

### **Ekologicky a energeticky výhodné mikroorganismy**

*Snížené náklady na ohřívací/chladicí procesy, vysoké vý-  
těžky při reakcích zahrnujících termolabilní složky, kapacita  
pro monitorování životního prostředí za nízkých teplot a v ne-  
poslední řadě i rychlé a ekonomické ukončení procesu mírným  
zvýšením teploty jsou hlavní výhody, které předurčují boom  
v použití psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganis-  
mů v 21. století.*

*Jsou to mikroorganismy, které jsou schopny růst a rozmno-  
žovat se za teplot blízkých 0 °C. Obývají oblasti, kde se průměrná  
teplota pohybuje pod 5 °C. Protože takové oblasti  
zaujímají více než tři čtvrtiny naší planety (oceány, Arktida,  
Antarktida, ledovce), představují mikroorganismy adaptova-  
né na nízké teploty významnou skupinu organismů.*

*K tomu, aby dokázaly přežívat v chladných prostředích si  
tyto mikroorganismy vyvinuly celou řadu adaptačních mecha-  
nismů u všech svých buněčných složek, zahrnujících membrá-  
ny, systém zajišťující energii, expresní systém, biodegradační  
dráhy i složky podílející se na příjmu živin. Všechny tyto  
mechanismy lze popsat v rámci adaptačních změn jejich bu-  
něčných proteinů a lipidů. V případě proteinů je cílem udržení  
dostatečné flexibility struktur i za nízkých teplot, což zajišťují  
především nekovalentní interakce daného proteinu. Bílkovin-  
né katalyzátory, enzymy, z psychrofilních a psychrotolerant-  
ních mikroorganismů, pak mají na rozdíl od svých mezofilních  
protějšků nízké teplotní optimum, vysokou katalytickou schop-  
nost za nízkých teplot a v neposlední řadě vykazují značnou  
nestabilitu za vyšších teplot. Ze složek buněčných lipidů, tvo-  
řících membránové systémy, hrají rozhodující úlohu v zacho-*

*vání buněčné životnosti za nízkých teplot mastné kyseliny.  
Nejčastějšími mechanismy, vedoucími k zachování fluidity  
buněčné membrány, jsou zkracování délky řetězce mastných  
kyselin a syntéza nenasycených a větvených mastných kyselin.  
Na rozdíl od změn v buněčných proteinech, které jsou výlučně  
vázané na genom, změny ve složení lipidů mohou být jak  
genotypové tak fenotypové. Mikroorganismy tak mají schop-  
nost regulovat složení své buněčné membrány přímo v závis-  
losti na vnějších podmínkách, tj. přímo reagovat na enviro-  
mentální podněty.*

*Z hlediska praktického využití těchto mikroorganismů do-  
chází v poslední době ke studiu jejich možných aplikací v řa-  
dě biotransformačních a bioremediačních technologií. Jejich  
hlavní výhodou je možnost dekontaminace znečištěných zón in  
situ za teplot pod 15 °C, tj. tam, kde většina mezofilních  
mikroorganismů vykazuje minimální aktivity. Jako příklad  
může sloužit biodegradace vícesytných alkoholů (ethylen-,  
propylen-, diethylenglykol) uvolňujících se z nemrznoucích  
směsí používaných v leteckém průmyslu a nacházejících se  
v okolí letištních drah. Avšak v současné době jsou nejvíce  
využívány enzymy izolované z těchto mikroorganismů, které  
díky svým vlastnostem mohou sloužit v řadě praktických apli-  
kací zahrnující široké spektrum biotechnologických oblastí  
(na příklad prací prostředky, mlékárenský a masný průmysl,  
čištění kontaktních čoček).*

*Michal Stibor  
a Blanka Králová*

# ADSORPČNÍ ROZPOUŠTĚCÍ METODY V ELEKTROANALÝZE – DATABÁZE APLIKACÍ

ROBERT KALVODA<sup>a</sup>, JIŘÍ BAREK<sup>b</sup>  
a MICHAL DŘEVÍNEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail: Michal.Drevinek@hornet.cz, <sup>b</sup>UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, e-mail: Barek@natur.cuni.cz

Věnováno prof. Ing. Karlu Štulíkovi, DrSc. k jeho 60. narozeninám

Došlo dne 2.IX.2000

Klíčová slova: adsorpční rozpouštěcí voltametrie a chronopotenciometrie, databáze aplikací

## Obsah

1. Úvod
2. Elektrochemické adsorpční rozpouštěcí metody
  - 3.1. Akumulační proces
  - 3.2. Rozpouštěcí proces
4. Zhodnocení a porovnání adsorpční rozpouštěcí voltametrie a adsorpční rozpouštěcí chronopotenciometrie
5. Využití elektrochemických adsorpčních metod
6. Databáze aplikací

## 1. Úvod

Nesporným přínosem stopové analýze jsou elektroanalytické metody pracující s elektrochemickým nahromaděním sledované látky z roztoku na elektrodě následovaným jejím elektrochemickým rozpouštěním. Detekční limit při těchto metodách leží v oblasti nanomolárních až subnanomolárních koncentrací. Dnes již klasická, všeobecně hojně používaná metoda anodické rozpouštěcí voltametrie (ASV) případně anodické rozpouštěcí chronopotenciometrie (ASCP) pracuje s elektrolytickým vylučováním stop iontů kovů na elektrodě a rozpouštěním depozitu zpět do roztoku polarizací elektrody ke kladným potenciálovým hodnotám za voltametrické nebo chronopotenciometrické kontroly. Vedle této metody, vhodné zejména ke stanovení stopových množství těžkých kovů např. ve vodách, lze ještě uvést katodickou rozpouštěcí voltametrii (CSV), spočívající ve vzniku kovových iontů anodickou oxidací materiálu elektrody, které reagují se stanovovanou slož-

kou za vzniku málo rozpustné sloučeniny na povrchu elektrody, jež je posléze katodicky rozpouštěna. V průběhu doby byly publikovány různé další varianty uvedených metod – v detailech je nutno odkázat na monografickou literaturu např.<sup>1–3</sup>.

Vedle zmíněných elektrolytických způsobů sloužících k nahromadění stanovované látky na elektrodě může být využito k tomuto účelu i adsorpce povrchově aktivních látek na povrchu elektrody. Jde zejména o povrchově aktivní komplexy kovů a velký soubor organických sloučenin. O této metodě, tedy adsorpční rozpouštěcí voltametrii nebo adsorpční rozpouštěcí chronopotenciometrii pojednává tento článek, který je míněn jako informativní úvod k databázi, zahrnující zhruba dva tisíce prací z tohoto oboru, publikovaných pracovníky všech světadílů. Tato databáze bude současně s uveřejněním tohoto článku ve své úplné formě vystavena jako příloha na internetové stránce časopisu Chemické listy ([http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/download/adsvi.zip](http://staff.vscht.cz/chem_listy/download/adsvi.zip)).

## 2. Elektrochemické adsorpční rozpouštěcí metody

Při těchto metodách se během rozpouštěcího, podle anglosaské literatury „stripovacího“ procesu, sleduje redukce či oxidace látky předtím nakoncentrované na elektrodě adsorpcí. Pro tento způsob analýzy s vyhodnocováním voltametrického záznamu rozpouštěcí křivky byl navržen<sup>4</sup> a je všeobecně vžitý název adsorpční rozpouštěcí voltametrie (Adsorptive Stripping Voltammetry – AdSV). Jestliže je k rozpouštěcímu kroku použito potenciometrické kontroly, jedná se o adsorpční rozpouštěcí potenciometrii AdSP. (Ve shodě s terminologií IUPAC by však měl být používán termín adsorpční rozpouštěcí chronopotenciometrie – AdSCP). Oba tyto rozpouštěcí kroky – voltametrický i chronopotenciometrický – jsou více méně rovnocenné, nicméně se přece jen vyznačují určitými specifickými vlastnostmi, které budou v dalším diskutovány.

Z historického hlediska budiž uvedeno, že zvýšení signálu v oscilografické polarografii střídavým proudem<sup>5</sup> (podle terminologie IUPAC by tato metoda měla být nazývána cyklickou derivační chronopotenciometrií) v důsledku redukce naadsorbované látky na elektrodě bylo popsáno již v r. 1955, a to u studia roztoků elementární síry<sup>6</sup>. Podobné efekty byly pozorovány i u organických látek a při adsorpci málo rozpustných anorganických sloučenin, např. AgI a PbSO<sub>4</sub> (cit.<sup>7</sup>). Příklad adsorpčního nahromadění redukovatelných organických sloučenin, prováděného při konstantním napětí v údobí před polarizací elektrody střídavým proudem, je uveden v práci<sup>8</sup>. Teoretické základy adsorpční rozpouštěcí analýzy byly popsány zejména v cit.<sup>9,10</sup> podobně jako experimentální uspořádání a pracovní postupy při použití různých typů elektrod a samozřejmě také nejrůznější možnosti použití této metody. V dalším proto bude zřetel věnován spíše porovnání obou nejčastěji používaných metod AdSV a AdSCP z hledisek jejich předností jak pro rychlé sériové analýzy, tak také pro základní výzkum v elektroanalytické chemii, biochemii, toxikologii aj.

### 3. Metodologické aspekty

Obě diskutované metody, AdSV i AdSCP, jsou založeny na procesu akumulacím, následovaným procesem rozpouštěcím a to za potenciostatických nebo galvanostatických podmínek.

#### 3.1. Akumulační proces

Pro optimalizaci akumulacímho procesu, který se u voltametrické i chronopotenciometrické metody provádí potenciostaticky, je nutné nalézt nejprve nejvýhodnější potenciál akumulace a dobu jejího trvání – vhodný postup je popsán např. v cit.<sup>9</sup> V řadě případů lze však sledované látky na elektrodě nahromadit adsorpcí pouze jejím vnořením do zkoumaného roztoku po určitou dobu při rozpojeném elektrickém obvodu.

Před zahájením akumulacímho procesu je třeba věnovat pozornost přípravě vzorku, zejména s ohledem na případné interference povrchově aktivních látek (PAL) často nedefinovaného složení. AdSCP je podstatně méně citlivá na zmíněné interference ve srovnání s AdSV. Při použití ASV nebo AdSV ke stanovení stop těžkých kovů ve vodách je nutno nejprve odstranit interferující PAL, např. vhodným způsobem mineralizace, případně vhodnými separačními metodami či postupy, nemá-li dojít k nežádoucím ovlivnění (snížení, případně i úplnému vymizení) měřeného signálu. Někdy lze zabránit interferencím PAL volbou dostatečně pozitivního akumulacímho potenciálu, při němž ještě k jejich rušivé adsorpci na elektrodě nedochází. Jako příklad takové možnosti může sloužit metoda AdSV na stanovení uranu ve vodách bez předchozí úpravy vzorku<sup>11</sup>. S eventuální konkurenční adsorpcí, zejména při práci s biologickými vzorky, je však nutno počítat i u AdSCP, jak může být demonstrováno na příkladu stanovení erythromycinu v moči<sup>12</sup>. Další vážné potíže u obou metod mohou také vyvstat při stanovení kovů po jejich vazbě do chelátů vlivem konkurenční adsorpce ligandu, jehož musí být v roztoku koncentrační nadbytek.

#### 3.2. Rozpouštěcí proces

V AdSV lze rozpouštěcí proces kontrolovat klasickou DC metodou, která má výhodu v tom, že umožňuje lepší proměrování výšky píku než tomu je např. u metody diferenčně pulsní, vzhledem k více méně přímkovému průběhu DC křivky v „čistém“ základním elektrolytu. Zhruba stokrát citlivější metody pulsní (diferenčně pulsní, square wave a AC metody) sledují v roztoku elektrolytu závislost funkce diferenciální kapacity na potenciálu elektrody, projevující se nárůstem signálu v oblasti blízkých meznímu kladnému a zápornému potenciálu, což v těchto potenciálových oblastech může znesnadnit měření výšky píku. Proto je někdy DC metoda výhodnější<sup>4,9</sup>. Pokud se týká citlivosti pulsních metod, ta bývá u square wave techniky nejvyšší<sup>13</sup>, avšak tento efekt často závisí na typu adsorbátu na elektrodě. Výška signálu je přímo úměrná rychlosti nárůstu polarizačního napětí, což představuje další možnost zvýšení citlivosti. V AdSCP se při potenciometrickém, ale i chemickém rozpouštění sleduje průběh  $dt/dE$  vs.  $E$  (cit.<sup>14,15</sup>), přičemž průběh této závislosti je tvarově stejný jako u běžně používaného průběhu diferenčně pulsního v AdSV. Velikost signálu odpovídající funkci  $dt/dE$  a tedy do jisté míry

i citlivost lze zvýšit rychlostí vzorkování klasického průběhu závislosti potenciálu na čase. Signál v AdSCP může být dále zvýšen i snížením rozpouštěcího proudu, neboť přechodový čas je nepřímě úměrný proudu, nicméně tento rozpouštěcí proud musí mít vždy větší hodnotu než proud nabíjecí. Principiálně lze rozpouštěcí proces také provádět chemicky spontánní oxidací depozitu vhodným oxidačním činidlem přítomným v roztoku. Jako oxidační činidlo slouží nejčastěji kyslík přítomný v analyzovaném roztoku. Tento způsob však bývá nejčastěji používán v anodické rozpouštěcí chronopotenciometrii k rychlým sériovým analýzám. Obecně platí, že v chronopotenciometrických rozpouštěcích metodách se má upřednostnit metoda konstantního proudu k zaručení lepší kontroly všech parametrů.

K podstatnému nárůstu citlivosti u obou metod (AdSV i AdSCP) může dojít vřazením katalytického procesu paralelně k procesu elektrodovému uplatňujícím se během rozpouštěcího kroku. Takový postup byl v polarografii první popisán Wiesnerem v r. 1943 (cit.<sup>16</sup>), kdy produkt elektrodové reakce reagoval se složkou v roztoku, regenerující původní elektroaktivní sloučeninu, což se projevilo nárůstem původního polarografického proudu. Tento proudový nárůst je závislý na rychlostní konstantě paralelní chemické reakce. Jako příklad tohoto jevu v adsorpčních rozpouštěcích metodách může být zmíněno stanovení Co, Mo, Cr, Pt a jiných kovů za přítomnosti chlorečnanů, bromičnanů, dusitanů aj.<sup>17,18</sup>

### 4. Zhodnocení a porovnání adsorpční rozpouštěcí voltametrie a chronopotenciometrie

Jednou z výhod AdSCP v porovnání s AdSV je menší citlivost na rušivý vliv PAL v roztoku, protože potenciál elektrody není závislý na diferenciální kapacitě elektrodové dvojvrstvy. Při použití uhlíkových elektrod lze navíc očekávat při nastavení vysokých citlivostí menší šum na křivkách: ten totiž vzniká nárazem elektronů na částičky uhlíku při měření proudových signálů při potenciostatických metodách, na rozdíl od chronopotenciometrických metod, kdy se měří potenciál elektrody. Toto jsou nesporné faktory přispívající k vyšší citlivosti chronopotenciometrických metod při měření závislosti  $dt/dE$  vs.  $E$ . Dalším příznivým faktorem ovlivňujícím citlivost je již zmíněná rychlost vzorkování při sledování této funkce a ev. použití nízké hodnoty rozpouštěcího proudu a v neposlední řadě víceméně přímkový průběh základního elektrolytu, který nekopíruje průběh závislosti diferenciální kapacity na potenciálu, jak tomu je u pulsních voltametrických metod. Výhodou chronopotenciometrických metod je také zhruba o 150 mV větší přepětí vodíku na rtuťové elektrodě, patrně v důsledku pomalé molalisace vodíku při rychlých změnách potenciálu elektrody. V oscilografické polarografii, kde byl tento jev běžně využíván, je tato rychlost řádu  $1000 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Tím je i při AdSCP rozšířen potenciálový rozsah, na který lze elektrodu polarizovat, což lze analyticky využít<sup>19</sup>.

Poněkud spornou výhodou – i když často citovanou – je možnost provozovat galvanostatické metody za přítomnosti kyslíku rozpuštěného v roztoku, což samozřejmě přispívá k rychlosti prováděných analýz (ostatně totéž platí pro AdSV při použití mikroelektrod). Při práci v neutrálních nepufrovaných roztocích však může dojít k rušivým vlivům v důsledku

UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry		<i>Adsorptive stripping voltammetry - organic compounds</i>	
COMPOUND	AZO DYES		
AUTHOR	CASTRILLEJO Y., PARDO R., BARRADO E., BATANERO P.S.		
JOURNAL	ELECTROANAL. 2, 553		
YEAR	1990		
TITLE	DETN. OF FOOD ADDITIVES AZO DYES AT AN HMDE WITH AdSV		
SUMMARY	FOOD SIMULT. DETN.		
COMMENT1	SIMULTANEOUS DETN OF THE DYES CAN ONLY BE ACHIEVED BY AN		
COMMENT2	ANALYTICAL MULTIVARIATE TECHNIQUE AND GENERALIZED STANDARD		
REMARK	ADDITION METHOD GSAM		
REMARK2			

Záznam: 14 61 z 701

Obr. 1. Příklad formulářového zobrazení databáze organických sloučenin

alkalizace povrchu elektrody  $\text{OH}^-$  ionty vzniklémi redukcí kyslíku.

Výše zmíněné výhody zřejmě přispěly v poslední době k oblibě chronopotenciometrické metody, což též ovlivnilo výrobu různých typů jednoúčelových analyzátorů často s pracovní elektrodou pouze „na jedno použití“ (cit.<sup>20</sup>). Význam voltametrických metod mimo jiné spočívá v jejich nezastupitelnosti v základním elektrochemickém výzkumu a v nalezení optimálních parametrů pro analytická měření a to i metodou AdSCP.

Vzhledem k výše uvedenému lze snad konstatovat, že obě metody, voltametrická i chronopotenciometrická, jsou více méně ekvivalentní a že je pro uživatele výhodné, jestliže jeho elektrochemický analyzátor umožňuje použití obou metod tak, aby k řešení určitého problému mohla být vybrána ta optimální.

## 5. Využití elektrochemických adsorpčních metod

Z dosud publikovaných prací zabývajících se adsorpčními rozpouštěcími metodami je patrné, že jich lze výhodně použít ve stopové analýze kovů a to i těch, které se vymykají běžným polarografickým či voltametrickým metodám, zejména metodě anodické rozpouštěcí analýzy<sup>21,22</sup> (jde např. o Al, Ba, Be, Ca, Rh, Pt a mnoho jiných). Citlivost AdSV nebo AdSCP je navíc často vyšší než ASV, protože kov se nerozpouští v objemu rtuti visící rtuťové kapkové elektrody, ale tvoří spíše monomolekulární vrstvu komplexu na jejím povrchu. Adsorpční rozpouštěcí metody skýtají navíc možnost stanovovat velký sortiment organických sloučenin. Nečastěji se jedná o látky biologicky aktivní a o látky významné z hlediska environmen-

tálního. Jako příklad lze uvést využití těchto metod při stanovení chemických karcinogenů<sup>23,24</sup> či environmentálně významných barviv<sup>25</sup>. Vedle organických sloučenin nesoucích elektroaktivní funkční skupinu mohou být na elektrodě též akumulovány látky projevující se pouze povrchovou aktivitou, které vykazují tensametrický efekt. Vedle problematiky rutinní analýzy jsou tyto metody zajímavé i pro specializované aplikace např. v oblasti biologie a toxikologie. Tak např. změny v redox signálech složek DNA imobilizovaných na povrchu elektrody může být použito k indikaci porušení DNA v důsledku chemického nebo fyzikálního působení. Řada sloučenin interagujících s DNA (např. antrachinony, genotoxické aromatické aminy aj.) mohou poskytovat v důsledku této vazby s DNA signály využitelné v toxikologické analýze. Biosensor vytvořený naadsorbováním DNA na povrchu elektrody může být použit k sledování specifických sekvencí řetězce DNA virů či bakterií s cílem diagnostiky některých chorob (AIDS, Hepatitis B, TBC). Tato detekce je založena na znalosti posloupnosti bází v DNA detegovaných patogenů tak, že na elektrodě je imobilizováno vlákno DNA mající takový sled bází, aby mohlo dojít hybridizací ke spojení s bakteriální či virovou DNA přítomnou ve vzorku na základě komplementárnosti řetězců. Dlužno však poznamenat, že tyto diagnostické metody jsou stále ještě ve vývojovém stádiu. Více o této tematice lze nalézt v cit.<sup>26</sup> Uvést by bylo možno i sledování imunologických reakcí metodou AdSV. Praktické aplikace AdSV jsou popsány např. v<sup>9,21,22</sup>.

## 6. Databáze aplikací

Rychlý nárůst počtu prací zabývajících se využitím elektrochemických adsorpčních metod vedl k vybudování rozsáh-



lé bibliografické databáze, která je roztržena do tří databázových souborů v programu Microsoft Access. První soubor obsahuje více než 700 prací popisujících stanovení jednotlivých kovů pomocí adsorpčních rozpouštěcích metod, přičemž jednotlivé kovy jsou zde pro přehlednost řazeny abecedně. Druhý obsahuje více než 1200 prací věnovaných stanovení různých organických sloučenin těmito technikami. Příslušný formulář odpovídající vybranému záznamu z této části databáze je pro ilustraci znázorněn na obr. 1. Třetí soubor obsahuje několik desítek obecněji zaměřených prací týkajících se obecných principů, teorie a historie elektrochemických metod využívajících adsorpční akumulace. Tato databáze je na vyžádání k dispozici na e-mailových adresách autorů a současně je vystavena jako doplňkový materiál k této publikaci na internetové stránce časopisu Chemické listy [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/download/adsvi.zip](http://staff.vscht.cz/chem_listy/download/adsvi.zip).

*Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (projekt 113100002) a Grantové agentuře České republiky (grant 203/98/1187).*

#### LITERATURA

- Vydra F., Štulík K., Juláková E.: *Rozpouštěcí polarografie a voltametrie*. SNTL, Praha 1977.
- Wang J.: *Stripping Analysis*. VCH, Deerfield Beach 1985.
- Štulík K., v knize: *Instrumentation in Analytical Chemistry* (Zýka J., ed.), sv. 2, str. 35. Horwood, Chichester 1994.
- Kalvoda R.: *Anal. Chim. Acta* 162, 197 (1984).
- Heyrovský J., Kalvoda R.: *Oszillografische Polarographie mit Wechselstrom*. Akademie Verlag, Berlin 1960.
- Kalvoda R.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 22, 852 (1956).
- Kalvoda R.: *Chem. Listy* 54, 1265 (1960).
- Kalvoda R., Budnikov G. K.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 28, 838 (1963).
- Kalvoda R., v knize: *Nové směry v analytické chemii* (Zýka J., ed.), sv. IV., str. 89. SNTL, Praha 1988.
- Novotný L., v knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Štulík K., Kalvoda R., ed.), str. 49. UNESCO-ROSTE, Venice 1996.
- Sanders S., Wagner W., Henze G.: *Anal. Chim. Acta* 205, 154 (1995).
- Hua Ch., Jagner D., Renman L.: *Talanta* 35, 525 (1988).
- Vire J-C., Patriarche G. J., Zhang H., Gallo B., Alonso R., v knize: *Contemporary Electroanalytical Chemistry* (Ivaska A., Lewenstam A., Sara R., ed.), str. 379. Plenum Press, New York 1990.
- Jagner D.: *Trends Anal. Chem.* 2, 53 (1983).
- Jin W., Wang J.: *Anal. Chim. Acta* 252, 59 (1991).
- Heyrovský J., Kůta J.: *Principles of Polarography*, str. 380. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1965.
- Panelli M. G., Voulgaropoulos A.: *Electroanalysis* 5, 355 (1993).
- Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. Wiley – VCH, New York 1994.
- Tomschik M., Havran L., Paleček E., Heyrovský M.: *Electroanalysis* 12, 274 (2000).
- Wang J., Tian B., Wang J., Lu J., Olsen C., Yarnitzky Ch., Olsen K., Hammerstrom D., Bennett W.: *Anal. Chim. Acta* 385, 429 (1999).
- Kalvoda R., Kopanica M.: *Pure Appl. Chem.* 112, 97 (1982).
- Štulík K., Kalvoda R. (ed.): *Electrochemistry for Environmental Protection*. UNESCO-ROSTE, Venice 1996.
- Barek J., Mejstřík V., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30, 37 (1999).
- Barek J., Muck A., Quaiserová V., Zima J.: *Electroanalysis*, v tisku.
- Zima J., Barek J., Moreira J. C., Mejstřík V.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29, 125 (1999).
- Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 621 (1998).

**R. Kalvoda<sup>a</sup>, J. Barek<sup>b</sup>, and M. Dřevínek<sup>a</sup>** (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, <sup>a</sup>Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Adsorptive Stripping Methods in Electroanalysis – Database of Applications**

Electrochemical adsorptive stripping methods are critically discussed from the point of view of their applications in trace analysis. A database of published papers in this field is described, which is available in Microsoft Access format from the authors by e-mail or as supplemental material at the URL [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/download/adsvi.zip](http://staff.vscht.cz/chem_listy/download/adsvi.zip).

# SEPARÁCIA ENANTIOMÉROV PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU NA CYKLODEXTRÍNOVÝCH STACIONÁRNYCH FÁZACH

IVAN ŠPÁNIK a JÁN KRUPČÍK

*Katedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: spanik@cvt.stuba.sk*

Došlo dňa 21.I.2000

Kľúčové slová:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyklodextríny, plynová chromatografia, separácia enantiomérov, stacionárne fázy

## Obsah

1. Úvod
2. Zloženie zmesnej stacionárnej fázy
  - 2.1. Obsah modifikovaného cyklodextrínu v zmesných fázach
  - 2.2. Typ cyklodextrínu
  - 2.3. Polarita polysiloxánového rozpúšťadla
  - 2.4. Typ a poloha substituentov v cyklodextrínových derivátoch
    - 2.4.1. Charakter substituenta v polohe 3
    - 2.4.2. Charakter substituenta v polohe 6
    - 2.4.3. Charakter substituenta v polohe 2
3. Pracovné podmienky a štruktúra analytu
  - 3.1. Charakteristiky kolóny a mobilnej fázy
  - 3.2. Pracovné podmienky
  - 3.3. Štruktúra analytu
4. Záver

## 1. Úvod

Kapilárna plynová chromatografia (CGC) patrí medzi najvýznamnejšie metódy analýzy opticky aktívnych organických látok. K výhodám tejto metódy patrí značná separačná účinnosť, rozlišovacia schopnosť, reprodukovateľnosť údajov a práca s malými množstvami vzoriek.

Pri priamej separácii enantiomérov metódou CGC sa dosiahol značný pokrok najmä po zavedení modifikovaných cyklodextrínov ako stacionárnych fáz<sup>1-4</sup>. Cyklodextríny sú cyklické glukózové oligoméry so 6, 7 alebo 8 glukózovými jednotkami, ktoré sa vyrábajú enzymatickým štiepením škrobu cyklodextrín-glukanoyl transferázou, alebo synteticky<sup>2</sup>. Natívne cyklodextríny ako stacionárne fázy v plynovej chromatografii vykazujú nízke separačné účinnosti bez ohľadu na to, či sa používajú ako tuhé fázy v chromatografii plyn–tuhá fáza, alebo ako roztoky v chromatografii plyn–kvapalina<sup>2</sup>. Separačné účinnosti kolón sa podstatne zvýšia, ak sa ako stacionárne fázy použijú deriváty cyklodextrínov (modifikované cyklodextríny)<sup>1-4</sup>. Na obr. 1 je schéma glukopyranózovej stavebnej jednotky s označením uhlíkových atómov a substi-

tuentov, ktorých charakter rozhoduje o vlastnostiach modifikovaných cyklodextrínov.

V súčasnosti sa na separáciu rôznych typov organických enantiomérov využívajú najmä kremenné kapilárne kolóny zmočené s rôzne modifikovanými  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrínovými stacionárnymi fázami<sup>1-4</sup>. Enantioselektivita cyklodextrínových fáz je na rozdiel od iných opticky aktívnych stacionárnych fáz univerzálna a vhodná na separáciu rozmanitých typov organických opticky aktívnych zlúčenín<sup>1-4</sup>.

Na prípravu kolón s cyklodextrínovými stacionárnymi fázami možno využiť čistý derivát cyklodextrínu, alebo jeho roztok vo vhodnom rozpúšťadle. Medzi najčastejšie používané rozpúšťadlá pre modifikované cyklodextríny patria polymérne siloxány, napríklad OV-1701 (cit.<sup>2</sup>). Kolóny pripravené s takýmito zmesnými fázami vykazujú veľmi dobré separačné vlastnosti, ich enantioselektivita je však v dôsledku zriedenia chirálnej časti stacionárnej fázy nižšia ako enantioselektivita kolón s čistou opticky aktívnou fázou.

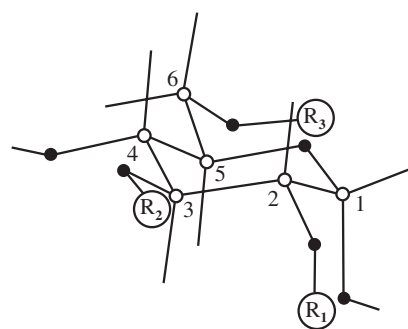
Enantiométna selektivita zmesnej stacionárnej fázy závisí od typu cyklodextrínu, povahy substituentov a ich polohy v molekule cyklodextrínu a pri zmesných fázach aj od obsahu cyklodextrínového derivátu a polaritu polysiloxánu.

V predchádzajúcej práci sme zhrnuli základné poznatky o využití cyklodextrínov ako stacionárnych fáz na separáciu enantiomérov organických opticky aktívnych zlúčenín kapilárnou plynovou chromatografiou<sup>1</sup>. V tejto práci sa hodnotia základné parametre, ktoré ovplyvňujú plynovo-chromatografickú separáciu enantiomérov opticky aktívnych zlúčenín v kapilárnych kolónach zmočených roztokmi modifikovaných cyklodextrínov rozpustených v nechirálnom polysiloxáne.

## 2. Zloženie zmesnej stacionárnej fázy

### 2.1. Obsah modifikovaného cyklodextrínu v zmesných fázach

Vlastnosti chirálnej stacionárnej fázy závisia od viacerých faktorov. Medzi základné patrí typ cyklodextrínového derivá-



Obr. 1. Schéma glukopyranózovej stavebnej jednotky cyklodextrínov. Glukopyranózy v molekulách cyklodextrínu sú spojené cez atómy kyslíka viazané na 1 a 4 uhlíkovom atóme; ● – atómy kyslíka, ○ – atómy uhlíka, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> a R<sub>3</sub> – substituenty. Vodíkové atómy nie sú označené

tu a jeho obsah v polysiloxánovom rozpúšťadle. So vzrastajúcim obsahom chirálneho selektora v stacionárnej fáze vzrastá enantioselektivita kolóny. Pre kolóny so zmesnými fázami v ktorých sa ako chirálny selektor používa tuhý (kryštalický) cyklodextrín sa však zistilo, že enantioselektivita takýchto zmesných fáz vzrastá s obsahom cyklodextrínového derivátu v polysiloxáne len po určitú hranicu<sup>5-8</sup>. Táto hraničná koncentrácia sa pohybuje od 15 % do 50 % v závislosti od typu polysiloxánu a cyklodextrínového derivátu<sup>5,9</sup>. Na obr. 2 je uvedená závislosť selektívneho faktora ( $\alpha$ ) od obsahu oktakis(2,6-di-*O*-pentyl-3-*O*-butyryl)- $\gamma$ -CD (%w) v polysiloxáne OV-1701 nameraná pre enantioméry gáfru pri 80 °C. Navyše sa zistilo, že s rastúcim obsahom kryštalického cyklodextrínového derivátu v zmesných fázach klesá účinnosť kapilárnych kolón. Ak obsah cyklodextrínového derivátu vzrastie nad určitú hodnotu, kolóna stráca tak separačnú účinnosť ako aj enantioselektivitu. Takáto stacionárna fáza sa stáva nehomogénnou a cyklodextrínový derivát sa zo zmesnej fázy vylučuje<sup>8</sup>. Tak napríklad enantioméry pinénu sa separovali na stacionárnej fáze s obsahom 10 % permetyl- $\beta$ -CD. Na stacionárnej fáze s obsahom 30 % permetyl- $\beta$ -CD sa tieto enantioméry už nepodarilo rozlíšiť<sup>10</sup>. S rastúcim obsahom cyklodextrínu v zmesnej fáze vzrastá aj čas potrebný na separáciu. Obsah kryštalického cyklodextrínového derivátu determinuje navyše aj minimálnu teplotu, pri ktorej ešte stacionárna fáza poskytuje symetrické píky. S rastúcim obsahom cyklodextrínu, vzrastá aj táto minimálna teplota. Tak napríklad enantioméry niektorých diolov sa separujú iba na zmesných stacionárnych fázach, nie však v kolónach s čistým tuhým cyklodextrínovým derivátom<sup>11</sup>. Vzťah medzi obsahom kryštalického cyklodextrínu a enantioselektivitou zmesnej stacionárnej fázy sa sledoval pri rôznych teplotách. Vant' Hoffove závislosti ( $\ln \alpha$  od  $1/T$ ) pre jednotlivé kolóny boli priamkové s rôznymi smernicami, ktoré sa pretínali pri určitej teplote. Nad touto teplotou sa enantioméry separovali v kolónach s vyšším obsahom cyklodextrínového derivátu a pod touto teplotou sa separácia enantiomérov dosiahla v kolónach s nižším obsahom cyklodextrínového derivátu<sup>12</sup>. Bicchi so spol. študoval vplyv obsahu heptakis(2,6-di-*O*-acetyl-6-*O*-*terc*-butyl-dimetylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrínu v OV-1701 na elučné poradie enantiomérov mentolu a izomentolu. Z kolóny, ktorá obsahovala 50 % cyklodextrínového derivátu eluovali enantioméry v obrátenom elučnom poradí, ako z kolóny v ktorej bol 10%-ný obsah cyklodextrínového derivátu. Z kolóny s 30 % obsahom cyklodextrínového derivátu eluovali študované enantioméry nerozlíšené<sup>13</sup>.

## 2.2. Typ cyklodextrínu

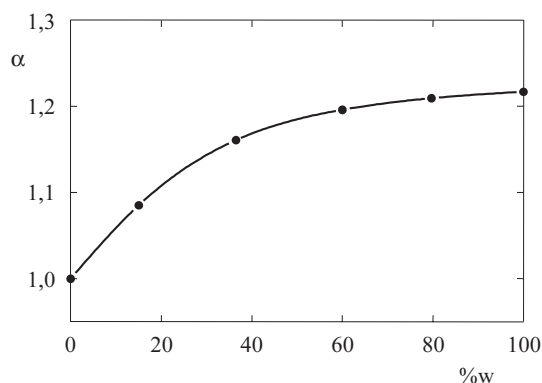
V súčasnosti sa nedarí predpovedať ako ovplyvňuje typ cyklodextrínového selektora ( $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD) enantioselektivitu stacionárnej fázy. Enantioméry niektorých zlúčenín vyžadujú pri separácii definovanú veľkosť dutiny a iné sa separujú nezávisle od použitého typu cyklodextrínu. Spočiatku sa predpokladalo, že základom rozlíšenia enantiomérov na cyklodextrínových fázach je tvorba inklúzných komplexov a preto na separáciu enantiomérov objemných analytov sa vyžadovali väčšie dutiny ( $\beta$ - resp.  $\gamma$ -CD) a na separáciu enantiomérov malých molekúl menšie dutiny ( $\alpha$ , resp.  $\beta$ -CD). V rozpore s týmto predpokladom sa však darilo separovať objemné molekuly  $\delta$ -laktónov na  $\alpha$ -CD (cit.<sup>14</sup>) a malé molekuly alifatických uhľovodíkov na  $\gamma$ -CD (cit.<sup>2,15</sup>). V niektorých prípadoch, sa

zmenou veľkosti cyklodextrínovej dutiny dosiahlo obrátené elučné poradie enantiomérov<sup>15</sup>. Tak napríklad Kobor so spol.<sup>16</sup>, získali na rovnakých derivátoch  $\alpha$ -CD na  $\beta$ -CD obrátené elučné poradie enantiomérov fenyletanolu. Obrátené elučné poradie je zrejme aj z obr. 3 na ktorom je chromatogram separácie enantiomérov *O*-metyl-*N*-trifluoroacetyl valínu v kapilárnej kolóne so zmesnou fázou {heptakis(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\beta$ -CD rozpustený v polysiloxáne OV-1701 v hmotnostnom pomere 3:7} (A) a {oktakis(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\gamma$ -CD rozpustený v polysiloxáne OV-1701 v hmotnostnom pomere 3:7} (B) pri 70 °C.

Obrátenie elučného poradia enantiomérov sa pozorovalo separáciou opticky aktívnych zlúčenín na rovnako substituovaných CD selektoroch s párnym a nepárnym počtom glukopyranózových jednotiek ( $\alpha$ - a  $\beta$ -CD, resp.  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD). Zmena elučného poradia enantiomérov sa doteraz nepozorovala pri separácii enantiomérov na rovnako substituovaných CD selektoroch s párnym počtom glukopyranózových jednotiek<sup>17</sup> ( $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD).

