



Redakce časopisu *Chemické listy*  
děkuje firmě Merck za její podporu aktivit  
České společnosti chemické

### 10 let soutěže o cenu firmy Merck

Ve dnech 5. a 6. února 2007 proběhl v areálu konferenčního centra VŠCHT Praha na Jižním Městě jubilejní 10. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie o cenu firmy Merck. Kromě příjemné povinnosti poděkovat organizátorům této soutěže z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha pod vedením doc. RNDr. Pavla Matějky, CSc. za dokonalou organizaci a vytvoření velmi příjemného a důstojného prostředí, se mi tak naskytla možnost ohlédnout se za uplynulým desetiletím. Činím tak právě v úvodníku k tomuto číslu *Chemických listů*, kde jsou shromážděny vybrané soutěžní práce dokumentující podle mého názoru neustále rostoucí úroveň této soutěže. Jako člen poroty téměř všech ročníků s potěšením sleduji rostoucí formální i obsahovou úroveň soutěžních prezentací, která podle mého názoru odráží rostoucí úroveň vědecko-pedagogické práce reprezentovaných kateder a ústavů analytické chemie. Rád bych této příležitosti využil k odpovědi na dvě otázky, které jsou mi v souvislosti s touto soutěží často kladeny: proč odborná skupina analytické chemie zvolila právě tuto formu soutěže založenou na veřejné prezentaci soutěžních prací před širokým kolektivem soutěžících a porotců a proč usilujeme o otištění vybraných soutěžních prací v časopise *Chemické listy*. V odpovědi na první otázku bych rád zdůraznil, že předchozí forma soutěže o nejlepší diplomovou práci z oboru analytické chemie se neosvědčila jednak proto, že lze obtížně posoudit skutečný podíl diplomanta na kvalitě odevzdané diplomové práce a jednak proto, že výsledky soutěže musely pochopitelně být vyhlašovány s několika-měsíčním zpožděním a v té době bylo obtížné vypátrat místo aktuálního pobytu soutěžících. Mnohem větší roli však hrála skutečnost, že tato dodatečná forma nijak vý-

razně nepřispívala k aktivizaci studentů analytické chemie. Právý opak platí a soutěži o cenu firmy Merck v její současné podobě, za kterou vdčíme jednak laskavému sponzorování firmy Merck a jednak práci širokého kolektivu pracovníků ze všech kateder či ústavů analytické chemie, kde se tato soutěž postupně konala. Hlásí se do ní a často velmi úspěšně vystupují i studenti nižších ročníků a příjemná odborná i společenská atmosféra soutěže sama přitahuje soutěžící. Tomu bezesporu napomáhá i větší počet oceněných soutěžících na rozdíl od řady dalších cen, kde „vítěz bere vše“, což činí trochu potíže při získávání soutěžících, kteří často mají pocit, že na nejvyšší stupeň stejně nedosáhnou. V případě soutěže o cenu firmy Merck lze bez nadsázky říci, že samotná nominace studenta do této soutěže je jeho úspěchem, takže studenti skutečně mají pocit naplnění starého olympijského hesla „není důležité vyhrát, ale zúčastnit se“. Stejně nasnadě je i odpověď na druhou otázku. Otištění vybraných soutěžních prací v našem časopise jednak „zviditelňuje“ tuto soutěž a jednak vytváří budoucí zárodek nového autorského kolektivu pro náš časopis. A to je věc, bez níž se žádný slušný chemický časopis pochopitelně neobejde. Navíc mám pocit, že většina soutěžních prací má úroveň, za níž se ani studenti ani jejich pracoviště rozhodně nemusí stydět. Na závěr bych – kromě radostné povinnosti poděkovat firmě Merck za veškerou její mnohostrannou a velmi účinnou podporu činnosti České společnosti chemické – rád vyslovil přání, aby webovské stránky této soutěže (<http://www.csch.cz/merck.html>) se i v příštím desetiletí utěšeně rozrůstaly a aby všichni soutěžící i organizátoři soutěže měli i nadále dobrý pocit, že dělají něco užitečného.

Jiří Barek

## MODERNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO RP-HPLC

DAVID SÝKORA<sup>a</sup>, EVA TESAŘOVÁ<sup>b</sup>, MAGDA VOSMANSKÁ<sup>a</sup> a MONIKA ZVOLÁNKOVÁ<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2

David.Sykora@vscht.cz

Došlo 6.4.06, přijato 22.6.06.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, reverzní fáze, monolity, hybridní sorbenty

### Obsah

1. Úvod – Pittcon 2005
2. Současné trendy ve vývoji HPLC sorbentů
  - 2.1. Porézní sorbenty
  - 2.2. Neporézní a povrchově porézní sorbenty
  - 2.3. Perfuzní sorbenty
  - 2.4. Monolity
3. Vybrané moderní stacionární fáze pro RP-HPLC
  - 3.1. Reverzní fáze na bázi silikagelu – stručný vývoj a současný stav
    - 3.1.1. Zlepšení kvality výchozího silikagelu
    - 3.1.2. Zlepšení chemické odolnosti reverzních silikagelových fází
    - 3.1.3. Speciální sorbenty určené pro RP-HPLC v mobilních fázích s vysokým obsahem vody
  - 3.2. Hybridní anorganicko-organické sorbenty pro RP-HPLC
  - 3.3. Reverzní fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu
  - 3.4. Monolitické stacionární fáze pro RP-HPLC
    - 3.4.1. Makroporézní monolitické disky
    - 3.4.2. Rigidní makroporézní polymerní monolitické kolony
    - 3.4.3. Tubulární monolitické kolony s radiálním tokem
    - 3.4.4. Silikagelové monolitické kolony
    - 3.4.5. Monolity – stacionární fáze budoucnosti
4. Závěr

### 1. Úvod – Pittcon 2005

Každoročně se v USA koná významná konference Pittcon, kde jsou představovány nejnovější výrobky a inovace v oblasti analytické chemie. Jedná se o největší výstavu svého druhu na světě. V rámci výstavy je věnován značný prostor také separačním technikám. Na základě poznatků z konference konané v roce 2005 lze stručně shrnout současné trendy v oblasti vysokoúčinné chromatografie do několika následujících bodů<sup>1</sup>:

- zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentu,
- používání kolon s menším vnitřním průměrem, tj. mikro a kapilárních kolon,
- komplexní miniaturizace celých separačních systémů,
- důraz na automatizaci analýz,
- využití ultravysokých tlaků v chromatografii,
- stále rostoucí význam techniky LC-MS.

V posledních letech je patrná silná tendence ke zmenšování rozměrů zrn/částic sorbentů. Před deseti lety byly nejpoužívanější stacionární fáze 5  $\mu\text{m}$ , dnes jsou nejrozšířenější fáze 3  $\mu\text{m}$ . Stále běžněji jsou komerčně dostupné i sorbenty s velikostí částic pod 2  $\mu\text{m}$ . Zmenšování sorbentu jde ruku v ruce se zkracováním chromatografických kolon. Výsledkem je podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách tradiční délky (25 cm) plněných 5  $\mu\text{m}$  sorbentem. Doby analýz na krátkých kolonách (5 cm, 2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají kolem 1 až 2 minut. Tyto kolony jsou s výhodou užívány zejména pro tzv. vysokoprostupné („high-throughput“) analýzy v oblastech, kde jsou denně zpracovávány stovky až tisíce vzorků. Jako příklad lze uvést chromatografickou analýzu kombinatoriálních knihoven. Krátké kolony se ale začínají prosazovat i v „běžných“ chromatografických aplikacích a celá řada firem poskytuje rostoucí sortiment kolon těchto nových formátů.

Vedle zkracování kolon dochází postupně také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr analytických kolon 4,6 mm je postupně opouštěn a nahrazen dnes již běžnějšími průměry kolem 3–4 mm. S nástupem techniky LC-MS vzrostla popularita kolon o průměru 2 mm a menším. Tento trend souvisí nejen se snahou o zrychlení analýz, ale také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu chromatografických laboratoří a v neposlední řadě i s hledisky ekologickými. Spotřeba mobilních fází, obvykle obsahujících organická rozpouštědla, a množství vznikajících odpadů může být tímto způsobem řádově sníženo. Navíc nově se rozvíjející obory, např. proteomika, vyžadují provádění separací v kolonách kapilárních a menších, protože množství vzorků bývají velmi malá a nároky na mez detekce vysoké. Splnění těchto po-

žadavků klade velké nároky nejen na vývoj stále lepších sorbentů, ale i instrumentálních systémů. Čerpadla mobilní fáze musí generovat potřebné tlaky, mimokolonové objemy je třeba minimalizovat stejně jako rozměry detekčních cel, příslušné časové konstanty musí být sníženy apod. Podrobnější diskuse nových trendů v oblasti chromatografické instrumentace je ovšem mimo rámec tohoto příspěvku. Nicméně, v této souvislosti je vhodné alespoň upozornit na první komerční systém pro ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC) schopný generovat tlaky kolem 100 MPa (Waters), který byl představen na výstavě Pittcon 2005. Pozoruhodný je také první komerční HPLC-čip s LC-MS rozhraním (Agilent Technologies), který využívá mikrofluidní technologii a integruje na ploše menší než kreditní karta obohacovací kolonu, analytickou kolonu, šesticečný ventil, elektrosprejovou jehlu, elektrické kontakty a identifikační mikročip. Je zřejmé, že právě miniaturizace je v současnosti jedním z hlavních směrů v oblasti separačních technik, kde se otevírá obrovské pole působnosti nejen pro další rozvoj instrumentace, ale i vývoj nových stacionárních fází.

Pokud se jedná o separační mody HPLC, je možno konstatovat, že dělení na reverzních fázích (RP) je stále nejrozšířenější technikou, přitom dominantní postavení mají již tradičně partikulární vázané fáze na bázi silikagelu. Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C<sub>18</sub> modifikace s tím, že tyto fáze představovaly kolem 50 % všech RP kolon nově uváděných na trh v roce 2005. S velkým odstupem následují modifikace C<sub>8</sub> (13 %), fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C<sub>4</sub> modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály nové, jako např. anorganicko-organické hybridy a modifikované oxidy kovů. Velmi perspektivní jsou také monolitické kolony.

## 2. Současné trendy ve vývoji HPLC sorbentů

Ačkoliv vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří ke „zralým“ analytickým technikám, tempo vývoje sorbentů rozhodně nepolevuje a na trh jsou uváděny stále pokročilejší materiály s lepšími vlastnostmi. Tyto inovace přinášejí nejen nové chemické modifikace na stávajících maticích, ale také využití modernějších matic a změny vlastního formátu separačního lože.

### 2.1. Porézní sorbenty

Porézní sorbenty si zachovávají dlouhodobě dominantní postavení v HPLC. Začátkem sedmdesátých let byl připraven mikropartikulární silikagel s velikostí zrn menší než 10 μm. Brzy poté byly připraveny jeho první chemicky modifikované formy, včetně reverzní fáze. Zpočátku byly částice silikagelu nepravidelného tvaru, ale postupně se podařilo zvládnout technologii výroby vedoucí ke sférickým částicím, a tak zlepšit separační účinnost, ale i další

vlastnosti výsledných sorbentů.

Jedním z cílů při vývoji nových chromatografických sorbentů vždy bylo dosažení vysoké separační účinnosti, která úzce souvisí s morfologií porézních částic. Většina povrchu typických porézních sorbentů je tvořena difuzivními póry. Zmenšení velikosti částic sorbentu zlepšuje inter- i intra-partikulární přenos hmoty. V porézní částici putuje solut z pohybující se mobilní fáze do stagnantní mobilní fáze, a pak do stacionární fáze uvnitř pórů, kde dochází k jeho interakci. Následně se analyt uvolní ze stacionární fáze a musí difundovat zpět do pohybující se mobilní fáze. Tímto mnohonásobně se opakujícím procesem analyt postupuje kolonou. V případě použití malých zrn sorbentu je difuzní proces rychlejší. Pomalý přenos hmoty ve stacionární fázi bývá hlavní příčinou malé separační účinnosti spojené s rozšiřováním píků a následně nedostačným chromatografickým rozlišením. Výroba sférických plně porézních částic řízené velikosti (a s úzkou distribucí) je v současnosti dobře zvládnuta. Jak bylo výše uvedeno, v oblasti porézních částic jsme v současnosti svědky pokračujícího trendu, který byl „nastartován“ již v 90. letech, tedy zmenšování velikosti sorbentu, zkracování, a také zmenšování průměru kolon.

### 2.2. Neporézní a povrchově porézní sorbenty

Snaha o urychlení přenosu hmoty ve stacionární fázi vedla k vývoji neporézních materiálů. Lze je rozdělit na neporézní silikagelové a neporézní polymerní částice. Neporézní sorbenty připomínají chromatografické náplně užívané v počátcích HPLC, liší se však velikostí. Současné neporézní částice mají rozměry kolem 2 μm (viz cit.<sup>2</sup>). Vlastní stacionární fáze je nanesena ve velice tenké vrstvě na povrchu neprostupné mikročástice. Přenos hmoty ve stacionární fázi je velmi rychlý a vysoké účinnosti jsou dosahovány i při velkých průtocích mobilní fáze nejen při dělení malých molekul, ale i syntetických polymerů a biomakromolekul<sup>3</sup>. Nevýhodou těchto materiálů je jejich malá sorpční kapacita v důsledku značně omezené velikosti povrchu stacionární fáze. Uvedené sorbenty lze snadno přetížit, a proto nejsou vhodné pro preparativní dělení. Navíc vzhledem k malým rozměrům částic sorbentu se na kolonách generuje vysoký tlak, podstatně vyšší než na mikropartikulárních plně porézních sorbentech s velikostí 5 μm.

Povrchově porézní sorbenty jsou podobné neporézním, ale neprostupné jádro bývá větší, kolem 5 μm, a vrstva stacionární fáze silnější. Tlaky na koloně plněné těmito materiály jsou tedy nižší než na kolonách s neporézními sorbenty, naopak sorpční kapacita je větší, a přitom dosažované účinnosti bývají lepší než na plně porézních materiálech.

### 2.3. Perfuzní sorbenty

Perfuzní sorbenty byly vyvinuty Afeyanem, Regnierem a spol.<sup>4,5</sup> a komercializovány firmou Perseprive Biosys-

tems (Massachusetts, USA) koncem 80. let. Uvedené sorbenty jsou určeny především pro separace biomakromolekul. Na rozdíl od konvenčních porézních materiálů obsahují perfuzní sorbenty dva typy pórů: difuzivní a tzv. „through pores“. Difuzivní póry jsou analogické jako u běžných porézních sorbentů a zajišťují dostatečnou sorpční kapacitu materiálu, protože většina povrchu sorbentu je tvořena právě těmito póry. „Through pores“ jsou řádově větších rozměrů a díky nim část mobilní fáze prochází přímo zrny sorbentu. Tak se vytváří konvektivní proudění uvnitř částic a výrazně se zrychluje přenos hmoty ve stacionární fázi. Výsledkem je vysoká separační účinnost i při rychlých analýzách makromolekul.

Komerční perfuzní materiály jsou polymerní sorbenty poněkud větších rozměrů než v současnosti vyráběné porézní stacionární fáze, běžně nad 12  $\mu\text{m}$ . Jejich velkou předností je nejen vysoká separační účinnost, ale i dobrá rigidita při značných průtokovým rychlostech mobilní fáze.

#### 2.4. Monolity

Na rozdíl od partikulárních sorbentů, kdy je chromatografická kolona naplněna velkým množstvím jednotlivých zrn vhodného materiálu, monolitická kolona obsahuje pouze jeden blok zhotovený z porézní hmoty. Podobně jako u perfuzních sorbentů monolity obsahují dva typy pórů odlišných velikostí (viz 2.3.). Rozdíl ovšem spočívá v tom, že monolitem prochází všechna mobilní fáze, čímž je dosaženo ještě rychlejšího přenosu hmoty. Monolitické kolony se velmi rychle prosazují všude tam, kde je třeba provádět rychlé a ultra rychlé separace. Vzhledem k velké sorpční kapacitě jsou velmi dobře použitelné pro dělení v preparativním měřítku. Současně s tím mají také vynikající předpoklady pro aplikace v mikroměřítku. Mohou být zhotoveny v nejrůznějších geometriích. Jejich příprava, zvláště rigidních polymerních monolitů, je přitom mimořádně jednoduchá. V současné době se velmi rychle prosazují i komerčně. Vzhledem k převratnosti konceptu bude monolitům dále věnována samostatná kapitola.

### 3. Vybrané moderní stacionární fáze pro RP-HPLC

Vývoj nových materiálů pro chromatografii v obráceném módu není zdaleka ukončen a lze jej považovat za kontinuální proces. Kvalita sorbentů se stále zvyšuje díky vyšší čistotě vstupních surovin, detailnější kontrole výrobních procesů, využití nových poznatků atd. Řada zlepšení nemá charakter revolučních změn, častěji se jedná spíše o pozvolný plynulý proces. Přesto ale občas dochází i ke změnám zásadním, které otevírají nové možnosti a předurčují budoucí trendy. V následující části bude věnována pozornost vybraným aspektům, které podstatně ovlivnily rozvoj a současný stav stacionárních fází pro RP-HPLC.

#### 3.1. Reverzní fáze na bázi silikagelu – stručný vývoj a současný stav

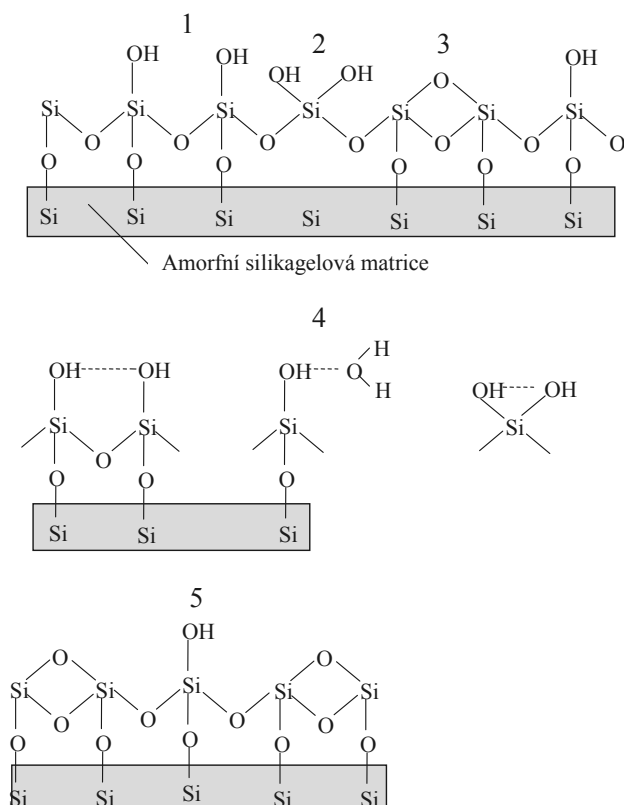
Reverzní fáze na bázi silikagelu, a zejména okta-decylová ( $\text{C}_{18}$ ) modifikace, představují stále nejrozšířenější typ sorbentů v HPLC. Podle odhadů v odborné literatuře existuje na trhu více než 400 těchto vázaných fází<sup>6</sup>. Jejich vlastnosti se ovšem vzájemně podstatně liší v závislosti na mnoha faktorech. Atraktivita silikagelu, jako výchozí matrice pro následnou chemickou modifikaci vedoucí ke vzniku reverzní fáze, je dána řadou jeho vynikajících vlastností:

- možnost přípravy monodisperzních částic sorbentu,
- možnost „ladění“ velikosti a distribuce pórů,
- možnost přípravy sorbentu s velkým specifickým povrchem,
- snadná chemická modifikovatelnost povrchu, a tedy možnost přípravy celé řady modifikací včetně obrácených fází,
- vysoká mechanická stabilita.

Chemii silikagelu byly věnovány pěkné přehledné články a knihy, např.<sup>7–9</sup>.

Silikagel pro kapalinovou chromatografii má nejčastěji porézní amorfní formu o složení  $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ . Voda je chemicky vázána v nestechiometrickém množství za vzniku silanolových skupin Si-OH. Pro HPLC v analytickém měřítku se v současné době nejčastěji užívá porézní silikagel o velikosti částic 3–5  $\mu\text{m}$ , s povrchem v rozmezí od 50–500  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  a velikostí pórů kolem 10 nm. Silanolové skupiny udělují povrchu silikagelu polární charakter a jsou pro svoji reaktivitu využívány k přípravě kovalentně vázaných fází. Koncentrace silanolů na plně hydroxylovaném silikagelu je obvykle kolem 9,0  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Na obr. 1 jsou znázorněny různé typy silanolových skupin, které jsou v nestejně míře rozprostřeny na povrchu silikagelu a vykazují rozdílnou kyselost. Silanolové skupiny a jejich typ mají velký vliv na chromatografické chování silikagelu. Díky silanolovým skupinám má silikagel vlastnosti měniče kationtů. V prostředí pufrů jsou protony silanolových skupin vyměňovány za kationty elektrolytu. Tento proces je silně závislý na pH mobilní fáze a na vlastnostech silikagelu. Hodnota  $\text{pK}_a$  silanolových skupin je teoreticky rovna 7, ale prakticky bývá podstatně nižší, kolem 4 (cit.<sup>10</sup>). V literatuře uváděné hodnoty je třeba vždy chápat jen jako průměrné. Ve skutečnosti mohou být, a bývají, na povrchu silikagelu silanoly značně různé kyselosti a je známo, že i velmi malá populace extrémně kyselých silanolových skupin může zásadně měnit vlastnosti sorbentu jako celku<sup>11,12</sup>.

Reverzní fáze na bázi silikagelu jsou dnes nejběžněji připravovány reakcí vhodného monofunkčního organosilanu (např. ethoxydi(methyl)oktadecylsilanu) se silikagelem. Kovalentně vázaný alifatický řetězec, kterým je nejčastěji oktadecylová nebo oktylová skupina, uděluje vzniklé stacionární fázi hydrofobní charakter. Je ovšem prokázáno, že silanizace vede ke zreagování jen asi poloviny všech přítomných silanolových skupin na povrchu silikagelu<sup>13</sup>. Za



Obr. 1. Různé typy funkčních skupin na povrchu silikagelu;  
 1 – vicinální silanolové skupiny; 2 – geminální silanolové skupiny;  
 3 – siloxanové skupiny; 4 – asociované silanolové skupiny;  
 5 – izolovaná silanolová skupina

jistých okolností se zbytkové silanoly mohou spolupodílet (vedle žádoucí hydrofobní interakce) na retenci analytů. Tato obvykle nežádoucí interakce je často doprovázena snížením separační účinnosti a chvostováním piků. Uvedený efekt se projevuje především při dělení bazických látek, které mohou být protonizovány, což vede k jejich zadržování na deprotonovaných silanolech elektrostatickou interakcí. Právě tyto nežádoucí sekundární iontově-výměnné interakce na povrchu silikagelových reverzních fází vždy do jisté míry omezují jejich univerzální použitelnost. Jednoduché řešení tohoto problému, tj. snížení protonizace báze zvýšením pH pufru, totiž není možné vzhledem k rozpustnosti silikagelu při vyšším pH. Eliminaci nebo alespoň potlačení iontové výměny na reverzních silikagelových fázích bylo věnováno mimořádné úsilí také proto, že celá řada důležitých analytů (léčiv apod.) má bazickou povahu.

### 3.1.1. Zlepšení kvality výchozího silikagelu

Koncem 80. a začátkem 90. let bylo jasně ukázáno, že kvalita výchozího silikagelu (před jeho modifikací na reverzní fázi) má mimořádnou důležitost. Žádná následující chemická modifikace nevede ke vzniku kvalitní reverzní

fáze, pokud samotný výchozí materiál nemá vhodné a dobře kontrolované vlastnosti. V tomto směru byly velmi přínosné práce Köhlera a Kirklanda, kteří experimentálně prokázali tehdy poměrně překvapivou skutečnost, že reverzní fáze s omezenou nežádoucí sorpcí bazických látek jsou připraveny na těch silikagelech, které před RP modifikací nesou velké množství homogenně distribuovaných asociovaných silanolových skupin. Naopak přítomnost malého počtu silanolů, a zvláště silně kyselých izolovaných silanolů, je nevhodná<sup>7,8</sup>. Nawrocki a spol. hledali příčiny velké kyselosti některých silanolových skupin a v této souvislosti odhalili negativní roli kovových nečistot v silikagelové matici<sup>14</sup>. Na základě uvedených poznatků se začalo intenzivně pracovat na vývoji tzv. bazicky deaktivovaných fází („base deactivated phases“). Většinou šlo o přípravu velmi čistého silikagelu s homogenní distribucí asociovaných silanolových skupin. (V souvislosti s velmi čistými silikagely se kromě označení „base deactivated silica“ můžeme v odborné literatuře setkat také s označením „type B silica“.) Dnes již prakticky všechny světově významné chromatografické firmy vyrábějí a pro přípravu vázaných fází používají ultračisté silikagely uvedeného typu. Výrobní technologie je zvládnuta natolik, že výrobci s kolonou dodávají i detailní informace o fyzikálně-chemických vlastnostech sorbentu. Pro jejich charakterizaci se využívají moderní analytické metody jako infračervená spektroskopie a nukleární magnetické rezonance v kombinaci s řadou chromatografických testů. Vzhledem k tomu, že silikagel je připravován z velmi čistých vstupních surovin za důkladně kontrolovaných podmínek, lze dnes např. množství příměsí kovů v matici kontrolovat na úrovni jednotek miligramů na kilogram (ppm) sorbentu a méně. Výsledné reverzní fáze poskytují pro většinu látek, včetně bazických, symetrické píky s vysokou účinností nejen v kyselých mobilních fázích, ale i při neutrálním pH.

### 3.1.2. Zlepšení chemické odolnosti reverzních silikagelových fází

Jednou z velkých slabín reverzních fází na bázi silikagelu je jejich omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí. Rozpustnost silikagelu ve vodném prostředí je silně závislá na jeho formě a fyzikálně-chemických charakteristikách. Typická C<sub>18</sub> fáze je stabilní jen v úzkém rozsahu pH, asi 3–9, často se dokonce uvádí jen 3–7, pokud je míněna dlouhodobá stabilita. Jakmile je pH mobilní fáze nižší než 3, dochází ke kyselé katalyzované hydrolyze siloxanové vazby mezi silikagelem a organosilanem<sup>13</sup>. Tento proces vede ke kontinuální ztrátě vázané fáze a ve svém důsledku ke ztrátě chromatografické retence pro hydrofobní analyty. Při hodnotě pH nad ~9 nastává naopak rozpouštění silikagelové matrice<sup>15</sup>. Rozpouštění silikagelu je doprovázeno poklesem účinnosti, vznikem volného prostoru v koloně, nakonec dojde k úplné destrukci stacionární fáze.

Navíc je vhodné si uvědomit, že dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu stacionární fáze je teplota<sup>13</sup>. V současnosti bývá chromatografická kolona v průběhu separace umístěna v termostatu a analýza obvykle probíhá

za konstantní teploty, často poněkud vyšší než je teplota laboratoře, protože díky poklesu viskozity a zrychlení přenosu hmoty dochází ke zlepšení separační účinnosti. Teplotní stabilita reverzních fází na bázi silikagelu bývá uváděna v rozmezí od 5 °C do asi 100 °C. Obecně ovšem platí, že zvyšování teploty vždy vede k rychlejší degradaci sorbentu, což se zejména projevuje při extrémních (z hlediska dané stacionární fáze) hodnotách pH.

Nejjednodušším řešením problému omezené stability sorbentu je striktní udržování pH mobilních fází v rozmezí od 3 do 7–9, což však zásadně omezuje možnost optimalizace složení mobilní fáze. Například při dělení bazických léčiv je často vhodné užití mobilní fáze buď silně kyselou, nebo naopak zásaditou. V silně kyselé oblasti pH dochází k potlačení nežádoucích iontových interakcí mezi protonizovanou bází a silanolovými skupinami, protože silanoly jsou zde nedisociovány. Eliminace sekundárních (iontově-výměnných) interakcí vede ke zvýšení separační účinnosti a zlepšení symetrie píků bazických látek. Naopak zvýšení pH mobilní fáze nad 7 může vést k deprotonizaci bazického analytu, a tím ke zvýšené retenci na obrácené fázi v důsledku nárůstu hydrofobicity analytu, a tím také ke zlepšené účinnosti separace a rozlišení.

Z výše uvedených důvodů byla a je motivace pro vývoj silikagelových stacionárních fází s rozšířeným rozsahem stability vzhledem k hodnotám pH a teplot velmi silná.

#### Zlepšení stability v kyselém prostředí

Již koncem 80. tých let bylo prokázáno, že zvětšení velikosti a hydrofobicity organosilanu vázaného na silikagel vede ke zvýšení odolnosti připravené fáze vůči kyselé hydrolyze<sup>16</sup>. C<sub>18</sub> fáze je tedy z tohoto pohledu stabilnější než C<sub>8</sub> > C<sub>4</sub> > C<sub>1</sub>. Předpokládá se, že objemný alkyl lépe chrání siloxanovou vazbu před hydrolyzou.

Jiné přístupy vedoucí ke zvýšené odolnosti sorbentu vůči silně kyselému prostředí jsou založeny na vzniku většího počtu kovalentních vazeb mezi silikagelem a modifikujícím silanem („multi-dentate approach“). Například pro vznik vázané fáze lze použít difunkční (R<sub>2</sub>SiX<sub>2</sub>) nebo trifunkční (RSiX<sub>3</sub>) organosilany (X=Cl, OR). Oba reagenty se budou vázat více kovalentními vazbami na povrch silikagelu, ale současně bude docházet v určité míře i k tvorbě polymerních struktur na povrchu stacionární fáze. Uvedený postup sice snižuje riziko kyselé hydrolyzy fáze, je ale poměrně málo reprodukovatelný, a navíc vede ke tvorbě nových reaktivních silanolových skupin. Moderní vázané fáze jsou proto dnes téměř výhradně připravovány s využitím monofunkčních organosilanů<sup>17</sup>. Komerčně nejspěšnější je zatím použití tzv. stericky chráněných silanů. Tato cesta přípravy byla vyvinuta a patentována Glajchem a spol.<sup>16,18</sup>. Stericky chráněné silany jsou tvořeny jedním alkylem (C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) nebo fenylem, dvěma objemnými isopropylými nebo isobutylovými skupinami a jednou reaktivní funkční skupinou (Cl), vázanými na křemíkový atom. Vzniklé fáze jsou stabilní i v agresivních podmínkách, např. v 0,1% trifluoroctové kyselině při pH ~ 0,9 za teploty 90 °C (cit.<sup>13,16</sup>). Isobutylová i isopro-

pylová skupina velmi dobře stíní kovalentní siloxanovou vazbu vůči kyselé hydrolyze.

#### Zlepšení stability v alkalickém prostředí

Úsilí o zlepšení odolnosti vázaných fází v alkalickém prostředí bylo zaměřeno na zvýšení stupně pokrytí silikagelové matrice hydrofobními funkčními skupinami a na její odstínění. Pouhé prodloužení alkylových modifikujících řetězců vede ke zlepšené odolnosti v alkalickém prostředí pravděpodobně v důsledku zlepšeného stínění silikagelové matrice<sup>13</sup>. Tento přístup však neposkytuje dostatečnou ochranu fáze a bylo nutno hledat alternativy. Jinou možností jsou dodatečné modifikující reakce („endcapping“). Technika je založena na modifikaci povrchu organosilanem s příslušně dlouhou hydrofobní skupinou a následné dodatečné modifikaci povrchu reakcí např. s trimethylchlorsilanem nebo hexamethyldisilazánem<sup>9</sup>. Malé rozměry endkapujících činidel jim umožní lépe proniknout k povrchu silikagelu. Tak dojde ke zreagování dalšího podílu silanolových skupin, které byly pro objemnější organosilan použitý v prvním stupni modifikace nepřístupné. Proces vede k dramatickému zlepšení odolnosti fáze vůči alkalickému prostředí. Technika tzv. dvojitého endkapingu („double endcapping“) poskytuje ještě lepší odstínění matrice<sup>15,19,20</sup>.

#### 3.1.3. Speciální sorbenty určené pro RP-HPLC v mobilních fázích s vysokým obsahem vody

Při chromatografii v obráceném módu může analytik ovlivňovat kvalitu separace mnoha faktory. Zásadní vliv má složení mobilní fáze: volba organické složky a volba jejího množství, výběr pufru a jeho pH, přídavek aditiva (povrchově aktivní látky, iontově párového činidla, chirálního selektoru, apod.), resp. volba teploty. Optimalizace složení mobilní fáze je poměrně obtížná při chromatografii silně polárních látek na obrácených fázích. Jejich velmi malá retence vyžaduje užití minimálního množství organického modifikátoru v mobilní organicko-vodné fázi nebo dokonce jeho úplnou eliminaci. Za takových podmínek ovšem dochází v případě konvenčních alkylových reverzních fází k tzv. „kolapsu fáze“, kdy analyty (leckdy i poměrně hydrofobní) eluují z kolony velmi rychle a bez separace. Mechanismus fázového kolapsu byl v literatuře poměrně hojně diskutován; kromě jiného přitom bylo experimentálně prokázáno, že užívaný pojem „kolaps fáze“ je částečně zavádějící, neboť skutečná podstata procesu je odlišná<sup>21</sup>. Bylo navrženo několik způsobů řešení problémů se ztrátou retence ve 100% vodném prostředí<sup>22</sup>: a) užití „neendkapovaných“ obrácených fází s krátkým alkylovým řetězcem, b) užití stacionárních fází naopak (a poněkud překvapivě) s velmi dlouhým řetězcem, C<sub>30</sub> fáze, c) aplikace makroporézních sorbentů, d) využití hydrofilních a „polárně endkapovaných“ stacionárních fází, e) použití sorbentů se zabudovanou polární funkční skupinou v alkylovém řetězci („polar-embedded alkyl phases“, PEP). Zvláště posledně zmíněná skupina moderních sorbentů pro RP-HPLC ve vodném prostředí je v současnosti početná a zasluhuje samostatnou pozornost.

Reverzní fáze se zabudovanou polární funkční skupinou

Podobně jako v případě nejtypičtějších reverzních fází založených na silikagelu modifikovaném dlouhými alifatickými (nejčastěji oktadecylovými) řetězci je v případě PEP silikagel kovalentně modifikován dlouhými alifatickými zbytky, ale tentokrát je do struktury těchto ligandů navíc zabudována určitá polární funkční skupina, vždy lokalizovaná v těsné blízkosti povrchu silikagelu. Díky včlenění polární skupiny do alifatického řetězce nedochází k fázovému kolapsu, stacionární fáze zůstává plně solvatovaná i v prostředí 100% vodné mobilní fáze a alkylové řetězce si zachovávají svou konformační volnost a schopnost interagovat s analyty. Navíc experimentální poznatky ukazují, že zabudované polární skupiny vstupují do interakcí se zbytkovými silanolovými skupinami na povrchu silikagelu, tím dochází k jejich stínění a omezení nežádoucího vlivu na separaci některých, zejména bazických, analytů.

Bouřlivý rozvoj PEP stacionárních fází nastal teprve v nedávné době. Postupně byly do alkylového řetězce zabudovány různé polární strukturní motivy, např. močovina, ethery, aminy, směsné amidy a jiné. Řada výrobců detailní chemickou strukturu PEP fází neuvádí z důvodů utajení.

Koncept sorbentů se zabudovanou polární funkční skupinou přináší řadu výhod:

- především sorbenty mohou být užity i ve 100% vodném prostředí bez nebezpečí fázového kolapsu, tento rys je zvláště důležitý pro dělení vysoce polárních látek,
- sorbenty vykazují obvykle nižší retenci a odlišnou selektivitu pro polární analyty ve srovnání s konvenčními čistě alkylovanými fázemi,
- analyty schopné tvořit vodíkové můstky mohou poměrně intenzivně interagovat se zabudovanými polárními skupinami a jejich retence bývá větší než na konvenčních fázích,
- sorbenty se vyznačují potlačenou aktivitou silanolových skupin, což vede ke snížení chvostování zásaditých látek zejména při neutrálním pH mobilní fáze,
- díky vodíkovým vazbám je na povrchu sorbentu přítomno více vody než na klasických alkylovaných fázích, čímž dochází k zeslabení interakce s bazickými látkami.

### 3.2. Hybridní anorganicko-organické sorbenty pro RP-HPLC

Velmi odlišný, zajímavý a komerčně úspěšný přístup k syntéze odolnějších reverzních fází na bázi silikagelu navrhl a poprvé publikoval Unger a spol.<sup>23</sup>. Koncept využívá reakce anorganického alkoxyasilanu s organickým alkoxyasilanem za vzniku anorganicko-organické hybridní částice<sup>24</sup>.

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabi-

lou a sníženým efektem reziduálních silanolů. V roce 1999 byla na trh uvedena první generace hybridních fází pod názvem XTerra firmou Waters<sup>24</sup>. Syntéza je založena na reakci dvou organosilanů, jeden z nich tvoří silikagelovou matici a druhý do vznikající matrice vnáší methylsiloxanové jednotky. Konkrétně se jedná o reakci tetraethoxyasilanu s methyltriethoxyasilanem. Vzniklé hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky, a to jak uvnitř matrice sorbentu, tak na povrchu. Stechiometrický poměr reaktantů 2:1 se osvědčil jako optimální z hlediska vlastností připraveného sorbentu. Pro potřeby RP-HPLC je povrch následně kovalentně modifikován buď trifunkčními silany za vzniku fází MS C<sub>8</sub> a MS C<sub>18</sub>, optimalizovaných pro maximální chemickou stabilitu a určených pro LC-MS, a nebo monofunkčními silany za vzniku fází RP<sub>8</sub> a RP<sub>18</sub>, s vloženými karbamáty, optimalizovaných pro minimální chvostování bazických látek. Experimentálně bylo prokázáno, že selektivita MS C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> stacionárních fází pro hydrofobní i polární analyty je obdobná jako na běžných silikagelových reverzních fázích<sup>24</sup>. Obdobně také selektivita hybridů se zabudovanou karbamátovou polární funkční skupinou se téměř nelišila od čistě silikagelových karbamátových kolon. Tato skutečnost se dá vhodně využít při přenosu chromatografických metod z konvenčních silikagelových sorbentů na materiály hybridní, kdy často není nutná nová optimalizace separačních podmínek. Vzhledem k tomu, že na povrchu hybridu je ve srovnání s klasickými silikagelovými materiály asi jen třetina silanolových skupin, chvostování bazických látek je na hybridních fázích výrazně omezeno a symetrie píků daleko lepší. Hybridy vykazují velkou odolnost vůči vysoké hodnotě pH mobilní fáze. Hybridní reverzní fáze byly úspěšně testovány v rozmezí pH 1,2 až 11,5 (cit.<sup>25</sup>). Analyty bazické povahy tak mohou být často separovány ve formě volných bází s daleko lepší separační účinností a odlišnou selektivitou než v kyselém prostředí. Další důležitou vlastností hybridních sorbentů je jejich zlepšená odolnost vůči zvýšené teplotě mobilní fáze<sup>24</sup>. Možnost chromatografie při teplotách i kolem 60 °C přináší řadu výhod: snížení viskozity mobilní fáze, a tím tlaku na koloně, zlepšení separační účinnosti a zmenšení závislosti účinnosti kolony na rychlosti průtoku (velmi zajímavý a důležitý efekt); tím se vytváří příznivé podmínky pro uplatnění uvedených sorbentů při velmi rychlých separacích.

V minulém roce byl úspěšně dokončen vývoj druhé generace hybridních sorbentů. Ty jsou připravovány reakcí tetraethoxyasilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem<sup>26</sup>. Ve srovnání se sorbenty XTerra byla dále podstatně zvýšena chemická odolnost v silně bazickém prostředí a separační účinnost<sup>26</sup>.

### 3.3. Reverzní fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu

Vzhledem k omezené chemické odolnosti silikagelu v alkalickém prostředí byly hledány jiné chemicky odolnější materiály použitelné pro přípravu obrácených fází. Ukázalo se, že oxidy hliníku, zirkonia a titanu jsou pod-

statně stabilnější v silně alkalickém prostředí než silikagel<sup>27,28</sup>. Navíc jsou tyto nové materiály v bazickém prostředí stabilní i při zvýšené teplotě, což neplatí pro silikagelové fáze. Zvýšená stabilita a pracovní rozsah pH přináší řadu výhod, kromě jiného i možnost regenerace kolon za velmi agresivních podmínek bez nebezpečí poškození sorbentu. Srovnávací testy jednotlivých oxidů prováděné za extrémních podmínek ukázaly, že oxid zirkonia je stabilnější než oxid hliníku jak v silně kyselém, tak alkalickém prostředí. Oxid zirkonia je naprosto stabilní v rozsahu pH 1–14, také oxid titanu je údajně stabilní ve stejném rozsahu, ale jednoznačný experimentální důkaz zatím podán nebyl. Naproti tomu, oxid hliníku je nezanebatelně rozpustný v kyselém prostředí, zvláště v kyselině chlorovodíkové. Mechanická odolnost vůči vysokému tlaku je u všech zmíněných oxidů velmi dobrá, plně srovnatelná nebo lepší než v případě silikagelu.

Chemické vlastnosti povrchu oxidů hliníku, zirkonia a titanu jsou podstatně odlišné od silikagelu<sup>27</sup>. Zatímco nemodifikovaný silikagel má povahu měniče kationtů, zmíněné oxidy mají amfoterní charakter a jsou tedy schopny v závislosti na pH mobilní fáze vystupovat buď jako měniče kationtů, nebo aniontů. Druhou velmi významnou odlišností je skutečnost, že na povrchu oxidů zmíněných kovů jsou místa s vlastnostmi Lewisovy kyseliny. Tato centra umožňují interakce na bázi ligandové výměny. Obecně lze říci, že chemie povrchu oxidů kovů je velmi složitá, mnohem komplikovanější než v případě silikagelu, např. na povrchu oxidů kovů jsou podobně jako na povrchu silikagelu lokalizovány hydroxylové skupiny, ale konkrétně v případě oxidu titanu se v literatuře uvádí, že je třeba rozlišovat 12 různých typů –OH skupin<sup>29</sup>.

Pro RP-HPLC aplikace je nezbytná hydrofobizace povrchu oxidů hliníku, zirkonia a titanu. Dosud neexistuje žádná modifikační technika vedoucí k úplnému odstínění povrchu sorbentů, a proto je nutno vždy počítat s tím, že konečná interakce s analytem nemusí mít čistě hydrofobní charakter. Pokud se jedná o způsoby modifikace povrchu, lze je třídit do několika skupin: a) dynamická modifikace se provádí přidávkou látky, která silně interaguje s povrchem sorbentu, do mobilní fáze, b) permanentní kovalentní chemická modifikace využívá reaktivity vhodných modifikujících činidel za vzniku stabilní vazby mezi povrchem sorbentu a činidlem, c) podstatou fyzikální modifikace povrchu je pokrytí povrchu vhodným polymerem nebo vrstvou uhlíku.

