérometrických biosenzorov. Niektorí autori vnímajú túto definíciu širšie a zaraďujú do tretej generácie aj biosenzory, v ktorých je mediátor integrovaný spolu s enzýmom a elektródou, prenášajúc pri tom elektróny medzi redox-

ným centrom enzýmu a polarizovanou elektródou⁹, vtedy ide vlastne o tzv. bezreagenčné biosenzory, ktoré sme opísali pri druhej generácii biosenzorov v časti 3.1. Treba však podotknúť, že hranica medzi druhou a treťou generáciou, teda medzi sprostredkovaným a priamym elektrónovým transferom, je niekedy ťažko rozlíšiteľná.

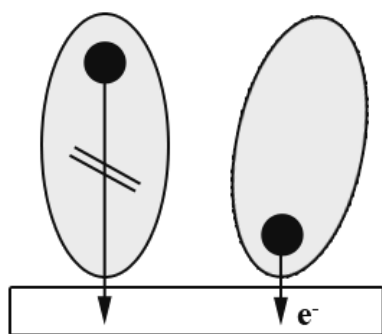
Pri priamom elektrónovom transfere preberá oxidačno-redukčný enzým rolu elektrokatalyzátora medzi molekulou substrátu a elektródou, pričom do tohto procesu nie je zahrnutý mediátor (obr. 3). Elektrónový transfer nastáva medzi aktívnym redoxným centrom enzýmu a elektródou a mal by sa teda objaviť pri redoxných potenciáloch samotnej prostetickej skupiny enzýmu⁵⁷.

Podľa Marcusovej teórie⁷ kinetika elektrónového transferu medzi dvomi redoxnými látkami závisí od hnacej sily (napr. od rozdielu potenciálov medzi dvomi redoxnými centrami), od reorganizačnej energie (ktorá kvalitatívne odráža štruktúrnu rigiditu redoxných látok v oxidovanej a redukovanej forme) a od vzdialenosti medzi dvomi redoxnými centrami⁵⁸. Zvyčajne však vzdialenosť medzi prosteticou skupinou enzýmu a elektródovým povrchom býva väčšia ako je potrebné pre priamy elektrónový transfer. Tento fakt je spôsobený tienением proteínového obalu enzýmu a elektrónový transfer cez tunelový mechanizmus sa preto vyskytuje pomerne zriedkavo⁵⁹. Optimálne navrhnuté elektródové usporiadanie by teda malo zabezpečiť, aby vzdialenosť elektrónového transferu medzi imobilizovaným redoxným proteínom a vhodným povrchom elektródy bola čo najmenšia⁶⁰. S tým súvisí aj vhodná orientácia enzýmu, enzým s prosteticou skupinou priamo natočenou k povrchu elektródy môže značne zvýšiť mieru elektrónového transferu⁴⁵ (obr. 4). Enzýmy imobilizované v prvej monovrstve vykazujú najkratšiu vzdialenosť redoxného centra od povrchu elektródy, musia však byť správne orientované, aby bola miera elektrónového transferu dostatočná. Proteíny nešpecificky absorbované priamo na materiál elektródy ako uhlík, zlato alebo platina majú sklon čiastočne denaturovať, zvyčajne nastáva zanášanie elektródy a orientácia enzýmu je náhodná⁶¹, takže podmienky pre priamy elektrónový transfer sú nevýhodné.

Jeden z prístupov na optimalizáciu priameho elektrónového transferu je návrh vhodných povrchov pre anizot-



Obr. 3. Priamy elektrónový transfer v tretej generácii biosenzorov; S – substrát, P – produkt, E_{ox} , E_{red} – oxidovaný, redukovaný enzým



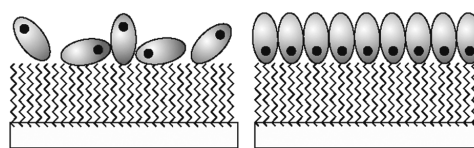
Obr. 4. Vplyv orientácie imobilizovaného enzýmu na priamy elektrónový transfer

ropickú a orientovanú imobilizáciu enzýmov, napr. samousporiadané monovrstvy (SAMs). Samousporiadaná vrstva predstavuje jedinú vrstvu molekúl na substráte, zvyčajne formovanú spontánne ponorením pevného substrátu do roztoku pozostávajúceho z amfifilných molekúl. SAMs preukazujú vysoký stupeň orientácie, molekulárneho usporiadania a tesnenia^{62,63}. Prichytenie molekúl proteínu k SAM môže byť neorientované, t.j. náhodné alebo orientované (obr. 5). Ak reaktívna funkčná skupina SAM reaguje špecificky s jedinou skupinou na povrchu proteínu, usporiadanie molekúl je orientované, čo zvyhodňuje priamy elektrónový transfer⁶⁴.

Prvá monovrstva imobilizovaného enzýmu na SAM predstavuje najväčší potenciál pre priamy elektrónový transfer a vzhľadom na ohraničený priestor tejto monovrstve aj samotná veľkosť molekuly enzýmu zohráva dôležitú úlohu pri maximálnom vzraste signálu senzora. Čím menšia je molekula, tým vyšší je jej počet v monovrstve a zvyčajne aj lepšia prístupnosť aktívneho centra cez difúziu substrátu⁶⁵. Napríklad použitie mikroperoxidázy MP-11, čo je fragment cytochrómu *c* s nízkou molekulovou hmotnosťou, imobilizovanej na alkántiolovej vrstve na zlate oproti chrovej peroxidáze (HRP) zväčší povrchovú koncentráciu molekúl a zmenší vzdialenosť elektrónového transferu, čo spôsobí dramatický nárast signálu pochádzajúceho z elektrokatalytickej redukcie peroxidu vodíka⁶⁵.

SAMs sa ukazujú ako výhodné aj vzhľadom na možnosť variability ich chemických parametrov. Napríklad vzdialenosť elektrónového transferu môže byť prispôbebná zmenou dĺžky hydrofóbneho reťazca, vložení vhodných funkčných skupín alebo integráciou vodivých oligomérov do reťazca⁶⁶.

Odlíšnym prístupom na optimalizáciu priameho elektrónového transferu v ampérometrických biosenzoroch môže byť zachytenie enzýmov vo vodivých materiáloch. Týmito materiálmi môžu byť často používané vodivé polyméry, ktoré by mali predstavovať rozvetvenú sieť molekulárnych „káblov“ v blízkosti enzýmov a umožniť tak priamu elektrickú komunikáciu medzi enzýmom a povrchom elektródy⁶⁷. Hoci bola vo vodivých polyméroch zachytená



Obr. 5. Schéma náhodnej (vľavo) a orientovanej (vpravo) imobilizácie molekúl proteínu na samousporiadanú monovrstvu

už celá škála rôznych enzýmov, vo väčšine prípadov sa elektrónový transfer vyskytol na základe prirodzených alebo umelých voľne rozpustených mediátorov a jeho mechanizmus nebol dobre definovateľný, pričom sa preukázala aj nízka citlivosť⁴⁵. Ak je však redoxné centrum enzýmu lokalizované v blízkosti jeho proteínového plášťa, je dostupnejšie a ak sú navyše medzi polymérom a enzýmom vhodné nábojové interakcie, elektrónový transfer je pravdepodobnejší. Multifaktorový enzým QH-ADH (chinoxemoproteín alkoholdehydrogenáza) má hlboko skryté primárne redoxné centrum PQQ, ktoré sa regeneruje vnútro-proteínovým elektrónovým transferom na hémových centrách nachádzajúcich sa na povrchu enzýmu. Zbudovaním tohto enzýmu do polypyrolu sa umožnil priamy elektrónový transfer medzi hémovými centrami a polypyrolovými reťazcami⁶⁷.

Priamy elektrónový transfer medzi redoxnými proteínmi a rôznymi elektródovými materiálmi je predmetom intenzívneho štúdia posledných 20 rokov. Aj keď je tento prístup veľmi atraktívny, efektívny priamy elektrónový transfer bol popísaný len pri obmedzenom počte oxidačno-redukčných enzýmov, pričom väčšina z nich obsahuje kovové centrá, obzvlášť hém⁵⁹. Enzýmy vhodné pre návrh biosenzorov tretej generácie by mali mať priamo dostupné redoxné centrum⁴⁵. Túto podmienku spĺňajú najmä menšie redoxné proteíny, ktoré nemajú enzymatickú aktivitu³² (napr. cytochrómy, feredoxíny, flavoproteíny). Aj prvé publikácie ohľadom priameho elektrónového transferu sa týkali malého redoxného proteínu cytochrómu *c*, ktorý je aktívny v biologických reťazcoch pri elektrónovom transfere⁵⁹. Priamy elektrónový transfer u väčších redoxných proteínov s enzymatickou aktivitou (oxidačno-redukčné enzýmy) bol dokázaný o dva roky neskôr. Lakáza a peroxidáza na uhlíkových elektródach vykazovali priamy elektrónový transfer v prítomnosti svojho substrátu⁴⁷. Aj pri niektorých ďalších enzýmoch, v ktorých hĺbka uloženia prostetickej skupiny znevýhodňuje podmienky pre priamy elektrónový transfer (napr. v prípade glukózooxidázy je FAD uložený 0,8 nm od povrchu enzýmu⁵), bol napriek tomu pozorovaný. Pár príkladov je uvedených v tabuľke IV.

Napríklad systém, v ktorom je glukózooxidáza (GOx) zachytená v poly(*N*-metylpyrole) elektrochemicky pripravenom na zlatej elektróde, prenáša elektróny na povrch elektródy⁷¹. Jiang a spol. po prvýkrát pozorovali priamy elektrónový transfer v prípade GOx imobilizovanej na

Tabuľka IV

Príklady ampérometrických biosenzorov s priamym elektrónovým transferom

Systém	E_w [mV]	S	LR [mmol l ⁻¹]	K_m [mmol l ⁻¹]	T [s]	D_L [μmol l ⁻¹]	Lit.
Vysoko orientovaný pyrolitický grafit s imobilizovanou GOx	900	–	0,4–7,5	2,52	–	200	68
HRP imobilizovaná na koloidné zlato	–400	0,307 A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,0008–1	1,3±0,3		0,4	69
Dvojnásobná polyetylénimín/ GOx dvojvrstva	300	8,8 ± 0,2 A(mol/l) ⁻¹ cm ⁻²	0,02–5,7	4,3	8	8,2	70

Pozn: E_w – pracovný potenciál, S – citlivosť alebo špecifická citlivosť podľa referencie, K_m – zdanlivá Michaelis-Mentenovej konštanty, D_L – detekčný limit, T – čas odozvy systému

SAMs (cit.⁷²). Monovrstva enzýmu bola imobilizovaná na elektróde v jedнокrokovom postupe zahŕňajúcom homobifunkčné činidlo bis(sulfosukcínimidyl)-3,3'-ditiodi-propionát (DTSSP), ktoré sa najprv kovalentne naviaže cez svoju esterovú skupinu na lyzínovú ε-aminoskupinu na povrchu GOx a následne vytvorí na zlatom povrchu SAM. Vzniknuté usporiadanie Au-DTSSP-GOx ľahko podstupuje reverzibilný nábojový transfer, pričom autori dokázali, že elektrónový transfer je dôsledok oxidácie prostetickej skupiny GOx a nie voľne rozpusteného FAD. Takto usporiadaná vrstva vykazuje aj katalytický prúd po pridaní glukózy do roztoku. Aj v prípade sulfát oxidázy imobilizovanej na monovrstve undekánu-1-tiolu na zlate bol dokázaný priamy elektrónový transfer⁷³.

Rozdielny prístup reprezentuje prvotná imobilizácia aktívneho centra enzýmu na samousporiadanú vrstvu na elektróde a následné pridanie apoenzýmu a vytvorenie aktívneho imobilizovaného holoenzýmu. Predpokladá sa, že orientovanie prostetickej skupiny smerom k povrchu elektródy skráti vzdialenosť elektrónového transferu. Tento prístup bol napríklad použitý pri HRP, kde bol cez flexibilný reťazec imobilizovaný hemín a následne apo-HRP. Vzdialenosť pre elektrónový transfer ostávala však napriek tomu veľká, preto autori začlenili ďalší prenášač – PQQ medzi monovrstvu a flexibilný reťazec, čím dosiahli značné zvýšenie elektrónového transferu⁷⁴.

Napriek rôznym prístupom a značnému úsiliu sa doteraz nepodarilo vyvinúť komerčne úspešný biosenzor s priamym elektrónovým transferom, aj keď sa tento prístup javí ako najslubnejší. Tento typ biosenzora by ponúkal väčšiu selektivnosť, keďže pracuje v nižších potenciáloch, bližších redoxnému potenciálu samotného enzýmu, menej podlieha vplyvu interferujúcich látok a zároveň nie je potrebné v reakčnej schéme ďalšie činidlo v podobe mediátora. Väčšie začlenenie biomolekuly spolu s povrchom elektródy môže tiež zvýšiť citlivosť biosenzora. Ďalším pozitívom by mohlo byť potenciálne zjednodušenie konštrukcie tohto typu biosenzora^{30,59,60}. Vo vývoji a zlepšení parametrov biosenzorov tretej generácie zrejme

bude hrať kľúčovú úlohu aj syntéza nových nanoštruktúrnych materiálov a ich komerčná dostupnosť.

4. Použitie nanočastíc na uľahčenie elektrónového transferu

Jedinečné chemické a fyzikálne vlastnosti nanočastíc ich robia mimoriadne vhodnými pre návrh nových a zlepšených senzorových zariadení, obzvlášť elektrochemických senzorov a biosenzorov. V týchto typoch senzorov už boli použité viaceré druhy nanočastíc ako kovové nanočastice, nanočastice oxidov, polovodičové nanočastice alebo zložené nanočastice⁶⁰. V tejto kapitole sa zameriame na ich úlohu pri zvýšení elektrónového transferu. Vo všeobecnosti kovové nanočastice majú excelentnú vodivosť a katalytické vlastnosti, čo z nich robí vhodných kandidátov pre elektrónové vodiče na zvýšenie elektrónového transferu medzi redoxným centrom proteínov a povrchom elektródy a tiež pre katalyzátory na zvýšenie elektrochemických reakcií.

Za pomoci zlatých nanočastíc bol pozorovaný zvýšený elektrónový transfer pre GOx (cit.⁶¹). Zlaté nanočastice veľké 1,4 nm boli funkcionalizované molekulou N⁶-(2-aminoetyl)-FAD a následne bol k nim pridaný apo-enzým GOx a vytvorili usporiadanú monovrstvu ditiolov na zlatej elektróde. Alternatívny postup predstavoval najprv usporiadanie zlatých funkcionalizovaných nanočastíc a až následne pridanie apo-GOx. Výsledná enzýmová elektróda vykazovala veľmi rýchly elektrónový transfer medzi redoxným centrom enzýmu a elektródou a enzýmová elektróda mohla byť použitá pre detekciu glukózy bez interferencií, keďže bola necitlivá voči kyslíku a aj iným interferentom ako napr. kyseline askorbovej.

Okrem zlatých nanočastíc boli pre zlepšenia elektrónového transferu úspešne použité aj nanočastice striebra. Strieborné nanočastice boli usporiadané na pyrolitické uhľikové elektródy a následne sa na nich imobilizoval cytochróm *c* (cit.⁷⁷). Priamy elektrónový transfer pomocou

strieborných nanočastíc bol dokázaný aj pre myoglobín⁷⁸. Taktiež niektoré nekovové nanočastice ako nanočastice oxidov⁷⁹ alebo polovodičové nanočastice⁸⁰ môžu zvýšiť elektrónový transfer medzi proteínmi a elektródami.

Efektívne zvýšenie elektrónového transferu nezávisí len na vodivosti nanočastíc, ale tiež na usporiadaní medzi nanočasticami a biomolekulami. Je predpoklad, že vytvorenie definovaného a usporiadaného zoskupenia nanočastíc pomocou nanotechnológií je sľubný prístup ku konštrukcii biosenzorov so zlepšenými vlastnosťami elektrónového transferu⁷⁵.

Ďalším z radov nanočastíc pre použitie v biosenzoroch na zlepšenia elektrónového transferu sú uhlíkové nanorúrky (CNT). Uhlíkové nanorúrky preukazujú jedinečnú kombináciu vynikajúcich mechanických, elektrických a elektrochemických vlastností, ktoré podnietili stúpajúci záujem o ich využitie ako komponentov v biosenzoroch. Nanorúrky majú vzhľadom ku svojej malej objemovej veľkosti rozsiahlu povrchovú plochu, čo im dovoľuje „zapojenie“ do proteínov, a tým umožňuje priamy elektrónový transfer aj s enzýmami ako GOx, ktorých redoxné centrá nebývajú za bežných podmienok dostupné⁸¹. Navyše majú vynikajúcu schopnosť sprostredkovať rýchlu kinetiku elektrónového transferu pre široký rozsah elektroaktívnych látok, ako peroxid vodíka alebo NADH (cit.⁸²). Nanorúrky sa tak stávajú ideálnymi kandidátmi na využitie pri vývoji biosenzorov ako elektródy alebo ako prevodníkové komponenty.

Napríklad ich použitie na modifikáciu elektród môže zabezpečiť schopnosť rýchlejšieho elektrónového transferu a tiež väčšiu odolnosť pred zanášaním elektródy. Ako efektívna metóda sa ukazuje rast uhlíkových nanorúrok priamo na sklovitej uhlíkovej elektróde alebo na kovových substrátoch. Tento prístup zlepšuje elektronický kontakt a neznečisťuje povrch elektródy nečistotami zo surfaktantov alebo iných látok zabezpečujúcich väzbu nanorúrok na elektródu. Navyše umožňuje zostrojiť elektródy s vertikálne zoradenými poliami nanorúrok, ktoré vykazujú vyššiu elektrokatalytickú aktivitu spojenú zároveň s rýchlym elektrónovým transferom^{83,84}.

Ďalším prístupom je kovalentné prichytenie enzýmov do siete uhlíkových nanorúrok na povrchu elektródy, čo často umožňuje priamy elektrónový transfer k aktívnemu centru enzýmu. Napríklad kovalentná imobilizácia GOx na pole nanorúrok prichytených na zlatom povrchu elektródy prostredníctvom SAM umožňovala priamy elektrónový transfer⁸⁵. Najprv však bolo imobilizované redoxné centrum enzýmu – FAD a až potom apo-GOx.

Priamy elektrónový transfer bol dokázaný aj pre GOx fyzikálne adsorbovanú na povrch CNT (cit.⁸⁶). Povrch nanorúrok bol pokrytý vrstvou molekúl povrchovo aktívnej látky – kationického surfaktantu a počas zmiešavania CNT suspenzie s GOx nastala ich fyzikálna adsorpcia na CNT. Vrstva sa naviazala na elektródu zo sklovitého uhlíka a na finálnu úpravu bol použitý Nafionový film na zlepšenie stability. Aj v iných prípadoch fyzikálne adsorbovaná GOx na CNT preukazovala priamy elektrónový transfer⁸⁷.

CNT sú teda materiálom vhodným na uľahčenie elektrochemických procesov v proteínoch, ale ich použitie je zároveň limitované niektorými ich vlastnosťami, ako ich sklon tvoriť agregáty vo väčšine roztokov a ich silná interakcia s proteínmi, čo môže zapríčiniť stratu biologickej aktivity enzýmov⁸⁸ (napr. niektoré výsledky naznačujú, že priamy elektrónový transfer GOx na CNT môže byť výsledkom čiastočnej denaturácie enzýmu, ktorá skráti vzdialenosť elektrónového transferu priblížením FAD bližšie k povrchu CNT, cit.⁸⁹).

LITERATÚRA

1. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
2. Updike S. J., Hicks G. P.: *Nature* 214, 986 (1967).
3. Guilbault G. G., Montalvo J., Smith R.: *Anal. Chim. Acta* 41, 1 (1969).
4. Heller A.: *Acc. Chem. Res.* 23, 128 (1990).
5. Hecht H. J., Schomburg D., Kalisz H., Schmid R. D.: *Biosens. Bioelectron.* 8, 197 (1993).
6. Hill H. A. O., Sanghera G. S., v knihe: *Biosensors. A Practical Approach* (Cass A. E. G., ed.), kap. 2. Oxford University Press, New York 1990.
7. Marcus R. A., Sutin N.: *Biochim. Biophys. Acta* 811, 265 (1985).
8. Scheller F. W., Wollenberger U., Warsinke A., Lisdat F.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 35 (2001).
9. Castillo J., Gáspár S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S. A., Ryabov A. D., Csöregi E.: *Sens. Actuators, B* 102, 179 (2004).
10. McNaught A. D., Wilkinson A. (ed.): *Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations*. 2. vyd. Blackwell Science, Oxford 1997.
11. Ramanavičius A., Ramanavičiene A., Malinauskas A.: *Electrochim. Acta* 51, 6025 (2006).
12. Mello L. D., Kubota L. T.: *Food Chem.* 77, 237 (2002).
13. Scheller F., Schubert F.: *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry – Volume 11: Biosensors*, str. 37. Elsevier, Amsterdam 1992.
14. Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 121 (2001).
15. Bardeletti G., Séchaud F., Coulet P. R., v knihe: *Biosensor: Principles and Applications* (Blum L. C., Coulet P. R., ed.), kap. 2. Marcel Dekker, New York 1991.
16. Yacynych A. M., v knihe: *Bioinstrumentation: Research, Developments and Applications* (Wise D. L., ed.), kap. 42. Butterworths, Londýn 1990.
17. Davis J., Vaughan D. H., Cardosi M. F.: *Enzyme Microb. Technol.* 17, 1030 (1995).
18. Heller A.: *J. Phys. Chem.* 96, 3579 (1992).
19. Gorton L.: *Electroanalysis* 7, 23 (1995).
20. Wang J.: *Electroanalysis* 13, 983 (2001).
21. Magner E.: *Analyst* 123, 1967 (1998).
22. Dimcheva N., Horozova E., Jordanova Z.: *Z. Natur-*

- forsch., C: J. Biosci. 57c, 705 (2002).
23. Fiorito P. A., Cordoba de Torresi S. I.: J. Braz. Chem. Soc. 12, 729 (2001).
 24. Li M., Deng C., Xie Q., Yang Y., Yao S.: Electrochim. Acta 51, 5478 (2006).
 25. Šnejdárková M., Rehák M., Otto M.: Anal. Chem. 65, 665 (1993).
 26. Shan D., He Y., Wang S., Xue H., Zheng H.: Anal. Biochem. 356, 215 (2006).
 27. Šnejdárková M., Rehák M., Babincová M., Sargent D. F., Hianik T.: Bioelectrochem. Bioenerg. 42, 35 (1997).
 28. Svobodová L.: *Kandidátska dizertačná práca*. Slovenská Akadémia Vied, Ivanka pri Dunaji 2003.
 29. Chaubey A., Malhotra B. D.: Biosens. Bioelectron. 17, 441 (2002).
 30. Zhang W., Li G.: Anal. Sci. 20, 603 (2004).
 31. Cardosi M. F., Turner A. P. F., v knihe: *Biosensors: Fundamentals and Applications* (Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S., ed.), kap. 15. Oxford University Press, New York 1987.
 32. Calvo E. J., Danilowicz C.: J. Braz. Chem. Soc. 8, 563 (1997).
 33. O'Neill R. D., Lowry J. P., Mas M.: Crit. Rev. Neurobiol. 12, 69 (1998).
 34. Zen J.-M., Kumar A. S., Tsai D.-M.: Electroanalysis 15, 1073 (2003).
 35. Schumann W., Wohlschläger H., Lammert R., Schmidt H.-L., Löffler U., Wiemhöfer H.-D., Göpel W.: Sens. Actuators, B 1, 571 (1990).
 36. Davis G., v knihe: *Biosensors: Fundamentals and Applications* (Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S., ed.), kap. 14. Oxford University Press, New York 1987.
 37. Bourdillon C., Demaille C., Moiroux J., Savéant J.-M.: J. Am. Chem. Soc. 115, 2 (1993).
 38. Ivanova E. V., Sergeeva V. S., Oni J., Kurzawa C., Ryabov A. D., Schuhmann W.: Bioelectrochemistry 60, 65 (2003).
 39. Krikstopaitis K., Kulz J., Tetianec L.: Electrochem. Commun. 6, 331 (2004).
 40. Zhang S., Wang N., Yu H., Niu Y., Sun C.: Bioelectrochemistry 67, 15 (2005).
 41. Ozoemena K. I., Nyokong T.: Electrochim. Acta 51, 5131 (2006).
 42. Liu Z.-M., Yang Y., Wang H., Liu Y.-L., Shen G.-L., Yu R.-Q.: Sens. Actuators, B 106, 394 (2005).
 43. Serra B., Reviejo A. J., Parrado C., Pingarroń J. M.: Biosens. Bioelectron. 14, 505 (1999).
 44. Lapenaite I., Kurtinaitiene B., Marcinkeviciene L., Bachmatova I., Laurinavicius V., Ramanavicius A.: Chem. Pap. 55, 345 (2001).
 45. Schuhmann W.: Rev. Mol. Biotechnol. 82, 425 (2002).
 46. Ryabova E. S., Goral V. N., Csöregi E., Mattiasson B., Ryabov A. D.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38, 804 (1999).
 47. Reiter S., Eckhard K., Blöchl A., Schuhmann W.: Analyst 126, 1912 (2001).
 48. Ryabov A. D., Sukharev V. S., Alexandrova L., Le Lagadec R., Pfeffer M.: Inorg. Chem. 40, 6529 (2001).
 49. Schuhmann W., Ohara T. J., Schmidt H. L., Heller A.: J. Am. Chem. Soc. 113, 1394 (1991).
 50. Ryabov A. D., Trushkin A. M., Baksheeva L. I., Gorbatova R. K., Kubrakova I. V., Mozhaev V. V., Gnedenko B. B., Levashov A. V.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 31, 789 (1992).
 51. Schuhmann W.: Biosens. Bioelectron. 10, 181 (1995).
 52. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerényi Z., Csöregi E., Schuhmann W.: Anal. Chim. Acta 463, 39 (2002).
 53. Habermüller K., Ramanavicius A., Laurinavicius V., Schuhmann W.: Electroanalysis 12, 1383 (2000).
 54. Gaspar S., Habermüller K., Csöregi E., Schuhmann W.: Sens. Actuators, B 72, 63 (2001).
 55. Mao F., Mano N., Heller A.: J. Am. Chem. Soc. 125, 4951 (2003).
 56. Mano N., Mao F., Heller A.: Chem. Commun. 10, 2116 (2004).
 57. Habermüller K., Mosbach M., Schuhmann W.: Fresenius' J. Anal. Chem. 366, 560 (2000).
 58. Carter M. T., Rowe G. K., Richardson J. N., Tender L. M., Terrill R. H., Murray R. W.: J. Am. Chem. Soc. 117, 2896 (1995).
 59. Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F. D., Ruzgas T., Gazaryan I.: Anal. Chim. Acta 40, 91 (1999).
 60. Freire R. S., Pessoa C. A., Mello L. D., Kubota L. T.: J. Braz. Chem. Soc. 14, 230 (2003).
 61. Ferretti S., Paynter S., Russell D. A., Sapsford K. E., Richardson D. J.: Trends Anal. Chem. 19, 530 (2000).
 62. Allara D. L.: Biosens. Bioelectron. 10, 771 (1995).
 63. Chechik V., Stirling C. J. M., v knihe: *The Chemistry of Organic Derivatives of Gold and Silver* (Patai S., Rappoport Z., ed.), kap. 15. John Wiley, Chichester 1999.
 64. Gilardi G., Fantuzzi A.: Trends Biotechnol. 19, 468 (2001).
 65. Lötzbeyer T., Schuhmann W., Schmidt H.: Sens. Actuators, B 33, 50 (1996).
 66. Liedberg B., Yang Z., Engquist I., Wirde M., Gelius U., Götz G., Bäuerle P., Rummel R.-M., Ziegler Ch., Göpel W.: J. Phys. Chem., B 101, 5951 (1997).
 67. Ramanavicius A., Habermüller K., Csöregi E., Laurinavicius V., Schuhmann W.: Anal. Chem. 71, 3581 (1999).
 68. Wang G., Thai N. M., Yau S.-T.: Electrochem. Commun. 8, 987 (2006).
 69. Xu X., Liu S., Ju H.: Sensors 3, 350 (2003).
 70. Zhang W., Huang Y., Dai H., Wang X., Fan C., Li G.: Anal. Biochem. 329, 85 (2004).
 71. De Taxis Du Poet P., Miyamoto S., Murakami T., Kimura J., Karube I.: Anal. Chim. Acta 235, 255 (1990).
 72. Jiang L., McNeil C. J., Cooper J. M.: J. Chem. Soc.,

- Chem. Commun. 1995, 1293.
73. Ferapontova E. E., Ruzgas T., Gorton L.: *Anal. Chem.* **75**, 4841 (2003).
74. Zimmermann H., Lindgren A., Schuhmann W., Gorton L.: *Chem.-Eur. J.* **6**, 592 (2000).
75. Luo X., Morrin A., Killard A. J., Smyth M. R.: *Electroanalysis* **18**, 319 (2006).
76. Xiao Y., Patolsky F., Katz E., Hainfield J. F., Willner I.: *Science* **299**, 1877 (2003).
77. Liu T., Zhong J., Gan X., Fan C., Li G., Matsuda N.: *ChemPhysChem* **4**, 1364 (2003).
78. Gan X., Liu T., Zhong J., Liu X. J., Li G. X.: *ChemPhysChem* **5**, 1686 (2004).
79. Zhang Y., He P. L., Hu N. F.: *Electrochim. Acta* **49**, 1981 (2004).
80. Zhou H., Gan X., Liu T., Yang Q. L., Li G. X.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **64**, 38 (2005).
81. Zhao Q., Gan Z., Zhuang Q.: *Electroanalysis* **14**, 1609 (2002).
82. Wang J.: *Electroanalysis* **17**, 7 (2005).
83. Li J., Cassell A., Delzeit L., Han J., Meyyappan M.: *J. Phys. Chem. B* **106**, 9299 (2002).
84. Gao M., Dai L., Wallace G. G.: *Electroanalysis* **15**, 1089 (2003).
85. Patolsky F., Weizmann Y., Willner I.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **43**, 2113 (2004).
86. Cai C., Chen J.: *Anal. Biochem.* **332**, 75 (2004).
87. Guiseppi-Elie A., Lei G., Baugham R. H.: *Nanotechnology* **13**, 559 (2002).
88. Gong K., Yan Y., Zhang M., Su L., Xiong S., Mao L.: *Anal. Sci.* **21**, 1383 (2005).
89. Liu J., Paddon-Row M. N., Gooding J. J.: *J. Phys. Chem., B* **108**, 8460 (2004).