## 2.3. Polarita polysiloxánového rozpúšťadla

Pretože cyklodextrínové deriváty v závislosti od charakteru substituentov vykazujú rôznu polaritu, na prípravu zmesných fáz sa používajú polysiloxány s rozdielnou polaritou. Pre polárne deriváty cyklodextrínov sa ako rozpúšťadlá odporúčajú polárne polysiloxány v ktorých sa tieto cyklodextrínové deriváty lepšie rozpúšťajú, čo umožňuje zvýšiť ich obsah v zmesných stacionárnych fázach. Zvýšením obsahu chirálneho selektora v zmesných stacionárnych fázach sa vo všeobecnosti zvýši enantioselektivita kolóny. Polárne interakcie polysiloxánov a cyklodextrínových selektorov však môžu aj zhoršiť enantioselektivitu zmesnej stacionárnej fázy<sup>18</sup>. Ak sa na prípravu zmesných fáz použijú polárne polysiloxány, vplyvom polárnych interakcií vzrastá retencia enantiomérov polárnych zlúčenín, čo pri danej teplote predlžuje čas analýzy. Preto je výhodnejšie aj pre polárne cyklodextrínové deriváty používať ako rozpúšťadlá stredne polárne polysiloxány. Okrem skrátenia analýzy sa na týchto zmesných fázach spravidla zlepši aj tvar píkov<sup>8</sup>. Pre stredne polárne cyklodextrínové deriváty sa na prípravu zmesných fáz odporúča používať ako rozpúšťadlá stredne polárne, alebo nepolárne polysiloxány. Pretože rozpustnosť cyklodextrínových derivátov v nepolárnych polysi-



Obr. 2. Závislosť selektívneho faktora ( $\alpha$ ) od obsahu oktakis(2,6-di-*O*-pentyl-3-*O*-butyryl)- $\gamma$ -CD (%w) v polysiloxáne OV-1701 nameraná pre enantioméry gáfru pri 80 °C

loxánoch je obmedzená, na prípravu zmesných fáz s týmito polysiloxánmi sa používajú nižšie obsahy cyklodextrínových derivátov, alebo sa separácia uskutoční pri vyššej teplote<sup>16</sup>. Zistilo sa, že závislosť enantioselektivity niektorých zmesných fáz od polarít použitého polysiloxánu je zložitá, pretože selektívny faktor  $\alpha$  pre enantioméry niektorých opticky aktívnych zlúčenín sa so vzrastajúcou polaritou polysiloxánu zvyšuje a pre iné znižuje. Znížením polarít polysiloxánu v zmesných fázach, sa väčšinou zníži retencia enantiomérov, čo umožňuje ich separovať pri nižších teplotách, a tým zvýšiť enantioselektivitu zmesnej fázy (zvýšiť hodnoty selektívnych koeficientov  $\alpha$ ). Pre enantioméry niektorých analytov sa však znížením separačnej teploty enantioselektivita zmesnej fázy zhorší<sup>19</sup>. Použitím stredne polárnych polysiloxánov na výrobu zmesných fáz sa podarilo rozdeliť enantioméry niektorých zlúčenín, ktoré sa neseperovali na zmesných fázach s polárnym polysiloxánom<sup>20</sup>. Štúdiom teplotných závislostí (napríklad  $\ln \alpha$  od  $1/T$ ) enantiomérov separovaných v kolónach v ktorých sa na prípravu zmesných fáz použili rôzne polárne polysiloxány sa zistilo, že zmenou polarít polysiloxánu sa menia aj smernice čiar. Závislosti sú priamkové a pretínajú sa pri určitých teplotách<sup>12</sup>.

## 2.4. Typ a poloha substituentov v cyklodextrínových derivátoch

### 2.4.1. Charakter substituenta v polohe 3

Substitúcia vodíkových atómov v hydroxylovej skupine viazanej na uhlíkovom atóme v polohe 3 rôznymi substituentami sa študovala najčastejšie, pretože charakter substituenta v tejto polohe podstatne ovplyvňuje enantioselektivitu cyklodextrínového selektora. Substituent v polohe 3 je takmer rovnobežný s osou cyklodextrínového torusu<sup>21</sup>. Charakter tohto substituenta výrazne ovplyvňuje konformáciu cyklodextrínu a navyše, interakcie enantiomérov s týmto substituentom sú rozhodujúce v prípadoch v ktorých separácia enantiomérov závisí od inklúzie analytu do dutiny cyklodextrínového derivátu. Voľbou tohto substituenta, možno voliť interakcie, ktoré ovplyvňujú separáciu enantiomérov. Tak napríklad acylová skupina umožňuje elektrón donor-akceptorové interakcie<sup>22–24</sup>, alkylová skupina van der Waalsove interakcie<sup>24</sup> a karbamátová skupina interakcie vodíkových väzieb<sup>25</sup>. Pri výbere tohto substituenta sa zohľadňuje všeobecne akceptovaný poznatok, že polárne zlúčeniny sa lepšie separujú na polárnych derivátoch, napriek tomu, že enantioméry niektorých polárnych zlúčenín sa lepšie separovali na derivátoch cyklodextrínov s alkylovou skupinou v polohe 3 (cit.<sup>26,27</sup>) a enantioméry niektorých nepolárnych analytov sa lepšie separovali na derivátoch cyklodextrínov, ktoré mali v polohe 3 polárnu funkčnú skupinu.

### 2.4.2. Charakter substituenta v polohe 6

Za predpokladu, že separácia enantiomérov vyžaduje inklúziu do dutiny cyklodextrínu a ostatné funkčné skupiny analytu interagujú na povrchu cyklodextrínu so substituentami v polohe 2 a 3, substituent v polohe 6 sa bezprostredne nezúčastňuje enantioselektívnych interakcií. Charakter tohto substituenta však výrazne ovplyvňuje tvar cyklodextrínového konusu a tým inklúziu analytu do dutiny. Substitúciou vodíkového atómu v OH skupine viazanej na 6 uhlíkovom ató-

me tercbutyldimetylsilylovou (TBDMS) skupinou sa výrazne zmení konformácia cyklodextrínu, čo prispieva k enantioselektívite takýchto derivátov<sup>28,29</sup>. Nahradením TBDMS skupiny acetylovou skupinou sa konformácia cyklodextrínu výrazne nezmení, enantioselektivita získanej fázy sa však zmenší. Pokles enantioselektivity týchto fáz sa vysvetľuje interakciami acetylovej skupiny s ostatnými substituentami cyklodextrínového derivátu, čo znižuje flexibilitu tohoto derivátu. Kim so spol.<sup>30</sup> zistili, že enantioselektivitu cyklodextrínových derivátov ovplyvňuje aj hydrofóbnosť substituenta v polohe 6.

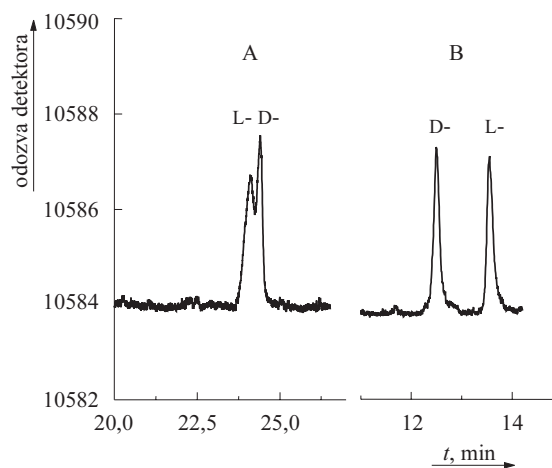
### 2.4.3. Charakter substituenta v polohe 2

V prípadoch, v ktorých separácia enantiomérov vyžaduje tvorbu inklúzných komplexov, substituent v polohe 2 ovplyvňuje separáciu enantiomérov menej významne, ako substituent v polohách 3 a 6. Keďže substituent v polohe 2 smeruje von z dutiny, neovplyvňuje významne tvar cyklodextrínovej dutiny a inklúziu analytu. V prípade, že separácia enantiomérov závisí od interakcií na povrchu cyklodextrínového derivátu, substituent v polohe 2 však môže separáciu enantiomérov výrazne ovplyvniť.

## 3. Pracovné podmienky a štruktúra analytu

### 3.1. Charakteristiky kolóny a mobilnej fázy

Parametre kolóny a vlastnosti mobilnej fázy ovplyvňujú enantioméru separáciu v podstatne menšej miere ako vlastnosti stacionárnej fázy. Separáciu enantiomérov ovplyvňuje dĺžka kolóny, hrúbka filmu stacionárnej fázy a vnútorný priemer kapiláry. Pre kolóny s dĺžkou (10 m až 25 m) sa zistilo, že dĺžka prakticky neovplyvňuje hodnoty selektívneho faktora  $\alpha$  (cit.<sup>31</sup>). Ak je hodnota selektívneho faktora dostatočne veľká, na separáciu spravidla postačujú krátke kolóny (60 cm



Obr. 3. Plynovochromatografická separácia enantiomérov *O*-metyl-*N*-trifluoroacetyl valínu v kapilárnej kolóne so zmesnou fázou {heptakis(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\beta$ -CD rozpustený v polysiloxáne OV-1701 v hmotnostnom pomere 3:7} (A) a {oktakis(2,6-di-*O*-metyl-3-*O*-pentyl)- $\gamma$ -CD rozpustený v polysiloxáne OV-1701 v hmotnostnom pomere 3:7} (B) pri 70 °C



až 5 m)<sup>32</sup>. Separáciu enantiomérov v kratších kolónach navyše možno realizovať pri nižších teplotách, čo je výhodné, pretože enantioselektivita chirálneho selektora spravidla s klesajúcou teplotou separácie vzrastá. Enantioméry niektorých zlúčenín je preto výhodné separovať v kratších kolónach, pretože požadovaná separácia v dlhších kolónach by sa dosiahla za veľmi dlhý čas. Kratšie kolóny však možno využiť výhodne najmä na separáciu enantiomérov zlúčenín s nižšou prchavosťou a ak ich netreba separovať vo veľmi komplikovaných matriciach, pretože skrátením kolóny sa znižuje aj jej separačná účinnosť<sup>5</sup>. Hrúbka filmu stacionárnej fázy významne neovplyvňuje enantioméru separáciu. S rastúcou hrúbkou filmu stacionárnej fázy v kolóne však vzrastá retencia, spravidla bez výraznej zmeny selektivity, napriek tomu, že sa pozoroval aj pokles enantioselektivity v kolónach s hrubším filmom stacionárnej fázy<sup>31</sup>. Priemer kolóny prakticky neovplyvňuje enantioselektivitu separačného procesu. Použitie kolón s väčším priemerom však umožňuje dávkovať väčšie množstvá.

Mobilná fáza ovplyvňuje enantioméru separáciu najmä prostredníctvom rýchlosti, ktorou prúdi v kolóne. Pri hodnotení vplyvu rýchlosti nosného plynu na enantioselektivitu stacionárnej fázy boli publikované protichodné výsledky. Zatiaľ čo Hardt so spol. zistili, že hodnota selektívneho faktora sa so zmenou prietoku mobilnej fázy v kolóne nemení<sup>5</sup>, Grob so spol. zistili, že zvyšovaním prietoku nosného plynu sa separácia enantiomérov obsahujúcich hydroxylovú skupinu zhorší, ale pre zlúčeniny s inými funkčnými skupinami obsahujúcich atóm kyslíka sa zlepši<sup>33</sup>. Podobné výsledky sa dosiahli pre všetky najčastejšie používané mobilné fázy v plynovej chromatografii (H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub>)<sup>33</sup>. Z týchto výsledkov sa usudzuje, že vplyv rýchlosti prietoku mobilnej fázy kolónou na separáciu enantiomérov závisí aj od štruktúry analytu. Použitie NH<sub>3</sub> ako mobilnej fázy síce nezlepšilo enantioméru separáciu, avšak v porovnaní s ostatnými nosnými plynmi sa výrazne zlepšila symetria píkov opticky aktívnych zlúčenín, ktoré obsahovali NH<sub>2</sub> skupiny a navyše sa znížila medza detekcie<sup>34</sup>.

### 3.2. Pracovné podmienky

Z pracovných podmienok, ktoré sa nastavujú v plynovej chromatografii, separáciu enantiomérov ovplyvňuje najmä teplota kolóny, spôsob a teplota kondicionovania kolóny a čas skladovania kolóny. Znižovaním teploty sa spravidla hodnota selektívneho koeficienta  $\alpha$  uvažovaných enantiomérov zvyšuje, preto sa na separáciu používa najnižšia teplota, pri ktorej sa ešte akceptuje čas separácie. Minimálna teplota separácie sa volí s ohľadom na charakter cyklodextrínového derivátu, charakter polysiloxánu a parametre kolóny. Vo všeobecnosti platí, že zmesné fázy s nepolárnym polysiloxánom možno používať pri nižších teplotách ako fázy pre ktoré sa použil polárny polysiloxán. Preto sa na prípravu zmesných fáz odporúča rozpúšťať cyklodextrínové deriváty v najmenej polárnych polysiloxánoch, v ktorých sa ešte rozpustí požadovaný obsah cyklodextrínového derivátu. Teplota kondicionovania kolóny ovplyvňuje separáciu enantiomérov iba v tých prípadoch v ktorých sa na prípravu stacionárnej fázy použije tuhý cyklodextrínový derivát. Takéto kolóny treba kondicionovať pri teplotách vyšších, ako je teplota topenia cyklodextrínového derivátu<sup>10,35</sup>. Skladovaním kolón s cyklodextrínovými stacionárnymi fázami rozpustenými v polysiloxánoch sa stráca ich

enantioselektivita. Pravdepodobným dôvodom straty enantioselektivity sú zmeny fyzikálnej modifikácie cyklodextrínového derivátu v roztoku, alebo jeho rekryštalizácia. U niektorých derivátov sa zistila strata enantioselektivity po skladovaní dlhšom ako 2 mesiace. U niektorých cyklodextrínových derivátov strata enantioselektivity vplyvom skladovania bola len dočasná a rekondicionáciou kolóny sa ju podarilo obnoviť<sup>36</sup>.

### 3.3. Štruktúra analytu

Medzi významné parametre, od ktorých závisí enantioselektivita chirálneho selektora patrí charakter, konfigurácia a konformácia opticky aktívnych zlúčenín. Medzi najdôležitejšie fyzikálne parametre analytov patrí ich prchavosť, pretože od nej závisí teplota separácie a tým nepriamo aj hodnota selektívneho faktora  $\alpha$  (cit.<sup>37</sup>). Veľmi prchavé analyty treba separovať pri nízkych teplotách. Z neprchavých analytov treba pripraviť také deriváty aby ich enantioméry bolo možno separovať pri teplotách, pri ktorých je cyklodextrínový selektor stály. Separácia enantiomérov závisí aj od konfigurácie a konformácie opticky aktívnych zlúčenín a od charakteru funkčných skupín<sup>38,39</sup>. Pretože mechanizmus separácie enantiomérov na cyklodextrínových stacionárnych fázach nie je známy, v súčasnosti prakticky nemožno predpovedať typ stacionárnej fázy, ktorú by bolo vhodné použiť na enantioméru separáciu daných opticky aktívnych zlúčenín. Vhodné stacionárne fázy sa hľadajú skusmo postupmi, ktoré sú známe ako „metódy pokusu a omylu“.

## 4. Záver

V článku sú zhrnuté poznatky o základných parametroch, ktoré ovplyvňujú plynovo-chromatografickú separáciu enantiomérov organických opticky aktívnych zlúčenín v kapilárnych kolónach zmočených s derivátmi  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrínov. Z článku vyplýva, že medzi základné parametre, ktoré ovplyvňujú enantioselektivitu stacionárnych CD fáz patrí typ cyklodextrínu, charakter substituentov a ich poloha v glukopyranózovej jednotke cyklodextrínu. Kvapalnú CD deriváty možno použiť ako stacionárne fázy bezprostredne. Z tuhých (kryštalických) derivátov sa vyrábajú zmesné stacionárne fázy (roztoky CD derivátov vo vhodnom polysiloxánovom polyméru). Zistilo sa, že enantioselektivita zmesných stacionárnych fáz závisí tak od obsahu CD derivátu v tomto roztoku ako aj od polarítivity polysiloxánového rozpúšťača. Z experimentálnych podmienok ovplyvňuje enantioselektivitu najmä teplota kolóny, podmienky pri tepelnom formovaní kolóny a čas skladovania kolóny.

## LITERATÚRA

1. Špánik I., Krupčík J.: Chem. Listy 94, 10 (2000).
2. König W. A.: *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*. Hüthig Buch Verlag, Heidelberg 1992.
3. König W. A.: Trends Anal. Chem. 12, 130 (1993).
4. Schurig V., Nowotny H. P.: Angew. Chemie 102, 969 (1990).
5. Jung M., Schmalzing D., Schurig V.: J. Chromatogr. 552, 43 (1991).

6. Hardt I., König W. A.: *J. Microcolumn. Sep.* 5, 35 (1993).
7. Jung M., Schurig V.: *J. Microcolumn. Sep.* 5, 11 (1993).
8. Francotte E., Grolimund K., Juvancz Z.: *Chirality* 5, 232 (1993).
9. Schurig V.: *J. Chromatogr. A* 666, 111 (1994).
10. Bicchi C., Artuffo G., D'Amato A., Nano G. N., Galli A., Galli M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 301 (1991).
11. Juvancz Z., Peterson P.: *J. Microcolumn. Sep.* 8, 99 (1996).
12. Dietrich A., Maas B., Mosandl A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 18, 152 (1995).
13. Bicchi C., D'Amato A., Manzin V., Galli A., Galli M.: *J. Microcolumn. Sep.* 7, 327 (1995).
14. Schmarr H. G., Mosandl A., Kaunzinger A.: *J. Microcolumn. Sep.* 3, 391 (1991).
15. König W. A., Icheln D., Runge T., Pffor I., Krebs A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 702 (1990).
16. Kobor F., Schomburg G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 693 (1993).
17. Armstrong D. W., Li W., Pitha J.: *Anal. Chem.* 162, 214 (1990).
18. Dietrich A., Maas B., Mosandl A.: *J. Microcolumn. Sep.* 6, 33 (1994).
19. Bicchi C., Artuffo G., D'Amato A., Manzin V., Galli A., Galli M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 209 (1993).
20. Dietrich S., Maas B., Brand G., Karl V., Kaunzinger A., Mosandl A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 769 (1992).
21. Harata K., Uemura K., Otagiri M., Hirayama F.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60, 437 (1987).
22. Jung M., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 289 (1993).
23. König W. A., Krebber R., Mischick P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 12, 732 (1989).
24. König W. A.: *Carbohydr. Res.* 192, 51 (1989).
25. Takeichi T., Toriyama H., Shimura S., Takayama Y., Morikawa M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 18, 179 (1995).
26. König W. A., Gehrcke B.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 175 (1993).
27. König W. A., Lutz S., Evers P., Knabe J.: *J. Chromatogr.* 503, 256 (1990).
28. Dietrich A., Maas B., Karl V., Kreis P., Lehmann D., Weber B., Mosandl A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 176 (1992).
29. Dietrich A., Maas B., Messer W., Bruche G., Karl V., Kaunzinger A., Mosandl A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 530 (1992).
30. Kim B. E., Lee K. P., Park K. S., Lee S. H., Park J. H.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 20, 437 (1997).
31. Bicchi C., Artuffo G., D'Amato A., Galli A., Galli M.: *Chirality* 4, 125 (1992).
32. Lindström M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 765 (1991).
33. Grob K., Neukom H. P., Schmarr H. G., Mosandl A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 433 (1990).
34. Gyllenhaal O., Gustavson K., Vessman J.: *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Symposium on Capillary Gas Chromatography* (Sandra P., ed.), str. 311. Huethig, Heidelberg 1993.
35. Venema A., Tolsma P. J. A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 12, 32 (1989).
36. Bicchi C., Artuffo G., D'Amato A., Galli A., Galli M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 655 (1992).
37. Benická E., Krupčík J., Špánik I., Hrouzek J., Sandra P.: *J. Microcolumn. Sep.* 8, 57 (1996).
38. Jaques K., Pottie M., van der Eyecken J., van der Walle M., Venema A., Sandra P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 703 (1993).
39. Jaques K., Buda W. M., Venema A., Sandra P.: *J. Microcolumn. Sep.* 7, 145 (1995).

**I. Špánik and J. Krupčík** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Stationary Phases**

The review describes main factors influencing direct gas chromatographic separation of enantiomers in capillary columns coated with cyclodextrin stationary phases. It has been shown that the type of cyclodextrin ( $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -CD), the nature and positions of substituents in CD derivatives, polarity of the polysiloxane used in mixed stationary phases and separation temperature are the main factors influencing separation of enantiomers of optically active compounds. Column characteristics, the carrier gas, conditioning and storage of columns are secondary parameters influencing the enantioselective separation procedure.

# PSYCHROFILNÍ A PSYCHROTROFNÍ MIKROORGANISMY, JEJICH ADAPTACE A VYUŽITÍ V MODERNÍCH BIOTECHNOLOGIÍCH

MICHAL STIBOR a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
e-mail: Michal.Stibor@vscht

Došlo dne 17.II.2000

Klíčová slova: psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy, biotechnologie

## Obsah

1. Úvod
2. Výskyt a definice psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů
  - 2.1. Potraviný
  - 2.2. Pozemní a vodní ekosystémy
3. Izolace psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů
4. Molekulární adaptace
  - 4.1. Struktura proteinů
  - 4.2. Membránové lipidy
5. Genetika psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů
6. Biotechnologické aplikace

## 1. Úvod

Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy žijí v polárních, alpských, hlubokomořských nebo jiných oblastech, kde se teplota pohybuje pod 5 °C. Tyto chladově adaptované mikroorganismy si v průběhu evoluce vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožnily existenci za nízkých teplot. Adaptační změny těchto mikroorganismů zahrnují jak změny ve struktuře proteinů (enzymy) tak změny ve složení lipidů tvořících buněčné membrány. Strukturální změny proteinů mají na rozdíl od lipidových, které mají genotypový i fenotypový charakter, pouze genotypový charakter. Enzymy, které jsou produkovány psychrotrofními a psychrofilními mikroorganismy jsou schopny katalyzovat reakce při teplotách blízkých 0 °C. Tyto enzymy jsou charakterizovány vysokou katalytickou aktivitou při nízkých teplotách, ale jsou teplotně labilní. Vzhledem k jejich vysoké specifické aktivitě a jejich rychlé inaktivaci při teplotách, kdy jsou enzymy z mesofilních mikroorganismů běžně aktivní, mají společně s jejich producenty velký biotechnologický potenciál. Studie srovnávající strukturu těchto enzymů s jejich mesofilními a termofilními analogy ukázaly, že molekulární podstata jejich adaptace na teploty blízké 0 °C je z největší části způsobena snahou zachovat flexibilitu jejich struktury. Ta u dosud studovaných enzymů vychází z oslabení intramolekulárních interakcí a naopak ze zesílení interakcí s rozpouštědlem. Tyto modifikace jsou však doprovázeny malou stabilitou za vyšších teplot, což je cena za jejich vysokou

aktivitu při teplotách, které jsou obecně považovány za nízké. Výše zmíněné vlastnosti umožňují jejich použití v biotechnologiích, a to především tam, kde jsou běžné teploty nežádoucí (potravinářský průmysl) a kde nízké provozní teploty znamenají snížení nákladů a také snížené riziko běžné kontaminace. Ze složek membránových lipidů jsou to hlavně mastné kyseliny, které se největší měrou podílejí na zachování fluidity buněčné membrány. A právě nenasyčené mastné kyseliny našly uplatnění v potravinářském průmyslu a jsou dosud jediným známým příkladem sloučenin nebílkovinového původu z chladově adaptovaných mikroorganismů s přímou aplikací. Nové poznatky studia molekulární genetiky chladově adaptovaných mikroorganismů umožnily vedle přímého využití těchto mikroorganismů v moderních biotechnologiích i využití některých jejich buněčných produktů.

## 2. Výskyt a definice psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů

Velká část naší planety nedosahuje ani teploty 5 °C, což je teplota při níž člověk pocituje chlad. Je třeba si uvědomit, že tři čtvrtiny Země pokrývají oceány, v jejichž hlubinách je teplota nízká a celý jeden světadíl, Antarktida, má chladné prostředí v průběhu celého roku. Mikroorganismy schopné růst za nízkých teplot jsou známy již více než 100 let a to jak v přírodních podmínkách (moře, půda) tak v prostředí vytvořeném člověkem (potraviný). Z hlediska zařazení těchto mikroorganismů již v roce 1902 Schmidt-Nielsen<sup>1</sup> použil termín psychrofil a to pro bakterie schopné růst při 0 °C. O rok později Muller argumentoval, že mnoho bakterií rostoucích při 0 °C má optimální teplotu růstu v rozmezí 20–30 °C, tj. v oblasti, kde běžně rostou mesofilní mikroorganismy a navrhl pro tyto mikroorganismy označení psychrotolerantní<sup>2</sup>. I přesto, že se v průběhu let definice psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů několikrát změnila, v současnosti je obecně uznávána definice popsaná Moritou<sup>3</sup>, který v roce 1975 popsal chladově adaptované mikroorganismy pomocí jejich minimálních, optimálních a maximálních růstových teplot. Tak pro psychrofilní mikroorganismus je minimální, optimální a maximální teplota <0, <15 a <20 °C. Na druhou stranu mikroorganismy, které mají tyto růstové teploty 0–5, >15, >20 °C jsou nazývány psychrotrofními. V některé literatuře je pro tuto skupinu mikroorganismů dosud používán termín psychrotolerantní<sup>4</sup> a pro úplnost je třeba zmínit, že před Moritovou definicí byl také pro tyto mikroorganismy používán termín fakultativně psychrofilní<sup>5</sup>. Přes jasnou a přesnou definici nelze však předpokládat, že všechny mikroorganismy bez zbytku zapadají do jedné ze dvou skupin. Psychrofilní mikroorganismy rostou, na rozdíl od psychrotrofních, v užším rozmezí teplot a jsou nejčastěji izolovány ze stále chladných oblastí i když nepředstavují dominantní typy<sup>6</sup>. Pravděpodobně i v těchto oblastech mají psychrotrofní kmeny určité výhody jako je například dostupnost živin. Výjimkou je tající led u břehů Antarktidy, kde řada studií ukázala, že hlavní skupinou mikroorganismů jsou psychrofilní<sup>7</sup>. Přestože je schopnost růst za

nízkých teplot široce rozšířená mezi mikrobiální florou a zahrnuje všechny jejich hlavní skupiny (bakterie, kvasinky, řasy, houby, plísňe), v poslední době byla věnována největší pozornost bakteriím. Dosud není znám jediný zástupce archaeobakterií s touto vlastností, ale je jen otázka času, kdy i v této skupině mikroorganismů bude izolován psychrofilní nebo psychrotolerantní druh. Zdá se pravděpodobné, že podobně jako schopnost fotosyntetizovat, byla schopnost růst při nízkých teplotách získávána v průběhu evoluce a řada mikroorganismů reprezentující široké spektrum taxonomicky odlišných druhů si tuto vlastnost postupně osvojovala. Obecně lze však říct, že psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy se vyskytují ve dvou prostředích, v potravinách skladovaných za nízkých teplot a v chladných pozemních a vodních prostředích.

### 2.1. Potraviny

Běžným způsobem jak prodloužit skladovací dobu čerstvých nebo částečně konzervovaných potravin je použití snížení teploty<sup>8</sup>. Takto uměle vytvořené, energeticky bohaté prostředí, je vhodným prostředím pro psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy<sup>9</sup>. Bakterie nemohou růst za teploty  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nižší, což je teplota správně skladovaných potravin. Hraniční teplota pro růst bakterií je  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , což je teplota při které dochází k vnitrobuněčnému tvoření ledu<sup>10</sup>. Pro plísňe a kvasinky je však tato teplota stále dostačující pro zachování jejich buněčných funkcí. Teploty mezi  $0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které slouží k běžnému skladování potravin, jsou kritické pro výskyt mikroorganismů, které mohou jak znehodnocovat potraviny tak i produkovat toxické látky. Nejběžnější psychrotrofní a psychrofilní bakterie jsou gramnegativní rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia* a *Aerobacter*<sup>11</sup>, a to i přesto, že jejich vegetativní buňky jsou zničeny při pasterizaci. Z kvasinek jsou to hlavně rody *Candida* a *Rhodotorula*. Vzhledem ke schopnosti růst za nízké vodní aktivity jsou houby přítomny zvláště v suchých nebo částečně dehydratovaných potravinách. Jako příklad psychrotrofní plísně je možno zmínit některé druhy rodu *Penicillium* izolované z potravin<sup>12</sup>. Přestože většina mikroorganismů, které jsou přítomny v potravinách a způsobují jejich znehodnocení, neznamená zdravotní riziko pro člověka, existuje několik výjimek. Zejména se jedná o druh *Listeria monocytogenes* způsobující listeriózu<sup>13</sup> a určité sérotypy druhu *Yersenia enterocolitica*, které způsobují infekce vyskytující se především u dětí. Z dalších patogeních druhů lze zmínit *Bacillus cereus* produkující toxiny a vyskytující se například v rýži. Mezi nebezpečné druhy patří anaerobní *Clostridium botulinum*, které roste za teplot  $3\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a má vedle toho i teplotně rezistentní spóry<sup>14</sup>. Jako příklad psychrotolerantní houby lze uvést *Cladosporium herbarum*, která tvoří černé kolonie na chlazeném mase<sup>15</sup>. Častým důvodem proč dochází k vlastnímu kažení potravin jsou lipolytické a proteolytické enzymy, kterým lze také přičíst zápach doprovázející kažení potravin. Ačkoliv je snížená teplota nejběžnějším prostředkem pro uchování potravin a prodloužení doby skladovatelnosti, velmi často se používají i další prostředky, jako například přísady soli nebo modifikovaná atmosféra. I těmto podmínkám se však dokáží některé mikroorganismy úspěšně přizpůsobit. Jako mikroorganismus, který roste za nízkých teplot a vedle toho je rezistentní na vysoké koncentrace oxidu uhličitého a nízké koncentrace kyslíku, lze uvést psychrotolerantní bakterii *Brochothrix thermopacta*<sup>16</sup>.

### 2.2. Pozemní a vodní ekosystémy

Na rozdíl od psychrofilních mikroorganismů, které nejčastěji obývají stále chladná prostředí, psychrotolerantní mikroorganismy se nacházejí v oblastech, kde dochází v průběhu roku k výkyvům teplot<sup>17</sup>. Jako příklad pro výskyt psychrotolerantních mikroorganismů lze uvést arktické a antarktické půdy, kde se teplota pohybuje pod  $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (cit.<sup>18</sup>), avšak v krátkém letním období stoupá. Naopak průměrná teplota polárních moří je  $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , průměrná teplota oceánů se stále udržuje pod  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tak jsou tyto epitopy ideálními oblastmi pro výskyt psychrofilních mikroorganismů. Psychrofilní bakterie jsou nedílnou součástí potravinového řetězce v mořských hlubinách<sup>19</sup>. Hluboká moře jsou vedle toho i oblasti s vysokým tlakem vody a tak mnoho izolátů získaných při výzkumu tohoto epitopy jsou také barofilní nebo barotolerantní<sup>20</sup>. Z evropských lokalit, kde jsou běžně přítomny psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy, je nejznámější alpská oblast<sup>21</sup>. Tam se vyskytují jak v půdě tak v ledovcích.

Vedle půdy a vodních ekosystémů jsou však tyto mikroorganismy asociovány i s rostlinami a studenokrevními živočichy<sup>22</sup>.

### 3. Izolace psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů

První bakterie schopná růst za nízkých teplot byla izolovaná Forstem v roce 1887 z konzervované ryby<sup>23</sup>. Od té doby bylo publikováno mnoho studií popisujících izolaci psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů<sup>24–26</sup>. Vedle aseptické práce není nutno při izolaci těchto mikroorganismů zachovávat speciální postupy, samozřejmě kromě stálého udržování nízké teploty. Psychrofilní nebo psychrotrofní izoláty nevyžadují speciální nároky na živiny kromě určitých skupin, které jsou však systematicky odlišeny a definovány právě díky těmto nárokům. Příkladem mohou být rhizobia schopné vázat plynný dusík nebo bakterie podílející se na metabolismu síry<sup>26</sup>. Přesto je u jedné skupiny většinou psychrofilních mikroorganismů nutné zachovávat prostředí, z kterého pochází; jsou to organismy z hlubokých oceánů a mořských sedimentů<sup>27</sup>. V těchto oblastech v hloubce dosahující až 11 000 m jsou za pomoci speciálních technologií asepticky odebírány vzorky, z kterých jsou pak izolovány jednotlivé barofilní a barotolerantní kmeny<sup>28</sup>. Přestože je těžké předpovídat, jaký mikrobiální druh bude izolován z určité oblasti, lze nalézt několik trendů, z nichž nejčastěji je zmiňovaný fakt, že gramnegativní bakterie převládají nad grampozitivními v mořích u Antarktidy. Naopak v suchých antarktických údolích převládají grampozitivní rody *Planococcus* a *Micrococcus*<sup>29</sup>. Tento fakt byl také pozorován u izolátů z alpských ledovců<sup>30</sup>, kdy byl izolován velký počet zejména pigmentovaných kmenů. Takto vybavené organismy absorbují svými pigmenty radiční záření, což jim slouží jako účinná obrana. Zajímavým údajem je skutečnost, že z 430 psychrotrofních izolátů z alpských oblastí bylo 77 % bakterií, 20 % kvasinek a zbytek tvořily plísňe<sup>30</sup>. Řada mikroorganismů, převážně bakterií izolovaných z mořských oblastí, byla vedle schopnosti růst za nízkých teplot také schopna tolerovat různé koncentrace soli a tak řada izolačních postupů používá právě sůl, nejčastěji NaCl, jako přísadu do kultivačního média<sup>31</sup>.



#### 4. Molekulární adaptace

K tomu, aby mohli růst a rozmnožovat se za nízkých teplot, si psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy vyvinuly řadu mechanismů, kterými se odlišují od svých mesofilních a termofilních analogů. V zásadě je lze rozdělit do dvou skupin: změny ve struktuře proteinů a změny související se složením lipidů tvořící buněčné membrány.

##### 4.1. Struktura proteinů

Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy obsahují enzymy s vysokou specifickou aktivitou za teplot blízkých 0 °C, což jim umožňuje přežít teploty, za kterých jsou základní životní funkce mesofilních mikroorganismů zastaveny. Tyto enzymy mají obvykle o 20–30 °C nižší teplotní optimum než odpovídající mesofilní enzym a jsou obecně termolabilní. Laktátdehydrogenasa z psychrotrofní bakterie *Bacillus psychrosaccharolyticus*<sup>32</sup> byla prvním enzymem z psychrotolerantního mikroorganismu, u něž byla stanovena aminokyselinová sekvence. Do současné doby byly studovány jak extracelulární tak intracelulární enzymy a u některých z nich jsou známy i terciární a kvartérní struktury (citrátsynthasa,  $\alpha$ -amylasa). Jednotlivé enzymy společně se svým zdrojem jsou obsaženy v tabulce I. Mezi extracelulární patří  $\alpha$ -amylasa<sup>33</sup> a lipasa<sup>34</sup>. Vzhledem k existenci izoenzymů a tomu, že jsou v současné době známé primární sekvence některých enzymů z více zdrojů, je možné tvrdit, že se stejné enzymy výrazně liší svými teplotními a kinetickými charakteristikami. Nejmarkantnějším příkladem je existence dvou izoenzymů isocitrátdehydrogenasy (ICDH) u psychrofilního kmene *Vibrio* sp. ABE-1 (cit<sup>35</sup>). ICDH 1 má větší termostabilitu než ICDH 2 a je také na rozdíl od monomerní ICDH 2 složena ze dvou identických podjednotek. Dimerní struktura ICDH 1 umožňuje řadu hydrofobních interakcí což má za následek větší teplotní odolnost<sup>35</sup>. Avšak na základě kinetických parametrů má naopak ICDH 2 70× větší aktivitu za nízkých teplot<sup>36</sup>. Dominantní charakteristika enzymů z psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů je jejich vyšší katalytická konstanta ( $k_{\text{kat}}$ ) a vyšší katalytická účinnost<sup>37</sup> ( $k_{\text{kat}}/K_m$ ). Studiemi dosud známých enzymů, které se podařilo připravit v krystalické formě, se ukázalo, že aktivní centrum těchto enzymů je na úrovni primární struktury identické s aktivními centry odpovídajících mesofilních enzymů<sup>38</sup>, a to platí i o postraních řetězcích, které k aktivnímu centru přiléhají. Z těchto závěrů vyplývá, že unikátní vlastnosti těchto enzymů jsou způsobeny aminokyselinovými zbytky, které se přímo neúčastní vlastní chemické reakce. Flexibilita struktury těchto enzymů má však na druhou stranu za důsledek větší teplotní labilitu. Menší rigidita struktury psychrotrofních a psychrofilních enzymů je způsobena především interakcí molekul enzymu s rozpouštědlem a to na základě nekovalentních elektrostatických interakcí jako jsou vodíkové vazby, solné můstky a aromatické interakce<sup>37</sup>. Pro příklad jsou v tabulce II uvedeny základní rozdíly ve struktuře psychrofilní a mesofilní  $\alpha$ -amylasy<sup>39</sup>. Z porovnání těchto struktur vyplývá, že výrazné snížení hydrofobního jádra psychrofilního enzymu je způsobeno výměnou alaninových zbytků za prolinové<sup>40</sup> což má za následek flexibilnější enzymovou molekulu. Podobný efekt má úbytek argininových aminokyselinových zbytků, který vede k oslabení intermolekulárních interakcí. Z hlediska průmyslových enzymů má v současnosti

Tabulka I

Enzymy z psychrotrofních a psychrofilních bakterií u nichž je známa primární struktura

Enzym	Bakterie	Lit.
Laktátdehydrogenasa	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	43
Lipasa	<i>Moraxella</i> sp. TA 144	44
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	45
	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	46
$\alpha$ -Amylasy	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	46
Isocitrátdehydrogenasa	<i>Vibrio</i> sp. ABE-1	47
Subtilisin (proteinasa)	<i>Bacillus</i> sp. TA 39	41
	<i>Bacillus</i> sp. TA 41	48
Triosafosfátisomerasa	<i>Moraxella</i> sp. TA 137	49
$\beta$ -Galaktosidasa	<i>Arthrobacter</i> sp. B7	50,51
$\beta$ -Laktamasa	<i>Psychrobacter immobilis</i>	52
Citrátsynthasa	<i>Moraxella</i> sp. DS2-3R	53
Esterasa	<i>Pseudomonas</i> sp. LS 107d2	54
Alkalická fosfatasa	kmen HK47 z mořské vody	55

Tabulka II

Adaptace psychrofilní  $\alpha$ -amylasy z *Alteromonas haloplanctis* A23 vzhledem k mesofilní  $\alpha$ -amylase<sup>39</sup>

Parametr	Hodnoty [%] u psychrofilního enzymu
Solné můstky	63
Aromatické interakce	5
Hydrofobní interakce	54
Obsah prolinu	38
Obsah argininu	55

největší význam subtilisin<sup>41</sup>. Přestože lze říci, že je psychrofilní subtilisin asi o 30–40 aminokyselin delší než subtilisin z mesofilních zdrojů, odvozená třídídimenzionální struktura je velmi podobná, a to hlavně v klíčových oblastech enzymu. U tohoto enzymu byly nalezeny velmi podobné strukturální adaptační změny – snížení aromatických interakcí, úbytek solných můstků, snížení počtu prolinových a argininových zbytků. Snížení počtu argininových zbytků vedlo k nižší afinitě k  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou pro tuto serinovou proteasu esenciální. Avšak když byl klíčový threonin nahrazen cílenou mutagenézí kyselinou asparagovou, aktivita tohoto enzymu se podstatně zvýšila<sup>42</sup>. Z tohoto pokusu jasně vyplývá, že molekulárním přístupem lze zdokonalit vlastnosti enzymů z psychrofilních a psychrotrofních zdrojů především za účelem jejich využití v biotechnologických aplikacích.