Silanizační techniky, velmi úspěšné při přípravě silikagelových obrácených fází, které měly vést ke kovalentní modifikaci povrchu oxidů kovů, se příliš neosvědčily. Experimentálně byla potvrzena platnost řady hydrolytické stability vazby mezi křemíkem a kyslíkem v pořadí: Si-O-Si-R >> Zr-O-Si-R > Ti-O-Si-R >> Al-O-Si-R. Důsledkem toho je fakt, že většina pokusů o stabilní silanizaci povrchů oxidů kovů monofunkčními silany byla neúspěšná. Modifikace provedené trifunkčními silany v některých případech alespoň částečně k úspěchu vedly, ale otázkou zůstává, zda tento výsledek nespočíval spíše v horizontální polymeraci trifunkčních silanů na porchu

oxidů kovů. Navíc pokud jsou pro silanizaci využity trifunkční silany, vzniknou nevyhnutelně reakcí s povrchem i skupiny M-O-Si-OH (M = Al, Zr nebo Ti), které svou velkou kyselostí dále přispějí k značné heterogenitě modifikovaného povrchu. Příprava současných komerčně dostupných RP sorbentů na bázi oxidů kovů proto není založena na využití silanizačních reakcí. Nejdůležitější postupy spočívají v pokrývání povrchu vhodnými hydrofobními vrstvami. Nejčastěji jsou oxidy kovů modifikovány polybutadienem (PBD), který má pro neionizovatelné látky podobnou separační selektivitu jako silikagelové C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> fáze, nebo polystyrenem (PS), který je svou selektivitou spíše blízký fenylové modifikaci silikagelu. Je třeba ale zdůraznit, že nabitě a ionizovatelné látky se chovají na PBD a PS modifikacích oxidů kovů podstatně odlišně než na silikagelových reverzních fázích, což je důsledek silných iontových a ligandově-výměnných interakcí mezi nedokonale odstíněným povrchem oxidů kovů a analyty. Pro uvedené sorbenty je proto typické, že volba typu pufru a jeho koncentrace má daleko větší vliv na retenční časy ionizovatelných analytů a na tvar píků, než je běžné v případě silikagelových reverzních fází. PBD sorbenty vykazují velmi dobrou pH stabilitu, pro oxid hliníku v rozmezí pH 3–12, pro oxid zirkonia v rozmezí pH 1–14. Kromě toho také tepelná odolnost zvláště zirkoniových PBD fází je mimořádná. K degradaci nedochází ani při aplikaci 1 mol l<sup>-1</sup> hydroxidu sodného při 100 °C. Velmi dobrou pH a tepelnou stabilitu mají i kovové oxidy pokryté vrstvou polystyrenu, které mohou být provozovány v rozmezí pH nejméně 1–13 a při teplotách až do 160 °C. Vedle PBD a PS byl povrch oxidu zirkonia úspěšně modifikován také pyrogenním uhlíkem<sup>30</sup>. Tato stacionární fáze je schopná velmi citlivě rozlišovat analyty podle tvaru jejich molekul, a je proto vhodná pro dělení geometrických isomerů<sup>31</sup>.

Důležitou vlastností moderních PBD, PS a uhlíkových fází je skutečnost, že separační účinnosti pro neutrální analyty jsou plně srovnatelné s účinnostmi dosahovanými na silikagelových fázích C<sub>18</sub> a C<sub>8</sub>, což znamená, že přenos hmoty ve stacionární fázi je dostatečně rychlý. V této souvislosti je třeba upozornit, že plně polymerní sorbenty, na bázi např. styren-divinylbenzenu nebo poly(methylmethakrylátu) jsou také vysoce chemicky stálé, ale účinnosti na nich dosahované bývají zpravidla podstatně nižší než na silikagelových reverzních fázích, pravděpodobně v důsledku přítomnosti mikropórů.

Kompatibilita sorbentů s vysokými teplotami nabízí mnoho zajímavých aplikačních výhod. Řada z nich již byla výše zmíněna, zde lze navíc připomenout možné využití samotné vody jako mobilní fáze. Je totiž známo, že při teplotě 200 °C má voda podobnou polaritu jako methanol při laboratorní teplotě<sup>32</sup>. Tímto způsobem lze dosáhnout snížení spotřeby organických rozpouštědel. Navíc vyloučení organických solventů může nabídnout i nové detekční možnosti (např. měření ve vzdálené UV oblasti < 210 nm).

V budoucnu lze předpokládat další rozvoj sorbentů odvozených od oxidů kovů. Je například pravděpodobné, že budou připraveny monolitické fáze. Také se dá očeká-



vat, že bude pokračovat vývoj modifikačních technik, které povedou k dokonalejšímu odstínění matrice stacionární fáze. Nejnovější způsoby pokrývání oxidů kovů vrstvami uhlíku a možnosti jejich následující chemické modifikace jsou v tomto směru velkým příslibem.

### 3.4. Monolitické stacionární fáze pro RP-HPLC

Monolity jsou zvláštní separační média, která nemají interpartikulární prostory<sup>33,34</sup>. Lze si je představit jako jednu jedinou velkou částici sorbentu. Morfologie monolitů je již dnes natolik vyladěna, že monolitické kolony mohou být často provozovány při ~5× větších průtocích než konvenční kolony plněné 5 μm sorbentem, přitom tlaky jsou srovnatelné. Podrobná teorie procesu přenosu hmoty v monolitických médiích byla nedávno vypracována Liapisem<sup>35,36</sup> a Tallarekem<sup>37</sup>.

#### 3.4.1. Makroporézní monolitické disky

Přestože první pokusy o přípravu monolitických kolon se datují již do šedesátých a sedmdesátých let minulého století<sup>38</sup>, prakticky použitelné materiály se objevily až později. Jedním z prvních chromatograficky využitelných formátů monolitických médií byly monolitické disky (monolitické membrány). Tyto materiály různého chemického složení a v mnoha geometriích byly poprvé úspěšně připraveny až v polovině 80. let, především za účelem rychlých separací bílkovin. Brzy se potvrdilo, že pro dosažení dobrého dělení stačí jen poměrně tenká membrána, a tím se vytvořil široký prostor pro další vývoj konceptu monolitických médií ve formě disku. Na výzkumu se významně podíleli i pracovníci Ústavu makromolekulární chemie v Praze. V současnosti jsou již monolitické disky komerčně dostupné, konkrétně např. od firmy CIM (BIA Separations). Disky o tloušťce do 3 mm jsou při vlastní separaci umístěny ve speciálním držáku, kam může být vloženo i několik různých membrán lišících se chemickou modifikací, a tak lze provádět vícerozměrné separace.

Hlavní využití tohoto formátu dnes stále spočívá především v oblasti rychlého dělení velkých biomolekul gradientovou elucí<sup>39</sup>. Většina komerčních disků je připravována z reaktivních monomerů, např. glycidylmethakrylátu, které jsou následně vhodně chemicky modifikovány pro jejich použití v různých separačních modech.

#### 3.4.2. Rigidní makroporézní polymerní monolitické kolony

Začátkem devadesátých let připravili Švec a spol. první rigidní makroporézní monolitické kolony<sup>40</sup>. Jejich syntéza se provádí velmi jednoduchým způsobem, a to *in situ* polymerací vhodných monomerů přímo v chromatografické koloně. Příprava spočívá v naplnění trubice směsí monomerů, radikálového iniciátoru a porogenu. Následně je trubice uzavřena, utěsněna a provedena polymerace za pečlivě kontrolované teploty. Koncová těsnění jsou potom nahrazena standardními koncovkami pro HPLC a připravená monolitická kolona je připojena k separačnímu systému. Nezreagované látky jsou vymyty

vhodným solventem, a tím je kolona připravena k provozu.

Tyto rigidní monolity byly s úspěchem vyrobeny nejen ve formátu typických nerezových HPLC kolon, ale i v kapilárách<sup>41,42</sup>, které nacházejí velké uplatnění při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jejich velkou předností je fakt, že provedení polymerace přímo v kapiláře je snazší než její plnění mikročásticemi konvenčního sorbentu.

Syntéza monolitů použitelných v různých chromatografických modech je uskutečnitelná několika postupy. Tak například přímá polymerace styrenu a divinylbenzenu vede ke stacionární fázi velmi vhodné pro RP-HPLC peptidů a proteinů. Jinou možností je aplikace reaktivních funkcionalizovaných monomerů a následná modifikace vzniklého polymeru v podobném smyslu, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole. V neposlední řadě je třeba upozornit i na možnost roubování monolitů s využitím UV záření, které umožňuje přípravu stacionárních fází s vysokou separační kapacitou.

#### 3.4.3. Tubulární monolitické kolony s radiálním tokem

Principiálně by vše nasvědčovalo tomu, že monolitické kolony by mohly být velmi zajímavé také pro preparativní separace. Problém je ovšem v tom, že radikálová polymerace v koloně je exotermní proces, při kterém se uvolňuje velké množství tepla. Polymerace probíhá bez míchání a odvod tepla je obtížný. Zatímco při výrobě monolitů pro analytické aplikace je tato komplikace zvládnutelná, dostatečně přesná kontrola teplotních poměrů při polymeraci velkých monolitů je mimořádně obtížná<sup>43</sup>. Takovéto monolity mají v důsledku vytvořeného teplotního gradientu nehomogenní distribuci pórů v radiálním směru, a to vede ke zhoršení chromatografických parametrů.

Tato obtíž byla do značné míry elegantně vyřešena konceptem tubulárních monolitů s radiálním tokem<sup>44</sup>. Jedná se o trubice s definovanou tloušťkou monolitem tvořených stěn, mobilní fáze a analyty procházejí přes stěnu v radiálním směru. Tyto kolony mohou mít objemy i kolem 10 litrů, používané průtoky jsou asi 10 l min<sup>-1</sup> a množství separovaných proteinů nebo oligonukleotidů může dosahovat i 200 g v jednom nástřiku.

#### 3.4.4. Silikagelové monolitické kolony

První silikagelové monolity byly syntetizovány Tanakou<sup>45</sup>. Na rozdíl od rigidních makroporézních polymerických médií, silikagelové monolity analytických rozměrů nemohou být připraveny přímo v chromatografické koloně, neboť při solidifikaci během hydrolytické iniciované polykondenzace tetraalkoxysilanů v prostředí polyethylen-glykolu (porogen), dochází k výraznému zmenšování objemu. Nejprve je tedy připraven monolit, ten je pak zatěsněn do kolony odpovídajících rozměrů, a nakonec obvykle následuje chemická modifikace povrchu podle účelu použití monolitu. Vzhledem ke srážení monolitu při jeho syntéze je obtížné připravit média s délkou nad ~15 cm. Pravděpodobně z podobných důvodů není snadná ani výroba monolitů s průměrem menším než 3 mm. Komerčně jsou

zatím dostupné kolony od firem Merck (Německo)<sup>46</sup> a Phenomenex (USA), ovšem jen ve dvou průměrech 4,6 mm (pro separace v analytickém měřítku), a pak až 100  $\mu\text{m}$  (pro kapilární chromatografii). Platí, že příprava silikagelových monolitů v kapilárním měřítku je snazší a reprodukovatelnější než výroba kolon větších rozměrů, a to proto, že kapiláry se s úspěchem polymerují podobně jako rigidní polymerní monolity, tedy přímým *in situ* procesem.

Silikagelové tyče obsahují jak velké póry o velikosti kolem 1  $\mu\text{m}$ , tak i velké množství mesoporů, a proto má výsledný monolit poměrně značně velký povrch, což je vlastnost důležitá zvláště při izokratických separacích v reverzním módu. Monolitické silikagelové kolony jsou vhodné pro rychlé separace především malých a středně velkých molekul. Tím se liší od všech ostatních typů monolitů, protože ty jsou naopak většinou užívány pro dělení makromolekulárních látek, většinou v gradientovém uspořádání.

### 3.4.5. Monolity – stacionární fáze budoucnosti

Podle některých odborníků představují monolitická média největší průlom v oblasti chromatografie od dob jejího vzniku<sup>47</sup>. Monolitická média jsou někdy označována jako „stacionární fáze čtvrté generace“ s přesně laděnými vlastnostmi<sup>48</sup>. V každém případě jim je v současnosti věnována velká pozornost mnoha vědeckými týmy a firmami. Je zřejmé, že potenciál monolitů ještě není plně využit. Díky jejich unikátním vlastnostem, tj. snadné přípravě a toleranci k vysokým průtokům, jsou již dnes v řadě konkrétních případů preferovány před klasickými partikulárními sorbenty. Vzhledem k tomu, že monolitické kolony patří mezi nové stacionární fáze, není zatím jejich sortiment tak pestrý jako v případě částicemi plněných kolon, ale tento stav se pravděpodobně rychle změní.

## 4. Závěr

Moderní trendy ve vývoji a výrobě stacionárních fází pro RP-HPLC směřují k produkci fází se stále větší mechanickou, chemickou a tepelnou odolností. Rozměry kolon a sorbentů se postupně zmenšují, což umožňuje zvýšit separační účinnost, zrychlit analýzy, zlepšit detekční limity, a přitom snížit spotřebu solventů.

Vysoce čistý silikagel se stále dobře osvědčuje jako výchozí matrice pro přípravu moderních vázaných fází. Ovšem hybridní anorganicko-organické materiály navíc vykazují vynikající odolnost vůči alkalickému prostředí. Nadějně jsou pravděpodobně i stacionární fáze založené na oxidech zirkonia a titanu. Velmi perspektivní, a dosud ani zdaleka nevyčerpanou oblastí jsou monolitická média.

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM 6046137307: „Fyzikálně-chemické metody analýzy a popisu chemických systémů a biosystémů“.*

## LITERATURA

1. Majors R. E.: *LCGC North America* 23, 248 (2005).
2. Barder T. J., Wohlman P. J., Thrall C., DuBois P. D.: *LCGC* 15, 918 (1997).
3. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: *LCGC North America* 17, 998 (1999).
4. Afeyan N. B., Gordon N. F., Mazsaroff I., Varady L., Fulton S. P., Yang Y. B., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 519, 1 (1990).
5. Regnier F. E.: *Nature* 350, 634 (1991).
6. Miyabe K., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 903, 1 (2000).
7. Kohler J., Chase D. B., Farlee R. D., Vega A. J., Kirkland J. J.: *J. Chromatogr., A* 352, 275 (1986).
8. Kohler J., Kirkland J. J.: *J. Chromatogr., A* 385, 125 (1987).
9. Neue U. D. (ed.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, New York 2001.
10. Mendez A., Bosch E., Roses M., Neue U. D.: *J. Chromatogr., A* 986, 33 (2003).
11. Nawrocki J.: *Chromatographia* 31, 193 (1991).
12. Nawrocki J.: *Chromatographia* 31, 177 (1991).
13. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. (ed.): *Practical HPLC Method Development*. 2. vyd. Wiley-Interscience, New York 1997.
14. Nawrocki J., Moir D. L., Szczepaniak W.: *Chromatographia* 28, 143 (1989).
15. Claessens H. A., van Straten M. A., Kirkland J. J.: *J. Chromatogr., A* 728, 259 (1996).
16. Kirkland J. J., Glajch J. L., Farlee R. D.: *Anal. Chem.* 61, 2 (1989).
17. Gritti F., Guiochon G.: *Anal. Chem.* 75, 5726 (2003).
18. Glajch J. L., Kirkland J. J. (du Pont de Nemours, E. I. and Co. USA): US 4705725; *Chem. Abstr.* 108, 146734 (1988).
19. Glajch J. L., Kirkland J. J. (du Pont de Nemours, E. I. and Co. USA): US 4746572; *Chem. Abstr.* 110, 208923 (1988).
20. Kirkland Jr. J. J., Adams J. B. (Hewlett-Packard Company, USA): US Patent 5,869,724; *Chem. Abstr.* 130, 162560, (1999).
21. Przybyciel M., Majors R. E.: *LCGC Europe* 15, 652 (2002).
22. Majors R. E., Przybyciel M.: *LCGC Europe* 15, 780 (2002).
23. Unger K. K., Becker N., Roumeliotis P.: *J. Chromatogr., A* 125, 115 (1976).
24. Cheng Y. F., Walter T. H., Lu Z. L., Iraneta P., Alden B. A., Gendreau C., Neue U. D., Grassi J. M., Carmody J. L., O'Gara J. E., Fisk R. P.: *LCGC North America* 18, 1162 (2000).
25. Neue U. D., Walter T. H., Alden B. A., Jiang Z. P., Fisk R. P., Cook J. T., Glose K. H., Carmody J. L., Grassi J. M., Cheng Y. F., Lu Z. L., Crowley R. J.: *Am. Lab.* 31, 36 (1999).
26. Wyndham K. D., O'Gara J. E., Walter T. H., Glose K. H., Lawrence N. L., Alden B. A., Izzo G. S., Hudalla

- C. J., Iraneta P. C.: *Anal. Chem.* 75, 6781 (2003).
27. Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr., A* 1028, 1 (2004).
  28. Nawrocki J., Dunlap C., Li J., Zhao J., McNeff C. V., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr., A* 1028, 31 (2004).
  29. Hadjiivanov K. I., Klissurski D. G.: *Chem. Soc. Rev.* 25, 61 (1996).
  30. Weber T. P., Jackson P. T., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 67, 3042 (1995).
  31. Wong V., Sweeney A. P., Khurram M., Shalliker R. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 25, 363 (2002).
  32. Kephart T. S., Dasgupta P. K.: *Talanta* 56, 977 (2002).
  33. Svec F., Tenikova B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
  34. Svec F.: *LCGC-LC Column Technology Supplement*, June 2004, str. 18.
  35. Liapis A. I., Meyers J. J., Crosser O. K.: *J. Chromatogr., A* 865, 13 (1999).
  36. Meyers J. J., Liapis A. I.: *J. Chromatogr., A* 852, 3 (1999).
  37. Leinweber F. C., Lubda D., Cabrera K., Tallarek U.: *Anal. Chem.* 74, 2470 (2002).
  38. Kubin M., Spacek P., Chromecek R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 3881 (1967).
  39. Josic D., Strancar A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 333 (1999).
  40. Svec F., Frechet J. M. J.: *Anal. Chem.* 64, 820 (1992).
  41. Holdšvendová P., Coufal P., Suchanková J., Tesařová E., Bosáková Z.: *J. Sep. Sci.* 26, 1623 (2003).
  42. Moravcová D., Jandera P., Urban J., Planeta J.: *J. Sep. Sci.* 26, 1005 (2003).
  43. Peters E. C., Svec F., Frechet J. M. J.: *Chem. Mat.* 9, 1898 (1997).
  44. Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T.: *Anal. Chem.* 72, 5693 (2000).
  45. Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T.: *J. Chromatogr., A* 965, 35 (2002).
  46. Cabrera K., Lubda D., Eggenweiler H. M., Minakuchi H., Nakanishi K.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 93 (2000).
  47. Al Bokari M., Cherrak D., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 975, 275 (2002).
  48. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: *LCGC North America* 17, 998 (1999).

**D. Sýkora<sup>a</sup>, E. Tesařová<sup>b</sup>, M. Vosmanská<sup>a</sup>, and M. Zvolánková<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup> *Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Modern Stationary Phases for RP-HPLC**

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is one of the most utilized chromatographic methods. Current trends towards more mechanically and chemically stable RP-HPLC stationary phases are discussed in the review. Column dimensions, sorbent particle size and solvent consumption are continuously decreasing. This enables faster and more efficient analyses. Highly pure silica still holds its position as the most frequently utilized starting material for RP preparation. However, hybrid silica-based stationary phases are significantly more stable in alkaline buffers. Also sorbents based on zirconia, alumina and titania seem to be promising. A bright future is envisioned for monolithic media.

## STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

PETR TŮMA A EVA SAMCOVÁ

Centrum biomedicínských oborů, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00 Praha 10  
petr.tuma@lf3.cuni.cz

Došlo 15.12.05, přepracováno 9.5.06, přijato 19.6.06.

**Klíčová slova:** proteinogenní aminokyseliny, kapilární elektroforéza, bezkontaktní vodivostní detekce, biologický materiál

### Obsah

1. Úvod
2. Elektroforetická separace aminokyselin
3. Fotometrická detekce v UV oblasti a detekce fluorescenční
4. Elektrochemická detekce
5. Nepřímá fotometrická detekce
6. Bezkontaktní vodivostní detekce
7. Praktické stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí
8. Závěr

### 1. Úvod

Aminokyseliny (AMK) mají pro živé organismy zásadní význam. AMK jsou základními stavebními kameny proteinů – biologických makromolekul, které na jedné straně katalyzují biochemické reakce (enzymy) a na druhé straně vytvářejí pevné struktury buněk, tkání a celých organismů. AMK jsou základní strukturou peptidů, které často plní funkci především informačních molekul (hormony). Z AMK je syntetizována řada biologicky aktivních molekul jako jsou např. neurotransmitery, mezi které patří adrenalin, noradrenalin, serotonin, dopamin a další<sup>1,2</sup>. AMK vstupují v organismu do intermediárního metabolismu a jejich oxidace přispívá za normálních podmínek asi v 10–20 % k oxidačnímu metabolismu organismu. Za nefyziologických podmínek se stávají významným zdrojem energie organismu (např. hladovění).

Proteiny jsou v živých organismech složkou všech tkání. Význam jejich metabolismu se však v jednotlivých tkáních mění. Ve tkáních jsou proteiny štěpeny na AMK a z aminokyselin se opět vytvářejí nové proteiny. Průběžně se doplňuje zásoba (pool) aminokyselin v těle hydrolyzou bílkovin z potravy nebo jejich syntézou. Protože místa uvolňování a spotřeby AMK jsou většinou prostorově

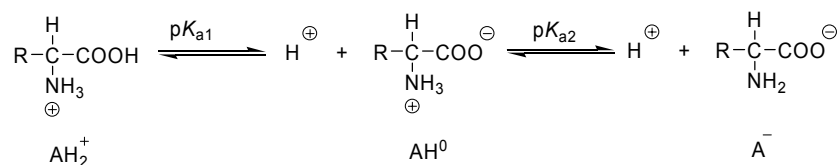
oddělena, musí docházet k přenosu aminokyselin mezi jednotlivými tkáněmi. AMK jsou v organismu transportovány ve volné formě rozpuštěné v krevní plasmě. Nalezneme je ovšem jako volné i v ostatních tělních tekutinách, jako je tkáňový mok, moč, plodová voda a mozkomíšní mok. Stanovení jejich koncentrací v těchto biologických tekutinách je důležitým klinickým ukazatelem. Poukazuje nejen na aktuální výživový stav organismu, ale zvýšené popř. snížené hladiny některých AMK jsou přímým ukazatelem některých vrozených metabolických vad, jako je argininémie, citrulinémie, homocystinurie, choroba javorového sirupu (maple syrup urine disease), hypermethioninémie, tyrosinémie či argininsukcinaturie<sup>3–5</sup>.

### 2. Elektroforetická separace aminokyselin

V biochemických laboratořích jsou standardně pro stanovení AMK používány automatické jednoúčelové analyzátory pracující na principu iontovýměnné chromatografie nebo chromatografie na chemicky vázaných fázích s postkolonovou derivatizací ninhydrinem<sup>6,7</sup>. Vývoj nových velmi rychlých a spolehlivých analytických metod založených na moderní instrumentaci je pro současnou klinickou praxi nezbytný. Velký potenciál pro stanovení AMK ve velmi složitých matricích, jako jsou biologické tekutiny, nabízí moderní přístroje pro vysokoúčinnou kapilární elektroforézu (CE). Předností CE je především vysoká separační účinnost, malý objem vzorku potřebný k analýze, nízká spotřeba mobilní fáze a vysoká rychlost analýzy<sup>8–11</sup>. Vysoká rychlost analýzy ve spojení s automatizací umožňuje provádět analýzy velkých souborů vzorků a tím splnit požadavky, které klade současný klinický výzkum.

Proteinogenní AMK jsou nízkomolekulární látky vhodné pro elektroforetickou separaci ve volném roztoku elektrolytu bez použití nosného média. AMK obsahují ve své chemické struktuře slabé disociovatelné skupiny: karboxylovou skupinu, aminoskupinu a některé ještě disociovatelnou skupinu v postranním řetězci. Celkový elektrický náboj AMK závisí na pH použitého separačního elektrolytu. Při postupném zvyšování pH separačního pufru od silně kyselého až po silně zásaditou oblast bude AMK postupně uvolňovat dva protony a přecházet od kationtu  $AH_2^+$ , přes neutrální zwitterion  $AH^0$  až po anion  $A^-$  (obr. 1, cit.<sup>12</sup>). U AMK s disociovatelnou skupinou v postranním řetězci je nutné uvažovat i disociaci této skupiny.  $pK_A$  karboxylové skupiny proteinogenních AMK se nachází v rozmezí 1,7–2,4 a  $pK_A$  aminoskupiny v rozmezí 8,7–10,5 (cit.<sup>13</sup>). AMK lze elektroforeticky stanovovat v jejich kationtové formě v kyselém prostředí kolem pH 2 nebo jako anionty kolem pH 9.

Z pohledu vlastní elektroforetické separace není pro-



Obr. 1. Schéma postupné deprotonizace AMK při zvyšování pH separačního elektrolytu od kyselé po zásaditou oblast

blematické stanovení celého profilu proteinogenních AMK v jejich nativní volné formě, ve které se vyskytují v biologických tekutinách živých organismů. V současné praxi je ovšem pouze okrajovou záležitostí. Komplikovaná je detekce separovaných AMK. Pouze AMK s aromatickou strukturou v postranním řetězci absorbují v UV oblasti spektra, volné nativní AMK neobsahují fluorofory a elektrochemicky aktivních AMK je pouze několik. Tento problém CE analýzy aminokyselin se obchází převedením neaktivních AMK na jejich aktivní deriváty, které poskytují odezvu při použití příslušné detekční techniky. Detekovat všech 20 proteinogenních AMK v jejich volné formě je možné pouze při použití nepřímé UV detekce, detekce vodivosti, popř. méně dostupných a velmi nákladných detekčních technik, jako je hmotnostní a NMR detekce<sup>8–11,14–16</sup>. Poslední dvě zmiňované detekční techniky nebudou pro svůj malý význam při CE stanovení AMK v tomto článku dále rozebírány.

### 3. Fotometrická detekce v UV oblasti a detekce fluorescenční

Fotometrická detekce v UV oblasti spektra (UV) obecně nedosahuje v CE takové citlivosti jako v LC, což se v konečném výsledku projeví ve vyšších hodnotách limitu detekce (LOD) v CE. K absorpci záření v CE dochází na velice krátké optické dráze, která je rovna vnitřnímu průměru elektroforetických kapilár (20–100 μm). Navíc z proteinogenních AMK absorbují v UV oblasti elektromagnetického spektra pouze Phe, Trp, Tyr a His a ani tyto AMK nenesou silné chromofory. Mnohem citlivější detekční technikou pro CE je detekce fluorescenční (FD), zejména její varianta, laserem indukovaná fluorescence (LIF). Ale také fluorescenční detekce naráží na nepřítomnost fluoroforů ve struktuře nativních AMK<sup>8–11,14–16</sup>. Obě tyto detekční techniky jsou z dlouhodobého hlediska nejvýznamnějšími pro detekci AMK a jejich strategie je založena v zabudování silných chromoforů popřípadě fluoroforů do struktury AMK. Derivatizaci je možné provést před vlastní CE separací (pre-column), v průběhu separace (on-column) nebo až po separaci (post-column). Z těchto tří možných variant významně převažuje předkolonová derivatizace. Mezi nejvýznamnější derivatizační činidla patří: 3-(4-karboxybenzoyl)chinolin-2-karbaldehyd (CBQCA), 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonylchlorid známý pod

názvem dansylchlorid (DnsCl), fluoreskamin, fluorenyl-9-methyl-chloroformiát (FMOC), naftalen-2,3-dikarbaldehyd (NDA), ftaldialdehyd (OPA) a fluoresceinisothio- kyanát (FITC). Tato derivatizační činidla reagují přednostně s primární aminoskupinou AMK. V tabulce I jsou uvedeny příklady využití nejběžnějších derivatizačních činidel při CE stanovení AMK v biologických materiálech. K separaci derivatizovaných AMK se využívá nejen kapilární zónové elektroforézy (CZE) ve volném roztoku elektrolytu, ale také micelární elektrokinetické chromatografie (MECK, cit.<sup>17</sup>). V MECK se do vodného separačního pufru přidává detergent, který zde vytváří hydrofobní micely a k separaci dochází na základě rozdílné hydrofobnosti analytů.

Derivatizace je v současné praxi nejrozšířenější strategií CE analýzy AMK a lze při ní dosáhnout velmi nízkých LOD, v oblasti nanomolárních koncentrací. Je nutné si ovšem uvědomit, že derivatizační proces s sebou přináší i komplikace. Především prodlužuje vlastní analýzu o dobu nutnou pro průběh derivatizačních reakcí, tyto reakce nejsou pro všechny AMK stejně rychlé, výsledné produkty jsou obvykle málo stabilní a cena derivatizačních činidel je poměrně vysoká. Navíc některé AMK obsahují primární aminoskupinu také v postranním řetězci a potom při derivatizaci vzniká z jedné AMK více produktů.

### 4. Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce (ECD) založená na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě se vyznačuje vysokou selektivitou a citlivostí. Z proteinogenních AMK jsou na běžných tuhých elektrodách (Pt, Au, uhlík) elektrochemicky aktivní pouze Tyr a Trp, v omezené míře též Cys a Met (cit.<sup>38–40</sup>). Využití elektrochemické detekce je opět jako v případě UV a fluorescenční detekce řešeno převedením AMK na jejich elektrochemicky aktivní deriváty. Byly popsány CE/ECD stanovení AMK derivatizovaných OPA (cit.<sup>41</sup>) a NDA (cit.<sup>42–46</sup>), které byly využity při analýzách biologických materiálů – piva<sup>44</sup>, erytrocytů<sup>45</sup>, makrofágů<sup>46</sup>, neuronů<sup>43</sup>. LOD CE/ECD se pohybuje v rozmezí 10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> M. Další možností využití ECD je stanovení obecně neelektroaktivních AMK v jejich volné formě na měděné, popř. niklové elektrodě. Existují patrně dva rozdílné mechanismy v elektrochemickém chování AMK na těchto elektrodách; v neutrálním a slabě alkalickém prostředí jde

Tabulka I

Vybrané aplikace použití derivatizačních činidel v kapilární elektroforéze při stanovení AMK v biologických materiálech

Činidlo	CE mód	Podrobnosti	LOD	Lit.
CBQCA	CZE-LIF	plasma	40 nM	4
CBQCA	CZE-LIF	mikrodialyzát šedé hmoty mozkové	nM	18
DnsCl	MEKC-UV	rostlinný materiál	–	19
Fluoreskamin	CZE-LIF	cytochrom hydrolyzovaný trávicími enzymy	10 nM	20
Fluoreskamin	CZE-UV	taurin v plasmě	nM	21
Fluoreskamin	CZE-LIF	Arg, citrulin v neuronech	5 nM–17 $\mu$ M	22
Fluoreskamin	CZE-LIF	AMK a peptidy v neuronech	nM	23
FMOc	MEKC-UV	chirální separace AMK s cykloextriny	–	24
FMOc	CZE-UV	chirální separace AMK s vankomycinem	–	25
FMOc	CZE-LIF	hydroxyprolin a prolin v kolagenu	nM	26
NDA	MEKC-LIF	Asp enantiomery, vzorky potkaního mozku	2 nmol g <sup>-1</sup>	27
NDA	MEKC-LIF	Trp enantiomery, biologické vzorky	33 nM	28
NDA	CZE-LIF	Glu, Asp – monitorování potkanů <i>in vivo</i>	–	29
OPA	MECK-LIF	Asp, Glu v tělesných tekutinách	100 nM	30
OPA + FITC	MECK-UV	hydroxyprolin v kolagenu kosterního svalstva	–	31
OPA	CZE-FD	hydrolyzát sojových bobů	2,5–10 $\mu$ M	32
OPA	CZE-LIF	obsah AMK v jedné buňce	4 nM–13 $\mu$ M	33
FITC	CZE-LIF	deriváty Arg v lidském séru	0,05 $\mu$ M	34
FITC	CZE-LIF	AMK v mikrodialyzátu bazálního ganglia	–	35
FITC	CZE-LIF	AMK v mikrodialyzátu thalamu	–	36
FITC	CZE-LIF	Glu, Gln v mozkomíšním moku	–	37

o tvorbu komplexů AMK s Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> ionty na povrchu elektrody, zatímco v silně alkalickém prostředí jde elektrokatalytický děj<sup>47–50</sup>.

Elektrochemické detektory ovšem nenalezly v CE takové uplatnění jako v LC. Z tohoto důvodu také nejsou elektrochemické detektory pro CE komerčně dostupné a jednotlivé laboratoře si je vyrábějí samy. Tento fakt má přímou souvislost s rušivým vlivem silného separačního pole na vlastní signál elektrochemického detektoru<sup>51</sup>.

## 5. Nepřímá fotometrická detekce

Elegantní metodou pro detekci látek, které neobsahují ve své struktuře vhodné chromofory, je nepřímá fotometrická detekce s využitím běžně dostupného UV detektoru. Princip nepřímé UV detekce spočívá v přidávku silně absorbující látky do separačního pufu. Silně absorbující ion separačního pufu by měl být zvolen tak, aby měl stejné znaménko náboje jako sledovaný analyt; byl tedy jeho koiontem. Vlivem CE separace je v zóně migrujícího analytu nižší koncentrace absorbujícího koiontu než v okolním separačním elektrolytu. Průchod této zóny foto-

metrickým detektorem se projeví snížením odezvy detektoru a zóna je na elektroferogramu patrna jako záporný pík, tzv. dip<sup>52,53</sup>. Některé příklady testovaných absorbujících koiontů při praktických analýzách směsí proteinogenních AMK jsou shrnuty v tabulce II.

Nespornou výhodou nepřímé fotometrické detekce je možnost stanovení volných nativních forem AMK fotometrickým detektorem, který je standardní součástí elektroforetických přístrojů. Použití nepřímé UV detekce je ovšem spojeno s volbou málo koncentrovaných separačních elektrolytů, což do značné míry limituje aplikaci této techniky na stanovení látek v biologických tekutinách, které jsou charakteristické vysokým obsahem anorganických solí.

## 6. Bezkontaktní vodivostní detekce

Zóny analytů v CE mají obecně rozdílnou elektrickou vodivost ve srovnání s vodivostí okolního separačního elektrolytu a pro jejich detekci lze využít univerzální detekční techniku – detekci vodivostní<sup>60,61</sup>. Vodivostní detekce je založena na měření elektrické vodivosti roztoku v detekční cele mezi dvěma kovovými elektrodami, které

Tabulka II

Vybrané aplikace použití nepřímé UV detekce pro stanovení AMK v biologických vzorcích

Absorbující koion	Podrobnosti	Lit.
4-Aminobenzoová kyselina	modelová směs AMK	54
4-(Dimethylamino)benzoová kyselina	modelová směs	54
4-Aminobenzoová kyselina	plasma, supernatant makrofágové kultury, LOD 2–20 $\mu\text{M}$	55
Salicylová kyselina	modelová směs	53
Chininsulfát	nádorové buňky	56
Kalixareny	modelová směs	57
Benzoová kyselina	rostlinný materiál, LOD 10–50 mM	58
Adenosinmonofosfát	AMK + fosforylované AMK, LOD 3–6 $\mu\text{M}$	59

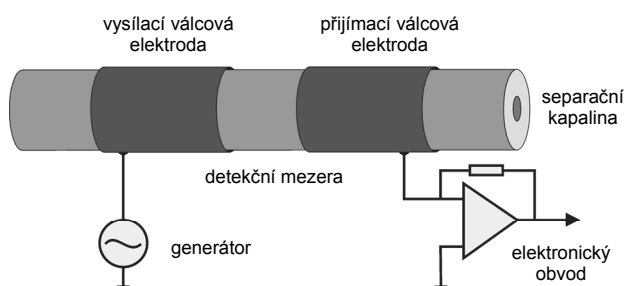
jsou umístěny na výstupu separační kapiláry. V tomto klasickém uspořádání, kdy jsou měřicí elektrody v přímém kontaktu s měřeným roztokem, nedosáhla vodivostní detekce v CE významného uplatnění stejně jako ostatní módy elektrochemické detekce založené na oxidaci nebo redukci analytu. V posledních letech se stala velmi populární vodivostní detekce prováděná v bezkontaktním uspořádání<sup>62–66</sup>. Nová konstrukce bezkontaktních vodivostních detektorů (CCD) pro CE byla popsána koncem 90. let minulého století<sup>67,68</sup>. Jde o CCD tvořené dvěma tubulárními, popř. semitubulárními<sup>69</sup> elektrodami, které jsou umístěny za sebou kolem vnějšího povrchu separační kapiláry a jsou od sebe odděleny detekční mezerou (obr. 2). Na jednu elektrodu je vkládán střídavý signál z generátoru, signál prochází přes stěnu separační kapiláry, je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře a poté snímán druhou vodivostní elektrodou. Umístění vodivostních elektrod za sebou podél separační kapiláry přispělo k výraznému zvýšení citlivosti CCD v CE v porovnání s původním snímáním vodivostního signálu v jednom místě napříč kapilárou<sup>70,71</sup>. Navíc toto nové uspořádání CCD umožňuje měřit vodivost při relativně nízkých frekvencích střídavého signálu (od desítek kHz po 1 MHz), což výrazně zjednoduší elektronické zpracování signálu detektoru. Zásadní výhodou CCD je fakt, že měřicí elektrody nejsou v přímém kontaktu s analyzovaným roztokem. U CCD se nerozpouští materiál

elektrody, látky se neadsorbují na povrch elektrody a neprobíhají děje, které vedou ke stárnutí elektrody. Použitím CCD v kombinaci s CE je vyřešen i problém interference silného separačního elektrického pole se signálem vodivostního detektoru<sup>51</sup>.

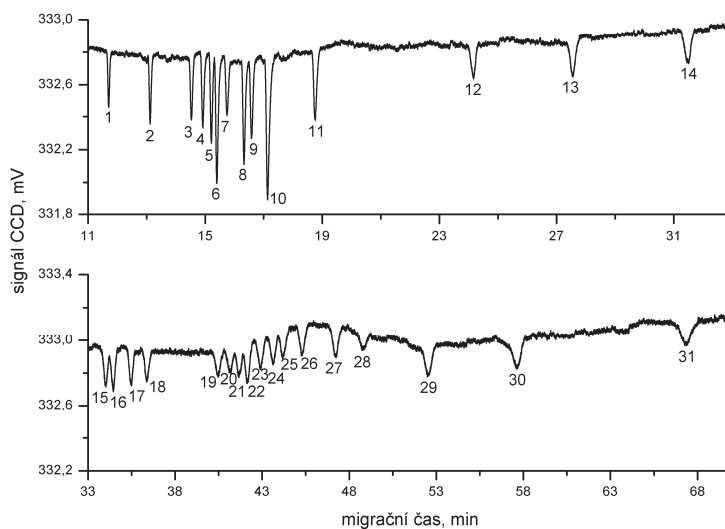
Z těchto důvodů se CCD stává jednou z nevhodnějších detekčních technik pro CE stanovení malých anorganických iontů v reálných matricích, jako je pitná<sup>72</sup> a dešťová voda<sup>73</sup> nebo lidské sérum<sup>74</sup>. Kromě stanovení anorganických iontů byly možnosti kombinace CE/CCD demonstrovány i pro analýzy organických látek neabsorbujících v UV. V literatuře byly naznačeny možnosti aplikace CE/CCD i na biochemicky významné skupiny molekul jako jsou mastné kyseliny<sup>75,76</sup>, monosacharidy a disacharidy<sup>77</sup>, aminokyseliny<sup>78,79</sup>, peptidy<sup>80</sup> a proteiny<sup>81</sup>.

## 7. Praktické stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí

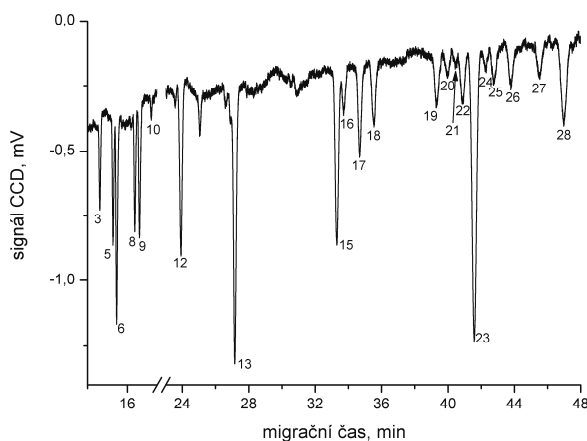
V naší laboratoři se zabýváme aplikací CE/CCD (cit.<sup>82</sup>) pro stanovení celého profilu AMK v biologických tekutinách. Vysoká účinnost CE umožňuje během jedné analýzy úplné oddělení všech 20 proteinogenních AMK. Ukázkový elektroferogram modelové směsi (obr. 3) demonstruje úplnou CE separaci 20 proteinogenních AMK a dalších 11 látek, které se běžně vyskytují v biologických vzorcích. Jako optimální separační pufr se ukázala 1,7 M octová kyselina s přidávkem 0,1 % (hydroxyethyl)celulosy (w/v) o pH 2,15. Při tomto pH migrují AMK v elektrickém poli jako kationty. Jelikož koiontem ke kladně nabitým AMK jsou vysoce vodivé  $\text{H}_3\text{O}^+$  ionty separačního elektrolytu, poskytují AMK v CCD záporné píky. Poměrně vysoká koncentrace octové kyseliny v separačním elektrolytu zajišťuje dobrou pufrací kapacitu a přidavek (hydroxyethyl)celulosy chrání vnitřní povrch kapiláry před nežádoucí adsorpcí látek z biologického vzorku. LOD dosažené za optimalizovaných separačních podmínek se pohybují v rozmezí 1,5  $\mu\text{M}$  pro Arg do 6,7  $\mu\text{M}$  pro Asp (Arg má při pH 2,15 nejvyšší migrační rychlost, zatímco Asp nejnižší).