V. Polohová and M. Šnejdárková (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Electron Transfer in Amperometric Biosensors**

At present direct electron transfer between an electrode and protein ranks among promising areas of biosensor research. This review focuses on current trends and methods in the development of third-generation amperometric biosensors. It describes the construction of the biosensors of three generations and enzyme immobilization techniques. The design of the electrode interface and biosensor architecture are essential in bioelectrocatalysis, fast electron transfer and electrode construction. Differences in the architectures usually reflect specific electron transfer mechanisms. In the second-generation biosensors, the preferred design consists of biosensors with mediators tightly bound in the active layer of the electrode surface. Attempts at the direct electron transfer employ techniques like self-assembled monolayers, conducting polymers, reconstitution of the prosthetic group and apoenzyme in active holoenzyme and integration of nanotechnology. Despite considerable efforts, no commercially available biosensors based on the direct electron transfer have been developed so far. Modern approaches such as redox proteins and enzymes with engineered electron pathways can make this type of biosensors commercially attractive.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE VE VÝZKUMU KVASINEK *Saccharomyces cerevisiae* A JEJÍ APLIKACE V PRAXI

JAN NOVÁK, GABRIELA BASAŘOVÁ,
JAROMÍR FIALA a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6
jaromir.fiala@vscht.cz

Došlo 22.6.07, přijato 27.9.07.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, *Saccharomyces cerevisiae*, třídění buněk, počet buněk, granularita, fluorescence, viabilita, buněčný cyklus, apoptóza

Obsah

1. Úvod
2. Průtoková cytometrie
 - 2.1. Analýza částic
 - 2.2. Použití průtokové cytometrie v biotechnologiích
 - 2.2.1. Hodnocené parametry
 - 2.2.2. Aplikace fluorescenčních barviv při sledování stavu kvasinek
3. Závěr

1. Úvod

Většina aplikací průtokové cytometrie se zaměřuje na výzkum lidských, živočišných a rostlinných buněk. V posledním desetiletí se průtoková cytometrie těší stále většímu zájmu mikrobiologů, kde je aplikována zejména ve výzkumu kvasinek coby stále významnějšího modelu vyšších eukaryot. V biotechnologických procesech, které jsou založeny na kvasinkách jako biologickém činiteli, vzniká potřeba proces optimalizovat z několika hledisek, mezi které patří stav populace kvasinek. Průtoková cytometrie se nabízí jako analytický nástroj zjišťování stavu kvasinek, neboť je schopna ve spojení s vhodným fluorescenčním barvením ve velice krátkém časovém úseku velice přesně vyhodnotit změny v populaci kvasinek.

2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie patří mezi metody luminiscenční analýzy. Je to fluorescenčně optická metoda, při níž je vzorek unášen proudem nosné kapaliny. Každý průtokový cytometr sestává z několika základních součástí, a to excitačního zdroje, měřicí optické cely, „forward scatter“ detektoru, „side scatter“ detektoru, systému zrcadel, optic-

kých filtrů a několika fluorescenčních detektorů seřazených podle vzrůstající vlnové délky emitované fluorescence (obr. 1). Některé cytometry jsou vybaveny tzv. třídíči (sortery), což jsou přídavná zařízení, fungující na několika odlišných principech, schopná třídít procházející částice na základě zvolených charakteristik.

Excitačním zdrojem bývá buď laser dané vlnové délky (nejčastěji argonový s vlnovou délkou 488 nm) nebo rtuťová výbojka. Vysokotlaké rtuťové výbojky emitují světlo různých vlnových délek a různé energie. U průtokových cytometrů se k excitaci používá hlavně čárové spektrum rtuťových výbojek od 365 po 546 nm. Výstupní výkon vysokotlakých rtuťových výbojek je 50 W, 100 W nebo 200 W. Tyto typy se od sebe liší velikostí a jasem¹.

2.1. Analýza částic

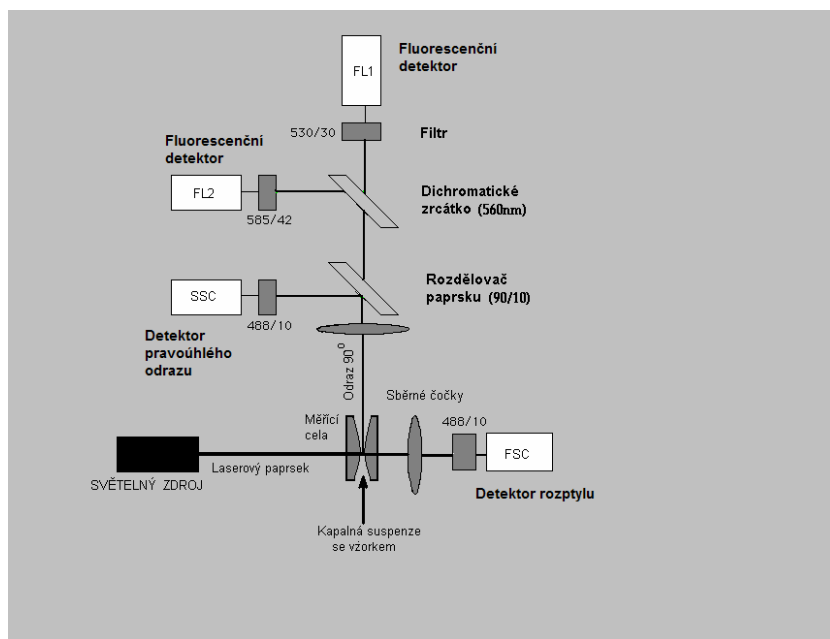
V měřicí cele ze speciálního optického plastu dojde ke střetu světla z excitačního zdroje a buňkami procházejícími jednotlivě kapilárou. Světlo se pak rozptýlí, odrazí nebo při určité vlnové délce vyvolá fluorescenci, jenž se šíří všemi směry od svého zdroje. Úhel rozptylu světla ve směru toku paprsku deteguje tzv. „forward scatter detektor“, jehož odezva je určujícím parametrem velikosti buněk. Světlo rozptýlené pod úhlem 90° vzhledem ke směru toku excitačního paprsku je detegováno tzv. „side scatter detektorem“, jehož signál odpovídá granularitě buněk. Světlo excitačního zdroje je v souladu se známou poučkou vždy nižší vlnové délky než je vlnová délka vyvolané fluorescence, která je detegována několika fluorescenčními detektory (obr. 2)^{1–3}.

2.2. Použití průtokové cytometrie v biotechnologických výrobcích

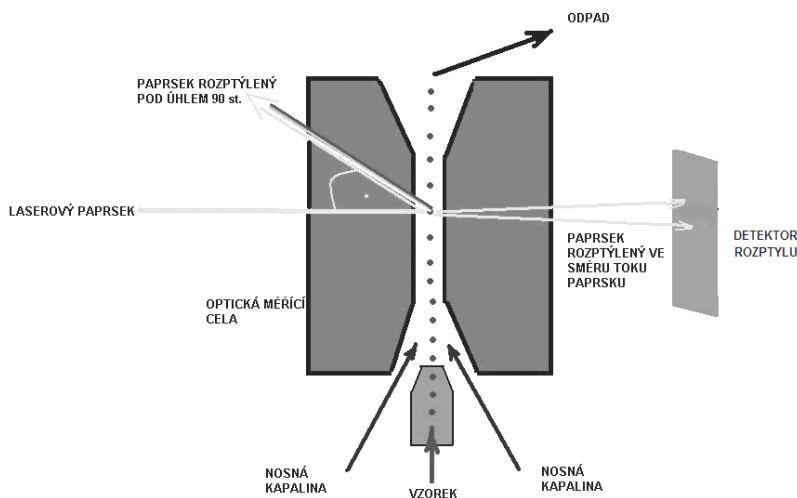
Metodou průtokové cytometrie lze získat informace o rozložení velikosti, granularity buněk v populaci, o intracelulárních komponentech kvasinek (bílkoviny, nukleové kyseliny, steroly), dále lze sledovat změny v rychlosti růstu, určit počet mrtvých a živých buněk v populaci, hodnotit mutace, sledovat buněčný cyklus, měřit velikost, počet buněk, intracelulární pH či dokonce buňky třídít podle zadaných charakteristik. Vzhledem k tomu se v průtokové cytometrii mluví o multidimensionální analýze. Výhodou metody je, že lze získat informace o velkém souboru buněk v relativně krátkém čase^{1,4,5}.

2.2.1. Hodnocené parametry

Výsledky jsou zobrazovány ve formě histogramů a obtisků (dot plot diagramy). Histogram obsahuje distribuci hodnot sledovaného parametru a skládá se z volitelného počtu kanálů. Dot plot diagram představuje rozložení odpovídajících bodů dvou zvolených parametrů



Obr. 1. Základní schéma uspořádání typického průtokového cytometru



Obr. 2. Detail analýzy buněk v měřicí cele průtokového cytometru

v dvourozměrném prostoru^{1,6}.

Běžně dostupné průtokové cytometry jsou schopny zachytit 6 až 12 parametrů proměřované částice. Jde zejména o tyto parametry:

- relativní distribuce velikosti částic ve formě histogramu – měřena dopředným rozptylem světla (FSC – „forward scatter“)
- relativní distribuce granularity částic ve formě histogramu – měřena bočním rozptylem světla (SSC –

„side scatter“)

- relativní distribuce fluorescence různých vlnových délek FL₁FL_n

Velikost, granularita a koncentrace buněk

Zatímco velikost buněk je poměrně známý a dobře představitelný parametr, granularita odpovídá jak rozptylu laserového paprsku způsobeném povrchovými vlastnostmi buňky, tak rozptylu paprsku způsobeným odrazem od vnit-

robuněčných struktur. Většina cytometrů je vybavena funkcí „true volume counting“, která je schopna určit koncentraci buněk přímo v daném roztoku. Např. při zkoumání morfologie a fyziologického stavu pivovarských kvasinek bylo zjištěno, že buňky s nízkou aktivitou a buňky mrtvé jsou v odpovídající fázi vývoje podstatně menší než buňky vitální^{7,8}. Pivovarské kvasnice podléhají změnám velikosti během procesu kvašení, které jsou typické pro každý kmen⁹. Variabilita velikosti během kvašení u kvasinek svrchního kvašení se pohybuje od 2,5 μm do 17,5 μm , u kvasinek spodního kvašení od 2,5 μm do 22,0 μm . Na počátku kvašení je pozorován pokles plochy aktivního povrchu buněk, který souvisí s velkým počtem pučících kvasinek v tomto období^{9,10}. Pro optimální průběh kultivace je důležitá také velikost nově vzniklých dceřinných buněk. Mateřské buňky s velkými dceřinnými buňkami, vznikající v exponenciální fázi růstu populace, jsou žádoucí, neboť velké buňky jsou schopné zahajovat buněčný cyklus téměř okamžitě a to následně zkracuje dobu kultivace^{11,12}.

Jedním z velmi často hodnocených parametrů je přesná koncentrace buněk v objemové jednotce média. Tento parametr se pomocí průtokové cytometrie zjišťuje velmi dobře. Základní podmínkou však je, že nejde o vláknité mikroorganismy a nebo takové, které tvoří shluky, jelikož ty přístroj vyhodnocuje jako jednu částici. Většina průtokových cytometrů je dnes opatřena automatickým počítačím zařízením částic^{1,13}.

Třídění (sorting) buněk

Pomocí průtokového cytometru lze tříditi jednotlivé buňky na principu fyzikální separace. Buňky lze dělit podle jedné nebo více charakteristik. Při třídění dochází k přeměně tekutého proudu kapaliny unášející vzorek na aerosol, jehož kapénky obsahují jednotlivé buňky. Po ozáření kapének laserem dochází k lomu na kapénkách a řídicí systém rozhodne o druhu částice a provede následnou separaci buněk. Třídíče částic se využívá při separaci apoptických buněk, ve výzkumu rakovinných buněk, při přípravě synchronizovaných buněčných linií a v poslední době na subcelulární úrovni pro třídění intracelulárních kompartmentů a chromosomů¹⁴.

2.2.2. Aplikace fluorescenčních barviv při sledování stavu kvasinek

Fluorescenční barviva čili fluorofory jsou chemická agens organické povahy, jejichž molekuly jsou excitovatelné a při přechodu do původního stavu emitují fluorescenční světlo. Fluorescenční barviva se dělí do dvou obecných tříd:

- vlastní – jsou součástí biologického materiálu vlastního vzorku,
- nevlastní – jsou přidány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti.

V průtokové cytometrii se téměř výhradně využívají barviva nevlastní, která lze podle povahy vazby na biologickou matici rozdělit na fluorescenční sondy a fluo-

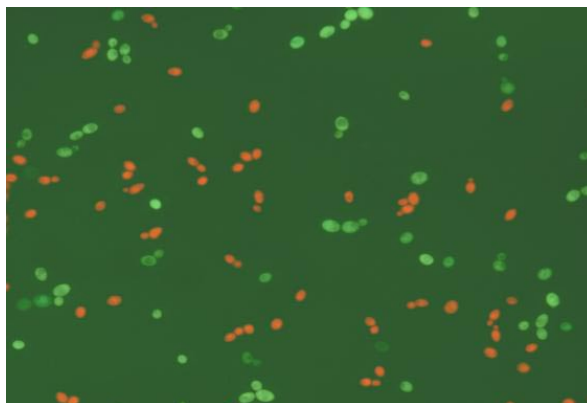
rescenční značky. Pokud se molekula barviva váže na biologickou matici kovalentně, nazývá se fluorescenční značka, pokud se váže nekovalentně, jde o fluorescenční sondu.

Při výzkumu kvasinek se využívají jak fluorescenční značky, tak fluorescenční sondy. Stav kvasinek je obvykle posuzován z hlediska jejich viability a vitality. Viabilita označuje procento buněk v populaci, které jsou živé a schopné dalšího rozmnožování, vitalita odráží fyziologický stav kvasinek.

Počet životaschopných buněk v populaci

Životaschopnost (viabilita) je klíčovým analytickým parametrem buněčné populace ve všech oblastech biotechnologického průmyslu, lze jmenovat kvasné výroby (pivovarství, lihovarství), potravinářský průmysl (droždářství, mlékářství), zpracování odpadů (výroba krmné biomasy), speciální biotechnologie (výroba léčiv, tkáňové kultury), atd. Nejspolehlivější metodou pro její určení jsou kultivační techniky, které jsou však v praxi téměř nepoužitelné, protože časový úsek mezi odebráním vzorku a zjištěným údajem je příliš velký. Z fluorescenčních barviv používaných k určení viability buněk průtokovou cytometrií lze jmenovat: propidiumjodid (3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylamoni)propyl]-6-fenylfenanthridin-5-ium-dijodid fluorescein-diacetát), FDA (fluorescein-diacetát), BCECF (5(6)-karboxy-2',7'-bis(3-karboxypropyl)fluorescein), Hoechst 34580 (*N,N*-dimethyl-4-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazol-2'-yl]anilin) a další desítky komerčně běžně dostupných barviv^{15,16}.

Při kontrole viability kvasinek se většinou využívá kombinace dvou barviv např. propidiumjodidu, který proniká buněčnou stěnou mrtvých či poškozených kvasinek a kovalentně se váže na DNA a fluorescein diacetátu, který proniká do všech buněk, ale pouze živými s vyšší esterasovou aktivitou je aktivován na fluorescenční fluorescein. Mrtvé buňky pak emitují fluorescenci v červené oblasti spektra, zatímco živé v zelené oblasti (obr. 3). Dnešní průtokové cytometry jsou navíc vybaveny funkcí, která umož-



Obr. 3. Rozlišení mrtvých a živých buněk na základě fluorescenčního barvení; zvětšení 10 × 40

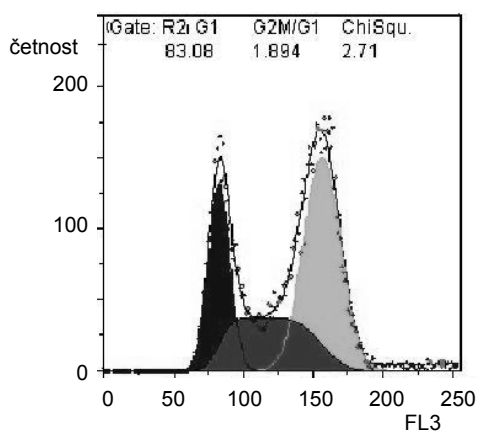
ňuje odlišit buňky živé, mrtvé a subletálně poškozené^{17–19}. Sledování buněčného cyklu

Buněčný cyklus je stále častěji sledovaným parametrem nejen v cytologii živočišných a rostlinných buněk, ale také při zkoumání proliferace kvasinek a některých plísní. Metody průtokové cytometrie pro stanovení jednotlivých fází buněčného cyklu vychází z poznatku, že DNA v buňkách lze (po enzymatickým odstranění RNA) barvit kvantitativně fluorescenčními barvivy. Intenzita fluorescence poté odpovídá obsahu DNA v buňce. Pro stanovení koncentrace DNA se nejčastěji používají fluorescenční značky jako propidium-jodid (3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylamonio)propyl]-6-fenylfenanthridin-5-ium-dijodid fluorescein-diacetát), akridinová oranž (*N,N,N',N'*-tetramethylakridin-3,6-diamin-hydrochlorid), DAPI (2-(4-karbamimidoylfenyl)indol-6-karboximidamid-dihydrochlorid), Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyfenyl)-*N,N*-dimethyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazol) atd. (tab. I) (cit.^{20–23}).

Za předpokladu, že mezi intenzitou emitované fluorescence a obsahem DNA v buňkách platí přímá úměra, se buňky s dvojnásobnou intenzitou emitované fluorescence vyhodnocují jako buňky v G₂ a M-fázi buněčného cyklu (obr. 4). Bylo např. zjištěno, že při nasazování pivovarských kvasnic k hlavnímu kvašení je výhodné zakvašovat kulturou, ve které je podíl buněk v G₂ a M-fázi maximální. Po nasazení takových kvasnic do provzdušněné mladiny se buňky rychle rozmnoží a přejdou do produkční fáze (G₁-fáze), kdy má populace nízkou aktivitu množení, ale vysokou metabolickou aktivitu projevující se rychlým úbytkem extraktu, tvorbou ethanolu, což se projeví rychlejší dobou kvašení^{11, 24}.

Enzymové aktivity, intracelulární pH

Určení enzymových aktivit pomocí fluorescenčních sond je spíše orientační a určuje, která buňka má vyšší tu



Obr. 4. Automatické vyhodnocení poměru buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu na průtokovém cytometru Partec PAS III; FL3 – relativní intenzita fluorescence zachycená detektorem FL3

kteřou enzymovou aktivitu v porovnání s jinou buňkou. Velmi dobře je popsáno určení esterasové aktivity buněk s použitím fluorescenčních sond v neaktivní (acetoxymethyl estery a nebo diacetáty) formě, která snadno proniká do buňky. Vnitrobuněčné esterasy štěpí molekulu barviva na aktivní fluoreskující barvivo a molekulový zbytek (aceton), vlastní neaktivní molekula barviva je tedy substrátem v enzymové reakci. Vzniklá fluorescence je podle některých prací přímo úměrná dané enzymové aktivitě. Z barviv lze jmenovat FDA fluorescein diacetát a CFDA 5,6-dikarboxyfluorescein-diacetát^{3,25,26}.

Určení vnitrobuněčného pH je založeno na vlastnosti některých barviv měnit intenzitu fluorescence v závislosti na pH. Na základě kalibrace *in vivo* nebo *in vitro* lze těmito sondami poměrně přesně určit intracelulární pH buněk. U kvasinek je např. intracelulární pH ukazatelem jejich vitality²⁷. Jednou z klíčových prací v oblasti je práce Slavíka²⁸.

Z běžně používaných barviv lze jmenovat fluorescein-diacetáty, BCECF, SNARF 1 atd.²⁹

Koncentrace fyziologicky významných látek

Z fyziologicky významných látek kvasinek lze pomocí průtokové cytometrie sledovat koncentraci glykogenu (acriflavine)³⁰, trehalosu (FITC-concavaline A)³¹, proteinů (FITC fluoresceinisothiokianát), neutrálních lipidů (nilská červeň) a sterolů (nystatin)³².

Sledování apoptózy

Apoptóza je vysoce regulovaná forma programované buněčné smrti. Apoptický proces umožňuje rychlé odstranění nepotřebných, poškozených, nebo infikovaných buněk. Jádro apoptických buněk je menší než u normálních buněk, což je možno zachytit pomocí řady barviv (např. řady Hoechst). Další možností, jak sledovat apoptózu, je pozorování zvýšené permeability membrán s použitím barviva YO-PRO1. Fluorescenčně lze dále apoptózu testovat např. s použitím konjugátů annexinu V, a to měřením aktivity specifických proteas. U pivovarských kvasinek se nepotvrdil významnější význam podíl apoptických buněk v populaci, což je připisováno stabilitě polyploidních kmenů^{33,34}.

3. Závěr

Průtoková cytometrie je mikrobiologií stále oblíbenější a častěji využívaná metoda, jejímž jediným limitujícím faktorem pro praktické použití v biotechnologických výrobcích je její cena. Ve spojení s vhodným fluorescenčním barvením je schopna velice dobře popsat okamžitý stav populace stejně jako přesně zachytit jakékoli její změny. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se zdá být vhodným modelovým organismem vyšších eukaryot a je vhodným objektem pro metody průtokové cytometrie.

Autoři děkují za finanční podporu získanou v rámci výzkumného záměru MSM 6046137305 a výzkumného centra IM 0570.

LITERATURA

- Shapiro H.: *Practical Flow Cytometry*, 4. vyd. Wiley, New York 2003.
- Walker M. G.: *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley, Dundee 2000.
- Novák J., Basařová G., Fiala J.: *Kvasný Prum.* 49, 260 (2003).
- Squires E. L.: *Anim. Reprod. Sci.* 89, 187 (2005).
- Rieseberg M., Kasper C., Reardon K. F., Scheper T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 350 (2001).
- Partec PAS III, Instrumentations and Optics*. Germany, Catalogue 2001–2002.
- Hashida M., Sakai K., Kogame M.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 25, 353 (1995).
- Achilles J., Mueller S., Bley T., Babel W.: *Cytometry Part A* 61, 88 (2004).
- Novák J., Basařová G., Fiala J., Teixeira J. A., Vicente A. A.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 30, 43/1 (2005).
- Hutter K.-J.: *Brauwelt* 140, 1634 (2000).
- Novák J., Basařová G., Fiala J.: *Kvasný prům.* 50, 214 (2004).
- Thomas K. C., Ingledew W. M.: *J. Ind. Microbiol.* 10, 61 (1992).
- Fiala J., Lloyd D. R., Rychtera M., Kent C. A., Al-Rubeai M.: *Biotechnol. Tech.* 13, 787 (1999).
- Kovářová J.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2003.
- Van Zandycke, Sylvie M., Olivier S., Gualdoni S., Smart K. A.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2003, 15.
- Ki-Bong, Matsuoka H.: *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 47.
- Hutter K. J.: *Brauwelt* 1992, 252.
- Simal O., Gualdoni S., Smart K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 15 (2003).
- Heggart H., Margaritis A., Stewart, R. J., Pilkington H., Sobczak J., Russell I.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 37, 409 (2000).
- Krishan A.: *J. Cell Biol.* 66, 188 (1975).
- Puite K. J., Broeke W. R. R.: *Plant Sci. Lett.* 32, 79 (1983).
- Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K.: *J. Histochem. Cytochem.* 45, 49 (1997).
- <http://probes.invitrogen.com/>, staženo 20.5.2007.
- Hutter K. J., Lange C.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 28, 38/1 (2001).
- Leszczynska M., Oleszkiewicz J. A.: *Env. Technol.* 17, 79 (1996).
- Dive C., Cox H., Watson J. V., Workman P.: *Mol. Cell. Probes* 2, 131 (1988).
- Imai T., Back W., Yasuda Y., Arimura H., Hori T., Abe M., Takeuchi T.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 28, 39/1 (2001).
- Cimprich P., Slavik J.: *Folia Microbiol.* 41, 84 (1996).
- Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1515 (2005).
- Hutter K. J., Remor M., Muller S.: *Monatsschr. Brauwiss.* 53, 68 (2000).
- Hutter K. J., Kliem C., Nitzsche F., Wiessler M.: *Monatsschr. Brauwiss.* 56, 121 (2003).
- Fiala J.: *Disertační práce*. VŠCHT, Praha 2003.
- Neumajer T.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2002.
- Mamdooh G.: *Anticancer Res.* 24, 1455 (2004).