##### 4.2. Membránové lipidy

Psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy nemají unikátní složení buněčné membrány a jednotlivé druhy si vytvořily odlišné mechanismy jak si uchovat všechny životní funkce za nízkých teplot. Základním rysem všech změn, a to jak změn ve složení mastných kyselin tak ve složení fosfolipidů, je snaha o zachování fluidity membrány<sup>56</sup>. Díky poměrně jednoduchosti provedení lipidové analýzy byl tento problém studo-

ván velmi podrobně a v současnosti existuje řada studií<sup>57,58</sup>, které se jím podrobně zabývají. Přestože dochází ke změnám ve složení jak polárních lipidů tak hydrofobních mastných kyselin, které jsou uvnitř lipidové dvojvrstvy, hlavní část adaptačních změn vedoucích k zvýšení fluidity membrány postihuje mastné kyseliny<sup>57</sup>. Jednoduchost při stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie umožnila poměrně přesně definovat, k jakým změnám dochází u jednotlivých mastných kyselin při snížení růstové teploty. Mezi základní charakteristiky, které si mikroorganismy v průběhu evoluce vytvořily, patří syntéza nenasycených mastných kyselin, zkracování délky řetězce mastných kyselin, větvení mastných kyselin a vzrůst poměru *anteisolo* větvených mastných kyselin. Je třeba zdůraznit, že každá z charakteristik může být jedinou možností jak se jednotlivé mikroorganismy přizpůsobují nízkým teplotám, přesto však většina mikroorganismů používá více typů adaptačních mechanismů<sup>58</sup>. Jako příklad lze uvést grampozitivní a gramnegativní bakterie, které se odlišují ve složení buněčných membrán<sup>59</sup> a tím v zastoupení jednotlivých mastných kyselin, takže u nich zákonitě dochází k odlišným změnám, které jsou v úzkém vztahu k jejich složení. Grampozitivní rody obsahují velké procento větvených mastných kyselin a tak je velmi častý vzrůst poměru *anteisolo* větvených mastných kyselin<sup>60</sup>. U gramnegativních rodů dochází k syntéze nenasycených mastných kyselin nebo ke snižování průměrné délky řetězce<sup>61</sup>. U některých mořských psychrofilních izolátů se zvyšuje poměr *transcis* nenasycených mastných kyselin, jak je například dokumentováno u druhu *Vibrio*<sup>62</sup>. Přisun živin je jedním z důležitých aspektů zachování viability buňky a jak naznačují některé studie<sup>63,64</sup> je tak tomu i u organismů schopných růst za nízkých teplot. Příkladem mohou být dvě psychrotolerantní bakterie<sup>65</sup>, z nichž jedna má vypracován lepší mechanismus příjmu živin a tak roste lépe za teplot blízkých 0 °C.

## 5. Genetika psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů

Znalosti molekulární biologie psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů jsou v porovnání se znalostmi termofilních mikroorganismů malé. Jako příklad lze uvést, že v současné době neexistuje žádný systém pro klonování v psychrofilních nebo psychrotrofních mikroorganismech. Dosud byly všechny enzymy exprimovány v mesofilních hostitelích<sup>37</sup>. Do současnosti se pozornost věnovala hlavně purifikaci a následné krystalizaci enzymů z těchto mikroorganismů. Z regulačních procesů podílejících se na expresi daného proteinu byla částečně studována jen transkripce<sup>66</sup>. Z této studie vyplývá, že se snížením teploty dochází z největší pravděpodobností k produkci některých enzymů (lipasa, kyselá fosfatasa). Jako další příklad sloužící k rozšíření znalostí o těchto mikroorganismech a jejich adaptaci na nízké teploty je izolace genů podílejících se na syntéze nenasycených mastných kyselin a existence tzv. proteinů chladového šoku. Na syntéze nenasycených mastných kyselin se podílí membránově vázaný protein, jehož purifikace je díky jeho lokalizaci velmi obtížná. Pomocí molekulárně genetických technik bylo však naklonováno několik genů kódující tento protein<sup>67</sup>. Transformací tohoto genu z teplotně rezistentní *Synechocystis* sp. PCC6803 do teplotně senzitivního kmene *Anacystis nidulans* byla tomu-

to kmenu umožněna syntéza nenasycených mastných kyselin a tím získal dříve mesofilní *A. nidulans* schopnost tolerovat nízké teploty<sup>68</sup>. Náhlým snížením teploty dochází k transkripci a translaci nové sady genů, které kódují proteiny chladového šoku (Csp). Ty jsou analogy k proteinům exprimovaným při náhlém zvýšení teploty<sup>69</sup> nazývané proteiny tepelného šoku (Hsp). Hlavním rozdílem mezi Csp a Hsp je fakt, že Hsp vznikají jako odpověď na širokou škálu podnětů (stresů), jako například přítomnost ethanolu, zvýšená teplota, přítomnost těžkých kovů nebo anaerobní podmínky<sup>70</sup>. Podobně jako Hsp jsou Csp přítomny jak v psychrofilních a psychrotolerantních tak v termofilních a mesofilních mikroorganismech<sup>69</sup>. Nejvíce jsou Csp prostudovány u *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*<sup>71</sup>. Hlavní Csp u *E. coli*, Csp A se zdá být transkripčním regulátorem ostatních proteinů chladového šoku<sup>72</sup> a syntéza tohoto proteinu je právě na transkripční úrovni regulovaná teplotou<sup>73</sup>. Funkce dalších proteinů chladového šoku není přesně známa, ale předpokládá se, že podobně jako proteiny tepelného šoku, jsou Csp součástí syntézy proteinů za nízkých teplot a podílejí se na identifikaci a odstraňování denaturovaných proteinů<sup>74</sup>. Vedle Csp byla u psychrofilních bakterií a kvasinek izolována druhá skupina proteinů, která však není na rozdíl od Csp syntetizovaná při náhlém snížení teploty, ale je syntetizovaná konstitutivně při růstu za nízkých teplot<sup>75</sup>. Tyto proteiny byly nazvány chladově aklimatizované proteiny (Cap). Bylo zjištěno, že se tyto proteiny v období, kdy dochází ke snížení teploty, syntetizují vždy odlišným mechanismem nezávisle na Csp<sup>76</sup>. Fyziologické funkce některých Csp a Cap jsou známy, jako příklad je možné uvést hlavní Csp izolovaný z *B. subtilis*. Tento enzym byl určen jako enzym citrátového cyklu akonitasa. Z hlediska praktického využití se slibným zdá být přenos TOL plazmidu z mesofilního kmene *Pseudomonas putida* do psychrotrofního kmene *P. putida*<sup>77</sup>. Kmen obsahující TOL plazmid je schopen odbourávat toluen a po konjugacím přenosu tohoto plazmidu do psychrotrofního kmene *P. putida* byl tento kmen schopen utilizovat toluen za teplot blízkých 0 °C.

## 6. Biotechnologické aplikace

Psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy představují velký potenciál pro současné biotechnologie, a to právě díky své unikátní schopnosti žít, růst a rozmnožovat se za teplot, které jsou člověkem chápány jako extrémní<sup>78</sup>. Přestože jsou mikroorganismy často využívány v řadě výrob a biotechnologiích, přímé použití psychrotrofního nebo psychrofilního mikroorganismu nedosahuje významných aplikací. Jejich buněčné produkty však již našly řadu praktických aplikací a v současné době je tato oblast intenzivně studována. Pro názornost jsou hlavní výhody při použití produktů z psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů uvedeny v tabulce III. Snížení energetického nároku snížením reakční doby vede automaticky ke snížení nákladů na celý proces. K nezanedbatelným výhodám patří také snížené riziko běžné kontaminace za teplot, kdy mesofilní produkty nevykazují žádnou nebo minimální aktivitu. Z hlediska praktického využití se nejvhodnějšími kandidáty jeví enzymy z těchto mikroorganismů a přehled hlavních produktů společně s možným použitím jsou shrnuty v tabulce IV. Teplotní senzitivita jak bylo například popsáno u alkalické fosfatasy<sup>55</sup> vedla k inaktivaci tohoto enzymu již v kompletním mediu a k zabránění nežádoucích

Tabulka III

Hlavní výhody použití produktů z psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů

Rychlé a ekonomické ukončení procesu za mírných tepelných podmínek
Vysoké výtěžky při reakcích zahrnujících teplotně sensitivní složky
Ovlivňování (stereo)specifity u reakcí katalyzovaných enzymy
Snížení nákladů eliminací chladících/ohřívajících kroků v procesu
Zvýšená kapacita při on-line monitorování v enviromentálních podmínkách

Tabulka IV

Využití produktů z psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů

Aplikace	Příklad produktu
Prací prášky	proteiny, lipasy, celulasy
Tenderizace masa	proteiny
Hydrolyza laktosy v mléce	$\beta$ -galaktosidasa
Přidávky do potravin	nenasycené mastné kyseliny
Enviromentální biosenzory	různé enzymy (např. oxidasy)
Bioremediace	různé enzymy (např. oxidasy)
Čištění kontaktních čoček	proteiny
Biotransformace	různé enzymy (např. dehydrogenasy)

aktivit tohoto enzymu. K nejpoužívanějším enzymům, které našly uplatnění v potravinovém průmyslu a jako přísady do detergentů, patří lipasy a proteasy<sup>79</sup>. Proteasy jsou právě díky nižším teplotám široce vyhledávané v řadě konkrétních aplikací (výroba sýru, úprava piva, pekařské výrobky) a jejich použití v pracích prostředcích je rozšířené zvláště v Japonsku, kde je praní za nízkých teplot tradicí<sup>83</sup>. Vedle proteas se do pracích prostředků přidávají i amylasy, celulasy a lipasy. V pivovarnictví mají využití vedle proteas i amylasy ke zrychlení vystírání sladu za nízkých teplot. Odstraňování pektinů, zvláště z ovocných šťáv za chladu, je jednou z možností jak zabránit zbytečnému zkracování doby trvanlivosti<sup>84</sup>. Klasická hydrolyza laktosy na glukosu a galaktosu v mléce probíhá za 30–40 °C po dobu 4 hodin za katalýzy  $\beta$ -galaktosidasou z kvasinky rodu *Kluyveromyces*. Alternativní cestou je hydrolyza psychrofilním enzymem za teplot 5–10 °C po dobu 24 hodin, což také snižuje riziko kontaminace<sup>85</sup>.

Z lipidových složek, které našly uplatnění jako přísady do potravy, jsou jediným dosud známým příkladem vícesytné nenasyčené mastné kyseliny<sup>86</sup>. Pro člověka esenciální linolová a  $\alpha$ -linolenová kyselina jsou vedle toho, že slouží jako prekurzory dalších nenasyčených mastných kyselin, nezbytné pro zdravý růst. Jsou základními stavebními jednotkami prostaglandinů, leukotrienů a dalších membránových struktur v mozku a zornici. Dalším příkladem, kdy měl základní výzkum přímou návaznost na biotechnologickou aplikaci, je

využití proteinů tvořících krystaly ledu při výrobě zmrzliny, umělého sněhu a řadě dalších potravinových aplikací<sup>87</sup>. Tvorba krystalků ledu byla pozorována u řady psychrotolerantních bakterií parazitujících na rostlinách<sup>88</sup>. Kmeny rodu *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Xanthomonas* tvoří krystalky na květech a listech za tvorby proteinů, které jsou kódovány specifickými geny<sup>89</sup>. Vytvořené modely vysvětlující vazbu vody na tyto proteiny a tím zahájení tvorby ledových krystalků<sup>90,91</sup> byly základem k využití těchto proteinů k výše zmíněným účelům. Z výskytu psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů vychází snaha o zapojení těchto organismů do procesů podléhajících se na odstranění nežádoucích látek ze životního prostředí, k čemuž je mikrobiální biodegradace velmi často využívána<sup>79</sup>. Příkladem je biodegradace motorové nafty půdními mikroorganismy<sup>80</sup> a degradace uhlovodíků psychrotrofní bakterií rodu *Pseudomonas*<sup>81</sup>. Vhodným prostředkem k čištění odpadních vod za teplot pod 15 °C se jeví právě chladově adaptované mikroorganismy nebo jejich produkty<sup>82</sup>. K zajímavým aplikacím nezapadajících do mikrobiální říše a zároveň patřících do lékařství, patří tvorba vakcín z chladově adaptovaných virů parainfluenza<sup>92</sup>. Na závěr je třeba zdůraznit, že nedávné pokroky v imobilizaci enzymů a zejména v genetickém inženýrství, jsou významným nástrojem sloužícím k dalšímu zdokonalení vlastností psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů a jejich produktů pro širší uplatnění v moderních biotechnologiích.

#### LITERATURA

- Schmidt-Nielsen S.: Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 9, 145 (1902).
- Muller M.: Arch. Hygiene 47, 127 (1903).
- Morita R. Y.: Bacteriol. Rev. 39, 144 (1975).
- Russell N. J., v knize: *Trends in Microbial Ecology* (Guerrero R., Pedro-Alio C., ed.). Spanish Society for Microbiology, Madrid 1993.
- Bhakoo M., Herbert A. R.: Arch. Microbiol. 1979, 121.
- Wyn-Williams D. D.: *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York 1990.
- Nichols D. S., Russell N. J.: *Microbiology* 1996, 142.
- Collins M. A., Buick R. K.: *Food Microbiol.* 1989, 6.
- Gould G. W., Russell N. J.: *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow 1991.
- Russell N. J.: *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Blackie, Glasgow 1992.
- Tanner A. C., Herbert R. A.: Kiel Meeresforsch. Sonderh. 5, 390 (1981).
- Land C. J., Bahnhidi Z. G., Albertsson A. C.: Nord. J. Botany 7, 97 (1987).
- Wilkins P. O., Bourgeois R., Murray R. G. E.: Can. J. Microbiol. 18, 543 (1972).
- Walker S. J., Springer M. F., v knize: *Cilled Foods, the State of the Art* (Gormley T. R., ed.), kap. 3. Elsevier, London 1990.
- Reuter G.: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. Academic Press, London 1981.
- Boghar A., Bohling H., Fort H., v knize: *Cilled Foods, the State of the Art* (Gormley T. R., ed.), kap. 5. Elsevier, London 1990.
- Bowman J. P., Brown M. V., Nichols D. S.: Antarctic Sci. 9, 134 (1997).



18. Friedmann E. I.: *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New York 1993.
19. Morita R. Y.: *Can. J. Microbiol.* 26, 1375 (1980).
20. Jannasch H. W., Wirsén C. O., Taylor C. D.: *Science* 216, 1315 (1982).
21. Gounout A. M.: *Can. J. Microbiol.* 22, 839 (1976).
22. Margesin R., Schinner F.: *Biotechnological Applications of Cold-adapted Organisms*. Springer, Berlin 1999.
23. Forster J.: *Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Infekt. Hyg.* 2, 337 (1887).
24. Innis W. E.: *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 445 (1975).
25. Russell N. J.: *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* 329, 595 (1990).
26. Schlegel H. G.: *General Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge 1993.
27. Austin B.: *Marine Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge 1988.
28. Kato Ch., Li L., Nogi Y., Nakamura Y., Tamaoka J., Horikoshi K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1510 (1998).
29. Miller K. L., Leschine S. B., Huguenin R. L.: *Ant. J. United States* 18, 222 (1983).
30. Schinner F., Margesin R., Pumpel T.: *Arctic Alpine Res.* 24, 88 (1992).
31. Yayanos A. A., DeLong E. F., v knize: *Current Perspectives in High Pressure Biology* (Jannasch H. W., Marquis R. E., Zimmerman A. M., ed.), kap. 5. Academic Press, London 1987.
32. Schlatter D., Kriech O., Suter F., Zuber H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 1435 (1987).
33. Kimura T., Hirikoshi K.: *Starch/Stärke* 42, 403 (1990).
34. Feller G., Thiry M., Arpigny J. L., Mergeay M., Gardey C.: *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 1669 (1989).
35. Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S.: *J. Biochem.* 86, 377 (1979).
36. Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 479 (1984).
37. Feller G., Gerday Ch.: *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 830 (1997).
38. Mosimann S., Meleshko R., James M. N. G.: *Proteins Struct. Funct. Genet.* 23, 301 (1995).
39. Feller G., Payan F., Theys F., Qian M., Haser R., Gerday Ch.: *Eur. J. Biochem* 222, 441 (1994).
40. Russell N. J.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 61, 1 (1998).
41. Davail S., Feller G., Narinx E., Gerday Ch.: *J. Biol. Chem.* 269, 17 (1994).
42. Feller G., Gerday Ch.: *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189 (1996).
43. Vckovski V., Schlatter D., Zuber H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 103 (1990).
44. Feller G., Thiry M., Gerday Ch.: *DNA Cell Biol.* 10, 381 (1991).
45. Arpigny J. L., Feller G., Gerday Ch.: *Biochim Biophys. Acta* 1171, 331 (1993).
46. Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libiouille C., Van Beeumen J., Gerday Ch.: *J. Biol. Chem.* 267, 5217 (1992).
47. Ishii A., Susuki M., Sahara T., Takada Y., Sasaki S., Fukunaga N.: *J. Bacteriol.* 175, 6873 (1993).
48. Davail S., Feller G., Narinx E., Gerday Ch.: *Gene* 119, 143 (1992).
49. Rentier-Delrue F., Mande S. C., Moyens S., Terpstra P., Mainfroid V., Goray K., Lion M., Hol W. G. J., Martial J. A.: *J. Mol. Biol.* 229, 85 (1993).
50. Trimbur D. E., Gutshall K. R., Prema P., Brenchley J. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4544 (1994).
51. Gutshall K. R., Trimbur D. E., Kasmir J. J., Brenchley J. E.: *J. Bacteriol.* 177, 1981 (1995).
52. Feller G., Narinx E., Arpigny J. L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday Ch.: *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 189 (1996).
53. Gerike U., Russell N. J., Hough D., Danson M. J.: *Eur. J. Biochem.* 248, 49 (1997).
54. McKay D. B., Jennings M. P., Godfrey E. A., MacRae I. C., Rogers P. J., Beacham I. J.: *J. Gen. Microbiol.* 138, 701 (1992).
55. Kobori H., Sullivan C. W., Shizuya H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6691 (1984).
56. Ingraham J. L., Bailey G. F.: *J. Bacteriol.* 77, 609 (1959).
57. Russell N. J.: *Trends Biochem. Sci.* 9, 108 (1984).
58. Russell N. J., v knize: *Microbial Lipids* (Ratledge C., Wilkinson S. G., ed.), kap. 8. Academic Press, London 1989.
59. Kates M.: *Techniques of Lipidology*, 2. vydání. Elsevier, New York 1988.
60. Bhakoo M., Herbert R. A.: *Arch. Microbiol.* 126, 51 (1980).
61. Ratledge C., Wilkinson S. G.: *Microbial Lipids*. Academic Press, London 1988.
62. Okujama H., Okajima N., Sasaki S., Higashi S., Murata N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 13 (1991).
63. Baxter R. M., Gibbons N. E.: *Can. J. Microbiol.* 8, 511 (1962).
64. Rose A. H., Evison L. M.: *J. Gen. Microbiol.* 38, 131 (1965).
65. Fukunaga N., Russell N. J.: *J. Gen. Microbiol.* 136, 1669 (1990).
66. Burini J. F., Gugi B., Merieau A., Guespin-Michel J. F.: *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 13 (1994).
67. Wada H., Gombos Z., Murata N.: *Nature* 347, 200 (1990).
68. Wada H., Gombos Z., Murata N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4273 (1994).
69. Jones P. G., Inouye M.: *Mol. Microbiol.* 11, 811 (1994).
70. Russell N. J., Hamamoto T., v knize: *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments* (Hirikoshi K., Grant W. D., ed.), kap. 2. Wiley-Liss, New York 1997.
71. Schindelin H., Marahiel M. A., Heinemann U.: *Nature* 364, 164 (1993).
72. Jones P. G., Krah R., Tafuri S. R., Wolffe A. P.: *J. Bacteriol.* 174, 5798 (1992).
73. Tanabe H., Goldstein J., Yang M., Inouye M.: *J. Bacteriol.* 174, 3867 (1992).
74. Lundheim R., Zachariassen K. E., v knize: *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments* (Hirikoshi K., Grant W. D., ed.), kap. 5. Wiley-Liss, New York 1997.
75. Whyte L. G., Inniss W. E.: *Can. J. Microbiol.* 38, 1281 (1992).
76. Lottering E. A., Sneips U. N.: *Curr. Microbiol.* 30, 193 (1995).
77. Kolenc R. J., Inniss W. E., Glick B. R., Robinson C. W., Mayfield C. I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 638 (1988).
78. Margesin R., Schinner F.: *J. Biotechnol.* 33, 1 (1994).
79. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J.: *J. Bacteriol.* 173, 4212 (1991).



80. Margesin R., Schinner F.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2660 (1997).
81. Whyte L. G., Bourbonniere L., Greer Ch. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3719 (1997).
82. Atlas R. M.: *Microbiol. Rev.* **45**, 180 (1981).
83. Bahn M., Schmid R. D., v knize: *Biotec 1* (Hollengerg C. P., Sahm H., ed.), kap. 9. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart 1987.
84. Brenchley J. E.: *J. Ind. Microbiol.* **17**, 432 (1996).
85. Herbert R. A.: *Trends Biotechnol.* **10**, 395 (1992).
86. Ring E., Sinclair P. D., Birkbeck H., Barbour A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3777 (1992).
87. Li J., Lee T.-C.: *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 259 (1995).
88. Gurian-Sherman D., Lindow S. E.: *FASEB J.* **7**, 1338 (1993).
89. Wolber P. K.: *Adv. Microb. Physiol.* **34**, 203 (1993).
90. Wolber P. K., Warren G.: *Trends Biochem. Sci.* **14**, 179 (1989).
91. Kajava A., Lindow S. E.: *J. Mol. Biol.* **232**, 709 (1993).
92. Murphy B. R.: *Bull. W.H.O.* **66**, 391 (1988).

**M. Stibor and B. Králová** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Psychrophilic and Psychrotrophic Microorganisms, Their Adaptation and Utilization in Modern Technologies**

Cold-adapted (psychrotolerant and psychrophilic) microorganisms are distinguished from mesophiles by their ability to grow at low temperatures. They are widely distributed in nature and they have evolved a complex range of adaptations enabling them to grow and survive in cold environment. Adaptation changes include both enzymes present in the microorganisms and lipids forming cell membranes. Due to their unique properties, cold-active enzymes are used in several biotechnological applications (detergents, biotransformations, contact lens cleaning, hydrolysis of lactose in milk). Of the lipids, polyunsaturated fatty acids serve as dietary supplements in food industry. Current knowledge of cold-adapted microorganisms indicates their high biotechnological potential for the future.

# MODIFIKACE PROTEINŮ V PRŮBĚHU STÁRNUTÍ ORGANISMŮ

JIŘÍ SAJDOK<sup>a</sup>, ANNA KOZAK<sup>a</sup>,  
JARMILA ZÍDKOVÁ<sup>a</sup>, PAVEL KOTRBA<sup>a</sup>,  
ALEXANDER PILIN<sup>b</sup> a JAN KÁŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav soudního  
lékařství, VFN v Praze, Studničkova 4, 128 00 Praha 2

Došlo dne 21.I.2000

Klíčová slova: abnormální proteiny, D-aminokyseliny v bíl-  
kovinách

## Obsah

1. Úvod
2. Spontánní změny konformace proteinů
3. Oxidace aminokyselinových zbytků
4. Deamidace a izomerace asparaginyly a glutaminyly
5. Racemizace aminokyselinových zbytků proteinů
  - 5.1. Kyselina D-asparagová
  - 5.2. D-Serin a ostatní D-aminokyseliny

## 1. Úvod

K nejvýznamnějším modifikacím bílkovin během stárnutí v podmínkách živých systémů patří vedle spontánních změn konformace proteinů i oxidace aminokyselinových zbytků (především prolylu, arginyly, lysyly a histidinyly), deamidace aspariginylů, glutaminyly a izomerace asparagové a glutamové kyseliny.

Akumulace abnormálních forem enzymů a ostatních (např. strukturálních) proteinů v průběhu stárnutí buňky a potažmo celého (mnohobuněčného) organismu je dána snižující se aktivitou specifických proteas, které preferenčně degradují modifikované formy daného proteinu nebo skutečnost, že se jedná o peptid či protein, který není obměňován a nebo nemůže být degradován z důvodu konformačních a nebo jiných změn. Abnormálním (modifikovaným) je zde rozuměn protein, jehož struktura byla pozmeněna v průběhu stárnutí modifikacemi chemické struktury nebo u kterého došlo ke spontánní změně konformace nebo racemizaci v něm obsažených aminokyselin bez změny primární struktury. Takové modifikace mohou vést ke změnám, které se v důsledku projeví změnou citlivosti daného proteinu vůči proteolytické degradaci<sup>1</sup>.

Aktivita specifických proteas, které mají v průběhu života buňky, mimo jiné, za úlohu udržovat co možná nejnižší podíl abnormálních forem proteinu je ovlivněna komplexním mechanismem regulujícím proces stárnutí resp. buněčnou apoptózu. Obecně se předpokládá, že aktivita proteas zodpovědných za recyklaci proteinů klesá s věkem jedince<sup>1</sup>. Gracy

a kol.<sup>2,3</sup> ukázali, že hladina kathepsinu B v *ex vivo* kultuře lidských fibroblastů klesá mezi 51. a 80. rokem věku donora. Další podporu tomuto předpokladu poskytuje přímá korelace mezi akumulací abnormálních forem glutaminsynthasy a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy v krysích hepatocytech a poklesem aktivity proteas s neutrálním pH optimum<sup>4</sup>.

## 2. Spontánní změny konformace proteinů

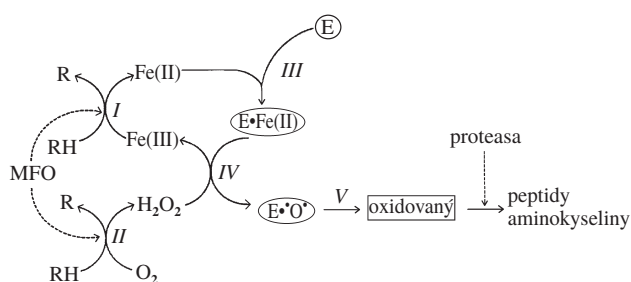
V některých případech bylo zjištěno, že enzymy, které nevykazovaly detegovatelnou změnu v primární struktuře se lišily např. v teplotní stabilitě, specifické katalytické aktivitě nebo kinetických parametrech. Tento rozdíl byl dán pouze stadiem ontogenetického vývoje organismu z něhož byl daný enzym izolován. Vzhledem k tomu, že během stárnutí organismu, je prodlužován biologický poločas rozpadu proteinů vlivem snížené „proteolytické aktivity“ buněk organismu, lze teoreticky očekávat zvýšenou pravděpodobnost výskytu samovolných změn v konformaci proteinů<sup>5</sup>.

Preparáty enolasy izolované z „mladých“ a „starých“ buněk *Turbatrix acetii* se lišily v teplotní stabilitě, spektrálních charakteristikách, kinetických parametrech a imunochemických vlastnostech<sup>6</sup>. Oba preparáty byly denaturovány v guanidinu HCl a po renaturaci byly získány proteiny, které vykazovaly naprosto shodné charakteristiky nezávisle na stáří zdrojových buněk. Podobné výsledky byly získány při renaturaci fosfoglycerát kinas krysího svalu<sup>7</sup>. V obou případech vykazovaly renaturované proteiny vlastnosti odlišné od charakteristik původních preparátů „starých“ (tj. abnormálních) a „mladých“ nemodifikovaných enzymů.

V dalších studiích s 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenasou bylo ukázáno, že změna konformace může být *in vitro* způsobena kovalentní modifikací (jodací) Cys-149 a po restauraci Cys získává 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenasa abnormální konformaci identifikovanou *in vivo*, jako důsledek stárnutí enzymu<sup>8,9</sup>.

## 3. Oxidace aminokyselinových zbytků

Řada proteinů (enzymů), konkrétně aminokyselinových zbytků tvořících vazebná místa pro tranzitní kov nebo aminokyselin v jeho blízkosti, je snadno oxidována enzymově nebo neenzymově, což vede ke ztrátě katalytické aktivity. Modifikované tj. „označené“ – proteiny podléhají proteolytické degradaci. Mechanismus tohoto procesu označovaného zkratkou MFO (z anglického mixed-function oxidation), je schematicky znázorněn<sup>11</sup> na obr. 1. V přítomnosti vhodného donoru elektronů, O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> MFO katalyzuje vznik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Fe<sup>2+</sup> (reakce I a II). Po vazbě Fe<sup>2+</sup> na enzym nebo jiný protein (reakce III) je generován aktivní kyslík (reakce IV), který oxiduje specifické aminokyselinové zbytky (reakce V). Řada autorů ukázala, že prostřednictvím MFO jsou konvertovány histidylové zbytky na asparaginylové nebo aspartylové a prolylové nebo arginylové jsou přeměněny na glutamylové popř. glutamylse-



Obr. 1. Schematické znázornění reakcí zahrnutých do procesu „mixed-function oxidation“ (MFO); RH – donor elektronů (NADPH, askorbová kyselina apod.), R – oxidovaný donor elektronů, E – enzym (popř. jiný protein schopný vázat  $\text{Fe}^{2+}$ ),  $\text{O}^{\bullet}$  – aktivní kyslík. Pořadí (sekvenci) reakcí MFO je možno nalézt v textu. Adaptováno z cit.<sup>1</sup>

mialdehyd<sup>1,11</sup>. Účast v MFO procesu je připisována řadě flavoproteinů, především tzv. NAD(P)H oxidasam<sup>10,12</sup>, xantinoxidase, křenové peroxidase nebo glukosaoxidase<sup>13</sup>. Vedle enzymových jsou známy i neenzymové systémy MFO jako např. systém zahrnující spoluúčast merkaptanů,  $\text{O}_2$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (cit.<sup>15</sup>).

Olivier a kol.<sup>15</sup> ukázali, že v průběhu stárnutí lidských erythrocytů je zvyšován podíl oxidovaných proteinů stanovený jako množství karboxylových skupin proteinů<sup>15</sup>. Tito autoři zároveň potvrdili, že množství proteinů oxidovaných prostřednictvím MFO v tkáňových kulturách lidských fibroblastů roste takřka exponenciálně s věkem donorů.

Množství oxidovaných proteinů nezáviselo na počtu *ex vivo* subkulturací a bylo tedy ovlivněno pouze genetickými faktory stárnutí. Tento závěr navíc potvrzují koncentrace oxidovaných proteinů v extraktech z fibroblastů pacientů postižených chorobami předčasněho stárnutí jako jsou progerie nebo Wernerův syndrom<sup>15</sup>.

#### 4. Deamidace a izomerizace asparaginyly a glutaminyly

Podobně jako oxidace prostřednictvím mechanismu MFO tak i deaminace asparaginyly a glutaminyly vede ke změně nábojových vlastností proteinu vyvolávajících řadu změn vlastností proteinu jako je termostabilita, senzitivita k proteasám, u enzymů pak afinita k substrátu nebo allosterickým efektorům<sup>3</sup>. Pravděpodobný mechanismus deaminace Asn, zahrnující vznik L-sukcinimidu, jež je následně hydrolyzován za vzniku L-aspartylu<sup>1,16</sup>, je znázorněn na obr. 2. Poločas deamidace proteinů je závislý na aminokyselinové sekvenci, v níž se daný zbytek Asn nebo Gln nachází. To bylo prokázáno sledováním spontánní deamidace 70 pentapeptidů s Asn nebo Gln lokalizovaných v centrální pozici<sup>17</sup>. Poločas spontánní deaminace byl podle sekvence pentapeptidu 6 dní až 9 let (!), což naznačuje, že permisivita deaminace může hrát roli biologických hodin pro obrat proteinů. Nízký biologický poločas skutečně koreluje s počtem Asn a Gln v primární struktuře řady proteinů<sup>17</sup>.

Názor, že deamidace může hrát roli ve zvyšování množství abnormálních proteinů v průběhu stárnutí podporuje zvýšený výskyt deaminované formy triosafosfátisomerasy v extraktech tkáňových kultur fibroblastů u pacientů trpících Wernerovým syndromem a progerií<sup>2</sup>. Vznik kyselejší a labilnější formy

triosafosfátisomerasy, jejíž akumulace je závislá na stárnutí jedince, je dán postupnou deamidací dvou asparaginylových zbytků (Asn 71 a následně Asn 15).

#### 5. Racemizace aminokyselinových zbytků proteinů

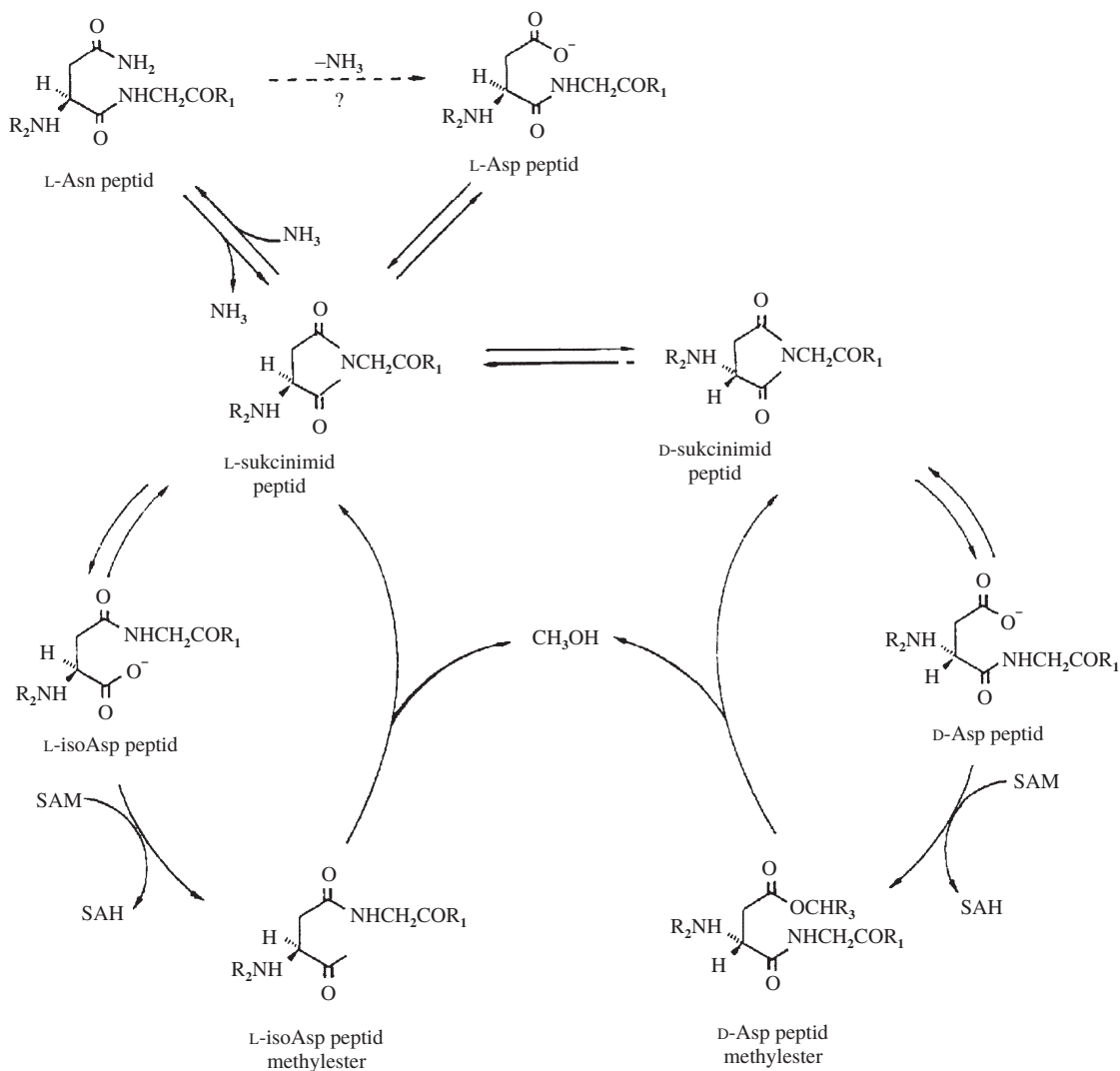
Skutečnosti, že biomolekuly a jejich komponenty mají chirální vlastnosti naznačil poprvé Louis Pasteur v roce 1858 a Emil Fisher roku 1891 předpověděl, že biologické makromolekuly jsou složeny z L-aminokyselin a D-cukrů<sup>18</sup>. Přírodní proteiny jsou skutečně složeny výhradně z L-aminokyselin. D-Enantiomery aminokyselin jsou součástí buněčných stěn gramnegativních bakterií<sup>19</sup>, celé řady antibiotik a jedů povahy oligopeptidů<sup>20</sup>. Skutečnost, že jsou proteiny tvořeny exkluzivně z L-enantiomerů, tedy podle přísného geometrického pravidla, pak předurčuje i jejich specifitu v protein-proteinových interakcích, vazbě substrátu do vazebného místa enzymu, stereospecifitu katalyzované reakce a řadu dalších vlastností.