Obr. 2. Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru pro CE s válcovými elektrodami



Obr. 3. CE/CCD separace modelové směsi 20 proteinogenních aminokyselin a dalších 11 biogenních látek rozpuštěných v systému voda/acetonitril 1:1 (v/v) v ekvimolární koncentraci 10  $\mu$ M (Asp a 4-hydroxyprolin 15  $\mu$ M). Separační pufr: 1,7 M octová kys. + 0,1 % (hydroxyethyl)celulosa, pH 2,15. Kapilára: délka 80 cm, k detektoru 67 cm, vnitřní průměr 75  $\mu$ m. Napětí +20 kV, proud +20  $\mu$ A. Hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 20 s. Identifikace píkú: 1 ethanolamin, 2 cholin, 3 kreatinin, 4  $\beta$ -Ala, 5 ornithin, 6 Lys, 7 4-aminomáselná kys., 8 Arg, 9 His, 10 methylhistidin, 11 karnitin, 12 Gly, 13 Ala, 14 2-aminomáselná kys., 15 Val, 16 Ile, 17 Leu, 18 Ser, 19 Thr, 20 Asn, 21 Met, 22 Trp, 23 Gln, 24 citrulin, 25 Glu, 26 Phe, 27 Tyr, 28 Pro, 29 cystin, 30 Asp, 31 4-hydroxyprolin



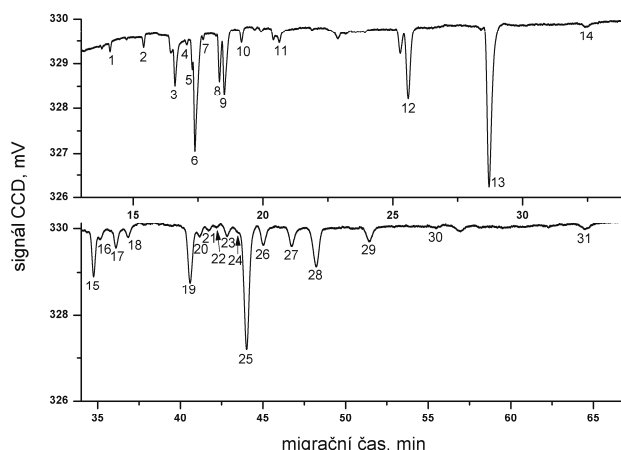
Obr. 4. CE/CCD elektroferogram krevní plasmy po deproteinizaci acetonem 1:1 (v/v); hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 6 s. Experimentální podmínky a identifikace píkú stejné jako v obr. 3

Tato citlivost CE/CCD je dostatečná pro stanovení všech 20 proteinogenních AMK v krevní plasmě<sup>83</sup> i plodové vodě<sup>84</sup>, viz obr. 4 a obr. 5.

Popsaná technika CE/CCD umožňuje citlivé stanovení celého profilu AMK v jejich volné formě, ve které se

vyskytují v živých organismech. Plasma nebo plodová voda jsou pouze deproteinizovány přidávkem organického rozpouštědla a poté přímo dávkovány do separační kapiláry. Tím odpadá zdlouhavá úprava vzorku, kterou vyžaduje použití fotometrické popř. fluorescenční detekce, a úplnou





Obr. 5. CE/CCD elektroferogram plodové vody po deproteinizaci acetonitrilem 1:1 (v/v); experimentální podmínky a identifikace píků stejné jako v obr. 3

analýzu je možné provést do 60 minut. Navíc CE/CCD umožňuje použití separačních pufrů o vysoké koncentraci složek, což má kladný vliv na CE separaci biologických tekutin s velkým přebytkem anorganických iontů.

## 8. Závěr

Moderní přístroje CE jsou vhodnou alternativou jed nouúčelových analyzátorů při stanovení AMK v biologických vzorcích. Problém CE analýzy AMK je především v nedostatku vhodných chromoforů a fluoroforů ve struktuře AMK. Pro použití rutinních detekčních technik založených na fotometrické detekci v UV oblasti a detekci fluorescenční je nutné AMK derivatizovat a poté stanovovat ve formě absorbujících derivátů. Naopak použití CCD umožňuje citlivé stanovení AMK v jejich volné nativní formě, ve které se vyskytují v živých organismech. Citlivost spojení CE a CCD je dostatečná pro analýzu celého profilu proteinogenních AMK v biologických tekutinách s tím, že není nutné provádět složitou úpravu biologického materiálu před vlastní CE analýzou.

*Tato práce byla podporována Grantovou agenturou ČR (grant č. 203/04/0519 a č. 203/03/D094) a MŠMT České republiky (výzkumný záměr č. MSM0021620814).*

### Seznam zkratk proteinogenních aminokyselin

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Gln	glutamin

Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
His	histidin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

### LITERATURA

- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H & H, Praha 1998.
- Devlin T. M.: *Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, New York 1992.
- Sriver C., Beaudet A., Sly W. S., Valle D.: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, Vol. 1. McGraw Hill, New York 1995.
- Boulat O., McLaren D. G., Arriaga E. A., Chen D. D. Y.: *J. Chromatogr.*, B 754, 217 (2001).
- Šenk P., Kozák L., Foret F.: *Electrophoresis* 25, 1447 (2004).
- Roe C. D., Roe D. S.: *Mol. Genet. Metab.* 68, 243 (1999).
- Moore S., Spackman D. H., Stein W. H.: *Anal. Chem.* 30, 1185 (1958).
- Poinsot V., Bayle C., Couderc F.: *Electrophoresis* 24, 4047 (2003).

9. Prata C., Bonnafous P., Fraysse N., Treilhou M., Poin-sot V., Couderc F.: *Electrophoresis* 22, 4129 (2001).
10. Smith J. T.: *Electrophoresis* 20, 3078 (1999).
11. Smith J. T.: *Electrophoresis* 18, 2377 (1997).
12. Stryer L.: *Biochemistry*, 2. vyd. CBS Publishers and Distributors, India 1986.
13. Lide D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 83. vyd. CRC Press, New York 2002.
14. Underberg W. J. M., Waterval J. C. M.: *Electrophoresis* 23, 3922 (2002).
15. Waterval J. C. M., Lingeman H., Bult A., Underberg W. J. M.: *Electrophoresis* 21, 4029 (2000).
16. Mikuš P., Kaniansky D.: *Chem. Listy* 94, 347 (2000).
17. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis – Principles, Practise and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1994.
18. Bergquist J., Vona M. J., Stiller C. O., Oconnor W. T., Falkenberg T., Ekman R.: *J. Neurosci. Methods* 65, 33 (1996).
19. Skocir E., Prosek M.: *Chromatographia* 41, 638 (1995).
20. Chan K. C., Muschik G. M., Issaq H. J.: *Electrophoresis* 21, 2062 (2000).
21. Kelly M. T., Fabre H., Perrett D.: *Electrophoresis* 21, 699 (2000).
22. Floyd P. D., Moroz L. L., Gillette R., Sweedler J. V.: *Anal. Chem.* 70, 2243 (1998).
23. Shippy S. A., Jankowski J. A., Sweedler J. V.: *Anal. Chim. Acta* 307, 163 (1995).
24. Wan H., Blomberg L. G.: *J. Chromatogr. Sci.* 34, 540 (1996).
25. Kang J. W., Yang Y. T., You J. M., Ou Q. Y.: *J. Chromatogr., A* 825, 81 (1998).
26. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr.* 653, 93 (1993).
27. Zhao S., Feng Y., LeBlanc M. H., Liu Y. M.: *J. Chromatogr., B* 762, 97 (2001).
28. Zhao S., Liu Y. M.: *Electrophoresis* 22, 2769 (2001).
29. Rocher C., Bert L., Robert F., Trouvin J. H., Renaud B., Jacquot C., Gardier A. M.: *Brain Res.* 737, 221 (1996).
30. Tivesten A., Lundqvist A., Folestad S.: *Chromatographia* 44, 623 (1997).
31. Chu Q. Y., Evans B. T., Zeece M. G.: *J. Chromatogr., B* 692, 293 (1997).
32. Oguri S., Yokoi K., Motohase Y.: *J. Chromatogr., A* 787, 253 (1997).
33. Zhang L. L., Yeung E. S.: *J. Chromatogr., A* 734, 331 (1996).
34. Causse E., Siri N., Arnal J. F., Bayle C., Malatray P., Valdiguie P., Salvayre R., Couderc F.: *J. Chromatogr., B* 741, 77 (2000).
35. Qu Y., Li Y., Vandenbussche E., Vandesande F., Arc-kens L.: *Brain Res. Protocol* 7, 45 (2001).
36. Silva E., Quinones B., Freund N., Gonzalez L. E., Hernandez L.: *Brain Res.* 923, 45 (2001).
37. Tucci S., Pinto C., Goyo J., Rada P., Hernandez L.: *Clin. Biochem.* 31, 143 (1998).
38. Reynaud J. A., Malfoy B., Canesson P.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 195 (1980).
39. Malfoy B., Reynaud J. A.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 213 (1980).
40. Luo P., Baldwin R. P.: *Electroanalysis* 4, 393 (1992).
41. Durgbanshi A., Kok W. T.: *J. Chromatogr., A* 798, 289 (1998).
42. O'Shea T. J., Greenhagen R. D., Lunte S. M., Lunte C. E., Smyth M. R., Radzik D. M., Watanabe N.: *J. Chromatogr.* 593, 305 (1992).
43. Swanek F. D., Anderson B. B., Ewing A. G.: *J. Microcolumn Sep.* 10, 185 (1998).
44. Dong Q., Jin W., Shan J.: *Electrophoresis* 23, 559 (2002).
45. Dong Q., Wang X., Zhu L., Jin W.: *J. Chromatogr., A* 959, 269 (2002).
46. Weng Q., Jin W.: *Electrophoresis* 22, 2797 (2001).
47. Luo P., Zhang F., Baldwin R. P.: *Anal. Chem.* 63, 1702 (1991).
48. Ye J., Baldwin R. P.: *Anal. Chem.* 66, 2664 (1994).
49. Gooding J. J., Hibbert D. B., Yang W.: *Sensors* 1, 75 (2001).
50. Wang A., Fang Y.: *Electrophoresis* 21, 1281 (2000).
51. Kappes T., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 12, 165 (2000).
52. Xiong X., Li S. F. Y.: *J. Chromatogr., A* 835, 169 (1999).
53. Bruin G. J. M., van Asten A. C., Xu X., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 608, 97 (1992).
54. Lee Y. H., Lin T. I.: *J. Chromatogr., A* 680, 287 (1994).
55. Žunić G., Jelić-Ivanović Z., Čolić M., Spasić S.: *J. Chromatogr., B* 772, 19 (2002).
56. Ma Y., Zhang R., Cooper C. L.: *J. Chromatogr.* 608, 93 (1992).
57. Arce L., Segura Carretero A., Rios A., Cruces C., Fernandez A., Valcarcel M.: *J. Chromatogr., A* 816, 243 (1998).
58. Crowder M. W., Numan A., Haddadian F., Weitzel M. A., Danielson : *Anal. Chim. Acta* 384, 127 (1999).
59. Chen Z. L., Warren C. R., Adams M. A.: *Chromatographia* 51, 180 (2000).
60. Ackermans M. T., Everaerts F. M., Beckers J. L.: *J. Chromatogr.* 549, 345 (1991).
61. Katzmayer M. U., Klampfl C. W., Buchberger W.: *J. Chromatogr., A* 850, 355 (1999).
62. Zemann A. J.: *Trends Anal. Chem.* 20, 346 (2001).
63. Zemann A. J.: *Electrophoresis* 24, 2125 (2003).
64. Kubáň P., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 16, 2009 (2004).
65. Guijt R. M., Evenhuis C. J., Macka M., Haddad P. R.: *Electrophoresis* 25, 4032 (2004).
66. Geraldo J., Brito-Neto A., da Silva J. A. F., Blanes L., do Lago C. L.: *Electroanalysis* 17, 1198 (2005).
67. Zemann A. J., Schnell E., Volgger D., Bonn G. K.: *Anal. Chem.* 70, 563 (1998).
68. da Silva J. A. F., do Lago C. L.: *Anal. Chem.* 70, 4339 (1998).
69. Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: *Electroanalysis* 13,

- 989 (2001).
70. Gaš B., Demjaněnko M., Vacík J.: *J. Chromatogr.* 192, 253 (1980).
  71. Gaš B., Vacík J.: *Chem. Listy* 74, 652 (1980).
  72. Kubáň P., Karlberg B., Kubáň P., Kubáň V.: *J. Chromatogr., A* 964, 227 (2002).
  73. Rocha F. R., da Silva J. A. F., do Lago C. L., Fornaro A., Gutz I. G. R.: *Atmos. Environ.* 37, 105 (2003).
  74. da Silva J. A. F., Ricelli N. L., Carvalho A. Z., do Lago C. L.: *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 265 (2003).
  75. Oliveira M. A. L., do Lago C. L., Tavares M. F. M., da Silva J. A. F.: *Quim. Nova* 26, 821 (2003).
  76. Surowiec I., Kaml I., Kenndler E.: *J. Chromatogr., A* 1024, 245 (2004).
  77. Carvalho A. Z., da Silva J. A. F., do Lago C. L.: *Electrophoresis* 24, 2138 (2003).
  78. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B.: *Electrophoresis* 24, 671 (2003).
  79. Tanyanyiwa J., Schweizer K., Hauser P. C.: *Electrophoresis* 24, 2119 (2003).
  80. Baltussen E., Guijt R. M., van der Steen G., Laugere F., Baltussen S., van Dedem G. W. K.: *Electrophoresis* 23, 2888 (2002).
  81. Abad-Villar E. M., Tanyanyiwa J., Fernández-Abedul M. T., Costa-García A., Hauser P. C.: *Anal. Chem.* 76, 1282 (2004).
  82. Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 23, 3520 (2002).
  83. Samcová E., Tůma P.: *Electroanalysis* 18, 152 (2006).
  84. Tůma P., Samcová E., Andělová K.: *J. Chromatogr., B* 839, 12 (2006).

**P. Tůma and E. Samcová** (*Centre of Biomedical Sciences, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic*): **Determination of Free Amino Acids in Biological Fluids Using Capillary Electrophoresis**

Determination of amino acids (AA) in biological fluids plays an important role in clinical research. Attention has been focused on separation methods offering a high separation efficiency, small volume of injected sample and short time of analysis. Capillary electrophoresis (CE) is one of the analytical methods that meets all these demands and, in addition, allows to overcome some technical obstacles in analysis of biological materials. This article provides a review of recent progress in the CE analysis of proteinogenic AAs in biological fluids. Principles and applications of various CE detection techniques are discussed, including those based on direct UV photometry, fluorimetry, indirect photometry, electrochemistry and conductivity. It is shown that the contactless conductivity detection (CCD) is superior to other detection techniques in the CE analysis of the whole profile of proteinogenic AAs occurring in their native forms in biological fluids. Apart from a high sensitivity, the CE/CCD method makes it possible to avoid complicated pretreatment of biological samples.

## MODERNÍ TRENDY SYNTÉZY NANOPORÉZNÍCH MATERIÁLŮ

ARNOŠT ZUKAL

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8  
arnost.zukal@jh-inst.cas.cz

Došlo 11.5.06, přijato 27.9.06.

Klíčová slova: nanoporézní materiály, kompozitní materiály, charakterizace, mezoporézní křemičitany, mezoporézní hlinítokřemičitany

### Obsah

1. Úvod
2. Nanoporézní křemičitany
3. Inkorporace hliníku
4. Kompozitní materiály
5. Závěr

### 1. Úvod

Nanoporézní materiály jsou definovány jako disperzní tuhé látky, které obsahují póry o velikosti 1 až 100 nm. Objem pórů zpravidla dosahuje hodnot 1,5 až 2,0 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, plocha jejich povrchu se blíží 1500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Pro mnoho nanoporézních materiálů je charakteristická dokonalá architektura porézního systému, který je vytvořen pravidelně uspořádanými póry téhož tvaru a téže velikosti.

Vysoká plocha povrchu pórů dodává nanoporézním materiálům řadu vlastností, které neporézní tuhé látky téhož chemického složení nemají. Vzhledem k tomu nanoporézní materiály nacházejí nejvíce přímých či potenciálních aplikací v adsorpčních a separačních procesech, katalýze a fotokatalýze, sensorice, mikroelektronice a v některých biotechnologiích. Pro všechny uvedené aplikace je podstatné, aby povrch pórů byl dobře dostupný pro molekuly z vnější kapalně či plynně fáze. Naproti tomu pro některé jiné aplikace – např. v izolační technice – je důležité, aby póry byly uzavřeny uvnitř tuhé fáze.

Standardní klasifikace porézních materiálů dle IUPAC, jež rozlišuje tři typy pórů<sup>1</sup>, není identická s definicí nanoporézních materiálů. Póry, které mají průměr menší než 2 nm, jsou označovány jako mikropóry. Průměr mezopórů je v intervalu 2 až 50 nm a makropóry mají průměr větší než 50 nm. Nanoporézní materiály tedy mohou obsahovat všechny tři typy pórů; tomuto označení se vymykají

jen některé vysloveně mikroporézní látky (např. zeolity) nebo naopak čistě makroporézní látky (např. některé anorganické izolační materiály).

V tabulce I jsou uvedeny základní charakteristiky nanoporézních materiálů, rozčleněných do šesti skupin podle chemického složení<sup>2</sup>. Je zřejmé, že snaha o zahrnutí všech skupin do tohoto příspěvku by vedla k povrchnosti a výrazně by snížila jeho informační hodnotu. Omezím se proto jen na křemičitany a hlinítokřemičitany, které náležejí k nejvýznamnějším materiálům pro separační a katalytické procesy. Pomínu čistý oxid hlinitý (uspořádanou mezoporézní aluminu), neboť jeho problematika je zcela specifická<sup>3–5</sup> a bylo by zapotřebí ji popsat ve zvláštním sdělení. Příspěvek jsem zaměřil na křemičitany a hlinítokřemičitany s uspořádanou mezoporézní strukturou, připravené supramolekulárním templátováním. Jsou nazývány též organizované mezoporézní materiály nebo mezoporézní molekulová síta. V závěru se zmíním o materiálech kompozitních, které obsahují dva porézní systémy, mikroporézní a mezoporézní. V mikroporézním systému nastávají požadované adsorpční či katalytické děje; mezoporézní systém pak umožňuje rychlejší transport molekul z plynné či kapalně fáze k mikropórům<sup>6</sup>. I když kompozitní materiály se mohou částečně vymykat definici materiálů nanoporézních, jsou zde pro svou důležitost uvedeny.

Literatura týkající se materiálů uvedených strukturálních typů je velmi rozsáhlá. Téměř všechny důležité práce byly publikovány v časopisech *Chemical Communications*, *Journal of the American Chemical Society*, *Journal of Physical Chemistry B*, *Langmuir*, *Chemistry of Materials*, *Angewandte Chemie* a *Microporous and Mesoporous Materials*. Mnoho informací je shrnuto ve sbornících z konferencí věnovaných mezoporézním molekulovým sítům<sup>7</sup>. Vzhledem k tomu, že problematika syntézy mezoporézních tuhých látek byla již několikrát přehledně zpracována<sup>2,8–13</sup>, zmiňuji v tomto příspěvku principy supramolekulárního templátování jen velmi stručně. Poněkud podrobněji jsem se zaměřil na problematiku charakterizace nanoporézních materiálů, neboť je stejně významná jako jejich syntéza. V oblasti přípravy nanoporézních materiálů zdůrazňuji několik vybraných aspektů, o nichž se domnívám, že v příštích létech nabudou největší důležitosti. Do svého příspěvku jsem nezahrnul postsyntézní modifikace a funkcionalizace povrchu nanoporézních křemičitanů a hlinítokřemičitanů. Tato problematika vytváří rozsáhlou výzkumnou oblast a bylo by zapotřebí ji zpracovat ve zvláštním přehledném článku.

### 2. Nanoporézní křemičitany

Kryštof Kolumbus je všeobecně pokládán za objevitele Ameriky. Leif Erisson sice dosáhl tohoto kontinentu

Tabulka I  
Klasifikace nanoporézních materiálů

Vlastnost	Materiál					
	polymery	uhlík	skla	hlinito-křemičitany <sup>a</sup>	oxidy <sup>b</sup>	kovy
Velikost pórů	mezo-makro	mikro-mezo	mezo-makro	mikro-mezo	mikro-mezo	mezo-makro
Plocha povrchu	nízká	vysoká	nízká	vysoká	střední	nízká
Porozita <sup>c</sup>	> 0,6	0,3–0,6	0,3–0,6	0,3–0,7	0,3–0,6	0,1–0,7
Permeabilita	nízká-střední	nízká-střední	vysoká	nízká	nízká-střední	vysoká
Pevnost	střední	nízká	vysoká	nízká	nízká-střední	vysoká
Teplotní stabilita	nízká	vysoká	střední	střední-vysoká	střední-vysoká	vysoká
Chemická stabilita	nízká-střední	vysoká	vysoká	vysoká	velmi vysoká	vysoká
Cena	nízká	vysoká	vysoká	nízká-střední	střední	střední
Životnost	krátká	dlouhá	dlouhá	střední-dlouhá	dlouhá	dlouhá

<sup>a</sup> Včetně aluminu a oxidu křemičitého, <sup>b</sup> typickými představiteli jsou oxid titaničitý (anatas) a zirkoničitý, <sup>c</sup> poměr objemu pórů a vnějšího objemu porézní látky

o několik století dříve, avšak teprve po Kolumbovi se objev Ameriky stal milníkem ve světových dějinách. Podobně pracovníci americké společnosti Mobil jsou velmi často pokládáni za objevitele organizovaných mezoporézních křemičitanů a hlinitokřemičitanů; syntézu těchto nanoporézních materiálů patentovali v roce 1991 (cit.<sup>14</sup>) a publikovali v roce 1992 (cit.<sup>15</sup>). První syntéza křemičitanového materiálu s organizovanou mezoporézní strukturou byla však patentována již o dvacet let dříve, v roce 1971 (cit.<sup>16</sup>). Autoři patentu neprozkoumali všechny vlastnosti přípraveného materiálu a pouze konstatovali, že jejich materiál vyniká extrémně nízkou zdánlivou hustotou. Též japonští autoři, kteří syntetizovali templátovaný oxid křemičitý v roce 1990, si nebyli vědomi významu svého objevu<sup>17</sup> a svůj výsledek publikovali sice v angličtině, avšak jen v japonském časopise. Pracovníci společnosti Mobil vyvinuli nezávisle na zmíněném patentu i na japonských autorech jednoduchý a spolehlivý postup pro syntézu templátovaných mezoporézních křemičitanů a hlinitokřemičitanů. Na rozdíl od svých předchůdců připravené materiály podrobně prozkoumali a ukázali, že porézní struktura těchto materiálů má v mezoporézním měřítku tytéž vlastnosti, jaké mají mikroporézní molekulová síta (např. zeolity)<sup>18</sup>. Teprve v roce 1997 bylo zjištěno při reprodukci jednoho z postupů, popsáných v citovaném patentu z roku 1971, že takto syntetizovaný porézní křemičitan je shodný s mezoporézním molekulovým sítem MCM-41 syntetizovaným podle postupu společnosti Mobil<sup>19</sup>.

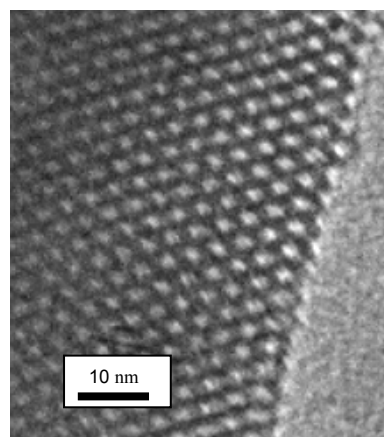
Hlinitokřemičitanová a křemičitanová mezoporézní molekulová síta, vyvinutá společností Mobil, představovala dlouholetý sen výzkumníků v oblasti katalýzy a adsorpce. Jejich objev zahájil neobyčejně intenzivní výzkum, který rychle vytvořil rozsáhlou oblast problematiky porézních materiálů<sup>20</sup>. Jak je zřejmé z historie tohoto objevu, velmi významnou roli hraje studium vlastností těchto ma-

teriálů. Vzhledem k tomu první část této kapitoly věnuje charakterizaci mezoporézních molekulových sít. Další části budou náležet novým trendům syntéz založených na supramolekulovém templátování.

## 2.1. Charakterizace

Úplnou charakterizaci mezoporézních molekulových sít není možno provést pouze pomocí jedné experimentální techniky. Jestliže chceme získat komplexní pohled na porézní strukturu a tvar a velikosti částic, je nezbytné použití transmissní a rastrovací elektronové mikroskopie, fyzikální adsorpce a rentgenové difrakce.

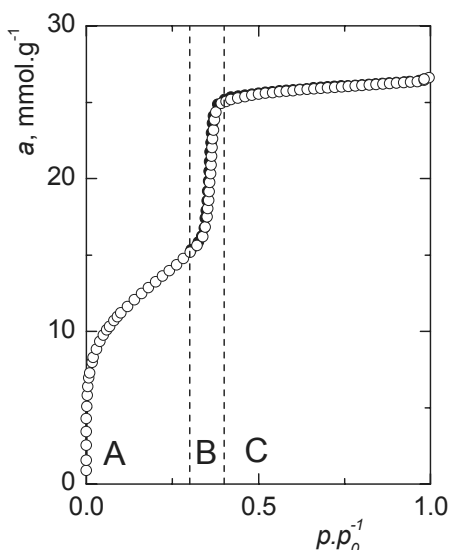
Na obr. 1 je uveden snímek porézního systému mezoporézního molekulového síta MCM-41. Tento systém je vytvořen rovnoběžnými kanály, které mají přibližně šesti-



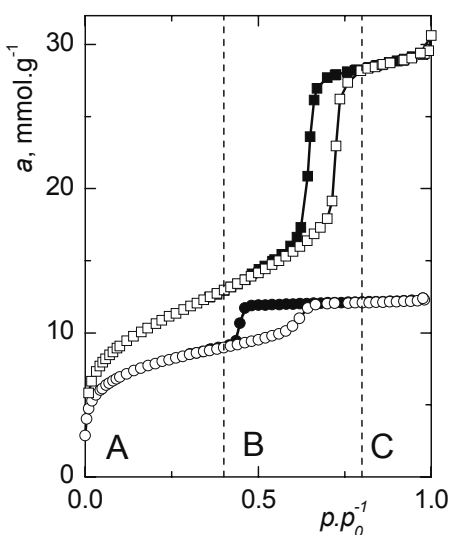
Obr. 1. Mezoporézní molekulové síto MCM-41; snímek z transmissního elektronového mikroskopu

úhelníkový průřez a jsou uspořádány do hexagonální voštinové struktury. Velikost kanálů činí 3,4 nm a tloušťka jejich stěn je 1,2 nm.

Mikroskopický snímek poskytuje přímý pohled na porézní strukturu, avšak ukazuje jen velmi malou její část. Základní parametry porézní struktury, které se vztahují k makroskopickému množství materiálu, získáme pomocí adsorpčních technik. Jako standardní adsorpční technika je



Obr. 2. Adsorpční izoterma dusíku na mezoporézním molekulovém síti MCM-41 při 77 K; plné body označují desorpci



Obr. 3. Adsorpční izotermy dusíku na mezoporézních molekulových sítích SBA-15 (□) a SBA-16 (○) při 77 K; plné body označují desorpci

všeobecně používáno měření adsorpčních a desorpčních izoterem dusíku při 77 K (tj. při teplotě normálního bodu varu tohoto adsorbátu).

Adsorpční a desorpční izotermy dusíku při 77 K na typických mezoporézních molekulových sítích jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Na těchto izotermách pozorujeme tři oblasti. V oblasti A, tj. za nízkých relativních tlaků  $p/p_0$  (kde  $p$  je rovnovážný tlak,  $p_0$  tlak nasycených par dusíku při teplotě měření) probíhá na celém povrchu monomolekulární a polymolekulární adsorpce (vyjádřená v milimolech adsorbovaného dusíku vztažených na 1 g adsorbentu). V oblasti B dusík kondenzuje v mezopórech a zcela zaplňuje jejich objem. Jelikož mezoporézní molekulová síť MCM-41 a SBA-15 mají válcovité póry konstantního průměru, nastává kondenzace dusíku v mezopórech téměř skokem a projevuje se strmým vzrůstem adsorbovaného množství. V oblasti C probíhá polymolekulární adsorpce na vnějším povrchu částic. Molekulové síto MCM-41 má průměr mezopórů 3,4 nm. Jelikož v pórech, jejichž průměr je menší než cca 3,6–3,8 nm, Kelvinovská kapilární kondenzace par dusíku nenastává, vyprazdňují se mezopóry molekulového síta MCM-41 při rovnovážném tlaku, který je shodný s tlakem, při němž probíhá jejich zaplňování. Tento děj je obvykle nazýván kapilární kondenzace bez hystereze. Zaplňování mezopórů molekulového síta SBA-15 o průměru 6,5 nm nastává v důsledku Kelvinovské kapilární kondenzace. Vzhledem k tomu, že meniskus kapalného dusíku má při zaplňování a vyprazdňování pórů různý poloměr křivosti, probíhají tyto děje při odlišných relativních tlacích, což způsobuje, že na izotermě pozorujeme hysterezní smyčku. Molekulové síto SBA-16 má kulovité póry o průměru 6 nm s okny o průměru 4 nm; tyto mezopóry se opět zaplňují mechanismem Kelvinovské kapilární kondenzace. Jelikož všechna okna mají též průměr, probíhá desorpce ve velmi úzkém intervalu relativních tlaků.

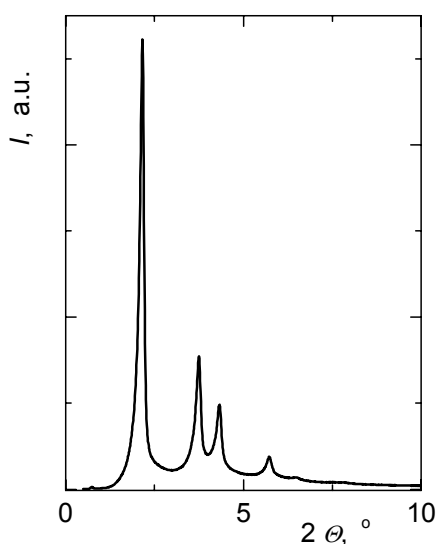
Kvalitativní popis adsorpčních dějů na mezoporézních látkách nám ukazuje, které strukturální parametry je možno z adsorpčních izoterm nalézt. K těmto parametrům zejména náleží celková plocha povrchu, objem, velikost a plocha povrchu mezopórů a plocha vnějšího povrchu částic. Pro kvantitativní analýzu adsorpčních izoterm na uspořádaných mezoporézních materiálech byla vyvinuta řada metod, založených na semiempirických či relativně přesných statisticko-termodynamických přístupech. Popis těchto metod nalezne čtenář v monografii<sup>21</sup> a v literatuře, jež je v ní citována.

Informace o tvaru mezopórů, získané z adsorpčních izoterm, nejsou zcela jednoznačné; další důležité informace, týkající se zejména vzájemného uspořádání mezopórů a tloušťky jejich stěn jen z adsorpčních izoterm získat nelze. Částice s uspořádanou mezoporézní strukturou obsahují pravidelně se střídající motiv stěna póru – objem póru. Z tohoto důvodu poskytují při měření rentgenové difrakce Braggovy reflexe i přesto, že vlastní stěny pórů jsou amorfní. Na difraktogramu mezoporézního molekulového síta MCM-41 (obr. 4) jsou patrné čtyři dobře rozlišitelné difrakční linie, které za předpokladu hexagonální

symetrie  $P6mm$  mohou být indexovány jako (100), (110), (200) a (210).

Jelikož vznik Braggových reflexí je způsoben pravidelným uspořádáním stěn pórů, tj. uspořádáním ve větších vzdálenostech ve srovnání s uspořádáním na atomové nebo molekulové úrovni, pozorujeme tyto reflexe v oblasti malých úhlů  $2\theta$ . U dobře uspořádaného porézního systému můžeme rozlišit nejméně 4–5 reflexí, které umožňují stanovit difrakční symetrii porézního systému. Nejčastěji se setkáváme s kubickou (např.  $Im\bar{3}m$ ,  $Pm\bar{3}m$ ), 2D nebo 3D hexagonální ( $P6mm$ ,  $P6_3/mmc$ ) či lamelární symetrií.

Kombinace vhodné adsorpční metody s rentgenovou difrakcí umožňuje stanovit tloušťku stěn pórů jako rozdíl mezi mřížkovým parametrem vypočteným z difraktogramu a velikostí pórů zjištěnou z adsorpční izotermy.



Obr. 4. Rentgenový difraktogram mezoporézního molekulového síta MCM-41

## 2.2. Syntéza

Po uveřejnění objevu syntézy templátovaných mezoporézních křemičitanů a hlinitokřemičitanů společností Mobil bylo úsilí mnoha výzkumných pracovišť zaměřeno na studium mechanismů tvorby uspořádané anorganicko-organické mezofáze, tj. studium samoorganizace organické (tenzidových micel) a anorganické složky (nejčastěji křemičitanových aniontů). Nejvíce prací bylo provedeno s čistě křemičitanovými materiály, které se projevily jako nejtvrdější a umožnily největší variabilitu porézních struktur. Prvními dobře definovanými mezoporézními materiály se staly: hexagonální molekulové síto MCM-41 s voštinovou mezoporézní strukturou (obr. 1) a kubické molekulové síto MCM-48 s trojrozměrným mezoporézním systémem. Tato síta byla syntetizována za přítomnosti tetraalkylamoniových tenzidů (např. hexadecyltrimethylamoniových solí), jejichž micely byly templátem (šablonou), kolem níž se vytvářely stěny pórů. Parametry jejich porézní struktury závisí jednak na použitém tenzidu, jednak na syntézních podmínkách. Typické hodnoty, vypočtené z adsorpčních izoterm dusíku, jsou uvedeny v tabulce II.

Současně s výzkumem mechanismů supramolekulárního templátování probíhal vývoj nových mezoporézních materiálů. Jelikož syntézy publikované pracovníky společnosti Mobil byly založeny na aplikaci kvartérních amoniových tenzidů jako činidel určujících strukturu mezoporézních molekulových sít, byla největší pozornost ve vývoji nových syntéz věnována tenzidům tohoto typu. V roce 1996 publikoval Stucky se spolupracovníky rozsáhlou studii, v níž popsal použití celkem osmi kationických tenzidů v syntézách templátovaných křemičitanů provedených v různých reakčních podmínkách<sup>22</sup>. Tyto materiály jsou označeny jako SBA; neznámější z nich jsou SBA-1 a SBA-3. (Strukturální parametry jsou uvedeny v tabulce II.) Významný pokrok v oblasti syntéz představovaly receptury založené na použití neionických tenzidů jako činidel určujících architekturu porézní struktury. První použití neionického tenzidu publikovali Pinnavaia a spol. v roce 1995 (cit.<sup>23</sup>); připravené materiály označili MSU-X (X je pořadové číslo materiálu). V roce 1998 Stucky a spol.

Tabulka II

Typické strukturální parametry mezoporézních molekulových sít

Mezoporézní molekulové síto	Difrakční symetrie	Plocha povrchu [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	Objem mezopórů [cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ]	Průměr mezopórů [nm]
MCM-41	hexagonální	900–1200	0,9–1,1	2,0–5,0
MCM-48	kubická	900–1100	0,9–1,1	2,5–3,5
SBA-1	kubická	1000–1100	0,6–0,7	3,0
SBA-3	hexagonální	1100–1300	0,7–0,9	3,0
SBA-15	hexagonální	700–900	0,9–1,2	6,0–10,0
SBA-16	kubická	600–950	0,4–1,0	3,0–8,0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Průměr vstupních oken kolísá v mezích 1,0–6,0 nm

publikovali další rozsáhlou studii<sup>24</sup>, v níž popsali řadu templátovaných křemičitanů, připravených s použitím 30 různých neionických tenzidů; i tyto materiály označili zkratkou SBA. Všechny použité tenzidy obsahovaly polyethylenoxidový řetězec (EO<sub>n</sub>) jako hydrofilní část, hydrofobní část tvořil buď polyisopropylenoxidový řetězec (PO<sub>m</sub>) nebo nejruznější uhlovodíkové řetězce. Z těchto tenzidů našly v syntézách největší uplatnění triblokové kopolymery typu EO<sub>n</sub>PO<sub>m</sub>EO<sub>n</sub>, vyráběné společností BASF pod názvem Pluronic. Nejznámější mezoporézní křemičitan syntetizované s triblokovými kopolymery jsou SBA-15 a SBA-16. (Strukturní parametry jsou uvedeny v tabulce II.)

Jestliže srovnáme kationický tenzid bromid hexadecyltrimethylamonný C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NBr s neionickým tenzidem Pluronic P123 HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>20</sub>[C(CH<sub>3</sub>)HCH<sub>2</sub>O]<sub>70</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>20</sub>H, pak vidíme, že molekula tohoto tenzidu má nejen jinou konstituci, ale je i podstatně větší. Rozmanitost použitých tenzidů způsobuje, že připravené materiály se liší typem difrakční symetrie i tvarem a velikostí mezopórů. Velikost micel – a tedy i velikost mezopórů – je především dána velikostí hydrofobního řetězce molekuly tenzidu; tvar micel pak určuje parametr uspořádání *g* (packing parameter), definovaný vzorcem

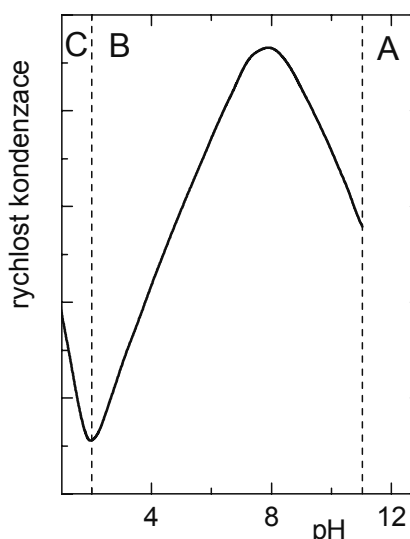
$$g = V/a_0 l \quad (1)$$

kde *V* a *l* jsou objem a délka hydrofobního řetězce, *a*<sub>0</sub> efektivní plocha hydrofilní části molekuly tenzidu. Kulové micely vznikají, jestliže *g* < 1/3; když 1/3 < *g* < 1/2, jsou micely válcovité. Jestliže *g* > 1/2, molekuly tenzidu vytváří flexibilní či rovinné (*g* = 1) dvojvrstvy.

Základní typy interakcí křemičitan/tenzid jsou shrnuty v tabulce III pomocí běžně používané symboliky. Každá reakční cesta je charakterizována nábojem tenzidu *S* a anorganické složky *I*; schéma reakční cesty dále zahrnuje pomocné iontové složky, k nimž náleží H<sup>+</sup> (proton) či vhodný anion X<sup>-</sup> nebo kation M<sup>+</sup>. Jak je zřejmé z obr. 5, pH reakční směsi určuje charakter interakce křemičitan/tenzid. V oblasti A (pH > 11) dochází k rozpouštění oxidu křemičitého a mezofáze proto nevzniká. V oblasti B (11 > pH > 2) probíhá tvorba mezofáze reakční cestou 1 z micel kationického tenzidu a z křemičitanových aniontů obsahujících disociované silanolové skupiny Si-O<sup>-</sup>. Tento děj může výrazně ovlivňovat přítomnost solí. Jestliže je-

jich koncentraci (normalizovanou na 1) označíme *x*, pak realističtější schéma interakcí v mezofázi je (1-*x*)S<sup>+</sup>T<sup>-</sup> + *x*M<sup>+</sup>X<sup>-</sup>. V izoelektrickém bodě (pH 2, skupiny Si-OH) je interakce tenzid/křemičitan zprostředkována vhodným aniontem X<sup>-</sup> (cesta 2) nebo vodíkovou vazbou (cesta 3). V oblasti C (pH < 2) jsou křemičitanové skupiny protonované a mají kladný náboj (skupiny Si-OH<sub>2</sub><sup>+</sup>). Interakce se tenzidem je proto zprostředkována aniontem X<sup>-</sup> (reakční cesty 4 a 5).

V posledních letech, zejména pak po roce 2000, lze v literatuře pozorovat úsilí zaměřené na vývoj syntéz, které umožňují precizně řídit architekturu pórů. Tvar micel byl optimalizován použitím směsí tenzidů, které byly zvoleny tak, aby parametr *g* měl pro daný tvar micel optimální hodnotu<sup>25,26</sup>. Pomocí směsí neionických triblokových tenzidů Pluronic F127 [(EO)<sub>106</sub>(PO)<sub>70</sub>(EO)<sub>106</sub>] a Pluronic P123 [(EO)<sub>20</sub>(PO)<sub>70</sub>(EO)<sub>20</sub>] v kombinaci s vhodnou volbou reakčních podmínek Ryoo a spol. připravili řadu molekulových sít SBA-16 s póry ve tvaru kulových dutin o průměru 4,5–9 nm a okny o velikosti několik desetin až 6 nm



Obr. 5. Vliv pH na rychlost kondenzace křemičitanových iontů

Tabulka III  
Interakce křemičitan/tenzid

Reakční cesta	Typ interakce	Tenzid	Schematický vzorec <sup>a</sup>	Připravený materiál
1	S <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	kationický	C <sub>n</sub> -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	MCM-41, MCM-48
2	S <sup>+</sup> X <sup>0</sup>	kationický	C <sub>n</sub> -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	SBA-1
3	S <sup>0</sup> T <sup>0</sup>	neionický	C <sub>n</sub> -(EO) <sub>n</sub>	MSU
4	S <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	kationický	C <sub>n</sub> -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	SBA-1, SBA-3
5	(S <sup>0</sup> H <sup>+</sup> )(X <sup>-</sup> T <sup>+</sup> )	neionický	(EO) <sub>m</sub> (PO) <sub>n</sub> (EO) <sub>m</sub> C <sub>n</sub> -(EO) <sub>m</sub>	SBA-15, SBA-16

<sup>a</sup> C<sub>n</sub> označuje nejdelší uhlovodíkový řetězec (n = 8 až 22), R různé menší uhlovodíkové skupiny



(cit.<sup>27</sup>).

Velikost a tvar tenzidových micel i charakter interakce křemičitan/tenzid v mezofázi ovlivňují přídavky anorganických solí do reakční směsi<sup>28</sup>. Tímto způsobem lze modifikovat jak mezoporézní systém, tak i vznik a velikost částic. Např. přídavek NaCl do reakční směsi pro syntézu MCM-41 způsobil vznik koloidních částic tohoto mezoporézního molekulového síta<sup>29</sup>. Naopak přídavek KCl umožnil provést syntézu SBA-15 při teplotě blízké teplotě okolí<sup>30</sup>.

Pro aplikační účely je zpravidla výhodné, jestliže částice porézní látky mají definovaný tvar a stálou velikost. Kulovité částice pak vynikají tím, že nejsnadněji vytvářejí uspořádané struktury. Unger<sup>31</sup> a Stucky<sup>32</sup> se spolupracovníky modifikovali klasický Stöberův postup<sup>33</sup> pro syntézu monodisperzních kuliček SiO<sub>2</sub> mikrometrové velikosti založený na řízené hydrolyze emulze tetraalkylorthokřemičitanu. Disperzní prostředí pro tuto emulzi tvoří voda s přídavkem vhodného alkoholu; jako katalyzátor je přidán NH<sub>3</sub> nebo NaOH. Při přípravě mezoporézních křemičitanů je v disperzním prostředí rozpuštěn též tenzid, jehož micely vytvářejí mezoporézní strukturu vznikajících částic. Mou a spol.<sup>34</sup> provedli syntézu kulovitých částic analogickým postupem; na rozdíl od předchozích receptur byla hydrolyza tetraalkylorthosilikátu katalyzována kyselé. Pokud pečlivě zvolili a dodržovali podmínky syntézy, tj. složení, pH a teplotu a způsob míchání reakční směsi, připravili mezoporézní koule o průměru až 1,5 μm, které nevykazovaly žádné makroskopické defekty. V nedávné době byla popsána podobná syntéza mezoporézního molekulového síta SBA-16 s kulovitými částicemi mikrometrové i milimetrové velikosti<sup>35</sup>. Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie bylo prokázáno, že tyto částice vznikají aglomerací koloidních částic a následným zaplňováním mezičásticových prostorů amorfni silikou.