J. Novák, G. Basařová, J. Fiala, and P. Dostálek
(*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Application of Flow Cytometry of Yeast in Research and Practice**

Flow cytometry as a rapid technique can be used for monitoring the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth in biotechnological processes. The technique permits analysis of single cells in suspension and thus to obtain cell size distribution, granularity, intracellular contents of DNA, proteins, and sterols, viability, cell cycle, intracellular pH and enzyme activities. Flow cytometry can also be used for cell sorting. Despite the advantages of flow cytometry, implementation of the technique in biotechnological laboratories is still limited.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

NOVÁ METODA CHARAKTERIZACE VÁPENCŮ POUŽÍVANÝCH V KOTLÍCH S FLUIDNÍ VRSTVOU PRO ODSÍŘENÍ SPALIN

PETR BURYAN^a, JOSEF VEJVODA^a, PETR CHALUPA^a, MARTIN MARYŠKA^a, JIŘÍ KRÁTKÝ^b a LUBOŠ VEVERKA^b

^a Ústav plynárenství, koksochemie a ochrany ovzduší, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Energetika Kladno s.r.o. buryanp@vscht.cz

Došlo 27.4.06, přijato 1.2.07.

Klíčová slova: odsíření spalin, fluidní kotel, hnědé uhlí, reaktivita vápence

Úvod

Cílem dávkování vápenců do komor energetických fluidních kotlů spalujících hnědé nebo černé uhlí je snížení emisí oxidů síry. Dávkovaný vápenec bude dále označován názvem „sorbent“. Pro optimalizaci průmyslového využití této odsířovací metody byla vyvinuta již celá řada laboratorních metod umožňujících předpověď chování těchto sorbentů SO₂ ve spalovacím procesu.

Obecně aplikované metody posuzující reaktivitu přírodních vápenců sledují především obsah vápníku, hořčíku, uhličitánů a dalších doprovodných minoritních prvků ve vápenci, dále jsou zaměřeny na stanovení tvrdosti uhličitánů, krystalickou strukturu, velikosti krystalitů, geologický původ, strukturu a distribuci částic a jejich porů před a po jejich kalcinaci, adsorpční mohutnost, vliv teploty a doby zdržení na koncentraci SO₂ ve vystupujících spalinách^{1–7}.

Pro hodnocení pro mokrý vápencový způsob odsířování spalin jsou používané metody založeny na stanovení relativního porovnání rychlostí rozpouštění vápenců v kyselinách nebo při jejich styku s SO₂ ve vodní suspenzi^{5–7}.

Pro hodnocení vápenců pro odsířování za vysokých teplot (suché odsíření) bylo vypracováno nepoměrně méně metod. Základem metod je porovnání relativní rychlosti reakce samotného kalcinovaného vápence s oxidem siřičitým^{8–11}.

Spolehlivost předpovědi

Předpovědi, které jsou získány pomocí dosud použí-

vaných laboratorních metod, závisejí na použité metodě. Bohužel, v provozních podmínkách získávané údaje o chování těchto vápenců jsou rozdílné. Tyto rozdíly byly doposud vysvětlovány z různých pohledů. Použité techniky měření sledují pouze samotné vápence nebo jejich kalcináty. Žádná z nich nezohledňuje možný vliv popelovin uhlí, příp. z nich vznikajícího popela na reaktivitu kalcinátu. Totéž se týká negativních dopadů oxidů křemíku, hliníku a železa vznikajících při kalcinaci nečistot vápenců či dolomitů na reaktivitu kalcinací vznikajících oxidů vápníku a hořčíku s SO₂ v reálných podmínkách kotle při spalování tuhých fosilních paliv.

Theoretické základy suché vápencové technologie odsířování spalin

Princip procesu

Technologie odsíření spočívá v injektáži směsi vzduchu a jemně rozemletého vápence do kotle nebo v přidávání mletého vápence do uhlí před mlýny. V procesu odsířování probíhají reakce:



Kalcinace vápence (1) probíhá obecně při teplotách 800–900 °C, reakce mezi vzniklým CaO a SO₂ (2) probíhá významnější rychlostí mezi 600–1000 °C. Produktem reakce vedle nezreagovaného volného CaO je síran vápenatý CaSO₄. Siřičitan vápenatý při teplotách nad 600 °C není termostabilní a disproportionuje dle reakce:



přičemž sulfid vápenatý (CaS) se dále oxiduje na CaSO₄. Kalcinaci vápence při teplotě nad 1050 °C již není vhodné realizovat, protože při této teplotě již dochází k deaktivaci vzniklého kalcinátu (přepálení) v důsledku změny porézní struktury.

Kinetická charakteristika procesu

Z kinetického hlediska představuje reakce mezi CaO a SO₂ heterogenní reakci „tuhá látka–plyn“. Počáteční stadium reakce lze vyjádřit kinetickým zákonem reakce 1. řádu, s rychlostí úměrnou koncentraci SO₂. Při zachytu SO₂ na povrchu zkalcinované částice se tvoří vrstva CaSO₄, která způsobuje, že další podíl SO₂ se dostává do částice difúzí přes tuto vrstvu. Tím se proces zpomaluje.

To je také důvod, proč nelze u práškových kotlů touto technologií dosáhnout vysokého stupně odsíření při stechiometricky únosném množství vápence a při omezené době styku obou reagujících fází. U kotlů s fluidním spalováním

paliv je prodlení vápence ve fluidní vrstvě nepoměrně delší a může v průměru dosáhnout řádově i tisíce sekund. Při této době styku, při optimální teplotě sulfatace 800 až 850 °C, kdy kalcinace vápence je následována sulfatací, není limitující vliv difuze SO₂ tak významný. Ovšem, vzhledem k tomu, že CaSO₄ má vyšší molární objem než CaO, dochází během reakce k ucpávání pórů kalcinátu, a proto nelze ani u tohoto typu kotlů dosáhnout kompletní přeměny sorbentu. Nicméně, pro vápence různého původu byly zjištěny významné rozdíly zachycení síry i při spalování uhlí ve fluidních kotlích.

Experimentální část

V případě této práce byla zvolena metoda izotermického reaktoru se stacionární a fluidní vrstvou zkoušeného zkalcinovaného vzorku a s měřením výstupní koncentrace SO₂ oproti vstupní koncentraci. Schéma aparatury je uvedeno na obr. 1.

Popis aparatury

Dávkování látek: k aparatuře (obr. 1) byly připojeny dvě tlakové lahve, a to čistý dusík a směs modelující spaliny s obsahem 8300 mg m⁻³ SO₂, 13 % CO₂ a 7 % O₂ v dusíku. Při testech s vlhkým plynem bylo do pomocného proudu dusíku dávkováno definované množství vody, která se zplynila v odpařovači. Průtoky plynů a dávkované vody byly regulovány pomocí elektronicky řízených ventilů z centrální jednotky.

Reaktor: Vlastní reaktor byl sestaven ze dvou křemenných trubic spojených zábrusem. Horní odnímatelná

část byla opatřena užší trubicí zakončenou fritou, v níž byl umístěn vzorek. Ve spodní části byl v křemenné výplni umístěn termočlánek pro snímání teploty. Reaktor byl umístěn v elektrické peci a přívodní trubičky (rovněž i horní část reaktoru nad zábrusem) byly vyhřívány odporovým topením na 105 °C, aby nedocházelo ke kondenzaci vody v případě vlhkého modelového plynu.

Postup měření: Testovací plyn byl přiváděn do spodní části trubice reaktoru. Průchodem přes křemennou drť se promísil (v případě testování vlhkým plynem, kdy byl přiváděn druhý pomocný proud obsahující vodní páru) a dostatečně předeřhál. Po opuštění reaktoru byl testovací plyn ochlazen a analyzován kontinuálním analyzátozem SO₂ Servomex Xentra 4900 s dvoukanálovým měřením SO₂ a jednonálovým měřením kyslíku.

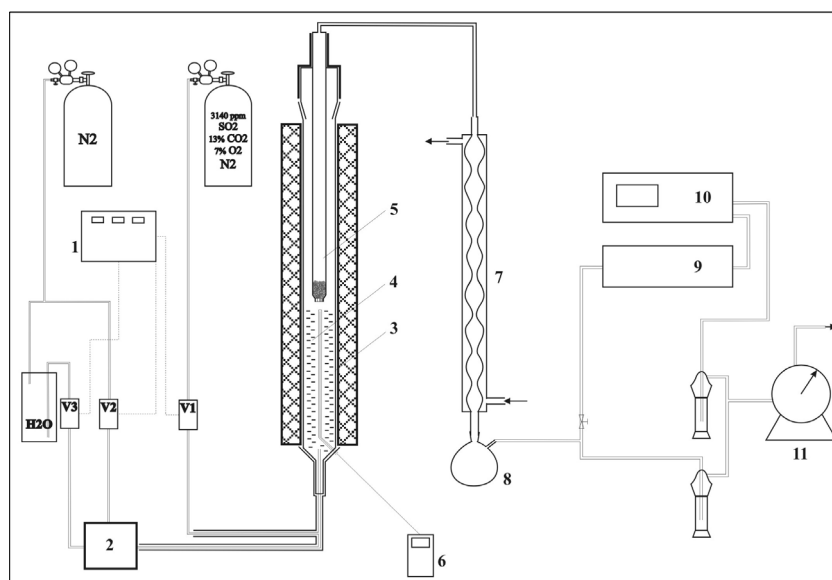
Chemické složení sledovaných vápenců

Měření reaktivit bylo zaměřeno na vápenec z Čížkovic (křída) a z Lahoště (kalcit). Jejich chemické složení je uvedeno v tab. I, obsah příměsí uvádí tab. II,

Tabulka I

Chemické složení posuzovaných vápenců v hm. %

Parametr	Čížkovice	Lahošť
Vlhkost	0,86	0,23
CaCO ₃	73,57	96,84
CaSO ₄	0,17	0,03
CaO	41,61	54,23
MgO	0,72	0,65



Obr. 1. Schéma aparatury; 1 – regulační jednotka, odpařovač, 2 – odpařovač, 3 – reaktor, 4 – drcený křemen, 5 – křemenný reaktor se vzorkem, 6 – teploměr, 7 – vodní chladič, 8 – zachycovač kondenzátu, 9 – chladič agregát, 10 – analyzátor, 11 – plynoměr

Tabulka II
Obsah příměsí ve zkoušených vápencích v hm. %

Prvek	Čížkovice	Lahošť
Na	0,056	0,018
Mg	0,522	0,402
Al	3,680	0,675
Si	8,630	1,340
P	0,059	0,102
S	0,061	0,130
K	0,919	0,694
Ti	0,186	0,034
Mn	0,020	0,021
Fe	1,220	0,301

Tabulka III
Měrné povrchy kalcinovaných a nekalcinovaných vápenců
v $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$

Vápenec	Povrch před kalcinací	Povrch po kalcinaci při 850 °C
Lahošť	2,63	8,44
Čížkovice	16,24	8,05

povrchy nekalcinovaných a kalcinovaných vzorků při teplotě 850 °C jsou uvedeny v tab. III.

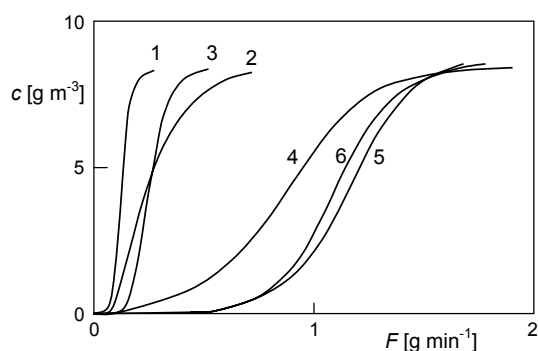
Výsledky a diskuse

Měření se suchým modelovým plynem

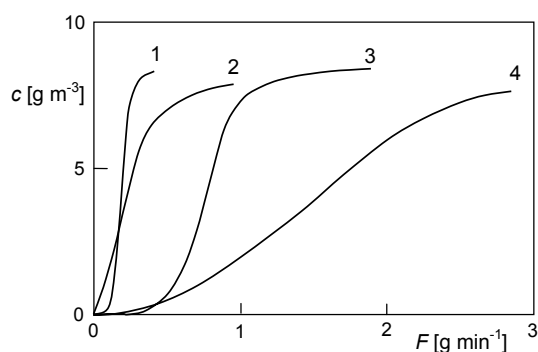
Pro vysvětlení rozdílů v reaktivitách sledovaných vápenců v průmyslových podmínkách odsíření fluidních kotlů spalujících hnědé uhlí z dolu Bílina byly vzorky vápenců z lokality Čížkovice a Lahošť nejprve podrobeny testům se suchým modelovým plynem při teplotách 750 °C, 850 °C a 950 °C při statickém uspořádání reakčního lože. Výsledky získané při těchto podmínkách, které jsou dokumentovány na obr. 2, dokladují, že teplota kalcinace vápenců 850 °C odpovídající provozním podmínkám fluidních kotlů pro spalování hnědé uhlí je pro kalcinaci obou vzorků optimální. Za zvolených podmínek adsorpční schopnost vápence z Čížkovic byla vyšší než vápence z Lahoště, což ale neodpovídalo provozním zkušenostem^{12,13}, kdy vápenec z lokality Čížkovice vykazoval podstatně horší odsířovací vlastnosti.

Měření s vlhkým plynem

Obdobné pořadí reaktivit, které neodpovídá provozním zkušenostem, bylo prokázáno u odsíření modelového plynu obsahujícího $8300 \text{ mg m}^{-3} \text{ SO}_2$ za přítomnosti 15 %



Obr. 2. Vliv teploty na reaktivitu vápenců; navážka 3 g frakce 0,3–0,6 mm, 1 – Lahošť 750 °C, 2 – Lahošť 850 °C, 3 – Lahošť 950 °C, 4 – Čížkovice 750 °C, 5 – Čížkovice 850 °C, 6 – Čížkovice 950 °C, c – výstupní koncentrace SO_2 z reaktoru, F – hmotnostní tok SO_2 do reaktoru



Obr. 3. Porovnání reaktivit vzorků vápenců s SO_2 ve stacionární a fluidní vrstvě při 750 °C; navážka 3 g frakce 0,3–0,6 mm; 1 – Lahošť, stacionární vrstva, 2 – Lahošť, fluidní vrstva, 3 – Čížkovice stacionární vrstva, 4 – Čížkovice, fluidní vrstva, c – výstupní koncentrace SO_2 z reaktoru, F – hmotnostní tok SO_2 do reaktoru

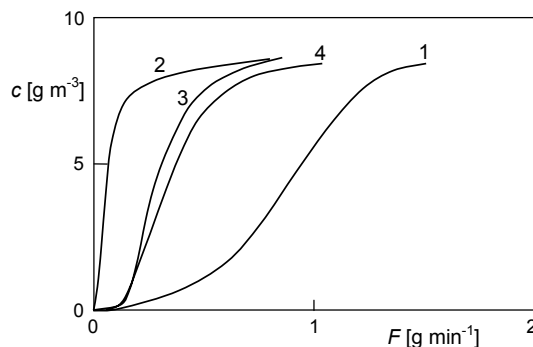
vodní páry^{12,13}, porovnání chování kalcinátů obou vápenců ve stacionární a fluidní vrstvě (obr. 3) nebo jejich porovnání po přidavku popela získaného spálením hnědé uhlí z dolu Bílina k již předpřipraveným kalcinátům.

Měření za současného spalování uhlí

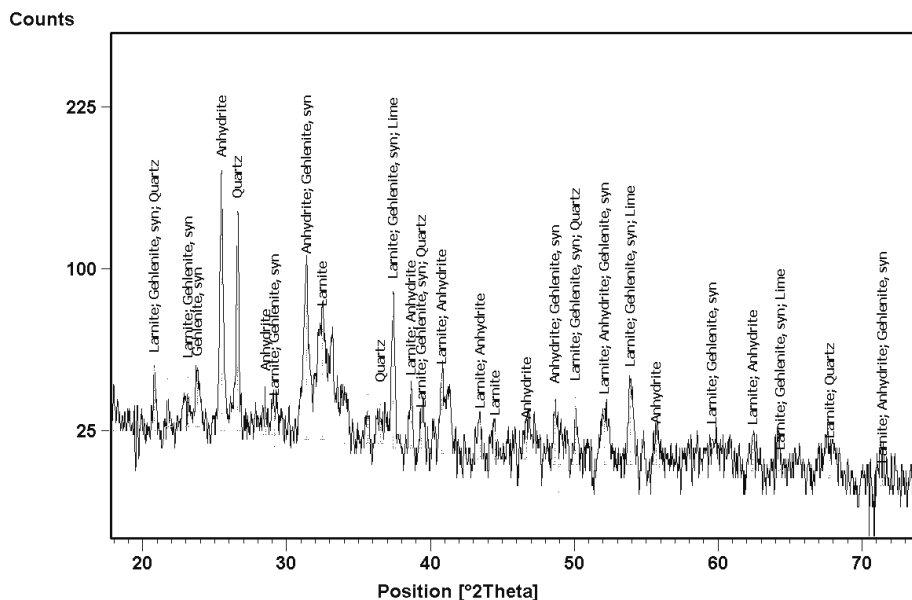
Vzhledem k tomu, že ani přidavek samotného popela ke zkoušeným vápencům neprokázal významnější změny reaktivit kalcinátů vápenců, byly provedeny pokusy, jejichž cílem bylo zjistit, jak se chovají vzorky sorbentů při současném spalování uhlí. Byly připraveny vzorky směsí 10 % vápence a 90 % uhlí z dolu Bílina s granulometrií vápenců 0,3–0,6 mm, vzorky byly zahřívány v muflové peci na 850 °C. Pokusy odsíření v reaktoru byly provedeny za stejných podmínek jako předchozí testy reaktivity. Výsledky těchto měření jsou znázorněny na obr. 4.

Významným zjištěním bylo, že zatím co reaktivita vzorku kalcitu kalcinovaného s uhlím se příliš nelišila od samotného vápence, čížkovický vápenec po spálení s uhlím při 850 °C vykázal velmi významné zhoršení reaktivity. Toto zjištění vedlo k závěru, že kalcinací vznikající CaO z čížkovické křídly reaguje ve fluidním ohništi za teploty vyšší než cca 800 °C se vznikajícími oxidy vlastních nečistot (viz tab. I), jílu, resp. popelovin z uhlí za vzniku řady aluminosilikátů, přičemž dochází k blokování povrchu pórů (zaslepování pórů). Slinutý povrch částic adsorbentu omezuje přístup SO₂ ze spalin k povrchu sorbentu. O tom svědčí i klesající hodnoty měrného povrchu kalcinátu u vápence Čížkovice (tab. II), na rozdíl od nárůstu měrného povrchu kalcinátu vápence z Lahoště.

K potvrzení uvedené hypotézy byl proveden výzkum směřující k prokázání tvorby těchto sloučenin pomocí fázevé analýzy RTG. Kalcinační testy laboratorně připravených směsí analytických vzorků (10 % uhlí + 90 % vápence) byly provedeny při 800 °C po dobu 4, 10 a 15 min.



Obr. 4. Porovnání reaktivit surových vápenců s SO₂ po samotné kalcinaci a kalcinaci v přítomnosti hnědého uhlí Bílina; 1 – Čížkovice, 2 – Čížkovice po kalcinaci za přítomnosti uhlí, 3 – Lahošť, 4 – Lahošť po kalcinaci za přítomnosti uhlí, c – výstupní koncentrace SO₂ z reaktoru, F – hmotnostní tok SO₂ do reaktoru



Obr. 5. RTG analýza ložového popela

Tabulka IV

Vybrané výsledky RTG analýzy v %

Kr. fáze	Albit	Larnit	Garnet	Gehlenit	Nakrit
Složení	Na _{0,14} Ca _{0,16} Al _{1,16} Si _{2,84} O ₈	Ca ₂ SiO ₄	Ca ₃ Al ₂ Si ₃ O ₁₂	Ca ₂ Al(AlSiO ₇)	Al ₂₁ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
Teplota					
950 °C	–	14	2	11	11
1000 °C	29	19	–	7	8

Pozn.: kalcinace 4 minuty

Vybrané výsledky získané analýzou RTG jsou uvedeny v tab. IV, resp. na obr. 5 je uvedena analýza RTG ložového popela z provozu používajícího k odsíření vápencem Čížkovice.

Testování reaktivit takto připravených kalcinátů je znázorněno na obr. 4. Ten dokládá, že při společném spálení uhlí s čížkovickým vápencem dochází k výraznému snížení jeho schopnosti reagovat s SO_2 ve fluidní vrstvě. V případě testování vápence Lahošť připraveného za stejných podmínek pokles reaktivity není zřejmý.

Výsledky ukazují, že v laboratorně připravených kalcinátech z vápence z Čížkovic byla prokázána přítomnost krystalických reaktantů oxidu vápenatého s oxidy, které tvoří významnou část jílových složek hnědého uhlí, uhlí z dolu Bílina nevyjímaje.

Závěr

Testování reaktivity dvou samotných vápenců v laboratoři prostřednictvím dosud používaných metod porovnávajících adsorpční mohutnost kalcinátů vápenců prokázalo, že vyšší účinek v podmínkách zvoleného experimentu má vápenc z Čížkovic, který je křídového původu a nemá vyvinutou krystalovou strukturu. Druhý vápenc (Lahošť) – vysokoprocenní kalcit, sice v laboratorním měřítku vykázal horší afinitu vůči oxidu siřičitému, nicméně při odsířování spalin v provozních kotlích poskytuje jednoznačně lepší výsledky.

Získané poznatky RTG analýzy vedou k závěru, že výsledky získané s čížkovickým vápencem v průmyslových podmínkách jsou ovlivněny typickými reakcemi mezi CaO a příslušnými oxidy popelovin uhlí, zejména SiO_2 , Al_2O_3 a Fe_2O_3 , o čemž svědčí i klesající povrch kalcinátu zjištěný v laboratoři, kterým proniká SO_2 do zrn CaO . Vzniklé reakční produkty CaO a oxidů Si , Al a Fe již nereagují s SO_2 , tzn., že se nepodílejí na odsíření spalin a ovlivňují velmi negativně spotřebu vápence použitého k odsíření spalin ve fluidní vrstvě kotle.

Na základě výsledků byl navržen nový postup určování reaktivity anorganických uhličitánů (sorbentů) a jejich odsířovacích schopností. Postup spočívá v tom, že vápenc je před měřením odsířovací reaktivity podroben nejprve kalcinaci jeho směsi s uhlím (např. v poměru 1:10), při teplotě respektující návaznou aplikaci (700 až 1000 °C), při reakční době odpovídající době zdržení ve fluidní vrstvě (3–5 min). Vlastní měření odsířovací aktivity je pak provedeno ve fluidní vrstvě až s takto získaným reakčním produktem po síťové předúpravě respektující fluidizační podmínky aparatury (např. frakce 0,3–0,6 mm).

Získané poznatky lépe vystihují reakční schopnosti vápenců odsířovat spalinu v provozních podmínkách než přímé aplikační testy založené na reakci s oxidem siřičitým a mohou tak významně přispět k lepší optimalizaci nákladů na množství vápence potřebného pro splnění emisních limitů pro SO_2 .

Část výsledků této práce byla získána za finanční podpory, kterou autoři obdrželi v rámci úkolu MSM ČR 604 613 7304.

LITERATURA

1. Borgward R. H.: Environ. Sci. Technol. 4, 363 (1970).
2. Borgward R. H., Harvey D. R.: Environ. Sci. Technol. 6, 351 (1972).
3. Diehl A.: *Thermogravimetric Analysis for Reactivity of Limestones, Proceedings from Conf. Dry Limestone, Gilbertville 22.–26.6.1970, Kentucky, USA.*
4. Vejvoda J., Hrnčič J.: Ochrana Ovzduší 10, 139 (1974).
5. Borgward R. H.: AIChE J. 31, 101 (1985).
6. Ar I., Dogu G.: Chem. Eng. J. 83, 1321 (2001).
7. Khinast J., Krammer G. C., Brunner C., Staudinger G.: Chem. Eng. Sci. 13, 2198 (1996).
8. Senary M. K., Pirkey J.: *Proceedings of the 10th International Conference on Fluidized Bed Combustions, 341–350, 1980.*
9. Adánez J., Labiano G., Abánades J. C., deDiego L. F.: Fuel 73, 355 (1994).
10. Badin E. J., Frayiner G. C.: Environ. Sci. Technol. 19, 894 (1985).
11. Snell G. J., Schaefer J. L., Kim H. T., Sethi V. K., Stencil J. M.: *Proceedings of the 10th International conference on Fluidized Bed Combustion (1), 351–7, 1989.*
12. Buryan P., Vejvoda J., Chalupa P., Maryška M., Krátký J., Veverka L.: *20. mezinárodní konference Ochrana ovzduší, Štrbské Pleso 23.–25.11.2005, str. 37–43. Kongrescentrum, Bratislava 2005.*
13. Buryan P., Vejvoda J., Chalupa P., Maryška M., Krátký J., Veverka L.: *15. mezinárodní konference kotle a energetická zařízení 2006, Brno 13.–15.3.2006, sekce IV, F018. AVO, Brno 2006.*

P. Buryan^a, J. Vejvoda^a, P. Chalupa^a, M. Maryška^a, J. Krátký^b, and L. Veverka^b (^aDepartment of Gas Manufacture, Coke Chemistry and Atmosphere Protection, Institute of Chemical Technology, Prague, ^bEnergetika Ltd. Kladno): **New Method of Characterization of Limestones Used in Kettles with Fluid Layer for Desulfurization of Combustion Products**

A new reliable two-step method for the prediction of limestone reactivity in desulfurization of coal combustion products in fluid kettles. In the first step the limestone is calcined with coal, in the second step the rate of the reaction of the mixture with sulfur dioxide in a tubular reactor is measured. The results of the method better correspond to the behaviour of limestone in industrial kettles with a fluid layer.

CENA MERCK

11. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck“ 2008

Ve dnech 5. a 6. února 2008 se na Chemickém ústavu Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně uskutečnil již 11. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos organizoval Chemický ústav Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck spol. s r. o. 15 účastníků ze 7 předních analytických pracovišť jasně dokumentovalo kvalitu vědecko-výzkumné práce v oboru analytické chemie na svých pracovištích i své schopnosti prezentovat na vysoké úrovni získané poznatky. Bez ohledu na dosažené umístění je proto na místě poděkovat všem soutěžícím studentům za odvedenou práci. Nelehký úkol poroty i vyrovnanost soutěžních prací dokumentuje i skutečnost, že byly uděleny dvě 2. ceny a celkem 5 zvláštních cen poroty.

První místo získal Vít Novotný (Univerzita Karlova v Praze) s prací „Voltametrické a amperometrické stanovení acifluorfenu, nitrofenu a oxyfluorfenu na stříbrné pevné amalgamové elektrodě“ a o druhé místo se podělila Pavla Foltýnová (Masarykova Univerzita v Brně) s prací „Off-line spojení kapilární elektroforézy, laserové desorpce a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (CE-LD ICP MS)“ a Jakub Rak (VŠCHT v Praze) s prací „Iontové kapaliny a jejich hydrofobicita“. Zvláštní cenu poroty získala Petra Hinnerová (Univerzita Palackého v Olomouci) za práci „Analýza mikroorganismů a buněk kapilární elektroforézou“, Petra Hřibová (Veterinární a farmaceutická fakulta Brno) za práci „Fenolické látky z rostlin rodu *Cuscuta*“, Alžběta Kokaislová (VŠCHT v Praze) za práci „Příprava SERS – aktivního měděného povrchu“, Hana Velínská (Univerzita Pardubice) za práci „Charakterizace přírodních směsí triacylglycerolů pomocí off-line dvourozměrné HPLC/MS“ a Pavel Žvátora (VŠCHT v Praze) za práci „Sledování způsobu vazby modelových látek na nanočástice stříbra“.