Takováto geometricky determinovaná selektivita mohla být demonstrována díky rozvoji chemické syntézy peptidů. Dunn a kol.<sup>21</sup> ukázali, že retrovirální proteasa HIV-1 (99 aminokyselinových zbytků) syntetizovaná z D-enantiomerů aminokyselin byla schopna hydrolyzovat pouze substrát o D-konformaci, nikoliv L-substrát (přirozená HIV-1 proteasa tj. L-enantiomer, vykazuje opačnou substrátovou specifitu). Spontánní konverze L-enantiomeru na D v molekule proteinu a akumulace abnormálních forem proteinu v průběhu stárnutí organismu může vést ke ztrátě nebo negativní alteraci funkce daného proteinu. Na druhou stranu, některé literární údaje<sup>22</sup> naznačují, že přítomnost některých D-aminokyselin v molekulách proteinů se zdá být nutná právě pro funkčnost proteinu, opět s ohledem na geometrické vlastnosti<sup>22</sup>.

##### 5.1. Kyselina D-asparagová

Zvýšený výskyt kyseliny D-asparagové byl zaznamenán u krys v některých částech mozku, v periferních orgánech jako nadledvinky, varlata a ledviny, ve frontálním kortexu lidského mozku, mozkomíšním moku, a kuřecím zárodku<sup>23–27</sup>. Množství D-Asp v jednotlivých tkáních je v těchto případech spjato s vývojovým stadiem jedince. Např. v krysím mozku představuje D-aspartyl 8,4 % asparagové kyseliny, ale tato hodnota klesá na 0,4 % 10 dní po narození<sup>23</sup>. V sítnici krysa stoupá zastoupení D-Asp z 10 % na 29 % 7 dní po narození, ale klesá na úroveň 1 % u jedinců starých 15 dní<sup>22</sup>.

Je zřejmé, že tyto přechodné výkyvy v zastoupení D-enantiomeru kyseliny asparagové souvisí s morfologickým a funkčním vývojem orgánů<sup>22</sup>. Nepředpokládá se však, že D-enantiomery jsou inkorporovány do nově syntetizovaného proteinového řetězce<sup>28</sup>, ačkoliv některé D-aminoacyl-tRNA mohou být syntetizovány<sup>29</sup>. Předpokládá se posttraslační konverze L-aspartylu na D-enantiomer a naopak. Specifická racemasa konvertující L-aminokyseliny na D-aminokyseliny však již byla nalezena u bezobratlých<sup>30</sup>. Nutnost enzymové konverze mezi jednotlivými enantiomery kyseliny asparagové podtrhuje relativně nízká rychlost ( $0,1 \text{ \% rok}^{-1}$ ) spontánní racemizace asparagylu popř. asparaginyly (mechanismus viz obr. 2) identifikovaná například u  $\beta$ -krystatinu v lidských očních čočkách<sup>31</sup>.



Obr. 2. Role tvorby sukcinimidu a karboxymethylace při deamidaci, racemizaci a izomeraci aspartylu a asparaginyly; SAM – S-adenosylmethionin (aktivní methyl), SAH – S-adenosylhomocystein. Adaptováno z cit.<sup>1</sup>

D-Aspartyl byl také identifikován v membránových proteinech erythrocytů<sup>32</sup> a myelinu<sup>33,34</sup>, v peptidech a proteinech tvořících kosti a zuby.

### 5.2. D-Serin a ostatní D-aminokyseliny

D-Serin byl identifikován v lidském, krysím a prasečím myelinu<sup>34,35</sup>. Z fyziologického hlediska jsou zajímavější volné D-enantiomery aminokyseliny jako D-Ser nebo D-Ala, které zřejmě hrají roli allosterického efektoru N-methyl-D-aspartát receptoru. Dále je známo, že množství D-enantiomerů různých aminokyselin roste vlivem různých onemocnění jako jsou např. Alzheimerova choroba nebo ledvinová nedostatečnost (pro přehled<sup>22</sup>). Řízený vznik a fyziologická role D-enantiomerů aminokyselin v organismu zůstává však stále neobjasněna. Na konci roku 1999 byl oznámen objev specifické serinisomerasy, která izomeruje L-serin na D-serin. Tento nový objev může posunout úvahy o vzniku D forem aminokyselin v savčích tkáních<sup>36</sup>.

### LITERATURA

1. Stadtman E. R.: J. Gerontol. Biol. Sci. 43, B112 (1988).
2. Gracy R. W., Yuksel K. U., Chapman M. L., Cini J. K., Jahani M., Lu H. S., Oray B., Talent J. M., v knize: *Modification of Proteins During Aging* (Aldeman R. D., Dekker E. E., ed.), str. 427. Alan R. Liss, New York 1985.
3. Gracy R. W., Chapman M. L., Cini J. K., Jahani M., Tollefsbol T. O., Yuksel K. U., v knize: *Molecular Biology of Aging* (Woodhead A. D., Blackett A. D., Holleender A., ed.), str. 1. Plenum Press, New York 1985.
4. Starke-Reed P. E., Oliver C. N., v knize: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* (Simic M. G., Ward J. F., Taylor K. A., ed.), str. 137. Plenum Press, New York 1988.
5. Rothstein M., v knize: *Molecular Biology of Aging* (Aldeman R. D., Dekker E. E., ed.), str. 193. Alan R. Liss, New York 1985.
6. Sharma H. K., Rothstein M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5865 (1980).



7. Yuh K.-C., Gafni A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7458 (1987).
8. Gafni A., Noy N.: Mol. Cell. Biochem. 59, 113 (1984).
9. Gafni A.: *Modification of Proteins During Aging* (Alde-  
man R. D., Dekker E. E., ed.), str. 19. Alan R. Liss, New  
York 1985.
10. Fucci L., Oliver C. N., Coon M. J., Stadtman E. R.: Proc.  
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 1521 (1983).
11. Cooper B., Creeth J. M., Donald S. R.: Biochem. J. 228,  
615 (1985).
12. Nakamura K., Oliver C., Stadtman E. R.: Arch. Biochem.  
Biophys. 240, 319 (1985).
13. Stadtman E. R., Wittenberger M. E.: Arch. Biochem.  
Biophys. 239, 379 (1985).
14. Kim K., Rhee S. G., Stadtman E. R.: J. Biol. Chem. 260,  
15394 (1985).
15. Oliver C. N., Levine R. L., Stadtman E. R.: J. Am. Geriatr.  
Soc. 35, 947 (1987).
16. Geiger T., Clarke S.: J. Biol. Chem. 262, 785 (1987).
17. Robinson A. B., Rudd C. J.: Curr. Top. Cell Regul. 8, 247  
(1974).
18. Lamzin V. S., Dauter Z., Wilson K. S.: Curr. Opin. Struct.  
Biol. 5, 830 (1995).
19. Červinka O., v knize: *Chemie organických sloučenin I*  
(Červinka O., ed.), str. 78. SNTL/Alfa, Praha 1985.
20. Karlson P.: *Základy biochemie*, str. 53. Academia, Praha 1981.
21. Dunn B. M., Gustchina A., Wlodawar A., Kay J.: Meth-  
ods Enzymol. 241, 255 (1994).
22. Imai K., Fukushima T., Santa T., Homma H., Hamase K.,  
Sakai K., Kato M.: Biomed. Chromatogr. 10, 303 (1996).
23. Neidle A., Dunlop D. S.: Life Sci. 46, 1517 (1990).
24. Hashimoto A., Kumashiro S., Nishikawa T., Oka T.,  
Takahashi K., Mito T., Takashima S., Doi N., Mizutani  
Y., Yamazaki T., Kaenko T., Ootomo E.: J. Neurochem.  
61, 348 (1993).
25. Hashimoto A., Oka T., Nishikawa T.: Eur. J. Neurosci. 7,  
1657 (1995).
26. Fisher G. H., Petrucelli L., Gardner C., Emory C., Frey  
W. H. II, Amaduci L., Sorbi S., Sorrentino G., Borghi M.,  
D'Aniello A.: Mol. Chem. Neuropathol. 23, 115 (1994).
27. Imai K., Fukushima T., Hagiwara K., Santa T.: Anal.  
Chim. Acta 290, 3 (1995).
28. Mor A., Amiche M., Nicolas P.: Trends Biochem. Sci.  
17, 481 (1992).
29. Calendar R., Berg P. J.: Mol. Biol. 26, 39 (1967).
30. Shikata Y., Watanabe T., Teramoto T., Inouhe A., Kawa-  
kami Y., Nishizawa Y., Katayama K., Kuwaka M.: J.  
Biol. Chem. 270, 16719 (1995).
31. Masters P. M., Bada J. L., Zigler J. S., Jr.: Nature 268, 71  
(1977).
32. McFaden P. N., Clarke S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
79, 2460 (1982).
33. Fisher G. H., Garcia N. M., Payan I. L., Cadilla-Perezrios  
R., Sheremata W. A., Man E. H.: Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 135, 683 (1986).
34. Shapira R., JenChou C. H.: Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 146, 1342 (1987).
35. Shapira R., Austin G. E., Mirra S. S.: J. Neurochem. 50,  
69 (1988).
36. Brennan M.: Chem. Eng. News (November 15).

*Práce je podporována grantem IGA MZ ČR č. 64753-3.*

**J. Sajdok<sup>a</sup>, A. Kozak<sup>a</sup>, J. Zídková<sup>a</sup>, P. Kotrba<sup>a</sup>, A. Pil-  
in<sup>b</sup>, and J. Káš<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbio-  
logy, Institute of Chemical Technology, Prague,* <sup>b</sup>*Department  
of Forensic Medicine, University Hospital, Prague*): **Protein  
Modification During Aging of Organism**

In the course of aging of organisms, various modifications of side chains of amino acid residues in proteins affect their biological stability and turnover. The main alterations in protein structure are: changes in conformation of proteins, oxidation of amino acid residues (mixed-function oxidation) and racemization of L-amino acids (glutamic and aspartic acids and serine) to corresponding D-forms. D-amino acids were found in bones, teeth, brain and eye lenses. It is generally accepted that the content of D-amino acids slowly increases with age due to a lower metabolic turnover. The discovery of specific D-serine racemase brings a new view of this topic.

# POUŽITIE LUMINISCENČNÝCH ZNAČIEK PRE SPEKTRÁLNU CHARAKTERISTIKU POLYMÉRNÝCH MATRÍC

PAVOL HRDLOVIČ a MARIÁN KAHOLEK

Ústav polymérov, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 842 36 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: upolhrdl@savba.sk

Došlo dňa 17.I.2000

Kľúčové slová: polyméry, matrice, luminescencia, singletné a tripletné značky, deriváty kumarínu

## Obsah

1. Úvod
2. Vplyv polymérnej matrice na spektrálne vlastnosti molekúl
3. Tepelná história a prechody v pevnej fáze
4. Vplyv orientácie na fotoprocesy v maticiaciach
5. Fotofyzikálne vlastnosti kumarínu a jeho derivátov
6. Záver

## 1. Úvod

Interakcie skúmaná molekula/prostredie sú predmetom rozsiahleho experimentálneho a teoretického bádania, ktoré sa sústreďuje na konštrukcie špecifických značiek<sup>1,2</sup>. Tieto interakcie, ak sa prejavujú v spektrálnych vlastnostiach, sú veľmi charakteristické pre danú molekulovú značku a tiež prostredie, v ktorom sa táto nachádza. Pre charakterizáciu fyzikálnych, chemických a štrukturálnych aspektov prostredia cielene vyhľadávajú, prípadne pripravujú molekuly so špecifickou odzvou na dané prostredie. Experimentálne ľahko dostupné sú spektrálne zmeny napr. v absorpčných, emisných, polarizačných a iných spektrách v homogénnom izotropnom kvapalnom prostredí. Menej obvyklé je použitie molekulových značiek v tuhom polymérnom prostredí.

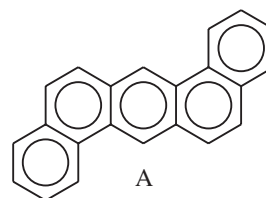
Cieľom tohoto prehľadu je zhrnúť prednosti a nedostatky polymérov ako nosičov resp. matrice pre spektrálne merania. Na základe porovnania niektorých spektrálnych charakteristík vybratých singletných a tripletných značiek chceme poukázať na rozdiely medzi štandardnými rozpúšťadlami a polymérnymi maticiami. Hlavnú pozornosť pritom budeme venovať možnosti použitia niektorých derivátov kumarínu ako značiek. Prevažná časť aplikácií derivátov kumarínu je založená na ich luminescenčných vlastnostiach. V centre záujmu fotofyzikov sú kumarínové deriváty ako aktívne prostredie vo farbivových laseroch<sup>3-5</sup> a ako fotosenzibilizátory<sup>6,7</sup>. Iná aplikácia v biofyzike je založená na použití acylovaných kumarínov ako značiek pre fotoindukované enzymatické štúdie<sup>8,9</sup>, ďalej je to skúmanie lipidovej dvojvrstvy a biologických membrán<sup>10</sup>, najmä pri prešetrení medzifázového potenciálu v profiloch pri rozličných vzdialenostiach od membránového povrchu<sup>11</sup>. No-

vá oblasť aplikácie kumarínov v medicíne je značenie proteínov dlhovoľne excitovateľnými kumarínmi s elektrón-akceptórnymi substituentami v polohe 3 alebo 4 (cit.<sup>12</sup>).

## 2. Vplyv polymérnej matrice na spektrálne vlastnosti molekúl

Priehľadnosť a makroskopická pevnosť väčšiny jednoduchých polymérov napr. polystyrénu (PS) a polymetylmetyakrylátu (PMMA) vedú k záveru, že tieto matrice sú svojim charakterom porovnateľné k organickým a anorganickým sklám pri nízkych teplotách (obyčajne pri 77 K). Experimenty, pri ktorých malé molekuly boli dopované v pevných polymérnych maticiaciach, ukázali, že pri 300 K majú polymérne matrice oveľa väčší voľný objem ako jednoduché organické sklá pri 77 K. Tým sa umožňuje molekulárny pohyb hlavne pre malé bočné skupiny, aj keď difúzia hlavne pri nízkych koncentráciách malých molekúl je značne obmedzená. Štúdie pohybu a pohyblivosti tohoto druhu poskytli dôležité poznatky ako o štruktúre organických polymérnych skiel, tak i o fotochemických a fotofyzikálnych procesoch prebiehajúcich v polymérnom prostredí.

Uhľovodíkové sklá sa použili ako matrice na štúdium spektroskopických vlastností malých molekúl pri nízkej teplote (77 K) G. N. Lewisom a spol.<sup>13</sup>, ktorí vyvinuli rad zmesí di(*n*-pentyl)éteru s 2-metylbutanom a etanolom (známe ako EPA sklá), ktoré boli výbornými rozpúšťadlami a ľahko tvorili priehľadné sklá pri teplote kvapalného dusíka. Neskôr sa ďalší výskumníci pokúsili urobiť podobné štúdie v sklovitých polymérnych maticiaciach pri laboratórnej teplote. Napríklad Geacintov a spol.<sup>14</sup> použili viaceré polymérne matrice pre spektroskopické štúdie fosforescencie dibenzo[*a,h*]antracénu (štruktúra A) a zistili, že vo všetkých prípadoch emisia bola zhasaná



kyslíkom pri laboratórnej teplote. Toto je azda najskorší dôkaz toho, že v sklovitých polymérnych maticiaciach sa môže dosiahnuť difúzia v medziach doby života excitovaného stavu. Ak malé molekuly môžu difundovať v polymérnom prostredí s rýchlosťou do  $5 \times 10^3 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , tak je jasné, že pri dobe života fosforescencie rovnajúcej sa rádovo sekundám fosforescencia môže byť efektívne zhasaná kyslíkom. Na rozdiel od anorganických a nízkomolekulových organických skiel, ktoré sú takmer nepriepustné pre kyslík pri laboratórnej teplote<sup>15</sup>, sa efektívne zhasanie kyslíkom vyskytuje veľmi často vo viskózných polymérnych maticiaciach.

Využitie polymérov ako matrice na rozdiel od kvapalných roztokov prináša niekoľko výhod pre fotofyzikálne štúdia:

- pohyblivosť dopovaných molekúl je obmedzená,
- môžu sa využiť niektoré špecifické orientácie dopovaných molekúl<sup>20,21,24</sup>,
- polymérna matrica je inertná, tj. interakcia rozpustenej dopovanej molekuly s prostredím je veľmi slabá,
- nižšia citlivosť dopovanej molekuly na vonkajšie vplyvy (napr. zhášanie kyslíkom),
- jednoduchá príprava vzoriek vo forme filmov alebo blokov.

Na druhej strane treba zdôrazniť, že tieto výhody majú dost ohraničenú platnosť. Hlavné problémy s využitím matric sú:

- príprava vzoriek môže značne ovplyvniť výsledky,
- pohyblivosť rozpustenej látky a citlivosť na vonkajší vplyv sú určené výberom matrice, zvlášť pri teplote sklovitého prechodu ( $T_g$ ),
- mechanizmus orientácie molekúl nie je doposiaľ dobre objasnený<sup>24</sup>,
- predpoklad inertnosti matrice je ohraničený.

Často sa o vplyve polymérnej matrice na spektrálne vlastnosti molekúl robia nie celkom oprávnené predpoklady. O vplyve polymérnej matrice na spektrálnu charakteristiku sa predpokladá, že:

- polymérna matrica je aj pri laboratórnej teplote totálne inertná, tj. nemá žiadny vplyv na spektrálne merania, alebo
- polymérna matrica má na spektrálne vlastnosti rovnaký vplyv ako analogické nízkomolekulové rozpúšťadlo.

Tieto predpoklady majú len čiastočne svoje opodstatnenie. Sú samozrejme limitné situácie, kedy možno predpokladať, že jeden z uvedených predpokladov je oprávnený.

Vplyv prostredia na absorpčné a emisné spektrá je zvládnutý na kvalitatívnej a semikvalitatívnej úrovni<sup>16–18</sup>. Pre získanie spektier mnohoatómových molekúl sa obvykle zvolia také podmienky, aby interakcie rôzneho typu boli vylúčené resp. zanedbateľné. Z tohto dôvodu sa obvykle meria v roztoku pri nízkej koncentrácii meranej látky. Rozpúšťadlá sa volia také, aby pri dostatočnej rozpustnosti interakcia rozpúšťadlo – rozpustená látka bola minimálna.

Pri rôznych aplikáciách je však potrebné používať látky s určitými optickými spektrálnymi vlastnosťami v podmienkach značne odlišných od štandardných. Príkladom je použitie farbív pre rôzne typy vlákien<sup>19</sup>. Fotofyzikálne vlastnosti takýchto systémov možno skúmať iba v krátkej a úzkej časovej škále<sup>20</sup>.

Na bližšie objasnenie týchto procesov sú dôležité údaje o rozsahu reorientácie polymérnej matrice po excitácii molekuly rozpustenej látky. Schmidtová a kol.<sup>19</sup> prišli k záveru, že disperzné sily hrajú dôležitú úlohu pri interakcii polymér–rozpustená látka. Reorientácia solvatačného obalu počas doby života excitovaného stavu rozpustenej látky v polyméroch je zanedbateľná pod teplotou sklovitého prechodu. Nadolski a kol.<sup>23,25</sup> na základe štúdia solvatochromizmu 4-(dimethylamino)-4'-nitroazobenzénu v rozpúšťadlách a v polymérnych matriciach prišli k záveru, že orientačná polarizácia hrá dôležitú úlohu. Znamená to, že aj v polyméroch môže dochádzať v niektorých prípadoch počas doby života excitovaného stavu dopovanej molekuly k reorganizácii solvatačného obalu.

V polymérnych matriciach obvykle dochádza k nehomogénemu rozširovaniu absorpčných a emisných spektier. Tento efekt spôsobuje najmä:

- existencia molekúl rozpustenej látky v miestach s rozdielnym mikroprostredím (o rôznej energii),

- reorientácia solvatačného obalu počas doby excitovaného stavu,
- interakcia typu rozpustená látka–rozpustená látka.

Naproti tomu k nehomogénemu rozšíreniu absorpčných a emisných spektier v polymérnych matriciach pri 77 K neprispieva reorientácia solvatačného obalu. Pre potlačenie nehomogénneho rozširovania absorpčných a emisných spektier je potrebné zvoliť takú matricu, v ktorej rozpustená látka zaujme len jednu definovanú polohu. To práve umožňujú Špolského matrice, čo sú vhodné uhľovodíky resp. zmesi uhľovodíkov<sup>26,27</sup> pri nízkej koncentrácii rozpustenej látky. Pre klasické Špolského matrice platí požiadavka, že najväčšie zúženie čiar sa dosahuje pri použití uhľovodíkov porovnateľných rozmerov ako rozpustená látka, čo sú obvykle aromatické polycyklické uhľovodíky, ktoré najčastejšie poskytujú kvazi-lineárne spektrá<sup>28</sup>.

Iná cesta pre dosiahnutie zúženia pásov je selektívna excitácia len jedného stavu rozpúšťadlo–rozpustená látka pomocou vhodne naladeného lasera. V prípade zúženia fosforescencie je potrebné týmto laserom excitovať v oblasti  $S_0-T_1$  pásu, ktorý je málo intenzívny<sup>27</sup> a to najmä pre prechody typu  $n \rightarrow \pi^*$ .

Prostredie bezprostredne obklopujúce molekulu často určuje jej základné vlastnosti, ako sú rozpustnosť a optické charakteristiky. Spektroskopické značky je tak možné použiť na skúmanie mikroprostredia makroskopicky homogénnych roztokov, na charakterizáciu polymérneho prostredia a na koreláciu zmien fotofyzikálnych parametrov, ktoré sú odozvou rozličných štruktúrnych modifikácií. Singletové značky sú vhodné na monitorovanie procesov v nanosekundovej oblasti, zatiaľ čo tripletové značky sa používajú pre usporiadané prostredie<sup>29,30</sup> a pre monitorovanie procesov v mikro- a milisekundovej oblasti.

Hlavnými fluorescenčnými značkami sú aromatické farbivá, ktoré sú preferenčne solubilizované v hydrofóbných mikrooblastiach. Ich presná lokalizácia je väčšinou neznáma. Technika fluorescenčných značiek bola použitá na detekciu výskytu interakcií polymér–rozpustená látka pomocou zdanelivej mikroviskozity ( $\eta_{app}$ ) a mikropolarity často vyjadrenej pomocou efektívnej permitivity ( $\epsilon_{eff}$ ). Určovanie absolútnych hodnôt  $\eta_{app}$  a  $\epsilon_{eff}$  je obvyčajne zaťažené určitou chybou, pričom pri kvantifikácii týchto hodnôt v miceliách a v tuhej fáze v porovnaní s hodnotami v rozpúšťadlách je potrebné byť opatrný. Zo zmien určitých fotofyzikálnych vlastností pri modifikácii rozpúšťadla rozličnými aditívami je možné získať hodnotné informácie. Tieto zmeny sa môžu použiť na posúdenie charakteru bezprostredného okolia značky. Zoznam najbežnejších fluorescenčných značiek ako sa uvádza v prehľadnej forme v článku<sup>31</sup> je ukázaný v tabuľke I a v schéme 1.

Na charakterizáciu polymérneho prostredia použili sa ako singletové značky<sup>31,32</sup> aj rôzne organické farbivá a pyrénové deriváty. Tri najbežnejšie fluorescenčné značky: pyrén (Py), pyrén-1-karbaldehyd (PCA) a 8-anilínonaftalén-1-sulfónová kyselina (ANS) majú tieto základné fotofyzikálne vlastnosti:

**P y r é n :** Kľúčovou vlastnosťou fotofyzikálnych vlastností pyrénu je zmena pomeru intenzít emisných pásov<sup>32</sup> spôsobená rozpúšťadlom. Tieto zmeny sa korelovali s polaritou bezprostredného okolia značky, a získala sa tak empirická pyrénová škála polaritativity rozpúšťadla. Napriek širokému použitiu pyrénu ako značky, doteraz nie sú plne pochopené molekulárne pro-

Tabuľka I

Fluorescenčné značky používané na charakterizáciu prostredia<sup>31</sup>

Značka	Parameter	
	experimentálny	mikroskopický
Py	$I_1/I_3$ (vibračná štruktúra emisie)	polarita
PCA	$\lambda_{em}$	polarita
Dipyme	$[I_1/I_3]_{monomér}^{DP}$ , $I_{excimér}/I_{monomér}$	polarita, mikroviskozita
ANS	$\lambda_{em}$ , $\phi_{em}$	polarita
TNS	$\lambda_{em}$ , $\phi_{em}$	polarita
2-Metylantracén	$r$ (anizotropia emisie)	mikroviskozita
DPH	$r$ (anizotropia emisie)	mikroviskozita
Rhodamin 6G	$\lambda_{em}$	polarita
Proflavin	$\lambda_{em}$	polarita
Akridin	$\lambda_{em}$	polarita
Rhodamin 6G/Kumarín 1	$I_{Rh6G}/I_{Cl}$ (NRET – bezradiačný prenos energie)	veľkosť klastrov
Pyrén-1-sulfonát/naftalén-2-sulfonát	$I_{Py}/I_{Np}$ (NRET – bezradiačný prenos energie)	veľkosť klastrov
1-Metylpyrén	$I_{total}$ , $\tau$ (zhášanie)	$N_{agg}$ – priem. agregáčn. č.
$[Ru(bipy)_2]^{2+}$	$I_{total}$ , $\tau$ (zhášanie)	$N_{agg}$ – priem. agregáčn. č.

cesy vzájomného vzťahu medzi pomerom intenzít emisných pásov a polaritou rozpúšťadla<sup>34</sup>. Závislosť pyrénovej emisie od polaroty rozpúšťadla je vyjadrená pomerom intenzít  $I_1/I_3$  (alebo  $I_3/I_1$ ), kde pás  $I_1$  zodpovedá prechodu  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$  (0–0) a pás  $I_3$  prechodu  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=1}$ , pričom  $S_1$  je prvý singletový excitovaný stav a  $S_0$  je základný stav pyrénu (obrázok 1).

Tieto hodnoty sa pohybujú od ~1,9 v polárnych rozpúšťadlách (1,87 vo vode) do ~0,6 v uhľovodíkoch.

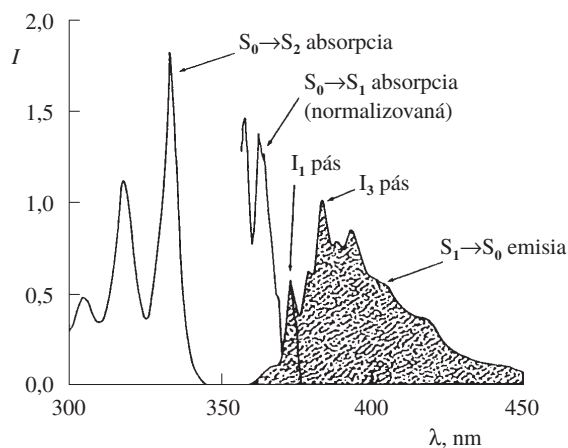
Iné polycyklické aromatické zlúčeniny, ktoré boli vyšetrené ako značky micelárnych a polymérnych systémov, sú fenantren a trifenyln<sup>35</sup>. Doteraz sa však nepoužili na prešetrenie interakcie polymér-rozpustená látka.

**P C A** : Užitočnou vlastnosťou 1-pyrénkarboxylaldehydu (PCA) v roztoku je závislosť jeho fluorescence od permitivity ( $\epsilon$ ) rozpúšťadla<sup>36</sup>. Stanovil sa empirický lineárny vzťah medzi vlnovou dĺžkou maxima emisie ( $\lambda_{em}^{max}$ ) a permitivitou ( $\epsilon$ ). Štúdium emisných vlastností PCA v širokej škále navrhnutých rozpúšťadiel však ukazuje, že závislosť je oveľa zložitejšia<sup>37</sup>.

**A N S** : Kvantový výťažok fluorescence ( $\phi_F$ ) 8-anilínonaftalén-1-sulfónovej kyseliny (ANS), definovaný ako pomer počtu emitovaných fotónov k počtu absorbovaných fotónov, vykazuje značnú závislosť od polaroty solvatačného prostredia<sup>38</sup>. Na hodnotu  $\phi_F$  môže vplývať množstvo ďalších faktorov. V najvšeobecnejšom prípade je kvantový výťažok fluorescence  $\phi_F$  daný vzťahom:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_Q[Q] + k_{IC} + k_{ISC} + k_P + k_{ET}} \quad (1)$$

pričom  $[Q]$  je koncentrácia ľubovoľného prítomného zhášadla,  $k_F$ ,  $k_Q$ ,  $k_{IC}$ ,  $k_{ISC}$ ,  $k_P$  a  $k_{ET}$  sú podľa poradia rýchlostné konštanty fluorescence, zhášania, vnútornej konverzie, medzysystémového prechodu, fotochemickej reakcie v excitovanom stave a prenosu energie<sup>39</sup>.



Obr. 1. Absorbčné a emisné spektrum pyrénu v cyklohexáne; pás (0–0) v absorbčnom spektre je normalizovaný k emisnému prechodu (0–0) (cit.<sup>34</sup>),  $I$  – normalizovaná

Vhodnými tripletovými značkami sa ukázali aj deriváty benzo-fenónu<sup>40</sup>, ktoré vykazovali silnejšiu emisiu pri 77 K a slabšiu pri laboratórnej teplote. Na klasifikáciu najnižšieho singletového stavu musí byť preskúmaný vplyv polaroty rozpúšťadla na posun najdlhovlnnejšieho pásu. Benzo-fenón vykazoval najnižší singlet typu  $n-\pi^*$ . Pretože singlet-tripletové rozštiepenie je nízke, triplet je tiež typu  $n-\pi^*$  (cit.<sup>40</sup>). Tento záver nie je všeobecne platný pre benzo-fenónové deriváty substituované v polohe 4. Lepšie vibračné rozlíšenie emisie sa pozorovalo pre monoketóny a alkylsubstituované antrachinóny v nepolárnych matriciach<sup>41,42</sup>. Vibračné rozlíšenie emisie sa podstatne nezlepšilo pre benzo-fenón. Vplyv polaroty rozpúšťadla na absorbčné spektrá sa koreloval s vplyvom polaroty polymérnej matrice na emisiu a jej zánik pre monoketóny benzo-fenónového typu<sup>40</sup> so snahou o kvalitatívne pochopenie faktorov vplyvajúcich na vibračnú štruktúru emisie týchto monoketónov. Vplyv polaroty polymérnej matrice na dobu



života monoketónov benzofenónového typu je menší ako na vibračné rozlíšenie.

Ďalšími vhodnými tripletovými značkami sú deriváty 1,2-diketónov. Hrdlovič a Lukáč<sup>43</sup> sledovali vplyv polymérneho prostredia na fotofyzikálne a fotochemické procesy derivátov 1,2-diketónov. Boli vyšetrené absorpčné a emisné spektrá derivátov benzilu a 1-fenylpropán-1,2-diónu v roztoku a v rôznych polymérnych matriciach. Najdlhovlnnejší absorpčný pás nízkej intenzity sa pri všetkých necyklických derivátoch posúval hypsochrómne od nepolárneho k polárnemu rozpúšťadlu, čo je typické pre  $n-\pi^*$  prechod. Najviac intenzívny druhý pás typu  $\pi-\pi^*$  sa posúval bathochrómne. V polymérnych matriciach bol pozorovaný nepatrný hypsochrómny posun s rozší-

rením emisného pásu. Doba života fosforescencie 1,2-diketónov leží v rozsahu 2–5 ms a emisia zaniká monoexponenciálne. Pri laboratórnej teplote zánik fosforescencie je oveľa rýchlejší a môže byť nafitovaný biexponenciálou.

Tripletné značky derivátov 1,2-diketónov sa môžu použiť ako donory, alebo akceptory tripletnej energie. Tieto procesy môžu byť monitorované zhášaním, alebo senzibilizáciou emisie<sup>44,45</sup>. Chromofóry typu nízkomolekulových 1,2-diketónov boli viazané na makromolekuly<sup>46,47</sup> a makromolekuly označené 1,2-diketónmi boli použité na štúdium rozličných fotofyzikálnych a fotochemických procesov.

Ako vhodnou fosforescencnou značkou sa ukazujú aj deriváty 9,10-antrachinónu<sup>42</sup>, ktorých emisia (fosforescencia) je

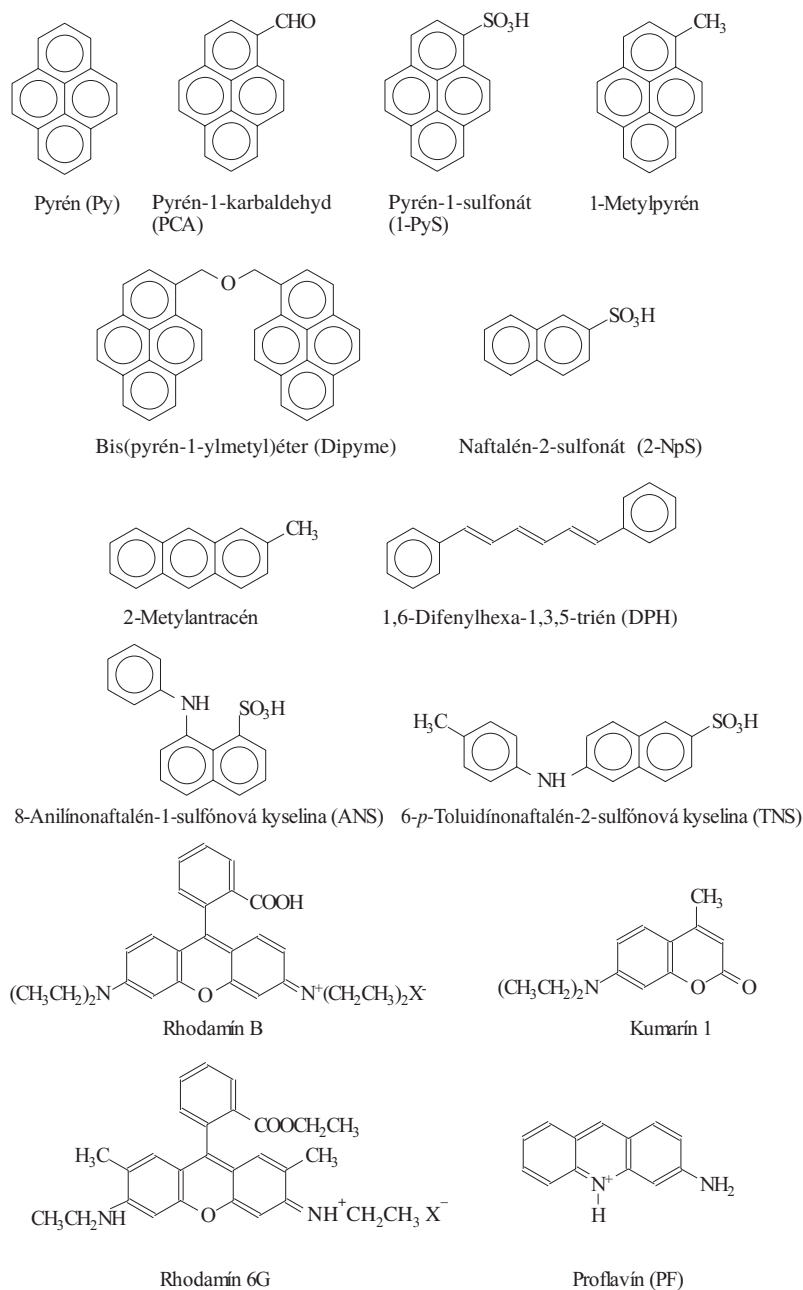


Schéma 1. Chemická štruktúra najbežnejších fluorescencných značiek

ovplyvnená polymérnou maticou. V nepolárnych uhľovodíkových maticiach boli získané spektrá s dobrým vibračným rozlíšením, pričom dominantnou bola základná vibrácia karbonylovej skupiny ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ). V polárnom poly(vinylalkohole) vibračná štruktúra úplne zaniká a intenzita klesá 5 až 10 krát. Vysoká fotochemická reaktivita vykazovaná 9,10-antrachinónom a jeho derivátmi bola využitá v rozličných aplikáciách, ako napr. pri zosieťovaní polymérov, senzibilizácii polymérnej degradácie a v experimentálnych systémoch na premenu a uskladnenie solárnej energie. Už dlho je jasné, že svetelná stabilita niektorých antrachinónových farbív v celulóзовých vláknach je dosť nízka<sup>48</sup>. Fotochemická reaktivita 9,10-antrachinónu a jeho derivátov silne závisí od substituentov a prostredia. Nedávno bolo ukázané, že polymérna matica silne vplyva na emisiu niektorých monoketónov a nesubstituovaného 9,10-antrachinónu, obzvlášť na vibračnú štruktúru emisie<sup>41</sup>.