Pro některé aplikace – zejména pro využití v optických zařízeních – mohou být významná mezoporézní křemičitanová vlákna mikrometrového průměru a milimetrové délky. Tato vlákna byla syntetizována na rozhraní dvou kapalných nemísících se fází; nevodná fáze obsahovala tetraalkylorthosilikát, vodná fáze tenzid. První syntéza byla publikována v roce 1997 (cit.<sup>36</sup>), podrobnější práce byla uveřejněna v roce 2001 (cit.<sup>37</sup>). Takto připravená vlákna se vyznačují pozoruhodnou porézní strukturou, neboť hexagonálně uspořádané póry jsou těsně stočeny kolem osy vlákna. Mezoporézní molekulové síto MCM-41 s vláknitými částicemi bylo též syntetizováno tzv. homogenním srážením<sup>38</sup>. V této metodě se mezofáze vytváří v alkalickém prostředí; snížení pH reakční směsi, nutné pro kondenzaci křemičitanových iontů (obr. 5), je dosahováno hydrolyzou esteru kyseliny octové. Na rozdíl od vláken připravených ve dvoufázovém systému má tento materiál mezopóry orientovány paralelně s osou vlákna.

V literatuře byla popsána též příprava tenkých mezoporézních filmů, které by mohly nalézt uplatnění zejména v optice, mikroelektronice či senzorce. Jednoduchou, avšak velmi efektivní metodu pro syntézu precizně uspořádaných tenkých mezoporézních filmů rozpracoval Brinker<sup>39</sup>.

Syntetické zeolity, které jsou mikroporézními mole-

kulovými síty, téměř vždy vytvářejí krystaly, jejichž plochy odpovídají příslušné krystalografické symetrii<sup>40</sup>. Naproti tomu částice mezoporézních molekulových sít vzhledem krystalů obvykle nemají. Pravidelné částice s dobře vyvinutými plochami byly připraveny jen v případě mezoporézních molekulových sít s krychlovou symetrií, a to pouze za speciálně optimalizovaných podmínek. Jelikož tyto částice mají krystalický vzhled, jsou v literatuře běžně nazývány krystaly – i když na rozdíl od skutečných krystalů nejsou uspořádány na atomární úrovni. První „krystaly“ mezoporézního síta MCM-48 připravili Ryoo a spol.<sup>41</sup>; později Mokaya a Xia syntetizovali pravidelné částice tohoto materiálu o velikosti 0,5–2 μm ohraničené dvanácti rovinami<sup>42</sup>. Přípravu dokonalých „krystalů“ mezoporézních molekulových sít SBA-1 a SBA-16 publikoval v nedávné době Mou a spol.<sup>43,44</sup>. Dobře definovaný tvar těchto částic je důsledkem velmi pomalého růstu, který probíhal při pH 2 až 3, tj. v oblasti, v níž je rychlost kondenzace křemičitanových iontů velmi nízká (obr. 5).

Syntéza pravidelně ohraničených částic mezoporézních molekulových sít s krychlovou symetrií je zřejmým důsledkem templátování porézního systému kulovými nebo krátkými rozvětvenými micelami. U hexagonálních molekulových sít MCM-41 a SBA-15 jsou mezopóry templátovány micelami, které mají tvar dlouhých ohebných tyčinek. Proto lze očekávat, že v důsledku fluktuací jsou micely náhodně přetrhávány; tyto defekty pak znemožňují vznik částic s krystalickým vzhledem, tj. ohraničených pravidelně uspořádanými plochami.

### 3. Inkorporace hliníku

Úsilí o zavedení hliníku do neutrálního křemičitanového skeletu mezoporézních molekulových sít bylo zpočátku motivováno snahou získat kyselý katalyzátor pro krakování velkých molekul, které nelze krakovat pomocí standardních katalyzátorů na bázi zeolitu Y. Hlinitokřemičitanová mezoporézní molekulová síta, jež by vykazovala dostatečnou stabilitu a kyselost nutnou pro krakovací proces, však dosud syntetizována nebyla; naproti tomu se tato síta osvědčila v řadě katalytických přeměn velkých molekul, jež nevyžadují vysoce kyselá aktivní místa<sup>45</sup>.

Ačkoliv první syntéza hlinitokřemičitanového molekulového síta MCM-41 byla publikována již v roce 1992 (cit.<sup>15,18</sup>), nelze přímou syntézu templátovaných mezoporézních hlinitokřemičitanů považovat za zcela vyřešený problém. Hlinitokřemičitanové materiály typu MCM-41 nebo SBA-15 obecně nedosahují úrovně uspořádání čistě silikátových materiálů. Přímá hydrotermální syntéza hlinitokřemičitanových materiálů je nejčastěji prováděna za přítomnosti kationtů alkalických kovů, které jsou odstraňovány z kalcinovaných forem iontovou výměnou za kationty amonné; amonné kationty jsou pak odstraněny další kalcinací. Tento postup však nejen poškozuje porézní strukturu, ale způsobuje i ztrátu tetraedricky koordinovaných atomů hliníku, tj. úbytek kyselých hydroxylových skupin. Syntéza hlinitokřemičitanového mezoporézního

síta může být provedena též v kyselém prostředí bez přítomnosti kationtů alkalicích kovů. Příkladem je příprava molekulového síta SBA-15 za použití tetraethylorthokřemičitanu jako zdroje křemíku<sup>46</sup>. K zabudování atomů hliníku do stěn pórů však dochází jen při snížení kyselosti reakční směsi, což má za následek zhoršení kvality mezoporézní struktury.

Další možností inkorporace hliníku je impregnace křemičitanových materiálů vhodnou sloučeninou tohoto prvku. Nejčastěji je používán isopropoxid nebo chloridhydroxid hlinitý<sup>47</sup>. Tento postup sice vede ke zvýšení kyselosti molekulových sít, avšak je doprovázen poškozením jejich mezoporézní struktury.

#### 4. Kompozitní materiály

Z předchozí části je zřejmé, že mezoporézní molekulová síta nevykazují dostatečnou teplotní stabilitu, zvláště po zabudování kationtů hliníku do křemičitanového skeletu, a jejich kyselost je nedostatečná pro nasazení v kysele katalyzovaných reakcích. Z těchto důvodů je věnována velká pozornost přípravě kompozitních molekulových sít (tzv. hierarchických struktur), které využívají jako stavební jednotky nanočástice krystalických zeolitů pro tvorbu mezoporézních materiálů. Výsledkem tohoto postupu jsou materiály obsahující mikroporézní i mezoporézní strukturu a přítomnost zeolitických částic zvyšuje jejich termickou stabilitu a kyselost.

Byly popsány dva základní postupy přípravy těchto kompozitních materiálů. Podle prvního postupu jsou předem připravená mezoporézní molekulová síta rekrystalizována za podmínek klasické hydrotermální syntézy zeolitů<sup>48</sup>. Druhý postup je dvoukrokový: v prvním kroku jsou připraveny nanočástice zeolitu o velikosti pod 50 nm, které jsou v druhém kroku přetvořeny do mezoporézních molekulových sít<sup>49</sup>. Z dosud popsaných syntéz vyplývá, že druhá cesta je mnohem nadějnější, neboť rekrystalizace již připraveného mezoporézního molekulového síta vede v bazických podmínkách k jeho částečnému rozpadu. Nopak použití nanočástic zeolitů (ZSM-5, zeolit Y, zeolit L, Beta) jako stavebních jednotek pro přípravu mezoporézního molekulového síta umožnilo připravit katalyzátory o podstatně vyšší tepelné stabilitě a kyselosti. Tyto katalyzátory vykazují vyšší aktivitu v kysele katalyzovaných reakcích než původní mezoporézní molekulová síta a mnohdy i než samotné zeolity<sup>50</sup>.

#### 5. Závěr

Templátovaná křemičitanová a hlinitokřemičitanová mezoporézní molekulová síta náleží k nanoporézním materiálům s vysokým aplikačním potenciálem. V důsledku pravidelné vnitřní architektury těchto materiálů je jejich jakákoliv vlastnost vlastností celého porézního systému či celého vnitřního povrchu pórů. Tato skutečnost umožňuje řadu vědeckých aplikací mezoporézních molekulových sít.

Typickým příkladem je oblast fyzikální adsorpce plynů, jež je široce využívána pro charakterizaci tuhých látek. Mezoporézní molekulová síta, studovaná jako modelové adsorbenty, umožnila kalibraci metod pro stanovení texturních parametrů tuhých látek a výrazně přispěla k rozvoji teorie adsorpce. Podobně tomu je i v oblasti heterogenní katalýzy, kde aktivita katalyzátorů na bázi mezoporézních molekulových sít může být snáze korelována s charakterem aktivních center.

Úspěšná příprava kompozitních materiálů, které obsahují uspořádané mikroporézní a mezoporézní systémy, zahájila intenzivní výzkum zaměřený na optimalizaci jejich katalytických vlastností. Zvládnutí řízení syntézy těchto hierarchických struktur náleží v současné době k neaktuálnějším problémům v oblasti porézních materiálů.

Technologické aplikace mezoporézních molekulových sít či materiálů připravených na jejich bázi dosud nebyly oznámeny. Lze je očekávat, a to nejen ve vysoce kvalifikovaných separačních procesech či v kvalifikované heterogenní katalýze, ale i v řadě jiných oborů, jejichž výčet přesahuje rámec tohoto článku.

*Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GA ČR 203/05/0197. Autor děkuje Prof. Jiřímu Čejkovi (Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AV ČR) za kritické pročtení rukopisu.*

#### LITERATURA

1. Rouquerol J., Avnir D., Fairbridge C. W., Everett D. H., Haynes J. H., Pernicone N., Ramsay J. D. F., Sing K. S. W., Unger K. K.: *Pure Appl. Chem.* 66, 1739 (1994).
2. Lu G. Q., Zhao X. S., v knize: *Nanoporous Materials: Science and Engineering* (Lu G. Q., Zhao X. S., ed.), str. 4, 317, Imperial College Press, World Scientific Publishing Co., Singapore 2004.
3. Čejka J., Žilková N., Rathouský J., Zukal A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 5076 (2001).
4. Čejka J., Kooyman P. J., Veselá L., Rathouský J., Zukal A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 4823 (2002).
5. Čejka J., Žilková N., Rathouský J., Zukal A., Jagiello J.: *Langmuir* 20, 7532 (2004).
6. Čejka J.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 157, 111 (2005).
7. a) *Mesoporous Molecular Sieves 1998* (Bonnevot L., Bèland F., Danumah C., Giasson S., Kaliaguine S., ed.), Baltimore, USA, 1998, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 117, Elsevier, Amsterdam 1998.  
b) *Nanoporous Materials II* (Sayari A., Jaroniec M., Pinnavaia T. J., ed.), Banff, Kanada, 2000, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 129, Elsevier, Amsterdam 2000.  
c) *2nd International Symposium on Mesoporous Molecular Sieves* (Bonnevot L., Giasson S., Kaliaguine S., Stöcker M., ed.), Quebec City, Kanada, 2000, *Microporous Mesoporous Mater.*, Volumes 44–45 (2001).  
d) *Zeolites and Mesoporous Materials at the Dawn of the 21<sup>st</sup> Century* (Galarnau A., Di Renzo F., Fajula

- F., Vedrine J., ed.), Montpellier, France, 2001, Stud. Surf. Sci. Catal. 135, Elsevier, Amsterdam 2001.
- e) *Nanoporous Materials III* (Sayari A., Jaroniec M., ed.), Ottawa, Kanada, 2002, Stud. Surf. Sci. Catal. 141, Elsevier, Amsterdam 2002.
- f) *Nanotechnology in Mesoporous Materials* (Park S.-E., Ryoo R., Ahn W.-S., Lee C. W., Chang J.-S., ed.), Jeju, Korea, 2002, Stud. Surf. Sci. Catal. 146, Elsevier, Amsterdam 2003.
- g) *Recent Advances in the Science and Technology of Zeolites and Related Materials* (van Steen E., Claeys M., Callanan L. H., ed.), Cape Town, Jižní Afrika, 2004, Stud. Surf. Sci. Catal. 154, Elsevier, Amsterdam 2004.
- h) *Nanoporous Materials IV* (Sayari A., Jaroniec M., ed.), Niagara Falls, Kanada, 2005, Stud. Surf. Sci. Catal. 156, Elsevier, Amsterdam 2005.
- i) *Zeolites and Ordered Mesoporous Materials: Progress and Prospects* (Čejka J., van Bekkum H., ed.), Stud. Surf. Sci. Catal. 157, Elsevier, Amsterdam 2005.
- j) *Molecular Sieves: From Basic Research to Industrial Applications* (Čejka J., Žilková N., Nachtigall P., ed.), Stud. Surf. Sci. Catal. 158, Elsevier, Amsterdam 2005.
8. Rathouský J., Zúkalová M., Zúkal A.: Chem. Listy 91, 413 (1997).
  9. Ciesla U., Schüth F.: Microporous Mesoporous Mater. 27, 131 (1999).
  10. Ying J. Y., Mehnert C. P., Wong M. S.: Angew. Chem. Int. Ed. 38, 56 (1999).
  11. Schüth F., Schmidt W.: Adv. Eng. Mater. 4, 269 (2002).
  12. Leontidis E.: Current Opinion Colloid Interface Sci. 7, 81 (2002).
  13. Čejka J.: Appl. Catal., A 254, 327 (2003).
  14. Beck J. S., Chu C. T.-W., Johnson I. D., Kresge C. T., Leonowicz M. E., Roth W. J., Vartuli J. W.: WO patent 91/11390 (1991).
  15. Kresge C. T., Leonowicz M. E., Roth W. J., Vartuli J. C., Beck J. S.: Nature 359, 710 (1992).
  16. Chiola V., Ritsko J. E., Vanderpool C. D.: US Patent 3 556 725 (1971).
  17. Yanagisawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato C.: Bull. Chem. Soc. Japan 63, 988 (1990).
  18. Beck J. S., Vartuli J. C., Roth W. J., Leonowicz M. E., Kresge C. T., Schmitt K. D., Chu C. T.-W., Olson D. H., Sheppard E. W., McCullen S. B., Higgins J. B., Schlenker J. L.: J. Am. Chem. Soc. 114, 10834 (1992).
  19. Di Renzo F., Cambon H., Dutartre R.: Microporous Mater. 10, 283 (1997).
  20. Čejka J., Wichterlová B.: Catal. Rev. 44, 375 (2002).
  21. Lowell S., Shields J. E., Thomas M. A., Thommes M.: *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2004.
  22. Huo Q., Margolese D. I., Stucky G. D.: Chem. Mater. 8, 1147 (1996).
  23. Bagshaw S. A., Prouzet E., Pinnavaia T. J.: Science 269, 1242 (1995).
  24. Zhao D., Huo Q., Feng J., Chmelka B. F., Stucky G. D.: J. Am. Chem. Soc. 120, 6024 (1998).
  25. Ryoo R., Joo S. H., Kim J. M.: J. Phys. Chem., B 103, 7435 (1999).
  26. Kim J. M., Sakamoto Y., Hwang Y. K., Kwon Y.-U., Terasaki O., Park S.-E., Stucky G. D.: J. Phys. Chem., B 106, 2552 (2002).
  27. Kim T.-W., Ryoo R., Kruk M., Gierszal K. P., Jaroniec M., Kamiya S., Terasaki O.: J. Phys. Chem., B 108, 11480 (2004).
  28. Leontidis E.: Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7, 81 (2002).
  29. Rathouský J., Zúkalová M., Kooyman P. J., Zúkal A.: Colloids Surf., A 241, 81 (2004).
  30. Yu C., Tian B., Fab J., Stucky G. D., Zhao D.: Chem. Commun. 2726 (2001).
  31. Grün M., Lauer I., Unger K. K.: Adv. Mater. 9, 254 (1997).
  32. Huo Q., Feng J., Schüth F., Stucky G. D.: Chem. Mater. 9, 14 (1997).
  33. Stöber W., Fink A., Bohn E.: J. Colloid Interface Sci. 26, 62 (1968).
  34. Kao C.-P., Lin H.-P., Mou C.-Y.: J. Phys. Chem. Solids 62, 1555 (2001).
  35. Stevens W. J. J., Mertens M., Mullens S., Thijs I., Van Tendeloo G., Cool P., Vansant E. F.: Microporous Mesoporous Mater. 93, 119 (2006).
  36. Huo Q., Zhao D., Feng J., Weston K., Buratto S. K., Stucky G. D., Schacht S., Schüth F.: Adv. Mater. 9, 974 (1997).
  37. Kleitz F., Marlow F., Stucky G. D., Schüth F.: Chem. Mater. 13, 3587 (2001).
  38. Schulz-Ekloff G., Rathouský J., Zúkal A.: J. Inorg. Mater. 1, 97 (1999).
  39. Brinker C. J.: MRS Bulletin 29, 631 (2004).
  40. Čejka J., Žilková N.: Chem. Listy 94, 278 (2000).
  41. Kim J. M., Kim S.K., Ryoo R.: Chem. Commun. 1998, 259.
  42. Xia Y., Mokaya R.: J. Mater. Chem. 13, 657 (2003).
  43. Chao M.-C., Wang D.-S., Lin H.-P., Mou C.-Y.: J. Mater. Chem. 13, 2853 (2003).
  44. Chen B.-C., Chao M.-C., Lin H.-P., Mou C.-Y.: Microporous Mesoporous Mater. 81, 241 (2005).
  45. Taguchi A., Schüth F.: Microporous Mesoporous Mater. 77, 1 (2005).
  46. Vinu A., Murugesan V., Böhlmann W., Hartmann M.: J. Phys. Chem., B 108, 11496 (2004).
  47. Mokaya R.: Chem. Commun. 2000, 1891.
  48. Verhoef M. J., Kooyman P. J., van der Wall J. C., Rigutto M. S., Peters J. A., van Bekkum H.: Chem. Mater. 13, 683 (2001).
  49. Prokešová P., Mintova S., Čejka J., Bein T.: Microporous Mesoporous Mater. 64, 165 (2003).
  50. Prokešová P., Žilková N., Mintova S., Bein T., Čejka J.: Appl. Catal., A 281, 85 (2005).

**A. Zukal** (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Dolejškova 3, Prague 8*): **Recent Trends in the Synthesis of Nanoporous Materials**

This contribution reviews recent trends and potentials in the synthesis of advanced nanoporous materials. The discovery of these materials has accelerated the development of methods of their characterization. The first part of this review describes the characteristics of typical

organized mesoporous silicas. For the preparation of templated mesoporous silicas, many synthetic routes have been developed. Recent advances in this field are presented and structural and morphological properties of resulting materials are described in the second part. In the third part, the incorporation of aluminum into the pore walls is briefly summarized. The last part is devoted to the composite micro/mesoporous materials with the special emphasis on the composites involving nanozeolitic particles.

## APROCHEM 2007

**16. Konference • Chemické technologie • Ropa • Petrochemie • Polymery**

Udržitelný rozvoj průmyslu • Výzkum • Školství • Bezpečnost • Ochrana Prostředí

**16. – 18. duben 2007 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal**

## ODPADOVÉ FÓRUM 2007

**2. Symposium • Výsledky výzkumu a vývoje pro odpadové hospodářství**

Nebezpečné, chemické, biodegradabilní a inertní odpady • Materiálové a termické využití • Recyklace •

Sanace zátěží • Systémové otázky • Odpadní vody • Odpadní plyny • Exhalace • Zápachy

**18. – 20. duben 2007 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal**

**Doprovodná technická výstavka • Firemní prezentace • Možnosti inzercí**

Plná znění příspěvků na CD ROM i v tištěné formě • Pro obě dílčí akce jediná registrace

Připravuje: PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCH, VŠCHT Praha, SCHP ČR, CEMC a ÚCHP AV ČR

2. Cirkulář – Pozvánka, Program a Přihláška účasti tiskem a na webu. Zveme srdečně k účasti.

**Kontakty: PCHE-PetroChemEng, Ing. Jaromír Škarka, CSc., Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6**

**T/F: 220 518 698 • M: 607 671 866 • T/F: 233 336 138 (jen do 31. 5. 2007)**

[www.aprochem.cz](http://www.aprochem.cz) • [pche@csvts.cz](mailto:pche@csvts.cz)

---

## CENA MERCK

---

### ANALÝZA MARKERŮ PRO CHARAKTERIZACI DESTILÁTŮ

MARCELA KORHOŇOVÁ\*, RADKA  
HEJDOVÁ, PETR BARTÁK, PETR BEDNÁŘ  
a LUBOMÍR ČÁP

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta,  
Univerzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8,  
771 46 Olomouc  
korhonovam@seznam.cz*

Došlo 16.6.06, přijato 19.10.06.

---

Klíčová slova: destiláty, plynová chromatografie, faktorová analýza, markery, estery

---

#### Úvod

Destiláty patří mezi alkoholické nápoje obsahující nejméně 20 obj.% alkoholu, při jejichž výrobě se smí používat výhradně kvasný ethanol<sup>1</sup>, který je tvořen během fermentace ze zkvasitelných surovin činností vhodných mikroorganismů (kvasinek) a izolován následnou destilací.

Mimo ethanolu a vody, které tvoří podstatnou část destilátů, jsou přítomny i další látky<sup>2</sup>, které mají vliv na senzorní vlastnosti<sup>3,4</sup> destilátu a na jeho kvalitu. Tyto látky mohou pocházet z původní suroviny<sup>2,5</sup> (samotná surovina, ale i kvas), mohou vznikat při fermentačním procesu<sup>6</sup> nebo při skladování a zrání<sup>7</sup>. Zastoupeny jsou především další nižší alifatické alkoholy<sup>2</sup> (methanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol i další alkoholy). Z aromatických a heterocyklických alkoholů vznikají při kvašení benzylalkohol, 2-fenylethanol a furfurylalkohol. Všechny se vyznačují výraznými senzorními vlastnostmi. Z více-mocných alkoholů se v ovocných destilátech vyskytuje 2,3-butandiol a glycerol. Další skupinu, která podstatným způsobem ovlivňuje senzorní vlastnosti ovocných destilátů, tvoří aldehydy. Ty pocházejí<sup>1</sup> jednak ze zpracované suroviny a jednak vznikají<sup>2</sup> během kvasného procesu i během destilace a staření. Mezi hlavními zástupci této skupiny chemických látek patří acetaldehyd, benzaldehyd a furankarbaldehyd. V ovocných destilátech jsou také zastoupeny těkavé alifatické kyseliny<sup>2,3</sup>, především kyselina

octová, dále kyselina mravenčí a máselná, a z vyšších pak kyseliny kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová a další. Tyto vznikají jako vedlejší produkty kvašení<sup>8</sup> a v malém množství bývají v ovocných destilátech přítomny (těkají s vodní parou) buď ve volné formě nebo jako estery.

Různorodé chemické složení jednotlivých destilátů způsobené mnoha faktory<sup>9,10</sup> (druh a kvalita použité suroviny, aktivita kvasinek, fermentační podmínky, technologický postup destilace, konečná úprava destilátu) naznačuje možnost rozlišení základních typů těchto alkoholických nápojů na základě identifikace markerů specifických pro daný druh destilátu, a tak i zabránění možného falšování lihovin.

#### Experimentální část

K analýze byly vybrány pálenky z meruněk, švestek, jablek a hrušek. U vzorků ovocných destilátů, které zahrnovaly výrobky z domácí, palírenské i průmyslové výroby, byly vybrány dvě skupiny potenciálních markerů. Skupina nízkomolekulárních látek zahrnovala 1-propanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl-acetát a 1,1-diethoxyethan. Druhou skupinu tvořily ethylestery vyšších mastných kyselin, a to ethyl ester kyseliny kaprylové, kaprinové, laurové, myristové, palmitové a stearové. Tyto látky byly vybrány jako univerzální (i když málo specifické) markery přítomné ve všech typech ovocných destilátů.

Pro měření obsahu látek v destilátech byl použit plynový chromatograf HP 6890 s hmotnostním detektorem 5973 N (Agilent, USA), knihovnou spekter NIST 98 (USA) a kolonou HP-5MS (5%-difeny-95%-polydimethylsiloxan) s parametry 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Podmínky GC separace: *i*) nízkomolekulární látky: 40 °C (2 min) – 10 °C min<sup>-1</sup> – 200 °C (5 min); nástřik: 0,2 μl, split 50:1; *ii*) ethylestery vyšších mastných kyselin: 50 °C (2 min) – 10 °C min<sup>-1</sup> – 300 °C (5 min); nástřik: 1 μl, dávkovací pulz 280 kPa, 24 s. Nosným plynem bylo helium (99,998 %; rychlost průtoku: *i*) 0,6 ml min<sup>-1</sup>, *ii*) 0,9 ml min<sup>-1</sup>; SIAD, Bergamo, Itálie).

Hmotnostní obsah jednotlivých markerů ve vzorcích byl určen metodou kalibrační přímky. Byly připraveny dva základní zásobní roztoky standardních látek: *i*) roztok nízkomolekulárních látek a *ii*) roztok ethylesterů vyšších mastných kyselin. Ethanolické zásobní roztoky byly následně ředěny 10×, 50× a 250× 50% ethanollem (v případě ethylesterů vyšších mastných kyselin 96% ethanollem).

---

\* Marcela Korhoňová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

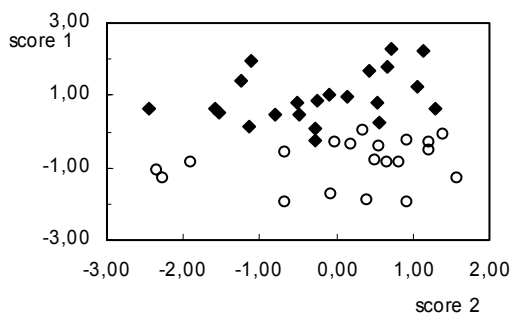
## Výsledky a diskuse

Ve sledovaných destilátech byla metodou kalibrační přímky stanovena koncentrace 1-propanolu, 2-propanolu, 2-methyl-1-propanolu, 2-methyl-1-butanolu, 3-methyl-1-butanolu, ethyl-acetátu, 1,1-diethoxyethanu a ethylesteru kyseliny kaprylové, kaprinové, laurové, myristové, palmi- tové a stearové. Přímá interpretace takto obsáhlých výsledků analýzy ovocných destilátů je poměrně komplikovaná právě pro velký počet naměřených dat, jejich vzájemnou provázanost a vysokou variabilitu u jednotlivých pálenek. Pro rychlé statistické zpracování takových rozsáhlých souborů dat a pro vyhledání a přehledně znázornění jejich vnitřní struktury se často využívá faktorová analýza („Factor Analysis“ – FA). Tato vícerozměrná statistická metoda<sup>11</sup> umožňuje určit rozbor struktury vzájemných závislostí proměnných, popis struktury dat a vyhledat významné faktory (jevy) a souvislosti, které je těžké určit analýzou jednotlivých ukazatelů či jejich dvojic.

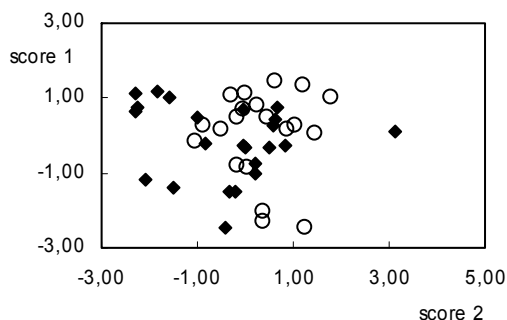
Pro analýzu byly dále vybrány dva soubory dat, vzorky meruňkovic a slivovic. Výsledek FA (obr. 1) ukázal, že došlo k rozdělení vzorků meruňkovic a vzorků slivovic na dvě skupiny. Tento výsledek naznačuje možnost rozlišení daného druhu destilátu na základě analýzy obsa-

hu uvedených analytů. Po vyloučení skupiny ethylesterů vyšších mastných kyselin a zúžení souboru vstupních dat na skupinu nízkomolekulárních látek, došlo k mírnému překrytí obou souborů, avšak bylo dosaženo rovněž uspokojivého rozlišení (obr. 2). Samotná analýza ethylesterů vyšších mastných kyselin již neposkytla dobré rozlišení (obr. 3). U sledovaných destilátů tedy koncentrace běžných nízkomolekulárních látek obsahují překvapivě více specifickou informaci a uvedené látky jsou tedy lepšími kvalitativními markery než ethylestery vyšších mastných kyselin. Následující analýza vzorků jablekovic a hruškovice, což jsou pálenky z jádrového ovoce, přinesla obdobné výsledky jako analýza meruňkovic a slivovic. I v tomto případě bylo možné odlišit pálenky z jednotlivých surovin na základě analýzy sledovaných markerů (obr. 4).

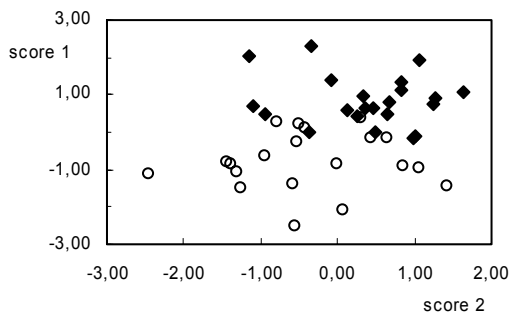
Při analýze pálenek ze stejného typu ovoce (peckovice resp. jádrové ovoce) dochází k dobrému rozlišení jak při FA analýze, jejíž matice zahrnuje všechny studované analyty, tak při analýze, kde vstupní matici tvoří pouze nízkomolekulární látky. U sledovaných vzorků tedy ethylestery vyšších mastných kyselin nemají podstatný vliv na výsledek FA analýzy. Lze předpokládat, že pro jiný druh ovoce resp. pro jinou výchozí surovinu, která nebyla zahrnuta do této studie, může být právě obsah ethylesterů



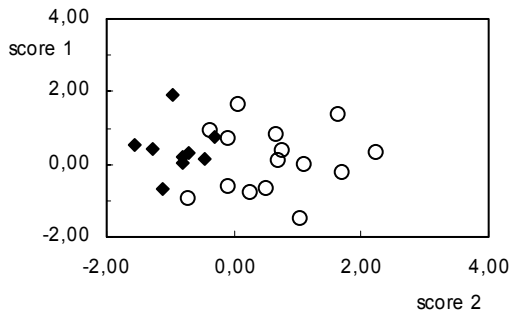
Obr. 1. FA vzorků meruňkovic a slivovic; ◆ vzorky slivovic, ○ vzorky meruňkovic



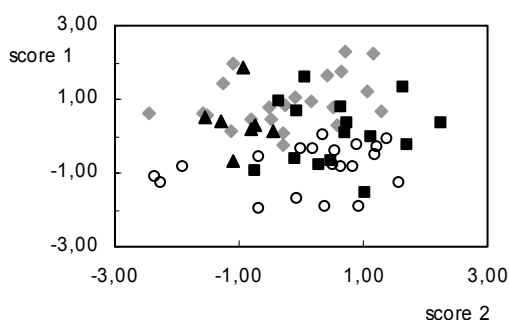
Obr. 3. FA ethylesterů vyšších mastných kyselin vzorků meruňkovic a slivovic; ◆ vzorky slivovic, ○ vzorky meruňkovic



Obr. 2. FA nízkomolekulárních látek vzorků meruňkovic a slivovic; ◆ vzorky slivovic, ○ vzorky meruňkovic



Obr. 4. FA vzorků jablekovic a hruškovice; ○ vzorky jablekovic, ◆ vzorky hruškovice



Obr. 5. FA vzorků meruňkovice, slivovice, jablkovice a hruškovice; ◆ vzorky slivovice, ○ vzorky meruňkovice, ■ vzorky jablkovice, ▲ vzorky hruškovice

vyšších mastných kyselin charakteristickým ukazatelem.

Z porovnání koncentrací navržených markerů v jednotlivých typech destilátů je zřejmé, že tyto markery jsou obsaženy prakticky ve všech destilátech ve srovnatelných koncentracích. Přes nízkou specifčnost je možné pomocí těchto markerů poměrně dobře odlišit určité typy destilátů. Z obr. 5 je ovšem vidět, že spojením všech uvedených ovocných pálenek do vstupní matice již nedochází k dobrému rozlišení. Z uvedených výsledků je zřejmé, že pro komplexnější charakterizaci bude nutné vyhledat další, specifčtější markery destilátů. Nadějnou skupinu představují např. terpeny, mezi nimiž lze najít látky, které jsou do značné míry specifické pro jednotlivé druhy ovoce.

## Závěr

Různé druhy ovocných destilátů byly matematicky analyzovány vícerozměrnou statistickou metodou, faktorovou analýzou, která dokázala rozlišit podobné druhy ovoce, pálenky pocházející z peckovin a pálenky pocházející z jádrového ovoce. Společnou analýzou všech ovocných destilátů však nebylo možné dosáhnout dostatečného rozlišení jednotlivých druhů ovoce. Výrazné zlepšení lze předpokládat při použití specifčtějších markerů (např. terpenů). Jejich vyhledání je důležitým úkolem budoucího výzkumu. Vybrané nízkomolekulární látky představují překvapivou a perspektivní skupinu univerzálních markerů destilátů.

*Autoři děkují Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy za finanční podporu (Grant č. MSM 6198959216).*

## LITERATURA

1. Merzoch K.: *Lihoviny jako "zdravotně nezávadné" potraviny?* V: Sborník Otevřená věda, Praha 2005, <http://www.otvarena-veda.cz>, staženo 19.10.2006.
2. Dyr J., Dyr J. E.: *Výroba slivovice a jiných pálenek*. Maxdorf, Praha 1997.
3. Demyttenaere J. C. R., Sánchez Martínez J. I., Verhé R., Sandra P., De Kimpe N.: *J. Chromatogr.*, A 985, 221 (2003).
4. Lehtonen P. J., Keller L. A., Ali-Mattila E. T.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, A 208, 413 (1999).
5. Grégr V., Uher J.: *Výroba lihovin*. SNTL, Praha 1974.
6. Uhrová H.: *Děláme si sami slivovici, meruňkovici, hruškovici, jablkovici a jiné ovocné destiláty, vína, šťávy a sirupy*. Víkend, Vimperk 2001.
7. Reid K. J. G., Swan J. S.: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 25, 49 (1993).
8. Lukić I., Banović M., Petrusović D., Radeka S., Sladonja B.: *J. Chromatogr.*, A 1101, 238 (2006).
9. Mangas J., Rodríguez R., Moreno J., Blanco D.: *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 29, 357 (1996).
10. Fitzgerald G., James K. J., MacNamara K., Stack M. A.: *J. Chromatogr.*, A 896, 351 (2000).
11. Meloun M., Militký J., Hill M.: *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech*. Academia, Praha 2005.

**M. Korhoňová, R. Hejdová, P. Barták, P. Bednář, and L. Čáp** (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc): **Analysis of Markers for Characterization of Distillates**

Fruit distillates, such as apricot-brandy, plum vodka "Slivovitz", cider-brandy and pear-brandy, originating from domestic production, small distilleries and manufacturing production, were analysed by gas chromatography with mass spectrometry. Less specific, but universal markers present in all types of distillates were selected for first experiments: propan-1-ol, propan-2-ol, ethyl acetate, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 1,1-diethoxyethane, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, ethyl tetradecanoate, ethyl palmitate and ethyl stearate. Quantitative data were statistically evaluated by factor analysis. Regarding the minute specificity of selected markers, unexpectedly good resolution was observed in this case. The results of factor analysis indicate a possibility of differentiation of products from different fruits. Samples of apricot-brandy and plum vodka (drupes) can be differentiated. In the same way, distillates from apples and pears (pomes) can be easily differentiated. Although, the full resolution of all samples requires discovery of other specific markers, the proposed set of low-molecular-weight compounds is a promising group of universal markers for characterisation of distillates.

## AUTOMATICKÁ SPEKTRÁLNA DEKONVOLÚCIA NA ANALÝZU REZÍDUÍ PESTICÍDOV METÓDOU RÝCHLEJ GC-MS

MICHAL KIRCHNER, SILVIA ONDREKOVÁ\*  
a EVA MATISOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava  
eva.matisova@stuba.sk

Došlo 5.5.06, prijaté 7.11.06.

Kľúčové slová: GC-MS, analýza rezíduí pesticídov, automatická spektrálna dekonvolúcia, AMDIS

### Úvod

Zvyšovanie rýchlosti analýz plynovou chromatografiou sa stalo zaujímavým už v období uvedenia kapilárnych kolón. Jednou z možností zvyšovania rýchlosti GC separácie je použitie krátkych kolón s malým vnútorným priemerom. Používajú sa kapilárne kolóny s malým vnútorným priemerom (I.D.) – 0,1 alebo 0,15 mm narrow-bore kolóny a s dĺžkou zvyčajne do 15 m. Výhodou takýchto kolón je predovšetkým vysoká separačná účinnosť porovnateľná, alebo dokonca vyššia ako v prípade konvenčných GC kolón<sup>1,2</sup>. K nevýhodám kapilárnych kolón s malým I.D. patrí nízky prietok nosného plynu, čo môže významne komplikovať dávkovanie vzorky a ich otázná odolnosť voči málo prchavým súčastiam matrice prítomným vo vzorke<sup>3</sup>. Chromatografické píky po separácii na kolónach s malým I.D. majú malú šírku, čo kladie vysoké nároky na detekciu, predovšetkým v prípade použitia hmotnostno-spektrometrických detektorov.

K času potrebnému na získanie analytického výsledku významne vplýva okrem samotnej separácie aj úprava vzorky a vyhodnotenie nameraných údajov. Firma Agilent Technologies vyvinula softvér „Deconvolution Reporting Software“<sup>4</sup>, ktorý má slúžiť na automatickú identifikáciu pesticídov (prípadne inej skupiny analytov) podľa knižnice hmotnostných spektier (RTLPEst 2) a na kvantitatívnu analýzu metódou GC-MS. Detekcia analytov v GC-MS sa uskutočňuje pri snímaní v režime „Full Scan“ (snímanie celých spektier). Vyhodnocovanie s použitím

„Deconvolution Reporting Software“ začína v prvej časti softvérového balíka – MSD Chemstation – program na obsluhu GC-MS a vyhodnocovanie analýz. Tu sa uskutoční bežná identifikácia analytov podľa elučného času a pomerov intenzít preddefinovaných selektívnych iónov a kvantitatívna analýza s použitím zvolenej kalibračnej metódy. Následne sa uskutoční dekonvolúcia chromatografických píkov a identifikácia cieľových analytov v druhej časti softvérového balíka, v programe AMDIS. Tento program slúži na automatickú elimináciu šumu z meraní a spektrálnu dekonvolúciu chromatografických píkov<sup>5</sup>. Identifikáciu uskutočňuje porovnávaním dekonvoluovaných spektier s referenčnými spektrami vo zvolenej knižnici, v prípade pesticídov je to knižnica RTLPEst 2, ktorá obsahuje spektrá 567 aktívnych látok. Následne sa všetky dekonvoluované spektrá, ktoré boli v programe AMDIS identifikované ako cieľové analyty, ešte raz porovnávajú so spektrami v knižnici NIST<sup>02</sup> (obsahuje 147000 rôznych zlúčenín) s použitím programu MS Search. Výstupom je správa obsahujúca tabuľku identifikovaných zlúčenín spolu s „match“ faktorom vyjadrujúcim zhodu dekonvoluovaného spektra s referenčným spektrom a množstvom látky. V dostupnej literatúre sa však neuvádzajú medze detekcie, pri ktorých je automatická procedúra spoľahlivá<sup>4</sup>. Na medze detekcie rôznych látok vplývajú dva faktory. Prvým je medza detekcie použitého GC-MS, teda množstvo látky, pri ktorom sa zaznamená dostatočne kvalitné hmotnostné spektrum a druhým je kvalita dekonvolúcie v programe AMDIS. Tu je dôležité, aby bolo možné účinne eliminovať šum merania a spektrálne odlišiť píky analytov od píkov pochádzajúcich z matrice vzorky.

Cieľom tejto práce je odhadnúť najnižšiu koncentráciu, pri ktorej je možná automatická dekonvolúcia a identifikácia rezíduí pesticídov v ovoci a zelenine programom AMDIS (Automated Mass – spectral Deconvolution and Identification System) a výpočet medze detekcie vybraných pesticídov pri rýchlej GC-MS analýze v režime „Full Scan“.

### Experimentálna časť

Chromatografické analýzy boli vykonané na GC-MS 6890N (Agilent Technologies, USA) s hmotnostným detektorom 5973N (Agilent Technologies, USA) s PTV dávkovačom (Programmed Temperature Vaporizer – dávkovač s programovanou teplotou odparovania) a autosamplerom 7683. Plynový chromatogram bol v on-line zapojení s počítačom pracujúcim so softvérom na kontrolu priebehu analýzy a spracovanie dát v MSD Chemstation D.01.02.

Na analýzu bola použitá kapilárna kolóna s malým

\* Silvia Ondreková sa s touto prácou úspešne zúčastnila súťaže O cenu firmy Merck 2006 za najlepšiu študentskú vedeckú prácu v odbore analytickej chémie.



Tabuľka I

Zoznam sledovaných pesticídov, zaradenie do chemických skupín, pôvod, elučný čas ( $t$ ), koeficient determinácie ( $R^2$ ), vypočítaná medza detekcie (LOD) a cieľový (kvantifikačný) ión

Pesticíd	Skupina	Zdroj	$t$ [min]	$R^2$	LOD [ng $\mu\text{l}^{-1}$ ]	Cieľový ión [m/z]
Dimethoate	organofosfát	Cheminova Agro	3,79	0,9990	0,30	87
Diazinon	organofosfát	Agrovita	3,97	0,9990	0,32	276
Terbutylazine	triazín	Ciba-Geigy	3,99	0,9990	0,28	214
Pyrimethanil	anilino- pyrimidín	Schering	4,06	0,9993	0,22	198
Chlorpyrifos-methyl	organofosfát	Dr,Ehrenstorfer	4,37	0,9994	0,20	286
Fenitrothion	organofosfát	Sumimoto Chemical	4,63	0,9994	0,28	277
Chlorpyrifos	organofosfát	Dow Chemical co,	4,72	0,9990	0,28	314
Cyprodinil	anilino- pyrimidín	Ciba-Geigy	5,02	0,9991	0,26	225
Penconazole	triazol	Ciba-Geigy	5,06	0,9991	0,26	248
Captan	ftalamid	Agrovita	5,17	0,9888	1,10	79
Methidathion	organofosfát	Ciba-Geigy	5,25	0,9990	0,28	145
Myclobutanil	triazol	Dow Agro science	5,50	0,9990	0,28	179
Kresoxim-methyl	oximinoacetát	Dr,Ehrenstorfer	5,58	0,9990	0,30	131
Tebuconazole	triazol	Agrovita	6,23	0,9989	0,30	250
Phosalone	organofosfát	Dr,Ehrenstorfer	6,73	0,9991	0,30	367
Bitertanol	triazol	Bayer	7,15	0,9983	0,40	170
Cypermethrin	pyretroid	Agrovita	7,65	0,9966	1,04	181
Etofenprox	neesterový pyretroid	Mitsui Toatsu Chemicals	7,71	0,9992	0,24	163

vnútorným priemerom typu CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS s rozmermi 15 m  $\times$  0,15 mm s hrúbkou stacionárnej fázy 0,15  $\mu\text{m}$  so zložením 95 % dimetyl 5 % fenylsiloxán od firmy Chrompak-Varian (Middelburg, Holandsko). Ako nosný plyn bolo použité hélium s čistotou 5,0 od firmy Linde Technoplyn (Bratislava, SR).