Fotografie z celého průběhu soutěže, výsledky a další informace je možné najít na internetových stránkách <http://www.chemi.muni.cz/~analytika/>. Zde je jistě namístě poděkovat celému týmu kolegů z Masarykovy univerzity,



Foto: Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck“ 2008; zleva: ředitel divize Chemie a laboratorních produktů firmy Merck pan Artur Stawisky, manažerka prodejního týmu firmy Merck paní Ing. Lenka Ungrmanová, Bc., Vít Novotný (Univerzita Karlova v Praze), Jakub Rak (VŠCHT Praha), Bc. Pavla Foltýnová (Masarykova Univerzita v Brně) a oblastní zástupce firmy Merck pan Mgr. Zdeněk Haváč.

jmenovitě Mgr. Mirce Bittové, Ph.D., Ing. Blance Hégrové, prof. RNDr. Viktoru Kanickému, Dr.Sc., doc. RNDr. Přemyslu Lubalovi, Ph.D. a Mgr. Petru Táborskému, Ph.D. za dokonalé organizační zabezpečení celé akce a za vytvoření neobyčejně příjemné a přátelské atmosféry, která vyvrcholila závěrečným rautem. Dík všem účastníkům patří pochopitelně i firmě Merck a všem jejím zástupcům přítomným na soutěži, jmenovitě panu Arturu Stawiskému, řediteli divize Chemie a laboratorních produktů, paní Ing. Lence Ungrmanové, manažerce prodejního týmu a panu Mgr. Zdeňku Haváčovi, oblastnímu zástupci firmy Merck.

Na závěr nezbývá než sdělit, že 12. ročník této soutěže se uskuteční na Univerzitě Pardubice v únoru 2009 a těšit se na další pokračování této zajímavé a užitečné akce.

Jiří Barek

HPLC SEPARACE POLYKARBOXYLÁTOVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU S VYUŽITÍM BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE

ANNA HAMPLOVÁ^{a*}, PAVEL COUFAL^a,
ZUZANA BOSÁKOVÁ^a, FRANTIŠEK OPEKAR^a
a VOJTĚCH KUBÍČEK^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2,

^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
annahamplova@volny.cz

Došlo 16.10.07, přijato 27.12.07.

Klíčová slova: HPLC, deriváty cykluenu, bezkontaktní vodivostní detektor (CCD)

Úvod

Počet lidí v České republice, které každý rok postihne nádorové onemocnění, se každým rokem zvyšuje. Včasné odhalení nádoru a zahájení léčby výrazně zvyšuje šance pacienta na úplné vyléčení. Proto se vedle vývoje nových léčiv věnuje velká pozornost diagnostice a zobrazování nádorů. Jednou z nejúčinnějších neinvazivních diagnostických metod je v současnosti tomografie magnetické rezonance (MRI – Magnetic Resonance Imaging)¹. K dosažení lepšího zobrazení nádoru se u této metody používají kontrastní látky, jejichž základem jsou paramagnetické látky založené převážně na Gd^{3+} iontu. Pro využití v klinické praxi musí být tento, pro tělo velmi toxický ion, aplikován ve formě komplexu, který je dostatečně stabilní jak z hlediska termodynamického, tak z hlediska kinetického. Ligandy používané k tomuto účelu nejčastěji jsou polykarboxylátové deriváty cykluenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) schopné koordinovat ion gadolinitý osmi koordinačně-kovalentními vazbami a vytvořit tak velmi stabilní komplex².

Polykarboxylátové deriváty cykluenu (obr. 1) se většinou připravují poměrně složitou několikastupňovou syntézou. Čištění jednotlivých reakčních meziproduktů je obtížné, protože vedle žádané látky nelze zabránit vzniku vedlejších produktů s velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. I s využitím opakovaně nízkotlaké sloupcové chromatografie je obtížné získat polykarboxylátové derivá-

ty cykluenu v čistotě požadované pro klinickou praxi. Možným řešením se zdá být použití HPLC, které nebylo u této skupiny látek dosud popsáno ani v analytickém ani v preparativním měřítku.

Studované deriváty cykluenu často nemají ve svých molekulách žádný výrazný chromofor a nejvíce absorbují záření až při vlnových délkách kolem 200 nm. V této oblasti UV jsou však spektrální odezvy analytů rušeny absorpcí methanolu a acetonitrilu, tedy rozpouštědel běžně používaných jako součást mobilní fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s reverzními fázemi (RP-HPLC). Jedním z možných řešení problému detekce studovaných látek je použití bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD – Contactless Conductivity Detector, v literatuře někdy také označovaný C^4D – Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detector)^{3,4}. Ačkoli jde o poměrně častou metodu detekce v kapilární zónové elektroforéze^{5,6}, v literatuře byly zatím popsány jen dva případy použití CCD v RP-HPLC (cit.^{7,8}). Důvodem malého počtu prací může být to, že metodou RP-HPLC je separováno poměrně málo látek majících náboj, který je hlavní podmínkou pro použití CCD. Nevýhodou této metody detekce je závislost signálu nejen na vodivosti analyzovaného roztoku, ale také na jeho elektrické permitivitě. Proto i malá změna obsahu vody v mobilní fázi způsobí velkou změnu signálu CCD, což vede např. k výrazným systémovým pikům^{9,10}.

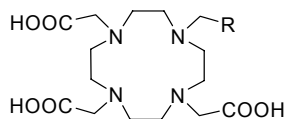
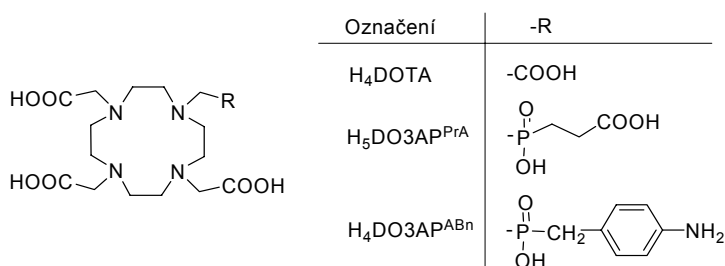
Cílem této práce bylo vyvinout metodu separace polykarboxylátových derivátů cykluenu pomocí RP-HPLC, která by umožnila rychlou kontrolu čistoty jednotlivých frakcí při dělení reakčních směsí sloupcovou chromatografií a dala se případně v budoucnu využít pro preparativní HPLC. Dalším úkolem bylo použití prototypu CCD jako vhodného detektoru pro vizualizaci polykarboxylátových derivátů cykluenu a jeho porovnání s UV detektorem při separaci těchto látek v RP-HPLC.

Experimentální část

Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, který se skládal z čerpadla LCP 4000, dávkovacího ventilu s 10 μ l smyčkou a spektrofotometrického UV detektoru LCD 2084 (vše Ecom, ČR). Současně byl použit prototyp bezkontaktního vodivostního detektoru s izolovanými drátkovými elektrodami¹¹ zkonstruovaný na katedře analytické chemie Univerzity Karlovy v Praze. Jako zdroj vysokofrekvenčního sinusového napětí pro CCD byl použit generátor FG 503 (Motech Industries, USA). Získaná data byla zpracována softwarem CSW 1.7 (DataApex, ČR).

* Anna Hamplová získala 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 1. Struktury studovaných polykarboxylátových derivátů cyklenu

K vývoji metody separace byly použity tyto kolony: RP Select B (C8), 125 × 4 mm, velikost částic 5 μm (Merck, SRN), Biospher PSI 200 NH, 150 × 4,6 mm, velikost částic 7 μm (Labio, ČR), Ascentis RP-Amide, 250 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Supelco, USA) a Discovery HSF5, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Supelco, USA).

Použité chemikálie

Methanol a acetonitril LiChrosolv pro HPLC a kyselina mravenčí (98–100%) byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina octová (99%), kyselina trifluoroctová (98%) a triethylamin (99,5%) byly zakoupeny od firmy Fluka (Neu-Ulm, Německo). Kyselina fosforečná (85%), hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný a hydroxid draselný, vše v čistotě p.a., byly zakoupeny od firmy Lachema (Brno, ČR).

Všechny studované polykarboxylátové deriváty cyklenu s čistotou větší než 95 % dle NMR byly syntetizovány na Katedře anorganické chemie Univerzity Karlovy v Praze^{12–14}. Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Milli-Q (Millipore Corporation, USA).

Příprava mobilních fází a vzorků pro analýzu

K analýzám byly používány roztoky polykarboxylátových derivátů cyklenu v mobilní fázi o koncentraci 1·10⁻⁴ mol dm⁻³, které byly uchovávány ve tmě v chladu. Mobilní fáze byly připraveny smísením organického rozpouštědla s deionizovanou vodou nebo pufrům o koncentraci 0,01 mol dm⁻³ v daném poměru a před použitím 15 min ultrazvukovány přístrojem Elmasonic S15H (P-LAB, ČR). Fosforečnanový pufr (pH 7,1) byl připraven rozpuštěním příslušného množství hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě. Octanový (pH 4,7), mravenčanový (pH 3,5) a fosforečnanový pufr (pH 2,1) byly připraveny částečným zneutralizováním příslušných kyselin hydroxidem draselným. Hodnoty pH vodné složky mobilní fáze byly měřeny na pH metru Jenway 4330 (Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, který byl kalibrován na standardní pufrů o pH 4 a 7.

Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Vzorek (10 μl) byl dávkován manuálně přes dávkovací ventil, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml min⁻¹. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 200 nm. Zdroj vysokofrekvenčního napětí pro CCD pracoval při frekvenci 100 kHz a amplitudě 4 V. Detektory byly zapojeny v sérii, přičemž CCD byl za výstupem z UV detektoru.

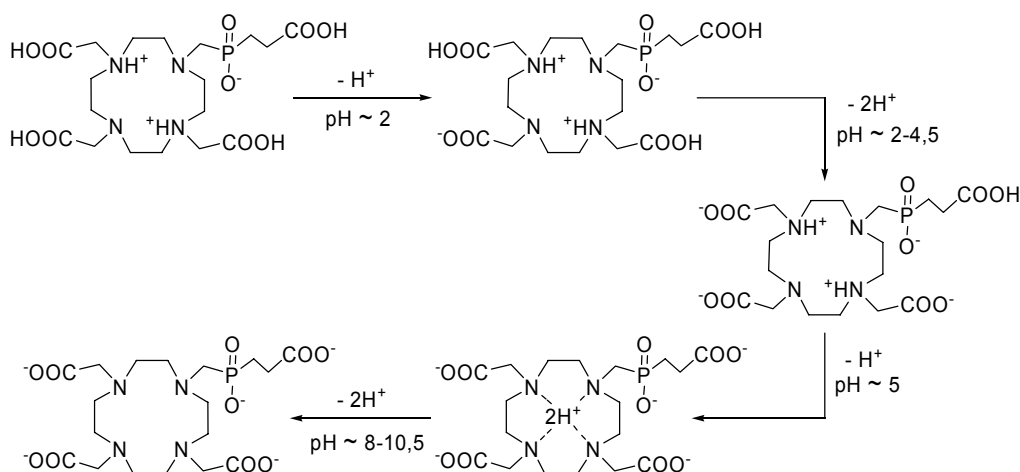
Výsledky a diskuse

Separace

Molekuly studovaných látek (obr. 1) obsahují vedle nepolárních částí také značně polární funkční skupiny. Separace tedy může být založena na hydrofilních i hydrofobních interakcích analytů se stacionární fází, které se budou uplatňovat různou měrou podle konkrétní sloučeniny. Další, pro chromatografii velmi důležitou, vlastností polykarboxylátových derivátů cyklenu je schopnost tvořit amfionty. Všechny studované deriváty cyklenu ve svých molekulách obsahují jednak aminoskupiny schopné protonizace, ale také karboxylové a fosfinátové skupiny, které mohou naopak deprotonizovat^{12,15}. Výsledný náboj jejich molekul se pak pohybuje od +3 do -4 podle pH mobilní fáze (obr. 2).

Pro vývoj metody separace polykarboxylátových derivátů cyklenu byla v této práci zvolena RP-HPLC, která je jednou z nejrozšířenějších analytických metod ve farmaceutickém průmyslu. Z velkého množství dostupných stacionárních fází byly vyzkoušeny tyto čtyři: klasická reverzní fáze C8 (kolona RP Select B), amidová (kolona Ascentis RP-Amide), aminopropyllová (kolona Biospher PSI) a pentafluorofenylpropyllová (kolona Discovery HS F5).

První experimenty byly provedeny na klasické reverzní fázi C8 (kolona RP Select B), která je díky deaktivovaným silanolovým skupinám doporučována pro analýzu bazických látek. Vzhledem k tomu, že molekuly všech analyzovaných látek obsahují několik silně polárních skupin, bylo možné předpokládat jejich malou retenci na tomto typu kolony. Výraznější interakci s klasickou reverzní stacionární fází může poskytovat pouze látka H₄DO3AP^{ABn}, u které se opro-

Obr. 2. Protonizace H₅DO3AP^{PrA} v závislosti na pH (cit.¹⁰)

ti ostatním studovaným látkám mohou navíc uplatnit hydrofobní interakce aromatického kruhu. Na této koloně byly testovány mobilní fáze obsahující od 15 do 85 obj.% organického modifikátoru (methanolu nebo acetonitrilu). Všechny studované látky eluovaly téměř s mrtvým časem kolony a k jejich separaci tedy nedošlo. Retenční čas H₄DO3AP^{ABn} se od retenčních časů ostatních polykarboxylátových derivátů cyklenu prakticky nelišil. Hodnota pH mobilní fáze byla postupně upravována pomocí pufrů o pH 2 až 7 s cílem změnit celkový náboj molekul studovaných látek. Výraznější zadržování polykarboxylátových derivátů cyklenu přesto nebylo pozorováno.

Lepší rozlišení látek obtížně separovatelných na klasické reverzní fázi C8 (C18) poskytují obvykle stacionární fáze se zakotvenou polární skupinou, protože k separaci na nich přispívají i hydrofilní interakce, zejména tvorba vodíkových vazeb¹⁶. Zakotvené polární skupiny navíc fungují jako velmi účinné chránění volných silanolových skupin¹⁷, a jsou tudíž doporučovány pro analýzu bazických a amfionických látek, jakými jsou i polykarboxylátové deriváty cyklenu. Pro separaci studovaných látek byla zvolena kolona Ascentis RP-Amide, která podle údajů výrobce obsahuje zakotvený amidový ligand. Opět byly testovány mobilní fáze s obsahem methanolu, resp. acetonitrilu, od 15 do 85 obj.% a pufrů s hodnotou pH v rozmezí od 2 do 7. K úspěšné separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu však nedošlo. Všechny studované látky eluovaly prakticky s mrtvým časem kolony bez ohledu na použitou mobilní fázi. Jediným výraznějším rozdílem oproti výsledkům získaným na koloně RP-Select B byla větší symetrie pík studovaných látek, což bylo patrně způsobeno lepším chráněním volných silanolových skupin zakotvenou amidovou skupinou než trimethylsilanovými skupinami na koloně RP Select B.

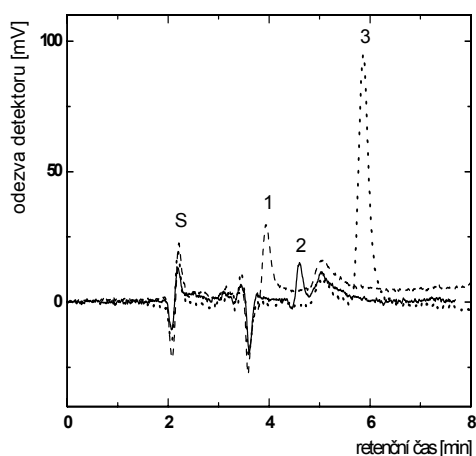
Jako další v pořadí byla testována aminopropylová stacionární fáze (kolona Biospher PSI 200 NH), nejpolárnější stacionární fáze z testovaných sorbentů. Při použití

mobilních fází obsahujících 35 až 85 obj.% methanolu jako organického modifikátoru studované látky z kolony neeluovaly ani po 120 minutách nebo byly jejich píky již natolik rozmyté, že splynuly se základní linií. Vysvětlení může spočívat v charakteru sorbentu, neboť aminoskupiny stacionární fáze jsou za podmínek separace protonizovány, díky čemuž se tato kolona chová jako slabě bazický aniontový iontoměnič. Separované látky patrně byly na koloně pevně zadržovány a k jejich vymytí bylo třeba mobilní fáze o pH vyšším či nižším než dovoluje stabilita stacionární fáze (tj. mimo interval pH 2–7,5).

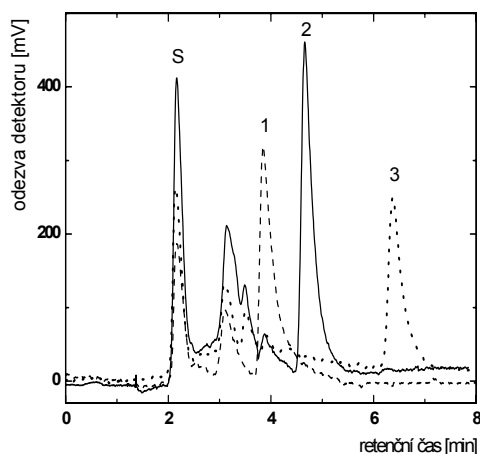
Experimenty provedené na předchozích třech kolonách ukázaly, že k úspěšné separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu je třeba nalézt takovou stacionární fázi, na které se budou uplatňovat zejména hydrofilní interakce, které budou navíc doplněny o interakce hydrofobní. Z dostupných stacionárních fází byla vybrána pentafluorofenylpropylová stacionární fáze s deaktivovanými silanolovými skupinami (kolona Discovery HS F5), jejíž základní charakteristikou je tzv. „U-shape retention“¹⁸. Při separaci polárních analytů se totiž tato kolona podle množství organického rozpouštědla v mobilní fázi chová buď jako reverzní, nebo jako normální fáze. Pokud je závislost retence na množství organického modifikátoru v mobilní fázi vynesena do grafu, výsledkem je křivka ve tvaru písmene U. Je-li použita mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru, měly by převažovat interakce hydrofilní, zejména iontově výměnné a tvorba vodíkových vazeb mezi analytem a stacionární fází.

Polykarboxylátové deriváty cyklenu se podařilo úspěšně separovat na této koloně při použití mobilních fází obsahujících od 65 do 95 obj.% organického modifikátoru, tedy za podmínek, kdy kolona Discovery HS F5 pracuje spíše v modu normální fáze. Pokud byl jako organický modifikátor mobilní fáze použit acetonitril místo methanolu, nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl ve tvaru pík studovaných látek. Podobných retenčních časů jednotlivě

a



b



Obr. 3. Chromatogramy vzorků H_4DOTA (1), H_5DO3AP^{PrA} (2) a H_4DO3AP^{ABn} (3); systémový pik je v chromatogramech označen písmenem S. Stacionární fáze: Discovery HSF5; mobilní fáze: methanol-voda (85:15, v/v); průtok: $0,5 \text{ ml min}^{-1}$; (a) UV detekce ($\lambda = 200 \text{ nm}$), (b) CCD detekce ($f = 100 \text{ kHz}$, $A = 4 \text{ V}$)

vých derivátů cykvenu bylo dosaženo, pokud mobilní fáze obsahovala asi o 10 obj.% méně acetonitrilu než methanolu. Čím více organického modifikátoru mobilní fáze obsahovala, tím více byly separované látky na koloně zadržovány, ale tím horší byl také tvar jejich piků. Nejlepšího dělení studovaných látek bylo dosaženo v mobilní fázi o složení methanol-voda (85:15, v/v), která je vhodným kompromisem mezi retencí jednotlivých separovaných látek a rozmýváním jejich piků (obr. 3). Píky jednotlivých studovaných látek byly symetrické a oddělené až k základní linii.

V další části práce bylo studováno chování polykarboxylátových derivátů cykvenu na této stacionární fázi při použití mobilních fází s malým obsahem organického modifikátoru (15–35 obj.%), tedy za podmínek, kdy kolona Discovery HS F5 pracuje spíše v modu reverzní fáze. Studované látky, s výjimkou H_4DO3AP^{ABn} , nebyly zadržovány ani při použití mobilní fáze o složení methanol-voda (15:85, v/v). Látka H_4DO3AP^{ABn} obsahující ve své molekule aromatický kruh, byla na této stacionární fázi pracující v reverzním módu zadržována ($k = 0,86$), ačkoli na klasické reverzní fázi C8 eluovala prakticky s čelem. Hlavním důvodem zadržování H_4DO3AP^{ABn} jsou pravděpodobně π - π interakce mezi aromatickými kruhy stacionární fáze a analyzované látky.

Detekce

Polykarboxylátové deriváty cykvenu poskytují i při vlnové délce odpovídající maximu absorpční křivky ($\lambda =$

200 nm) poměrně slabý signál, zejména pokud je jako organický modifikátor mobilní fáze použit methanol (obr. 3a). Na základě této skutečnosti byl za klasický UV detektor zařazen ještě CCD, kterým je možné detegovat nabitě látky, jakými jsou polykarboxylátové deriváty cykvenu, a to i ve velmi malých koncentracích.

Pokud byla pro separaci studovaných látek použita mobilní fáze s malou vodivostí, tzn. neobsahující kyselinu ani pufr, poskytoval CCD, v souladu s očekáváním, podstatně větší odezvu než standardní UV detektor. To je jasně patrné z chromatogramů jednotlivých studovaných látek získaných na koloně Discovery HS F5 v optimální mobilní fázi methanol-voda (85:15, v/v) při současně UV (obr. 3a) a CCD detekci (obr. 3b). Poměr signálu a šumu (S/N) všech studovaných látek byl pro CCD větší, v případě látky H_5DO3AP^{PrA} dokonce více než desetkrát, ve srovnání s UV detektorem (tab. I).

Píky zaznamenané CCD vykazují větší asymetrii oproti těm, které byly získány UV detektorem. To je způsobeno pravděpodobně tím, že CCD byl zařazen až jako druhý v pořadí, což vedlo k výraznějšímu rozmýváním zón analytů. Díky větší citlivosti vodivostní detekce jsou v chromatogramech na obr. 3b vidět nečistoty eluující s retenčním časem kolem 3 min, které při použití UV detekce téměř zanikají v šumu základní linie. Chromatogramy navíc ukazují, že jak vzorek H_5DO3AP^{PrA} , tak H_4DO3AP^{ABn} je znečištěn malým množstvím H_4DOTA , což při UV detekci není vůbec patrné.

Tabulka I

Poměr signálu a šumu (*S/N*) pro UV a bezkontaktní vodivostní detekci

Látka	UV detektor <i>S/N</i>	CCD detektor <i>S/N</i>
H ₄ DOTA	24	58
H ₅ DO3AP ^{PrA}	10	128
H ₄ DO3AP ^{ABn}	63	77

Závěr

V rámci této práce bylo studováno chromatografické chování polykarboxylátových derivátů cyklenu. Byly vyzkoušeny čtyři typy moderních stacionárních fází: klasická reverzní fáze C8 (kolona RP Select B), aminopropylová (kolona Biospher PSI 200 NH), amidová (kolona Ascentis RP-Amide) a pentafluorofenylpropylová (kolona Discovery HS F5). Ze studovaných stacionárních fází je k separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu vhodná pouze kolona Discovery HS F5, na které se uplatňují jak hydrofilní, tak hydrofobní interakce separovaných látek se stacionární fází. Nejlepšího výsledku separace bylo dosaženo při použití mobilní fáze o složení methanol-voda (85:15, v/v).

Bylo zjištěno, že CCD, zatím používaný převážně v kapilární zónové elektroforéze, je vhodný pro detekci nabitých látek i v RP-HPLC, kterou lze uplatnit zejména, jde-li o látky slabě absorbující v UV oblasti. Neobsahuje-li mobilní fáze kyselinu ani pufr, poskytuje CCD lepší výsledky než běžný UV detektor. Signály studovaných látek byly při použití CCD natolik zřetelné, že bylo možné identifikovat ve vzorcích nečistoty, které na záznamu pořízeném UV detektorem nebyly patrné.

Seznam symbolů a zkratk

<i>A</i>	amplituda, V
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
<i>f</i>	frekvence, Hz
MRI	tomografie magnetické rezonance („Magnetic Resonance Imaging“)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
H ₄ DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
H ₄ DO3AP ^{ABn}	kyselina-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-{methyl[(4-amino-fenyl)methyl]fosfinová}
H ₅ DO3AP ^{PrA}	kyselina-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-[methyl(2-karboxy-ethyl)fosfinová]
<i>k</i>	retenční faktor
<i>S/N</i>	poměr signálu a šumu

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021620857), Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/06/0467), Grantové agentuře Akademie věd České republiky (projekt č. KAN201110651) a mezinárodnímu projektu COST D38 za finanční podporu.

LITERATURA

- Merbach A. E., Tóth E.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, New York 2001.
- Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Laufer R. B.: *Chem. Rev.* 99, 2293 (1999).
- Kubáň P., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 16, 2009 (2004).
- Guijt R. M., Evenhuis Ch. J., Macka M., Haddad P. R.: *Electrophoresis* 25, 4032 (2004).
- Abad-Villar E. M., Kubáň P., Hauser P. C.: *J. Sep. Sci.* 29, 1031 (2006).
- Šolínová V., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 29, 1743 (2006).
- Kubáň P., Hauser P. C.: *J. Chromatogr., A* 1128, 97 (2006).
- Kubáň P., Abad-Villar E. M., Hauser P. C.: *J. Chromatogr., A* 1107, 159 (2006).
- Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Suchánková J., Coufal P., Štulík K.: *Chromatographia* 56, 445 (2002).
- Srbek J., Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 28, 1263 (2005).
- Hoherčáková Z., Opekar F., Štulík K.: *Electroanalysis* 17, 1924 (2005).
- Försterová M., Svobodová I., Lubal P., Táborský P., Kotek J., Hermann P., Lukeš I.: *Dalton Trans.* 5, 535 (2007).
- Desreux J. F.: *Inorg. Chem.* 19, 1319 (1980).
- Rudovský J., Kotek J., Hermann P., Lukeš I., Mainero V.: *Org. Biomol. Chem.* 3, 112 (2005).
- Anderegg G., Arnaud-Neu F., Delgado R., Felcman J., Popov K.: *Pure Appl. Chem.* 77, 1445 (2005).
- Euerby M. E., Petersson P.: *J. Chromatogr., A* 994, 13 (2003).
- Ascah T. L., Feibush B.: *J. Chromatogr.* 506, 357 (1990).
- Bell D. S., Jones A. D.: *J. Chromatogr., A* 1073, 99 (2005).