Komplikujúcim faktorom využitia značiek môže byť ich pohyblivosť alebo difúzia, ktorá znemožní ich presnú a špecifickú lokalizáciu. Heppel<sup>49</sup> ukázal, že koeficient translačnej difúzie antracénu v roztoku nezávisí od prítomnosti polyizobutylénu, dokonca aj keď systém bol tak koncentrovaný, že sa tvoril gél. Na druhej strane v systémoch tvoriacich vodíkové väzby, ako napr. glycerol, ale aj poly(vinylalkohol) (PVA), alebo gél želatíny, sa rýchlosť difúzie značne znižuje. V prípade makromolekulových systémov sa zdá pravdepodobné, že pre tvorbu kavit voľného objemu, do ktorých sa môžu premiestniť difundujúce molekuly, je nevyhnutný koordinovaný pohyb bočných skupín v polyméri, ktorý je ovplyvnený vodíkovými väzbami. Buettner<sup>50</sup> získal podobné výsledky s vysušenými želatínovými filmami obsahujúcimi 1-naftol. Pozoroval intenzitu fluorescencie po záblesku od prítomnosti kyslíka v 1-naftol obsahujúcej matici a ukázal, že kyslík by mohol byť odstránený z blízkeho okolia 1-naftolu opakovaným zábleskom. V dôsledku tvorby vodíkových väzieb medzi peptidovými molekulami v želatíne je rýchlosť difúzie kyslíka značne menšia ako v polymérnych esteroch, napr. v PMMA, v ktorých je veľmi malá interakcia medzi refrazcami na účet vodíkových väzieb. Ďalším dôvodom zníženia rýchlosti difúzie v polyméroch s vodíkovými väzbami je, že napr. v želatíne a v PVA nedochádza k samozhášaniu tripletov, ktoré bolo pozorované pre 2-naftol alebo erytrozin. Toto pozorovanie naznačuje, že za týchto podmienok tieto molekuly nemôžu difundovať do takej vzdialenosti, aby nastala medzi nimi interakcia.

### 3. Tepelná história a prechody v pevnej fáze

Všeobecne je známe, že doba života fosforescencie rozličných prímiesnych molekúl v polyméroch alebo sklách tvorených malými molekulami závisí od času, uplynutého od vytvorenia skla. Napr. Martin a Kalantar<sup>50</sup> pozorovali, že doba života fosforescencie benzénu a príbuzných chromofórov v EPA sklách rastie v priebehu prvých 5–6 hodín od vytvorenia skla. Ak sa sklám poskytla relaxačná doba niekoľko hodín po meraní, nepozorovali sa žiadne zmeny. Tento efekt sa vyskytuje iba v takých sklách, u ktorých sa teplota sklovitého prechodu nachádza v intervale  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  od teploty merania ( $77\text{ K}$ ). V dôsledku veľkej makroskopickej viskozity polymérne sklá sa nikdy nebudú nachádzať v termodynamickovej rovnováhe pod teplotou sklovitého prechodu.

Fotofyzika prímiesnych molekúl môže úplne závisieť od

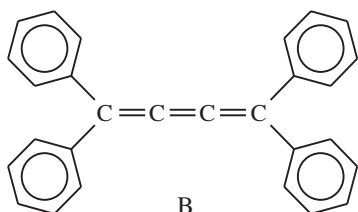
teploty, pri ktorej sa tvorí sklo. Tento efekt vidieť v práci Franka a Harraha<sup>52</sup>, kde koncentrácia excimérových centier v PS a v polyvinylnaftaléne rozpustenom v PS, závisí od teploty, pri ktorej bol film nanosený a sušený. Po sušení môžu byť merania uskutočnené pri značne nižších teplotách, čo neovplyvňuje na konformáciu makromolekúl a výslednú koncentráciu centier. Ak je teplota merania značne nižšia od teploty sklovitého prechodu polyméru, potom je málo pravdepodobné, aby boli možné veľké zmeny v konformácii makromolekúl a tým dochádzalo k premiestňovaniu a prípadne k čiastočnému zániku excimérových centier.

V polymérnej matici pri  $77\text{ K}$  je úplne zamrznutý solvatačný obal základného stavu rozpustenej dopovanej látky. Charakter solvatačného obalu základného stavu je daný jednak interakciou rozpustenej látky–polymérna matica (termodynamický efekt) a jednak spôsobom prípravy (kinetický efekt). Pri príprave filmov odlievaním z roztoku sa pri pomalom odparovaní vytvorí solvatačný obal, ktorý je energeticky optimálny pre základný stav. Komplikujúcim faktorom pri štandardnej príprave polymérnych filmov odlievaním môže byť rôzny stupeň agregácie dopovanej látky, i keď sa vychádza z homogénnych roztokov a finálne filmy sú opticky priehľadné. Pri príprave filmov lisovaním z prášku solvatačný obal rozpustených látok nie je pri danej teplote v termodynamickej rovnováhe, pretože príprava sa deje za značne nerovnovážnych podmienok a síce rýchle vyhriatie, lisovanie a rýchle ochladenie. Pri difúzii rozpúšťanej látky do polymérneho filmu obsadzuje molekula rozpustenej látky dostupné miesta v hmote polyméru. Pri semikryštalických materiáloch dopant vniká najmä do amorfnej časti a na rozhranie amorfnej a kryštalickej fázy. Obsadenie na rozhraní amorfnej a kryštalickej fázy je určené spôsobom prípravy.

Z údajov práce Somersalla a spol.<sup>53</sup> vidieť, že fosforescencia polymérov obsahujúcich bočnú karbonylovú a aromatickú skupinu závisí od teploty. Nespojitosť sa pozorovala na grafe závislosti logaritmu intenzity emisie od prevrátenej hodnoty teploty v zhode s rozmrazovaním niektorých typov molekulového pohybu. Zhášanie fosforescencie kyslíkom je v tomto prípade ďalším dôkazom toho, že pohyb kyslíka a ostatných malých molekúl cez polymérne matrice je uľahčený malými rotáciami a vibráciami bočných skupín hlavného polymérneho refazca. V dôsledku toho, že tieto pohyby zamrzajú pri teplote, ktorá sa približuje k absolútnej nule, difúzne koeficienty tiež dosiahnú zanedbateľné hodnoty.

### 4. Vplyv orientácie na fotoprocesy v maticiach

Dôležitá výhoda polymérnych matric v porovnaní s EPA sklami pri  $77\text{ K}$  alebo anorganickými sklami pri laboratórnej pozostáva v tom, že môžu byť ľahko orientované mechanickým natiahnutím. Táto vlastnosť bola využitá na štúdium optických vlastností orientovaných systémov malých molekúl v rozličných polymérnych maticiach. Napríklad, Bott a Kurucsev<sup>54</sup> študovali smer prechodových momentov malých molekúl podľa spektier dichroizmu v natiahnutých filmoch polyvinylalkoholu a polyetylénu (PE). Ako sondy sa použili malé molekuly naftalénu, antracénu, chinolínu a akridínu. Spomenutí autori<sup>54</sup> prišli k záveru, že distribúcia molekúl vo filmoch podľa orientácie nie je celkom určená tvarom molekúl a vo všeobecnom prípade hodnoty všetkých troch orientačných



parametrov pre každú molekulu treba určiť separovane pre každý systém rozpustená látka–polymérna matrica tak, aby sa zistil smer prechodového momentu zo spektier dichroizmu.

Podobný prístup použili Aviv a spol.<sup>55</sup>, ktorý študovali fotodimerizáciu tetrafenylbutatriénu (štruktúra B) v nematickom kvapalno-kryštalickom systéme a v orientovanom polyetyléne (PE). Kvantitatívna dimerizácia bola dosiahnutá v cholesterovej fáze, zatiaľ čo v amorfnej tavenine je potlačená. Dimerizácia prebieha aj v PE, ale kvantový výťažok 3× vzrastie v natiiahnutom orientovanom stave polyméru. Taktiež sa pozorovalo, že fotodimerizácia tetrafenylbutatriénu (II) neprebíha vo viskózných roztokoch parafínových olejov, ale prebieha v amorfnej fáze PE. Autori navrhli, že v polymérnom prostredí ako v natiiahnutých tak i v neorientovaných systémoch fotodimerizácia je uľahčená pri predĺžení doby života excitovaného stavu. Zdá sa pravdepodobným, že pozorované vplyvy sú určené preferenčnou orientáciou v kryštalickej fáze polyetylénu a v kvapalných kryštáloch.

## 5. Fotofyzikálne vlastnosti kumarínu a jeho derivátov

Kumarín (2*H*-1-benzopyrán-2-ón) a jeho deriváty sa hojne vyskytujú v prírode. Veľa prírodných a syntetických derivátov kumarínu sa využíva v rôznych aplikáciách v chémii, biológii, medicíne a fyzike. Prevažná časť aplikácií derivátov kumarínu je založená na ich luminiscenčných vlastnostiach. Z tohoto dôvodu sa venuje stále pozornosť príprave rôzne substituovaných derivátov kumarínu a tiež charakteristike ich spektrálnych vlastností.

Povaha najnižšieho excitovaného stavu kumarínu a niektorých jeho derivátov sa študovala<sup>56</sup> použitím statických a časovo-rozlišených fluorescenčných meraní pri laboratórnej teplote a taktiež využitím anizotropie fluorescencie pri 77 K v nepolárnych a polárnych rozpúšťadlách v spojitosti s teoretickými údajmi. Výsledky ukazujú, že najnižší excitovaný stav  $S_1$  nesubstituovaného kumarínu má  $n, \pi^*$  charakter v rozličných rozpúšťadlách, čo vedie k nízkej fluorescencii. Substitúcia v polohách 3–8 vedie k zmene charakteru tohoto  $S_1$  stavu z  $n, \pi^*$  na  $\pi, \pi^*$  a následne tým aj k vyššej intenzite fluorescencie. Problematikou určenia poradia elektronických stavov, zmiešavania stavov a následne fotofyzikálnym a fotochemickým vlastnostiam kumarínových systémov sa zaoberali aj skoršie práce<sup>57,58</sup>.

V súčasnosti je známe, že určité zlúčeniny, ktoré majú blízko ležiace excitované stavy o rozličnej konfigurácii, môžu prejavovať zvláštne vlastnosti s ohľadom na ich fotofyzikálne procesy. Existuje viacero príkladov<sup>59,60</sup>, ako je duálna emisia substituovaných dialkylanilínov, súvisiaca s relaxáciou stavu s torzným vnútromolekulovým prenosom náboja (TICT). Medzi zlúčeniny, kde najnižšie singletné  $n, \pi^*$  a  $\pi, \pi^*$  stavy môžu

silne vplyvať na fotofyzikálne vlastnosti, patria i niektoré kumarínové deriváty.

Nedávno bolo ukázané, že luminiscenčné vlastnosti 4-alkyl a 7-alkoxy derivátov kumarínu silne závisia od prostredia<sup>61</sup>. Spektroskopické štúdie spolu s výpočtami rýchlostnej konštanty radiačného prechodu indikujú, že 4-alkyl a 7-alkoxy substituenty nezmenia symetriu elektrónového oblaku kumarínového skeletu. Pozorované zmeny rýchlosti radiačného prechodu a tiež polohy absorpčného a emisného maxima môžu byť vysvetlené zmenami v elektrónovom prechodovom momente molekuly, spôsobené slabým donorným potenciálom substituentov. Stanovil sa výrazne vyšší kvantový výťažok a doba života fluorescencie niektorých derivátov kumarínu vo viskóznom glycerole ako v metanole, čo vedie k tvrdeniu, že torzná rotácia alkyl a alkoxy substituentov súvisí s rýchlosťou bezradiačnej vnútornej konverzie ( $k_{IC}$ ).

Fotofyzikálne vlastnosti 3-chlóro-7-metoxi-4-metylkumarínu sú ovplyvnené polaritou rozpúšťadla. Rýchlostná konštantá vnútornej konverzie ( $k_{IC}$ ) sa zmení až o 2 rády pri prechode od nepolárnych rozpúšťadiel k polárnej vode<sup>62</sup>. Dramatická zmena  $k_{IC}$  je spôsobená skutočnosťou, že tam je pokles aktivačnej energie vnútornej konverzie (bezradiačných procesov), pretože  $S_2 (n, \pi^*)$  stav je blízko ležiaci  $S_1 (\pi, \pi^*)$  stavu. S rastúcou polaritou rozpúšťadla sa rozšíri energetická medzera medzi týmito stavmi a klesá veľkosť tohoto efektu a následne rastie kvantový výťažok fluorescencie<sup>62</sup>. Fotofyzikálne vlastnosti niektorých derivátov kumarínu sú nevyhnutne určene vzájomnou lokalizáciou dvoch energeticky blízko ležiacich  $n, \pi^*$  a  $\pi, \pi^*$  singletných stavov, ktoré dovoľujú významné  $n, \pi^* - \pi, \pi^*$  zmiešavanie, závisiace od povahy substituenta a rozpúšťadla<sup>56</sup>.

Niektorí autori<sup>62–64</sup> pozorovali pokles kvantového výťažku fluorescencie pre kumarínové deriváty substituované v polohách 3–8 v polárnych rozpúšťadlách v porovnaní s nepolárnymi rozpúšťadlami. Neobyčajne veľký Stokesov posun sa pozoroval u derivátu kumarínu s dimethylaminovou skupinou v polohe 3 v dôsledku vnútromolekulového prenosu náboja<sup>63</sup> (ICT). Rôzne bezradiačné mechanizmy vedúce k dezaktivácii najnižšieho excitovaného stavu, ktoré konkurujú fluorescencii, sú vnútromolekulový prenos náboja<sup>63</sup> (ICT), tvorba torzného vnútromolekulového prenosu náboja<sup>64,65</sup> (TICT) a taktiež zmena planárnej na pyramidálnu konfiguráciu aminovej skupiny v excitovanom stave<sup>64</sup>. Napriek množstvu štúdií, úloha fotofyzikálnych dezaktivačných procesov prebiehajúcich v substituovaných kumarínoch nie sú stále dobre pochopené. Taktiež sa navrhlo<sup>65</sup>, že tvorba vodíkovej väzby môže vplyvať na fotofyzikálne vlastnosti niektorých kumarínových derivátov v roztoku. Fotofyzikálne vlastnosti derivátov 7-aminokumarínu vo vode sú veľmi odlišné od vlastností v alkoholových roztokoch spôsobených tvorbou špecifických vodíkových väzieb medzi rozpustenou látkou a protickým rozpúšťadlom. Tieto interakcie závisia od stupňa alkylácie aminovej skupiny a vplyvajú nie iba na posuny v absorpčných a emisných spektrách, ale tiež na bezradiačné dezaktivačné procesy (tvorba TICT stavu).

V centre záujmu fyzikov sú kumarínové deriváty ako aktívne prostredie vo farbičkových laseroch<sup>3–5</sup> a ako fotosenzibilizátory<sup>6,7</sup>. Viacerí autori charakterizovali deriváty kumarínu substituované v polohách 3–8 predovšetkým ako farbivá vhodné pre lasery<sup>64,66–69</sup>. Najúčinnnejšie ako laserové farbivá sú kumaríny substituované v polohe 7 elektrónodornou skupi-

nou ako hydroxy, alkoxy a amino, pričom v polohe 3,4 a 6 sú rôzne elektrónakceptorné skupiny. Zvýšenie účinnosti farbičkového lasera sa obvyčajne dosiahne cez zmenu prenosu energie vo farbičkovom-laserovom mechanizme<sup>69-71</sup>. Mechanizmus prenosu energie je ovplyvnený metódou excitácie a fluorescenčnými charakteristikami donorovej farbičky.

Množstvo rozličných materiálov sa testovalo ako pevné médium pre laserové farbičky, pričom polymérne matrice majú niekoľko dôležitých výhod, ako dobrá kompatibilita s organickými farbičkami, dobrá optická homogenita a sú prístupné k nenákladným výrobným technikám, ktoré by mohli uľahčiť miniaturizáciu a návrh integrovaných optických systémov. Nedávno bola opísaná účinná laserová emisia s dobrou stabilitou pre rozličné polymérne matrice dopované s rodaminovými a kumarínovými farbičkami<sup>72,73</sup>. Taktiež bol prešetrený vplyv rastúcej obmedzenosti mobility farbičkových molekúl na účinnosť lasera<sup>74</sup>. Účinnosť lasera klesá ak viskozita prostredia rastie, reflektujúci vplyv meniacej sa mobility molekúl a polarizácie prostredia na laserový výťažok. Získané výsledky naznačujú, že použitie prostredia s nižšou polaritou pre kumarínové farbičky vedie k nárastu laserovej účinnosti. Analýzou výsledkov získaných použitím difúznej teórie v izotropných látkach môžu byť získané difúzne koeficienty farbičkových molekúl v rozličných vzorkách.

Zaujímavé sú fotofyzikálne vlastnosti série kumarínových laserových farbičiek v prostredí vodného roztoku polyelektrolytu<sup>75</sup>. Kovalentné viazanie farbičky na poly(metakrylovú kyselinu) (PMAA) vo vode je ukázané cez pozorovanie výrazného modrého posunu fluorescenčného pásu a nárastu kvantového výťažku emisie, doby života a polarizácie oproti polárnym rozpúšťadlám. Systematická zmena fluorescenčných vlastností naznačuje, že hydrofóbne farbičky sa zdržujú v pomerne nepolárných a vysoko viskózných mikrodoménach vodných roztokov PMAA pri nižšom pH, pri ktorom je dôležitá kompaktná konformácia elektroneutrálneho polyelektrolytu. Prechod z hyperglobulovej konformácie môže byť ľahko sledovaný z odozvy fluorescencie kumarínových farbičiek ako vlnová dĺžka, kvantový výťažok alebo polarizačné údaje. Porovnanie fluorescenčných údajov vo vodnom roztoku PMAA s vodným roztokom glycerolu ukazuje, že mikroviskozita vo vnútri PMAA je takmer rovnaká ako v čistom glycerole (>5,0 poise pri 20 °C). Vplyv nízkopolárneho a vysokoviskózneho prostredia polymérnych domén zvýši energiu emisného ICT stavu a spomalí bezradiačný zánik ICT→TICT. Zvýšenie fluorescencie a rozpustnosti vo vode kumarínových farbičiek kovalentne viazaných na PMAA môže mať praktický význam pri použití týchto farbičiek ako aktívneho prostredia vo farbičkových laseroch.

Nedávno sa pozoroval výrazný nárast intenzity fluorescencie (až 7 krát) pre 7-(dietylaminó)-4-metylkumarín (Kumarín 1) v obmedzenom geometrickom usporiadaní v pórovitých nanokompozitoch<sup>76</sup>. Zabránenie agregácie kumarínovej farbičky a zmena kryštálového poľa v okolí molekuly Kumarínu 1 v priestoroch medzi nosnými piliermi v flovitom pórovitom nanokompozite zjavne vedie k zvýšeniu intenzity fluorescencie. Toto výrazné zvýšenie v intenzite fluorescencie je prisúdené izolácii molekuly Kumarínu 1 v priestoroch medzi piliermi s malými alebo žiadnymi interakciami medzi molekulami. Je jasné, že fluorescenčná účinnosť je vyššia u fluorescenčných značiek s rigidnou, planárnou štruktúrou<sup>76</sup> a agregácia týchto molekúl má určitú úlohu vo fluorescenčnom

zhášaní. Molekuly, ktoré tvoria diméry a väčšie agregáty, majú často zreteľne rozdielne absorpčné pásy. V niektorých prípadoch je pozorovaná slabá alebo žiadna fluorescencia. Vo všeobecnosti, molekuly sa agregujú vo väčšom rozsahu vo vode ako v organických rozpúšťadlách. Jednou z efektívnych ciest na zabránenie agregácie molekúl je izolovať molekuly v matici<sup>78,79</sup>. Pozitívne výsledky s vhodnými kumarínovými komplexami<sup>76</sup> navrhujú niekoľko možných aplikácií farbičkových nanokompozitov v lineárnej a nelineárnej optike.

Rezonančný prenos energie bol prešetrený na niekoľkých donor-akceptorových pároch<sup>80-82</sup>. Nedávno sa pozoroval rezonančný prenos energie medzi laserovými farbičkami odvodených od kumarínu v roztoku<sup>69,70,83</sup>. Experimentálne a teoretické hodnoty rýchlostných konštánt bezradiačného prenosu energie ( $k_{ET}$ ) a kritických prenosových vzdialeností ( $R_0$ ) boli stanovené v rozličných rozpúšťadlách. Získané výsledky a nezávislosť týchto hodnôt od viskozity rozpúšťadla naznačujú, že rezonančný prenos energie je dominantným mechanizmom. Molekulová štruktúra týchto laserových farbičiek sa zdá hrať dôležitú úlohu v účinnosti procesov prenosu energie. Na sérii kumarínových farbičiek, ktoré boli kovalentne viazané vo vodo-rozpustnom polyméri (poly(metakrylová kyselina), PMAA), boli prezentované charakteristiky rezonančného prenosu energie<sup>84</sup>. Účinný prenos singletnej energie sa uskutočňuje medzi kumarínovými farbičkami kovalentne viazanými na kompaktnú alebo globulovú formu PMAA vo vode. Viazanie v medziach polymérnych mikrodomén sa zdá určujúcim faktorom na uskutočnenie prenosu energie. Údaje prenosu energie sú získané zo zhášania fluorescencie donora, nárastu fluorescencie akceptora a významnej depolarizácie akceptorovej emisie.

Fotofyzikálne vlastnosti vybraných kumarínových značiek ako fluorescenčné maximum, kvantový výťažok, polarizácia alebo prenos energie, ktoré sú voľné alebo kovalentne viazané na polyméri, nás môžu informovať o mikroskopickom polarite a viskozite polymérnych mikrodomén. Z tohoto dôvodu kumarínové deriváty ako značky priťahujú pozornosť na monitorovanie rozličných aspektov prostredia.

## 6. Záver

Polymérne matrice vykazujú špecifické zvláštnosti, ktoré majú svoje prednosti najmä, čo sa týka pohodlnej manipulácie, dlhodobého uskladňovania vzoriek, špecifického usporiadania a obmedzenia vplyvu kyslíka. Kvalitatívne a kvantitatívne postihnutie týchto špecifických zvláštností bude hrať dôležitú úlohu pri použití polymérnych matric napr. ako nosičov pre laserové farbičky, alebo pri konštrukcii senzorov rôznych typov. Na príklade kumarínových derivátov, substituovaných v polohe 3, sme ukázali výraznú závislosť fotofyzikálnych procesov od prostredia a možnosti využitia týchto efektov.

## LITERATÚRA

1. Mayer A., Neuenhofer S.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 33, 1044 (1994).
2. Prasanna de Silva A., Gunaratne H. Q. N., Gunnlangsson T., Huxley A. J. M., Mc Coy C. P., Rudemacher J. T., Rice T. E.: *Chem. Rev.* 97, 1515 (1997).
3. Drexhage K. H., v knihe: *Dye Lasers* (Schäfer F. P., ed.), kap. 4. Springer-Verlag, Berlin 1970.



4. Haydon S. C.: Spectrosc. Lett. 8, 815 (1975).
5. Schimitschek E. J., Trias J. A., Hammond P. R., Henry R. A., Atkins R. L.: Opt. Commun. 16, 313 (1976).
6. Song S., Harter M. L., Moore T. A., Herndon W. C.: Photochem. Photobiol. 14, 521 (1971).
7. Tuveson R. W., Wang G. R., Becker R. S.: Photochem. Photobiol. 56, 341 (1992).
8. Schröder U., Diehl H. A.: Biochim. Biophys. Acta 913, 185 (1987).
9. Häberle W., Gruler H., Dutkowski Ph., Müller-Enoch D.: Z. Naturforsch. 45c, 273 (1990).
10. Pal R., Petri W. A. Jr., Ben-Yashar V., Wagner R. R., Barenholz Y.: Biochemistry 24, 573 (1985).
11. Kraayenhof R., Sterk G. J., Sang H. W. W. F.: Biochemistry 32, 10057 (1993).
12. Fauler G.: Appl. Fluor. Technol. 1, 14 (1989).
13. Lewis G. N., Lipkin D.: J. Am. Chem. Soc. 64, 2801 (1942).
14. Geacintov N., Oster G., Cassen T.: J. Opt. Soc. Am. 58, 1217 (1968).
15. Jousset-Dubien J., Lesclaux R.: Pure Appl. Chem. 34, 265 (1973).
16. Farid S., Martic P. A., Thompson D. R., Specht D. P., Hartman S. E., Williams J. L. R.: Pure Appl. Chem. 51, 241 (1979).
17. Suppan P.: J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 50, 293 (1990).
18. Pytela O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 53, 1333 (1988).
19. Schmidt E., Loelinger H., Zurcher R.: Helv. Chim. Acta 61, 488 (1978).
20. Guillet J. E.: *Polymer Photophysics and Photochemistry*. Cambridge University Press, Cambridge 1985.
21. Michl J., Thulstrup J. W.: *Spectroscopy with Polarized Light. Solute Alignment by Photoselection in Liquid Crystals, Polymers and Membranes*. VCH, Deerfield Beach 1986.
22. Salmassi A., Schnabel W.: Polym. Photochem. 5, 215 (1984).
23. Uznanski P., Kryszewski M., Thulstrup E. W.: Eur. Polym. J. 27, 41 (1991).
24. Phillips P. J.: Chem. Rev. 90, 425 (1990).
25. Nadolski B., Uznanski P., Kryszewski M.: J. Macromol. Sci. Phys. B23, 221 (1984).
26. Shpolskii E. U.: Sov. Phys. Usp. 3, 372 (1960).
27. Vo-Dinh T., Suter G. W., Kallir A. J., Wild U. P.: J. Chem. Phys. 89 3026 (1985).
28. Wehry E. L., Mamantov G.: Prog. Anal. Spectrosc. 10, 507 (1987).
29. Bolt J. D., Turro N. J.: Photochem. Photobiol. 35, 305 (1982).
30. Cline-Love L. J., Skrilec M.: Anal. Chem. 53, 1872 (1981).
31. Winnik F. M., Regismond S. T. A.: Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 118, 5 (1996).
32. Kalyanasundaram K., Thomas J. K.: J. Am. Chem. Soc. 99, 2039 (1977).
33. Dong D. C., Winnik M. A.: Can. J. Chem. 62, 2560 (1984).
34. Karpovich D. S., Blanchard G. J.: J. Phys. Chem. 99, 3951 (1995).
35. Nakashima K., Tanaka I.: Langmuir 9, 90 (1993).
36. Thomas J. K.: Chem. Rev. 80, 283 (1980).
37. Dederen J. C., Coosemens L., DeSchryver F. C., Van Dormael A.: Photochem. Photobiol. 30, 443 (1979).
38. Trauble H., Overpath P.: Biochim. Biophys. Acta 307, 491 (1973).
39. Turro N. J.: *Modern Molecular Photochemistry*. Benjamin-Cummings, Menlo Park 1978.
40. Hrdlovič P., Srnková K.: Eur. Polym. J. 28, 1279 (1992).
41. Hrdlovič P.: Polym. Photochem. 7, 359 (1986).
42. Hrdlovič P., Taimr L., Pospíšil J.: Polym. Deg. Stab. 25, 73 (1989).
43. Hrdlovič P., Lukáč I.: Polym. Deg. Stab. 43, 195 (1994).
44. Backstrom H. J. L., Sandros K.: Acta Chem. Scand. 14, 46 (1960).
45. Daneček J., Hrdlovič P., Lukáč I.: Eur. Polym. J. 12, 513 (1976).
46. Lukáč I., Zvara I., Hrdlovič P.: Eur. Polym. J. 18, 427 (1982).
47. Gebert M. S., Torkelson J. M.: Polymer 31, 2402 (1990).
48. McKellar J. F.: Radiat. Res. Rev. 3, 141 (1971).
49. Heppel G. E.: Photochem. Photobiol. 4, 7 (1965).
50. Buettner A. V.: J. Phys. Chem. 68, 3253 (1964).
51. Martin T. P., Kalantar A. H.: J. Phys. Chem. 72, 2256 (1968).
52. Frank C. W., Harrah L. A.: J. Chem. Phys. 61, 1526 (1974).
53. Sommersall A. C., Dan E., Guillet J. E.: Macromolecules 7, 233 (1974).
54. Bott C. C., Kurucsev T.: J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2 71, 749 (1975).
55. Aviv G., Sagiv J., Yogev A.: Mol. Cryst. 36, 349 (1976).
56. Seixas de Melo J. S., Becker R. S., Maçanita A. L.: J. Phys. Chem. 98, 6054 (1994).
57. Haydon S. C.: Spectrosc. Lett. 8, (1975) 815.
58. Schulman S. G.: *Molecular Luminescence Spectroscopy* (Schulman S., ed.), sv. 1. Wiley-Interscience, New York 1985.
59. Rettig W.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 25, 971 (1986).
60. Zachariasse K., Grobys M., von der Haar Th., Hebecker A., Illichev Y., Kühnle W., Morawski O.: J. Inf. Recording 22, 553 (1996).
61. Heldt J. R., Heldt J., Ston M., Diehl H. A.: Spectrochim. Acta, Part A 51, 1549 (1995).
62. Seixas de Melo J. S., Becker R. S., Elisei F., Maçanita A. L.: J. Chem. Phys. 107, 6062 (1997).
63. Gáplovský A., Hrdlovič P., Donovalová J., Hrnčiar P.: J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 59, 221 (1991).
64. Arbeloa T. L., Arbeloa F. L., Arbeloa J. L.: J. Lumin. 68, 149 (1996).
65. Rechthaler K., Köhler G.: Chem. Phys. 189, 99 (1994).
66. Arbeloa T. L., Arbeloa F. L., Tapia M. J., Arbeloa J. L.: J. Phys. Chem. 97, 4704 (1993).
67. Raju B. B., Varadarajan T. S.: J. Phys. Chem. 98, 8903 (1994).
68. Raju B. B., Varadarajan T. S.: J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 85, 263 (1995).
69. Raju B. B., Varadarajan T. S.: Laser Chem. 16, 109 (1995).
70. Raju B. B., Varadarajan T. S.: J. Lumin. 55, 49 (1993).

71. Saito Y., Nomura A., Kano T.: Appl. Phys. Lett. 53, 1903 (1988).
72. Sastre R., Costela A.: Adv. Mater. 7, 198 (1995).
73. Costela A., Garcia-Moreno I., Figuera J. M., Amat F., Sastre R.: Appl. Phys. Lett. 68, 593 (1996).
74. Costela A., Garcia-Moreno I., Barroso J., Sastre R.: Polym. Prepr. 37, 236 (1996).
75. Jones II G., Rahman M. A.: J. Phys. Chem. 98, 13028 (1994).
76. Włodarczyk P., Komarneni S., Roy R., White W. B.: J. Mater. Chem. 6, 1967. (1996)
77. Förster Th.: *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*. Vanderhoeck and Ruprecht, Göttingen 1951.
78. Avnir D., Levy D., Reisfeld R.: J. Phys. Chem. 88, 5956 (1984).
79. Tanaka H., Takahashi J., Tsuchiya J.: J. Non-Cryst. Solids 109, 164 (1989).
80. Speiser S., Katararo R.: Opt. Commun. 27, 287 (1978).
81. Ware W.: J. Am. Chem. Soc. 83, 4374 (1961).
82. Bennet R. G., Kellogg R. E.: J. Photochem. Photobiol. 7, 571 (1968).
83. El-Kemary M. A.: Can. J. Anal. Sci. Spectrosc. 43, 95 (1998).
84. Jones II G., Rahman M. A.: Chem. Phys. Lett. 200, 241 (1992).

**P. Hrdlovič and M. Kaholek** (*Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*): **Use of Luminescence Probes for Spectral Characterization of Polymer Matrices**

Main features of polymers as supports for spectral measurements are summarized. Spectral characteristics of selected singlet and triplet probes, such as absorption and emission maxima, quantum yield and lifetime of emission, their anisotropy and energy transfer, are evaluated with respect to their use in common polymer matrices. Photophysical processes of 3-substituted coumarin derivatives are analyzed and their suitability for application as singlet probes in polymer matrices is evaluated.

---

## NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

---

**DOPORUČENÍ IUPAC****NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts**

A unified scale is recommended for reporting the NMR chemical shifts of all nuclei relative to the  $^1\text{H}$  resonance of tetramethylsilane. The unified scale is designed to provide a precise resonance frequency  $X$  in a magnetic field in which the  $^1\text{H}$  resonance of TMS in dilute solution (<1 % by volume) in chloroform is exactly 100 MHz. Referencing procedures are discussed, including matters of practical application of the unified scale. Secondary reference samples are recommended for each nucleus, and the relevant values of  $X$  are listed, many of which are the results of new measurements.

Some earlier recommendations relating to the reporting of chemical shifts are endorsed, though a minor change to the definition of the  $\delta$  scale is suggested. Relations between the Unified scale and recently published recommendations for referencing in aqueous solutions (for specific use in biochemical work) are mentioned, as well as the special effects of working in the solid state with magic-angle spinning. In all, nine new recommendations relating to chemical shifts are made. Standardized nuclear spin data are presented in tabular form for the stable (and some unstable) isotopes of all elements with nonzero quantum numbers. The information given in-

cludes quantum numbers, isotopic abundances, magnetic moments, magnetogyric ratios, receptivities, and, where appropriate, quadrupole moments and linewidth factors.

Otiskujeme synopse názvoslovných návrhů z oboru chromatografie, které připravila komise IUPAC pro molekulární strukturu a spektroskopii. Návrhy jsou určeny k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR  
Heyrovského nám. 2  
162 06 Praha 6  
tel. (02) 20403322, fax 35357981  
e-mail: kah@imc.cas.cz

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 30. června 2001 na adresu:

Prof. Robin K. Harris  
Department of Chemistry  
University of Durham  
South Road  
Durham DH1 3LE, United Kingdom  
tel. +44 191-374-3121, fax +44 191-386-1127  
e-mail: r.k.harris@durham.ac.uk

### Děkan přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy

*vypisuje*

**konkurs na přijetí do doktorského studia**

**Studium bude zahájeno 1. října 2001 v oborech**

***biologických, ekologických, chemických, geologických a geografických***

Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém oboru.

Příhlášky a podrobné informace na adrese:

PřF UK, odd. vědecké výchovy

Albertov 6, 128 43 Praha 2

tel. 02/21952419, 21952244

Příhlášky se přijímají **do 30.4.2001**

Česká komise pro makromolekulární nomenklaturu\* předkládá se souhlasem Českého komitétu pro chemii české znění dokumentu Mezinárodní unie čisté a užité chemie (IUPAC)\*\* z roku 1994 jako vhodnou pomůcku pro grafický popis polymerů v běžné chemické praxi a při publikování výsledků základního i aplikovaného výzkumu. Dokument uvádí reprezentativní paletu příkladů všech druhů polymerů, včetně jejich názvů založených na struktuře i názvů založených na názvech monomerů. V názvech jsou již uplatněny nedávné změny v názvosloví organické chemie.

## GRAFICKÁ ZNÁZORNĚNÍ (CHEMICKÉ VZORCE) MAKROMOLEKUL (Doporučení IUPAC 1994)

*Ubi materia, ibi geometria*  
J. Kepler (1571–1630)

### Souhrn

Jednoznačné grafické znázornění molekul je zvláště důležité u makromolekul, neboť ty často vykazují větší počet strukturních znaků než molekuly o nízké molekulové hmotnosti. Například vzorec kopolymeru by měl přímo naznačovat, zda znázorňuje kopolymer blokový nebo kopolymer s nespecifikovaným pořadím monomerních jednotek. Tak dvojblokový kopolymer, složený z bloku majícího  $p$  monomerních jednotek A a bloku obsahujícího  $q$  monomerních jednotek B se znázorní vzorcem  $-(A)_p(B)_q-$  zatímco odpovídající nahodilý kopolymer se popíše vzorcem  $(-A-l-B-)_n$ , při čemž  $p + q = n$ .