Optimalizované chromatografické podmienky:

Podmienky PTV dávkovača: režim studený splitless, počiatková teplota: 150  $^{\circ}\text{C}$ , počiatkový čas: 0,00 min, 1. teplotný gradient gradient: 400  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do 300  $^{\circ}\text{C}$  (2,00 min), 2. teplotný gradient 400  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do 350  $^{\circ}\text{C}$  (0,5 min), tlak 363,5 kPa, splitless čas 1,13 min, prietok deličom 160 ml  $\text{min}^{-1}$ , dávkovaný objem: 2  $\mu\text{l}$ .

Teplotný program termostatu pece: počiatková teplota 130  $^{\circ}\text{C}$  izotermicky 1,13 min, teplotný gradient 27,25  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , konečná teplota 290  $^{\circ}\text{C}$  6,00 min.

Podmienky MS detektora: teplota GC-MS prevodníka 290  $^{\circ}\text{C}$ , režim „Full Scan“ so začiatkom merania po 2,50 min, rozsah skenovaných m/z 50–450, vzorkovací parameter 1, teplota iónového zdroja 250  $^{\circ}\text{C}$ , energia elektrónov 70 eV, teplota kvadrupólu 150  $^{\circ}\text{C}$ .

Štandardy pesticídov sme získali z rôznych zdrojov (tab. I). Zásobný roztok pesticídov s približnou koncentráciou 0,5 mg  $\text{ml}^{-1}$  bol pripravený v toluéne (SupraSolvMerck KgaA, Darmstadt, Nemecko).

Metóda úpravy vzoriek bola prevzatá z literatúry<sup>6</sup>. Zo zhomogenizovanej vzorky jablka (odroda jonatán), sa odobralo 25 gramov do kadičky a extrahovalo sa s použitím homogenizátora Ultra-Turrax T25 basic (Ika Werke, Staufen, Nemecko) (19 000 ot  $\text{min}^{-1}$ , 3 min) s 50 ml acetonitrilu (Suprasolv, Merck, Bratislava). Po filtrácii zmesi cez filtračný papier zo sklenených mikrovláskien a prídavku 2,5 g NaCl sa oddelená organická fáza presušila s 2 g bezvodého  $\text{MgSO}_4$ . Extrakt (25 ml) sa na vákuovej odparke odparil do objemu približne 1 ml. Získaný koncentrát sa prečisťoval na 500 mg SPE  $\text{NH}_2$ - kolónke (Bond-elut, IST, Midglamorgan, UK) elúciou 15 ml acetónu (Suprasolv, Merck, Bratislava). Efluent sa prúdom čistého dusíka odparil do sucha a doplnil toluénom na objem 5 ml. Zakonzentrovací faktor úpravy vzorky bol 2,5.

## Výsledky a diskusia

Použitie softvéru AMDIS na automatickú dekonvolúciu a detekciu analytov

Na posúdenie možností využitia softvéru AMDIS v stopovej analýze reziduí pesticídov s použitím rýchlejšej

Tabuľka II  
Početnosť pozitívnej identifikácie jednotlivých pesticídov na rôznych koncentračných hladinách, n=7

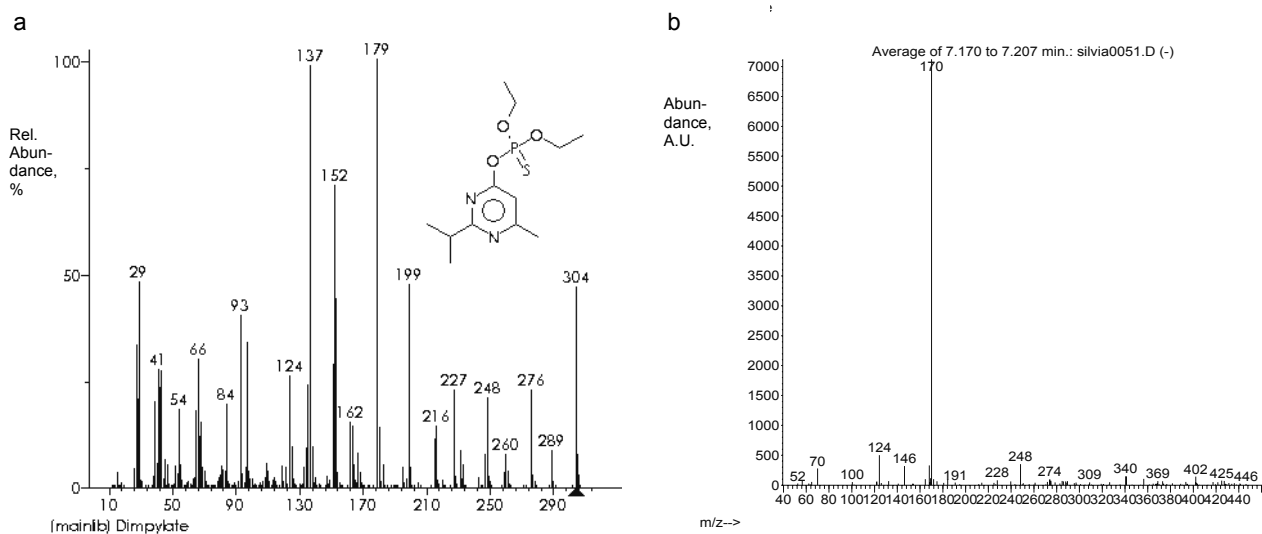
Pesticíd	Početnosť pozitívnej identifikácie jednotlivých pesticídov koncentrácia [ng $\mu\text{l}^{-1}$ ]						
	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
Dimethoate	7	7	7	7	3	0	0
Diazinon	7	7	7	7	7	7	0
Terbuthylazine	7	7	7	7	7	6	0
Pyrimethanil	7	7	7	7	7	7	1
Chlorpyrifos-methyl	7	7	7	7	7	7	0
Fenitrothion	7	7	7	7	7	4	0
Chlorpyrifos	7	7	7	7	7	7	0
Cyprodinil	7	7	7	7	7	7	1
Penconazole	7	7	7	7	7	7	0
Captan	7	7	7	0	0	0	0
Methidathion	7	7	7	7	7	0	0
Myclobutanil	7	7	7	7	7	0	0
Kresoxim-methyl	7	7	7	7	7	5	0
Tebuconazole	7	7	4	7	0	0	0
Phosalone	7	7	7	7	7	1	0
Bitertanol	7	7	7	2	0	0	0
Cypermethrin	7	7	7	7	0	0	0
Etofenprox	7	7	7	7	7	1	0

GC je potrebné zistiť najnižšiu koncentráciu rôznych pesticídov, pri ktorej je ešte možná spoľahlivá identifikácia s použitím automatickej dekonvolúcie. Na tento experiment sme zvolili zmes 18 pesticídov (tab. I), reprezentujúcu zastúpenie látok z viacerých chemických skupín pesticídov. Pripravili sme roztoky štandardov pesticídov v extrakte z jablák s rozdielnymi koncentraciami: 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , čo odpovedá 4; 2; 0,4; 0,2; 0,04; 0,02; 0,004 mg  $\text{kg}^{-1}$  v pôvodnej vzorke jablka. Čistota použitých jablák neošetrovaných pesticídovými prípravkami bola overená<sup>6</sup>. Roztok každej koncentračnej hladiny sme analyzovali na GC-MS prístroji 7 $\times$  vo „full scan“ režime. Celkový čas analýzy bol 12,92 min a šírky sledovaných píkov pre všetky analýzy boli v rozmedzí od 0,72 do 1,02 sek. Pre rýchlu GC šírka píku by mala byť v rozmedzí 1–3 sek podľa definície<sup>1,2</sup>. Počet zaznamenaných spektier na chromatografický pík (šírka píku pri základni) bol v rozmedzí 11–13.

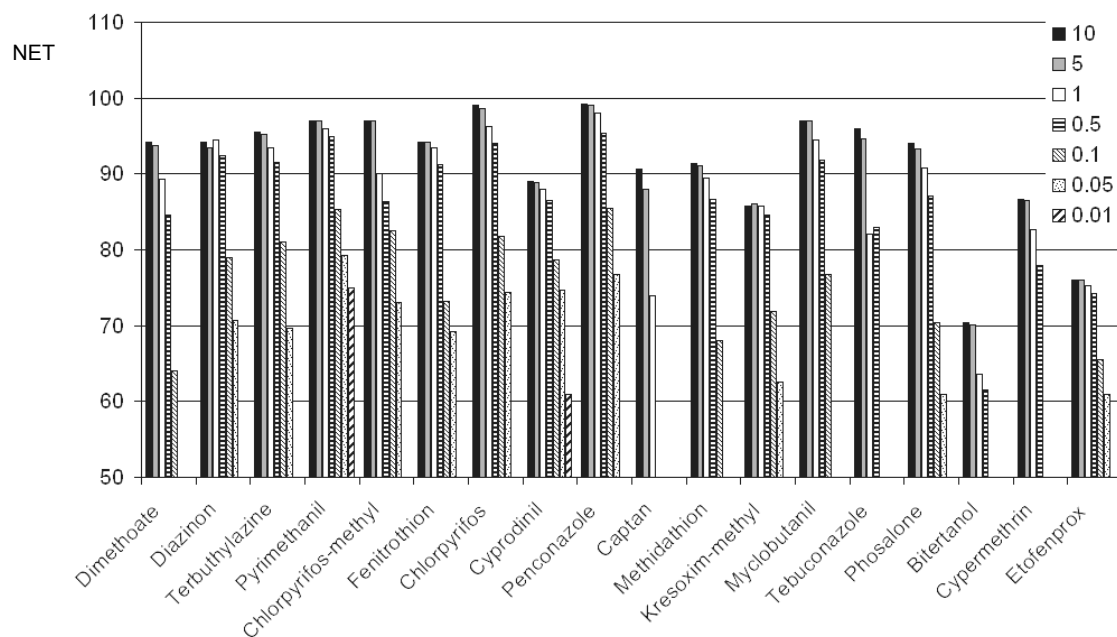
Na vyhodnotenie získaných GC-MS súborov sme použili prednastavené parametre softvéru AMDIS, všetky nastavenia vyhovovali vlastnostiam GC-MS záznamov z rýchlej GC-MS. Výsledkom z analýzy údajov v programe AMDIS je „report“ obsahujúci tabuľku identifikovaných látok spolu s niekoľkými faktormi vyjadrujúcimi podobnosť dekonvoluovaných spektier so spektrami v knižnici. V tab. II sú zhrnuté počty, vyjadrujúce koľkokrát pri každej koncentračnej hladine bola identifikácia da-

ného analytu úspešná. Pri vysokých koncentráciách 10 a 5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  bola automatická identifikácia úspešná vo všetkých prípadoch. Pri koncentrácii 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  boli všetky pesticídy úspešne identifikované, výnimkou bol tebuconazole, ktorý bol identifikovaný len 4 $\times$ , captan nebol identifikovaný pri koncentrácii 0,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  a bitertanol bol identifikovaný pri tejto koncentrácii len 2 $\times$ . Pri koncentrácii 0,1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  boli identifikované všetky zlúčeniny okrem captanu, tebuconazolu, bitertanolu a cypermethrinu; dimethoate bol identifikovaný len 3 $\times$ . Všeobecne môžeme konštatovať, že s klesajúcou koncentraciou klesá úspešnosť identifikácie rezíduí pesticídov tak, ako to vyplýva z tab. II. Pri koncentrácii 0,01 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  boli identifikované len pyrimethanil a cyprodinil 1 $\times$ .

Úspešnosť automatickej identifikácie pesticídov na určitej koncentračnej hladine závisí od bohatosti hmotnostného spektra danej látky a účinnosti ionizácie. Hmotnostné spektrum diazinonu, uvedené na obr. 1, má dostatočný počet intenzívnych iónov: 137, 152, 179, 199, 304 a preto diazinon bol úspešne identifikovaný vo všetkých koncentračných hladinách okrem 0,01 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Obr. 1 zobrazuje namerané hmotnostné spektrum bitertanolu, ktoré má jediný intenzívny ión s m/z 170, čo spôsobilo, že bol úspešne identifikovaný len v rozmedzí koncentračných hladín 10 až 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Pri koncentrácii 0,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  bol identifikovaný len 2 $\times$  a v rozmedzí koncentrácií 0,1–0,01 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  už nebol



Obr. 1. a) Hmotnostné spektrum diazinonu z knižnice NIST'02, b) hmotnostné spektrum bitertanolu; namerané za podmienok uvedených v experimentálnej časti, dávkovaná koncentrácia  $0,05 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ , dávkovaný objem  $2 \mu\text{l}$



Obr. 2. Závislosť NET faktora charakterizujúceho podobnosť dekonvoluovaných spektier pesticídov programom AMDIS s referenčnými spektrami v knižnici RTLPe2 od koncentrácie pesticídov v analyzovanom roztoku; koncentrácia pesticídov v jednotkách  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$

identifikovaný. Z toho vyplýva, že čím má daná látka menší počet intenzívnych iónov v hmotnostnom spektre, tým je horšie a ťažšie identifikovateľná.

Na obr. 2 je znázornená závislosť NET faktora vyjadrujúceho podobnosť dekonvoluovaného spektra s referenčným spektrom v knižnici RTLPe2 od koncentrácie pesticídov

v analyzovanom roztoku. Ako z grafu vyplýva, takmer všetky látky boli úspešne identifikované s NET faktorom nad 90 na koncentračných hladinách 10 a  $5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . S klesajúcou koncentraciou analytov a znižujúcou sa komplexnosťou MS spektier sledovaných látok klesá aj NET faktor podobnosti dekonvoluovaných hmotnostných spektier.

## Kalibrácia a výpočet medze detekcie

Na uskutočnenie kalibrácie sme vykonali integráciu plôch jednotlivých iónových extrahovaných chromatogramov zo záznamu celkového iónového toku (TIC) pre špecifické ióny zodpovedajúce jednotlivým pesticídum, tak ako sú uvedené v tab. I. Vypočítali sme priemernú plochu píkov pre každú koncentračnú hladinu. Opakovateľnosť meraní plôch píkov ( $n=7$ ), vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka sa zhoršovala s klesajúcou koncentráciou analyzovaných roztokov a pohybovala sa približne v rozmedzí do 4 % pre koncentrácie pesticídov do  $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . Pre nižšie koncentrácie sa RSD pohybovala až do 40 %. V tab. I sú uvedené vypočítané hodnoty koeficientu determinácie  $R^2$ , ktorý sa používa na zhodnotenie linearitu odzvy metódy. Koeficient determinácie je najvyšší pre chlorpyrifos-methyl a fenitrothion (0,9994) a najnižší pre captan (0,9888). Zo štúdia vyplýva, že odzvy je lineárna v rozsahu koncentrácií  $10\text{--}0,01 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

Pomocou postupu výpočtu medze detekcie (LOD) podľa literatúry<sup>7</sup> sme vypočítali medze detekcie, ktoré sú uvedené v tab. I. LOD je najnižšia pre chlorpyrifos-methyl  $0,20 \text{ ng}$  a najvyššia pre captan  $1,10 \text{ ng}$ . Zaujímavé je porovnanie vypočítaných medzí detekcie získaných z plôch píkov extrahovaných iónových chromatogramov a schopnosti programu AMDIS pozitívne identifikovať prítomné pesticídy na základe dekonvoluovaných spektier. AMDIS dokázal identifikovať mnohé analyty aj na koncentračnej hladine podstatne nižšej ako LOD vypočítaná metódou „Upper Limit Approach“<sup>7</sup>.

## Záver

Na posúdenie možnosti použitia rýchlej GC-MS a automatického vyhodnocovania analýz programom AMDIS sme ako modelovú vzorku zvolili roztoky štandardov vybraných pesticídov v extrakte matrice jablka s koncentraciami, ktoré zodpovedajú množstvám 4; 2; 0,4; 0,2; 0,04; 0,02; 0,004  $\text{mg kg}^{-1}$  v pôvodnej vzorke jablka. Pri vysokých koncentraciách 4 a 2  $\text{mg kg}^{-1}$  bola automatická identifikácia úspešná vo všetkých prípadoch, pri koncentrácii 0,4  $\text{mg kg}^{-1}$  bola automatická identifikácia neúspešná pre captan a bitertanol. S ďalším poklesom koncentrácií sledovaných pesticídov v analyzovaných roztokoch sa znižoval počet úspešne identifikovaných látok, ako aj podobnosť dekonvoluovaných spektier s referenčnými spektrami v knižnici vyjadrená ako NET faktor. Vypočítali sme medzu detekcie LOD, ktorá sa pohybuje v rozmedzí  $0,20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  pre chlorpyrifos po  $1,10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  pre captan. Zo získaných výsledkov vyplýva, že navrhovaná kombinácia rýchlej GC-MS a automatickej identifikácie

s programom AMDIS nie je dostatočne citlivá na identifikáciu všetkých reziduí pesticídov v rastlinných komoditách. Závisí to od požadovaných hodnôt maximálnych reziduálnych limitov (MRL), ktoré sa pre rôzne kombinácie pesticídov a komodít pohybujú v rozmedzí  $0,01\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$ . Veľmi nízke MRL ( $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sú vyžadované pre detskú výživu.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-000705.*

## LITERATÚRA

1. Kirchner M., Matisová E.: Chem. Listy 98, 396 (2004).
2. Matisová E., Dömötörövá M.: J. Chromatogr., A 1000, 199 (2003).
3. Kirchner M., Matisová E., Otrekal R., Hercegová A., de Zeeuw J.: J. Chromatogr., A 1084, 63 (2005).
4. <http://www.chem.agilent.com/Scripts/Generic.ASP?lPage=14509&indcol=N&prodcol=Y>, stiahnuté 26.4.2006.
5. <http://www.amdis.net>, stiahnuté 26.4.2006.
6. Hercegová A., Dömötörövá M., Matisová E., Kirchner M., Štefuca V.: J. Chromatogr., A 1084, 46 (2005).
7. Mocák J., Bobrowski A.: Water Sci. Technol. 1, 19 (2001).

**M. Kirchner, S. Ondreková, and E. Matisová**  
(*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia*): **Automated Mass Spectral Deconvolution for Pesticide Residues Analysis by Fast GC-MS**

The aim of this study was to estimate the lowest concentration of pesticide residues in non-fatty food matrix at which the residues can be successfully identified by automatic spectral deconvolution software AMDIS. For GC-MS measurements fast GC with narrow capillary column was utilized. For a mixture of 18 pesticides, the identification was successful at concentration levels  $4\text{--}0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  in real matrix samples (apples). With decreasing concentration, the number of identified pesticides and the quality of deconvoluted spectra decreased. The calculated limits of full-scan detection ranged from  $0.20 \text{ ng}$  for chlorpyrifos to  $1.10 \text{ ng}$  for captan. Software AMDIS with the used experimental set-up is not sufficiently sensitive for reliable identification of pesticide residues in non-fatty food matrices with low maximal residual limits (e.g. baby food  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

## VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH TECHNIK PRO ANALÝZU BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

ONDŘEJ ZÍTKA<sup>a,b\*</sup>, KAREL STEJSKAL<sup>a,b</sup>,  
ANDREA KLECKEROVÁ<sup>c</sup>, VOJTĚCH ADAM<sup>b</sup>,  
MIROSLAVA BEKLOVÁ<sup>d</sup>, ALEŠ HORNA<sup>e,f</sup>,  
VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ<sup>c</sup>, LADISLAV HAVEL<sup>c</sup>  
a RENÉ KIZEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova  
Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie  
a biochemie, a <sup>c</sup> Ústav biologie rostlin, Agronomická fa-  
kulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,  
Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>d</sup> Ústav veterinární ekologie  
a ekotoxikologie, Veterinární a farmaceutická univerzita  
v Brně, Palackého 1–3, 612 42 Brno, <sup>e</sup> Radanal s.r.o.,  
Okružní 613, 530 03 Pardubice, <sup>f</sup> Ústav potravinářského  
inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše  
Bati ve Zlíně, Nám. TGM 275, 762 72 Zlín  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 17.7.06, přijato 30.11.06.

Klíčová slova: elektrochemické techniky, kadmium,  
vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemická  
detekce, diferenční pulzní voltametrie, kukuřice, *Zea mays*

### Úvod

Díky antropogennímu působení dochází v životním prostředí k nárůstu celé řady škodlivých sloučenin, jako jsou pesticidy, ale také těžké kovy. V mnoha zemích je koncentrace těžkých kovů v životním prostředí závažným problémem v ochraně zdraví a produkci potravin<sup>1,2</sup>. Je známo, že těžké kovy jsou vzhledem ke svým vlastnostem jedny z nejnebezpečnějších látek, které se v životním prostředí vyskytují<sup>3–6</sup>. Protože je jejich přítomnost vysoce nežádoucí, byly rostliny i živočichové nuceni vyvinout řadu ochranných mechanismů pro jejich detoxikaci. Je velmi zajímavé, že byly objeveny rostlinné druhy, které jsou schopny těžké kovy akumulovat bez viditelné deprese a zpomalení růstu. Této schopnosti je právě možné využít v nových biotechnologických procesech zvaných fytoremediace<sup>1</sup>.

Je známo, že pokud jsou rostliny vystaveny účinkům těžkých kovů, zahájí rostlinné buňky syntézu thiolových

sloučenin, jako jsou glutathion a fytochelatiny (PC). Glutathion je malý tripeptid skládající se z glutaminu, cysteinu a glycinu ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycin). Je nejrozšířenějším neproteinovým thiolem vyskytujícím se prakticky ve všech buňkách rostlinných i živočišných organismů, hub a v některých prokaryotických organismech. Glutathion může v organismu existovat ve dvou stavech: redukováném (GSH) a oxidovaném (GSSG). Z glutathionu (GSH) tzv. transpeptidizační reakcí probíhá syntéza PC katalyzovaná enzymem  $\gamma$ -Glu-Cys dipeptidyl transpeptidasou (triviálně fytochelatin syntetasa, PC-syntetasa)<sup>5,6</sup>. Fytochelatiny mají základní strukturu  $(\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly<sup>5,6</sup>, kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ( $\gamma$ -Glu-Cys) může opakovat 2 až 11× (nejčastěji 2–5×)<sup>7</sup>.

Existují rozličné metody pro analýzu thiolových sloučenin<sup>8–17</sup>. Nejčastěji se využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s různými typy detektorů<sup>12–14,18</sup>. K charakterizaci thiolových sloučenin lze také využít elektrochemických metod, jako jsou diferenční pulzní voltametrie<sup>8</sup> či chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza<sup>19</sup>, kde nachází své uplatnění kromě visící rtuťové kapkové elektrody také pevné elektrody, především zlatá elektroda<sup>20</sup>, jejichž povrchy mohou být vhodně modifikovány.

V naší práci byl studován vliv kadmiových iontů na růst rostlin kukuřice. Sledovali jsme hladinu kadmia v jednotlivých částech rostliny kukuřice a navíc bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) pro simultánní stanovení devíti různých thiolových sloučenin.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Acetonitril a methanol (čistota pro HPLC) byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Standardy PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> a DesGlyPC jsme získali od firmy Clonestar Brno. Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4 °C.

#### Kultivace rostlin

Pokusnou rostlinou byla kukuřice setá (*Zea mays* L.) F1 hybrid Gila. Sedmidenní klíčící rostliny byly umístěny do opěrných novodurových nádobek a takto vysazeny do kultivačních van naplněných vodou. Kultivační vany byly umístěny v termostataném boxu (Sanyo, Japonsko), kde byly udržovány konstantní podmínky (teplota 20 °C, vlhkost 65 %, 14 h světlo). Po osmi dnech kultivace byla voda ve vanách nahrazena vodnými roztoky o různé koncentraci

\* Ondřej Zítka se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500  $\mu\text{M}$ ) ve formě  $\text{CdCl}_2$ . Expozice rostlin  $\text{Cd}$  trvala 6 dnů, přičemž po 24 h intervalech byly odebrány čtyři rostliny od každé pokusné varianty. Odebrané rostliny byly omyty třikrát v destilované vodě a jednou v roztoku 0,5 M EDTA, a následně rozděleny na část listovou a kořenovou.

#### Příprava vzorku pro stanovení thiolových sloučenin

Listy a kořeny kukuřice (průměrně 0,2 g svěží hmotnosti) byly zmrazeny kapalným dusíkem pro destrukci buněk<sup>21–23</sup>. Zmrazené části rostlin byly rozetřeny v třecí misce a poté byly do misky přidány 2 ml fosfátového pufru o pH 7,0. Vzniklý roztok byl homogenizován na třepačce Vortex–2 Genie (Scientific Industries, USA) po dobu 30 min při 4 °C. Homogenát byl centrifugován (15 000 ot  $\text{min}^{-1}$ ) 30 min při 4 °C pomocí centrifugy Universal 32 R (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo). Supernatant byl před analýzou filtrován přes membránový filtr (0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore, USA).

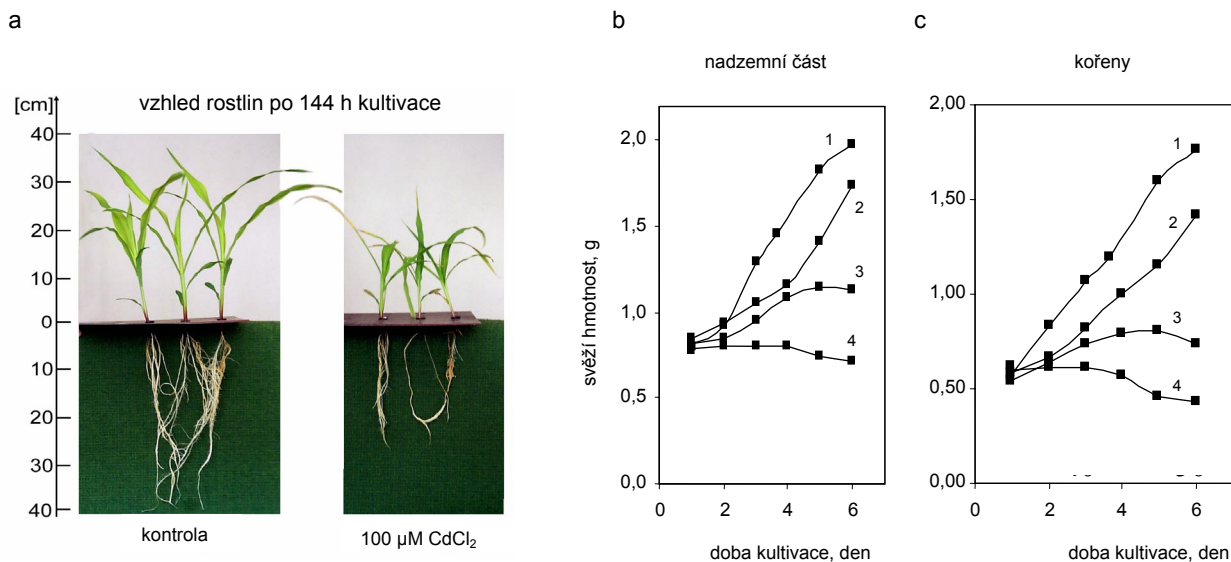
#### Elektrochemické stanovení kadmia

Elektrochemické měření bylo prováděno na přístroji AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém, který se skládal z visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) jako pracovní elektrody s plochou 0,4  $\text{mm}^2$ , argentochloridové elektrody ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ ) jako referenční elektrody a platinového drátku jako

pomocné elektrody. GPES software (EcoChemie, Nizozemí) byl použit pro zpracování hrubých dat. Acetátový pufr o pH 3,6 (0,2  $\text{mol l}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ ) byl použit jako základní elektrolyt. Vzorky kukuřičných obilok byly zbaveny kyslíku probubláváním argonem (99,999 %) po dobu 120 s. Koncentrace kadmia byla měřena pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV). Anodický sken byl započat při  $-0,7 \text{ V}$  a zastaven u  $-0,4 \text{ V}$ . Kadmium bylo vylučováno na HMDE při potenciálu  $-0,7 \text{ V}$  s dobou akumulace 120 s za laboratorní teploty. Roztok byl během vylučování míchán (1450 ot  $\text{min}^{-1}$ ). Další použité parametry metody byly: modulační čas 0,02 s, potenciálový krok 1,05 mV, rychlost skenu 10,5  $\text{mV s}^{-1}$ , modulační amplituda 49,5 mV.

#### Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, USA), chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (150  $\times$  4,6; 3  $\mu\text{m}$  velikost částic, Varian, USA) a osmikanálového elektrochemického detektoru CoulArray (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující čtyři sériově řazené cely. Každá cela obsahuje jednu pracovní uhlíkovou elektrodu, dvě referenční (hydrogenpaládiové) a dvě pomocné elektrody (uhlíkové). Chromatografická kolona a elektrochemický detektor jsou termostátovány na stejnou teplotu. Vzorek (5  $\mu\text{l}$ ) byl injektován manuálně přes dávkovací ventil (Rheodyne).



Obr. 1. a) Fotografie rostlin kukuřice (*Zea mays* L.) kultivovaných po dobu 144 h; charakteristické růstové křivky rostlin kukuřice vystavené působení 0, 150, 400 a 500  $\mu\text{M}$  koncentraci  $\text{CdCl}_2$  získané vážením svěží hmotnosti b) nadzemní části a c) kořenů; rostliny byly kultivovány za podmínek aerohydroponie po dobu 144 h, při teplotě 20 °C, 65 % vzdušné vlhkosti a světelném režimu: 14 h světlo a 10 h tma; 1 – 0  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 2 – 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 3 – 400  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 4 – 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$

## Výsledky a diskuse

Elektrochemické metody se v posledních letech dostávají do popředí zájmů různých vědních i průmyslových odvětví pro jejich rychlost, velmi dobrou citlivost, reprodukovatelnost, nízké provozní náklady a především možnost miniaturizace. Jak je ukázáno v řadě prací, jsou vhodné pro stanovení širokého spektra biologicky významných látek<sup>19,24–27</sup> včetně iontů kovů<sup>10,21,28–31</sup>. Lze je tedy využít nejen pro určení aktuální koncentrace studované látky, ale také pro sledování jejich změn v závislosti na čase a druhu sledovaného organismu či složky životního prostředí.

### Morfologické změny

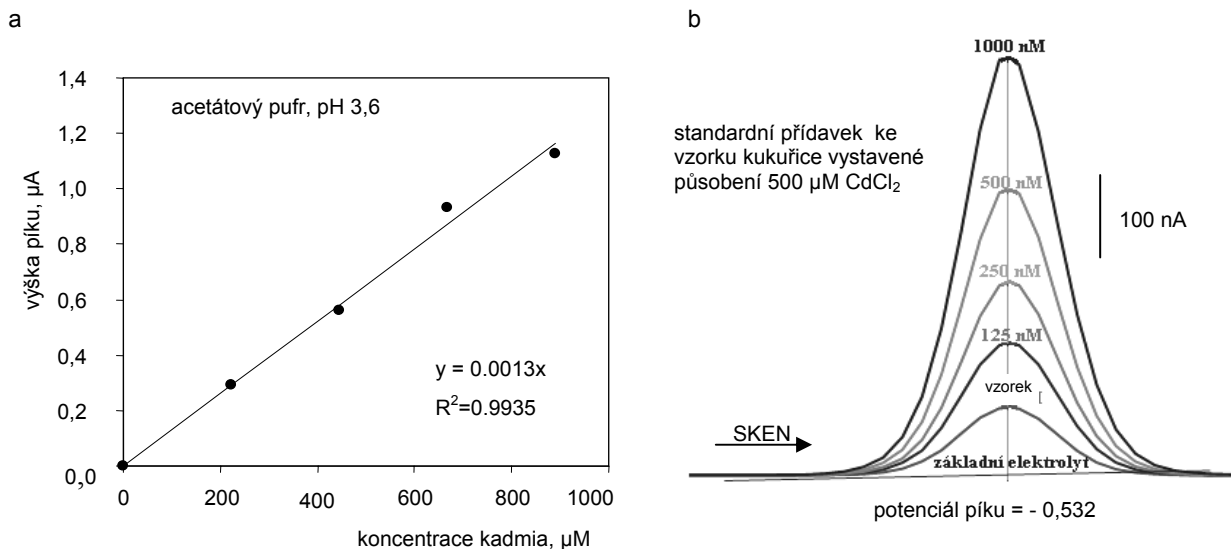
Kademnaté ionty jsou pro většinu organismů velmi toxické a z toho důvodu jsou využívány jako model toxicity<sup>13,32</sup>. Rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) byly vystaveny působení 0, 50, 150, 200, 300, 400 a 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  po dobu šesti dnů. U všech aplikovaných koncentrací kademnatých iontů jsme pozorovali růstovou depresi ve srovnání s kontrolou, přičemž výrazný toxický vliv kadmia na rostliny byl velmi zřejmý u nejvyšších aplikovaných dávek kadmia, kde se kromě růstové deprese objevovala poléhavost a chloróza (obr. 1).

### Analýza kademnatých iontů v různých částech kukuřice

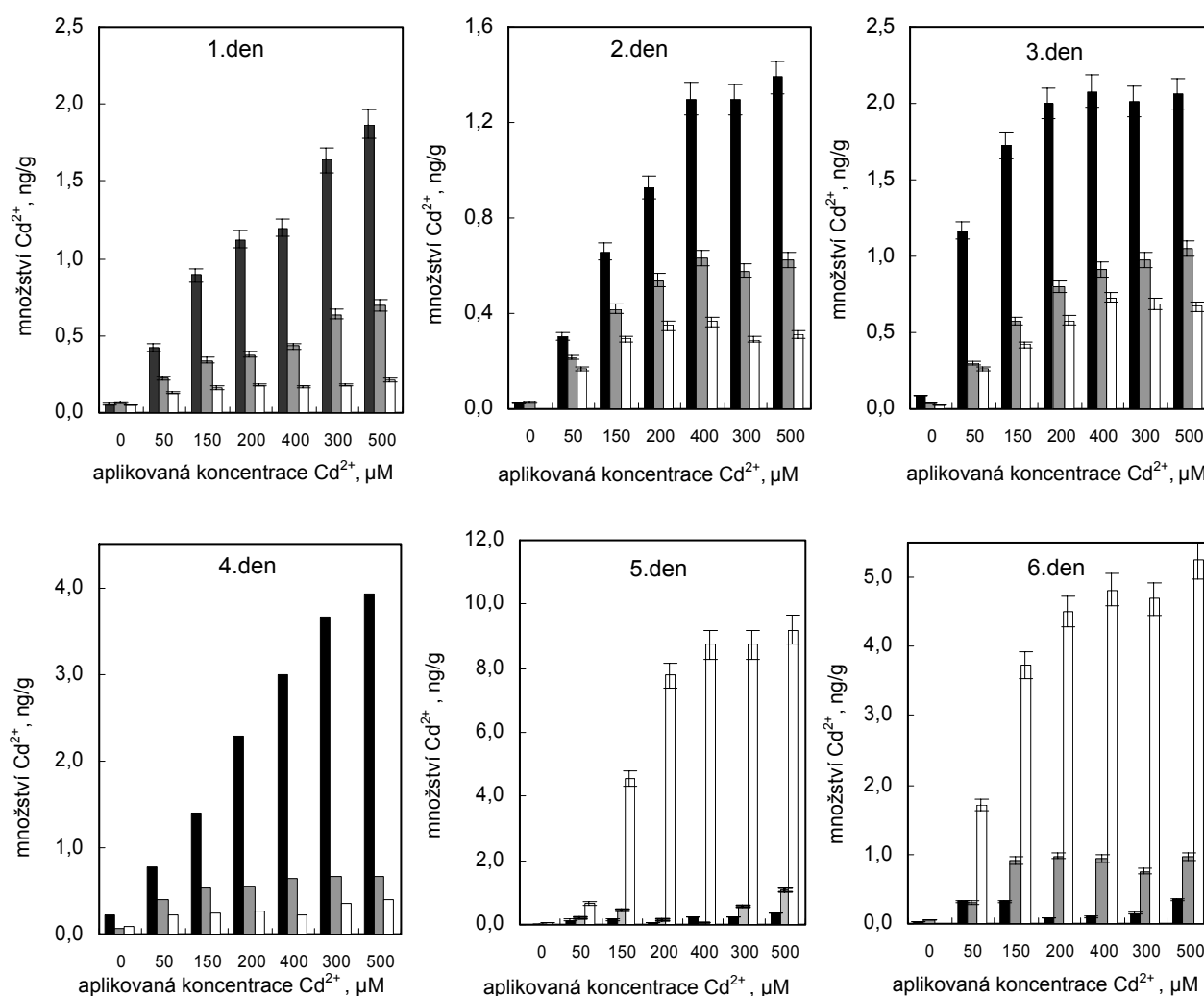
Pro zjištění obsahu kademnatých iontů v různých

částech kukuřice bylo využito diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV) v 0,2 M acetátovém pufru (pH 3,6). Kadmium bylo akumulováno na rtuťové kapkové elektrodě (tvorba sloučeniny kadmia se rtuťí) při potenciálu  $-0,7$  V po dobu 120 s. Poté byla vzniklá sloučenina kadmia a rtuť rozpouštěna. Signál studovaného kadmia byl pozorován při potenciálu  $-0,53$  V. Za výše uvedených podmínek bylo postupně k základnímu elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 3,6) přidáváno zvyšující se množství  $\text{CdCl}_2$ . Pozorované voltametrické signály lineárně vzrůstaly s rostoucí koncentrací kadmia ( $y = 0,0013x$ ;  $R^2 = 0,9935$ ) (obr. 2). Ze získaných experimentálních dat bylo možné určit limit detekce kademnatých iontů (určený jako 3 S/N) 335 fM s chybou stanovení 1,5 %. Elektroanalytická metoda byla použita pro analýzu volných kademnatých iontů v biologickém vzorku (extrakty z kořenů a listů kukuřice). Na DPAS voltamogramech reálných vzorků byl pozorován velmi dobře vyvinutý, DPASV symetrický signál kadmia při potenciálu  $-0,53$  V (obr. 2). Zjistili jsme, že rostliny kukuřice přijaly kořeny průměrně 6  $\text{pg g}^{-1}$  kadmia za hodinu (u dávky kadmia 50  $\mu\text{M}$ ) a 23  $\text{pg g}^{-1}$  kadmia za hodinu (u dávky 500  $\mu\text{M}$ ). Obsah kadmia v rostlinách velmi rychle stoupá do aplikované dávky 200  $\mu\text{M}$ , pak již jeho obsah stoupá méně strmě (obr. 3). Nejvyšší obsahy kadmia byly pozorovány v kořenech od  $0,5 \pm 0,1 \text{ ng g}^{-1}$  (na počátku experimentu) až do  $4 \pm 0,3 \text{ ng g}^{-1}$  (ve čtvrtém dni). Obsahy kadmia v listové části rostlin byly do čtvrtého dne velmi nízké a pohybovaly se do  $1 \pm 0,2 \text{ ng g}^{-1}$ .

Jak je známo, kořeny jsou místem prvního kontaktu rostliny s okolním prostředím, ve kterém je přítomno mno-



Obr. 2. a) Kalibrační závislost proudové odpovědi na koncentraci kademnatých iontů detegovaných v prostředí 0,2 M acetátového pufru (pH 3,6); anodický sken byl započat při  $-0,7$  V a ukončen při  $-0,4$  V. Kadmium bylo vylučováno na HMDE při potenciálu  $-0,7$  V s dobou akumulace 120 s za laboratorní teploty. Roztok byl během vylučování míchán ( $1450 \text{ ot. min}^{-1}$ ). Další použité parametry metody byly: modulační čas 0,02 s, potenciálový krok 1,05 mV, rychlost skenu  $10,5 \text{ mV. s}^{-1}$ , modulační amplituda 49,5 mV; b) Voltamogramy kademnatých iontů o různé koncentraci, které byly přidány do vzorku získaného z kukuřice vystavené působení 500  $\mu\text{M}$  koncentraci  $\text{CdCl}_2$ ; elektrochemická analýza probíhala v prostředí 0,2 M acetátového pufru (pH 3,6)



Obr. 3. Množství detegovaného kadmia u kukuřice vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů; byly analyzovány mladší a starší listy a kořeny. Podrobnosti analýzy jsou uvedeny na obr. 2; ■ kořeny, ■ mladší listy, □ starší listy

ho látek, např. volné ionty. Rostliny byly proto nuceny k vytvoření velmi důmyslných aktivních mechanismů příjmu, aby v takovém prostředí byly schopny existence. Pravděpodobně díky těmto ochranným mechanismům byl obsah kadmia právě v kořenech nejvyšší, přičemž k transportu těžkého kovu dále rostlinou docházelo pouze minimálně. Kadmium je nejvíce imobilizováno v buňkách rhizodermis. V pátém dni experimentu byl pozorován velmi výrazný pokles obsahu kadmia v kořenech kukuřice, přičemž v šestém dnu došlo pouze k minimálnímu zpětnému nárůstu (obr. 3). Oproti tomu velmi prudce stoupal obsah kadmia ve starších listech v pátém a šestém dni. Nárůst obsahu kadmia ve starších listech může souviset s transportem kadmia do částí rostlin, kde je toxický kov více imobilizován. Šestý den obsah kadmia mírně klesal,

což může být způsobeno selháním obranných mechanismů, které souvisí s vážným poškozením rostlin vedoucím k jejich smrti. Zjistili jsme, že v pátém dni experimentu byl pozorován výrazný nárůst obsahu oxidovaného glutathionu, což právě souvisí s nárůstem obsahu kadmia v rostlinách a vzestupem množství kyslíkových radikálů. V ostatních částech rostlin byly obsahy kadmia velmi nízké. Pozorovaný jev pravděpodobně souvisí s porušením ochranných mechanismů v kořenech rostlin. Zatím není zcela zřejmé, proč nedochází k výraznému nárůstu obsahu kadmia v mladších listech (vyšší metabolická aktivita, intenzivnější transpirační tok), ale pouze v listech starších. U mladších listů byla pozorována výrazná variabilita v obsahu kadmia, avšak jeho obsah v listech s aplikovanou dávkou kademnatých iontů roste. Nejvyšší obsah kadem-



natých iontů byl pozorován ve třetím dni experimentu. V šestém dni experimentu obsah kadmnatých iontů mírně vzrůstal, což podporuje hypotézu o porušení ochranných mechanismů u rostliny.