A. Hamplová^a, P. Coufal^a, Z. Bosáková^a, F. Opekar^a, and V. Kubíček^b (^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic, ^b Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.): **HPLC Separation of Cyclen Polycarboxylates Using Contactless Conductivity Detection**

Polycarboxylate derivatives of cyclen are potential La (III) ion carriers for application in medicine, e.g. in magnetic resonance imaging (MRI). The compounds are prepared in multistep syntheses and hence the development of efficient separation and analytical methods for the determination of purity of the products and intermediates is desirable. This work was focused on HPLC methods suitable for the purpose. Out of the four modified stationary phases, only the pentafluorophenylpropyl modification,

offering mix-mode interactions, was found suitable. The effect of the mobile phase composition was investigated using aqueous methanol, acetonitrile and buffers of different pH. The best results were obtained with a methanol-water mixture (85:15, v/v). UV detection is unsuitable for the purpose because of its low absorption coefficients, even at short wavelengths. A new type of contactless conductivity detector provided a better sensitivity than the UV detector.

MINIATURIZACE ELEKTROLYTICKÝCH PRŮTOKOVÝCH CEL PRO ELEKTROCHEMICKÉ GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN V METODĚ AAS

JAKUB HRANIČEK*, VÁCLAV ČERVENÝ
a PETR RYCHLOVSKÝ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 12843 Praha 2
hranicek.jakub@email.cz

Došlo 2.11.07, přijato 21.1.08.

Klíčová slova: atomová absorpční spektrometrie, elektrochemické generování, těkavé hydridy, účinnost, miniaturizace, elektrochemická cela, atomizace

Úvod

Alternativní metodou k dnes již důkladně prostudovanému chemickému generování těkavých sloučenin¹ je metoda elektrochemického generování. Tato metoda překonává řadu komplikací spojených s chemickým generováním. Pro redukci analytu na hydrid je použit místo chemického redukčního činidla elektrický proud v prostředí velmi čistých minerálních kyselin². Tím odpadá možnost kontaminace roztoku analytu z redukčního činidla (popř. interferujícími ionty), což vede k možnosti dosáhnout nižších mezí detekce a stanovitelnosti. Další výhodou je úspora relativně drahého redukčního činidla nutného pro chemické generování. Při chemickém generování těkavých sloučenin je možné generovat těkavé sloučeniny některých prvků pouze z nižších oxidačních stavů tohoto prvku. Zredukování vyšších oxidačních stavů na nižší výrazně prodlužuje dobu rutinních analýz. Tento předredukční krok u elektrochemického generování odpadá³.

Technika elektrochemického generování těkavých sloučenin je prostředkem pro zavádění vzorku v plynné fázi v atomových spektrálních metodách. Může být také použita jako derivatizační technika při spojení separační techniky (např. kapalinové chromatografie, CZE) s detekcí některou prvkově selektivní spektroskopickou metodou při speciální analýze⁴. Základním požadavkem u této kombinované techniky je co nejmenší mrtvý objem celé aparatury; v daném případě zejména minimální objem elektrolytické cely a separátoru fázi. Současně by ovšem nemělo

dojít k výraznému snížení účinnosti generování příslušné těkavé sloučeniny. Tyto dva požadavky jsou však obvykle protichůdné a musí být proto nalezen vhodný kompromis.

Velmi často používanou elektrolytickou průtokovou celou pro generování těkavých sloučenin je tenkovrstvá cela^{5,6}, která dnes existuje v řadě modifikací^{7–9}. Společným rysem těchto cel je vždy iontově výměnnou membránou oddělený katodový a anodový prostor zhotovený z různého materiálu (plexisklo, teflon, polypropylen). Elektrody mají odlišnou velikost, tvar a mohou být z různých materiálů (olovo, uhlík, platina).

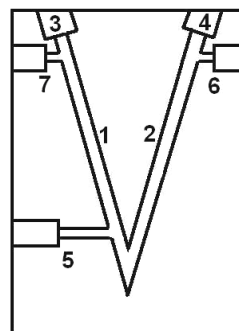
Cílem této práce byla konstrukce a optimalizace dvou různých typů miniaturních elektrolytických průtokových cel s minimálním vnitřním objemem pracujících v režimu kontinuální průtokové analýzy. Jedná se o konstrukčně nové typy bez iontově výměnné membrány.

Experimentální část

Konstrukční typy cel

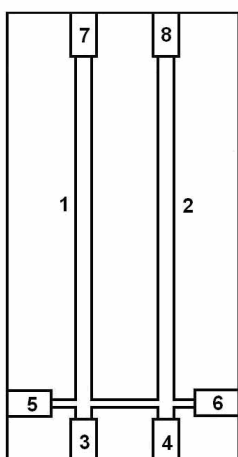
V této práci byly připraveny dva typy elektrolytických průtokových cel s miniaturizovaným katodovým a anodovým prostorem.

Jako první byla vyrobena cela A (obr. 1), která je zhotovena z jediného bloku plexiskla, ve kterém jsou vyvrtány otvory pro katodový a anodový prostor. Tyto prostory svírají vzájemně ostrý úhel ve tvaru písmene V. V katodovém prostoru je umístěna olověná katoda a v anodovém prostoru pak platinová anoda. Elektrolyt obsahující modelový prvek (selen) je zaváděn pouze jedním přívodním kanálkem vyústujícím do katodového pro-



Obr. 1. **Elektrolytická cela A;** 1 – katodový prostor, 2 – anodový prostor, 3 – závit pro upevnění katody, 4 – závit pro upevnění anody, 5 – kanálek se závitkem pro přívodní hadičku elektrolytu, 6 – kanálek se závitkem pro odvod plyných produktů z anodového prostoru, 7 – kanálek se závitkem pro odvod plyných produktů a elektrolytu z katodového prostoru

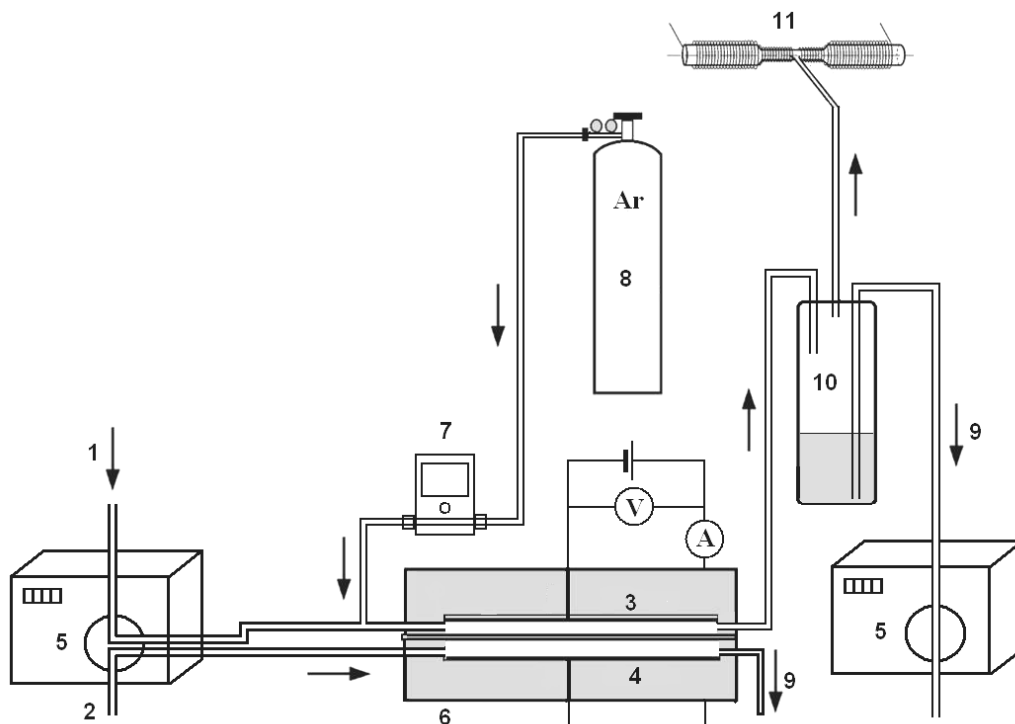
* Jakub Hraníček získal s touto prací 2. místo v soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie O cenu firmy Merck 2007.



Obr. 2. **Elektrolytická cela B**; 1 – katodový prostor, 2 – anodový prostor, 3 – závit pro upevnění katody, 4 – závit pro upevnění anody, 5 a 6 – místo pro přívodní hadičku elektrolytu, 7 – místo pro odvod plyných produktů a elektrolytu z katodového prostoru, 8 – místo pro odvod plyných produktů a elektrolytu z anodového prostoru

storu. Oba elektrodové prostory jsou vzájemně propojeny, takže elektrolyt může volně proudit přes katodový prostor i do prostoru anodového. Výhodou tohoto konstrukčního uspořádání je možnost výrazně přiblížit konce obou elektrod k sobě (menší vkládané napětí) aniž by došlo k přerušování kontinuální elektrolyzy nahromaděnými plynými produkty. Plyné produkty elektrolyzy (včetně elektrolytů) jsou rychle odváděny samostatnými výstupy od elektrod a je jim zamezena sorpce na povrchu okolních stěn. Výstup z anodového prostoru byl zaváděn do odpadu, výstup z katodového prostoru pak do miniaturního separátoru fází vlastní konstrukce, kde docházelo k oddělení kapalné a plyné fáze. Plyná fáze byla dále unášena nosným plynem (argon – 99,998 %) do odporově vyhřívaného křemenného atomizátoru (950 °C) umístěného v optické ose atomového absorpčního spektrometru.

U druhé zkonstruované cely B (obr. 2) jsou elektrodové prostory uspořádány do tvaru písmene U. Oba elektrodové prostory jsou kolmo propojeny kanálkem a mají svůj vlastní přívod a odvod elektrolytu a produktů. Elektrody jsou vsazeny z horní části do příslušných elektrodových prostorů. Anodovým prostorem proudí pouze čistý elektrolyt a katodovým prostorem pak elektrolyt s analytem. Výhodou tohoto uspořádání, oproti cele A, kdy elektrolyt vstupuje do elektrolytické cely dvěma vstupy, je rychlejší vymývání analytu po předchozím měřicím cyklu.



Obr. 3. **Schéma aparatury pro kontinuální elektrochemické generování** (zde s celou TC); 1 – přívod katolytu, 2 – přívod anolytu, 3 – katoda, 4 – anoda, 5 – peristaltická pumpa, 6 – tenkovrstvá průtoková cela, 7 – elektronický průtokoměr, 8 – nosný plyn, 9 – odpad, 10 – separátor fází, 11 – atomizátor

Pro srovnání parametrů nově připravených generačních cel byla použita klasická tenkovrstvá cela s iontově výměnnou membránou TC popsaná již dříve.

Objemy katodového prostoru jednotlivých cel byly následující: cela A 289 mm³, cela B 321 mm³ a cela TC (referenční) 654 mm³. Jedná se vždy o objem katodového prostoru zmenšeného o vlastní objem vložené elektrody. U všech cel byla katoda vyrobena z oloveného drátu o průměru 1 mm a čistoty 99,999 % (Aldrich, USA). Anoda byla vyrobena z platinového drátu o průměru 1 mm a čistoty 99,99 % (Goodfellow, UK). Schéma zapojení aparatury pro kontinuální elektrochemické generování těkavých sloučenin ve spojení s AAS detekcí je na obr. 3.

Přístrojové vybavení

Při optimalizaci pracovních parametrů elektrolytických cel a zjišťování základních charakteristik stanovení Se byl použit atomový absorpční spektrometr Solar 939 (Unicam, UK) se Se výbojkou s vysokou září s vlastním napájecím zdrojem (18 mA, $\lambda_{\text{Se}} = 196,0$ nm, šířka spektrálního intervalu 1,0 nm, Photron, Rakousko). Pro čerpání elektrolytů bylo použito programovatelné osmikanálové peristaltické čerpadlo MasterFlex[®] L/S (Cole-Parmer USA). Jako zdroj konstantního proudu byl použit laboratorní lineární zdroj LPS 303 firmy American Reliance, USA. Jako atomizátor byl použit externě vyhříváný křemenný atomizátor (délka atomizačního ramene 170 mm, vnitřní průměr 12 mm).

Chemikálie

Pracovní roztoky Se^{IV} o požadované koncentraci byly připravovány ředěním ze standardního roztoku Se^{IV} o koncentraci 1,000±0,002 g l⁻¹ (Analytika, Praha). Pro ředění všech roztoků byla používána deionizovaná voda připravená zařízením Milli Q_{PLUS} firmy Millipore, USA. Kyseliny H₂SO₄ (96 %), HCl (37 %) a H₃PO₄ (85 %) byly čistoty Suprapure, firmy Merck, Německo.

Výsledky a diskuse

Pro optimalizaci pracovních parametrů elektrolytických cel i zjištění základních charakteristik stanovení s těmito celami byl vybrán jako analyt selen. Pracovní parametry i základní charakteristiky byly srovnávány s výsledky získanými s tenkovrstvou elektrolytickou celou TC. Experimenty byly prováděny v režimu kontinuální průtokové analýzy.

Optimalizace pracovních podmínek

U obou cel byly optimalizovány následující parametry, které mohou výrazným způsobem ovlivnit dosaženou citlivost stanovení: odtahová rychlost, velikost a umístění elektrod, typ elektrolytu, zavádění nosného plynu, průtoková rychlost nosného plynu, průtoková rychlost elektroly-

tu(ů), generační proud a koncentrace elektrolytu (H₂SO₄). Ve všech případech byl hodnocen dosažený signál pro koncentraci Se 60 ng ml⁻¹.

Při průchodu elektrolytu se stanovovaným prvkem elektrolytickou průtokovou celou dochází na katodě ke kontinuální redukci analytu až na těkavý hydrid, který je spolu se vznikajícím vodíkem po oddělení kapalně fáze v separátoru fází unášen proudem inertního plynu do atomizátoru. Aby se v elektrolytické cele A i B ustavila hydrostatická rovnováha mezi přiváděným a odváděným elektrolytem a plynnými produkty elektrodových reakcí, musel být výstup směsi elektrolytu a plynných produktů z anodového prostoru řízen peristaltickým čerpadlem. Pokud byla nastavena malá odtahová rychlost, docházelo vlivem přetlaku vyvíjejících se plynných produktů na anodě k vytlačování elektrolytu z anodového prostoru do katodového prostoru a k přerušování elektrodové reakce. V případě velké odtahové rychlosti nastala podobná situace v katodové části elektrolytické cely. Proto byla nejdříve u elektrolytické cely A nalezena optimální odtahová rychlost produktů z anodového prostoru (1,6 ml min⁻¹). U cely B byla pozorována podobná závislost na odtahové rychlosti z anodového prostoru a byla zjištěna optimální hodnota 5,3 ml min⁻¹.

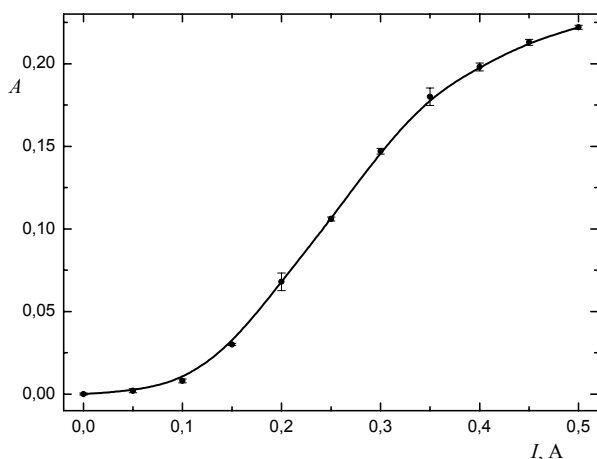
Délka vložené platinové anody nebyla rozhodující pro průběh elektrodové reakce. U olovené katody bylo třeba upravit délku tak, aby konec elektrody nezasahoval u obou cel do prostoru mezi přivodním kanálkem pro elektrolyt a místem spojení obou elektrodových prostor. Nakonec byla délka katody volena tak, aby její konec zasahoval těsně nad přivodní kanálek katolytu. V tomto případě nedocházelo k přerušování elektrolyzy.

Při použití HCl (katolyt běžně používaný v tenkovrstvých generačních celách) jako elektrolytu byl pro roztok Se (60 ng ml⁻¹) pozorován nulový signál v obou celách A i B. Důvodem je pravděpodobně plynný chlor vznikající na anodě a částečně pronikající do katodového prostoru a rozkládající vznikající selenovodík. Dále byla vyzkoušena H₃PO₄ a H₂SO₄. Pro další experimenty byla nadále používána H₂SO₄ (1,0 mol l⁻¹), se kterou bylo dosaženo nejvyšší citlivosti stanovení.

Nosný plyn byl zaváděn těsně za výstup z elektrolytické cely. Zavádět nosný plyn před elektrolytickou celou se ukázalo nepraktické, protože průchod nosného plynu malými prostory elektrolytické cely způsoboval náhodné přerušování elektrolyzy, což se výrazně projevvalo na zhoršení stability signálu. Závislost signálu na průtokové rychlosti nosného plynu vykazovala shodně u obou typů cel výrazné maximum při průtoku 10,0 ml min⁻¹.

Při sledování vlivu průtokových rychlostí elektrolytů nebyly pro obě cely zjištěny významné rozdíly. Pracovní rozsahy průtokových rychlostí mají svou spodní limitní hodnotu; při překročení dojde k přerušování elektrolyzy (pokles hladiny).

Typická závislost absorbance na velikosti vloženého generačního proudu je na obr. 4 (cela A). Při hodnotách



Obr. 4. Závislost absorbance na velikosti generačního proudu pro celu A; průtoková rychlost nosného plynu $10,0 \text{ ml min}^{-1}$, koncentrace elektrolytu 1 mol dm^{-3} , průtoková rychlost elektrolytu $2,5 \text{ ml min}^{-1}$, odtahová průtoková rychlost $1,6 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaná koncentrace selenu 60 ng ml^{-1}

Tabulka I

Optimální pracovní podmínky pro stanovení Se technikou hydridové AAS při použití cel A, B a TC

Elektrolytická cela	A	B	TC
Generační proud, A	0,40	0,50	1,20
Průtoková rychlost nosného plynu, ml min^{-1}	10,0	10,0	20,0
Průtoková rychlost elektrolytu, ml min^{-1}	2,5	2,5	2,0
Koncentrace katolytu, mol dm^{-3}	1	1	1
Odtahová průtoková rychlost, ml min^{-1}	1,6	5,3	---

proudu do 0,1 A ke vzniku hydridu prakticky nedochází, při vyšších hodnotách generačního proudu (0,15–0,35 A) je nárůst výrazný a křivka je v této oblasti nejstrmější. V další části pak dochází k mírnému poklesu strmosti křivky. Signál lze zaznamenávat i při vyšších hodnotách než je optimálně zvolená hodnota 0,4 A; elektrolyt se však již velmi zahřívá a dochází k pronikání vodní páry do spojovacího materiálu aparatury a následně až do atomizátoru.

Posledním optimalizovaným parametrem byla koncentrace elektrolytu (H_2SO_4). Opět shodně pro obě cely byl zjištěn klesající signál se stoupající koncentrací elektrolytu. Experimentálně bylo zjištěno, že je výhodnější použít vyšší koncentraci elektrolytu v kombinaci s vyšší hodnotou generačního proudu (menší zahřívání elektrolytů).

Optimální pracovní podmínky (zahrnující hodnotu vloženého generačního proudu, průtokovou rychlost nosného plynu, průtokovou rychlost elektrolytu, koncentraci

Tabulka II

Základní charakteristiky stanovení Se technikou hydridové AAS s elektrochemickým generováním při použití cel A, B a TC

Elektrolytická cela	A	B	TC
Mez detekce, ng ml^{-1}	2,23	0,32	0,60
Mez stanovitelnosti, ng ml^{-1}	7,44	1,06	2,01
Citlivost stanovení, $\times 10^3 \text{ ng}^{-1} \text{ ml}$	1,53	7,32	4,86
Opakovatelnost – RSD, %	1,40	0,56	0,62
Korelační koeficient	0,9982	0,9988	0,9995
Lineární dynamický rozsah, ng ml^{-1}	7,44–100	1,06–100	2,01–100

elektrolytu a odtahovou rychlost) pro celu typu A, B a TC jsou uvedeny v tab. I.

Základní charakteristiky stanovení selenu technikou HGAAS s elektrochemickým generováním

Při optimálních pracovních podmínkách byla proměřena pro elektrolytické cely A, B a TC kalibrační závislost pro stanovení Se technikou HGAAS s elektrochemickým generováním selenovodíku v rozsahu koncentrací 0 až 20 ng ml^{-1} a 0 až 250 ng ml^{-1} . Z kalibračních závislostí a dalších měření byly stanoveny základní parametry charakterizující stanovení Se s nově konstruovanými elektrolytickými celami. Tyto dosažené parametry spolu s parametry získaným s referenční celou TC jsou uvedeny v tab. II.

Závěr

Ze srovnání nově připravených elektrolytických průtokových generačních cel pro generování těžkých sloučenin s referenční tenkovrstvou celou vyplývá, že obě cely mají přibližně poloviční objem katodového prostoru ve srovnání s celou TC. Zároveň v nich není použita iontově výměnná nafionová membrána, která velmi často u tenkovrstvých cel způsobuje jejich „stárnutí“ a postupně zhoršování generačních charakteristik cel (deformace membrány, její zanesení...).

U elektrolytické cely A vedla miniaturizace k poklesu citlivosti a zároveň i zhoršení detekčního limitu stanovení Se. U cely B bylo naopak pozorováno zvýšení citlivosti a snížení meze detekce a stanovitelnosti ve srovnání s celou TC.

Další předností nových cel je snížení vkládaného generačního napětí; to vede k výraznému zvýšení životnosti elektrolytických cel (odpadá silné zahřívání elektrolytů

vedoucí až k postupné deformaci cely).

Závěrem lze konstatovat, že nově zkonstruovaná elektrolytická průtoková cela B splňuje požadavek na miniaturizaci katodového prostoru za současného zvýšení citlivosti stanovení. Tato cela má poloviční vnitřní katodový objem ve srovnání s tenkovrstvou průtokovou celou TC a bylo u ní pozorováno 1,5násobné zvýšení citlivosti ve srovnání s klasickou tenkovrstvou celou. Vzhledem k jejímu minimálnímu vnitřnímu objemu bude výhodné tuto celu využít v derivatizační jednotce při speciální analýze selenu a jiných hydridotvorných prvků po jejich předchozí separaci na chromatografické koloně.

Práce vznikla s podporou grantu A400310507/2005 Grantové agentury Akademie věd ČR a projektu MŠMT č. MSM0021620857.

LITERATURA

1. Dědina J., Tsalev D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. John Wiley and Sons, Chichester 1995.
2. Laborda F., Bolea E., Castillo J. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 743 (2007).
3. Denkhaus E., Golloch A., Guo X. M., Huang B.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 870 (2001).
4. Červený V., Válková Z., Rychlovský P.: *Colloquium*

Spectroscopicum Internationale XXXIV, Antwerp, 4 – 9 Sept, 2005. Book of Abstracts, str. 232.

5. Lin Y. H., Wang X. R., Yuan D. X., Yang P. Y., Huang B. L., Zhuang Z. X.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* 7, 287 (1992).
6. Brockmann L., Nonn C., Golloch A.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* 8, 397 (1993).
7. Hueber D. M., Winefordner J. D.: *Anal. Chim. Acta* 316, 129 (1995).
8. Šíma J., Rychlovský P.: *Chem. Listy* 92, 676 (1998).
9. Šíma J., Rychlovský P.: *Spectrochim. Acta, Part B* 58, 919 (2003).

J. Hraníček, V. Červený, and P. Rychlovský
(*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague*) **Miniaturization of Flow-Through Electrolytic Cells for Electrochemical Generation of Volatile Compound in AAS**

Two types of miniaturized flow-through electrolytic cells, without exchange membranes and with minimal inner volume, for electrochemical hydride generation in AAS were designed. For one of these cells, a higher sensitivity and better limit of detection in Se determination by hydride-generation AAS and electrochemical generation of Se hydride were attained than in the classical thin-layer flow-through cell.

VLIV SIMULOVANÉHO TRÁVENÍ NA SPECIACI PRVKŮ V ŽITNÝCH VLOČKÁCH*

MARTIN JUŘÍČEK^a, RICHARD KOPLÍK^b
a OTO MESTEK^a

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
oto.mestek@vscht.cz

Došlo 24.4.07, přijato 8.1.08.

Klíčová slova: stopové prvky, speciace, ICP-MS, žitné vločky

Úvod

Prvky obsažené v biologických materiálech mohou být přítomny v mnoha fyzikálních a chemických formách¹. S ohledem na studium toxicity, biologické využitelnosti, hromadění a transportu stopových prvků v organismu je nezbytné mít o prvcích více informací než jen informaci o celkovém obsahu. Odpovědi na tyto otázky může dát speciální analýza. Původní chemická speciace prvků v potravinových surovinách může být změněna během výroby potravin, zejména během tepelného zpracování, které způsobuje denaturaci metaloproteinů a jiných metalobiomolekul a mohou se změnit rozpustnosti prvků². Tyto změny jsou doprovázeny uvolněním iontů kovů z chelátů s organickými ligandy. K nejpodstatnějším chemickým změnám ve struktuře specií kovů však dochází během trávicích procesů probíhajících v gastrointestinálním traktu. Přesto počet dosud publikovaných prací zabývajících se těmito změnami je minimální. Tak např. byl sledován podíl železa vázaného v hemu a železnatých a železitých iontů ve směsi vzniklé simulovaným trávením různých typů stravy ze školních jídelen ve Španělsku³ nebo podíl celkového a anorganicky vázaného arsenu v roztoku po simulovaném trávení různých mořských řas⁴. Další publikovaná studie se týká také speciace arsenu: iontově výměnnou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) byl sledován obsah různých specií po enzymové digesci různých typů dětské výživy⁵.

Cílem této úvodní studie je zkoumat vliv simulovaného trávení za podmínek *in vitro* na speciaci vybraných

stopových kovů a fosforu ve vzorku rozemletých žitných vloček. Jedná se o potravinu, která se běžně konzumuje i bez tepelné úpravy. Vhodnou metodou pro speciální analýzu prvků v biologických matricích je kapalinová chromatografie se selektivní detekcí prvků. Pro speciální frakcionaci prvků v luštěninách^{6,7} a obilovinách⁸ se osvědčilo spojení gelové permeační chromatografie (SEC) a ICP-MS.

Experimentální část

Chemikálie a činidla

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) použitý pro přípravu mobilní fáze a extrakčního činidla byl získán od firmy Fluka (Neu-Ulm, SRN). Kyselina dusičná (65 %) čistoty Suprapur, stejně jako standardní roztoky Rh, Mn, Fe, Zn, Mo, Cu, Ni, Co, Cd a P pocházely od firmy Merck (Darmstadt, SRN). Vepřový pepsin pocházel od firmy Fluka a vepřový pankreatin (tj. směs pankreatických trávicích enzymů) od firmy Sigma (St. Louis, USA). Pro úpravu pH byly použity NH_4HCO_3 čistoty p.a a roztok amoniaku čistoty Suprapur firmy Merck. K přípravě a ředění všech roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA).

Vzorek

Vzorek žitných vloček (Pro-Bio s.r.o., Staré Město pod Smrkem) byl zakoupen v obchodní síti. Před stanovením byly vločky namlety ve vibračním mlýně. Nutriční hodnoty žitných vloček deklarované výrobcem byly 10,5 % bílkovin, 70,2 % sacharidů, 2 % lipidů, využitelná energie 1385 kJ/100 g.