Souhrnně řečeno, dokument uvádí pravidla a příklady pro grafické znázornění opakujících se konstitučních jednotek, monomerních jednotek, regulárních a iregulárních polymerů s jednoduchou i složitou strukturou, a to včetně homopolymerů organických i anorganických, kopolymerů střídavých a periodických, kopolymerů statistických, nahodilých a s neurčenou strukturou, kopolymerů blokových a roubovaných, včetně hvězdicových polymerů. Navržené grafické znázornění chemických vzorců polymerů je vhodné pro grafické počítačové programy.

### Úvod

Grafická znázornění (chemické vzorce) makromolekul jsou široce používána ve vědecké literatuře o polymerech, včetně dokumentů IUPAC o názvosloví makromolekul<sup>1</sup>. Předložený dokument stanoví pravidla pro jednoznačné znázornění struktury makromolekul chemickými vzorci. Pravidla se v zásadě týkají syntetických makromolekul. Pokud je to možné, jsou tato pravidla v souladu se vzorci v dokumentech IUPAC<sup>1-6a</sup> se vzorci iregulárních makromolekul<sup>7</sup>, molekul kopolymerů<sup>1-3,8</sup> a hvězdicových makromolekul.

Ve srovnání s chemickými vzorci molekul o nízké molekulové hmotnosti musí být chemické vzorce polymerů navíc schopny znázornit, že se konstituční jednotky v makromolekule opakují a různým způsobem spojují.

Termín konstituční jednotka<sup>2,3</sup> se v celém textu používá jak pro opakující se konstituční jednotku<sup>2,3</sup>, tak pro monomerní jednotku<sup>2,3</sup>; jeden z těchto typů konstitučních jednotek by měl být použit vždy, kdykoliv je to možné a vhodné.

Chemické vzorce makromolekul by se v zásadě měly psát jen v těch případech, kdy je struktura konstitučních jednotek známá. Danou strukturu lze však pro zdůraznění specifických strukturních rysů napsat různými způsoby; takové alternativní struktury nemusí nezbytně odrážet pořadí uvádění názvů podle pravidel názvosloví založeného na struktuře<sup>4</sup>.

## 1. Obecná pravidla

Pravidlo 1.1: Znázornění konstituční jednotky vzorcem má být ve shodě se zvyklostmi v organické<sup>9,10</sup> a anorganické chemii<sup>11</sup> a s pravidly IUPAC pro názvosloví polymerů<sup>1-8</sup>.

Pravidlo 1.2: Pořadí uvádění konstitučních jednotek ve vzorcích je v souladu se strukturou makromolekuly libovolné, a proto nemusí vyhovovat pravidlům udaným v cit.<sup>4</sup>

Pravidlo 1.3: Pomlčky znázorňující chemické vazby se mohou vynechat, aby vzorec byl co nejsevěřenější. Na koncích opakujících se konstitučních jednotek musí být pomlčky připojeny.

*Poznámka 1.3:* Úpuštění od jedné či více pomlček u chirálního nebo prochirálního atomu nebo pomlček u atomů spojených dvojnou vazbou znamená, že konfigurace odpovídajícího místa stereoizomerie není známa nebo se úmyslně nespecifikuje<sup>1-3,5</sup>.

Pravidlo 1.4: Postranní skupiny nebo substituenty obsahující více než jeden symbol atomu a napsané na stejném řádku jako hlavní řetězec makromolekuly se dávají do závorek, obvykle kulatých.

Pravidlo 1.5: Závorky a indexy vyznačují opakování konstituční jednotky. Závorky jsou kulaté nebo hranaté a mohou být použity libovolně s výjimkou anorganických polymerů, pro něž se doporučuje užívat k tomu účelu výhradně kulaté závorky, aby se zabránilo záměně za hranaté závorky, označující koordinační struktury.

Pravidlo 1.6: Indexy  $n$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $r$  atd. vyznačují násobnost polymerních sekvencí, indexy  $a$ ,  $b$ ,  $c$  atd. vyznačují mnohonásobnost oligomerních sekvencí. Indexy by měly být vytištěny kursivou. Není-li kursiva k dispozici, měly by být indexy podtržené.

Pravidlo 1.7: Jsou-li koncové skupiny známy, mohou se jejich vzorce připojit k vazbám na koncích konstitučních jednotek vně závorek.

Pravidlo 1.8: Údaje o hmotnostním zlomku ( $w$ ), molárním zlomku ( $x$ ), molární hmotnosti ( $M$ ), relativní molekulové hmotnosti

\* Členové komise: M. Beneš, P. Čefelín, J. Kahovec, J. Kotasť, P. Kratochvíl, B. Meissner, J. Roda, J. Vohlídal.

\*\* Pure Appl. Chem. 66, 2469–2482 (1994).



( $M_p$ ), polymerizačním stupni (DP) nebo o jejich průměrných hodnotách lze vyjádřit tak, že se příslušné hodnoty zapíší v kulatých závorkách za vzorcem makromolekuly obdobným způsobem, jaký se doporučuje pro pojmenování kopolymerů<sup>8</sup>. Použití obecných pravidel je objasněno v následujících oddílech.

## 2. Regulární polymery

Pravidlo 2.1: Regulární polymer (cit.<sup>2,3</sup>, definice 3.1) s opakující se konstituční jednotkou (cit.<sup>2</sup>, definice 3.3) —R— se znázorňuje vzorcem



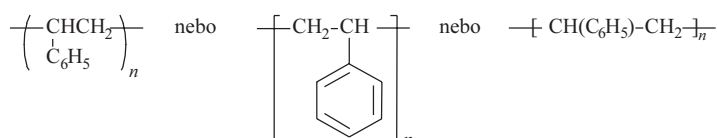
a v případech, kde jsou známy koncové skupiny E' a E'', vzorcem



*Poznámka 2.1:* Chemické vazby spojující opakující se konstituční jednotky se znázorňují pomlčkami protínajícími závorky.

*Příklady\*\**

2-E1: poly(1-fenylethylen)  
polystyren

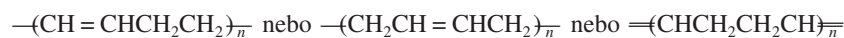


2-E2: syndiotaktický poly(1-fenylethylen)  
syndiotaktický polystyren

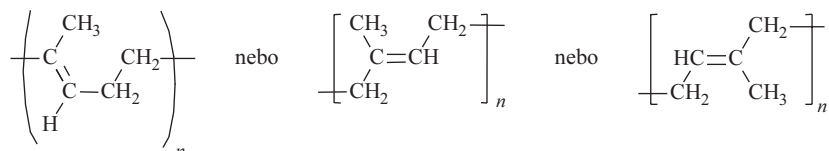


*Poznámka:* Analogické vzorce mohou být nakresleny pro ostatní taktické makromolekuly<sup>5</sup>.

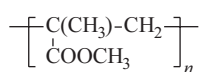
2-E3: poly(but-1-en-1,4-diyl)  
1,4-polybutadien



2-E4: poly(1-methyl-*trans*-but-1-en-1,4-diyl)  
*trans*-1,4-polyisopren



2-E5: poly[1-(methoxykarbonyl)-1-methylethylen]  
poly(methyl-methakrylát)



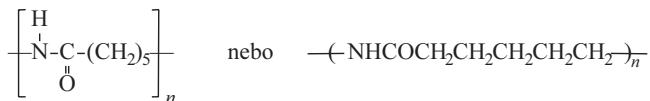
2-E6: poly(oxyethylenoxytereftaloyl)  
poly(ethylen-tereftalát)



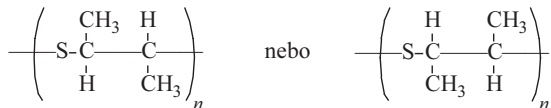
\* Nejprve se uvádějí systematické názvy založené na struktuře<sup>1,4-6,12</sup> a pak následují názvy odvozené od názvů monomerů, názvy semisystematické nebo názvy triviální<sup>1,4-6,12</sup>, pokud existují. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

\*\* Zobrazené vzorce opakujících se konstitučních jednotek nejsou jediné možné.

2-E7: poly[imino(1-oxohexan-1,6-diy)]  
poly( $\epsilon$ -kaprolaktam), poly(hexano-6-laktam)

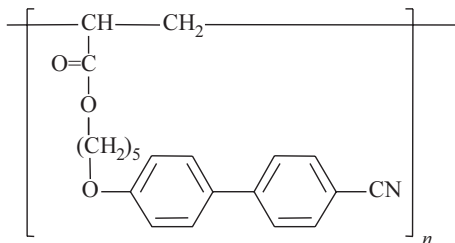


2-E8: poly[thio-(*R,R*)-1,2-dimethylethylen] nebo poly[thio-(*S,S*)-1,2-dimethylethylen]  
poly[*cis*-(*R,S*)-dimethylthiiran]



*Poznámka:* Při enantioselektivní polymerizaci *cis*-(*R,S*)-2,3-dimethylthiiranu může vznikat poly[thio-(*R,R*)-1,2-dimethylethylen] nebo jeho enantiomer.

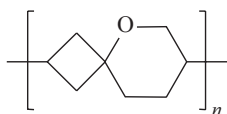
2-E9: poly{1-[(5-[(4'-kyanbifenylyl)oxy]pentyl)oxy]karbonyl}ethylen}



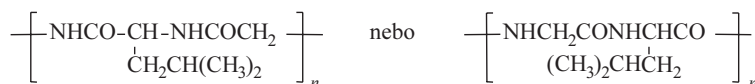
2-E10:  $\alpha$ -hydro- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylen)  
poly(ethylenglykol)



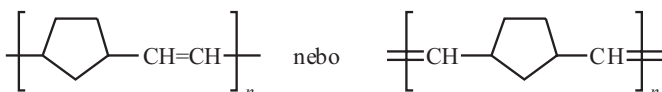
2-E11: poly(5-oxaspiro[3.5]nonan-2,7-diy)



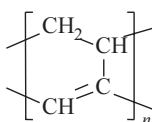
2-E12: poly[imino(2-isobutyl-1-oxoethylen)imino(1-oxoethylen)]  
poly(glycylleucin)



2-E13: poly(cyklopentan-1,3-diylethen-1,2-diy)  
polynorboren

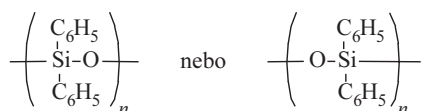


2-E14: poly(but-1-en-1,4:3,2-tetrayl) (cit.<sup>12</sup>)  
ladder-poly[methyl(vinyl)keton] (cit.<sup>12</sup>)

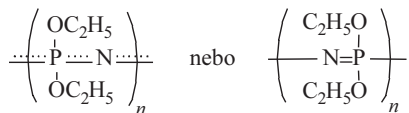


*Poznámka:* Název tohoto žebříkovitého polymeru, odvozený od monomeru, udává výchozí monomer pro syntézu, která spočívá ve víceetapové reakci zahrnující kondenzaci a cyklizaci.

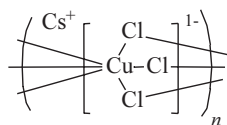
2-E15: *catena*-poly[(difenylsilicium)- $\mu$ -oxo] (cit.<sup>6</sup>) nebo  
poly[oxy(difenylsilandiyl)] (cit.<sup>4,9</sup>)  
poly(difenylsiloxan)



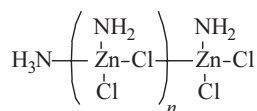
2-E16: *catena*-poly[(diethoxofosfor)- $\mu$ -nitrido] (cit.<sup>6</sup>) nebo  
poly[nitrilo(diethoxyfosforanylyliden)]



2-E17: *catena*-poly{cesium[kuprát-tri- $\mu$ -chloro](1-)} nebo  
*catena*-poly{cesium[kuprát(II)-tri- $\mu$ -chloro]}



2-E18:  $\alpha$ -ammin- $\omega$ -(amminchlorozinek)-*catena*-poly[(amminchlorozinek)- $\mu$ -chloro]



### 3. Iregulární polymery<sup>2,3,7</sup>

Pravidlo 3.1: Iregulární polymer (cit.<sup>2,3</sup>, definice 3.2) nebo iregulární blok (cit.<sup>2,3</sup>, definice 3.16), obsahující konstituční jednotky –U–, –V–, –W–, atd., se popisuje vzorcem



*Poznámka 3.1.1:* Řada teček naznačuje přítomnost dalších konstitučních jednotek.

*Poznámka 3.1.2:* Pořadí konstitučních jednotek ve vzorci je libovolné.

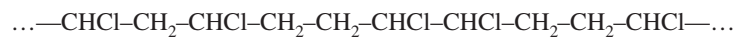
*Poznámka 3.1.3:* Šikmé lomítko mezi konstitučními jednotkami znamená, že pořadí těchto jednotek je nepravidelné nebo neznámé.

*Poznámka 3.1.4:* Pomlčky na koncích vzorce se zakreslují uvnitř závorek, protože nemusí znamenat koncové chemické vazby makromolekul\*.

*Poznámka 3.1.5:* Správnost výběru konstitučních jednotek by měla být vždy prověřena jejich opakováním ve vzorcích, tedy vytvořením vzorců o delších sekvencích. Tímto způsobem lze vyloučit kombinace konstitučních jednotek, které se v makromolekulách nevyskytují.

*Příklady\*\**

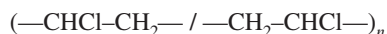
3-E1: poly(1-chlorethylen/2-chlorethylen)  
(iregulární polymer odvozený od vinylchloridu, jehož jednotky jsou spojeny hlava k patě i hlava k hlavě),



s monomerními jednotkami:  $-\text{CHCl}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CHCl}-$

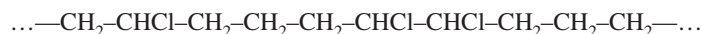
\* Poznámka České komise: Pomlčky u každé konstituční jednotky se píšou dlouhé (stejně jako pomlčky vyznačující propojení bloků), neboť kterákoliv z nich může znamenat chemickou vazbu na konci bloku.

\*\* Nejprve jsou uvedeny názvy založené na struktuře<sup>7</sup> a potom vysvětlení (v závorkách), je-li nutné. Pak následují vzorec segmentu makromolekuly, monomerní nebo konstituční jednotky nutných k popisu úplné struktury a navrhovaný vzorec. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

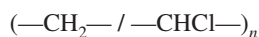


*Poznámka:* Řada teček vyznačuje pokračování makromolekulárního řetězce.

- 3-E2: poly(chlormethylen/methylen)  
(chlorovaný polyethylen, který neobsahuje dichlormethylenové jednotky)

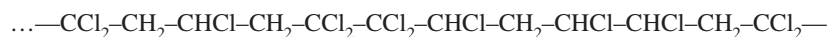


s monomerními jednotkami: —CH<sub>2</sub>—, —CHCl—

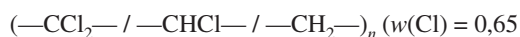


Viz poznámka k 3-E1.

- 3-E3: poly(chlormethylen/dichlormethylen/methylen)  
(chlorovaný poly(vinylchlorid) s hmotnostním zlomkem chloru 0,65),

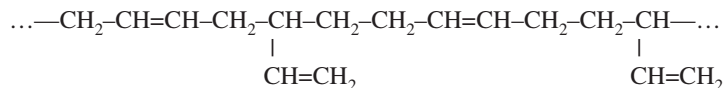


s konstitučními jednotkami: —CCl<sub>2</sub>—, —CH<sub>2</sub>—, —CHCl—

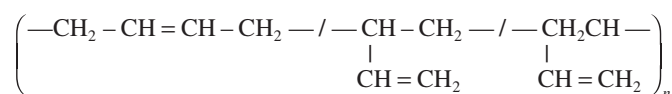


Viz poznámka k 3-E1.

- 3-E4: poly(but-2-en-1,4-diyll/1-vinylethylen/2-vinylethylen)  
(iregulární polymer obsahující jednotky vzniklé polymerizací buta-1,3-dienů 1,4- a 1,2-adicí):

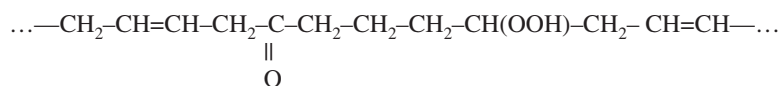


s monomerními jednotkami: —CH<sub>2</sub>—CH=CH—CH<sub>2</sub>—, —CH—CH<sub>2</sub>—  
|  
CH=CH<sub>2</sub>

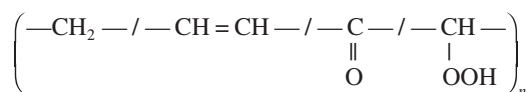


Viz poznámka k 3-E1.

- 3-E5: poly(karbonyl/hydroperoxymethylen/methylen/ethen-1,2-diyll) (oxidovaný polyethylen):

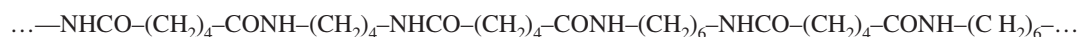


s konstitučními jednotkami: —CH<sub>2</sub>—, —CH=CH—, —C—, —CH(OOH)—  
||  
O



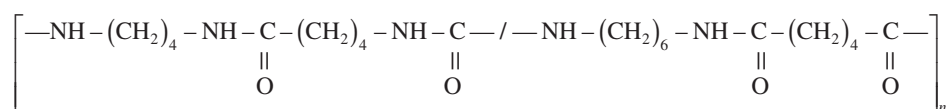
Viz poznámka k 3-E1.

- 3-E6: poly(iminohexan-1,6-diylliminoadipoyll/iminobutan-1,4-diylliminoadipoyll)  
(polyamid odvozený od adipoylchloridu a směsi hexan-1,6-diaminu a butan-1,4-diaminu),



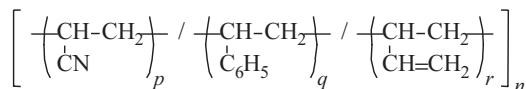
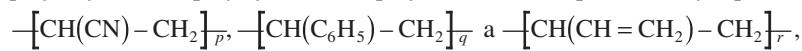
s konstitučními jednotkami: —NH—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—NHCO—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—CO—, —NH—(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>—NHCO—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—CO—





Viz poznámka k 3-E1.

3-E7: poly[poly(1-kyanethylen)/poly(1-fenylethylen)/poly(1-vinylethylen)] (iregulární polymer složený z regulárních bloků polyakrylonitrilu, polystyrenu a 1,2-polybutadienu s nespecifikovaným pořadím bloků<sup>\*</sup>



*Poznámka:* Volba konstitučních jednotek je diktována pravidlem 1.1 a pravidly v cit.<sup>1,4</sup>, např. 1-kyanethylen má přednost před jednotkou 2-kyanethylen.

## 4. Kopolymery

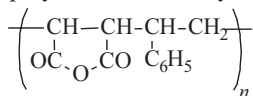
### 4.1. Alternující a periodické kopolymery

Pravidlo 4.1.1: Alternující a periodické kopolymery jsou, pokud je to možné, pokládány za regulární polymery.

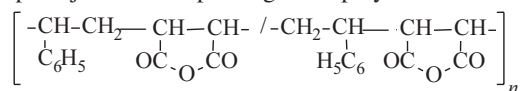
Pravidlo 4.1.2: Pseudoperiodické kopolymery, například takové, v nichž se jen některé konstituční jednotky opakují pravidelně, se považují za iregulární polymery (viz poznámka k příkladu 4.1-E1) nebo za nespecifikované kopolymery (viz příklad 4.1-E3).

*Příklady*<sup>\*\*</sup>

4.1-E1: poly(styren-*alt*-maleinanhydrid)  
poly[2,5-dioxotetrahydrofuran-3,4-diyl(1-fenylethylen)]



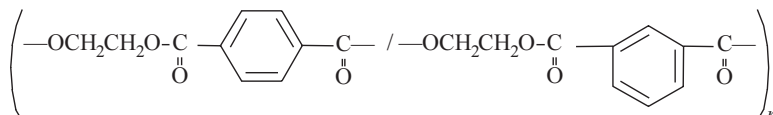
*Poznámka:* V případech, kdy jsou přítomny jednotky 1-fenylethylenu i 2-fenylethylenu v měřitelných množstvích, použije se vzorec pro iregulární polymer:



4.1-E2: poly(formaldehyd-*per*-ethylenoxid-*per*-ethylenoxid)<sup>\*\*\*</sup> nebo poly(oxymethylenoxyethylenoxyethylen)



4.1-E3: poly(ethylen glykol-*alt*-(tereftalová kyselina; isoftalová kyselina)]  
poly(ethylen-tereftalát)-*co*-ethylen-isoftalát)



\* Poznámka České komise: srov. Pravidlo 4.3.2.

\*\* Nejprve se uvádějí názvy kopolymerů založené na názvech monomerů<sup>1,4,8</sup>, pak systematické názvy založené na struktuře, pokud existují, a následuje navržený vzorec. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

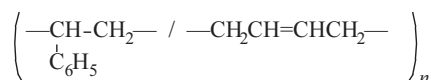
\*\*\* Poznámka České komise: Název monomeru „ethylenoxid“ by měl být nahrazen názvem „oxiran“ v souladu s doporučením IUPAC k názvosloví organických látek.

## 4.2. Statistické, nahodilé a nespécifikované kopolymery

Pravidlo 4.2.1: Statistické, nahodilé a nespécifikované kopolymery se považují za iregulární polymery.

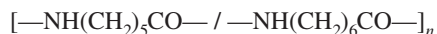
Příklady\*

4.2-E1: poly(styren-*stat*-buta-1,3-dien)

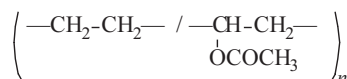


*Poznámka:* Buta-1,3-dien je zabudován 1,4-adicí, to však název založený na názvu monomeru není schopen postihnout.

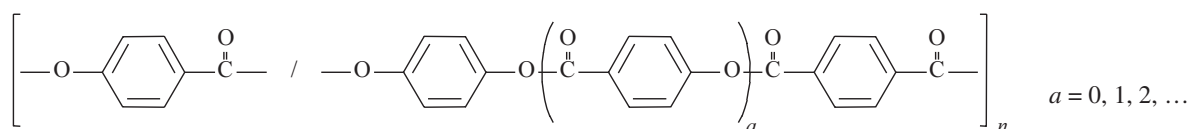
4.2-E2: poly[(6-aminohexanová kyselina)-*stat*-(7-aminoheptanová kyselina)]



4.2-E3: poly(ethylen-*ran*-vinyl-acetát)

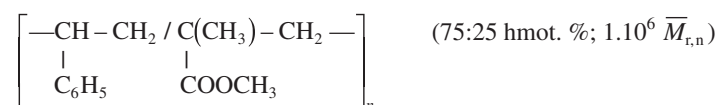


4.2-E4: poly[(4-hydroxybenzoová kyselina)-*co*-hydrochinon-*co*-tereftalová kyselina]

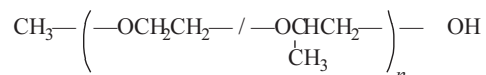


*Poznámka:* V tomto grafickém znázornění se předpokládá, že se uplatňují jen esterifikační reakce.

4.2-E5: poly(styren-*co*-methyl-methakrylát) (75:25 hmot. %;  $1 \cdot 10^6 \bar{M}_{r,n}$ )



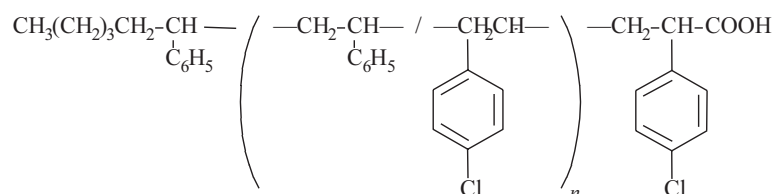
4.2-E6:  $\alpha$ -methyl- $\omega$ -hydroxy-poly(ethylenoxid-*co*-propylenoxid)\*\*,\*\*



*Poznámka:* Pomlčky znázorňující vazby koncových skupin neprotínají závorky ve vzorci polymeru, protože vzorec nespécifikuje, která koncová skupina je připojena ke které monomerní jednotce.

4.2-E7:  $\alpha$ -butyl- $\omega$ -karboxy-poly[styren-*co*-(4-chlorstyren)]

$\alpha$ -(1-fenylhexyl)- $\omega$ -[2-(4-chlorfenyl)-2-karboxyethyl]-poly[styren-*co*-(4-chlorstyren)] (cit.<sup>8</sup>)



Viz poznámka k 4.2-E6.

\* Nejprve je vždy uveden název kopolymery založený na názvech monomerů<sup>1,8</sup>, pak název založený na struktuře, pokud existuje, nakonec pak navržený vzorec. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

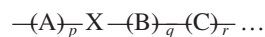
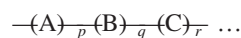
\*\* Podle cit.<sup>10</sup> by měl být název „propylenoxid“ nahrazen názvem „2-methyloxiran“.

\*\*\* Poznámka České komise: Podle cit.<sup>10</sup> by měl být i název monomerní jednotky „ethylenoxid“ nahrazen názvem „oxiran“.

*Poznámka:* Vzorec je přesnější než udává prvý z uvedených názvů, neboť ukazuje, že koncová skupina butyl je připojena v poloze 2 skupiny 1-fenylethyl a koncová karboxylová skupina je navázána v poloze 2 skupiny 2-(4-chlorfenyl)ethyl.

#### 4.3. Blokované kopolymery

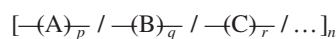
Pravidlo 4.3.1: Vzorce blokovaných kopolymerů (cit.<sup>2,3</sup>, definice 3.35) tvořených sledem regulárních bloků (cit.<sup>2,3</sup>, definice 3.15), a spojovacích jednotek (pokud jsou známy; viz<sup>8</sup>, pravidlo 5.5) ve známém pořadí se zapisují např. takto:



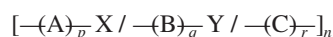
kde A, B, C atd. jsou opakující se konstituční jednotky regulárních bloků  $-(A)_p$ ,  $-(B)_q$ ,  $-(C)_r$  atd. a  $-X-$ ,  $-Y-$  atd. jsou spojovací jednotky, které se nepovažují za součásti bloků.

*Poznámka 4.3.1:* Řada teček vyznačuje přítomnost dalších konstitučních jednotek nebo bloků nebo jednotek i bloků.

Pravidlo 4.3.2: Vzorce blokovaných kopolymerů tvořených sledem regulárních bloků a spojovacích jednotek, pokud jsou známy, v neznámém pořadí, se zapisují tak, že se vzorce bloků, a spojovacích jednotek oddělí šikmým lomítkem. Například vzorec



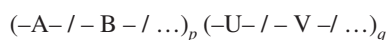
znázorňuje blokovaný kopolymer tvořený neznámým pořadím regulárních bloků  $-(A)_p$ ,  $-(B)_q$ ,  $-(C)_r$  atd. a



znázorňuje blokovaný kopolymer tvořený neznámým pořadím regulárních bloků  $-(A)_p$ ,  $-(B)_q$  a  $-(C)_r$  se spojovacími jednotkami  $-X-$  nebo  $-Y-$  připojenými k  $-(A)_p$ , respektive  $-(B)_q$ .

*Poznámka 4.3.2:* Řada teček vyznačuje přítomnost dalších konstitučních jednotek nebo bloků nebo jednotek i bloků.

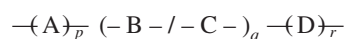
Pravidlo 4.3.3: Blokovaný kopolymer, tvořený sledem iregulárních bloků, se popisuje vzorcem



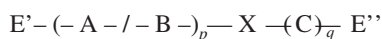
kde A, B atd. a U, V atd., jsou opakující se konstituční jednotky iregulárních bloků  $(-A- / -B- / \dots)_p$   $(-U- / -V- / \dots)_q$ .

*Poznámka 4.3.3.1:* Řada teček vyznačuje přítomnost dalších konstitučních jednotek nebo bloků nebo jednotek i bloků.

*Poznámka 4.3.3.2:* Vazby směřující od prvé a poslední konstituční nebo spojovací jednotky iregulárního bloku se píší uvnitř závorek, když není známo, ke kterým jednotkám iregulárního bloku jsou ostatní bloky nebo koncové skupiny připojeny. Tak



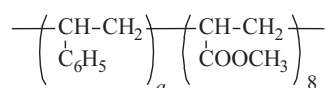
znázorňuje blokovaný kopolymer, v němž je iregulární blok  $(-B- / -C-)_q$  (viz pravidla 3.1 a 1.6) je zapojen mezi regulární bloky  $-(A)_p$  a  $-(D)_r$  zatímco



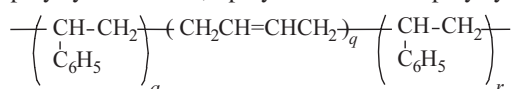
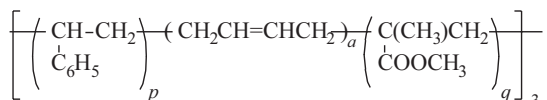
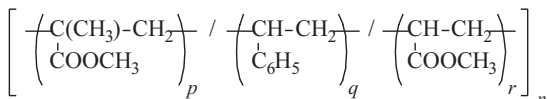
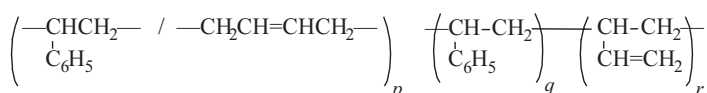
znázorňuje blokovaný kopolymer, v němž je iregulární blok  $(-A- / -B-)_p$  připojen jedním koncem ke koncové skupině E' a druhým koncem prostřednictvím spojovací jednotky  $-X-$  k regulárnímu bloku  $-(C)_q$  s koncovou skupinou E''.

#### Příklady\*

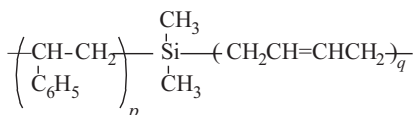
4.3-E1: oligostyren-*block*-oktakis(methyl-akrylát)



\* Uvedeny jsou názvy založené na názvech monomerů a navrhovaný vzorec. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

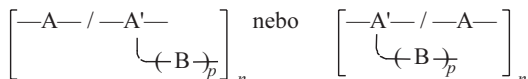
4.3-E2: polystyren-*block*-1,4-polybutadien-*block*-polystyren4.3-E3: tris[polystyren-*block*-1,4-oligobutadien-*block*-poly(methyl-methakrylát)]4.3-E4: poly[poly(methyl-methakrylát)-*block*-polystyren-*block*-poly(methyl-akrylát)]4.3-E5: poly(styren-*stat*-buta-1,3-dien)-*block*-polystyren-*block*-1,2-polybutadien

Viz poznámka k 4.2-E1.

4.3-E6: polystyren-*block*-dimethylsilandiyl-*block*-1,4-polybutadien

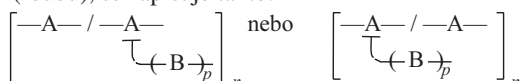
## 4.4. Roubované kopolymery

Pravidlo 4.4.1: Vzorec roubovaného kopolymery tvořeného hlavním polymerním řetězcem monomerních jednotek A, k níž je ve známých polohách připojen k některým monomerním jednotkám A neznámý počet bloků monomerních jednotek B (roubů), se zapisuje takto

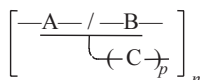


kde A' označuje monomerní jednotku A, která je modifikována substitucí roubem.

Pravidlo 4.4.2: Vzorec roubovaného kopolymery tvořeného hlavním polymerním řetězcem monomerních jednotek A, k níž je v neznámých místech připojen k některým monomerním jednotkám A neznámý počet bloků monomerních jednotek B (roubů), se zapisuje takto:



kde vodorovná úsečka pod nemodifikovanou monomerní jednotkou \*\* značí, že poloha připojení roubu není známa.



*Poznámka:* Je-li hlavní řetězec roubovaného kopolymery sám kopolymerem tvořeným monomerními jednotkami A a B a není-li známo, ve kterém místě a ke které z jednotek A, B jsou rouby  $\text{—(C)—}_p$  připojeny, zapíše se vzorec takto:

\* Poznámka České komise: Uveden je obecný vzorec iregulárního polymeru, avšak pravidlo lze využít i pro regulární polymery (alternující a periodické kopolymery, blokový kopolymer s regulárními bloky ve známém pořadí).

\*\* Poznámka České komise: Ve vzorci určitého kopolymery se formálně zakresluje nemodifikovaná monomerní jednotka, ačkoliv ve skutečnosti jde o substituovanou monomerní jednotku.



Pravidlo 4.4.3: Je-li znám, zapisuje se průměrný počet roubů v molekule kopolymeru ( $i$ ) v závorkách za vzorcem

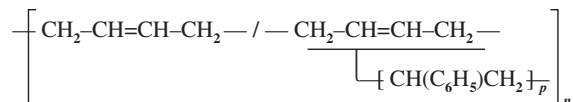


Viz Pravidla 4.4.1 (pro A') a 4.4.2.

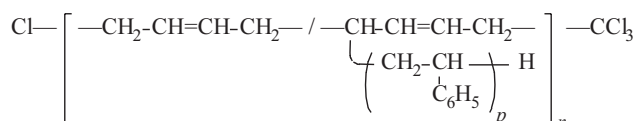
#### Příklady\*

4.4-E1: 1,4-polybutadien-*graft*-polystyren

(a: bloky polystyrenu naroubované na jednotky but-2-en-1,4-diyl v neznámých polohách)

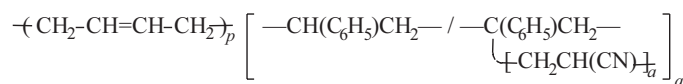


(b: bloky polystyrenu naroubované na jednotky but-2-en-1,4-diyl ve známé poloze s tím, že na jednom konci hlavního řetězce je koncovou skupinou chlor a na druhém trichlormethyl a na volné konce bloků polystyrenu jsou navázány jako koncové skupiny vodíky.



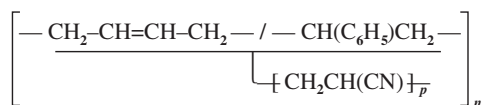
4.4-E2: 1,4-polybutadien-*block*-(polystyren-*graft*-oligoakrylonitril)

(rouby polyakrylonitrilu vázané na dvojblokovém kopolymeru 1,4-polybutadien-polystyren ve známé poloze některých monomerních jednotek odvozených od styrenu.



4.4-E3: poly(buta-1,3-dien-*stat*-styren)-*graft*-polyakrylonitril

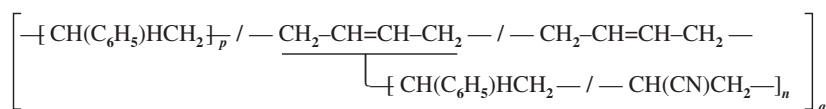
(polyakrylonitril naroubovaný na statistický kopolymer buta-1,3-dien-styren v nespecifikovaných polohách)



Viz poznámka k 4.2-E1.

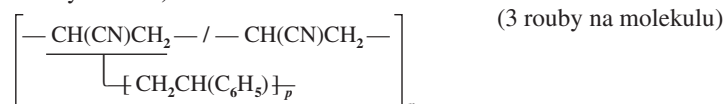
4.4-E4: polystyren-*block*-[1,4-polybutadien-*graft*-poly(styren-*co*-akrylonitril)]

(kopolymer styrenu a akrylonitrilu naroubovaný na dvojblokový kopolymer 1,4-polybutadien-polystyren v nespecifikovaných polohách některých jednotek but-2-en-1,4-diylu)



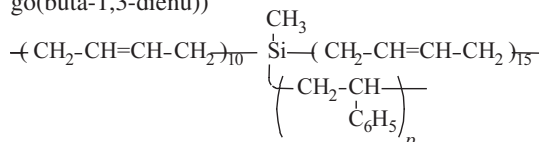
4.4-E5: polyakrylonitril-tris(-*graft*-polystyren)

(tři rouby polystyrenu vázané na jedné molekule polyakrylonitrilu v nespecifikovaných polohách monomerní jednotky z akrylonitrilu)



\* Nejprve jsou uvedeny názvy založené na názvech monomerů, pak vysvětlení v závorkách a posléze navržený vzorec. V poznámkách k příkladům 4.4-E6 a 4.4-E7 jsou uvedeny názvy hvězdicových kopolymerů založené na struktuře. (Viz cit.<sup>10</sup>, pokud jde o změny od doby vydání cit.<sup>9</sup>)

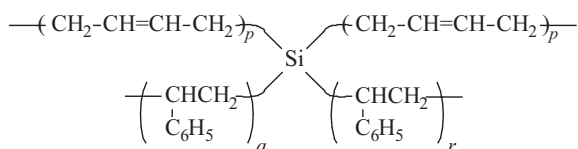
4.4-E6: deka(buta-1,3-dien)-*block*-(methylsilantriyl-*graft*-polystyren)-*block*-pentadeka(buta-1,3-dien)  
(hvězdicový kopolymer, v němž na centrální methylsilanovou jednotku jsou navázány polystyren a dva řetězce oligo(buta-1,3-dienu))



*Poznámka:* Buta-1,3-dien se navazuje výhradně 1,4-adicí, což nelze vyjádřit v názvu založeném na názvech monomerů. Název založený na struktuře<sup>7</sup> zní:

[deka(but-2-en-1,4-diyl)][pentadeka(but-2-en-1,4-diyl)][poly(2-fenylethylen)]methylsilan.