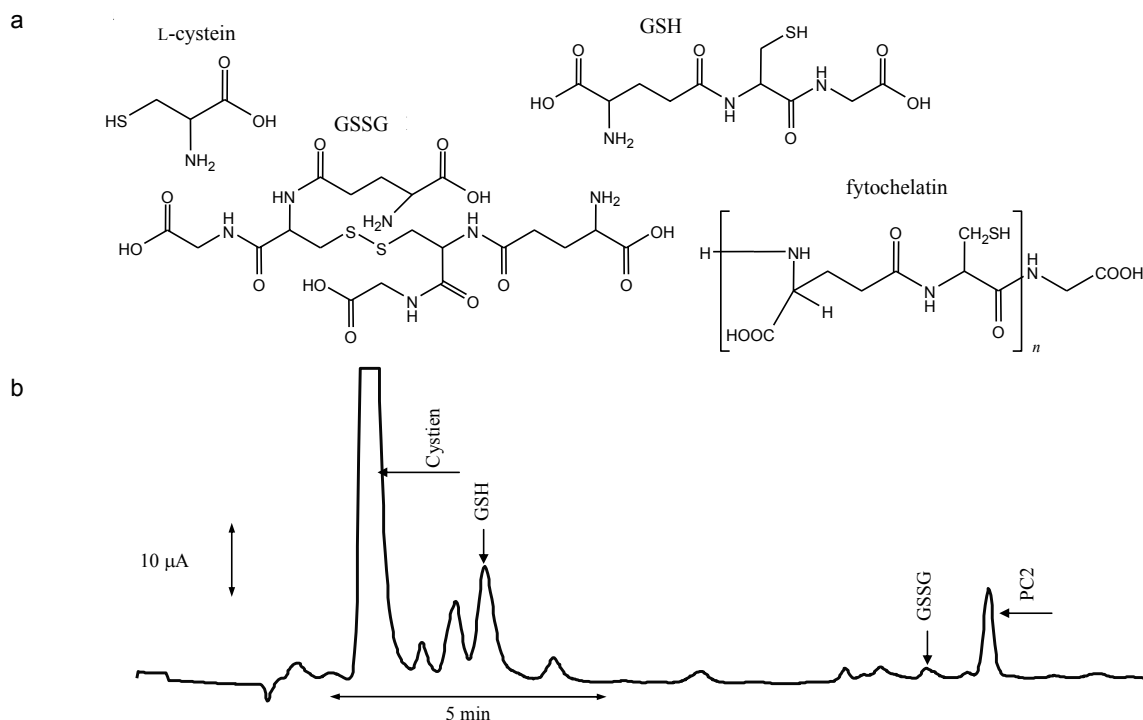
#### Změny obsahu detegovaných thiolů v rostlinách kukuřice

Pomocí námi nedávno publikované metodiky jsme studovali obsah thiolových sloučenin v různých částech kukuřice vystavené působení různých koncentrací kadmnatých iontů<sup>14,15</sup>. V této práci jsme se zaměřili na studium cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu a fytochelatinu 2 (obr. 4). Pro analýzu jsme využili vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Na obr. 4b je chromatografický záznam analýzy rostlinného extraktu z kořenů kukuřice vystavené působení 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Na chromatogramu jsou velmi dobře rozlišitelné a odečitatelné píky všech studovaných thiolů. Na základě řady analýz jsme zjistili, že obsah cysteinu u všech rostlin se vzrůstající koncentrací kadmnatých iontů a dobou expozice vzrůstá přibližně o 500–800 % (v porovnání s kontrolou). Šestý den experimentu byl pozorován mírný pokles obsahu cysteinu, což může souviset s intenzivním zapojením této látky do metabolismu rostliny právě

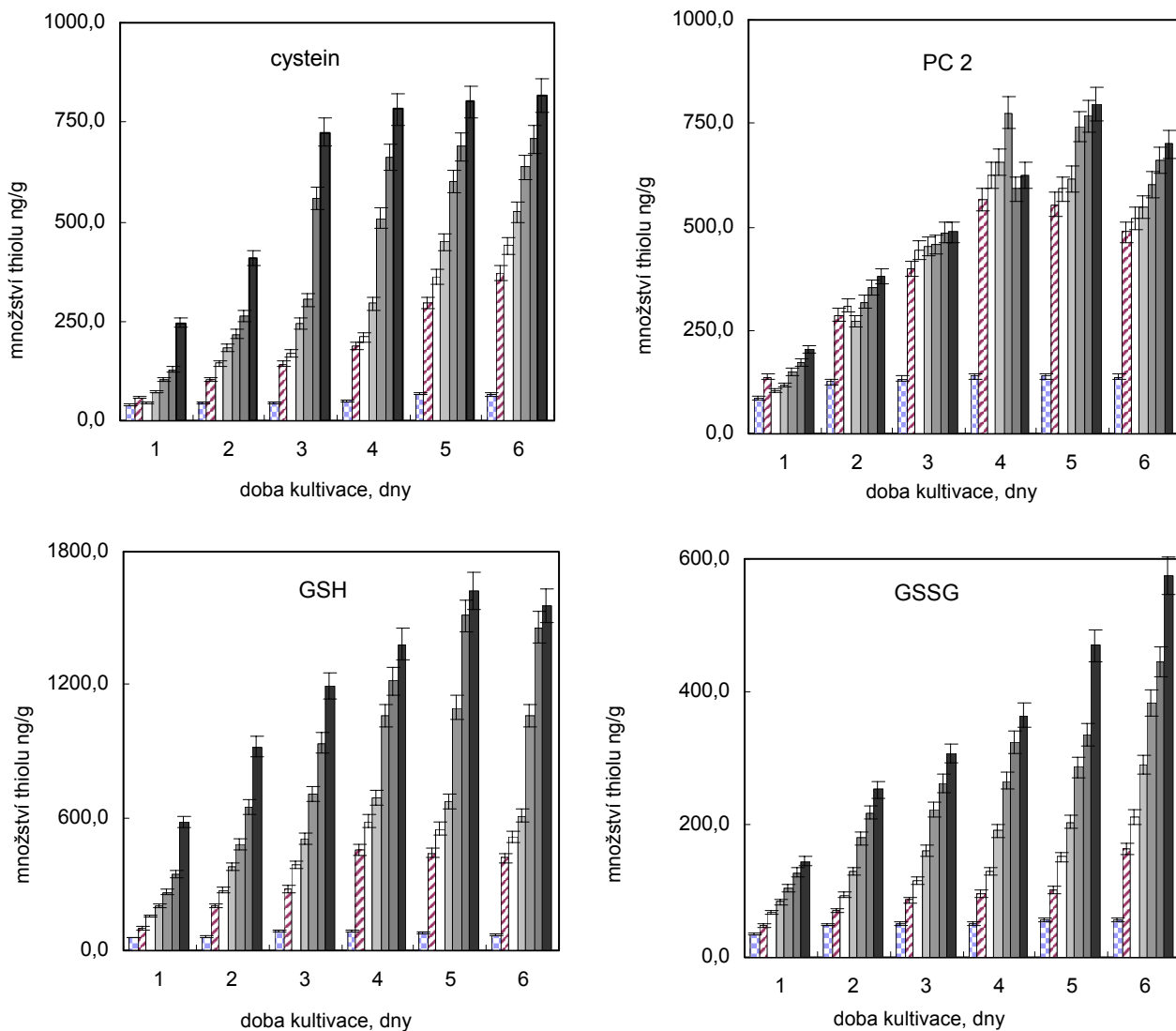
v detoxikačním procesu. Obsah GSH a  $\text{PC}_2$  po celou dobu experimentu velmi rychle vzrůstal. Již první den experimentu byl při nejvyšší aplikované koncentraci pozorovaný nárůst obsahu thiolů o více než 200 % (v porovnání s kontrolou). Po následující dva dny expozice se obsah GSH a  $\text{PC}_2$  zvyšoval přibližně o 30–60 % v závislosti na aplikované dávce kadmia vyjma kontrolních rostlin. Od třetího dne experimentu byly tyto změny pozvolnější (nárůst obsahu o 10–30 %). Pozorovaný jev pravděpodobně souvisí s výraznou toxicitou kadmia, která byla ve třetím dni experimentu velmi dobře patrná jak na růstové křivce, tak na morfologii rostlin. Obsah GSSG v rostlinách s rostoucí aplikovanou dávkou kadmia a dobou expozice také rostl. V šestém dni experimentu byl jeho obsah o 100 až 600 % vyšší v porovnání s kontrolou. Takový nárůst obsahu GSSG ukazuje na porušení glutathionového cyklu a silný oxidační stres exponovaných rostlin (obr. 5).

#### Závěr

Vzrůstající množství polutantů různého druhu a původu v životním prostředí vede organismy k aktivaci detoxikačních mechanismů. Studium způsobu adaptace na jednotlivé druhy znečištění je velmi důležitým úkolem mo-



Obr. 4. a) Chemická struktura L-cysteinu, redukovaného glutathionu (GSH), oxidovaného glutathionu (GSSG) a fytochelatinu. b) Chromatogram současného stanovení několika thiolů ve vzorku kořenů kukuřice exponovaných 150  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  po 144 h kultivace



Obr. 5. Změna celkové hladiny cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu a phytochelatinu u kukuřice vystavené  $\square$  0,  $\square$  50,  $\square$  100,  $\square$  150,  $\square$  200,  $\blacksquare$  400 a  $\blacksquare$  500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> v průběhu šestidenního experimentu; podrobnosti jsou na obr. 1 a 4

derní analytické chemie, biochemie a molekulární biologie. Jak je ukázáno, elektrochemické stanovení v průtokovém systému umožňuje citlivé, rychlé a automatizované měření řady thiolů, které jsou rostlinami aktivně syntetizovány proti působení těžkých kovů. Kadmium také ovlivňuje růst rostlin kukuřice. Vstup kadmia do rostlin kukuřice je ovlivněn řadou ochranných mechanismů.

Práce na tomto příspěvku byla financována díky projektům: GAČR 522/07/0692, MSMT 6215712402 a Výzkumného centra 1 M06030.

#### LITERATURA

1. Zehnálek J., Vacek J., Kizek R.: Lis. Cukrov. Reparske 120, 220 (2004).
2. Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: Lis. Cukrov. Reparske 120, 222 (2004).
3. Meister A.: J. Biol. Chem. 263, 17205 (1988).
4. Cobbett C. S.: Curr. Opin. Plant Biol. 3, 211 (2000).
5. Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6838 (1989).
6. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Science 320, 674 (1985).

7. Cobbett C. S., Goldsbrough P. B.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159 (2002).
8. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
9. Vodičková H., Pacakova V., Šestáková I., Máder P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
10. Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: *Bioelectrochemistry* 63, 347 (2004).
11. Fojta M., Fojtova M., Havran L., Pivonkova H., Dorcak V., Sestakova I.: *Anal. Chim. Acta* 558, 171 (2006).
12. Camera E., Rinaldi M., Briganti S., Picardo M., Fanali S.: *J. Chrom., B* 757, 69 (2001).
13. Klejdus B., Zehnalek J., Adam V., Petrek J., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Rozik R., Havel L., Kuban V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 117 (2004).
14. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
15. Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejdus B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: *J. Chrom., A* 1084, 134 (2005).
16. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).
17. Vitecek J., Petrlova J., Petrek J., Adam V., Potesil D., Havel J., Mikelova R., Trnkova L., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5087 (2006).
18. Camera E., Picardo M.: *J. Chrom., B* 781, 181 (2002).
19. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
20. Zhang W., Wan F. L., Zhu W., Xu H. H., Ye X. Y., Cheng R. Y., Jin L. T.: *J. Chrom., B* 818, 227 (2005).
21. Petrek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 576 (2005).
22. Viteček J., Adam V., Petřek J., Babula P., Novotná P., Kizek R., Havel L.: *Chem. Listy* 99, 496 (2005).
23. Babula P., Mikelová R., Adam V., Potěšil D., Zehnálek J., Kizek R., Havel L., Sladký Z.: *Chem. Listy* 100, 271 (2006).
24. Kizek R., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 119 (2002).
25. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejdus B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1167 (2005).
26. Billova S., Kizek R., Jelen F., Novotna P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 362 (2003).
27. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
28. Kudravá M., Růriková D.: *Chem. Listy* 99, 731 (2005).
29. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 1003 (2003).
30. Davis A. C., Wu P., Zhang X. F., Hou X. D., Jones B. T.: *Appl. Spectrosc. Rev.* 41, 35 (2006).
31. Mader P., Musil J., Čurdová E., Korečková J., Cibulka J.: *Chem. Listy* 81, 1190 (1987).
32. Fojtova M., Kovarik A.: *Plant Cell Environ.* 23, 531 (2000).

**O. Zítka<sup>ab</sup>, K. Stejskal<sup>ab</sup>, A. Kleckerová<sup>b</sup>, V. Adam<sup>b</sup>, M. Beklová<sup>d</sup>, A. Horna<sup>e</sup>, V. Šupálková<sup>c</sup>, L. Havel<sup>c</sup>, and R. Kizek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, <sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, and <sup>c</sup>Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, <sup>d</sup>Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, <sup>e</sup>Radanal Ltd., Pardubice, <sup>f</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Technology, Zlín): **Utilizing Electrochemical Techniques for Detection of Biological Samples**

Heavy metals rank among the most toxic compounds occurring in the environment; they are also dangerous due to bioaccumulation. Plants and animals have developed a number of protective mechanisms. The detoxification mechanisms of heavy metals in different organisms have been intensively studied for many years. We aimed at investigation of detoxification mechanisms of maize plants treated with 0, 50, 100, 150, 200, 400 and 500 µM Cd(II) solutions for six days. In particular, we observed their growth and determined the Cd content (by differential pulse anodic stripping voltammetry) and thiol concentration (by HPLC) in the treated plants. Maize plants took up 6 pg of Cd per gram per hour at the lowest dose and 23 pg Cd per g per hour at the highest Cd dose. The relations of glutathione and phytochelatin contents, applied Cd dose, cultivation time, growth curve and plant morphology were investigated.

## VALIDÁCIA METÓDY STANOVENIA KADMIA METÓDOU ETA-AAS

SOŇA FÁNDLYOVÁ<sup>a</sup>, ONDREJ HEGEDŮS<sup>a,b</sup>  
a ALŽBETA HEGEDŮSOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, <sup>b</sup> Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nitre, Štefánikova 58, 949 63 Nitra, Slovenská republika  
ahegedusova@ukf.sk, labodbor@zoznam.sk

Došlo 14.6.06, prijaté 30.11.06.

Kľúčové slová: stanovenie kadmia, ETA-AAS, validácia

### Úvod

Akreditácia skúšobných laboratórií znamená preukázať zhodu s požiadavkami európskej normy EN ISO/IEC 17025:2005, ktorá bola v priebehu roka 2005 vydaná v Slovenskej republike vo forme národnej normy s identickým obsahom. Táto norma stanovuje všeobecné požiadavky na spôsobilosť vykonávať skúšky alebo kalibrácie vrátane vzorkovania. Popisuje požiadavky na skúšanie a kalibrácie, ktoré sa vykonávajú použitím normalizovaných metód, nenormalizovaných metód a metód vyvinutých laboratóriom. V technických požiadavkách normy sú popísané požiadavky na skúšobné a kalibračné metódy a validáciu metód. Podľa normy STN EN ISO/IEC 17025:2005 (cit.<sup>1</sup>) validácia je potvrdenie preskúmaním a podaním objektívnych dôkazov, že požiadavky, ktoré sa kladú na uvažované špecifické použitie, sú splnené, a musí byť taká rozsiahla, koľko treba na splnenie požiadaviek daného použitia alebo oblasti používania. Citovaná norma striktné neurčuje rozsah a formu validácie, túto úlohu necháva na laboratória, ktoré metódy navrhujú, vyvíjajú, modifikujú, resp. používajú vo svojich špecifických podmienkach. Validácia má byť taká rozsiahla, aby výsledky skúšania validovanými metódami zodpovedali potrebám zákazníkov. Odporúčajú sa rôzne techniky alebo ich kombinácia:

- kalibrácia použitím referenčných etalónov alebo referenčných materiálov,
- porovnanie s výsledkami dosiahnutými inými metódami,
- medzilaboratórne porovnanie,
- systematické posúdenie faktorov ovplyvňujúcich vý-

sledok,

- posúdenie neistoty výsledkov založené na vedeckej znalosti teoretických základov metódy a na praktických skúsenostiach.

Validácia metódy v praxi znamená aj to, že výsledky analýz, získané počas validácie, sa musia podrobiť štatistickej analýze. Na hodnotenie nameraných dát v skúšobných laboratóriách už v súčasnej dobe existuje bohatá ponuka profesionálnych počítačových programov. Pre skúšobného užívateľa tieto komerčné programy dávajú širokú možnosť štatistického hodnotenia výsledkov. Pre skúšobné laboratória je často výhodné mať metódy, vytvorené pre konkrétne potreby laboratória, ktoré môžu využívať bez špeciálneho vzdelania v oblasti štatistiky.

Cieľom predloženej práce bolo stanoviť vybrané validačné charakteristiky analytickej metódy stanovenia kadmia metódou AAS v rastlinnom materiáli pomocou štatistickej metódy vytvorenej vo vlastných laboratóriách v programe Excel.

### Experimentálna časť

#### Použitie prístroje a zariadenia

- Na stanovenie kadmia sa použil atómový absorpčný spektrofotometer SpectrAA–200 fy. Varian, Austrália. Merania sa uskutočnili využitím techniky elektrotermickej atomizácie s deutériovou kompenzáciou pozhadia s modulom GTA-100,
- mineralizačný autokláv ZA-1.

#### Chemikálie a reagenty

- kyselina dusičná, suprapur, Merck
- peroxid vodíka p.a. Merck s certifikátom
- použitý štandard na zostrojenie kalibračnej závislosti: Cadmium standard solution, koncentrácia 0,0015 mg l<sup>-1</sup>, dodávateľ Merck. Pracovné roztoky sa pripravili riešením základného roztoku v 1% (v/v) roztoku HNO<sub>3</sub>,
- použitý referenčný materiál na overenie správnosti metódy: Standard Reference Material N 1570a, Trace Elements in Spinach Leaves, NIST USA, dodávateľ Chemmea s.r.o. Bratislava, obsah Se je 2,89 ± 1,0 mg kg<sup>-1</sup>
- deionizovaná voda

#### Podmienky merania

Pri použití elektrotermickej atomizácie sa na meranie použila katódová kadmiová výbojka, prúd na lampe 10 mA, vlnová dĺžka 228,8 nm, šírka štrbiny 1,0 nm,

\* Soňa Fándlyová sa s touto prácou úspešne zúčastnila súťaže o cenu firmy Merck 2006 za najlepšiu študentskú vedeckú prácu v odbore analytická chémia.

s deutériovou kompenzáciou pozadia. Dávkovaný objem vzorky 10  $\mu\text{l}$ . Použitý modifikátor: 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v dávkovanom objeme 10  $\mu\text{l}$ . Pre vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda kalibračnej krivky.

### Validácia metódy

Validácia sa uskutočnila štatistickou analýzou nameraných dát pre nasledovné parametre<sup>2</sup>: presnosť metódy – ako opakovateľnosť, vyjadrenú relatívnou smerodajnou odchýlkou; správnosť metódy – analýzou matricových referenčných materiálov (RM). Ako RM sa použil: Standard Reference Material N 1570a, Trace Elements in Spinach Leaves, USA; linearita metódy v oblasti očakávaných koncentrácií z kalibračnej závislosti podľa rovnomernosti nárastu relatívnej odozvy prístroja k príslušným koncentráciám; limitné hodnoty analytickej metódy – medza dôkazu (LOD), medza stanoviteľnosti (LOQ) zo zistenej kalibračnej závislosti  $y = 77,1 \cdot x - 0,012$  metódou ULA (cit.<sup>3</sup>); neistota analytickej metódy, vyjadrená ako rozšírená kombinovaná neistota pomocou počítačového programu Metro2003, verzia: 3.02 (cit.<sup>4</sup>). Na pracovisku autorov boli vytvorené také výpočtové tabuľky v programe Excel, ktoré umožnia jednoznačné hodnotenie nameraných dát podľa konkrétnych požiadaviek laboratória na validáciu metódy<sup>5</sup>. Výpočtové tabuľky umožňujú výpočet a hodnotenie nameraných dát so slovným hodnotením plnenia požiadavky na jednotlivé validačné charakteristiky tak, aby dali jednoznačnú odpoveď užívateľovi o ďalšej nutnej činnosti. Postup jednotlivých krokov výpočtu sledovaných validačných charakteristík je popísaný v publikovanej literatúre autorov článku<sup>6</sup>.

### Analýzovaný materiál

Na analýzy sa použili vzorky sušenej mrkvy. Vzorky mrkvy sa odoberali z výskumných políčok Výskumného ústavu zeleninárskeho v Nových Zámkoch, vo fáze zberu po aplikácii remediačnej techniky pomocou rôznych adsorbentov.

### Spracovanie vzoriek

Vzorky konzumnej časti mrkvy po očistení sa zhomogenizovali a použili na mineralizáciu, resp. na prípravu sušiny.

Sušina sa pripravila sušením čerstvých homogenizovaných vzoriek v sušiarňi pri teplote 105 °C.

Mineralizácia vzoriek: 1 g návažku sušiny mrkvy po homogenizácii v tretej porcelánovej miske sa priamo navažovala do mineralizačných autoklávov typu ZA-1. K naváženým vzorkám sušiny sa pridal na zvlhčenie 1 ml deionizovanej vody. Ku vzorkám sa pridal 5 ml konc.  $\text{HNO}_3$  a 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vzorky sa uzavreli do kovových plášťov mineralizačných autoklávov a mineralizovali sa v horkovzdušných sterilizátoroch v trvaní 120 min pri teplote 140 °C.

Úprava mineralizátov pre ETA-AAS: Po vychladnutí

mineralizačných autoklávov sa mineralizáty kvantitatívne preniesli do 25 ml odmerných baniek a doplnili deionizovanou vodou po rysku.

### Výsledky a diskusia

Rôzne zeleninové druhy predstavujú maticu, ktorú nie je možné priamo bez úpravy vzorky analyzovať a ktorá tzv. maticovým efektom významne môže ovplyvniť priebeh analýzy. Nakoľko sa jedná o stanovenie nízkych koncentrácií sledovanej látky, bolo treba použiť metódu s vysokou citlivosťou.

Moderné prístroje AAS sú vybavené technikou lineárnej kalibrácie s počiatkom v bode 0, ako aj s nenulovým úsekom, pričom sa pracuje v „normálnom kalibračnom móde“ s kalibráciou vo vodných roztokoch. Predpokladom použitia tejto techniky je, že metóda musí mať požadovanú výťažnosť a vplyv matrice na výsledok merania musí byť malý<sup>7</sup>.

Porovnaním kalibračných závislostí vodných roztokov a mineralizátov so štandardným prídavkom kadmia sa zistilo, že metóda ETA-AAS dávala len o málo odlišnú smernicu závislosti, čo poukazuje na malý vplyv matrice na výťažnosť stanovenia vzoriek zelenín.

Možnosť stanovenia reálnych koncentrácií Cd v analyzovaných vzorkách sa sledovala porovnaním výsledkov meraní slepých vzoriek s výsledkami meraní reálnych vzoriek. Merania sa vykonali sériami analýz slepých vzoriek a vzoriek mrkvy celým analytickým postupom vrátane mineralizácie technikou ETA-AAS. Absorbancia merania slepých vzoriek na AAS sa porovnávala s hodnotami absorbancie vzoriek mrkvy (tab. I). Z výsledkov meraní vyplýva jednoznačná a po analýze série

Tabuľka I

Porovnanie absorbancie merania slepých vzoriek a vzoriek mrkvy

Vzorka	Absorbancia	
	slepé vzorky	mrkva
1	0,0005	0,0020
2	0,0006	0,0021
3	0,0005	0,0023
4	0,0008	0,0022
5	0,0009	0,0021
6	0,0004	0,0019
7	0,0008	0,0020
8	0,0007	0,0021
9	0,0008	0,0021
10	0,0009	0,0021
11	0,0006	0,0023
12	0,0005	0,0020
Smerodajná odchýlka	0,00017	0,00011

Tabuľka II  
Hodnotenie opakovateľnosti metódy stanovenia Cd v modelových vodných roztokoch

Poradové číslo merania	Meraná hodnota [mg l <sup>-1</sup> ]
1	0,2213
2	0,2310
3	0,2180
4	0,2223
5	0,2438
6	0,2298
7	0,2480
8	0,2448
9	0,2446
10	0,2338

Parameter	Hodnota
Aritmetický priemer, mg l <sup>-1</sup>	$\bar{x}$ 0,234
Smerodajná odchýlka, mg l <sup>-1</sup>	$s$ 0,011
Výberový variačný koeficient, %	$s_R = 100 \cdot s / \bar{x}$ 4,73

Tabuľka III  
Hodnotenie správnosti metódy stanovenia Cd v referenčnom materiáli

Poradové číslo merania	Referenčná hodnota [mg kg <sup>-1</sup> ]	Stanovená hodnota [mg l <sup>-1</sup> ]	Výťažnosť [%]
1		2,90	100,3
2	2,89	2,70	93,4
3		3,01	104,2

Parameter	Hodnota
Aritmetický priemer, mg l <sup>-1</sup>	$\bar{x}$ 99,31
Smerodajná odchýlka, mg l <sup>-1</sup>	$s$ 0,157
Výberový variačný koeficient, %	$s_R = 100 \cdot s / \bar{x}$ 5,48

vzoriek bezpečná rozlíšiteľnosť absorpcie slepých vzoriek od absorpcie vzoriek mrkvy. Znamená to, že metóda môže byť úspešne použitá aj na stanovenie nízkych koncentrácií Cd v mrkve.

Validita metódy sa overila analýzou reálnych vzoriek.

Analýzou série vzoriek v podmienkach opakovateľnosti sa vypočítala opakovateľnosť metódy. Vypočítaný výberový variačný koeficient merania je 4,73 % (tab. II), čo je nižšia hodnota ako kladená požiadavka. Analýzou

referenčného materiálu sa dokázalo, že sledovaná metóda pracuje s veľmi dobrou výťažnosťou, pričom relatívny rozptyl výsledkov okolo správnej hodnoty je malý (tab. III).

Kadmium ako kontaminant, je prítomné v bežných vzorkách rastlinného materiálu v relatívne malom množstve, čo predurčuje na jeho stanovenie použiť metódu, ktorou je možné jeho nízke koncentrácie bezpečne stanoviť. Ako vyplýva z výsledkov analýzy v tab. IV, medza stanovenia je 0,27 µg l<sup>-1</sup>, kým medza dôkazu je 0,090 µg l<sup>-1</sup>, čo v prepočte na návažok vzorky v množstve 1 g pre medzu stanovenia je 6,8 µg kg<sup>-1</sup>, pre medzu dôkazu 2,3 µg kg<sup>-1</sup>. Tieto hodnoty dávajú istotu, že hodnoty kadmia, ktoré sa vyskytujú v stanovovaných vzorkách, sa môžu bezpečne stanovovať.

Tabuľka IV  
Výpočet detekčných limitov stanovenia z kalibračnej závislosti

<i>Hodnotenie posunu kalibračného vzťahu v kalibračnej závislosti<sup>a</sup></i>	
$m$ , l mg <sup>-1</sup>	77,01
$b$	-0,012
$H_0: b = 0$	$H_1: b \neq 0$
$t_{\text{vyp}}$	5,5
$t_{\text{krit}}$	2,1

*Výpočet medze dôkazu a medze stanovenia z kalibračnej závislosti<sup>a</sup>*

$k_{D(n-2; 0,05)}$	2,15
$s_y$	0,0035
$b_{\text{max}}^b$	0,021
LOD, µg l <sup>-1</sup>	0,090
LOQ, µg l <sup>-1</sup>	0,27

<sup>a</sup> Absorbancia =  $f(c)$ , pričom  $c$  je koncentrácia [mg l<sup>-1</sup>], podľa hodnotenia kalibračnej závislosti platí kalibračný model:  $y = m \cdot x + b$ ; <sup>b</sup> najväčší dovolený posun regresnej priamky

Tabuľka V  
Výpočet kombinovanej neistoty metódy

Parameter	Hodnota
Stanovovaná veličina	Cd
Stanovená hodnota, µg kg <sup>-1</sup>	16,0
Kombinovaná štandardná neistota, µg kg <sup>-1</sup>	2,1
Rozšírená štandardná neistota, µg kg <sup>-1</sup>	± 4,7
Expanzný koeficient	2,26
Pravdepodobnosť	95%
Počet stupňov voľnosti	9

Tabuľka VI  
Hodnotenie sledovaných validačných charakteristík metódy

Validačné charakteristiky	Hodnota		
	požiadavka	namerané	plnenie
Medza detekcie, $\mu\text{g l}^{-1}$	LOD < 0,1	0,090	splnená
Medza stanovenia, $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ < 0,30	0,27	splnená
Horná hranica rozsahu merania, $\mu\text{g l}^{-1}$	min. 1000	1300	splnená
Opakovateľnosť metódy, %	$s_R < 10,0$	4,7	splnená
Kalibračný graf :			
– linearita, %	$\Delta_{A \text{ rel}}^a \pm 20,0$	11,7–17,3	splnená
– spoľahlivosť regresie, %	$s_{y \text{ rel}}^b < 10,00$	2,9	splnená
Správnosť metódy, %	$100 \pm 10,0$	101,7	splnená
Kombinovaná štandardná neistota, %	$u_c < 30,0$	29,3	splnená

<sup>a</sup> Maximálna dovolená odchýlka od priemernej relatívnej odozvy; <sup>b</sup> relatívna reziduálna smerodajná odchýlka

Táto skutočnosť sa dokázala aj porovnaním absorbcí sledovaných slepých vzoriek a vzoriek mineralizátov mrkvy, ktoré sú uvedené v tab. I.

Výpočet kombinovanej štandardnej neistoty metódy vyžaduje odhaliť všetky zdroje neistoty počas celého analytického procesu. Použitý výpočtový program na základe výpočtového vzorca stanovovaného analytu zostrojil Ishikawov diagram, pomocou ktorého sú jednotlivé neistoty priradované k výsledku stanovenia. Výsledkom výpočtu je kombinovaná štandardná neistota, ktorú uvádza tab. V.

Všetky vypočítané a jednotlivo hodnotené validačné charakteristiky sa premietli do súhrnnej tabuľky v programe Excel, v ktorej sa na základe výsledkov hodnotenia jednotlivých validačných charakteristík hodnotila validácia ako celok<sup>5</sup>. Z dosiahnutých výsledkov validácie (tab. VI) vyplýva, že metódu možno úspešne používať na analýzu sledovaných vzoriek.

## Záver

Výpočtom sledované validačné charakteristiky stanovenia kadmia metódou ETA-AAS, počítané vo výpočtových tabuľkách v programe Excel dokazujú, že metóda sa vyznačuje s požadovanou hodnotou opakovateľnosti a správnosti, linearita merania je zabezpečená v celom rozsahu kalibrácie. Po vypočítaní detekčných limitov metódy je zrejme, že obsah kadmia, ktorý sa vyskytuje v stanovovaných vzorkách rastlinného pôvodu, sa môže bezpečne stanovovať. Vypočítaná kombinovaná neistota merania v sledovanom koncentračnom rozsahu zodpovedá požiadavkám kladeným na metódu.

## LITERATÚRA

1. STN EN ISO/IEC 17025:2005: *Všeobecné požiadavky na spôsobilosť skúšobných a kalibračných laboratórií*. SÚTN Bratislava 2005.
2. STN ISO 3534-1: *Štatistika. Slovník a značky – Časť 1: Pravdepodobnosť a všeobecné štatistické termíny* (júl 1999).
3. Mocák J.: *Lab. Diagnostika* 3, 43 (1998).
4. Baričič P., Mackov M.: *Metro2003 (Verzia: 2.30). Laboratórny softvér pre Windows*. Chemmea s.r.o., Bratislava 2003.
5. Hegedús O.: *Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva, Donovaly, 2 – 3. október 2002*, Zborník abstraktov (OCHA, ŠZÚ Banská Bystrica), str. 14.
6. Hegedús O., Hegedúsová A., Gašparik J., Ivičičová A.: *Chem. Listy* 99, 518 (2005).
7. Borošová D.: *Konferencia Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva. Donovaly, 2. – 3. októbra 2002*, Zborník, str.37. Štátny zdravotný ústav v Banskej Bystrici, Banská Bystrica 2002.

**S. Fándlyová<sup>a</sup>, O. Hegedús<sup>a,b</sup>, and A. Hegedúsová<sup>a</sup>**  
(<sup>a</sup> Department of Chemistry, Constantine the Philosopher University in Nitra, <sup>b</sup> Regional Authority of Public Health, Nitra, Slovak Republic): **Validation of ETA-AAS Method of Cadmium Determination**

An ETA (electrothermal atomization)-AAS method of Cd determination in plants was validated by determining its accuracy (under repeatability conditions), trueness, calibration curve and linearity, limit of detection, limit of determination and combined standard uncertainty. The results showed that the method is suitable for the determination of low cadmium contents in vegetables.

## ANALÝZA FOSFOLIPIDOVÝCH BIOMARKERŮ PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ

STANISLAV OPLUŠTIL<sup>a\*</sup>, DAVID CHRASTINA<sup>a</sup>, MARTIN RULÍK<sup>b</sup>, PETR BARTÁK<sup>a</sup>, PETR BEDNÁŘ<sup>a</sup> a LUBOMÍR ČÁP<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup> Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
s.oplustil@post.cz

Došlo 16.6.06, přepracováno 8.1.07, přijato 22.1.07.

Klíčová slova: fosfolipidy, lipidy, etherové lipidy, biomarkery, plynová chromatografie

### Úvod

Biologické membrány jsou předmětem velkého zájmu badatelů, jelikož jsou s nimi úzce spjaté mnohé životně důležité procesy, jako je transport látek, transformace energie, regulace metabolismu, koordinace biologických procesů či buněčná diferenciací.

Během evoluce se každý živý systém vyvíjel a přizpůsoboval změnám a existenci v novém prostředí. U buněčných membrán docházelo během tohoto procesu nejen k velkým strukturním změnám, ale i k významným změnám jejich funkce.

Viditelné znaky přizpůsobení se organismu nehostinným a často extrémním podmínkám prostředí je možné pozorovat u archaebakterií (Archaea). Extrémní teploty a hodnoty pH, vysoké koncentrace solí nebo striktně anaerobní prostředí byly nesporně důvodem k tomu, že tyto organismy jsou vybavené nezbytnými komponentami a jedinečnými biologickými procesy. Jedním z nejdůležitějších biochemických rysů archaebakterií je kromě jiného také unikátní lipidové složení a z toho odvozená specifická struktura membrány, což také slouží jako hlavní chemotaxonomický znak této skupiny mikroorganismů.

Studium archaebakteriálních membrán otvírá nové a doposud nevyřešené problémy membranologie. Můžeme předpokládat, že zavedení metod molekulární biologie, které zatím u Archaea nejsou příliš aplikovány, přinese

mnohé významné objevy z teoretického, ale i praktického hlediska.

Sedimenty rybníčního a říčního dna jsou významným místem, kde se často kumulují po různě dlouhou dobu organické látky a kde můžeme očekávat přítomnost řady mikroorganismů včetně zástupců říše Archaea.

Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) je jednou z nejmodernějších biochemických metod, kterou lze využít k popisu a charakterizaci mikrobiálních společenstev. Mastné kyseliny poskytují informace jednak o všeobecné struktuře aktivních mikrobiálních společenstev a jednak také o biomase určitých skupin mikroorganismů<sup>1,2</sup>.

Fosfolipidy nejsou zásobními látkami, v živých buňkách je jejich množství přibližně konstantní; po smrti buňky se velice rychle odbourávají. Z toho důvodu dobře určují velikost biomasy živých buněk. Analýza celkové biomasy je relativně jednoduchá a je založena na izolaci fosfolipidové frakce a kolorimetrickém stanovení fosforu<sup>3</sup> nebo na stanovení nespecifických mastných kyselin (kyselina palmitová)<sup>4</sup>.

Některé mastné kyseliny jsou naopak velmi specifické pro určitou skupinu organismů, pro určitý rod nebo dokonce druh. Doposud je známa celá řada různých specifických biomarkerů a jejich počet neustále stoupá v souvislosti s pokračujícím mikrobiologickým výzkumem. Například větvené a cyklické mastné kyseliny se vyskytují převážně v bakteriích a výskyt těchto mastných kyselin bývá spojován s bakteriální aktivitou<sup>5</sup>. Nenasycené cyklické mastné kyseliny by mohly být potenciálními biomarkery bakterií rodu *Clostridium* včetně mezofilních, termofilních a psychrofilních bakterií<sup>6</sup>.

Archaebakterie se liší od ostatních bakterií obsahem unikátní skupiny tzv. etherových lipidů, ve kterých jsou uhlovodíkové řetězce spojeny s glycerolem etherovou vazbou místo esterové<sup>7</sup>. Hlavní lipidy jsou diethery či tetraethery, které jsou velmi odolné k degradaci. Jejich přítomnost v biomembránách snižuje jejich prostupnost pro ionty a protony a umožňuje přežívání archaebakterií v extrémních podmínkách. Polární etherové lipidy tvoří 80–95 % membránových lipidů archaebakterií. Zbývajících 5–20 % tvoří převážně neutrální skvaleny (C<sub>30</sub>) a jiné isoprenoidy<sup>8</sup>.

Dietherové lipidy archaebakterií jsou schopné vytvářet běžnou lipidovou dvojvrstvu díky interakcím proti sobě orientovaných fytanylových řetězců. Délka fytanylového řetězce je shodná s délkou řetězce mastných kyselin u běžných lipidů bakterií a eukaryot a tak je i celá dvojvrstva podobná běžné fosfolipidové membráně.

Cílem této práce je ověření praktické využitelnosti analýzy lipidových markerů (esterové i etherově vázaných) při charakterizaci reálných vzorků sedimentů a biologických kalů.

\* Stanislav Opluštil se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



## Experimentální část

### Přístroje a chemikálie

Měření byla prováděna na plynovém chromatografu HP 6890 s hmotnostním spektrometrem 5973 N MSD (Agilent, Palo Alto, USA). Byla použita nepolární kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s teplotním programem 50 °C – 1 min – 10 °C min<sup>-1</sup> – 150 °C – 5 °C min<sup>-1</sup> – 300 °C – 19 min a heliem jako nosným plynem s průtokem 0,9 ml min<sup>-1</sup> (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie). Rozpouštědla (methanol, hexan, chloroform) a běžné chemikálie (hydroxid draselný, kyselina octová) byly čistoty p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR). Jako standard etherového lipidu byl použit dipalmitylglycerolether (*O,O'*-dihexadecylglycerol) (Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko).

### Analýza esterových lipidů

Běžný postup analýzy fosfolipidových mastných kyselin zahrnuje extrakci lipidů organickými rozpouštědly, frakcionaci a izolaci fosfolipidů chromatografií na silikagelu, transesterifikaci mastných kyselin a analýzu methylesterů plynovou chromatografií<sup>9</sup>.

37 g vlhkého sedimentu (obsah vody do 35 %), 30 ml fosfátového pufru (0,05 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,4), 37,5 ml chloroformu a 75 ml methanolu bylo sonifikováno 20 min v ultrazvukové lázni. Kapalná fáze byla oddělena centrifugací a přenesena do dělicí nálevky. Po přidavku 37,5 ml chloroformu a 37,5 ml redestilované vody byl vzorek protřepáván 20 min a ponechán přes noc.

Spodní organická fáze byla oddělena, zfiltrována přes fritu a odpařena do sucha při teplotě nepřesahující 37 °C. Extrakt byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a přenesen na silikagelové kolonky (Bond Elute-SI, 500 mg, 3 ml) předem promyté 5 ml směsí methanol / chloroform (4:1). Neutrální lipidy a glykolipidy byly postupně vymyty 5 ml chloroformu a 5 ml acetonu. Nakonec byly eluovány fosfolipidy 5 ml methanolu a roztok byl odpařen do sucha. Fosfolipidová frakce byla rozpuštěna v 1 ml směsí toluen / methanol (1:1) a 1 ml methanolického roztoku hydroxidu draselného (0,2 mol l<sup>-1</sup>) a inkubována 15 min při 37 °C. Vzorek byl zneutralizován 0,2 ml kyseliny octové (1 mol l<sup>-1</sup>), byly přidány 2 ml směsí hexan / chloroform (4:1) a 2 ml destilované vody. Vzorek byl protřepán a organická fáze (horní) byla oddělena. Vodná fáze byla dvakrát extrahována 2 ml směsí hexan / chloroform (4:1). Spojený extrakt byl odpařen na objem 1 ml a analyzován plynovou chromatografií.

Pro označení mastných kyselin byly použity obvyklé zkratky ve formátu: <počet atomů uhlíku> : <počet dvojných vazeb> ω <poloha první násobné vazby od methylového konce řetězce>. Tak například palmitolejová kyselina obsahující 16 uhlíkových atomů a jednu dvojnou vazbu na sedmém uhlíkovém atomu (od CH<sub>3</sub> konce) je označena 16:1ω7. Pro rozvětvené iso- (methylskupina na druhém

uhlíku od CH<sub>3</sub> konce řetězce) a anteiso- (methylskupina na třetím uhlíku od CH<sub>3</sub> konce řetězce) kyseliny a pro cyklické kyseliny odvozené od cyklopropanu bylo použito označení i-, a-, a cy-. Označení 10Me- znamená methylskupinu na desátém atomu uhlíku od karboxylového konce řetězce.

### Analýza etherových lipidů

Pro analýzu etherových lipidů byl použit stejný extrakční postup. Směs lipidů (bez frakcionace na silikagelu) byla hydrolyzována 20 ml roztoku hydroxidu draselného (1 g KOH, 4 ml H<sub>2</sub>O, 16 ml methanolu) v ultrazvukové lázni (5 min při 25 °C) a ponechána 3 h při 60 °C. Po ochlazení byly etherové lipidy extrahovány třikrát 5 ml směsí hexan / chloroform (4:1) a odpařeny do sucha. Volná hydroxyskupina etherových lipidů byla silylována 250 μl bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) 12 h při 60 °C, vzorek byl odpařen v proudu dusíku do sucha, rozpuštěn v 1 ml hexanu a analyzován plynovou chromatografií<sup>10</sup>.

## Výsledky a diskuse

Pro analýzu esterově vázaných mastných kyselin byly fosfolipidy izolované ze vzorků sedimentů transesterifikovány na odpovídající methylestery mastných kyselin a analyzovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Jednotlivé methylestery byly identifikovány na základě elučnic (retenční časy) a spektrálních (hmotnostní spektra) dat.