Příprava natráveného vzorku

K navážce 2 g rozemletých vloček v polypropylenové nádobce 60 ml bylo přidáno 40 ml $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ HCl a 50 mg pepsinu. Po uzavření byla nádobka protřepávána po dobu 12 h při teplotě 37 °C. Poté byla směs ochlazená a pH suspenze bylo upraveno přidávkou roztoku 1 mol l^{-1} NH_4HCO_3 a 1 mol l^{-1} amoniaku na hodnotu 7,5. Po přidávku 100 mg pankreatinu a uzavření nádobky následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 12 h. Vzniklá suspenze byla po ochlazení převedena do polypropylenové odměrné baňky 100 ml a doplněna demineralizovanou vodou po značku. Směs byla odstředěna (20 000 g, 20 min, 4 °C) a horní vrstva byla použita k dalším analýzám.

* Tato práce byla úspěšně prezentována v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou odbornou práci v oboru analytická chemie.

Příprava extraktu

Vzorek rozemletých vloček (2 g) byl v polypropylenové lahvičce extrahován třepáním s 50 ml tlumivého roztoku 0,02 mol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5) při teplotě 20 °C. Suspenze byla odstředěna (20 000 g, 20 min, 4 °C) a horní vrstva byla použita k dalším analýzám.

Stanovení celkových obsahů prvků

Vzorek vloček (0,5 g) resp. extraktu nebo natráveného vzorku (10 ml) byl mineralizován 3 ml konc. HNO₃ tlakovým mikrovlnným rozkladem v nádobce z PTFE (110 ml) v mineralizátoru Uniclever BM1-Z (Plazmatronika-Service, Wrocław, Polsko) po dobu 10 min. Obsah rozkladné nádoby byl poté převeden do odměrné baňky 50 ml a doplněn demineralizovanou vodou po značku. Před stanovením stopových prvků metodou ICP-MS (cit.⁹) byly mineralizáty vzorků a příslušné slepé vzorky zředěny a k roztokům byl přidán srovnávací roztok prvků (Ge, Rh, In a Bi) v takovém množství, aby výsledná koncentrace těchto prvků činila 50 µg l⁻¹.

On-line spojení gelové permeační chromatografie a ICP-MS

Aparatura se skládala z vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, Walnut Creek, USA) zajišťujícího průtok mobilní fáze (0,02 mol l⁻¹ roztok Tris-HCl, pH 7,5) 0,5 ml min⁻¹, skleněné předkolony s náplní Chelex 100 v NH₄⁺ cyklu, prvního injektoru (pro nástřik vzorku) se smyčkou 100 µl z materiálu PEEK, separační kolony Superdex 75 o rozměrech 300×10 mm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko), druhého injektoru (pro nástřik kalibračních roztoků) se smyčkou 200 µl z polymeru PEEK a z detektoru ICP-MS (spektrometr Elan 6000, Perkin-Elmer, Norwalk, USA), Tok efluentu

z chromatografické kolony byl T-kusem spojen s tokem srovnávacího roztoku (50 µg l⁻¹ Rh) a směs byla dopravována peristaltickým čerpadlem (průtok 1,3 ml min⁻¹) do pneumatického zmlžovače ICP-MS. Ke spojení jednotlivých částí aparatury byly použity kapiláry z polymerních materiálů PTFE a PEEK. Nástřik kalibračních roztoků kovů se provedl během prvních deseti minut po nástřiku vzorku před elucí prvních složek vzorku z kolony. Nástřik kalibračních roztoků fosforu se provedl ve 40. minutě od nástřiku vzorku, kdy byla eluce složek vzorku již ukončena. Podrobnosti lze nalézt v pracích^{6,10}.

Výsledky a diskuse

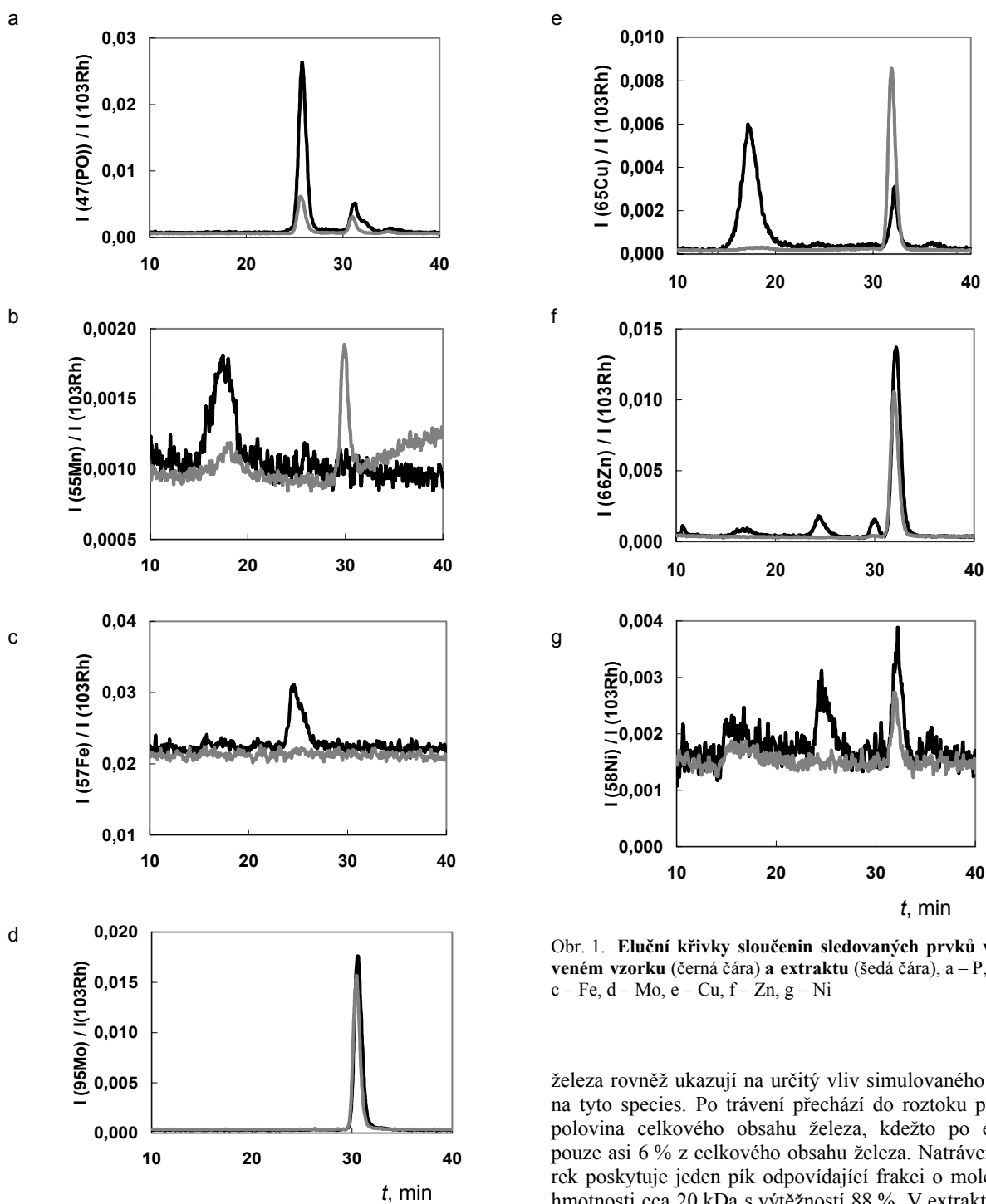
Tabulka I shrnuje údaje o celkovém obsahu prvků v původním pevném vzorku, podílu přešlém do extraktu a podílu přešlém do natráveného vzorku. Je patrné, že zatímco podíl prvků rozpustných v tlumivém roztoku je poměrně nízký (6–42 %), podíl převedený během trávení do rozpustných forem je podstatně vyšší (50–99 %). Podíly prošlé chromatografickou kolonou vypovídají o zastoupení stabilních komplexů v příslušně upravených vzorcích.

Obr. 1 znázorňuje eluční křivky sloučenin sledovaných prvků v extraktu a natráveném vzorku žitných vloček. U fosforu si obě eluční křivky dobře odpovídají. Jsou zde patrné dva hlavní píky, jeden v oblasti středních molekulových hmotností (cca 5 kDa), druhý v nízkomolekulární oblasti (cca 2 kDa). Trávením přejde do roztoku mnohem větší část specií fosforu (93 % celkového obsahu) než extrakcí (25 %). Také chromatografická výtěžnost vztahená na obsah prvku v extraktu resp. natráveném vzorku je vyšší v natráveném vzorku (93 %) proti extraktu (76 %). Jinak je tomu v případě manganu. Vliv simulovaného trávení je sice přibližně stejný jako u sloučenin fosforu (extrakcí a trávením je solubilizováno 24 % resp. 99 % celkového Mn), chromatografická výtěžnost je však velice

Tabulka I
Elementární složení žitných vloček (v µg g⁻¹)

	P	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
Celkový obsah	3040	17,9	25,5	0,005	0,250	3,58	34,0	2,00	0,007	0,018
Podíl extrahovatelný do 0,02 mol l ⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5) ^a	772 (25 %)	4,27 (24 %)	1,58 (6 %)	0,001 (20 %)	0,039 (16 %)	0,786 (22 %)	2,55 (8 %)	0,834 (42 %)	0,002 (29 %)	0,005 (27 %)
Podíl prošlý SEC kolonou ^b	585 (76 %)	0,013 (0,3 %)	n.d.	n.d.	0,043 (110 %)	0,653 (83 %)	1,33 (52 %)	0,872 (104 %)	n.d.	n.d.
Podíl uvolněný trávením	2830 (93 %)	17,8 (99 %)	12,7 (50 %)	0,003 (52 %)	0,130 (52 %)	1,91 (53 %)	25,0 (74 %)	1,25 (62 %)	0,006 (85 %)	0,017 (94 %)
Podíl prošlý SEC kolonou ^c	2640 (93 %)	0,029 (0,2 %)	11,2 (88 %)	n.d.	0,150 (115 %)	1,31 (69 %)	2,63 (11 %)	1,20 (96 %)	n.d.	n.d.

^a Procenta jsou vztažena k celkovému obsahu; ^b procenta jsou vztažena k obsahu v extraktu; ^c procenta jsou vztažena k obsahu v natráveném vzorku; n.d.: obsah prvku nebyl detegován



Obr. 1. Eluční křivky sloučenin sledovaných prvků v natráveném vzorku (černá čára) a extraktu (šedá čára), a – P, b – Mn, c – Fe, d – Mo, e – Cu, f – Zn, g – Ni

nízká (<1 %). Je to způsobeno malou stabilitou komplexních sloučenin manganu. Ionty manganu z původního roztoku se adsorbují na gelové náplni kolony. Přesto je v extraktu patrný jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (<2 kDa) a v roztoku natráveného vzorku jeden širší pík ve vysokomolekulární oblasti. Eluční křivky sloučenin

železa rovněž ukazují na určitý vliv simulovaného trávení na tyto species. Po trávení přechází do roztoku přibližně polovina celkového obsahu železa, kdežto po extrakci pouze asi 6 % z celkového obsahu železa. Natrávený vzorek poskytuje jeden pík odpovídající frakci o molekulové hmotnosti cca 20 kDa s výtěžností 88 %. V extraktu nebyl detegován žádný pík sloučenin železa. U niklu extrakt poskytuje jediný pík nízkomolekulární frakce (<2 kDa). Chromatogram natráveného vzorku obsahuje navíc ještě další pík sloučenin niklu v oblasti okolo 20 kDa. V důsledku kontaminace při manipulaci se vzorkem chromatografická výtěžnost niklu mírně přesahuje 100 %. Podíly rozpustných sloučenin niklu v extraktu a natráveném vzorku jsou 16 % a 52 % z celkového obsahu niklu ve

vzorku. Sloučeniny mědi v extraktu jsou obsaženy v jediné nízkomolekulární (<2 kDa) frakci, přičemž jejich chromatografická výtěžnost činí 83 %. V natráveném vzorku je měď rozdělena do dvou frakcí: první je totožná s frakcí v extraktu, druhá, o přibližně dvojnásobném obsahu Cu, spadá do vysokomolekulární oblasti (cca 120 kDa). Celková chromatografická výtěžnost mědi v natráveném vzorku je nižší (69 %). Podíl rozpustných sloučenin mědi v extraktu a natráveném vzorku představuje přibližně jednu pětinu resp. jednu polovinu celkového obsahu mědi. U zinku mají extrakt i natrávený vzorek společný jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (<2 kDa). Natrávený vzorek navíc obsahuje další tři menší frakce sloučenin zinku. Specie sloučenin zinku je procesem trávení ovlivněna nejvíce ze všech stanovovaných prvků. V extraktu představuje rozpustný podíl zinku 8 % celkového obsahu Zn, v natráveném vzorku je to 74 %. Chromatografické výtěžnosti však mají opačný trend, v extraktu dosahuje tento parametr hodnoty 52 %, v natráveném vzorku je to pouze 11 %. Eluční křivky molybdenu se velmi dobře shodují. Extrakt i natrávený vzorek poskytují jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (cca 2–3 kDa). Rozpustný podíl molybdenu v extraktu činí 42 % a v natráveném vzorku 62 % z celkového obsahu. Chromatografické výtěžnosti molybdenu se blíží 100 %. Ostatní stanovované prvky se v natráveném vzorku a zejména extraktu vzorku nacházely v nízkých koncentracích a poskytovaly velmi slabé signály, které neumožňovaly správnou kvantifikaci.

Je patrné, že do natráveného vzorku přechází vyšší podíl prvků než do extraktu, což je způsobeno uvolněním prvků vázaných na biopolymery v důsledku jejich štěpení trávicími enzymy. Srovnáním retenčních časů specií jednotlivých prvků v natráveném vzorku a extraktu je patrné, že některé species Ni, Zn, Fe a Cu mají stejné retenční časy. Jedná se o specie Ni a Zn ($t_R = 16,8$ min), Fe a Ni ($t_R = 24,6$ min) a Ni, Cu a Zn ($t_R = 32,2$ min). Lze tedy předpokládat, že tyto prvky mohou být vázány v extraktu i v natráveném vzorku na stejné ligandy.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307.

LITERATURA

1. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: Chem. Listy 91, 38 (1997).
2. Koplík R., Mestek O., Komínková J., Borková M., Suchánek M.: Food Chem. 85, 31 (2004).
3. Cámara F., Amaro F. A., Barberá R., Lagarda M. J.: Eur. Food Res. Technol. 221, 768 (2005).
4. Laparra J. M., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R.: J. Agric. Food Chem. 51, 6080 (2003).
5. Pardo Martínez M., Vinas P., Fischer A., Hill S. J.: Anal. Chim. Acta 441, 29 (2001).
6. Koplík R., Borková M., Mestek O., Komínková J., Suchánek M.: J. Chromatogr., B 775, 179 (2002).
7. Mestek O., Komínková J., Koplík R., Borková M., Suchánek M.: Talanta 57, 1133 (2002).
8. Koplík R., Borková M., Bicanová B., Polák J., Mestek O., Komínková J.: Food Chem. 99, 158 (2006).
9. Koplík R., Čurdová E., Suchánek M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 360, 449 (1998).
10. Koplík R., Pavelková H., Cincibuchová J., Mestek O., Kvasnička F., Suchánek M.: J. Chromatogr., B 770, 261 (2002).

M. Juříček, R. Koplík, and O. Mestek (*Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Effect of Simulated Digestion on Element Speciation in Rye Flakes**

To investigate element speciation in digested rye flakes, a simulated digestion using pig's pepsin and pancreatin was performed at 37 °C. The digest was analyzed by SEC/ICP-MS (Superdex 75, 0.02 mol l⁻¹ Tris-HCl buffer). Most elements in flakes are solubilized by enzymatic hydrolysis. P and Mo recoveries in SEC analysis of the digest approach to 100 %, those of Fe and Cu range from 60 to 80 % and that of Zn varies from 10 to 40 %. Ionic species or labile complexes were not recovered. The proportions of elements change as a result of enzyme digestion. No Fe is recovered in SEC analysis of flake extracts. Most Fe in the digest is bonded to a medium-molecular-weight fraction. Low-molecular-weight (<2 kDa) fractions with bonded Cu and Zn partly persist in the digest.

STUDIUM KOMPLEXACE METALLAKARBORANŮ S CYKLODEXTRINY POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

JAKUB RAK^{a,*}, MARCELA TKADLECOVÁ^a,
PETR CÍGLER^{a,b}, VLADIMÍR KRÁL^{a,c}

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Výzkumné
centrum ÚOCHB a Gilead Sciences, Ústav organické che-
mie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6,
^c Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10
jakub.rak@vscht.cz

Došlo 31.5.07, přijato 22.1.08.

Klíčová slova: cykloextrin, metallakaboran, komplex,
NMR

Úvod

V této práci byla sledována interakce vybraného zá-
stupce ikosahedrálních metallakaboranů se třemi cyklo-
dextriny (dále CD) lišícími se velikostí vnitřní kavity.

Metallakaborany jsou nově objevenou skupinou inhi-
bitorů HIV-1 proteasy zodpovědné za replikaci viru
a představují tedy potenciální virostatika pro léčbu HIV
infekce¹. Mezi významné vlastnosti metallakaboranů
patří vysoká stabilita, rigidita skeletu a delokalizace náboje
po jejich povrchu. Hydrofobní charakter metallakaboranů
způsobuje jejich nízkou rozpustnost a spontánní agregaci
ve vodném prostředí², s čímž souvisí problémy při testová-
ní i potenciálním farmaceutickým využití.

Nezbytnou podmínkou pro léčbu je především trans-
port účinné látky do buněk. Jednou z možností solubilizace
inhibitorů a zlepšení transportu je vytvoření optimálně
stabilního komplexu s látkami schopnými procházet bu-
něčnou stěnou. Tento komplex má být natolik stabilní, aby
zároveň zabránil vzniku nežádoucího komplexu metalla-
kaboranu se sérovým albuminem přítomným v relativně
vysokých koncentracích v krvi. Vhodnými stericky a tva-
rově komplementárními ligandy pro komplexaci metalla-
kaboranů jsou právě CD. Jsou to obecně cyklické oligosa-
charidy tvořené několika jednotkami α -D-glukopyranosy
(obr. 1) spojenými vazbou α -1,4. Mají tvar dutého kornou-
tu s relativně lipofilnější kavitou ve srovnání s vnějším
hydrofilním povrchem. Jejich dalšími, z farmaceutického

hlediska výhodnými, vlastnostmi jsou nízká toxicita
a snadná odbouratelnost.

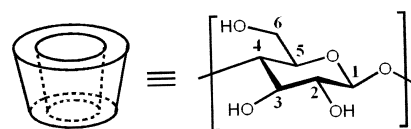
Vazba metallakaboranu (obr. 2) do lipofilních kavit
CD je umožněna díky interakcím mezi opačně nabitými
vodíky³ (dále H-H můstky), které stabilizují vznikající
inkluzní komplexy. Polarizované H-H můstky obsahují
vždy vodík z CD s kladným parciálním nábojem a vodík
se záporným parciálním nábojem vázaný na elektropozit-
ivní bor.

Experimentální část

Všechna spektra ¹H NMR byla měřena na NMR spek-
trometru Varian, model Mercury Plus (pracovní frekvence
300 MHz). Spektra byla vztažena vůči methylovému sig-
nálu *tert*-butanolu umístěnému v uzavřené kapiláře vlože-
né do NMR kyvety s měřeným roztokem. Jako rozpouště-
dlo byla použita deuterovaná voda (99,8 %-D Sigma Ald-
rich). Měření byla prováděna za konstantní teploty 298 K,
v případě γ -CD při 323 K kvůli urychlení chemické výmě-
ny.

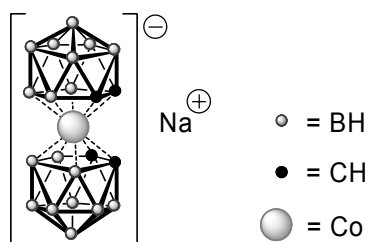
Použité chemikálie: kobalt(3+) bis(1,2-dikarbolliid)
sodný (obr. 2), 18,2 hm.% vody (určeno termogravimetrií,
ověřeno metodou Karla Fishera a elementární analýzou),
rozměry – průměr 0,51 nm, délka 0,91 nm. α -CD (6 glu-
kosových jednotek), 10,0 hm.% vody (určeno elementární
analýzou), rozměry – vnitřní průměr kavity 0,52–0,57 nm
a hloubka kavity 0,80 nm. β -CD (7 glukosových jednotek),
13,7 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry –
vnitřní průměr kavity 0,64–0,78 nm a hloubka kavity
0,80 nm. γ -CD (8 glukosových jednotek), 8,9 hm.% vody
(určeno elementární analýzou), rozměry – vnitřní průměr
kavity 0,75–0,95 nm a hloubka kavity 0,80 nm.

Pro různé koncentrace jednotlivých CD byly měřeny
¹H NMR titrační křivky, tj. sledovány změny chemických
posunů po přidávání metallakaboranu, přičemž celková
koncentrace CD byla udržována konstantní. U všech CD
byl sledován především signál ¹H-3 (obr. 3) nacházející se
na širším vnitřním okraji kavity, který vykazuje největší
změny chemického posunu. U signálu ¹H-5 jsou změny

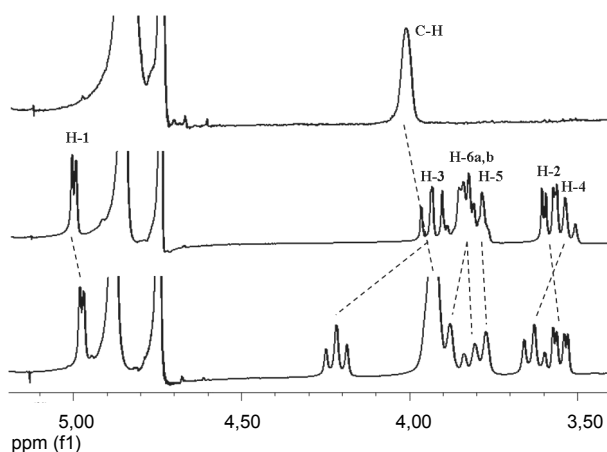


Obr. 1. Tvar molekuly α -, β -, γ -CD ($n = 6,7,8$) s číslováním
atomů

* Jakub Rak získal za tuto práci zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 2. Ikosahedrální metallakarboran - kobalt(3+) bis(1,2-dikarbollid) sodný



Obr. 3. ^1H NMR spektra metallakarboranu (nahore), α -CD (uprostřed) a jejich směsi (dole); měření prováděno v D_2O s vnitřní kapilárou pro referencování, spektra obsahují zbytkové signály rozpouštědla

chemického posunu podstatně menší a nelze je sledovat v průběhu celé titrace, protože nastává překryv se signálem ^1H -6. Změny chemických posunů pro další vodíky CD jsou pro vyhodnocení příliš malé a signály vodíků z OH skupin nelze sledovat v deuterované vodě kvůli probíhající chemické výměně s jádry deuteria z rozpouštědla.

Roztoky byly vždy připravovány bezprostředně před vlastním měřením a byly sonifikovány pro zajištění homogenity. Bylo ověřeno, že pozorovaná změna chemického posunu je časově nezávislá v rámci několika hodin. Po několikadenním stání se roztoky stávají nehomogenními – zřejmě v důsledku agregace obou složek samotných a pravděpodobně i vzniku směsných agregátů CD a metallakarboranu.

Výsledky a diskuse

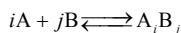
Největší změny chemického posunu α -CD, β -CD i γ -CD byly pozorovány vždy na signálu ^1H -3 nacházejícím se na širším vnitřním okraji kavity. S rostoucí vzdále-

ností od širšího okraje změny chemických posunů ostatních ^1H signálů klesají, z čehož lze usuzovat na vnořování metallakarboranu do kavity CD širším hrdlem. Analogicky největší změny chemických posunů signálů ^{13}C byly pozorovány při širším okraji CD. Vzhledem k nejvyšší citlivosti ke komplexaci byly pro vyhodnocení vybrány signály ^1H -3. Příklad pozorovaných změn ve spektru při titraci α -CD je uveden na obr. 3.

Pro vyhodnocení titračních křivek a určení parametrů bylo využito matematického modelování, tj. navržení možných produktů komplexačních rovnováh v souladu s teoretickými předpoklady a naměřenými daty a nalezení parametrů tohoto modelu.

Uvažované komplexy jsou schematicky znázorněny na obr. 4. Nejjednodušší komplex 1:1 spočívá v inkluzi metallakarboranu do kavity CD, relativně mělké zanoření dané velikostmi obou látek umožňuje vznik symetrického komplexu 2:1. Komplex 1:1 může komplexovat další volný metallakarboran a vzniká tak komplex 1:2. Komplex 2:2 si lze představit jako neinkluzní komplex dvou inkluzních komplexů 1:1. Očekávaná interakce mezi dvěma metallakarborany v komplexech 1:2 a 2:2 by mohla vzniknout přiblížením volných (tj. bez CD) subklástrů metallakarboranů, mezi nimiž by se nacházel solvatovaný sodný kation.

Vznik různých typů komplexů A_iB_j (A značí cyklo-dextrin a B metallakarboran) podle rovnic



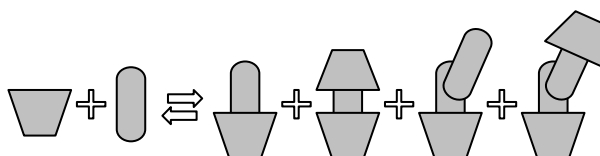
lze popsat rovnovážnými konstantami

$$K_{ij} = \frac{[A_iB_j]}{[A]^i[B]^j}$$

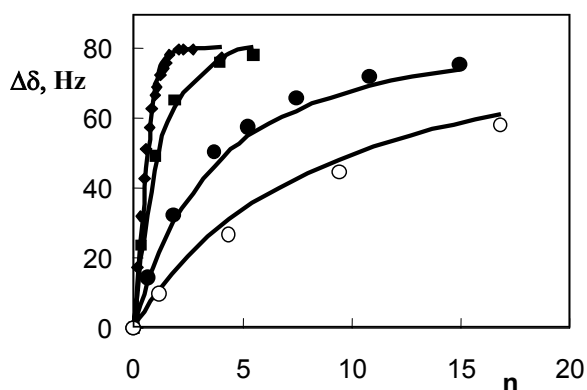
Pro pozorovanou změnu chemického posunu signálu ^1H -3 cyklo-dextrinu jako sledované látky platí v případě rychlé chemické výměny vztah

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m i\Delta\delta_{ij}[A_iB_j]}{c(A)}$$

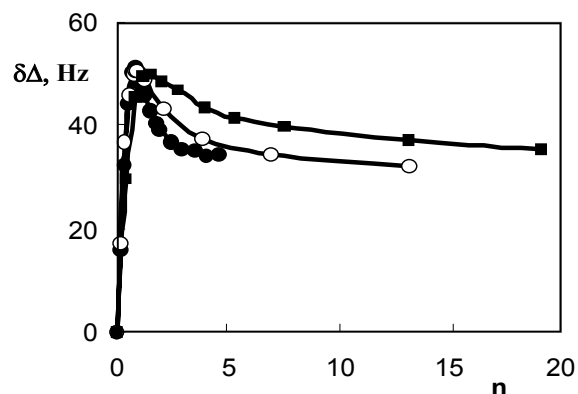
kde $c(A)$ je celková analytická koncentrace cyklo-dextrinu, jehož signál je sledován. Minimalizací sumy kvadrátů odchylek experimentálních a modelovaných hodnot $\Delta\delta_{\text{obs}}$ se získají optimalizované hodnoty parametrů matematického modelu.