4.4-E7: polystyren-*block*-[silantetrayl-bis[-*graft*-poly(buta-1,3-dien)]]-*block*-polystyren nebo  
poly(buta-1,3-dien)-*block*-[silantetrayl-bis(-*graft*-polystyren)]-*block*-poly(buta-1,3-dien)  
(hvězdicový kopolymer, kde na centrální Si atom jsou navázány dva řetězce polystyrenu a dva řetězce poly(buta-1,3-dienu))



*Poznámka:* Buta-1,3-dien se navazuje výhradně 1,4-adicí, což nelze vyjádřit v názvu založeném na názvech monomerů. Název založený na struktuře<sup>7</sup> zní:

bis[poly(but-2-en-1,4-diyl)][poly(1-fenylethylen)][poly(2-fenylethylen)silan.

## LITERATURA

1. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Compendium of Macromolecular Nomenclature* („Purple Book“). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991.
2. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Basic Definitions of Terms Relating to Polymers* (1974), *Pure Appl. Chem.* 40, 477–491 (1974). Přetištěno jako kapitola 1 v kompendiu<sup>1</sup> (viz předcházející reference). Český překlad: *Chem. Listy* 79, 281 (1985).
3. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Glossary of Basic Terms in Polymer Science* (1996); *Pure Appl. Chem.* 68, 2283–2311 (1996).
4. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature of Regular Single-Strand Organic Polymers* (1975), *Pure Appl. Chem.* 48, 373–385 (1976). Přetištěno jako kapitola 5 v kompendiu<sup>1</sup>. Český překlad: *Chem. Listy* 81, 290 (1987).
5. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Stereochemical Definitions and Notations Relating to Polymers* (1980), *Pure Appl. Chem.* 53, 733–752 (1981). Přetištěno jako kapitola 2 v kompendiu<sup>1</sup>. Český překlad: *Chem. Listy* 90, 371 (1996).
6. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature for Regular Single-Strand and Quasi-Single-Strand Inorganic and Coordination Polymers* (1984), *Pure Appl. Chem.* 57, 149–168 (1985). Přetištěno jako kapitola 6 v kompendiu<sup>1</sup>.
7. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature for Irregular Single-Strand Organic Polymers*, *Pure Appl. Chem.* 66, 873–889 (1994). Český překlad: *Chem. Listy* 90, 888 (1996).
8. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Source-Based Nomenclature for Copolymers* (1985), *Pure Appl. Chem.* 57, 1427–1440 (1985). Přetištěno jako kapitola 7 v kompendiu<sup>1</sup>. Český překlad: *Chem. Listy* 84, 843 (1990).
9. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H* („Blue Book“). Pergamon Press, Oxford 1979. České znění: *Nomenklatura organické chemie* (Pravidla IUPAC 1979, oddíly A, B, C, D a F). Academia, Praha 1985.
10. International Union of Pure and Applied Chemistry: *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993. České znění: *Průvodce názvoslovím organických sloučenin podle IUPAC (Doporučení 1993)*, Academia, Praha 2000.
11. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature of Inorganic Chemistry, Recommendations 1990* (tzv. „Red Book“). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1990.
12. International Union of Pure and Applied Chemistry: *Nomenclature of Regular Double-Strand (Ladder and Spiro) Organic Polymers*, *Pure Appl. Chem.* 65, 1561–1580 (1993). Český překlad: *Chem. Listy* 92, 415 (1989).

### Czech Commission for Macromolecular Nomenclature: Graphic representations (chemical formulae) of macromolecules (IUPAC Recommendations 1994)

The document provides rules and examples for the graphic representation of constitutional repeating units and monomeric units, regular and irregular polymers of simple as well as complex structures, including organic and inorganic homopolymers, alternating and periodic copolymers, statistical, random and unspecified copolymers, block copolymers and graft copolymers, including star polymers. The proposed graphic representations of chemical formulae for polymers are suitable for presentation through graphics computer programs.

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENÍ OBSAHU LASALOCIDU V KRMIVECH METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ PRO OBSAHY MENŠÍ NEŽ 5 mg/kg

MICHAL DOUŠA

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno; Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň

Došlo dne 18. XI.1999

Klíčová slova: HPLC, lasalocid, krmivo

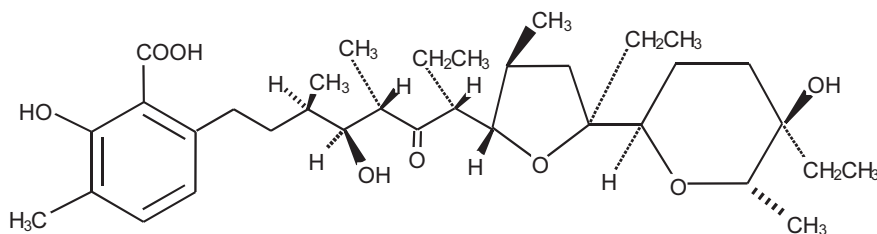
### Úvod

Lasalocid (obr. 1), ionoforní polyetherická monokarboxylová kyselina, se používá jako účinné antikokcidikum ve výkrmu kuřat a krůtat a odchovu kuřic a bažantů řádově v obsazích 75 až 125 mg/kg finálního krmiva<sup>1</sup> a ochranná lhůta je 5 dnů. Jeho objev<sup>2</sup>, struktura<sup>3-5</sup> a aktivita<sup>6,7</sup> jako antikokcidika byly již popsány.

Jako oficiální metoda zkoušení v České republice i v členských státech Evropské unie se dosud používá difuzní plotnová metoda na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (cit.<sup>8</sup>). Obdobnou oficiální metodou je metoda sdružení Association of Official Analytical Chemists<sup>9</sup> (AOAC). Spektrofluorimetrická metoda stanovení lasalocidu v krmivech je rovněž metodou AOAC<sup>10</sup>, která je relativně rychlá a poskytuje reprodukovatelné výsledky i přes složitou matici a řadu používaných čistících kroků extraktu v této metodě. Lasalocid je extrahován octanem ethylnatým v přítomnosti acátového pufru o pH 4,7 a takto získaný extrakt je přečištěn extrakcí s kyselinou chlorovodíkovou a následně s hydroxidem sodným. Korekce pozadí se provádí převedením lasalocidu do komplexu kyselina boritá–lasalocid, přičemž dochází k posunutí maxima emisního spektra k nižším vlnovým délkám z 430 nm na 419 nm a současně dochází k hypochromnímu efektu<sup>11</sup>. Vlivem přidavku hydroxidu sodného během přípravy vzorku dochází k retroaldolovému štěpení lasalocidu<sup>3</sup> a v závislosti na množství hydroxidu klesá rychle výtěžnost metody.

Stanovení lasalocidu v premixech a krmných směsích metodou HPLC s fluorescenční detekcí je poprvé popsáno v metodě<sup>12</sup>, která je velmi rychlá a mez detekce se pohybuje od 3 do 15 mg/kg v závislosti na matici vzorku, kdy významnou úlohu hraje vliv přítomných karotenoidů. Lasalocid je extrahován mobilní fází a separace lasalocidu probíhá na reverzní fázi. Výsledky jsou v dobré shodě s metodou spektrofotometrickou<sup>10</sup>. HPLC metoda výhodně spojuje selektivitu separačního procesu s velmi selektivní a citlivou detekcí. Dále byla popsána řada prací stanovení lasalocidu v různých zvířecích tkáních a krvi<sup>13-16</sup>, kdy tyto publikace vycházely z již zveřejněné práce<sup>12</sup>, byla však nutná modifikace extrakce lasalocidu ze vzorku (ethyl-acetát/acetonitril) a dále pak separace na chromatografické koloně na silikagelu tak, aby vzhledem k jiné matici vzorku docházelo k separaci píku lasalocidu na základní linii. Výtěžnost metody<sup>13</sup> dosahuje v závislosti na obsahu lasalocidu pouhých 30 % až 90 %; u metody<sup>16</sup> se mez detekce pohybuje kolem 25 µg/kg a výtěžnost metody okolo 70 % pro obsahy lasalocidu 25 µg/kg až 1 mg/kg. Metoda HPLC stanovení lasalocidu s postkolonovou derivatizací<sup>17</sup>, která využívá derivatizační reakce hydroxyskupiny molekuly polyetherových monokarboxylových kyselin s aromatickým aldehydem (vanilinem) v prostředí kyseliny sírové při teplotě 95 °C za vzniku barevného aduktu. Metoda umožňuje stanovení monensinu, salinomycinu, narasinu a lasalocidu vedle sebe. Předností metody je zanedbatelný vliv matrice vzorku a poměrně vysoká selektivita detekce; nevýhodou je malá citlivost metody a vysoká mez stanovitelnosti. Derivatizační reakce karboxylové funkční skupiny molekuly lasalocidu byly využity i při předkolonové derivatizaci a následném stanovení metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Jako činidla se používají 1-(bromacetyl)pyren v acetonitrilu v alkalickém prostředí triethylaminu za přítomnosti katalyzátoru kryptofixu K-222 (cit.<sup>18</sup>) nebo 9-anthryldiazomethan<sup>19</sup>. Nevýhodou obou uvedených metod je velká experimentální náročnost, celková doba analýzy a nízká reprodukovatelnost výsledků. Derivatizace karboxylové skupiny 1-(bromacetyl)pyrenem<sup>18</sup> vyžaduje dvojí přečištění extraktu na silikagelu – jednak přečištění extraktu před vlastní derivatizací a následně i vlastní derivátu. Derivatizace 9-anthryldiazomethanem<sup>19</sup> naopak vyžaduje acetylaci lasalocidu ještě před vlastní derivatizační reakcí.

Na základě požadavků zákona o krmivech §7 (cit.<sup>20</sup>) Ministerstvo zemědělství České republiky ukládá monitorování výskytu nežádoucích doplňkových látek u výrobků uváděných do oběhu. V souladu s koncepcí pro monitorování nežádou-



Obr. 1. Strukturální vzorec lasalocidu

cích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která umožňuje stanovení lasalocidu ve stopových koncentracích a zároveň snižuje pravděpodobnost interference matrice.

## Experimentální část

### Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika) a přečištění extraktu bylo provedeno na separační jednotce BAKER spe 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování extraktu bylo provedeno na koncentrátoru vzorků Termovap (ECOM, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládá z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), fluorescenčního detektoru W474 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Byla použita chromatografická kolona NovaPak C<sub>18</sub>, 4 μm, 3,9×150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoku bylo měřeno na pH-metru pH 526 (WTW, SRN).

### Chemikálie

Methanol, dichlormethan, kyselina octová byly čistoty pro HPLC (J.T. Baker, USA); hexan a octan ethylnatý čistoty p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika); ostatní chemikálie čistoty pro analýzy (Merck, SRN).

Extrakční směs byla připravena smísením 200 ml octanu ethylnatého a 800 ml hexanu. Promývací činidlo pro extrakci na silikagelu bylo připraveno smísením 8 ml acetonu a 192 ml dichlormethanu. Eluční činidlo pro extrakci na silikagelu bylo připraveno smísením 12 ml methanolu a 188 ml dichlormethanu.

Mobilní fáze byla připravena smísením 200 ml octanového pufru o pH 4,0 s 800 ml methanolu. Octanový pufr byl připraven rozpuštěním 3,402 g trihydrátu octanu sodného v deionizované vodě (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA), přidáním 5,0 ml kyseliny octové a doplněním na 1 litr. pH tohoto roztoku bylo upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 4,0.

Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg.l<sup>-1</sup> byly připraveny postupným ředěním základního roztoku lasalocidu (Riedel-deHaën, SRN) v methanolu o koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup> mobilní fázi.

### Výběr vzorků

Pro analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17 (cit.<sup>20</sup>).

### Pracovní postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. 45 g

zkušební vzorku se extrahuje 150 ml extrakční směsí 30 minut v 500 ml kónické baňce na laboratorní třepačce. Na kolonku Spe-Pak Plus Silica, kondicionovanou 4 ml dichlormethanu, se odměří 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Kolonka se promyje 3 krát 3 ml promývacího činidla a lasalocid se eluuje 8 ml elučního činidla do vialky na 10 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku do sucha při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze, promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 8 000 ot.min<sup>-1</sup> a nanáší na chromatografickou kolonu. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I  
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm, 3,9×150 mm
Složení mobilní fáze	methanol–octanový pufr pH 4,0 (800+200)
Průtok mobilní fáze	1 ml.min <sup>-1</sup>
Teplota kolony	okolí
Objem nástřiku	10 μl
Detektor fluorescenční	excitační vlnová délka: 310 nm, emisní vlnová délka: 430 nm

## Výsledky a diskuse

### Mez detekce a mez stanovitelnosti

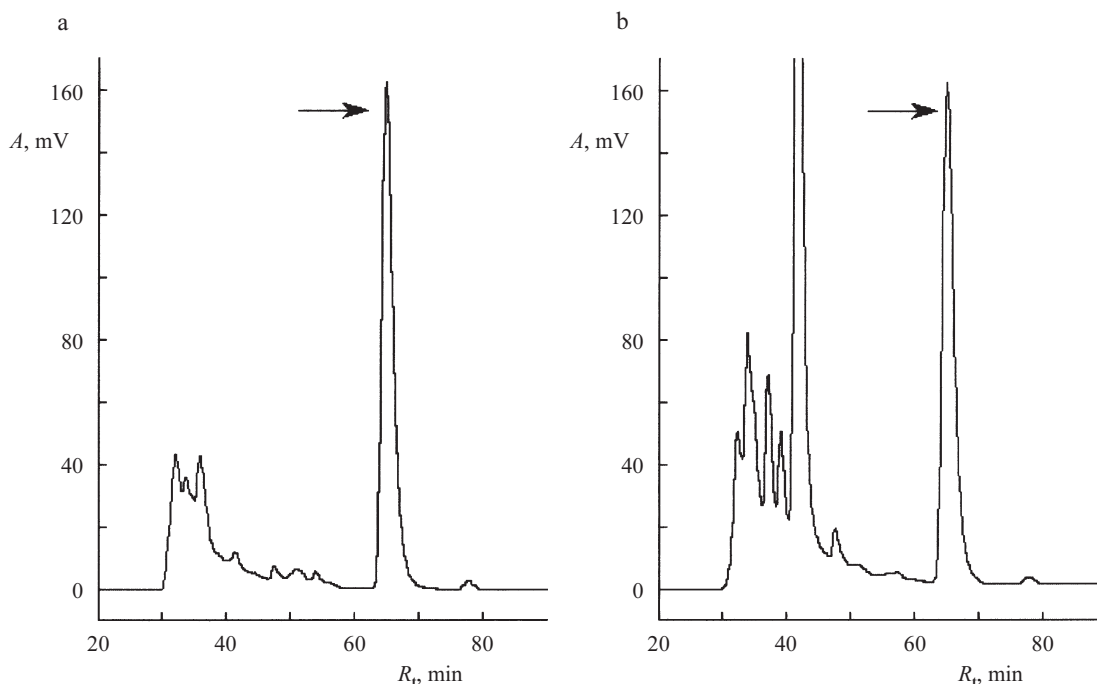
Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez (1-α)%ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle rovná hodnotě 0,1 (cit.<sup>21</sup>). Mez detekce má hodnotu 0,04 mg.l<sup>-1</sup>, tj. pro standardní operační proceduru 30 μg.kg<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,08 mg.l<sup>-1</sup>, tj. pro standardní operační proceduru 50 μg.kg<sup>-1</sup>.

### Správnost a přesnost

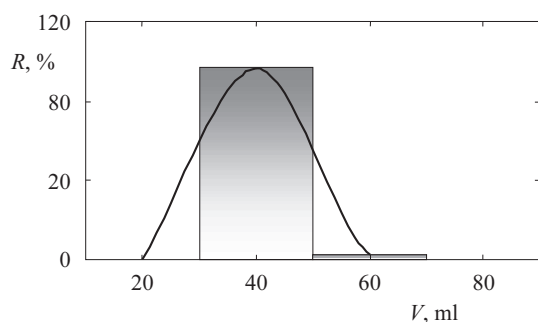
Při prekoncentraci lasalocidu na silikagelu byla sledována vhodnost použitého promývacího činidla (eluce interferentů), potřeba desorpčního činidla a výtěžek extrakce na pevné fázi.

K eluci interferentů byly zvoleny dva promývací systémy – dichlormethan a promývací činidlo dichlormethan–aceton (192+8). Při použití dichlormethanu byly odstraněny pouze látky s nižší polaritou než samotný lasalocid (s největší pravděpodobností přírodní barviva). Při použití druhého promývacího systému byly odstraněny látky s vyšší polaritou současně s barvivy a lipidy. Rozdíl v použitých promývacích systémech je patrný z chromatogramů na obr. 2.

Spotřeba desorpčního činidla je patrná z elučního profilu lasalocidu z pevné fáze Silica (obr. 3). Měření bylo zjištěno, že k desorpci lasalocidu postačuje 6 ml elučního činidla, přesto byl však zvolen objem 8 ml a to z důvodu dokonalé desorpce



Obr. 2. HPLC separace lasalocidu po předchozí prekoncentraci na kolonce Sep-Pak Silica při použití promývacího činidla dichlormethan-aceton (192+8) (a) a dichlormethanu (b); HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I



Obr. 3. Eluční profil lasalocidu z kolonky Sep Pak Silica (výtěžnost  $R$ , objem desorpčního činidla  $V$ )

Tabulka II

Výtěžek metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg/kg]	0,50	1,00	2,50	5,00
Nalezená hodnota [mg/kg]	0,48	0,92	2,43	4,79
Výtěžek metody [%]	96,4	91,6	97,2	95,8
Interval spolehlivosti	0,01	0,01	0,03	0,11
Relativní směrodatná odchylka [%]	1,66	1,20	0,92	1,92

a kvantifikace lasalocidu a proměnlivosti matrice. Vliv matrice na desorpci lasalocidu nebyl dále studován.

Vzhledem k tomu, že neexistují certifikované referenční materiály, byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva (40 % pšenice, 30 % ječmen, 10 % sojový extrahovaný šrot, 10 % masokostní moučka, 5 % úsušky píce a 5 % vápenec) s obsahem lasalocidu 0,5, 1,0, 2,5 a 5,0 mg/kg. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti  $P = 0,95$ ) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 0,5 až 5,0 mg/kg je  $(95,0 \pm 3,6)$  %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Konstanta  $a$  regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu  $-0,0131 \pm 0,1162$  a statisticky se neliší od nuly. Konstanta  $b$  regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu  $0,9647 \pm 0,0408$  a neliší se statisticky od jedničky. Metoda tudíž poskytuje správné výsledky.

Přesnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků, jejichž celkový počet byl 35. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 0,2 až 5,0 mg/kg má opakovatelnost hodnotu 0,10 mg/kg.

#### LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Berger J., Rachlin A. I., Scott W. E., Sternbach L. H., Goldberg M.: J. Am. Chem. Soc. 73, 5295 (1951).



3. Westley J. M., Evans R. H., Williams T., Stempel A.: J. Chem. Soc. D 1970, 71.
4. Johnson S. M., Herrin J., Liu S. H., Paul J.: J. Am. Chem. Soc. 92, 4428 (1970).
5. Westley J. W., Oliveto E. P., Berger J., Evans R. H., Glass R., Stempel A., Toome V., Williams T.: J. Med. Chem. 16, 397 (1973).
6. Mitrovic M., Schildknecht E. E.: 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of Poultry Science Association South Dakota State University, Brookings, SD, Aug. 6–10. 1973.
7. Bartley E. E., Herod E. L., Bechtle R. M., Sapienza D. A., Brent B. E.: J. Anim. Sci. 49, 1066 (1979).
8. Vyhláška č. 222/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchování vzorků podléhajících zkáze, ve znění pozdějších předpisů.
9. Official Methods of Analysis, 16th Ed., AOAC, secs. 5.3.10, Method 975.60. Arlington, 1995.
10. Official Methods of Analysis, 16th Ed., AOAC, secs. 5.2.04, Method 975.61. Arlington, 1995.
11. MacDonald A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1214 (1978).
12. Osadca M., Araujo M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1074 (1978).
13. Weiss G., Kaykaty M.: J. Agric. Food Chem. 31, 81 (1983).
14. Weiss G., Kaykaty M., Miwa B.: J. Agric. Food Chem. 31, 78 (1983).
15. Frank L. R., Barnes C. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, 4, 584 (1989).
16. Weiss G., Felicito N. R., Kaykaty M., Chen G., Caruso A., Hargroves E., Crowley C., MacDonald A.: J. Agric. Food Chem. 31, 75 (1983).
17. Johannsen F. H.: Agribiol. Res. 44, 78 (1991).
18. Asukabe H., Murata H., Harada K., Suzuki M., Oka H., Ikai Y.: J. Agric. Food Chem. 42, 112 (1994).
19. Martinez E. E., Shimoda W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 637 (1986).
20. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech.
21. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači. FINISH, Pardubice 1992.

**M. Douša** (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional Laboratory Department, Plzeň): **Determination of Lasalocid in Amino Feeds by Fluorescence Detection for Contents Lower than 5 mg/kg**

An HPLC method of determination of lasalocid was developed for fast monitoring of its content as an undesirable additive in final fodders. Lasalocid is extracted from a sample with a mixed solvent ethyl acetate–hexane and, after purification of the extract with silica gel, it is determined by HPLC on a reverse C<sub>18</sub> phase with fluorescence detection. The determination limit (50 µg/kg), repeatability (0.1 mg.kg<sup>-1</sup>) and yield of the method (95 %) were found for lasalocid concentrations 0.5–5 mg/kg. The repeatability was determined for real samples of final fodders.

## Česká společnost chemická přijme

### *novou výkonnou redaktorku Chemických listů*

*Kvalifikační předpoklady:* VŠ vzdělání chemického zaměření  
*Předpokládaný nástup:* jaro 2001, několikaměsíční zaškolení  
*Bližší informace:* prof. B. Kratochvíl, tel. 02/3113908, 0606/870366, e-mail: kratochb@vscht.cz  
 Ing. C. Jirátová, tel. 02/21082370, e-mail: jiratova@csvts.cz  
 Ing. M. Bláhová, tel. 02/22220184, e-mail: mblahova@csvts.cz

## MIKROVLNNÁ MINERALIZACE TĚLNÍCH TEKUTIN

TOMÁŠ NAVRÁTIL<sup>a</sup>, ZDENA DLASKOVÁ<sup>b</sup>,  
MILOSLAV KOPANICA<sup>c</sup> a LADISLAV NOVOTNÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, Navratil@jh-inst.cas.cz, <sup>b</sup>Klinika nemocí z povolání, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Toxikologická laboratoř, Na Bojišti 1, 128 00 Praha 2, <sup>c</sup>UNESCO satelitní centrum pro stopové prvky na Karlově univerzitě, Praha

Došlo dne 11.X.1999

Klíčová slova: voltametrie, biochemie, intoxikace olovem, analýza moči, krve, stolice

## Úvod

K otravě těžkými kovy může u člověka dojít při profesionální expozici (nemoc z povolání) nebo jiným způsobem (např. sebevražednými pokusy, působením kontaminovaného životního prostředí, apod.). Míra intoxikace pacienta olovem se určuje stanovením až čtyř (někdy i pěti) parametrů – koncentrace olovnatých iontů v krvi, v moči a ve stolici a dále stanovením kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (popř. porfyrinů) v moči<sup>1</sup>.

Vzorky moče, analyzované v této práci, byly odebírány při pravidelných preventivních prohlídkách osobám, vystavených olovu v pracovním prostředí.

Provádění všech uvedených analýz podle předepsaných postupů<sup>2,3</sup> je značně časově i instrumentálně náročné. Doba kompletní analýzy všech čtyř základních ukazatelů přesahuje 13 hodin (z toho asi 8–12 hodin se spotřebuje na mineralizaci vzorku a tudíž doba samotné analýzy je proti tomu zanedbatelná). Je nutné vzít v úvahu, že v případě použití voltametrie je nutné provést mineralizaci důkladněji, než je tomu při užití AAS, jak plyne i z literatury<sup>4</sup>.

Vzhledem k tomu, že po vyšetření pacienta je nutno v co nejkratší lhůtě rozhodnout o způsobu léčby, je rychlé dodání výsledků analýz velmi důležité. Aktuální je proto hledání způsobů, jak zrychlit a popřípadě i zjednodušit potřebné analytické postupy.

Podle některých pramenů lze nahradit mineralizaci moči vícenásobným ředěním demineralizovanou vodou okyselenou kyselinou dusičnou<sup>5</sup>, avšak tento postup je jen stěží aplikovatelný při užití voltametrických metod, kde přítomnost organických látek působí rušivě a hlavně tyto látky na sebe mohou vázat stanovený kov.

Je známo, že na trhu se vyskytuje mnoho typů specializovaných mineralizačních systémů, avšak jejich cena se pohybuje v řádech statisíců korun, což si vzhledem k ekonomické situaci našeho zdravotnictví může dovolit jen málokterá laboratoř.

## Experimentální část

## Přístroje

Podle klasifikace literatury<sup>6</sup> by měla být mikrovlnná mineralizace označována jako podtyp mokrého rozkladu, avšak pro jednoduchost je v této práci označována pouze jako „mikrovlnná“ a mineralizace na mokré cestě za atmosférického tlaku jako „mineralizace na mokré cestě“.

Mineralizace vzorků na mokré cestě byla prováděna za pomoci topného hnízda a vodní lázně.

Mikrovlnná mineralizace byla prováděna v mikrovlnném mineralizačním zařízení (Polaro-Sensors, spol. s r.o., Praha) (max. výkon 1000 W). Maximální počet současně mineralizovaných vzorků na vnitřním rotoru byl šest. Maximální přípustný tlak v zařízení je 4 MPa, při jeho překročení (exploze) dojde k proražení pojistky (ochranného víčka) a tlak je přepouštěn z nádoby přepadem do expanzní nádoby.

Pro voltametrická měření byl užit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, spol. s r.o., Praha). Pracovní metodou byla diferenční pulsní anodická stripping voltametrie. Pro odstranění vzdušného kyslíku sloužilo vyublání dusíkem.

## Chemikálie

Pro přidávky olovených iontů byly používány standardní roztoky Astatol (Analytika, spol. s r.o., Praha) o základní koncentraci 1 mg.ml<sup>-1</sup>, které byly podle potřeby ředěny 1:10 až 1:100. Kyselina chlorovodíková, kyselina dusičná i peroxosíran sodný (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Lachema Brno) byly čistoty p. a.

## Mineralizace na „mokré cestě“

Konkrétní postup včetně homogenizace byl popsán hlavně v literatuře<sup>1,2,7</sup>.

Mineralizace moči na mokré cestě<sup>7,8</sup> byla prováděna tak, že 100 ml moči bylo smícháno se 30 ml koncentrované kyseliny dusičné a roztok byl odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a odpařen znovu do sucha. Tento proces byl opakován až do vzniku bílého odparku. K němu bylo přidáno 5 ml 10 % KI a 3–5 ml koncentrované HNO<sub>3</sub> a odpařování bylo opakováno až do vzniku bílého odparku, který byl rozpuštěn v destilované vodě a zředěn na 10 ml. Následovalo srážení pomocí 2 ml 1 M-(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 ml 1 M-NH<sub>4</sub>OH a 20 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Následoval sedimentační proces (30 min) a centrifugace při 2500 s<sup>-1</sup> po dobu 10 min. Sraženina byla promyta suspendováním v 10 ml destilované vody s přidáním 2–3 kapek čpavku a celý proces centrifugace včetně promytí se opakoval ještě dvakrát. Nakonec se sediment rozpustil v 0,5 ml koncentrované HCl a roztok se doplnil na 10 ml destilovanou vodou.

## „Mikrovlnná“ mineralizace

Ke 20 ml vzorku moči bylo přidáno 80 ml destilované vody. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno do mikrovlnné mineralizační nádoby 5 ml, přidáno 5 ml destilované vody a 100 mg peroxosíranu sodného. Nádobka byla po uzavření vložena do mineralizační jednotky, byl nastaven výkon v intervalu mezi 500 W až 1000 W. Testovaná doba sepnutí byla

mezi 15 s a 2 minutami. Pro úplnou mineralizaci bylo zkušeno i opakované provedení mikrovlnného rozkladu, které se provádělo po úplném vychladnutí nádoby (cca 15–20 min). Po vyjmutí nádoby byl mineralizát kvantitativně převeden do kádinky, přidáno 100 mg peroxosíranu sodného, provedeno odpaření do sucha. Mineralizát byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky, přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné a doplněno redestilovanou vodou po rysku.

### Postup stanovení

25 ml mineralizátu bylo převedeno do voltametrické nádoby. Měření bylo prováděno metodou anodické diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě<sup>9</sup> (počáteční potenciál  $E_{in} = -800$  mV, konečný  $E_{fin} = +150$  mV vs. nasycená kalomelová elektroda SKE, rychlost scanu  $20$  mV.s<sup>-1</sup>). Pík olova byl registrován u  $-375$  mV vs. SKE. Současně bylo možno vyhodnocovat i pík kadmia při  $-550$  mV a mědi při  $+50$  mV. Po přidání EDTA lze stanovit i thalium u  $-400$  mV.

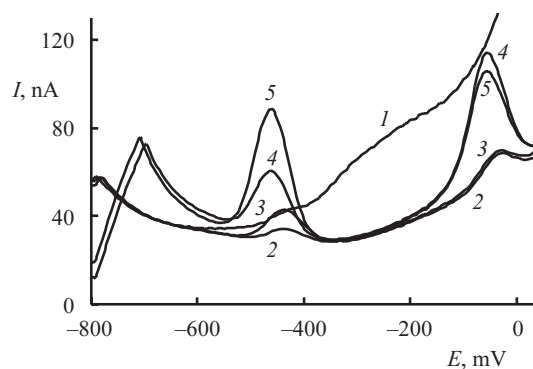
### Výsledky a diskuse

#### Optimalizace postupu mikrovlnné mineralizace

Jako vhodné oxidační činidlo byl zvolen peroxosíran sodný. Na rozdíl od jiných obdobně účinných látek (např. peroxidů) nevykazuje takovou aktivitu, která by vedla k enormnímu nárůstu tlaku v mineralizátoru. 10 ml roztoku vzorku v nádobce je maximální přijatelné množství.

Regulovatelný výkon byl nastavován mezi 500 W až 1000 W (maximální nastavitelná hodnota zařízení). Testovaná doba sepnutí byla mezi 15 s a 2 min. Pokud se prodloužila doba mineralizace přes 1 minutu, docházelo asi ve 30 % pokusů k překročení maximálního povoleného tlaku. Pravděpodobnost překročení maximálního přípustného tlaku narůstá i se vzrůstajícím výkonem mineralizační jednotky. Při době mineralizace 2 minuty došlo k překročení mezního tlaku téměř v 80 % případech.

V souladu s poznatkami cit.<sup>6</sup> se jako optimální jevílo užití výkonu 500 W, max. 700 W. Jak se však ukázalo, u některých vzorků nedošlo po 60 s mineralizace k úplnému rozkladu a výsledky byly asi o 10–15 % nižší než u mineralizace na mokré cestě. Proto se jeví jako vhodné provést ještě jednu mineralizační proces. Mineralizační zařízení pracuje ve spínaném režimu a nelze zaručit, že v okamžiku vypnutí není přímo v činnosti. Proto okamžitě zapnutí by ve výsledku odpovídalo podstatně vyššímu výkonu a zvýšilo by to pravděpodobnost překročení horní hranice přípustného tlaku téměř k 80 %. Ukázalo se jako optimální nechat nádobku vychladnout po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Pak již postačovalo při stejném výkonu provádět rozklad znovu po dobu 30 s. Zbýlé malé procento přítomných organických látek v mineralizátu bylo možno odstranit jeho povařením 100 mg peroxosíranu sodného a následným odpařením do sucha. Odparek byl převeden do 25 ml odměrné baňky, bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné a doplněno redestilovanou vodou. Nutnost povaření mineralizátu s peroxosíranem je patrná z obr. 1, kde je vidět značné potlačení píku olova



Obr. 1. Srovnání voltamogramů při stanovení olova v moči: 1 – bez mineralizace, 2 – po mikrovlnné mineralizaci bez povaření s peroxosíranem, 3 – po mikrovlnné mineralizaci bez povaření s peroxosíranem s přidavkem  $5 \mu\text{g Pb}^{2+}$ , 4 – po mikrovlnné mineralizaci a povaření s peroxosíranem, 5 – po mineralizaci a povaření s peroxosíranem s přidavkem  $5 \mu\text{g Pb}^{2+}$

#### Tabulka I

Srovnání výsledků stanovení olova v moči při mineralizaci na mokré cestě a mikrovlnnou mineralizací (výsledky mikrovlnné mineralizace považovány za 100 %)

Pacient	Pb [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]		Rozdíl [%]
	mokrá cesta	mikrovlnná mineralizace	
1	0,050	0,055	-9,1
2	0,083	0,087	-4,6
3	0,075	0,079	-5,1
4	0,059	0,055	7,2
5	0,019	0,021	-9,5
6	0,022	0,025	-12,0
7	0,021	0,023	-8,7
8	0,070	0,074	-5,4
9	0,037	0,037	0,0
10	0,017	0,019	-10,5

zbývající organickou maticí. Stejně tak je možno usuzovat z obr. 1, že ředění doporučené v cit.<sup>5</sup>, jen ztěžá nahradit mineralizaci.

Výsledky srovnání obou výše zmíněných mineralizačních postupů jsou uvedeny v tab. I. Z nich je patrné, že hodnoty koncentrací získaných mineralizací na mokré cestě jsou v průměru o 5–10 % nižší než při aplikaci mikrovlnného rozkladu, což dokazuje větší důkladnost rozkladu.

Uvedený postup mikrovlnné mineralizace lze aplikovat nejen při stanovení olova, ale i ostatních prvků, které poskytují anodický pík ve voltametrickém měření společně s olovem. Jedná se především o kadmium, měď a po přidání EDTA i o thalium. Při klasické mineralizaci na mokré cestě výše uvedeným způsobem bylo nutno u kadmia postupovat odlišným způsobem, jiným opět pro stanovení mědi. Mikrovlnný postup mineralizace se ukazuje jako univerzální, vhodný pro všechny v tomto odstavci uvedené prvky.

## Výsledky stanovení indikátorů otravy

Při vyhodnocení voltametrických měření byla použita metoda standardního přídatku. Každé měření bylo třikrát opakováno a při užití verze Polar Pro 1.0 for Windows<sup>10</sup> byla pro výpočet užitá všechna tři měření se třemi přídatky. Standardní relativní odchylka<sup>11,12</sup> samotného měření byla nižší než 1 % (vypočtena přímo programem Polar Pro<sup>10</sup>). Měření probíhala za laboratorní teploty 298±0,5 K. Reprodukovatelnost záznamů byla lepší než ±1 %. Roztoky byly připraveny s použitím redestilované vody. Měření byla prováděna nezávisle na obou pracovištích zúčastněných autorů, přičemž mezilaboratorní rozdíly mezi získanými výsledky nebyly pozorovány. Tím byla testována i reprodukovatelnost stanovení, která se pohybovala v rozmezí ±15 %.

## Závěr

Je popsán postup mikrovlnné mineralizace vzorků moči, případně stolice jako náhrada za mineralizaci na mokré cestě. Tento nový způsob mineralizace je prováděn za přídatku peroxosíranu sodného, při tlaku menším než 4 MPa, a to dvakrát po sobě opakovaně po dobu 60 s a 30 s. Pro kompletní rozklad je třeba mineralizát ještě jednou povařit s peroxosíranem sodným a následně odpařit do sucha. Výsledky obdržené z analýzy po mikrovlnné mineralizaci jsou asi o 5–10 % vyšší než po mineralizaci klasické, což indikuje důkladnější rozklad matrice. Doba potřebná k mikrovlnné mineralizaci (cca 30 min) je podstatně kratší nežli doba potřebná ke klasické mineralizaci na mokré cestě. Stejný způsob mineralizace lze aplikovat při stanovení několika kovů v moči najednou (např. kadmia, thalia, mědi a olova).

Autoři děkují za grantovou podporu IGA MZ ČR reg. čís. grantu 4238-3/97 a GA ČR reg. č. grantu 203/98/P239.

## LITERATURA

1. Bardoděj Z., David A., Šedivec V., Škramovský S., Teisinger J.: *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. Avicenum, Praha 1980.

2. De Medinilla J., Espigares M.: *J. Soc. Occup. Med.* 41, 107 (1991).
3. Grabecki J., Haduch T., Urbanovica H.: *Int. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 23, 226 (1967).
4. Mader P., Čurďová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
5. Spěváčková V., Knotková J.: *Chem. Listy* 92, 287 (1998).
6. Mader P., Čurďová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
7. Goldfrank L. R., Flomenbau N. E.: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. Appleton and Lange, New York 1994.
8. Dlasková Z., Navrátil T., Novotný L., Pelclová D., Mádllová P.: *Chem. Listy* 93, 142 (1999).
9. *Metodiky k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*. Polaro-Sensors, Praha 1994–98.
10. *Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*. Polaro-Sensors, Praha 1994–98.
11. Eckschlager K.: *Chemometrie*. Karolinum, Praha 1991.
12. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.