Relativní zastoupení (v %) jednotlivých fosfolipidových mastných kyselin ve vybraných typech sedimentů je uvedeno v tabulce I. Všechny uvedené vzorky jsou charakteristické výrazným zastoupením nasycené kyseliny palmitové (16:0) a nenasycených kyselin palmitolejové (16:1ω7) a olejové (18:1ω9). Tyto kyseliny bývají označovány jako tzv. nespecifické a mohou sloužit jako nespecifické markery biologické kontaminace, např. při hodnocení biofilmu usazeného na vnitřní stěně vodovodního potrubí<sup>11</sup>. Isomery kyseliny palmitolejové, označené 16:1ω6 a 16:1ω8, jsou považovány za biomarkery methanotrofních bakterií. Jejich významnější zastoupení v „anaerobnějším“ říčním sedimentu odebraném ve stojaté vodě nad jezem odpovídá předpokládané produkci metanu v rezervoáru. Kyselina linolová (18:2ω6) bývá uváděna jako typický biomarker hub. Její vysoký obsah v aktivovaném kalu z čistírny odpadních vod dobře odpovídá předpokládané přítomnosti mikroskopických hub, které jsou běžnou součástí vloček aktivovaného kalu. Vzorek písku z vodárenského filtru je charakteristický mnohem jednodušším profilem mastných kyselin. Tento fakt je v dobrém souladu s předpokládanou nepatrnou bakteriální kontaminací surové podzemní vody. Odhady počtu mikrobiálních buněk ve vzorku písku z vodárenského filtru (~10<sup>6</sup> buněk/g sušiny při použití konverzního faktoru 0,5 fmol fosfolipidu na buňku) jsou o jeden až dva řády nižší než odpovídající počty buněk

Tabulka I

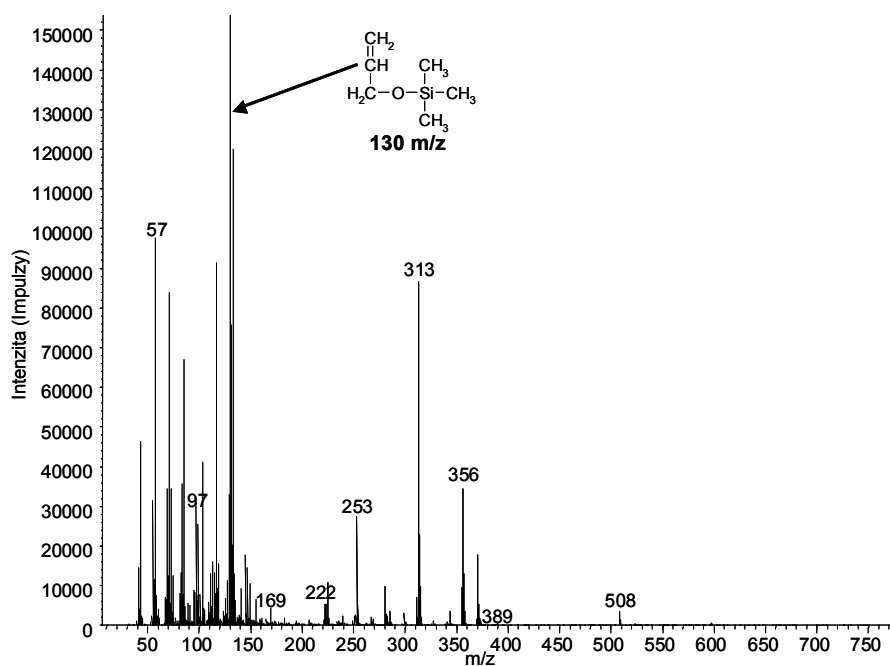
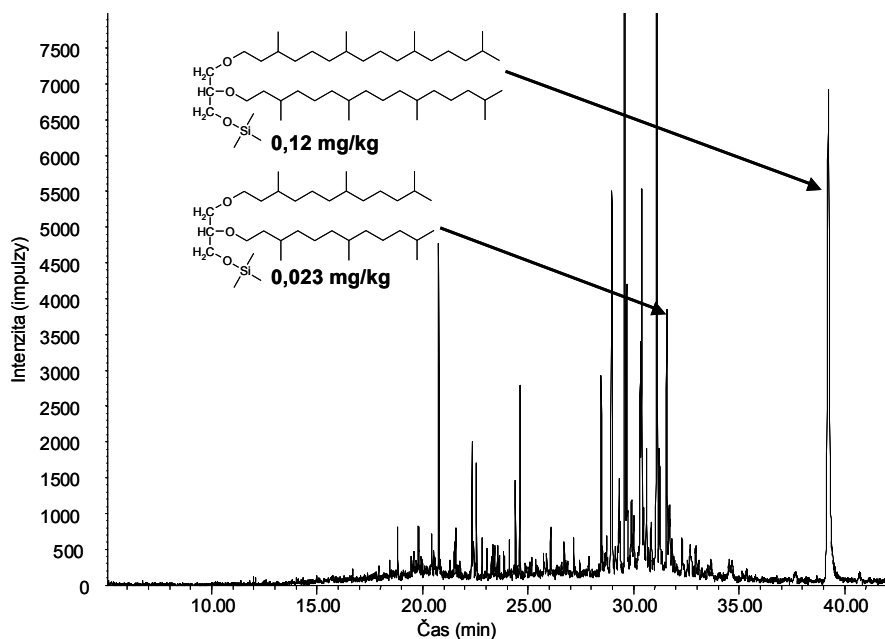
Relativní zastoupení (v %) esterově vázaných fosfolipidových mastných kyselin ve vybraných vzorcích (zkrácená nomenklatura mastných kyselin je vysvětlena v experimentální části)

Mastné kyseliny	Říční sediment (anaerobní)	Říční sediment (aerobní)	Aktivovaný kal	Vodárenský písek
<i>Nasyčené</i>				
12:0	1,2	0,5	7,5	5,7
14:0	1,6	2,3	5,6	4,6
15:0	0,7	1,4	3,3	–
16:0	12,5	22,2	13,4	35,5
18:0	1,9	–	2,9	–
20:0	1,0	0,2	3,3	–
21:0	0,7	0,1	–	–
22:0	1,7	0,2	0,07	–
23:0	0,6	0,1	~0,01	–
24:0	1,5	0,2	~0,01	–
26:0	0,7	0,1	–	–
28:0	0,6	–	0,01	–
30:0	0,2	–	–	–
<i>Nenasycené</i>				
16:1 $\omega$ 6	4,6	2,5	3,5	–
16:1 $\omega$ 7	33,3	11,4	22,0	35,5
16:1 $\omega$ 8	1,4	0,5	–	–
18:1 $\omega$ 7	10,9	9,7	14,0	6,2
18:1 $\omega$ 9	3,9	9,8	11,5	–
18:2 $\omega$ 6	2,6	2,7	4,2	–
20:1	0,3	0,1	0,01	–
20:4	0,3	0,8	0,1	–
20:5	0,1	1,7	~0,01	–
22:6	–	0,3	–	–
<i>Větvené a cyklické</i>				
i14:0	1,0	2,0	–	–
i15:0	3,7	6,0	2,4	12,5
a15:0	4,8	12,0	6,2	–
i16:0	1,4	1,7	–	–
10Me16:0	3,0	5,6	–	–
i17:0	0,5	1,6	–	–
cy17:0	2,4	2,6	–	–
cy19:0	0,8	1,7	–	–

nalezených v říčních sedimentech ( $\sim 10^8$  buněk/g sušiny).

Pro analýzu etherových fosfolipidů se nejlépe osvědčil postup založený na extrakci lipidů stejnou extrakční směsí jako u běžných esterových lipidů a následné hydrolyze esterově vázaných mastných kyselin. Běžné, esterově vázané lipidy jsou tak převedeny na polární nízkomoleku-

lární produkty a nehydrolyzovatelné etherově vázané lipidy pak mohou být extrahovány směsí hexan – chloroform. Volnou hydroxyskupinu (po hydrolyze fosfátu) je vhodné silylovat bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA) a vzniklé trimethylsilylery analyzovat GC-MS. Jako srovnávací látka pro analýzu etherových lipidů byl použit

Obr. 1. Hmotnostní spektrum  $O,O'$ -dihexadecylglyceroluObr. 2. Ionový chromatogram vzorku vyhnílého kalu ( $m/z$  130)

dipalmitylglycerolether ( $O,O'$ -dihexadecylglycerol) v jehož hmotnostním spektru (obr. 1) byl pozorován jako nejintenzivnější ion o  $m/z$  130 odpovídající pravděpodobně zbytku molekuly po odštěpení obou alkoxykupin

( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). Tento fragment je společný všem  $O,O'$ -dialkylglycerolům a selektivní monitorování iontu o  $m/z$  130 tak dovoluje citlivou a specifickou detekci dietherových fosfolipidů.

Na obr. 2 je uveden iontový chromatogram vyhnílého kalu z čističky odpadních vod rekonstruovaný pro ion  $m/z$  130. Ve vzorku se podařilo nalézt dva etherové lipidy, které byly identifikovány na základě hmotnostních spekter jako  $O,O'$ -bis(3,7,11-trimethyldodecyl)glycerol ( $t_{R1} = 31,55$  min) a  $O,O'$ -bis(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol ( $t_{R2} = 39,23$  min).

## Závěr

Většina dosud známých lipidových biomarkerů mikroorganismů byla navržena na základě analýzy čistých kultur získaných kultivačním způsobem (*in vitro*). V této práci byly studovány praktické možnosti využití popsaných lipidových biomarkerů při charakterizaci reálných vzorků sedimentů a vyhnílého kalu (bez kultivace). Dosažené výsledky naznačují, že dosud navržené biomarkery dovolují přibližnou kvantifikaci mikrobiální biomasy v sedimentech a hrubou charakterizaci společenstva např. ve smyslu převládajícího způsobu získávání energie. Jelikož se počet známých specifických biomarkerů neustále zvětšuje (např. 10Me18:0 pro aktinomycety), lze předpokládat, že řada z nich se dobře osvědčí i při charakterizaci mikrobiálních společenstev v reálných ekosystémech. Nadějnou skupinou jsou nehydrolyzovatelné etherové lipidy specifické pro mikroorganismy říše Archaea, jejichž výzkum konvenčními metodami je komplikován mimo jiné i značnými experimentálními těžkostmi při jejich kultivaci. Studium biochemické, genetické a molekulárně-biologické podstaty Archaeabakterií přitom má klíčový význam nejen pro porozumění evoluční biologii, ale například i pro biotechnologické využití těchto výjimečných (extremofilních) organismů.

*Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu (projekt MSM 6198959216) a Ing. M. Urbánkové z Čistírny odpadních vod Olomouc za pomoc při odběru vzorků z vyhnívacích nádrží.*

## LITERATURA

1. Rulík M, Lamačová J., Barták P., Rolčík J.: *Význam a využití metody analýzy fosfolipidových mastných kysel*

*lin pro charakteristiku a kvantifikaci mikrobiálních společenstev*. V: Sborník referátů přednesených na semináři Mikrobiologie vody 2002 (Baudišová D., ed.), str. 55. Ostravice 2002.

2. Kaneda T.: *Microbiol. Rev.* 55, 288 (1991).
3. Vestal J. R., White D. C.: *Bioscience* 39, 535 (1989).
4. Findlay R. H., Dobbs F. C., v knize: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (Kemp P. F., Sherr B. F., Sherr E. B., Cole J. C., ed.), str. 271–284. Lewis Publishers, Boca Raton 1993.
5. Gehron M. J., Davis J. D., Smith G. A., White D. C.: *J. Microbiol. Methods* 2, 165 (1984).
6. DeRosa M., Gambacorta A., Gliozzi A.: *Microbiol. Rev.* 50, 70 (1986).
7. Chan M., Himes R. H., Akagi J. M.: *J. Bacteriol.* 106, 876 (1971).
8. Kates M.: *The Biochemistry of Archaea*. kap 9. Elsevier Science Publisher, Ottawa 1993.
9. Tunlid A., Ringelberg D., Phelps T. J., Low C., White D. C.: *J. Microbiol. Methods* 10, 139 (1989).
10. Nichols P. D., Mooney B. D., Elliott N. G.: *J. Chromatogr., A* 936, 183 (2001).
11. Herb S., Stair J. O., Ringelberg D. B., White D. C., Flemming H. C.: *Water Sci. Technol.* 32, 141 (1995).

**S. Opluštil<sup>a</sup>, D. Chrastina<sup>a</sup>, M. Rulík<sup>b</sup>, P. Barták<sup>a</sup>, P. Bednář<sup>a</sup>, and L. Čáp<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup>Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc): **Analysis of Phospholipids Biomarkers by Gas Chromatography**

Most known lipid biomarkers were found by analysis of pure bacterial cultures *in vitro*. The practical impact of a biomarker including possible interferences should be tested in extensive research of target strains in real ecosystems. Phospholipid fatty acids identified in river sediments, activated sludge and waterworks sand filters correspond with those proposed previously as biomarkers typical of expected microorganisms. Two ether lipids regarded as specific biomarkers of the Archaea kingdom were identified in digested sludge from a sewage water plant.

## VYUŽITÍ IONTOVÝCH KAPALIN PRO SEPARACI LÁTEK V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII

MICHAL ZAPADLO<sup>a\*</sup>, EVA BENICKÁ<sup>b</sup>, JANKA MYDLOVÁ<sup>b</sup>, KATEŘINA VÍTKOVÁ<sup>a</sup> a JÁN KRUPČÍK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc, Česká republika, <sup>b</sup> Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika  
mikzap@seznam.cz

Došlo 26.6.06, přepracováno 8.1.07, přijato 22.1.07.

Klíčová slova: plynová chromatografie, stacionární fáze, Kovatsovy retenční indexy, iontové kapaliny

### Úvod

Jako iontové kapaliny označujeme sloučeniny s obecným složením organický kation a organický nebo anorganický anion a teplotou tání nižší než 100 °C (cit.<sup>1</sup>). Ve druhé polovině 20. století byly syntetizovány iontové kapaliny s bodem tání nižším než je laboratorní teplota<sup>2</sup>. Pro odlišení se začalo používat označení RTIL (room temperature ionic liquid).

Fyzikálně-chemické vlastnosti iontových kapalin úzce souvisí se strukturou obou iontů. Podmínkou nízké teploty tání splňují soli s objemnými ionty, delokalizovaným nábojem a nízkým stupněm symetrie kationtu. Do této skupiny patří sloučeniny obsahující kvartérní atom dusíku, jako jsou pyridiniové, imidazoliové a amoniové soli, dále také fosfoniové a sulfoniové soli. Jako nekoordinující anionty se nejčastěji používají tetrachlorohlinitany, hexafluorofosfáty, tetrafluoroboráty, ale i nitrát, acétát, trifluoroacetát, bis(trifluoromethansulfonyl)amidát a další<sup>3</sup>.

Od 60. let 20. století se iontové kapaliny dostaly do povědomí téměř všech chemických i ekologických oborů pro své velmi zajímavé fyzikálně-chemické vlastnosti. Velký zájem projevují pracovníci zabývající se tzv. zelenou chemií<sup>3,4</sup>. Iontové kapaliny totiž umožňují snižování emisí těkavých organických sloučenin (VOC) a s tím spojené omezování spotřeby klasických rozpouštědel.

RTIL jsou fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobné taveninám kovových solí a v roztoku se chovají jako ionty<sup>1</sup>.

Teplotní rozsah použitelnosti těchto kapalin je od jejich teploty tání až po teplotu rozkladu, tedy v rozmezí do 250 až 350 °C. Jejich viskozita sice značně kolísá v závislosti na teplotě, ale přesto tenze par v celém teplotním rozsahu použitelnosti zůstává velmi nízká, až téměř zanedbatelná<sup>5</sup>.

Fyzikálně-chemické vlastnosti iontových kapalin, jako jsou povrchové napětí, teplota tání, viskozita, hustota a tepelná stabilita, jsou závislé na struktuře kationtu i aniontu<sup>6</sup>. Délka alkylového řetězce a další substituenty na skeletu cyklu ovlivňují dipólové,  $\pi$ - $\pi$  a  $n$ - $\pi$  interakce mezi iontovou kapalinou a dalšími molekulami či ionty. Proto s prodlužující se délkou alkylového řetězce klesá rozpustnost iontových kapalin v polárních a středně polárních rozpouštědlech<sup>7</sup>.

Výměnou aniontu v iontové kapalině je možné zcela změnit její fyzikálně-chemické vlastnosti a to zejména rozpustnost. Příkladem může být iontová kapalina EMIM-BF<sub>4</sub> (1-ethyl-3-methylimidazolium-tetrafluoroborát), která je ve vodě dobře rozpustná. Pouhou výměnou aniontu BF<sub>4</sub><sup>-</sup> za PF<sub>6</sub><sup>-</sup> se tato iontová kapalina stane ve vodě zcela nerozpustnou<sup>8</sup>.

Iontové kapaliny se v dnešní době využívají jako náhrada za klasická těkavá organická rozpouštědla, jako progresivní reakční systémy v organických syntézách, reakční prostředí nebo jeho součást při biokatalytických transformacích<sup>9,10</sup> a katalyzátory v organických syntézách<sup>11</sup>. Dále se používají při extrakcích kapalina-kapalina<sup>12</sup>, jako velmi málo těkavé matrice pro MALDI-MS (cit.<sup>13</sup>) a pro svou nehořlavost jsou atraktivními kandidáty na elektrolyty v lithiových bateriových článcích<sup>14</sup>. Další využití našly při voltametrických metodách pro svou schopnost rozšiřovat využitelný potenciálový rozsah a jako základní elektrolyty s dobrou vodivostí<sup>15</sup>.

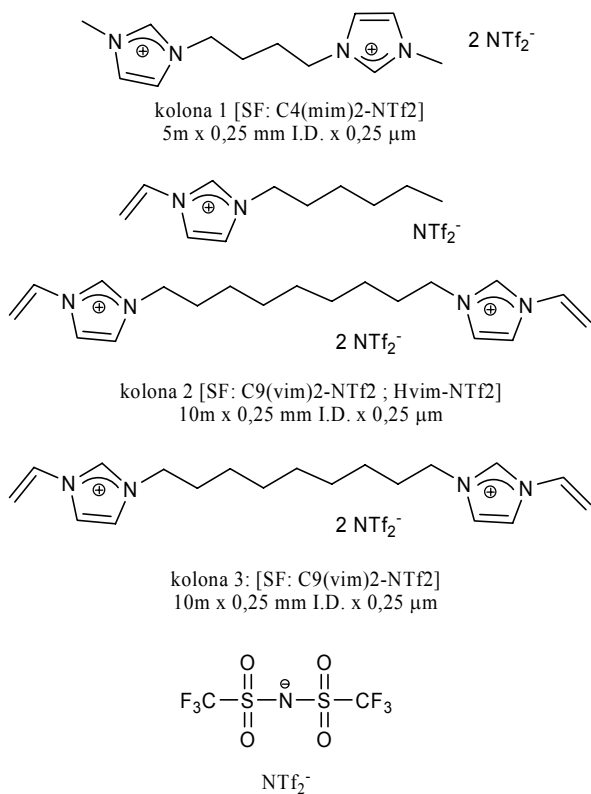
V současné době se věnuje značná pozornost experimentálnímu využití iontových kapalin jako stacionárních fází v plynové rozdělovací chromatografii a jako mobilních fází ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii<sup>4</sup>.

### Experimentální část

#### Přístroje

Analýza vzorků byla provedena na přístroji HP 5890 series II s plamenově-ionizačním detektorem (FID) a dávkovačem s děličem toku. Dělicí poměr byl 1:100, nosným plynem byl vodík o průtoku 1,26 ml min<sup>-1</sup>. Všechny separace probíhaly za izotermických podmínek (100 °C). Tep-

\* Michal Zapadlo se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 1. Struktura a parametry testovaných kolon

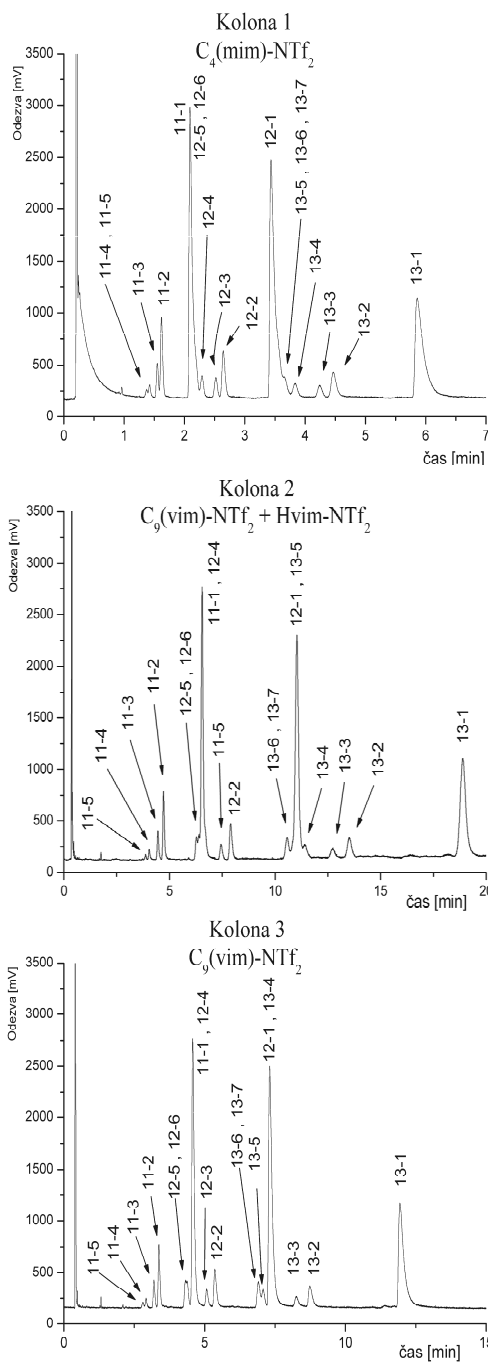
lota nástřiku byla 250 °C a teplota detektoru 300 °C. Byl dávkován 1 μl vzorku technikou horké jehly.

### Příprava iontových kapalin

Obecná syntéza iontových kapalin imidazolové struktury, které byly použity v této studii, je založena na reakci alkyl a *N*-alkylimidazolu s halogenalkanem, resp. dihalogenalkanem za laboratorní teploty bez přístupu světla. Reakční směs se několikrát promyje ethyl-acetátem pro odstranění vedlejších reakčních produktů. Nadbytek ethyl-acetátu je odpařen ve vakuové odparce a zbytek je rozpuštěn ve vodě. Výměna aniontu se provádí ve vodném prostředí a výsledný monomer iontové kapaliny je uchováván bez přístupu světla nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (cit.<sup>16,17</sup>).

### Stacionární fáze

V této studii byly při separacích použity iontové kapaliny jako stacionární fáze pro kapilární plynovou chromatografii. Jednotlivé stacionární fáze a parametry příslušných kolon jsou uvedeny na obr. 1. Iontové kapaliny i kapilární kolony byly připraveny týmem spolupracovníků pod vedením prof. D. W. Armstronga z Iowa State University, USA<sup>17</sup>.



Obr. 2. Ukázka separace alkoholů; 11-1: dodekan-1-ol; 11-2: 2-methylundekan-1-ol; 11-3: 2-ethyldekan-1-ol; 11-4: 2-propylnonan-1-ol; 11-5: 2-butyloktan-1-ol; 12-1: tridekan-1-ol; 12-2: 2-methyldodekan-1-ol; 12-3: 2-ethylundekan-1-ol; 12-4: 2-propyldekan-1-ol; 12-5: 2-butylnonan-1-ol; 12-6: 2-pentylloktan-1-ol; 13-1: tetradekan-1-ol; 13-2: 2-methyltridekan-1-ol; 13-3: 2-ethyl-dodekan-1-ol; 13-4: 2-propylundekan-1-ol; 13-5: 2-butyldekan-1-ol; 13-6: 2-pentylnonan-1-ol; 13-7: 2-hexyloktan-1-ol

## Analyty

Analyzovány byly produkty hydroformylace alkenů C11–C13. Hydroformylací alkenů vzniká směs rozvětvených aldehydů. Následnou hydrogenací vzniká směs příslušných alkoholů, které jsou důležitými meziprodukty při průmyslové výrobě detergentů<sup>18</sup>. Dále byly připraveny deriváty a analoga alkoholů. Byly připraveny acetáty a trifluoracetáty alkoholů a příslušné bromalkany. Pro označení jednotlivých analytů bylo použito zkratk ve formátu: a-b, kde a udává počet uhlíkových atomů výchozího alkenů, b udává polohu dvojné vazby výchozího alkenů (např. pro tridekan-1-ol zkratka 12-1).

## Výsledky a diskuse

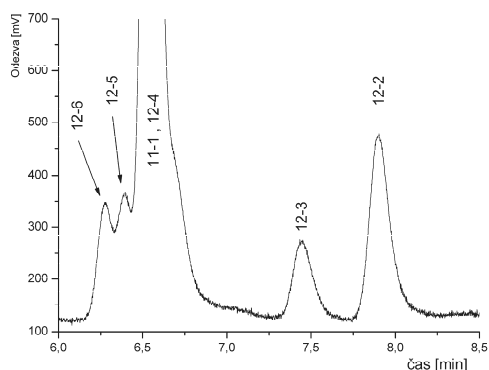
Na obr. 2 jsou ukázky separace modelové směsi alkoholů na třech různých stacionárních fázích.

V závislosti na použité stacionární fázi se mění eluční pořadí kritických párů isomerů. Na následujících výřezech z chromatogramů budou demonstrovány výhody použití iontových kapalin jako stacionárních fází pro separaci isomerů s podobnou teplotou varu.

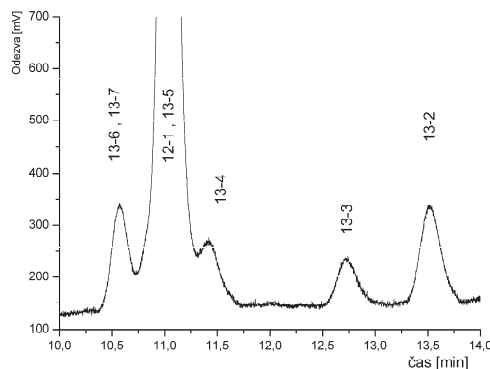
Při použití kolony se stacionární fází  $C_4(\text{mim})_2\text{-NTf}_2$  separace alkoholů 12-5, 12-6 a 11-1 neprobíhala. Stejný případ je i u alkoholů 13-5, 13-6, 13-7, které eluují společně s alkoholem 12-1.

Při použití kolony se směsí dvou iontových kapalin ( $\text{Hvim-NTf}_2$ ;  $C_9(\text{vim})_2\text{-NTf}_2$ ) anebo pouze s  $C_9(\text{vim})_2\text{-NTf}_2$  se změnilo eluční pořadí alkoholů 12-5 a 12-6 (obr. 3).

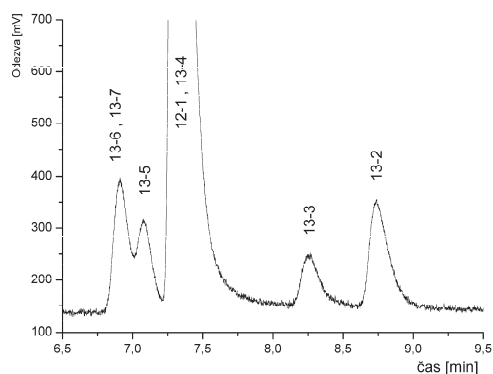
U druhého kritického páru isomerů je zřetelnější změna elučního pořadí způsobená kombinací dvou iontových kapalin. Při použití směsné stacionární fáze byly odděleny alkoholy 13-6 a 13-7 od alkoholu 13-5, který eluoval s alkoholem 12-1 a alkohol 13-4 eluoval z kolony na chvostu alkoholů 12-1 a 13-5 (obr. 4).



Obr. 3. Chromatogram alkoholů; kolona 2, výřez I



Obr. 4. Chromatogram alkoholů; kolona 2, výřez II



Obr. 5. Chromatogram alkoholů; kolona 3, výřez II

Změnou stacionární fáze, resp. jejího složení se změnilo eluční pořadí v porovnání se směsnou stacionární fází (společný základ v použití iontové kapaliny  $C_9(\text{vim})_2\text{-NTf}_2$ ). Touto změnou se oddělily alkoholy 13-6 a 13-7 od isomeru 13-5. Alkoholy 12-1 a 13-4 eluovaly spolu (obr. 5).

Iontové kapaliny jako stacionární fáze skýtají obrovský potenciál při použití v plynové chromatografii. Na výřezech chromatogramů (obr. 3–5) je demonstrována výhoda jejich použití. Pouhou změnou složení stacionární fáze je možné změnit eluční pořadí isomerů.

Pro exaktní popis elučního chování jednotlivých složek modelové směsi hydroformylačních produktů bylo využito retenčních indexů. Kovatsovy retenční indexy alkoholů na kolonách s iontovými kapalinami a koloně HP-5 jsou uvedeny v tabulce I.

Jako další parametr popisu jednotlivých stacionárních fází byl zvolen výškový ekvivalent teoretického patra jako míra účinnosti separačního procesu<sup>19</sup>.

Tabulka I  
Kovatsovy retenční indexy složek modelové směsi alkoholů

Označení	Název	Kolona 1	Kolona 2	Kolona 3	HP5
11-1	dodekan-1-ol	1558	1617	1649	1675
11-2	2-methylundekan-1-ol	1503	1566	1590	1634
11-3	2-ethyldekan-1-ol	1495	1556	1581	1628
11-4	2-propylnonan-1-ol	1479	1540	1563	1613
11-5	2-butylloktan-1-ol	1472	1535	1556	1607
12-1	tridekan-1-ol	1639	1701	1736	1776
12-2	2-methyldekan-1-ol	1591	1648	1678	1735
12-3	2-ethylundekan-1-ol	1583	1638	1668	1728
12-4	2-propyldekan-1-ol	1566	1617	1649	1713
12-5	2-butylnonan-1-ol	1558	1613	1638	1707
12-6	2-pentylloktan-1-ol	1558	1610	1638	1704
13-1	tetradekan-1-ol	1735	1787	1822	1880
13-2	2-methyltridekan-1-ol	1686	1734	1768	1837
13-3	2-ethyldekan-1-ol	1677	1725	1758	1830
13-4	2-propylundekan-1-ol	1659	1708	1736	1814
13-5	2-butyldekan-1-ol	1655	1701	1729	1806
13-6	2-pentylnonan-1-ol	1655	1695	1725	1803
13-7	2-hexylloktan-1-ol	1655	1695	1725	1803

Tabulka II  
Počet teoretických pater a výška teoretického patra

12-2	Kolona 1		Kolona 2		Kolona 3		SP-2340		HP-5	
	n	H [mm]	n	H [mm]	n	H [mm]	n	H [mm]	n	H [mm]
Alkohol	13686	0,365	25287	0,396	18764	0,533	–	–	70215	0,266
Acetát	16757	0,298	31875	0,314	20795	0,481	22382	0,447	83284	0,225
Trifluoracetát	16109	0,310	27588	0,363	26192	0,382	17195	0,582	77012	0,243
Bromalkan	18668	0,268	28573	0,350	38555	0,259	18048	0,554	68320	0,274

Porovnáním počtu pater, resp. jejich výšky, která zohledňuje i délku kolony, je možné konstatovat, že na základě naměřených retenčních dat a vypočtených hodnot jsou kolony s iontovými kapalinami srovnatelně účinné jako referenční kolona HP-5 (tab. II). Srovnání kolon 2 a 3 s kolonou HP-5 ukazuje, že výškové ekvivalenty teoretických pater jsou srovnatelné. Rozdíly ve výšce teoretického patra u kolon 2 a 3 jsou způsobeny iontovou kapalinou Hvim-NTf<sub>2</sub>, která je kopolymerována s iontovou kapalinou C<sub>9</sub>(vim)<sub>2</sub>-NTf<sub>2</sub>. Volný hexylový řetězec narušuje jednotnost filmu a vnáší do stacionární fáze znaky nepolární fáze.

Tyto kolony mají dobrou účinnost a v budoucnosti se dají využít pro dosažení volitelného stupně selektivity při separaci bohatých směsí alkylovaných sloučenin. Další široké a specifické použití iontových kapalin je otázkou vývoje a výzkumu nových stacionárních fází.

## Závěr

V této studii byla testována použitelnost iontových kapalin jako stacionárních fází v plynové chromatografii. Pro jednoduchý popis použitých stacionárních fází byla zvolena modelová směs hydroformylačních produktů (alkoholy, příslušné deriváty a analoga).

Na základě retenčních dat byly vypočteny retenční indexy složek modelových směsí a bylo popsáno eluční chování jednotlivých složek modelových směsí v závislosti na použité stacionární fázi. Pro srovnání byly modelové směsi separovány i na komerčně vyráběných kolonách. Jako referenční byla použita kolona HP-5.

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že iontové kapaliny mají velký potenciál pro použití v plynové chromatografii. Vhodnou volbou iontové kapaliny, či směsi iontových kapalin je možné dosáhnout změn



v elučním pořadí řetězových isomerů s blízkou teplotou varu. Tato vlastnost velice ovlivní možnosti kvalitativní i kvantitativní analýzy reálných vzorků.

#### Seznam symbolů a zkratk

C <sub>4</sub> (mim) <sub>2</sub> -NTf <sub>2</sub>	1,4-bis(3-methylimidazolium)butan-bis (trifluoromethansulfonyl)imid
Hvim-NTf <sub>2</sub>	1-hexyl-3-vinylimidazolium-bis (trifluoromethansulfonyl)imid
C <sub>9</sub> (vim) <sub>2</sub> -NTf <sub>2</sub>	1,9-bis(3-vinylimidazolium)nonan-bis (trifluoromethansulfonyl)imid

*Autoři děkují prof. Danielu W. Armstrongovi z Iowa State University za zapůjčení testovaných kolon a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 6198959216) a programu CEEPUS za finanční podporu.*

#### LITERATURA

- Hanusek J.: Chem. Listy 99, 263 (2005).
- Carda-Broch S., Berthold A., Armstrong D. W.: Anal. Bioanal. Chem. 375, 191 (2003).
- Earle M. J., Seddon K. R.: Pure Appl. Chem. 72, 1391 (2000).
- Pandey S.: Anal. Chim. Acta 556, 38 (2005).
- Brennecke J. F., Maginn E. J.: AIChE J. 47, 2384 (2001).
- <http://bama.ua.edu/~rdrogers/webdocs/ionicliquids.html>, staženo 26.března 2006.
- Anderson J. L., Ding R., Ellern A., Armstrong D. W.: J. Am. Chem. Soc. 127, 593 (2005).
- Qin W., Wei H., Li S. F. Y.: J. Chromatogr., A 985, 447 (2003).
- Nara S. J., Harjani J. R., Saunkhe M. M.: Tetrahedron Lett. 43, 2979 (2002).
- Basso A., Cantone S., Linda P., Ebert C.: Green Chem. 7, 671 (2005).
- Judeh Z. M. A., Schen H.-Y., Chi B. Ch., Feng L.-Ch., Selvasothi S.: Tetrahedron Lett. 43, 9381 (2002).
- Huddleston J. G., Willauer H. D., Swatloski R. P., Visser A. E., Rogers R. D.: Chem. Commun 16, 1765 (1998).
- Anderson J. L., Ding J., Welton T., Armstrong D. W.: J. Am. Chem. Soc. 124, 14247 (2002).
- Matsumoto H., Sakaebe H., Tatsumi K.: J. Power Sources 146, 45 (2005).
- Berthold A., Carda-Broch S.: Actualite Chim. 271, 24 (2004).
- Cassol C. C., Ebeling G., Ferrera B., Dupont J.: Adv. Synth. Catal. 348, 243 (2006).
- Anderson J. L., Armstrong D. W.: Anal. Chem. 77, 6453 (2005).
- Krupčík J., Repka D.: Collect. Czech. Chem. Commun. 50, 1808 (1985).
- Churáček J. a kol.: Analytická separace látek. SNTL, Praha 1991.

**M. Zapadlo<sup>a</sup>, E. Benická<sup>b</sup>, J. Mydlová<sup>b</sup>, K. Vítková<sup>a</sup>, and J. Krupčík<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic; <sup>b</sup> Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovakia): **Using Ionic Liquids for Separation in Gas Chromatography**

Room temperature ionic liquids (RTIL) are organic salts composed of an organic cation and organic or inorganic anion, with a melting point below room temperature. They have been used as novel solvent systems in organic synthesis, solvents immiscible with water and polar solvents in liquid-liquid extraction, new background electrolytes for voltammetric studies and batteries, non-volatile matrices for MALDI-MS, stationary phases in gas chromatography and mobile phases in HPLC. In this study, RTILs were used as stationary phases in capillary gas chromatography. Kovats retention indexes of model mixtures of hydroformylating products of undec-1-ene, dodec-1-ene and tridec-1-ene, were measured. The measured data were confronted with those on classical (commercial) nonpolar column HP-5 (5 % poly(diphenylsiloxane) – 95 % poly(dimethyl-siloxane)) and polar column SP-2340 (100 % poly[bis(3-cyanopropyl)siloxane]).

# STUDIUM INDUKOVANÉHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU V KOMPLEXECH PORFYRINŮ A POLY(L-GLUTAMOVÉ KYSELINY)

ONDŘEJ JULÍNEK<sup>a\*</sup> a MARIE URBANOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie a <sup>b</sup> Ústav fyziky a měřicí techniky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
julineko@vscht.cz, marie.urbanova@vscht.cz

Došlo 31.5.05, přepracováno 13.9.06, přijato 19.10.06.

**Klíčová slova:** cirkulární dichroismus, porfyryny, polypeptidy, komplexy porfyřinů, indukovaný cirkulární dichroismus, ternární komplexy, chirální paměť

## Úvod

Porfyryny jsou látky, které se zúčastňují biologicky důležitých pochodů. Jsou to ale také sloučeniny významné z hlediska praktického využití, známé je např. jejich použití ve fotodynamické terapii při léčbě rakoviny<sup>1</sup>. Cílem této práce bylo ověřit, zda dochází k přenosu chirální informace z matrice prostřednictvím kationtového porfyřinu na porfyřin aniontový.

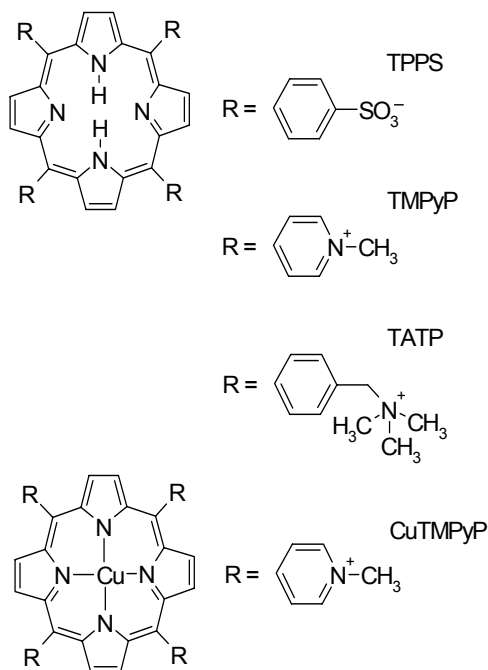
Jako matrice byla zvolena poly(L-glutamová kyselina) (PLGA), jejíž konformaci lze měnit změnou pH roztoku<sup>2,4</sup>. Dobře definované  $\alpha$ -helikální konformace je možné dosáhnout nastavením pH na dostatečně nízkou hodnotu (pH 3–5), při vyšších hodnotách pH přechází PLGA do konformace označované historicky jako nahodilé klubko, nově jako PP-II, která je blízká rozvolněné levotočivé šroubovici<sup>5</sup> typické pro jednu ze struktur poly(L-prolinu).

Vhodným nástrojem pro zjišťování přenosu chirální informace je spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), pomocí níž je možné sledovat jak konformaci PLGA matrice v UV oblasti, tak případný vznik indukovaného cirkulárního dichroismu porfyřinů v oblasti Soretova pásu ve viditelné části spektra. Indukovaný cirkulární dichroismus může být vyvolán pro původně achirální porfyřin jeho vazbou na chirální matrici nebo chirálním uspořádáním ve vzniklých komplexech.

Pomocí ECD (cit. 6–8) a vibračního cirkulárního dichroismu<sup>9,10</sup> bylo ukázáno, že za vhodných podmínek dochází k interakci PLGA s kationtovými porfyřiny. K při-

mé vazbě mezi PLGA a aniontovým porfyřinem nedochází v důsledku odpuzivých elektrostatických sil mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami PLGA a záporně nabitým porfyřinovým derivátem<sup>11</sup>. Tato vazba je však možná prostřednictvím kationtového porfyřinu, který slouží jako mezičlánek odstiňující elektrostatický vliv PLGA a umožňující aniontovému porfyřinu vytvořit chirální konjugát. Tento efekt byl zatím pozorován při použití měďnatého derivátu 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyřinu (CuTMPyP) jakožto kationtového a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyřinu (TPPS) jakožto aniontového porfyřinu, kdy vznikají vysoce stabilní supramolekulární komplexy vykazující molekulární paměť<sup>12,13</sup>. Vzniklé komplexy se stávají nezávislé na konformaci matrice a svou strukturu nemění ani při výrazné změně pH a iontové síly roztoku<sup>12,13</sup>. Důležitou roli při vzniku vyšších molekulárních struktur hrají, kromě pH a iontové síly, další podmínky, jako je teplota a koncentrace látek, zejména poměr koncentrací polypeptidu a porfyřinu [P]/[D], kde [P] a [D] jsou látkové koncentrace polypeptidu a porfyřinu<sup>12</sup>.

V této práci byla studována indukce cirkulárního dichroismu při interakci porfyřinů s polypeptidovou matricí mající konformaci  $\alpha$ -helikální nebo PL-II. Kromě kationtového porfyřinu CuTMPyP byly použity další dva kationtové porfyřiny: 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-



Obr. 1. Struktura použitých porfyřinových derivátů

\* Ondřej Julínek se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

-yl)porfin-tetrachlorid (TMPyP) a 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylamonio)methyl]fenyl}porfyrin-tetrachlorid (TATP). Dále bylo ověřeno chování ternárního komplexu PLGA+CuTMPyP+TPPS a dosažené výsledky byly srovnány se systémy PLGA + TMPyP + TPPS a PLGA + TATP + TPPS s cílem potvrdit nebo vyvrátit vznik podobných konjugátů pro tyto další porfyrinové deriváty.

## Experimentální část

### Materiály a metody

Jako chirální matrice byla použita kyselina poly(L-glutamová) ve formě sodné soli s průměrnou molekulovou hmotností  $13\,000\text{ g mol}^{-1}$  (Sigma). Jako aniontový porfyrin byl zvolen 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfín ve formě sodné soli (TPPS) (Sigma). Jako kationtové porfyriny byly zvoleny 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylamonio)methyl]fenyl}porfyrin-tetrachlorid (TATP, cit.<sup>14</sup>), 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porfín-tetrachlorid (TMPyP) (Porphyrin Systems) a jeho měďnatý derivát (CuTMPyP) ve formě chloridu, který byl připraven na Ústavu analytické chemie rutinní metalací<sup>15</sup>. Struktura použitých porfyrinů je znázorněna na obr. 1.

Spektra ECD byla měřena na spektrofotometru J-810 Jasco, s rozlišením  $0,5\text{ nm}$ , časovou konstantou  $1\text{ s}$  a rychlostí záznamu  $100\text{ nm s}^{-1}$ . Koncentrace matrice PLGA byla  $c(\text{PLGA}) = 1 \cdot 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ , vztažena na aminokyselinový zbytek, v případě ternárního komplexu při pH 3,6 byla tato koncentrace  $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4}\text{ mol l}^{-1}$ . Koncentrace porfyrinu byla dána požadovaným poměrem  $[\text{P}]/[\text{D}]$  látkových koncentrací PLGA a porfyrinu.