Obr. 4. Schematické znázornění možných typů komplexů CD (lichoběžník) s metallakarboranem (ovál): 1:1, 2:1, 1:2, 2:2



Obr. 5. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 α -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči α -CD, n , při teplotě 298 K; koncentrace α -CD v mmol l^{-1} : 0,15 (●); 0,38 (○); 2,3 (■); 8,5 (◆). Proložení křivek pomocí modelu 1:1 s konstantou stability 899 a hodnotou $\Delta\delta_{11} = 89,2$ Hz



Obr. 6. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 β -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči β -CD, n , při teplotě 298 K; koncentrace β -CD v mmol l^{-1} : 0,16 (■); 0,47 (○); 1,5 (●). Data propojena pro lepší přehlednost

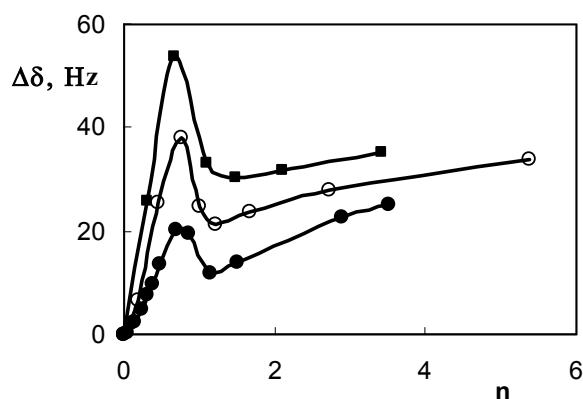
Pro zkoumanou soustavu rovnováh byl vytvořen model, kde každý produkt je popsán dvěma parametry: konstantou stability komplexu K_{ij} a tzv. „complexation induced shift“ $\Delta\delta_{ij}$, tj. rozdílem chemického posunu daného signálu v komplexu oproti posunu nekomplexovaného CD. V případě nesymetrických komplexů obsahujících více než jednu molekulu sledované látky (cyclodextrinu) odpovídá $\Delta\delta_{ij}$ zprůměrované hodnotě $\Delta\delta$ všech molekul sledované látky z komplexu. Snahou bylo použít pro daný systém minimální počet vznikajících komplexů – v této práci $i, j \in \{1, 2\}$. Používání víceparametrových modelů je obecně nežádoucí, protože hrozí vzájemná korelace mezi parametry.

Naměřené titrační křivky pro systém α -CD + metallakarboran odpovídají kvalitativně komplexaci se stechiometrií 1:1, jak lze očekávat podle zlomu na křivce získané pro nejvyšší koncentraci α -CD. Pro vyhodnocení konstanty stability jsou vhodné křivky změřené při dvou nižších koncentracích. Hodnotu konstanty stability komplexu a proložení titračních křivek je vidět na obr. 5. Hodnota konstanty stability byla nezávisle ověřována pomocí isothermální kalorimetrie (ITC). Získaná hodnota konstanty stability pro vznik komplexu se stechiometrií 1:1 se sice poměrně dobře shoduje s hodnotou získanou z NMR, ale s ohledem na rozpustnost látky ležela tato hodnota na hranici měřitelnosti ITC. Model předpokládající vznik komplexů 1:1 a 2:1 dává lepší proložení všech čtyř křivek najednou, což ovšem může být i důsledek většího počtu nastavitelných parametrů. Na druhou stranu takový model vychází z velikosti a symetrie metallakarboranu a velikosti kavity CD a z analogie s výsledky u systému β -CD + metallakarboran.

Průběh titračních křivek u systému β -CD + metallakarboran na obr. 6 vylučuje, že by se mohlo jednat výhradně o komplex 1:1. Jednotlivé titrační křivky lze prolo-

žit modelem 1:1 a 2:1, pro současné proložení všech křivek však tento model selhává. Teprve model zahrnující vznik produktů se stechiometrií 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 splňuje všechny nezbytné podmínky a vztahy mezi jednotlivými parametry a výstižně prokládá naměřená data. Komplexace je určitě výrazně silnější, což odpovídá hlubšímu zanoření metallakarboranu do větší kavity CD. Rovněž průběh křivek ITC svědčí o vzniku více typů komplexů a o řádově silnější komplexaci ve srovnání s α -CD. Pro průkaznější popis komplexace u tohoto systému bude třeba současně vyhodnotit výsledky z více analytických metod, což bude předmětem dalšího studia.

Jednotlivé křivky γ -CD + metallakarboran (obr. 7) mají sice podobný průběh jako v případě β -CD, ale



Obr. 7. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 γ -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči γ -CD, n , při teplotě 323 K; koncentrace γ -CD v mmol l^{-1} : 1,9 (●); 4,3 (○); 14 (■). Data propojena pro lepší přehlednost

k vystižení jejich průběhu se dvěma extrémy nestačí model 1:1 a 2:1. Celkově však ani model využitý u β -CD (tj. 1:1, 2:1, 1:2, 2:2) není schopen uspokojivého proložení všech naměřených dat najednou. Je možné, že vzniká ještě více typů komplexů, také zde může díky větší velikosti kavity docházet ke vzniku složitějších směsných agregátů. Přesto lze předpokládat srovnatelné konstanty stability s β -CD vzhledem k velikosti kavity (větší oproti α -CD i β -CD, ale umožňující ještě efektivní tvorbu H-H můstků). Za laboratorní teploty je ve spektrech pozorována pomalá chemická výměna znemožňující odečet změn chemického posunu, proto byla měření prováděna při teplotě 323 K. U komplexace β -CD bylo však ověřeno, že průběh titrační křivky touto změnou teploty není výrazně ovlivněn.

Kromě vzniku inkluzních komplexů CD může rovnováhu ovlivňovat také agregace metallakarboranu, jejíž průběh je však znám pouze na kvalitativní úrovni². K intenzivní agregaci dochází paradoxně při velmi nízkých koncentracích metallakarboranu a potom především při velmi vysokých koncentracích. Je známo, že agregaci metallakarboranu lze potlačit přidávkem methanolu. V této práci však bylo pozorováno, že už 10 % methanolu ve vodě zcela zabrání tvorbě komplexu s CD (data nejsou ukázána). Rovnovážný proces může dále ovlivnit také agregace CD, která se uplatňuje při koncentracích vyšších než 3 mM (cit.⁴). Zahnutí těchto fenoménů do popisu rovnováhy sice způsobí zlepšení průběhu proložení experimentálních dat, avšak za cenu dalšího nárůstu počtu optimalizovaných parametrů matematického modelu.

Závěr

V práci bylo ukázáno, že cyklodextriny mohou sloužit pro komplexaci ikosahedrálních metallakarboranů a že lze velikostí kavity modulovat stabilitu komplexu. Tento fakt je důležitým kritériem v dalším testování metallakarboranů pro uvedené farmakologické aplikace. Tvorba stabilních inkluzních komplexů otevírá možnost formulační strategie pro potenciální léčiva.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT ČR č. 6046137307, Centra pro výzkum nových antivirotik a cytostatik IM0508 MŠMT ČR a Centra LC 512.

LITERATURA

1. Cígler P., Kožíšek M., Řezáčová P., Brynda J., Otwinowski Z., Pokorná J., Plešek J., Grüner B., Dolečková-Marešová L., Máša M., Sedláček J., Bodem J., Kräusslich H.-G., Král V., Konvalinka J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15394 (2005).
2. Matějčík P., Cígler P., Procházka K., Král V.: *Langmuir* 22, 575 (2006).
3. Fanfrlík J., Lepšík M., Horinek D., Havlas Z., Hobza P.: *Chem. Phys. Chem.* 7, 1100 (2006).
4. Bonini M., Rossi S., Karlsson G., Almgren M., Nostro P., Baglioni P.: *Langmuir* 22, 1478 (2006).
5. Havlíček J., Tkadlecová M., Vyhnánková M., Pínkassik E., Stibor I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1783 (1996).

J. Rak^a, M. Tkadlecová^a, P. Cígler^{a,b}, and V. Král^{a,c} (^a Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Gilead Sciences Research Center, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, ^c Zentiva Co. Prague): **NMR Study of Complexation of Metallacarboranes with Cyclodextrins**

Metallacarboranes and their derivatives are the recently discovered inhibitors of HIV protease. The main goal of this work was to study the interaction of parent metallacarborane derivatives with cyclodextrins (CD) differing in the inner cavity size. This interaction can improve the drug solubility and its transport to the cells. For α -, β - and γ -CD, NMR titrations with sodium cobalt(III) bis(1,2-dicarbollide) were performed at various CD concentrations. It was found that the greatest change in the ¹H NMR chemical shift is observed at position 3 of CD on the inner broader rim of the cone-shaped molecule of CD. For α -CD, the NMR titration curves correspond to the 1:1 stoichiometry and to the stability constant ca. 900. For β -CD, simultaneous formation of 1:1 and 2:1 complexes and higher stability constants at least by two orders of magnitude follow from the titration curves. For γ -CD, more than two types of complexes are present. It was shown for β -CD that the increased temperature does not significantly influence the titration curves. The model, consisting of a high number of adjustable parameters, for the determination of stability constants of the complexes must be confirmed by independent analytical methods such as isothermal calorimetry and X-ray structure determination.

CHARAKTERIZACE SORPČNÍCH GELŮ PRO POUŽITÍ V TECHNICE DIFUZNÍHO GRADIENTU V TENKÉM FILMU

MICHAELA GREGUŠOVÁ^{a,b*}, BOHUMIL DOČEKAL^b a HANA DOČEKALOVÁ^a

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ^b Ústav analytické chemie v.v.i., Akademie věd ČR, Veveří 97, 602 00 Brno
gregusova@iach.cz, docekal@iach.cz

Došlo 29.5.07, přijato 11.12.07.

Klíčová slova: technika difuzního gradientu v tenkém filmu (DGT), Spheron-Oxin[®]

Úvod

Technika difuzního gradientu v tenkém filmu (Diffusive Gradients in Thin Films Technique – DGT) vyvinutá v 90. letech minulého století¹ je v současnosti s úspěchem používána k měření *in situ* stopových koncentrací² celé škály převážně labilních kovových specií v přírodních vodách^{3–10}, sedimentech^{11–16} a půdách^{17–20}.

K přednostem techniky DGT patří jednoduchost provedení, nízké náklady, vysoká citlivost, prekoncentrační schopnosti, využití při současném stanovení více prvků a možnost speciální analýzy. Technika DGT je založena na Fickových zákonech difuze. Využívá tenké vrstvy hydrogelu, která řídí transport kovů z roztoku k sorpčnímu médiu, v němž se akumulují labilní specie kovů⁸. Nejpoužívanějším sorpčním médiem pro stanovení kovů technikou DGT je chelatační iontoměnič Chelex 100 s vázanými skupinami kyseliny iminodioxetové, který je selektivní pro volné ionty přechodných kovů a jejich ionty vázané ve slabých komplexech.

Klíčovou roli při stanovení specií kovů technikou DGT hraje nalezení vhodného sorpčního gelu umožňující stanovení širšího spektra chemických specií.

V posledních letech byla vyzkoušena řada nových sorpčních gelů. Pro měření radionuklidů Cs a Sr ve vodách byl použit sorpční gel obsahující iontoměnič AG50W-X8 (cit.²¹) nebo gel obsahující vázaný fosfomolybdenan amonný²². Jako sorpční médium byly rovněž použity membrány na bázi celulosy s funkčními skupinami kyseliny fosforečné²³. Tato modifikace techniky DGT se ukázala být vhod-

ná pro měření Cu a Cd. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití gelu kopolymeru kyseliny akrylové a akrylamidu²⁴. Popsána jsou také sorpční média založená na jiném principu než na iontové výměně, např. na srážení. Pro stanovení fosfátů tak bylo využito oxidů železa²⁵ a pro stanovení sulfidů jodidu stříbrného fixovaného v sorpčním gelu^{12,26}.

V této práci byly studovány vlastnosti nového specifického sorpčního gelu na bázi selektivního iontoměniče Spheron-Oxin[®] s vázanými funkčními skupinami 8-hydroxychinolinu pro využití v technice DGT ke stanovení vybraných kovů (Cd, Cu, Ni a Pb) zajímavých z hlediska charakterizace některých součástí životního prostředí. Byla optimalizována syntéza nového sorpčního gelu, stanoveny pomocné parametry sloužící k vyhodnocení charakteristik zachytu analytů (eluční faktor, kapacita sorpčních disků), dále byly studovány faktory ovlivňující selektivitu sorpce (pH, iontová síla), vliv potenciálně konkurujících iontů (Mg) a modelových komplexujících ligandů (kyselina iminodioxetová), simulujících vliv přírodních součástí vodních systémů. Vlastnosti nového sorpčního gelu byly srovnány s vlastnostmi sorpčního gelu obsahujícího běžně používaný chelatační iontoměnič Chelex 100 s vázanou kyselinou iminodioxetovou.

Experimentální část

Chemikálie

Pro přípravu difuzních a sorpčních gelů byl použit akrylamid (40%, Merck, Darmstadt, SRN), patentované síťovadlo (DGT Research, Ltd., Lancaster, UK), peroxosíran amonný (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN) a *N,N,N',N'*, tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich). Pro přípravu sorpčních gelů byl dále použit Chelex 100 (Na-forma, velikost zrn 38–75 μm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) a Spheron-Oxin[®] 1000 (velikost zrn 63–100 μm, Lachema Brno, ČR). Ve všech experimentech byly použity chemikálie čistoty p.a. a deionizovaná voda připravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore. Pro přípravu modelových roztoků byly použity standardní roztoky Cd, Cu, Ni a Pb o koncentraci 1 mg ml⁻¹ (Astasol[®], Analytika Praha, ČR).

Přístroje

Obsah kovů v eluátech sorpčních gelů a v roztocích odebraných před a po aplikaci sond DGT byl stanoven plamenovou a bezplamenovou atomovou absorpční spektrometrií na přístrojích AA 3110 a AAnalyst 600 (Perkin Elmer Analytical Instruments, USA) za podmínek běžně doporučených výrobcem.

* Tato práce byla úspěšně prezentována v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

Pracovní postupy

Difuzní gel i sorpční gely, tj. gely se zakomponovanými iontoměníči, byly připravovány dle postupů přejatých od DGT Research Ltd., Lancaster, UK (cit.²⁷). Z plátků gelů byly speciálním nožem vyřezány kruhové disky o průměru 25 mm. Disky difuzního gelu byly před použitím stabilizovány a uchovávány v 0,01 mol l⁻¹ NaNO₃. Z disků sorpčních gelů byly opakovaně elucí v 1 mol l⁻¹ kyseliny dusičné ještě před jejich použitím odstraněny analyty, sorbované během syntézy. Přečištěné gely byly nakonec uchovávány v deionizované vodě.

Vzorkovací jednotky DGT pístového tvaru^{8,27} byly sestaveny těsně před expozicí tak, že na vnitřní cylindrickou část jednotky byl umístěn disk sorpčního gelu, který byl překryt diskem difuzního gelu a následně ochranným membránovým hydrofilním polyethersulfonovým filtrem (Supor[®]-450, Pall Corporation, USA, póry 0,45 μm), který zabraňoval mechanickému poškození gelů. Tyto vrstvy pak byly uzavřeny druhou prstencovou částí jednotky DGT s expozičním okénkem o průměru 2 cm.

Po expozici v modelových roztocích iontů vybraných kovů (Cd, Cu, Ni a Pb) za zvolených podmínek byly jednotky DGT rozebrány a jednotlivé vrstvy gelů odděleny. Sorpční gely byly eluovány po dobu 24 h v 1 ml 1 mol l⁻¹ kyseliny dusičné v uzavřených, předem vyčištěných, plastových nádobkách. Pro srovnávací měření byly z modelových roztoků odebírány vzorky roztoku před a po expozici jednotek DGT, které byly filtrovány přes membránový filtr s póry o velikosti 0,45 μm (Supor[®]-450) k oddělení podílu kovů nacházejících se v koloidních částicích.

Výsledky a diskuse

Syntéza sorpčního gelu a stanovení pomocných charakteristik

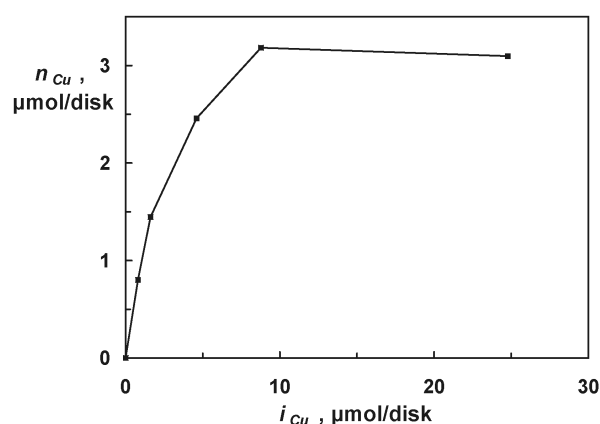
Předběžné experimenty ukázaly, že při přípravě sorpčního gelu bylo možno zabudovat až 0,2 g Spheron-Oxinu[®] na 1 ml gelového roztoku. Toto množství iontoměníče tak poskytovalo dostatečnou sorpční kapacitu disku jednotky DGT, jak je ukázáno níže, umožňující dlouhodobou expozici disku v reálných vodných systémech životního prostředí. Pro dosažení homogenního rozložení Spheron-Oxinu[®] v sorpčním gelu, které je třeba dodržet pro získání reprodukovatelných výsledků zvláště při eluci zachycených kovů, je vhodné iontoměníč před polymerací ponechat po dobu 72 h botnat v gelovém roztoku.

Vykrojené disky připravených sorpčních gelů byly nejprve charakterizovány stanovením pomocných parametrů dovolujících vyhodnotit záchyt iontů sledovaných kovů v sorpčním gelu, a to objem roztoku obsaženého v sorpčním gelu disku, kinetiku eluce a účinnost eluce (eluční faktor) zachycených kovů 1 ml 1 mol l⁻¹ kyseliny dusičné. Dále byla stanovena celková sorpční kapacita disku sorpčního gelu, dovolující odhadnout prakticky využitelnou kapacitu disků.

Z úbytku hmotnosti připravených disků sušením při 105 °C (gel obsahuje více než 95 % vody) a rovněž ze známého průměru disku 25 mm a jeho tloušťky změřené mikrometrem byl zjištěn objem disku V_g 0,19 cm³, o který je třeba navýšit objem V_e přidaného elučního roztoku při stanovení zachyceného množství kovu. Eluční faktor f_e , který vyjadřuje výtěžek jednorázové eluce při zvoleném objemu elučního činidla, byl zjištěn z poměru množství kovu uvolněného v jednom jednodenním elučním stupni a z celkového množství kovu získaného vyluhováním během několika po sobě jdoucích jednodenních elucí téhož exponovaného disku stejným množstvím roztoku kyseliny. Zjištěné hodnoty elučních faktorů činily pro Cd 0,98, pro Cu 0,66, pro Ni 0,86 a pro Pb 0,93. Pořadí elučních faktorů Cd>Pb>Ni>Cu koresponduje se stoupajícími hodnotami konstant stability β_1 (log β_1 činí 7,2; 9,0; 9,9 a 12,2; cit.²⁸) komplexů iontů kovů s 8-hydroxychinolinem do prvního stupně. Měření kinetiky eluce kovů v intervalu do 24 h ukázala, že ustavení eluční rovnováhy nastává již po 30 min u všech sledovaných kovů. Uvolnění sorbovaných kovů z disků se Spheron-Oxinem[®] je tedy reverzibilní a velmi rychlé.

Eluční faktory pro Cd, Cu, Ni a Pb u běžně používaného sorpčního gelu s iontoměníčem Chelex 100 nabývají hodnot kolem 0,80 (cit.⁸).

Pro srovnání s běžným sorpčním gelem obsahujícím Chelex 100 byla stanovena též sorpční kapacita disků sorpčního gelu se Spheron-Oxinem[®]. Při několikanásobném přetížení disku ionty mědi ve statickém uspořádání dosahovala kapacita disků hodnoty 3 μmol/disk, jak ukazuje obr. 1. Tato hodnota je nižší oproti teoretické hodnotě 8 μmol/disk vypočtené ze známé kapacity použitého iontoměníče pro Cu (0,25–0,3 mmol g⁻¹; cit.²⁹) a objemu sorpčního gelu. Snížení kapacity je pravděpodobně vyvoláno



Obr. 1. Závislost sorbovaného množství mědi n_{Cu} na vloženém množství mědi i_{Cu} (sorpční izoterma Cu) pro sorpční gel se Spheron-Oxinem[®] při pH 7, teplotě 24 °C a poměru fází 2 ml roztoku na disk

zabudováním iontoměniče do struktury polyakrylamidového gelu. Lineární oblast sorpční izotermy, v níž má disk praktické analytické využití, odpovídá asi 10 % celkové kapacity sorpčního gelu, která je dostatečně vysoká pro několikátý denní až několikaměsíční expozici jednotky DGT s tímto sorpčním gelem v přírodních vodných systémech.

Z měření závislosti sorpce niklu na době expozice disků při několikanásobném přetížení byla odvozena celková kapacita disku 2,4 $\mu\text{mol Ni}$, která velmi dobře odpovídala celkové kapacitě disku pro Cu, zjišťované ve statickém uspořádání.

Běžné disky sorpčních gelů s iontoměničem Chellex 100 mají kapacitu asi 5 $\mu\text{mol/disk Cd}$ (cit.⁸). Kapacity sorpčních gelů se Spheron-Oxinem[®] a s Chellexem 100 tak dosahují přibližně stejných hodnot, a proto mohou být aplikovány za srovnatelných podmínek.

Ověření funkčnosti techniky DGT využívající sorpční gel

Z koncentrace C_e [ng cm^{-3}] jednotlivých kovů v eluátech sorpčních gelů a z hodnot elučních faktorů byla vypočtena množství kovů vázaných na Spheron-Oxin[®] v jednotlivých discích, a dále pak koncentrace kovů v roztoku C_{DGT} [ng cm^{-3}] stanovená technikou DGT, přičemž pro výpočet byly použity tabelované hodnoty difuzních koeficientů D [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$] převzaté z literatury⁸, experimentálně zjištěná tloušťka Δg [cm] difuzního gelu 0,08 cm, příslušná doba expozice t [s] a průřez A [cm^2] difuzního okénka 3,14 cm^2 (dle 1. Fickova zákona $C_{\text{DGT}} = C_e \cdot (V_e + V_g) \cdot \Delta g / f_e \cdot D \cdot t \cdot A$). Porovnáním koncentrace kovů nalezených technikou DGT C_{DGT} a koncentrace kovů C_{SOL} stanovených přímo v roztocích odebraných vzorků expozičních roztoků byly nalezeny poměry $C_{\text{DGT}} / C_{\text{SOL}}$ 0,98 \pm 0,11 pro Cd, 1,07 \pm 0,10 pro Cu, 0,94 \pm 0,11 pro Ni a 1,16 \pm 0,09 pro Pb (hodnoty \pm reprezentují rozšířenou nejistotu měření). Tyto výsledky ukazují, že technika DGT se sorpčním gelem na bázi Spheron-Oxinu[®] poskytuje spolehlivé výsledky pro všechny sledované kovy.

Vliv faktorů ovlivňujících sorpci na sorpční gel

Vliv pH vnějšího roztoku

Vliv kyselosti vnějšího roztoku na záchyt Cd, Cu a Ni byl sledován v oblasti pH 3–8 (použití sorpčních gelů v alkalické oblasti je omezeno botnacími efekty polyakrylamidového gelu³⁰). Sorpční gel se Spheron-Oxinem[®] účinně zachycuje kovy z roztoku o pH 6–8 (viz obr. 2) a může tedy být využit pro stanovení kovů ve většině přírodních vod. Zmíněné rozmezí pH je velmi podobné oblasti zjištěné pro sorpční gel s Chellexem 100 (cit.⁸). Výrazný pokles záchytu Cd při hodnotě pH 3 na gelu se Spheron-Oxinem[®] je podobný chování sorpčního gelu s Chellexem 100 (cit.⁸).

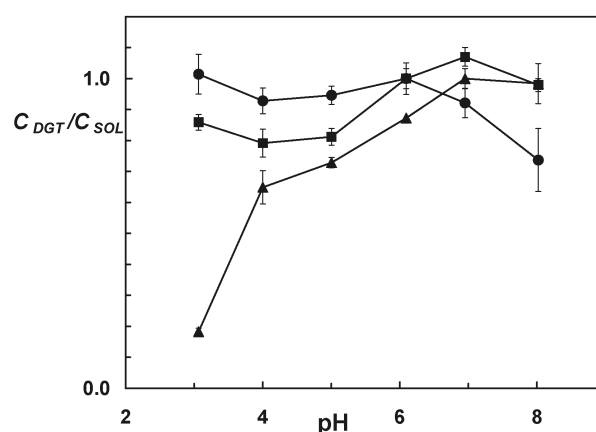
Vliv iontové síly

Vliv iontové síly na záchyt kovů na sorpčním gelu se Spheron-Oxinem[®] byl sledován při pH 7 na modelových roztocích kadmia s koncentrací NaNO_3 rostoucí až k hodnotě odpovídající koncentraci sodných iontů v mořské vodě, a to v rozsahu $2,5 \cdot 10^{-5} - 0,6 \text{ mol l}^{-1}$. Z výsledků měření vyplynulo, že změna iontové síly v rámci experimentální nejistoty (<5 %) nemá vliv na sorpci kadmia v celém rozsahu a že tedy technika DGT může poskytovat spolehlivé výsledky jak při stanovení kovů ve velmi čistých sladkých vodách, tak i ve vodách mořských. Zároveň výsledky ukazují, že záchyt iontů přechodných kovů je značně selektivní proti běžným alkalickým kovům, které se mohou v přírodních systémech s vysokou solností nacházet až v několikařádovém přebytku vůči kovům přechodným.

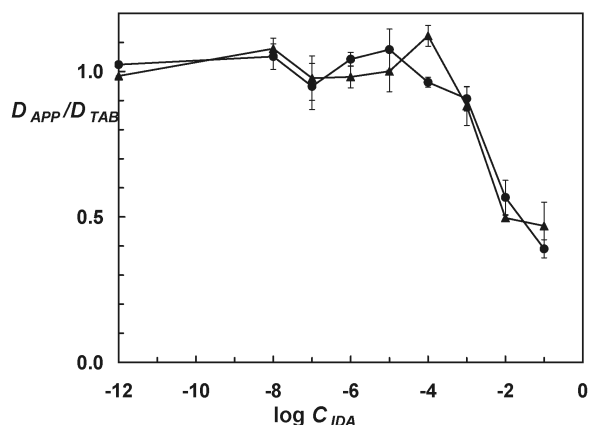
Některé z předchozích studií uvádějí, že koncentrace nalezaná technikou DGT ve vodách s nízkou iontovou silou může být nadhodnocena díky tomu, že sodná forma iontoměniče Chellexu 100, vytvářející záporný koncentrační gradient v difuzním gelu, může ovlivňovat transport iontů gelem v roztocích s nízkou iontovou silou $< 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (cit.³¹). Rovněž v práci³² byl zmiňován vliv nízké iontové síly ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaNO}_3$) na výsledky nalezené technikou DGT. Podobné efekty však nebyly při použití sorpčních gelů se Spheron-Oxinem[®] pozorovány, patrně proto, že funkční skupiny nejsou při pH blízkém neutrálnímu v sodné formě. Z tohoto pohledu se použití nového sorpčního gelu jeví výhodnější.