**T. Navrátil<sup>a</sup>, Z. Dlasková<sup>b</sup>, M. Kopanica<sup>c</sup>, and L. Novotný<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*, <sup>b</sup>*Clinic of Occupational Diseases, Toxicological Laboratory, 1st Faculty of Medicine, Charles University*, <sup>c</sup>*UNESCO Trace Element Satellite Centre, Charles University, Prague*): **Microwave Mineralization of Body Fluids**

A procedure is described for microwave mineralization of urine or faeces samples as replacement for wet mineralization. The new method uses a sodium peroxosulfate solution at pressures lower than 4 MPa in two consecutive mineralizations for 60 and 30 s. For complete decomposition, it is necessary to boil the mixture once again with a sodium peroxosulfate solution and evaporate it to dryness. The results obtained are about 5–10 % higher than those from classic mineralization, which indicates a more thorough decomposition of the matrix. The time required for microwave mineralization (ca. 30 min) is substantially shorter than that for wet mineralization. The same method can be used in determination of metals in urine simultaneously (e.g. cadmium, thallium, copper, and lead).



**QUANTITATIVE CHEMILUMINESCENT DETECTION OF PLANT PEROXIDASES USING A COMMERCIAL KIT ORIGINALLY DESIGNED FOR BLOTTING ASSAYS**

MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, ELIDA NORA FERRI<sup>b</sup>,  
KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup>, and TOMÁŠ MACEK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 3, 166 28 Prague, e-mail: martina.mackova@vscht.cz, <sup>b</sup>Institute of Chemical Sciences, University of Bologna, Italy, <sup>c</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague

Received November 11, 1999

Key words: peroxidase, detection, ECL chemiluminescence

## Introduction

Peroxidases are widely spread enzymes in plants, microbes and animal tissues. The broad substrate specificity, multi-functional properties and availability of peroxidases from different sources allows us to apply these enzymes in various biological and biochemical processes. From this point of view horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) is the most studied and used enzyme. Colorimetric<sup>1</sup>, electrochemical<sup>2</sup> and chemiluminescent methods<sup>3,4</sup> are used for the detection of peroxidase activity. Classical colorimetric methods are generally based on the monitoring of the formation of a coloured product from a colourless oxygen acceptor<sup>5</sup>. These compounds include benzidine, *o*-tolidine, *o*-toluidine, pyrogallol, *o*-dianisidine, *o*-phenylenediamine, guaiacol, 4-chloro-1-naphthol and many others. The chemiluminescent method is based on the oxidation of cyclic diacylhydrazides accompanied by the emission of light<sup>6</sup>. One of the most clearly understood systems is the HRP/hydrogen peroxide-catalysed oxidation of luminol in alkaline conditions. Disadvantages of the normal chemiluminescent method are overcome by the enhanced chemiluminescent method (ECL). ECL is achieved by performing the oxidation of luminol with HRP in the presence of chemical enhancers (e.g. certain phenols, naphthols, etc.)<sup>7</sup>. The main advantages of ECL are that the light emission is intense, easily measured and the peroxidase activity can be assayed in seconds. Also in this field the most studied peroxidase is HRP. ECL has provided the basis for a convenient and sensitive assay for peroxidase and peroxidase conjugates as a qualitative endpoint reaction in blotting assays, DNA – probe assays and immunoassays.

In the present study we describe the use of the ECL method for the estimation of peroxidase activity using the commercial ECL Amersham kit originally designed for qualitative Western blotting detections. This kit was used for the analysis of HRP and peroxidases isolated from plant cells of different plant species cultivated *in vitro*. Chemiluminescent detection was compared with photometric detection of peroxidase activity using two chromogenic substrates, guaiacol and pyrogallol.

## Experimental

### Materials and Methods

*Plant cells:* Strains of *in vitro* cultures of various species – *Solanum aviculare* KK1N, *Solanum nigrum* SNC90, *Atropa belladonna* R1BC and *Armoracia rusticana* K62K were obtained from the Collection of Plant Tissue Cultures of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the ČR. The plant cells were cultivated on the medium of Linsmeier and Skoog<sup>8</sup> at 26 °C in the dark<sup>9</sup>.

*Peroxidase extraction:* Soluble peroxidase activities were determined in crude extracts obtained by the procedure already described<sup>10</sup>.

*Photometric procedures:* Guaiacol and pyrogallol (both Sigma) were used for the detection of activity of commercial HRP (Sigma) and the estimation of the reproducibility of photometric method in comparison with ECL analysis. The reaction with both chromogenic substrates was measured at 25 °C. Reaction mixtures prepared with guaiacol contained 2.6 ml of 13 mM guaiacol in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5, 0.1 ml of 5 mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.1 ml of the enzyme<sup>11</sup>. The pyrogallol mixture was prepared according to the Sigma Manual and it contained 0.32 ml of 5 % pyrogallol, 0.16 ml of 147 mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.32 ml of phosphate buffer pH 6.5, 2.1 ml H<sub>2</sub>O and 0.1 ml of the enzyme. In both cases reactions were initiated by the addition of the HRP sample and the change in absorbance was continuously monitored at 470 nm with guaiacol, and at 590 nm with pyrogallol.

*ECL procedure:* Reagents A and B of the Amersham kit designed for Western blotting were mixed in the ratio 1:1 and 20 µl of this mixture was added to 200 µl of glycine – NaOH buffer pH 10. The chemiluminescent reaction was started by the addition of 20 µl of the peroxidase sample of appropriate dilution. Luminescence expressed in RLU (relative luminescent units) of the reaction mixture was measured immediately after addition of the sample of peroxidase during several seconds with a luminometer Biocounter 1500 (Celsis LUMAC, The Netherlands).

## Results and Discussion

The reproducibility of three different methods for detection of peroxidase activity was compared. Peroxidase activity was estimated using guaiacol or pyrogallol as substrates for peroxidase or by the chemiluminescent method (see Table I). As a standard sample of peroxidase pure HRP purchased from Sigma Company in lyophilised form was used. It was dissolved in 0.1 mol.l<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 6.4 at an initial concentration of 1 mg protein/ml. This solution was further diluted according to the requirements of the chosen methods.

The data in Table I show that the lowest standard deviation of the measurement of peroxidase activity was obtained by the chemiluminescent method. This method has other advantages, it is very sensitive<sup>3,4,12</sup> and, compared to the spectrophotometric method, coloured samples do not interfere and the whole procedure is much faster. Using the reagents of the kit (A and B) purchased from Amersham the error of the method which normally needs fresh and individual mixing of the reagents before each procedure (luminol with the enhancer solutions



Table I

Comparison of the reproducibility of spectrophotometric and chemiluminescent methods for the determination of horseradish peroxidase (HRP) activity. (Original concentration of the commercial HRP was  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  diluted in phosphate buffer pH 6.4, activities were estimated as described in Materials and Methods.)

Spectrophotometric		Chemiluminescent
guaiacol (nkat/mg protein)	pyrogallol ( $\text{pgl}\cdot\text{U}^{\text{a}}/\text{mg protein}$ )	luminol ( $\text{RLU}^{\text{b}}/\text{mg protein}$ )
1147	18.8	$4.6 \times 10^{10}$
1086	18.4	$4.5 \times 10^{10}$
1142	23.1	$4.4 \times 10^{10}$
964	28.2	$4.0 \times 10^{10}$
1297	24.1	$4.2 \times 10^{10}$
1178	23.1	$4.4 \times 10^{10}$
$\phi^{\text{c}} = 1159 \pm 84.5$ $\Delta = 7 \%$	$\phi^{\text{c}} = 22.6 \pm 2.7$ $\Delta = 12 \%$	$\phi^{\text{c}} = 4.3 \times 10^{10} \pm 1.6 \times 10^9$ $\Delta = 4 \%$

<sup>a</sup>Purpurogallin units, <sup>b</sup>relative luminescent units, <sup>c</sup>the average value of measured activities,  $\Delta$  standard deviation

and hydrogen peroxide in required concentrations in proper buffer) is also lower. According to the producer's manual the shelf life of the ECL kit is one year.

In further experiments other parameters of the chemiluminescent method with the Amersham ECL kit were followed. The dependence of the enzyme activity on the concentration of lyophilised HRP is shown in Figure 1. Activity measurement was linear from  $500$  to  $4 \times 10^8$  RLU/ml of the enzyme activity, i.e. values corresponding to concentrations  $0.2$ – $15 \mu\text{g protein/ml}$ . These activities would correspond to  $0.26$ – $6.2 \text{ U/mg}$  estimated by guaiacol, the values which would not be straight-way measurable with chromogens. Consequently the chemiluminescent assay is applicable for a wider peroxidase concentration range than methods which use the colour change of some chromogenic substrates. It is clear that spectrophotometric methods are not so sensitive as chemiluminescent ones; on the other hand, the enzyme amount suitable for the reaction with chromogens to allow first-order reaction has to be much lower than  $15 \mu\text{g protein/ml}$ .

As an example the method was used for the estimation of peroxidase activities isolated from fresh tissues of different plant species. Peroxidase activities were determined using the same procedure as was used for measurement of HRP activity. In natural samples the enzyme activity can be affected by certain effects. One is the possible interference of heme-containing enzymes, other proteins etc. The possible interference of catalase present in natural samples has been discussed<sup>4</sup>. The authors determined simultaneously peroxidase and catalase activities based on the additions of peroxidase standards with 25 natural samples isolated from various fruits and vegetables. It was shown that peroxidase activities measured by the chemiluminescent method are in good agreement with those obtained using the guaiacol method and maximal intensity of chemiluminescence was influenced only negligibly. Similar results were obtained in our experiments (data not shown).

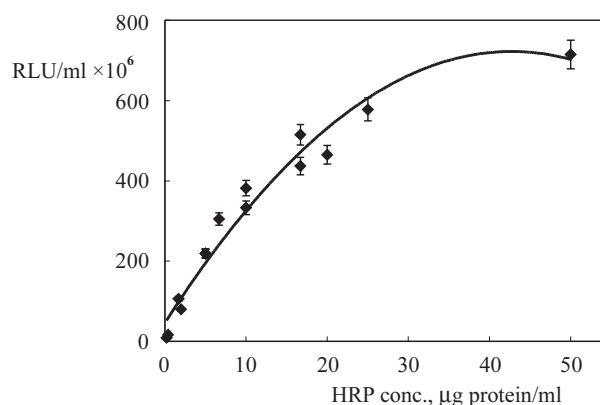


Fig. 1. Dependence of the activity of horseradish peroxidase (Sigma), measured by the chemiluminescent method, on its concentration

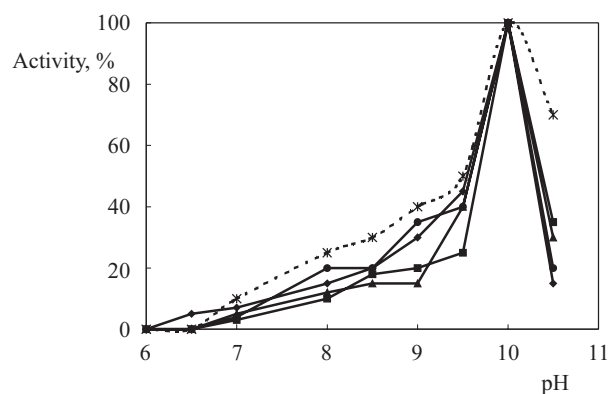


Fig. 2. pH optimum of the chemiluminescent reaction catalysed by peroxidases isolated from different plant species, HRP  $\times$  commercial (Sigma) horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase preparation, K62K  $\blacklozenge$  strain of *A. rusticana* callus, R1BC  $\blacksquare$  strain *Atropa belladonna* callus, SNC9O  $\bullet$  hairy root clone of *Solanum nigrum*, KK1N  $\blacktriangle$  strain of *S. aviculare* callus

An important parameter of the chemiluminescent reaction is pH (Ref.<sup>12</sup>). Light emission is highly dependent on the pH of the reaction mixture but peroxidases usually have much lower optimum pH than is the optimum for the light emission. Figure 2 shows that the chemiluminescent reaction catalysed by peroxidases from four different plant tissues exhibited very high and the same pH optimum (pH 10) as the reaction catalysed by pure HRP. Many authors measuring peroxidase activities by chemiluminescent methods used reaction pH 7.0–8.0, which was definitely less advantageous. According to our findings the use of lower reaction pH did not give accurate results. The use of the high pH can also negatively influence the interference of other enzymes which could affect reaction conditions of the chemiluminescent procedure.

The chemiluminescent method which uses the reagents from the Amersham ECL kit offers a good alternative to the well known colorimetric methods still widely exploited today and it significantly improves the chemiluminescent procedure which normally uses separate mixing of all components of the reaction mixture. From the results presented above it can be seen that the use of the described method increases the reproducibility of the assay of peroxidase activity compared to

colorimetric methods, and its use also accelerates the whole procedure. The wide range of measurable peroxidase concentrations reduces the number of sample dilutions required, thus decreasing the experimental error and leading to time saving. Large series of samples can be analysed rapidly. Also the sensitivity of the chemiluminescent method and its reasonable price must be taken into account.

*This work was supported by the grants No. 203/96/0499 and 203/99/1628 of the Grant Agency of the Czech Republic.*

#### REFERENCES

1. Saunders G. C., in: *Immunoassays in the Clinical Laboratory* (Nakamura R. M., Dito W. R., Tucker E. S., ed.), p. 99. Alan R. Liss, New York 1979.
2. Alexander P. W., Maitra C.: *Anal. Chem.* 54, 68 (1982).
3. Girotti S., Ferri E. N., Ghini S., Fini F., Musiani M., Carrea G., Roda A., Rauch P.: *Chem. Listy* 91, 477 (1997).
4. Frébort I., Haviger A., Jílek M.: *Phytochem. Anal.* 3, 55 (1992).
5. Conyers S. M., Kidwell D. A.: *Anal. Biochem.* 192, 207 (1991).
6. Arakawa H., Maeda M., Tsuji A.: *Anal. Biochem.* 97, 248 (1979).
7. Thorpe G. H. G., Kricka L. J.: *Methods Enzymol.* 133, 331 (1986).
8. Linsmaier-Bednar E. M., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 18, 100 (1965).
9. Macek T., in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj Y. P. S., ed.), Vol. 7, p. 443. Springer Verlag, Berlin 1989.
10. Macková M., Macek T., Očenášková J., Burkhard J., Demnerová K., Pazlarová J.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 39, 317 (1997).
11. Cvikrová M., Hrubcová M., Vágner M., Macháčková I., Eder J., in: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Welinder K. G., Rasmusse S. K., Penel C., Grep-pin H., ed.), p. 445. University of Geneva, Geneva 1993.
12. Kricka L.J., Stott R.A.W., Thorpe G.H.G. in: *Practical Spectroscopy Series* (Baeyens W.R.G., De Keukeleire D., Kozkidis K., eds.) Vol 12, p. 599. Marcel Dekker, New York 1991.

**M. Macková<sup>a</sup>, E. N. Ferri<sup>b</sup>, K. Demnerová<sup>a</sup>, and T. Macek<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, <sup>b</sup>Institute of Chemical Science, University of Bologna, Italy, <sup>c</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Quantitative Chemiluminescent Detection of Plant Peroxidases Using a Commercial Kit Originally Designed for Blotting Assays**

The paper describes an improvement of chemiluminescent analysis of plant peroxidases by the use of a commercial kit originally designed for qualitative Western blotting assays. The chemiluminescent method using the reagents of the Amersham ECL kit offers a good alternative to the well known and widely exploited colorimetric or chemiluminescent methods using luminol. The proposed procedure significantly improves the chemiluminescent enzyme assay with labour-consuming separate mixing of all components by application of standard and ready-to-use solutions.

## OSOBNÍ ZPRÁVY

**Pětasedmdesátiny doc. PhMr. RNDr. Jiřho Volkeho, DrSc.**

Již starý Archimedes toužil po tom, mít pevný bod, o něž by se mohl opřít a tak pohnout zeměkouli. Podobně i my ostatní bychom rádi měli ve svém okolí pevné, jakési referenční body, o které bychom se v případě potřeby mohli pomyslně opřít. Jedním z takových pevných bodů – osobností – v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, tedy v mém, resp. v našem okolí, je i pan doktor Volke.

Jeho chemická životní pouť ukazuje, jak je pro pokrok v základním výzkumu důležitá interdisciplinarita a široké vzdělání. Po druhé světové válce vystudoval napřed farmacii na Univerzitě Karlově, aby se později jakožto žák profesora Heyrovského zabýval fyzikální chemií, jmenovitě polarografií. Byl jedním z prvních aspirantů a později vědeckých pracovníků tehdy založeného Polarografického ústavu ČSAV, kde se věnoval právě farmaceuticky významným sloučeninám a jejich modelům jednak z hlediska analytického, jednak z hlediska studia jejich metabolických mechanismů. Svoji aktivitu pak rozšiřoval i na elektrochemické studium dalších biologicky významných sloučenin (pesticidů, herbicidů, NADH), tedy převážně heterocyklických látek. Již několik desetiletí je uznávaným světovým odborníkem ve svém oboru. Publikoval dosud téměř dvě stě původních sdělení, ve kterých se zabýval hlavně vztahem struktura – reaktivita (redox vlastnosti) u organických sloučenin, studiím reakčních meziproductů, zvláště radikálových, elektrochemicky generovaných, v poslední době se věnuje též elektrochemickému výzkumu psychofarmak a problematice molekul s více redox-aktivními centry. Stal se tak spoluzakladatelem české organické (molekulární) elektrochemie, tímto směrem zaměřenou skupinu vedl v Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie J. Heyrovského přes 30 let a vychoval přitom řadu mladších vědeckých pracovníků. Jeho dlouholetá a velmi plodná spolupráce s katedrou (nyní ústavem) organické chemie na VŠCHT v Praze (která pokračuje i nadále v další generaci) způsobila i jeho zájem o organickou elektrosyntézu. Ilustrací zde může být i jeho zatím poslední monografie na toto téma (*Electrochemistry in Organic Synthesis*), kterou sepsal spolu s prof. Liškou a která vyšla před několika lety. A to jsem nepřipomněl jeho velikou zásluhu na existenci a kvalitě časopisu *Chemické listy*, jehož je dlouholetým (a stále činným) redaktorem.

Bylo by toho ještě mnoho, co by se mohlo a mělo zmínit, aby se vykreslila ve všech odstínech vskutku renesanční osobnost pana doktora Volkeho a aby se daly zmínit všechny věci, za něž jsme mu vděční jak osobně, tak i vědecky. Protože je ale formát časopisu *Chemické listy* na to příliš malý, doporučuji se s ním setkat osobně, v jeho laboratoři, třeba nad šálkem čaje. Vhodným důvodem by například mohla být skutečnost, že se narodil na svátek sv. Matěje právě před pětasedmdesáti lety (24.2.1926). Rádi bychom mu i my touto formou popřáli, aby byl stále zdravý a v dobré pohodě a aby nám ještě dlouho byl jedním z pevných bodů v chemickém vesmíru.

*Za kolegy a přátele  
Jiří Ludvík*

**Šedesátka prof. Ing. Karla Štulíka, DrSc.**

Tak už Tě to, Karle, taky postihlo a zařadil ses mezi nás šedesátníky a šedesátnice.

Pocházíš z Kolína z učitelské rodiny, dětství jsi prožíval v harmonickém prostředí v Kouřimí. Gymnázium jsi navštěvoval v Kolíně, na který rád vzpomínáš. Byl jsi vždy výborný student, s vyznamenáním jsi absolvoval i Fakultu technické a jaderné fyziky ČVUT v Praze, specializaci fyzikální a jaderná chemie. Během diplomové práce a později aspirantury v Polarografickém ústavu J. Heyrovského (1963–1967) jsi zcela propadl elektroanalytickým metodám. Od roku 1967 věrně sloužíš Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a zejména její katedře analytické chemie, nejprve v různých nepedagogických funkcích, po revoluci jako docent (od roku 1990) a od roku 1991 jako profesor analytické chemie. Tehdy také nastala Tvá závratná kariéra v řadě funkcí: vedoucího katedry analytické chemie (1990–1997), děkana Přírodovědecké fakulty (od roku 1997 dodnes), předsedy Grantové agentury ČR (1992–2000), člena 6 vědeckých rad, předsednictví nebo členství v 8 různých oborových komisích, členství v poradních či redakčních radách 8 mezinárodních časopisů a členství v mezinárodních organizacích (FECS, IUPAC, UNESCO). Uplatňuješ v nich své výborné řídicí schopnosti a jako jednoho z mála Tě tyto funkce nepoznamenaly, zůstal jsi sám sebou.

Jelikož jako nestraník jsi do revoluce žádný z těchto funkcí nemohl zastávat, měl jsi spoustu času se věnovat výuce studentů a zejména vědecké práci. Může to dosvědčit Tvých 60 diplomantů, 30 doktorandů a řada Tvých kolegů. Tvé přednášky jsou velmi oblíbené nejen pro Tvůj zasvěcený výklad, ale i pro Tvůj zvučný přednes. Jsi proto často zván na různé konference a zahraniční univerzity, např. jako visiting profesor v letech 1988 a 1989 na univerzitu v Padově.

Tvá vědecká činnost je úctyhodná. Jsi autorem nebo spoluautorem 250 publikací, většinou v mezinárodních časopisech, 5 monografií v češtině, angličtině, ruštině a čínštině, řady skript a učebnice analytické chemie. Tvé publikace byly 1689 krát citovány. Tvoje vědecká činnost byla oceněna v roce 1990 doktorátem chemických věd, členstvím v Inženýrské akademii a v Učené společnosti ČR a řadou medailí, např. Louis Gordon Memorial Award, Hanušovou medailí Čs. společnosti chemické, pamětní medailí UK nebo cenou rektora UK za nejlepší učebnici roku.

Jsi velmi všestranný. Svoji výbornou znalost angličtiny, kterou sis osvojil při svém působení jako pedagogický asistent na University of Strathclyde v Glasgowě, jsi později uplatnil ve své překladatelské činnosti, která Ti pomáhala v 70. a 80. letech uživit rodinu. Jsi hlavně prima kamarád, spolehlivý, a proto se s Tebou dobře spolupracuje, což mohu dosvědčit z vlastní zkušenosti (67 společných původních prací, 1 monografie a 8 kapitol v knihách).

Po svých rodičích jsi zdědil systematičnost a schopnost vysvětlit každý problém od samého začátku. Ne nadarmo jsi získal v našem katedrálním divadelním souboru KACHERE (kamarádi chemických reakcí) přezdívku Charlie Kazatel alias Charlie Kufr. Svě herecké nadání jsi prokázal v řadě postav,

např. jako pan učitel Písaříček či jedooký Janek. Tvé hudební nadání, které jsi dříve uplatňoval při hře na housle, se nyní projevuje především libozvučným pískáním při chůzi po chodbách (které, jak říkáš, nemusí být projevem dobré nálady) a dále při zpěvu na katedrálních i mimokatedrálních večírcích.

Významné jsou i Tvé sportovní úspěchy, např. výstup v Himaláji až do výšky 5 700 m, pokus o zdolání Mont Blancu či v poslední době Olympu. Přeji Ti uskutečnění Tvého snu vystoupit na Kilimandžáro, ale nesmíš to dlouho odkládat.

Dovedeš uživat života, máš rád ženy, dobré jídlo a dobré pití. Jak sám říkáš, miluješ všechny potraviny, které však, s výjimkou jednoho, jsou bohužel nezdravé.

Karluchu, ať se všechno daří, zůstaň takový, jaký jsi. Do dalších let Ti přeji hlavně to zdravíčko

Věra Pacáková

### K šedesátinám prof. Ing. Vratislava Ducháčka, DrSc.

Prof. Ing. Vratislav Ducháček, DrSc., vedoucí ústavu polymerů Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, se dožívá dne 16.2.2001 šedesátí let. Vystudoval VŠCHT v r. 1963 na tehdejší katedře gumárenské a plastikářské technologie u profesora Franty a od té doby je jeho odborná činnost spojena s tímto pracovištěm, které během doby prodělalo několik změn názvu. Zde v r. 1967 obhájil kandidátskou disertační práci, v r. 1979 se habilitoval na katedře polymerů, hodnost doktora věd získal v r. 1991 a profesorem Ústavu polymerů se stal v r. 1993.

Pedagogická činnost prof. Ducháčka byla a je neobyčejně rozsáhlá. Zahnuje všechny druhy činnosti úspěšného vysokoškolského učitele, od výchovy doktorandů (studentů doktorských studijních programů) a přednášek studentům v pregraduálním a postgraduálním studiu až po popularizační přednášky pro středoškolské studenty. (V současné době přednáší předměty „Gumárenské suroviny a jejich zpracování“ a „Průmyslové aplikace a recyklace polymerů“, předmět postgraduálního studia „Chemické aspekty zpracování a aplikace polymerů“, volitelný předmět „Polymerní materiály“ pro studenty Fakulty chemické technologie.) Posluchači oceňují srozumitelnost výkladu profesora Ducháčka a řadí jeho přednášky k nejlepším. V průběhu své pedagogické činnosti vedl více než padesát diplomových prací a vychoval celou řadu kandidátů technických věd, nyní doktorů.

Svou vědeckou činnost zahájil jako vědecký aspirant u profesora Franty studiem kinetiky a mechanismu vulkanizace nenasyčených uhlovodíkových kaučuků účinkem thiuramdisulfidových systémů neobsahujících elementární síru. V dalších letech pak toto téma rozvinul, věnoval se i složitějším systémům sírové vulkanizace urychlené thiuramy a jinými urychlovači. Svými studii přispěl k osvětlení sporných bodů mechanismu thiuramové vulkanizace a závěry jeho prací jsou v odborné literatuře obsáhle citovány. Další rozsáhlou oblastí vědeckého zájmu prof. Ducháčka je výzkum vícesložkových polymerních systémů. Zde využil své předcházející zkušenosti pro modifikaci termoplastů kovulkanizací s kaučuky. Podrobněji se zabývá otázkami mísitelnosti polymerních složek, problematikou morfologie směsí polymerů, kinetikou a mechanismem dílčích reakcí vedoucích

ke vzniku síťové struktury, síťováním polymerních směsí za podmínek smykového namáhání. Výsledky svého výzkumu publikoval ve velké řadě původních sdělení, z toho většinu v renomovaných zahraničních časopisech a ve vyžádaných přednáškách na zahraničních konferencích. Je spoluautorem dvou anglicky vydaných knižních publikací, autorem a spoluautorem několika česky vydaných příruček, vysokoškolských učebnic a učebních textů. Rozsah jeho publikační činnosti je vpravdě úctyhodný.

Rozsáhlá je rovněž odborně-organizační činnost profesora Ducháčka. Je členem řady nejrůznějších tuzemských komisí majících vztah k pedagogice, vědeckých rad, atestačních komisí, členem redakční rady časopisu *Plasty a kaučuk*. Dále je členem řady zahraničních institucí. Je členem výboru International Rubber Conference Organization, členem redakční rady *Journal of Polymer Engineering*, odborným lektorem časopisu *Polymer International*, aktivním členem New York Academy of Science, čestným členem výzkumné rady poradců American Biographical Institute a rady poradců International Biographical Association, čestným profesorem Albert Schweitzer International University, členem Polymer Network Group a Polymer Processing Society.

Prof. Ducháček patří k předním osobnostem v oblasti chemie a technologie makromolekulárních látek v České republice i v zahraničí. Dokládá to jak jeho výše již citované členství v řadě domácích i zahraničních orgánů a organizací, tak skutečnost, že je uveden v řadě životopisných přehledů: „Kdo je kdo v České republice na přelomu 20. století“, „Who's Who in Science and Engineering“, „Five Hundred Leaders of Influence“, „International Leaders in Achievement“, „Dictionary of International Biography“.

My, spolupracovníci profesora Ducháčka, oceňujeme nejen jeho výsledky odborné, ale velmi si vážíme i jeho lidských vlastností. Blahopřejeme mu k jeho životnímu jubileu a do dalších let mu přejeme mnoho zdraví a tvůrčích sil.

Antonín Kuta

### K nedožitým pětadevadesátinám doc. Ing. Artura Stoye

16. února by se dožil 95 let můj otec Artur Stoy, chemik, vynálezce a patentový právník. Zemřel 1. května 2000 v Praze, kde se také narodil a kde prožil většinu svého života. Byl to dlouhý a plodný život – uvažte, že se mu podařilo přežít mj. rakouské mocnářství, první i druhou Československou republiku, tisíciletou Rus i Sovětský svaz včetně našeho přátelství k němu na věčné časy.

Byl fascinován světem kolem nás a hledáním jeho podstaty vědou. Nesmírně ho těšilo pozorování překotného vývoje vědy a techniky: vždyť se mu podařilo prožít skoro celé 20. století, ve kterém se objevily automobily, rádia, letadla, lety do vesmíru, moderní léčiva, a vůbec asi tak 99 % všeho, co dnes používáme k životu, zábavě i zaměstnání.

Byl nejen zaujatým svědkem, ale i aktivním spoluvůrcem celé té exploze technologie a vědy, která během jeho života tak důkladně změnila náš svět. Byl osobně u zrodu syntetických vláken, hydrogelu, biomimetických materiálů a jiných moderních oborů. Jeho hlavním zájmem byly polymery akrylonitrilu, u kterých podstatně přispěl k jejich poznání i využití. Většina z jeho několika desítek vynálezů a patentů je



z tohoto oboru. Velkou část práce v chemii udělal jako docent VŠCHT v Pardubicích, jako vedoucí výzkumné skupiny plastů závodu Synthesia v Semtíně a konečně v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV v Praze, kde po léta spolupracoval s nedávno zesnulým akademikem O. Wichterlem (jejich přátelství a spolupráce začala však daleko dříve, ve výzkumu firmy Baťa ve Zlíně v roce 1942). Jako chemik byl naprosto nezdolný. Pracoval i na své chalupě, v mé laboratoři při jeho návštěvách v USA a vůbec kde byla jakákoliv příležitost. Ještě dlouho po odchodu do důchodu dělal zajímavé a často i významné pokusy na svém psacím stole v obývacím pokoji ve svém bytě na Petřínách. (Jinde nemohl, neboť moje matka ho s tím zcela rezolutně vyhostila z kuchyně; nebezpečné operace, jako práci s akrylonitrilem nebo koncentrovanou kyselinou dusičnou, páchal ovšem na balkoně.) Zdědil jsem z té doby několik jeho laboratorních deníků – je to pro mne zajímavé a inspirativní čtení i dnes.

AS také významně přispěl k výchově nových chemiků a propagaci vědy všeobecně. Býval redaktorem Státního nakladatelství technické literatury, a sám napsal sedm knižních publikací. Z toho bylo několik učebnic a monografií, a několik velmi dobrých populárně-vědeckých knížek (oblíbená byla jeho útlá knížka *Nové hmoty*, kterou napsal koncem 50. let s doc. F. Keblem). Učil technologii syntetických vláken na Vysoké škole chemicko-technologické v Pardubicích a byl zřejmě dobrým učitelem vzpomínaným řadou studentů a pozdějších mých spolupracovníků v Akademii i v zahraničí.

Jednou z jeho hlavních činností byla patentová ochrana vynálezu. Byl kdysi referentem patentového úřadu (žádná ostuda pro vědce – sám Albert Einstein měl kdysi podobné místo) a pak patentovým zástupcem pro řadu významných institucí: Baťovy závody, SPOFA, Interpharma, Ústav makromolekulární chemie ČSAV, atd. Jedním z jeho významných klientů byl již zmíněný Otto Wichterle. Některé vynálezy měli i společně. Vypracoval ochranu na celou řadu významných vynálezů, jako byly například syntetické hydrogely a měkké kontaktní čočky. A tyto patenty získal nejen doma, ale také je s velkým zaujetím a dovedností získával a obhajoval v zahraničí. Byl právem hrdý na to, že nikdy v životě neprohrál patentový spor! A byly to velkolepé bitvy, jako například obhajoba patentu SPOFY na tetracyklin proti American Cyanamide, série patentů na měkké kontaktní čočky v USA a patentu na polyamidy SILON proti firmám IG Farben a DuPont. A nebyl pouze patentovým zástupcem: klientům pomáhal „dovynalézat“ jejich vynálezy často významným způsobem. Pamatuji si, jak kdysi elegantně vyřešil problém spočívající v tom, že reformační katalyzátor, užívaný v tehdejších Stalinských závodech a v rafinerii na zpracování ropy stavěné kdysi jednou českou firmou v Homsu v Sýrii, narážel na patenty firmy International Hydrogenation Co.: prostě vyná-

lezl, vytvořil a patentoval nový katalyzátor, na který se původní patenty nevztahovaly! Ušetřil tehdy naší republice pěkné peníze.

AS nezanedbával pro vědu a chemii ostatní stránky života. Naše rodina byla těžištěm jeho života. V roce 1932 se oženil se svou školní láskou Lidmilou a prožili zbytek života spolu. Moje matka ho přežila o pouhé dva měsíce. Zanechali po sobě 5 dětí, více než tucet vnuků a nějaké ty pravnučky na dvou kontinentech. Otec byl na tento příspěvek „světovému genetickému fondu“ patřičně hrdý.

Kromě práce a rodiny také psal básně a pohádky v několika jazycích, zajímal se o astronomii, pěstoval ovoce, to všechno se zaujetím, odborně a dobře. Také byl v mládí slibným boxerem, v pozdějším věku pak budoval chalupu, opravoval si svá auta, jezdil na výlety doma i po zahraničí, hrál ping-pong a tenis, sbíral i zcela atypické houby a rozpoznával rostliny a hmyz. Vždycky mne udivoval a znovu překvapoval rozsahem i hloubkou vědomostí a dovedností z různých oborů. Budu vždycky vzpomínat na naše dlouhé debaty o všem možném, někdy i dosti vzrušené, ale vždycky zajímavé.

Je s podivem, co se toho do některého života vejde. V jeho pozůstalosti jsem našel následující epitaf:

Zde leží muž.

On mnoho pracoval.

(Teď prstem nehne už.)

Byl chemik a tak dál.

Pro práci nezapomněl snít

A milovat.

A když to mělo být,

I ránu do čelistí uměl dát.

A verše taky někdy psal

(Jen dobrým přátelům,

nebo je roztrhal.)

Teď konec už je snům.

Životů deset aspoň mít

By býval chtěl

A všechna dobrá vína pít.

To nešlo, bohužel.

Dětí měl, chvála bohu, dost

A tím se postaral

I o svou budoucnost.

Jen v nich teď žije dál.

Vystihuje ho to docela hezky. Prosím, vzpomeňte si na něj se mnou.

Vladimír A. Stoy



## OBSAH

ÚVODNÍK	81
REFERÁTY	
Adsorpční rozpouštěcí metody v elektroanalýze – databáze aplikací R. Kalvoda, J. Barek a M. Dřevínek	82
Separácia enantiomérů plynovou chromatografiou na cyklodextrinových stacionárných fázach I. Špánik a J. Krupčík	86
Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy, jejich adaptace a využití v moderních biotechnologiích M. Stibor a B. Králová	91
Modifikace proteinů v průběhu stárnutí organismů J. Sajdok, A. Kozak, J. Zídková, P. Kotrba, A. Pilin a J. Káš	98
Použití luminiscenčních značek pro spektrální charakteristiku polymérnych matric P. Hrdlovič a M. Kaholek	102
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE	
Doporučení IUPAC NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts (J. Kahovec)	111
Grafická znázornění (chemické vzorce) makromolekul (Doporučení IUPAC 1994) Česká komise pro makromolekulární nomenklaturu	112
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Stanovení obsahu lasalocidu v krmivech metodou HPLC s fluorescenční detekcí pro obsahy menší než 5 mg/kg M. Douša	123
Mikrovlnná mineralizace tělních tekutin T. Navrátil, Z. Dlasková, M. Kapanica a L. Novotný	127
Quantitative Chemiluminiscent Detection of Plant Peroxidases Using a Commercial Kit Originally Designed for Blotting Assays M. Macková, E. N. Ferri, K. Demnerová, and T. Macek	130
OSOBNÍ ZPRÁVY	133

## CONTENTS

EDITORIAL	81
REVIEW ARTICLES	
Adsorptive Stripping Methods in Electroanalysis – Database of Applications R. Kalvoda, J. Barek, and M. Dřevínek	82
Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Stationary Phases I. Špánik and J. Krupčík	86
Psychrophilic and Psychrotrophic Microorganisms, Their Adaptation and Utilization in Modern Technologies M. Stibor and B. Králová	91
Protein Modification During Aging of Organism J. Sajdok, A. Kozak, J. Zídková, P. Kotrba, A. Pilin, and J. Káš	98
Use of Luminescence Probes for Spectral Characterization of Polymer Matrices P. Hrdlovič and M. Kaholek	102
NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY	
IUPAC Recommendations NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts (J. Kahovec)	111
Graphic Representations (Chemical Formulae) of Macromolecules (IUPAC Recommendations 1994) Czech Commission for Macromolecular Nomenclature	112
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Determination of Lasalocid in Animal Feeds by Fluorescence Detection for Contents Lower than 5 mg/kg M. Douša	123
Microwave Mineralization of Body Fluids T. Navrátil, Z. Dlasková, M. Kapanica, and L. Novotný	127
Quantitative Chemiluminiscent Detection of Plant Peroxidases Using a Commercial Kit Originally Designed for Blotting Assays M. Macková, E. N. Ferri, K. Demnerová, and T. Macek	130
PERSONAL NEWS	133

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 95 (2001), čís./no. 2 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 125, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 111 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 32 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Hetflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámstný (webové stránky) • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. Jirátořová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, M. Drdák, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNY NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/index.html](http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html) • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jionická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2001 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2001 (12 čísel) 1034 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2310 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2001 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/I 5333/95 • 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 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • 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. SAZBA BULLETINU: B. Valter, SEKRETARIÁT ČSCH: Novotného lávka 5, tel., fax +420(2) 2222 0184, e-mail: mblahova@csvts.cz