Vliv hořčnatých iontů

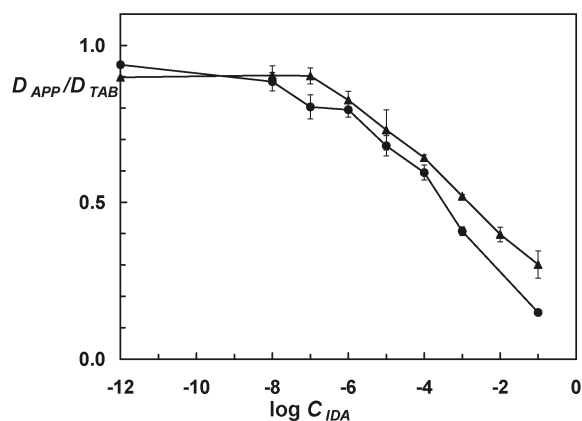
Funkční skupiny Chellexu 100 (kyselina iminodioxová) a Spheron-Oxinu[®] (8-hydroxychinolin) tvoří relativně stabilní komplexy s vápníkem a hořčíkem, které jsou velmi často přítomny v přírodních vodách. Jak vyplývá z hodnot konstant stability pro oba typy ligandů, pevnost komplexu



Obr. 2. Závislost sorpce Cd, Cu a Ni na hodnotě pH vnějšího roztoku stabilizovaného 0,02 mol l^{-1} octanovým pufrům a s koncentrací každého z kovů 30 $\mu\text{g l}^{-1}$, ▲ Cd, ● Cu, ■ Ni



Obr. 3. Závislost relativního výtěžku záchytu Cd na sorpčním gelu obsahujícím Chelex 100 a Spheron-Oxin[®] na koncentraci kyseliny iminodioctové (pH 7), C_{IDA} v mol l⁻¹, D_{APP}/D_{TAB} je poměr zdánlivého a tabelovaného difuzního koeficientu, ● CHELEX 100, ▲ SPEHERON-OXIN



Obr. 4. Závislost relativního výtěžku záchytu Ni na sorpčním gelu obsahujícím Chelex 100 a Spheron-Oxin[®] na koncentraci kyseliny iminodioctové (pH 7), C_{IDA} v mol l⁻¹, D_{APP}/D_{TAB} je poměr zdánlivého a tabelovaného difuzního koeficientu, ● CHELEX 100, ▲ SPEHERON-OXIN

hořčíku je proti komplexu vápníku vyšší. I když je konstanta stability komplexu 8-hydroxychinolinu s hořčíkem nižší ve srovnání s komplexy s Cd, Cu, Ni a Pb, může přítomnost hořčíku ovlivňovat výsledky nalezené technikou DGT v důsledku mnohonásobně vyšší koncentrace hořčíku než sledovaných přechodných kovů v přírodních vodách. Z rozdílu konstant stability hořčíku a jednotlivých kovů vyplývá (konstanty stability komplexů kovů Mg, Cd, Cu, Ni a Pb s kyselinou iminodioctovou do prvního stupně β_1 , vyjádřené jako log β_1 činí 2,94; 5,35; 10,55; 8,26 a 7,45; a pro komplexy s 8-hydroxychinolinem činí 4,50; 7,20; 12,20; 9,90 a 9,02; cit.^{27,33}), že vliv hořčíku by se měl nejvíce projevit na sorpci kadmia a nejméně na sorpci mědi. Proto byl zkoumán vliv přítomnosti hořčíku jako potenciálního přírodního interferentu, který by mohl negativně ovlivňovat výsledky získávané technikou DGT.

Vliv přítomnosti hořečnatých iontů při pH 7 na sorpci kovů v sorpčních gelech s Chelexem 100 a se Spheron-Oxinem[®] byl sledován v rozmezí koncentrací 0–0,05 mol l⁻¹ dusičnanu hořečnatého. Horní mez intervalu odpovídá koncentraci hořečnatých iontů v mořské vodě. V celém rozsahu koncentrací neměl v rámci experimentální nejistoty (<5 %) obsah hořečnatých iontů vliv na sorpci Cd, Cu, Ni a Pb i při teoretickém přetížení kapacity disků sorpčních gelů hořečnatými ionty o dva řády a při molárním koncentračním poměru hořčíku a sledovaného kovu 10⁵, což odpovídá horní mezi zkoumaného intervalu. Tento vliv se neprojevil ani při sorpci kadmia, kde by se měl vliv hořečnatých iontů nejvíce projevit. Afinita obou sorbentů k iontům alkalických zemin je tedy nižší, než by se dalo očekávat podle analogie s homogenními komplexními rovnováhami v roztocích. Z výsledků také vyplývá, že oba typy sorpčních gelů mohou být použity při stanovení koncentrace kovů ve vodách s vysokou tvrdostí.

Vliv kyseliny iminodioctové

Při aplikaci jednotek DGT v přírodních systémech se může projevit vliv některých konkurujících komplexujících složek, jako např. huminových látek. Jako ligand, který by simuloval vliv konkurující látky přítomné v přírodním vodném systému, byla pro modelové experimenty vybrána kyselina iminodioctová. Vliv tohoto konkurenčního činidla na výtěžek záchytu Cd, Cu, Ni a Pb byl studován při pH 7 pro sorpční gely se Spheron-Oxinem[®] i s Chelexem 100.

Z výsledků na obr. 3 a 4 je patrné, že s růstem koncentrace kyseliny iminodioctové klesá koncentrace kovů stanovených technikou DGT. Vliv rostoucí koncentrace kyseliny iminodioctové C_{IDA} na relativní výtěžek záchytu je vyjádřen jako podíl zdánlivého difuzního koeficientu D_{APP} pro definovanou koncentraci kyseliny iminodioctové a tabelovaného difuzního koeficientu D_{TAB} , odpovídajícího nulové koncentraci kyseliny iminodioctové. Přitom je zdánlivý difuzní koeficient vyjádřen ve smyslu 1. Fickova zákona jako tok iontů kovu normalizovaný na jednotkovou tloušťku difuzní vrstvy a jednotkovou koncentraci kovu v roztoku. Zlom na křivce závislosti nastává již při poměrně nízkých koncentracích konkurujícího ligandu. Podle odhadu dosahuje koncentrace funkčních skupin v gelovém roztoku sorpčního disku s Chelexem 100 hodnoty 3·10⁻² mol l⁻¹. Při této koncentraci kyseliny iminodioctové ve vnějším roztoku by se měly koncentrace volných iontů kovů v obou roztocích vyrovnat. Z grafů lze tedy vyvodit, že se v roztoku s volnými funkčními skupinami tvoří stabilnější komplexy než s fixovanými v sorpčním gelu.

Průběhy závislosti pro sorpční gely s Chelexem 100 i se Spheron-Oxinem[®] jsou velmi podobné (obr. 3 je pro jednoduchost uveden jen graf pro Cd). V rozmezí koncentrací kyseliny iminodioctové 1·10⁻⁸–1·10⁻⁴ mol l⁻¹ výtěžky kolísají v rámci experimentální chyby (<5 %) oproti výsledku pro nulovou koncentraci kyseliny iminodioctové (na obr. 3 a 4 je

tento bod znázorněn v hodnotě $\log C_{IDA} = -12$). Výtěžek záchytu kovů klesá při hodnotě $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny iminodioctové, a to úměrně konstantám stability kyseliny iminodioctové s těmito kovy (viz výše).

U niklu byl na základě hodnot konstant stability předpokládán rozdíl asi jeden a půl řádu mezi sorpčním gelem s Chelexem 100 a se Spheron-Oxinem[®]. Experimentálně zjištěný rozdíl činil přibližně jeden řád (obr. 4), což potvrdilo předpoklad sorpčních vlastností. Tohoto rozdílu lze s výhodou využít ve speciální analýze různých chemických forem niklu v reálných systémech. U Cd, Cu a Pb však nebyly očekávané rozdíly vyplývající z rozdílu konstant stability potvrzeny, což je možné přisoudit vlivu polyakrylamidového gelu na Spheron-Oxinu[®]. Vhodný postup přípravy sorpčních gelů s neovlivněnými vlastnostmi funkčních skupin se proto v budoucnu bude muset ještě cíleně zkoumat.

Tato práce byla uskutečněna v rámci Výzkumného záměru AVO Z40310501 "Moderní analytické techniky pro bioanalýzu, ekologii a nanotechnologie".

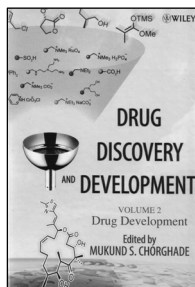
LITERATURA

1. Davison W., Zhang H.: *Nature* 367, 546 (1994).
2. Diviš P., Dočekalová H., Řezáčová V.: *Chem. Listy* 99, 640 (2005).
3. Torre M. C. A., Beaulieu P. Y., Tessier A.: *Anal. Chim. Acta* 418, 53 (2000).
4. Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 72, 4447 (2000).
5. Denney S., Sherwood J., Leyden J.: *Sci. Total. Environ.* 239, 71 (1999).
6. Gimpel J., Zhang H., Hutchinson W., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 448, 93 (2001).
7. Webb J. A., Keough M. J.: *Marine Pol. Bull.* 44, 222 (2002).
8. Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 67, 3391 (1995).
9. Ernstberger H., Zhang H., Davison W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 873 (2002).
10. Garmo O. A., Royset O., Steiness E., Flaten T. P.: *Anal. Chem.* 75, 3573 (2003).
11. Zhang H., Davison W., Knight B., McGrath S.P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 704 (1998).
12. Zhang H., Davison W., Tych W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 4181 (1995).
13. Teasdale P. R., Hayward S., Davison W.: *Anal. Chem.* 71, 2186 (1999).
14. Krom M. D., Mortimer R. J. G., Poulton S. W., Hayes P. J.: *Aquat. Sci.* 64, 282 (2002).
15. Zhang H., Davison W., Mortimer R. J. G., Krom M. D., Hayers P. J., Davies I. M.: *Sci. Total. Environ.* 296, 175 (2002).
16. Diviš P., Dočekalová H., Smetková V.: *Chem. Listy* 97, 1184 (2003).
17. Dočekal B., Smetková V., Dočekalová H.: *Chem. Pap.* 57, 161 (2003).
18. Hooda P. S., Zhang H., Davison W., Edwards A. C.: *Eur. J. Soil Sci.* 50, 285 (1999).
19. Davison W., Hooda P. S., Zhang H., Edwards A. C.: *Adv. Environ. Res.* 3, 550 (2000).
20. Zhang H., Zhao F. J., Sun B., Davison W., McGrath S. P.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602 (2001).
21. Chang L. Y., Davison W., Zhang H., Kelly M.: *Anal. Chim. Acta* 368, 243 (1998).
22. Murdock Ch., Kelly M., Chang L. Y., Davison W., Zhang H.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 4530 (2001).
23. Li W., Zhao H., Teasdale P. R., John R., Zhang S.: *Anal. Chim. Acta* 464, 331 (2002).
24. Li W., Zhao H., Teasdale P. R., John R., Zhang S.: *React. Funct. Polym.* 52, 31 (2002).
25. Zhang H., Davison W., Gadi R., Kobayashi T.: *Anal. Chim. Acta* 370, 29 (1998).
26. DeVries C. R., Wang F.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 792 (2003).
27. <http://www.dgtresearch.com>, staženo 5.11. 2006.
28. Inczédy J.: *Komplexotvorné rovnováhy v analytické chémii*. Alfa, Bratislava 1974.
29. Slovák Z.: *Bulletin n.p. Lachema Brno 1979*, 30.
30. Gimpel J., Zhang H., Hutchinson W., Davison, W.: *Anal. Chim. Acta* 448, 93 (2001).
31. Alfaro-De la Torre M. C., Beaulieu P.-Y., Tessier A.: *Anal. Chim. Acta* 418, 53 (2000).
32. Warnken K. W., Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 77, 5440 (2005).
33. Kotrlý S., Šůcha L.: *Chemické rovnováhy v analytické chémii*. SNTL, Praha 1988.

M. Gregušová^{a,b}, B. Dočekal^b, and H. Dočekalová^a
^a Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, ^b Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): **Characterization of Resin Gels for Diffusive Gradient in Thin Films Technique**

The diffusive gradient in the film technique (DGT) is a new approach to the in-situ determinations of labile metal species in aquatic systems. The DGT device accumulates labile species from solution and therefore contamination problems associated with conventional collection and filtration procedures are eliminated. The technique employs a hydrogel layer to control the diffusive transport of metals to a cation-exchange resin, which is selective for free or weakly complexed metal ion species. This study deals with the use of a new resin based on the Spheron-Oxin[®] ion exchanger in the DGT technique. The resin with a selectivity for trace metal species higher than Chelex 100 could provide more information on metal speciation in aquatic systems. Its performance was tested for Cd, Cu, Ni and Pb under laboratory conditions. The new resin provides reliable results in the pH range 6–8, independently of ionic strength (25 mmol l⁻¹– 0.6 mol l⁻¹) and also in the presence of Mg(NO₃)₂ (10 μmol l⁻¹– 0.05 mol l⁻¹). The effect of iminodiacetic acid, as a model competitive ligand on the metal uptake measured by DGT probe was also assessed.

RECENZE



Mukund S. Chorghade
(ed.):
**Drug Discovery
and Development**
Vol. 2: Drug Development

Vydal Wiley-VCH, Weinheim 2007.
První vydání, 387 stran.
ISBN 978-0471-39847-9

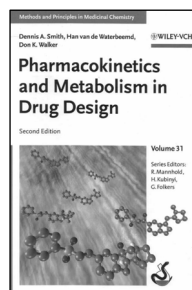
Druhý svazek série “Výzkum a vývoj léčiv“ je věnovaný oblasti vývoje léčiv a představuje volné pokračování prvního dílu, který byl věnován oblasti výzkumu nových léčiv, přičemž logicky zapadá do editorem vymezeného konceptu vytvořit ucelenou řadu věnovanou farmaceutickému průmyslu od výzkumu v oblasti nových biologicky aktivních struktur přes vývoj procesu, výrobu, klinické testování až po marketing. Podle slov editora M. S. Chorghadeho by tak toto encyklopedicky pojaté dílo mělo zaplnit mezeru, kterou představuje popis tak komplexního procesu, kterým se každodenně zabývají farmaceutické firmy. Moderní výzkum a vývoj léčiv v dnešních dnech vyžaduje spolupráci širokého spektra odborníků z často velmi vzdálených oblastí lidské činnosti, jako jsou vědečtí pracovníci z oblasti chemie, biologie, medicíny, farmakologie, přes techniky z inženýrských oblastí až po marketingové a další ekonomicko-právní profese. Editor vědom si této skutečnosti oslovil řadu odborníků a týmů pracujících v jednotlivých oblastech výzkumu, vývoje a prodeje farmaceutických substancí, kteří vytvořili jednotlivé kapitoly věnované významným tématům na cestě vývoje farmaceutického procesu.

Publikace “Výzkum a vývoj léčiv“ v patnácti kapitolách detailně popisuje důležité etapy vývoje farmaceutických substancí. Některé kapitoly jsou věnovány “moderním“ tématům farmaceutického průmyslu, např. screeningu biologicky aktivních látek obsažených v rostlinách a jejich využití pro inspiraci k syntéze jejich analog, stereoselektivním aspektům syntézy léčiv, úloze stereoselektivních katalytických systémů, technologickému aspektu “zvětšení měřítka“, problematice solí a polymorfismu, roli „outsourcingu“ při výrobě léčiv, legislativním aspektům spojeným s výrobním procesem, databázovým systémům a jejich využití při vyhledávání léčiv, klinickému výzkumu atd.

Publikace “Výzkum a vývoj léčiv“ je zajímavým pokusem obsáhnout komplexní proces, který začíná syntézou potenciálně biologicky aktivní substance a končí jejím úspěšným zavedením na trh. Zda se tento úkol, který si editor vytyčil, zdařil, asi nejlépe posoudí sami čtenáři, mezi které bude patřit široká obec pracovníků farmaceutického průmyslu, stejně jako čtenářů se zájmem o uvedenou

oblast. V každém případě lze konstatovat, že jednotlivé kapitoly věnované významným oblastem výzkumu a vývoje farmaceutických substancí představují velmi kvalitně sepsaná review na daná témata, která nesou všechny znaky textů psaných odborníky s dlouholetou praxí v uvedených oborech. Čtenářskou komunitou publikace “Výzkum a vývoj léčiv“ by měly být rovněž studenti farmaceutických oborů, kterým texty jednotlivých kapitol pomohou odhalit zajímavá témata současného farmaceutického průmyslu a umožní vytvořit komplexnější obraz tohoto významného průmyslového odvětví.

Petr Kačer



Dennis A. Smith,
Han van de Waterbeemd,
Don K. Walker:

**Pharmacokinetics
and Metabolism in Drug Design**

Vydal Wiley-VCH, Weinheim 2006.
První vydání, 187 stran.
ISBN 3-527-31368-0

Koncept předkládané publikace je plně vystižen jejím názvem a je zaměřen na osud léčiva v organismu s důrazem na etapu metabolických přeměn léčiva jako velmi důležitých pochodů, které je nutné respektovat již v raných stádiích výzkumu a vývoje nových léčiv. Snahou autorů je zařazení a respektování důležitosti farmakokinetiky jako samostatného odvětví v rámci farmakologie, potažmo medicínální chemie a zdůraznění jejího neopominutelného významu při návrhu a vývoji nových léčiv, jelikož pouze porozumění a respektování farmakokinetických zákonitostí může vést k úspěšnému vývoji nového léčiva, jehož účinnost byla primárně potvrzena *in vitro*.

Publikace “Farmakokinetika a metabolismus při návrhu nových léčiv“ je vyváženým textem, v kterém lze nalézt podrobně popsané základní kapitoly farmakokinetiky, které bývá dosti často zcela neopodstatněně ve farmakologických textech věnován pouze omezený prostor. Rovněž jsou zde popsány nové oblasti, které se v rámci farmakokinetiky rozvinuly v posledním desetiletí. Základní linie jednotlivých kapitol (Fyzikální aspekty farmakokinetiky, Adsorpce, Distribuce, Clearance, Renální clearance, Jaterní „metabolická clearance, Vzájemné interakce léčiv, Toxicita léčiv atd.) je vedena záměrem autorů každou část rozčlenit na popis fundamentálních principů a na konkrétních příkladech ukázat jejich význam pro návrh a vývoj nových léčiv. Tento aspekt je nutné vyzdvihnout s ohledem na dlouholetou praktickou zkušenost auto-

rů v oblasti výzkumu a vývoje nových léčiv ve farmaceutických firmách Astra-Zeneca, případně Pfizer, stejně jako jejich “cit” pro předávání informací a zkušeností z jejich působení v universitním prostředí (University Liverpool, University Bern, University Basel). Výsledkem je pak vysoce konsistentní, vyvážený, moderně pojatý text farmakokinetiky, který neopomine žádnou z kapitol uvedeného odvětví a rovněž nenechá žádnou z prezentovaných částí expandovat do oblasti vysoce specializované, která by nesplňovala podmínku základního farmakokinetického textu.

Knižní publikace “Farmakokinetika a metabolismus při návrhu nových léčiv“ je koncepčně sestavena tak, že

není určena pouze pro skupinu odborníků pracujících v oblasti farmakokinetických studií, ale poskytuje pohled na uvedenou oblast mnohem širšímu okruhu čtenářů, a to i těm, kteří nejsou s uvedenou oblastí detailně seznámeni. Text publikace je mimořádně čtivý a lze jej proto doporučit nejen čtenářům zájímajícím se o oblast výzkumu a vývoje nových léčiv, případně studentům, kteří pocítí nedostatečný rozsah farmakokinetických kapitol při studiu farmakologických, případně farmaceutických oborů, ale všem, kteří se cítí osloveni oblastí interakce léčiva s živým organismem.

Petr Kačer



Invited Lecture Series

Topic: Mg and Zn-Organometallics

Functionalized Mg and Zn-Organometallics for Organic Synthesis

The preparation of highly functionalized organozinc compounds will be emphasized using zinc powder in the presence of LiCl. In a second part, the preparation of polyfunctional magnesiated heterocycles using either a X/Mg-exchange triggered by $i\text{-PrMgCl-LiCl}$ or by a direct deprotonation using new soluble Mg-bases such as TMPMgCl-LiCl or $(\text{TMP})_2\text{Mg-2LiCl}$. Finally, the synthesis of aminated heterocycles using an oxidative amination procedure with chloranil will be described.

Speaker: Professor Paul Knochel

Department of Chemistry
Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

ÚOCHB AV ČR

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.
Flemingovo nám. 2, Praha 6

Lecture Hall 10:00 am



Invited Lecture Series

Topic: Geminal Fluorination

Theoretical Studies of the Schizophrenic Effects of Geminal Fluorination on Organic Reactions: Explanations and Predictions

Dolbier and coworkers have found that geminal fluorination has a large effect on lowering the barrier to *cis-trans* isomerization of 1,2-dimethylcyclopropane. Lemal and coworkers have shown that geminal fluorination actually stabilizes [2.2.2]propellane toward ring opening. In order to understand these very different effects of geminal fluorination, *ab initio* calculations have been performed and, from the results, explanations proposed and experimentally testable predictions made.

Speaker: Professor Wes Borden

Department of Chemistry
University of North Texas, Denton, Texas, USA

ÚOCHB AV ČR

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.
Flemingovo nám. 2, Praha 6

Lecture Hall 10:00 am



Česká společnost chemická
Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5
116 68 Praha 1
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Proč se stát členem České společnosti chemické

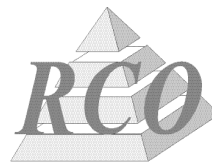
Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.



Česká společnost chemická · Univerzita Palackého
Statutární město Olomouc · SIGMA-ALDRICH – hlavní sponzor



SIGMA-ALDRICH

60. JUBILEJNÍ SJEZD ASOCIACÍ ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Olomouc 1. – 4. září 2008

Odborné sekce:

- Anorganická chemie (včetně bioanorganické); Garant: Tomáš Wágner; Sponzor sekce **MERCI**
- Organická chemie (včetně bioorganické a farmaceutické); Garant: Jan Hlaváč; Sponzor sekce **FARMAK**
- Analytická chemie (včetně bioanalytické); Garantka: Eva Tesařová; Sponzor sekce **SHIMADZU**
- Přírodní látky (fytoceutika, biologická aktivita, fytofarmaka); Garant: Vladimír Křen; Sponzor sekce **TEVA**
- Chemické vzdělávání, historie a popularizace chemie; Garant: Hana Čtrnáctová, Juraj Ševčík; Sponzor sekce **UNIVERZITA PALACKÉHO** ve spolupráci s projektem MedVěd
- Průmyslová chemie (ChemProgres); Garant: Jiří Hanika; Sponzor sekce **SPOLCHEMIE**
- Teoretická a fyzikální chemie; Garant: Jaroslav Koča; Sponzor sekce **THERMOFISCHER** (dříve SPECTRONEX)
- Potravinářská chemie (včetně funkčních potravin, nutraceutik a doplňků stravy); Garant: Vladimír Filip; Sponzor sekce **MERCK**

Program:

Pondělí 1. 9. 2008 (Moravské divadlo)

Slavnostní zahájení

J.-M. Lehn: *From Supramolecular Chemistry to Constitutional Dynamic Chemistry*

Večer na uvítanou

Úterý 2. 9. (Regionální centrum Olomouc)

Irena Valterová: *Biosyntéza hmyzích feromonů*

Eubor Fišera: *1,3-Dipolárne cykloadície chirálnych nitrónov a ich využitie v syntéze*

Přednášky v sekcích, minisymposia

Plakátová sdělení (Umělecké centrum Univerzity Palackého)

Výstava firem (Umělecké centrum Univerzity Palackého)

Setkání u moravských vín

Středa 3. 9. (Regionální centrum Olomouc)

Miloslav Frumar: *Rychlé reversibilní změny amorfni – krystalická fáze a nové materiály pro optické a elektrické paměti vysoké hustoty*

Karel Lemr: *Hmotnostní spektrometrie – od elektrického výboje k zobrazování tkání*

Přednášky v sekcích, minisymposia

Vyhlášení vítězů plakátových sdělení a společenský večer

Čtvrtek 4. 9.

Exkurze, výlety (www.ckpressburg.cz)

www.sjezd2008.upol.cz

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	165	EDITORIAL	165
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Termoplastické vulkanizáty	166	Thermoplastic Vulcanizates	166
S. Dubinin a V. Ducháček		S. Dubinin and V. Ducháček	
Elektrónový transfer v ampérometrických biosenzorech	173	Electron Transfer in Amperometric Biosensors	173
V. Polohová a M. Šnejdárková		V. Polohová and M. Šnejdárková	
Průtoková cytometrie ve výzkumu kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a její aplikace v praxi	183	Application of Flow Cytometry of Yeast in Research and Practice	183
J. Novák, G. Basařová, J. Fiala a P. Dostálek		J. Novák, G. Basařová, J. Fiala, and P. Dostálek	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Nová metoda charakterizace vápenců používaných v kotlích s fluidní vrstvou pro odsíření spalin	188	New Method of Characterization of Limestones Used in Kettles with Fluid Layer for Desulfurization of Combustion Products	188
P. Buryan, J. Vejvoda, P. Chalupa, M. Maryška, J. Krátký a L. Veverka		P. Buryan, J. Vejvoda, P. Chalupa, M. Maryška, J. Krátký, and L. Veverka	
CENA MERCK		MERCK PRIZE	
HPLC separace polykarboxylátových derivátů cykvenu s využitím bezkontaktní vodivostní detekce	194	HPLC Separation of Cyclen Polycarboxylates Using Contactless Conductivity Detection	194
A. Hamplová, P. Coufal, Z. Bosáková, F. Opekar a V. Kubíček		A. Hamplová, P. Coufal, Z. Bosáková, F. Opekar, and V. Kubíček	
Miniaturizace elektrolytických průtokových cel pro elektrochemické generování těkavých sloučenin v metodě AAS	200	Miniaturization of Flow-Through Electrolytic Cells for Electrochemical Generation of Volatile Compound in AAS	200
J. Hraníček, V. Červený a P. Rychlovský		J. Hraníček, V. Červený, and P. Rychlovský	
Vliv simulovaného trávení na speciaci prvků v žitných vločkách	205	The Effect of Simulated Digestion on Element Speciation in Rye Flakes	205
M. Juříček, R. Koplík a O. Mestek		M. Juříček, R. Koplík, and O. Mestek	
Studium komplexace metallakarboranů s cyklo-dextriny pomocí NMR spektroskopie	209	NMR Study of Complexation of Metalla-carboranes with Cyclodextrins	209
J. Rak, M. Tkadlecová, P. Cígler a V. Král		J. Rak, M. Tkadlecová, P. Cígler, and V. Král	
Charakterizace sorpčních gelů pro použití v technice difuzního gradientu v tenkém filmu	213	Characterization of Resin Gels for Diffusive Gradient in Thin Films Technique	213
M. Gregušová, B. Dočekal a H. Dočekalová		M. Gregušová, B. Dočekal, and H. Dočekalová	
RECENZE	218	BOOK REVIEWS	218

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 102 (2008), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 132, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 118 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORŮ/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drařar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podeřva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORŮ/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • 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, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2008 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 153 Kč, roční plné předplatné 2008 (12 čísel) 1570 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 785 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 83 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 63 EUR (doručování via SCHS), 234 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • 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 v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: M. Pojarová • Dáno do tisku 3.3.2008.