## Výsledky a diskuse

Konformace PLGA ve vodném prostředí byla sledována pomocí ECD v UV oblasti při  $180\text{--}250\text{ nm}$ . V kyselém prostředí PLGA poskytuje ECD spektrum s kladným maximem u  $192\text{ nm}$  a zápornými maximy u  $209$  a  $222,5\text{ nm}$  (obr. 2, spektrum 1). Tento spektrální průběh je charakteristický pro  $\alpha$ -helikální konformaci. Při pH 9 PLGA poskytuje ECD spektrum se záporným maximem u  $196,5\text{ nm}$ , které je charakteristické pro konformaci PL-II (obr. 2, spektrum 2).

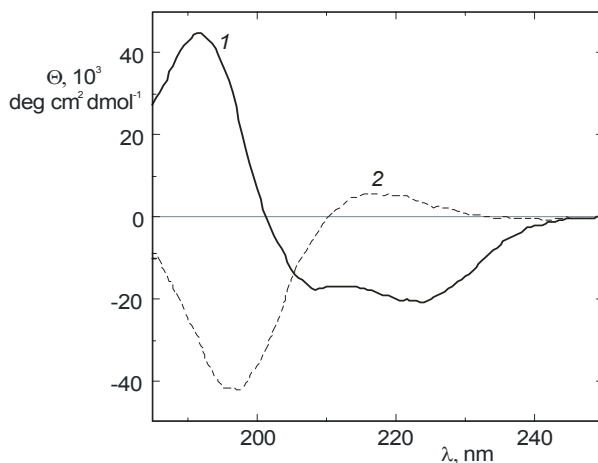
Vznik makromolekulárního komplexu mezi  $\alpha$ -helikální PLGA a kationtovým porfyrinem se projevuje indukovaným cirkulárním dichroismem (obr. 3) původně achiální porfyrinu.

Při pH 9, kdy se matrice PLGA nachází v konformaci PP-II, nebyl v roztocích PLGA a kationtového porfyrinu změřen žádný ECD signál v Soretově oblasti, který by odpovídal chirálnímu uspořádání porfyrinů; v oblasti maxim absorpčních pásů je pozorován pouze vyšší šum.

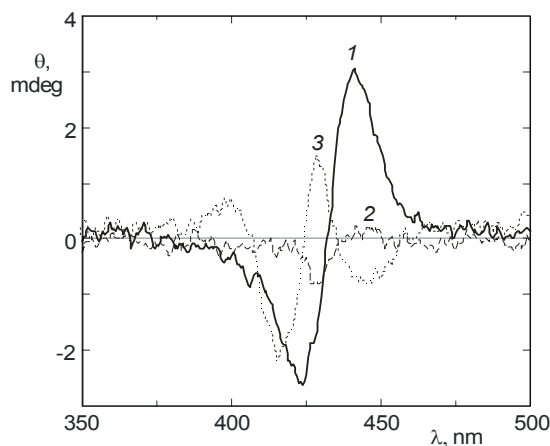
Zatímco u binárních směsí kationtových porfyrinů a matrice PLGA mající  $\alpha$ -helikální konformaci byl pozo-

rován dobře reprodukovatelný signál ECD v oblasti absorpčních Soretových pásů kationtových porfyrinů, v případě konformace PP-II se spektrum ECD pohybuje na úrovni šumu, který je způsobený vysokou absorpcí porfyrinu v této oblasti vlnových délek. Z toho usuzujeme, že indukce optické aktivity je podmíněna konformací matrice, nikoli pouhou vazbou porfyrinu na chirální matrici, a dochází tedy k přenosu chirální informace z matrice na porfyrinovou část komplexu.

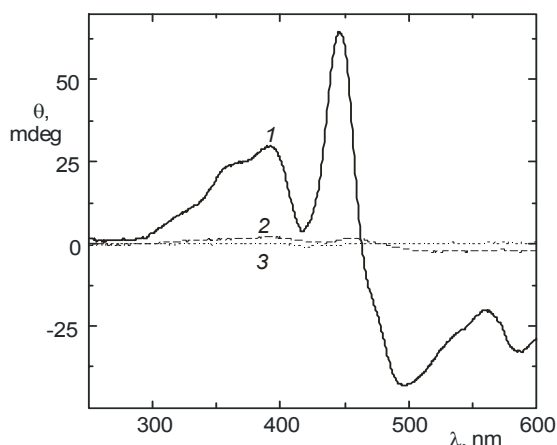
Vznik ternárních komplexů byl studován pro obě konformace polypeptidové matrice. Titrace binárních komplexů PLGA a kationtového porfyrinu aniontovým porfyrinem TPPS při pH 9, kdy polypeptidová matrice má konformaci PP-II, nevede ke vzniku indukovaného cirkulárního dichroismu. Odtud plyne, že ke vzniku ternárního chirálního komplexu za těchto podmínek nedochází.



Obr. 2. ECD spektrum PLGA; pH 3,75 (1), pH 9 (2)



Obr. 3. ECD spektra komplexu PLGA s kationtovými porfyriny;  $[\text{P}]/[\text{D}] = 50$ , pH 4,5; PLGA-CuTMPyP (1), PLGA-TMPyP (2), PLGA-TATP (3)



Obr. 4. ECD spektra ternárních komplexů PLGA-kationový porfyrin-TPPS;  $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $c(\text{kationový porfyrin}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ , pH 3,6; poměr  $[\text{TPPS}]/[\text{kationový porfyrin}] = 1:1$ . Kationový porfyrin: CuTMPyP (1), TMPyP (2), TATP (3)

Další spektrální studie vzniku ternárních komplexů byla provedena pro všechny tři kationové porfyriny při pH 3,6, kdy se polypeptidová matrice nachází v  $\alpha$ -helikální konformaci, a při koncentracích  $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $c(\text{kationový porfyrin}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  (obr. 4). Tyto podmínky se ukázaly pro vznik komplexu optimální<sup>12</sup>. Při použití kationových porfyrinů TMPyP a CuTMPyP se pozoruje zřetelné spektrum ECD, přičemž indukovaná optická aktivita vzniklého komplexu je přibližně 30krát vyšší u měďnatého porfyrinu. To potvrzuje existenci vysoce uspořádaných stabilních supramolekulárních komplexů mezi molekulami CuTMPyP a TPPS (cit.<sup>13</sup>). Ze spekter na obr. 4 je zřejmé, že za stejných podmínek dochází k přenosu chiralitě také prostřednictvím porfyrinu TMPyP. Indukovaná optická aktivita je však v tomto případě výrazně menší než v případě měďnatého porfyrinu CuTMPyP. TATP za daných podmínek žádné indukované chirální uspořádání aniontového porfyrinu v komplexu neumožňuje.

## Závěr

Pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu v UV a viditelné oblasti byly studovány podmínky přenosu chirální informace z chirální matrice na původně achirální kationové a aniontové porfyrinové deriváty. Byly nalezeny optimální podmínky pro vznik chirálního komplexu kationového a aniontového porfyrinu s uspořádáním porfyrinových jednotek vycházejících z geometrie matrice. Pro binární komplexy byl prokázán přenos chirální infor-

mace z  $\alpha$ -helikálně uspořádané matrice kyseliny polyglutamové na tři kationové porfyriny CuTMPyP, TMPyP a TATP. V případě, že se polyglutamová kyselina nachází v konformaci PP-II, se žádný signál indukovaného cirkulárního dichroismu nepozoruje a tedy porfyrinové molekuly jsou navázány neuspořádaně.

U ternárních směsí polyglutamové kyseliny, aniontového porfyrinu TPPS a kationového porfyrinu bylo zjištěno, že optimálním kationovým porfyrinem pro vznik chirálního ternárního komplexu na polyglutamové matrici je metalovaný derivát CuTMPyP. Při použití nemetalovaného porfyrinu TMPyP chirální ternární komplex také vzniká, intenzita cirkulárně dichroických pásů je však řádově nižší.

*Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektů MSM 6046137307 a OC-135.*

## LITERATURA

1. Sternberg E. D., Dolphin D., Bruckner C.: *Tetrahedron* 54, 4151 (1998).
2. Fasman G. D., Lindblow C., Bodenheimer E.: *Biochemistry* 3, 155 (1964).
3. Olander D. S., Holtzer A.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 4549 (1968).
4. Nagasawa M., Holtzer A.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 538 (1963).
5. Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
6. Ikeda S., Nezu T., Gotthold E.: *Biopolymers* 31, 1257 (1991).
7. Nezu T., Ikeda S.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66, 18 (1993).
8. Aoudia M., Rodgers M. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9063 (1997).
9. Urbanová M., Setnička V., Král V., Volka K.: *Biopolymers* 60, 307 (2001).
10. Palivec L., Urbanová M., Volka K.: *J. Peptide Sci.* 11, 536 (2005).
11. Purrello R., Scolaro L. M., Bellacchio E., Gurrieri S., Romeo A.: *Inorg. Chem.* 37, 3647 (1998).
12. Purrello R., Raudino A., Monsù Scolaro L., Loisi A., Bellacchio E., Lauceri R.: *J. Phys. Chem., B* 104, 10900 (2000).
13. Lauceri R., Raudino A., Scolaro L. M., Micali N., Purrello R.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 894 (2002).
14. Kubát P., Lang K., Anzenbacher P., Jursíková K., Král V., Ehrenberg B.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2000, 933.
15. Pasternack R. F., Spiro E. G., Tlach M.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36, 599 (1974).

**O. Julínek<sup>a</sup> and M. Urbanová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry and* <sup>b</sup> *Department of Physics and Measurements, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **The Study of Induced Circular Dichroism in the Porphyrin-Poly(L-glutamic acid) Complexes**

The formation conditions for the binary complexes composed of poly(glutamic acid) and cationic porphyrins 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylammonio)methyl]phenyl}porphyrin tetrachloride (TATP), 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-pyridinium-4-yl)porphyrin (TMPyP) and its Cu(II)

derivative (CuTMPyP), and the ternary complexes composed of poly(glutamic acid), the same cationic porphyrins TATP, TMPyP and CuTMPyP and anionic porphyrin 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin were studied by electronic circular dichroism spectroscopy. The binary chiral complexes are formed if any of the three cationic porphyrins is used and the polypeptidic matrix possesses the  $\alpha$ -helical structure. The ternary chiral complexes are formed if the matrix exhibits  $\alpha$ -helical structure and cationic porphyrins TMPyP or CuTMPyP are used. When the metal porphyrin is used, the intensity of circular dichroism bands in spectrum is one order higher.

## UV SPEKTRÁLNÍ A ELEKTRO-MIGRAČNÍ CHARAKTERISTIKY IMIDAZOLOVÝCH RIBOSIDŮ

PETRA VYSKOČILOVÁ<sup>a,b\*</sup>, PETR HORNÍK<sup>a,b</sup>,  
DAVID FRIEDECKÝ<sup>a</sup> a TOMÁŠ ADAM<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, <sup>b</sup>Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc  
petrvyskocil@centrum.cz

Došlo 23.6.05, přepracováno 18.9.06, přijato 9.11.06.

Klíčová slova: purinová *de novo* syntéza, imidazolové ribosidy, efektivní elektroforetická pohyblivost, UV spektra, kapilární elektroforéza

### Úvod

Dědičné metabolické poruchy patří k velmi závažným onemocněním. Při chybné sekvenci DNA kódující určitý enzym se snižují jeho katalytické vlastnosti. To má za následek akumulaci substrátu enzymové reakce. Substrát může být pro buňku toxický, a proto se jej snaží eliminovat. Purinová *de novo* syntéza (PDNS) je metabolickou dráhou vedoucí ke vzniku purinových nukleotidů z fosforibosyldifosfátu. Probíhá v deseti stupních, jejichž konečným meziproduktem je inosinmonofosfát (Schéma 1). V současné době jsou známy pouze tři enzymové defekty v metabolické dráze PDNS. Superaktivita regulačního enzymu – fosforibosylpyrofosfátsynthetasy<sup>1</sup> – se projevuje nadměrnou produkcí kyseliny močové. Deficit bifunkční adenylosukcinátlyasy<sup>2</sup> (katalyzuje osmý stupeň PDNS a dále konverzi sukcinyladenosinmonofosfátu na AMP) se projevuje intracelulární akumulací [5-amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribotidu (SAICAR) a také sukcinyladenosinmonofosfátu. Odpovídající ribosidy [5-amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribosid (SAICAR) a sukcinyladenosin jsou jako metabolity vylučovány do tělních tekutin. Nedávno bylo objeveno<sup>3</sup>, že akumulace (5-amino-4-karbamoylimidazol)ribotidu (AICAR) v buňkách a příslušného ribosidu (AICAR) v tělních tekutinách je projevem defektu AICAR-transformylasy. Diagnostika metabolických defektů purinového a pyrimidinového metabolismu se provádí technikami vysokoúčinné kapalinové chro-

matografie (HPLC) nebo kapilární elektroforézy (CE).

Z analogie s doposud rozpoznávanými defekty PDNS lze předpokládat, že v případě defektu PDNS akumulované substráty prostupují přes buněčnou membránu jako ribosidy. Detekce těchto látek v tělních tekutinách slouží k jejich diagnostice. V této práci je popsána syntéza, čištění, základní elektromigrační a spektrální vlastnosti imidazolových ribosidů – defosforylovaných meziproductů PDNS. Tyto látky obsahují imidazolový kruh, což umožňuje provádět jejich identifikaci na základě absorpce záření v UV oblasti.

### Materiál a metody

#### Příprava a čištění ribosidů

Všechny ribosidy s výjimkou SAICAr byly připraveny chemicky, analogicky k popsaným syntézám ribotidů a analyzovány kapilární elektroforézou.

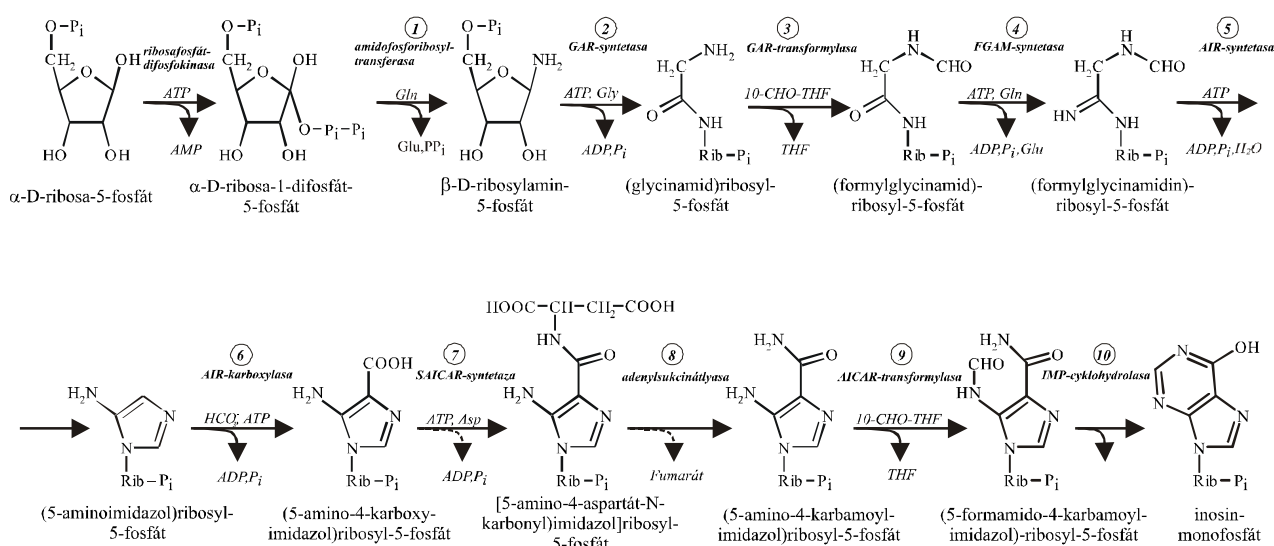
(5-Aminoimidazol)ribosid (AIR), odpovídající defosforylovanému šestému meziproductu PDNS, byl připraven z komerčně dostupného AICAr (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada) alkalickou hydrolyzou a následnou dekarboxylací<sup>4</sup>. 1 g AICAr byl zahříván v 6 mol l<sup>-1</sup> NaOH. Směs byla poté ochlazena a pH bylo nastaveno na 4,7 ledovou kyselinou octovou. Spontánní dekarboxylace probíhala za probublávání argonem po dobu 18 hodin. Po odpaření na rotační vakuové odparce byl vzorek uložen do exsikátoru. Výtěžek syntézy byl 80 %.

(5-Amino-4-karboxyimidazol)ribosid (CAIR), odpovídající sedmému defosforylovanému meziproductu PDNS, byl připraven alkalickou hydrolyzou<sup>5</sup> jako AIR. Produkt sirupovité konzistence byl opakovaně rozetřen a dekantován nejprve s ethanolem a následně s methanolem. Hnědý pevný produkt byl uložen do exsikátoru. Výtěžek provedené reakce byl 99 %.

[5-Amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribosid (SAICAR) byl připraven enzymaticky s použitím rekombinantní adenylosukcinátlyasy<sup>6</sup>. Autoři děkují Dr. J. Krijtovi a M. Zikánové (Ústav dědičných metabolických poruch v Praze, Všeobecná fakultní nemocnice Praha) za poskytnutí této látky.

Syntéza (5-formamido-4-karbamoylimidazol)ribosidu (FAICAR), odpovídajícího předposlednímu defosforylovanému intermediátu PDNS, byla popsána ve dvou publikacích<sup>7,8</sup>. Námí provedená příprava dle prvního postupu<sup>7</sup> nebyla úspěšná, během reakce neprobíhala formylace. Syntéza byla proto provedena podle druhého publikovaného postupu<sup>8</sup>. 1 g AICAr byl zahříván ve formylační směsi složené z 1,1 g NaOH, 13,6 ml kyseliny mravenčí a 25 ml acetanhydridu. Výsledné produkty byly lyofilizovány a uschovány v exsikátoru. Výtěžek syntézy byl 50 %.

\* Petra Vyskočilová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

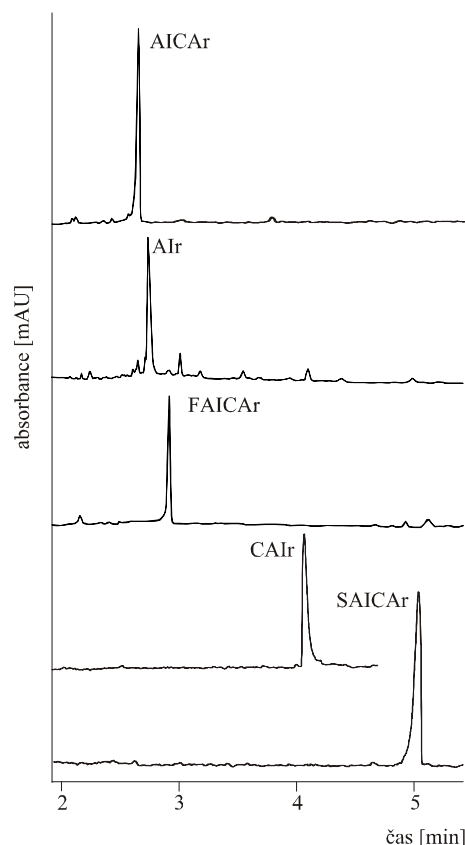
Schéma 1. Purinová *de novo* syntéza

CAIr a SAICAr neobsahovaly žádné vedlejší produkty. FAICAr byl znečištěn pouze výchozí látkou syntézy – AICAr. AIR obsahoval ze všech syntetizovaných ribosidů nejvíce nečistot. Oba tyto surové ribosidy jsme přečistili na katexu Dowex 50WX8 v  $\text{NH}_4^+$  – cyklu. Při jejich čištění byl žádaný produkt FAICAr získán na ionexové koloně jako nezadržený podíl elucí vodou. V případě AIR byl surový produkt nanesen na rekondiovanou kolonu, která byla promývána vodou a čistý AIR byl pak eluován 1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OH}$ . V obou případech byly jednotlivé frakce eluátů analyzovány kapilární elektroforézou a frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a lyofilizovány.

#### Kapilární elektroforéza, elektromigrační a spektrální vlastnosti analytů

Analýzy produktů syntéz a přečištěných ribosidů (obr. 1) byly prováděny na přístroji P/ACE 5510 vybaveném spektrofotometrickým detektorem s polem diod (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Separace byly prováděny za konstantního napětí s náběhovou napětíovou rampou 30 s ve vnitřně nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$  (Polymicro CE and CEC Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 20 cm a celková délka 27 cm. Pro analýzy byla využita dříve publikovaná metoda<sup>9</sup>. Separace byly prováděny při napětí 10 kV a teplotě 30  $^\circ\text{C}$  v módu micelární elektroforetické chromatografie v alkalickém základním elektrolytu o složení 60  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 80  $\text{mmol l}^{-1}$  dodecylsulfát sodný (SDS). Hodnota pH 9,6 byla nastavena pomocí 2-amino-2-methyl-propan-1-olu. Přidavek micelotvorných činidel byl zvolen s ohledem na budoucí použití pro analýzu biologických tekutin s obsahem proteinů.

Při studiu elektromigračních vlastností ribosidů



Obr. 1. Analýza přečištěných imidazolových ribosidů kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií; základní elektrolyt: 60  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 80  $\text{mmol l}^{-1}$  SDS, upraveno na pH 9,6 přidavkem 2-amino-2-methyl-propan-1-olu; vnitřní/vnější průměr křemenné kapiláry 50/375  $\mu\text{m}$ , efektivní/celková délka 20/27 cm, napětí 10 kV, proud 45  $\mu\text{A}$ , teplota 30  $^\circ\text{C}$

Tabulka I  
Přehled pufrů užitých při studiu vlastností imidazolových ribosidů

pH	Složení pufru <sup>a</sup>	Iontová síla <sup>d</sup>
3	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina citronová (pK <sub>1</sub> 3,13) – 0,8 mmol/l CTAB <sup>b</sup>	0,009
5	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina octová (pK 4,76) – 0,8 mmol/l CTAB <sup>b</sup>	0,014
7	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina fosforečná (pK <sub>2</sub> 7,21)	0,035
9	20 mmol l <sup>-1</sup> TABS <sup>c</sup> (pK 8,90)	0,011

<sup>a</sup> Příslušná hodnota pH byla nastavena titrací pufrů roztokem NaOH, <sup>b</sup> hexadecyltrimethylamoniumbromid, <sup>c</sup> (*N*-tris[hydroxymethyl]methyl-4-aminobutansulfonová kyselina, <sup>d</sup> za laboratorní teploty

v závislosti na pH byl každý z ribosidů analyzován kapilární zónovou elektroforézou. Při analýzách byly použity výše popsané podmínky, pouze s jinými základními elektrolyty (tabulka I) o různém pH, jejichž složení bylo vybráno podle hodnot pK. Nastavení pH bylo prováděno titrováním pufrů roztokem NaOH. V případě roztoků o pH 3 a 5 by doba analýzy byla příliš dlouhá, proto byl přidán kationtový tenzid hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB) v submicelární koncentraci a experiment probíhal při obrácené polaritě. Tyto analýzy poskytly informace o elektromigračních a spektrálních vlastnostech studovaných látek. Efektivní pohyblivosti ribosidů byly vypočteny dle vztahu

$$\mu_{\text{ef}} = (l_t \cdot l_d / t_{\text{anal}} \cdot U) - (l_t \cdot l_d / t_{\text{EOF}} \cdot U)$$

kde  $l_t$  je celková délka kapiláry [cm],  $l_d$  je délka kapiláry k detektoru [cm],  $t_{\text{anal}}$  je migrační čas analytu [s],  $t_{\text{EOF}}$  je migrační čas značky elektroosmotického toku [s] a  $U$  je vložené napětí [V]. Pro stanovení pohyblivosti elektroosmotického toku byl jako značka použit mesityloxid.

Protože neznáme přesnou koncentraci syntetizovaných ribosidů v analyzovaných roztocích, vycházeli jsme při výpočtu molárních absorpčních koeficientů z publikovaných hodnot<sup>10–13</sup> a uvažovali vztah

$$\varepsilon_x = A_x \cdot \varepsilon_y / A_y$$

kde  $\varepsilon_x$  je molární absorpční koeficient [l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>],  $\varepsilon_y$  je publikovaný molární absorpční koeficient při pH 7 [l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>],  $A_x$  je korigovaná plocha píku [mAU cm],  $A_y$  je korigovaná plocha píku při pH 7 [mAU cm]. Korigované plochy píků byly odečítány při vlnové délce, která je uvedena v literatuře<sup>10–13</sup>.

## Výsledky a diskuse

Je všeobecně známo, že pH prostředí ovlivňuje disociaci a protonizaci ionogenních skupin analytu. Míru ionizace a velikost náboje vyjadřují hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí analytů, které jsou prezentovány v tabulce II. Ve struktuře A1r se při pH < 5 protonizuje aminoskupina vázaná na imidazolovém kruhu a v této oblasti pH se tedy A1r chová jako kationt. CA1r má ve své struktuře kromě aminoskupiny také karboxylovou skupinu. Při pH 3 se chová jako kationt, ale při pH 5 je nenabitý (migruje s elektroosmotickým tokem). Při pH

Tabulka II  
Efektivní pohyblivosti ( $\mu_{\text{ef}} \cdot 10^9$  [m<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>]) imidazolových ribosidů v závislosti na pH při teplotě 30 °C

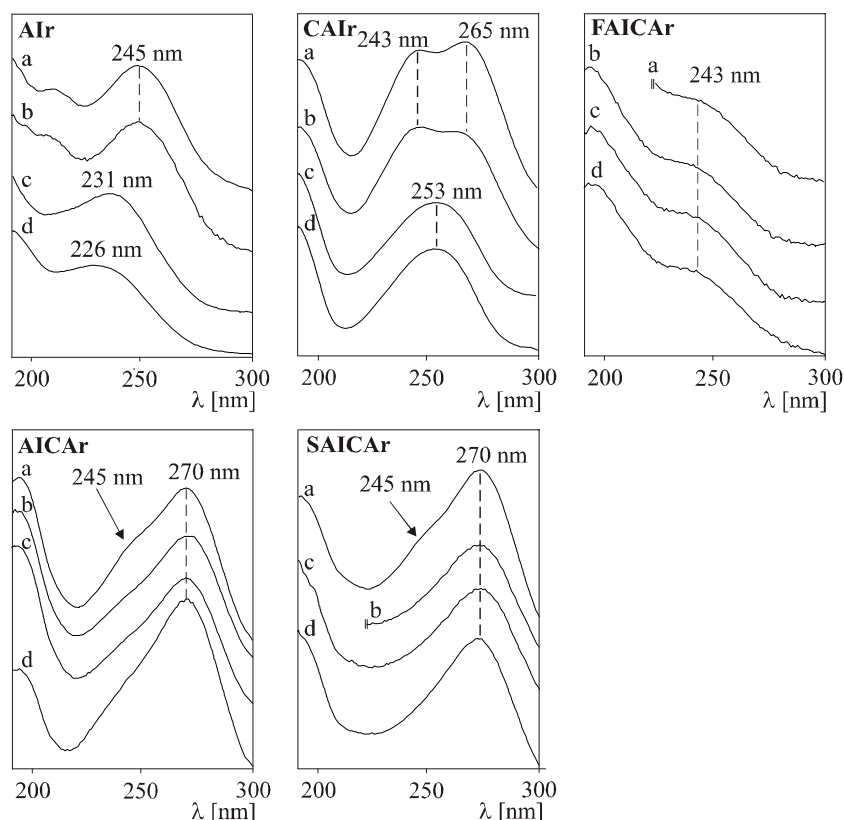
Ribosid	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
A1r	22,2	15,9	0	0
CA1r	4,9	0	-15,3	-15,5
SA1CAr	0	0	-23,4	-22,8
A1CAr	5,5	0	0	0
FA1CAr	0	0	0	-3,0

> 5 se chová jako aniont, neboť karboxylová skupina je plně disociována a aminoskupina není protonizována. Další zvyšování pH disociaci neovlivňuje. SA1CAr má ve své struktuře dvě karboxylové skupiny a při pH > 7 se prokazatelně chová jako aniont. A1CAr obsahuje aminoskupinu a amidovou skupinu. Při pH < 3 se chová jako kationt, při vyšším pH již nenese žádný náboj. Jinak je tomu u FA1CAr, kde je aminoskupina chráněná formylovou skupinou, a proto se neprotonizuje. Při pH ≥ 9 disociuje enolforma aldehydové skupiny a FA1CAr se chová jako aniont.

Kromě elektromigračních vlastností se mění i vlastnosti spektrální. Hodnoty molárních absorpčních koeficientů ve spektrálních maximech ribosidů analyzovaných při různém pH jsou uvedeny v tabulce III. Na obr. 2 jsou uvedena UV spektra studovaných ribosidů při použitých pH. U SA1CAr a A1CAr se při pH < 3 zvyšuje absorbance v oblasti 245 nm. U CA1r se významně měnila UV spektra v závislosti na pH. Při pH 3 jsou zřejmá dvě absorpční maxima. Se snižujícím se pH se zvyšuje absorbance v oblasti 243 nm. Při pH 7 splývají obě maxima do jednoho v oblasti 253 nm, které se s rostoucím pH nemění. U A1r se s rostoucím pH posunuje absorpční maximum směrem k nižším vlnovým délkám. Naopak spektra FA1CAr zůstávají při všech hodnotách pH stejná.

Elektromigrační vlastnosti ribosidů jsou velmi užitečné pro jejich analýzu kapilární elektroforézou. Informace o spektrálních vlastnostech rozšiřují možnosti identifikace ribosidů i na jiné separační techniky využívající UV detekce. Znalosti spektrálních vlastností ribosidů byly využity při potvrzení identity látek analyzovaných kapilární elektroforézou. Jednotlivé ribosidy byly tak





Obr. 2. Závislost spektrálních vlastností imidazolových ribosidů na pH; a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7, d) pH 9

Tabulka III

Molární absorpční koeficienty ( $\epsilon$  [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]) imidazolových ribosidů

Ribosid	$\lambda$ [nm]	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
AIr	260	5969	4735	2400	7769
CAIr	260	7531	8281	10080	8912
SAICAr	270	24605	32180	13300	30347
AICAr	267	9844	11270	12600	9557
FAICAr	248	4798	4216	6590	4477

s jistotou identifikovány na základě svých spektrálních vlastností.

## Závěr

Byly připraveny meziproducty purinové *de novo* syntézy ve formě ribosidů a tyto ribosidy byly přečištěny. Pro identifikaci ribosidů kapilární elektroforézou jsou stěžejní spektrální a elektromigrační vlastnosti. Na základě elektroforetických analýz při různém pH s UV detekcí byly získány poznatky o ionizaci imidazolových ribosidů a o jejím vlivu na UV spektra. Zejména informace o spektrálních

vlastnostech rozšiřují možnost odhalit doposud neobjevené enzymové defekty druhé poloviny purinové *de novo* syntézy, a to elektroseparačními technikami s UV detekcí.

*Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR NR/7796-3 a MSM 6198959205.*

## LITERATURA

1. Sperling O., Eliam G., Parsky-Brosh S., De Vries A.: *Biochem. Med.* 6, 310 (1972).
2. Vincent M. F.: *Dissertation*. Université Catholique de

- Louvain, Louvain, 1997.
3. Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., Van den Berghe G., Vincent M. F.: *Am. J. Human. Gen.* 74, 1276 (2004).
  4. Groziak M. P., Huan Z. W., Ding H., Meng Z., Stevens W. C., Robinson P. D.: *J. Med. Chem.* 40, 3336 (1997).
  5. Srivastava P. C., Mancuso R. W., Rousseau R. J., Robins R. K.: *J. Med. Chem.* 11, 1207 (1974).
  6. Zikanova M., Krijt J., Hartmannova H., Kmoch S.: *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 493 (2005).
  7. Mueller W., Benkovic S. J.: *Biochemistry* 20, 337 (1981).
  8. Lukens L., Flaks J.: *Methods Enzymol.* 6, 671 (1963).
  9. Adam T., Friedecký D., Fairbanks L., Ševčík J., Barták P.: *Clin. Chem.* 45, 2086 (1999).
  10. Mayer E., Leonard N. J., Bhat B., Stubbe J., Smith J. M.: *Biochemistry* 21, 5022 (1992).
  11. Laikind P. K., Seegmiller J. L., Gruber E.: *Anal. Biochem.* 156, 81 (1986).
  12. Hards R. G., Patterson D.: *J. Chromatogr.* 445, 217 (1988).
  13. Szabados E., Christopherson R. I.: *Anal. Biochem.* 221, 401 (1994).

**P. Vyskočilová<sup>a,b</sup>, P. Horník<sup>a,b</sup>, D. Friedecký<sup>a</sup>, and T. Adam<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc, Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Spectral and Electromigration Characteristics of Imidazole Ribosides**

Some imidazole ribosides were synthesized, purified by ion exchange chromatography and analyzed by capillary micellar electrophoretic chromatography and zone electrophoresis. Basic spectral and electromigration characteristics of the ribosides at various pH are reported. The data on ribosides can be used in diagnosis of the known and as yet undescribed enzyme defects in the *de novo* purine synthesis.

### VŠCHT Praha přijme odborného pracovníka/ci do akreditované laboratoře pro Ústav chemie a analýzy potravin.

#### Hlavní náplň práce:

provádění rozborů vzorků potravin a plodin  
zajišťování provozu výzkumné a zkušební laboratoře  
vedení laboratorní dokumentace a záznamů  
technické zabezpečení seminářů a konferencí

#### Požadovaný profil vhodného uchazeče:

vysokoškolské vzdělání (praxe výhodou)  
zkušenosti v analytické (chemické) laboratoři  
základní schopnost práce s PC (MS Office)  
časová flexibilita a samostatnost  
znalost angličtiny vítána

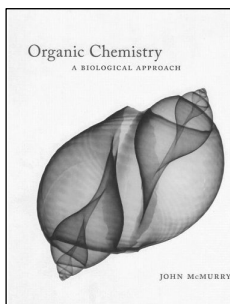
#### Nabízíme:

samostatnou práci na špičkovém pracovišti  
příležitost k profesnímu rozvoji  
pracoviště v blízkosti metra  
pružnou pracovní dobu  
příspěvek na stravování, návštěvu kulturních a sportovních zařízení, rekreaci,  
penzijní připojištění

Nástup: dle dohody

Kontakt: jana.hajslova@vscht.cz

## RECENZE



John E. McMurry

**Organic Chemistry,  
A Biological Approach**

1. vydání, ISBN 0-495-11127-9/  
0-495-01525-3, 1024 stran,  
© 2006/2007, cena knihy v měkké  
vazbě GBP 40, nově ve vazbě pev-  
né, \$155,95, jako eBook: \$77,99.

Je pozoruhodné, jak málo autorů se pustilo do učebnice k disciplíně, kterou můžeme nazvat biologická chemie. Dnešní doba, která dychtí po bezpečnějších a nových a nových lékových substancích a v obecném hledisku po prodloužení a zkvalitnění života a která si začala hrát s genetickou výbavou člověka potřebuje odborníky, kteří nejenže rozumí biologii, biochemii, medicíně a genetice, ale zejména (a to zahrnuje i výše jmenované) rozumí organické chemii, jako jejich molekulární základně.

McMurryho učebnice, vydaná v brožovaném vydání vloni, která vychází letos i v pevné vazbě a s celou řadou knižních i elektronických souputníků, je kandidátem na stupně vítězů v pomyslné soutěži knih o biologické chemii. Biologická chemie totiž nejenže nepřináší chemii do biologie, ale vrací se k tomu, co bylo kdysi nazváno molekulární biologie a co se tomu molekulárnímu již mnohdy vzdálilo – chemickému popisu fungování přírody. Jak je již zvykem, je napsána příjemně, dobře technicky zvládnuta v barvě a je jen málo co, co se jí dá vytknout. Autor, John E. McMurry (Získal bakalářský titul na Harvardově universitě a Ph.D. na Columbia University. Je poctěn „fellowship“ v American Association for the Advancement of Science a Alfred P. Sloan Research Foundation. Napsal řadu knih o organické chemii.) je znám svým stylem, jenž si studenti oblíbili, John McMurry vidí v této knize chemii jinak. Vidí biologické a přírodní souvislosti a zamýšlí se nad jejich důsledky.

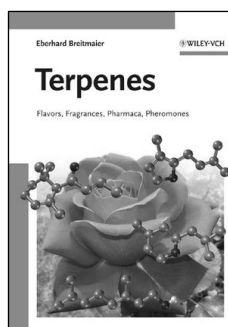
Výčet témat knihy mluví za vše: Struktura a chemická vazba, kyseliny a báze, organické reakce, stereochemie, určování struktury (MS, IR, UV), po přehledu základní systematiky organické chemie přicházejí aminokyseliny, peptidy a proteiny, cukry, lipidy, nukleové kyseliny a sekundární metabolity jako úvod do chemie přírodních látek, vždy doplněné zmínkou o metabolismu.

Cosí, co následovalo po šestém vydání slavného „McMurryho“ je tím, co opět potěší nestora české chemické pedagogiky, prof. Pacáka. Na nějakých 1000 stranách s mnoha obrazy a schématy, 3D-modely nám autor přináší lehký a čerstvý pohled na dobrý základ biologické chemie s mnoha důležitými konotacemi k naukám o živé přírodě, přemyslu a životnímu prostředí.

Pan John E. McMurry se však dopouští nectnosti

téměř charakteristické pro americké učebnice této řady (srovnej např. John E. McMurry, Eric E. Simanek: Fundamentals of Organic Chemistry). Tato učebnice totiž malinko pokulhává, pokud se týče ztvárnění chiralit a jejich aspektů, zejména v reflexi pravidel a doporučení IUPAC. Nicméně, lze ji i tak doporučit jako dobrý zdroj informací pro studenty organické chemie i biochemie a příbuzných disciplín.

*Pavel Drašar*



Eberhard Breitmaier

**Terpenes: Flavors,  
Fragrances, Pharmaca,  
Pheromones**

Vydal J. Wiley-VCH, v srpnu 2006.  
Pevná vazba, 223 stran,  
cena € 52.50.  
ISBN: 978-3-527-31786-8

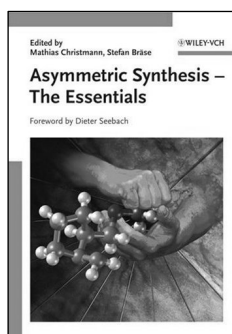
Tento kompaktní přehled chemie terpenů a jejich použití pokrývá jak strukturní aspekty široké skupiny přírodních isoprenoidů, jejich zdroje, biologické a farmakologické vlastnosti a u vybraných látek ukazuje též možnosti totální a průmyslové syntézy.

Tato, dalo by se říci, skromná příručka o terpenech pro „začátečníky“ přináší dobrý přehled základních informací z této oblasti chemie přírodních látek. Hlavní součásti, resp. jejich výčet poskytnou dostatečný obrázek: Význam, struktury a biosyntéza terpenů; Hemi-, mono-, sesqui-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny; Biologické, olfaktorické a farmakologické vlastnosti; vybrané syntézy terpenů; Izolace a určování struktur v chemii terpenů. Je vybavena m.j. sekcí o biogenezi, polycyklických terpenech, ginkgoloidech, neohopanech, ba i o kanabinoidech.

Knih se hodí pro studenty či začínající odborníky v oblasti chemie přírodních látek, biochemie, biologie a farmacie, či obecně pro kohokoliv, kdo se o problematiku zajímá. Kniha je dobře vyvedena, tisk i sazba si nezasluhují negativních připomínek. Užitečnou příručku lze jen doporučit.

Autor, Eberhard Breitmaier získal PhD na Universitě v Tübingen, v Německu, jako člen týmu Ernsta Bayera. Po stáži v University of Houston se vrátil do Tübingen. Získal profesuru v oboru organické a analytické chemie na Univerzitě v Bonnu. Je autorem mnoha publikací a několika učebnic o NMR-spektroskopii, organické chemii a přírodních látkách.

*Pavel Drašar*



Christmann, Mathias /  
Bräse, Stefan (ed.)

### Asymmetric Synthesis - The Essentials

Vydal Wiley-VCH, Weinheim,  
1. vydání, říjen 2006.  
346 stran, brožovaná vazba,  
cena 89 eur  
ISBN-10: 3-527-31399-0

Zajímavý sborník pokrývající širší asymetrické katalýzy aplikované v kontextu soudobé chemie, který přináší dobrý přehled stavu v oblasti. Knižka je také příručkou "Who's who" autorů z oboru, ale pohřbu pouze s domicilem v Anglii, Dánsku, Francii, Japonsku, Německu, Nizozemsku, Švýcarsku a USA, jakoby se jinde v této oblasti chemie nic nedělo. Redaktoři ale takové právo výběru mít musí. S předmluvou od Dietra Seebacha přináší kniha 59 příspěvků od vedoucích osobností asymetrické syntézy, včetně (a proto usiluje o titul "Who's who") životopisů 87 autorů.

Kniha je rozdělena do pěti oddílů: Nástrojem řízené asymetrické syntézy, Asymetrická katalýza, Bioinspirovaná katalýza, Asymetrická syntéza přírodních látek a konečně Asymetrická syntéza v průmyslu.

Počínaje základními koncepcemi asymetrické syntézy s použitím diastereoselektivních metod a asymetrické katalýzy se ohnisko obrací k jejich použití v syntéze přírodních látek a, jak bylo výše řečeno, v průmyslu, což je chvályhodné. Studenti vyšších cyklů, výzkumníci a průmysloví chemici naleznou v knize jistě plno inspirace pro práci a náplně pro výuku.

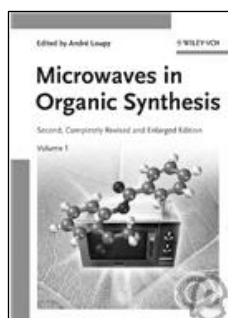
V dnešní době, kdy hodně produktů chemického a farmaceutického průmyslu jsou chirální látky, je taková příručka mimořádně cenná. Po thalidomidové aféře v polovině minulého století to ani jinak nejde nikde kolem nás, jmenujme např. v potravinářském, farmaceutickém, voňavkářském průmyslu, v zemědělské a lesnické chemii atd atd.. Naštěstí, posledních několik let zažívá významný pokrok v metodách užívajících biokatalýzu, organo- a organokovovou katalýzu, a podobné metody, přispívající k tomu, že používané metody jsou efektivnější, ekonomičtější, ale i přátelštější k životnímu prostředí.

Kniha je zajímavá i tím, že přináší názory vědců na jimi zpracovanou tematiku.

Výsledkem je užitečné shrnutí východisek a metod pro chemii přírodních látek, lékových substancí, agrochemikálií, ale i biokatalýzu, které by nemělo chybět v knihovně žádného organického či farmaceutického chemika v laboratoři či průmyslu.

Autoři, pánové Mathias Christmann pracují jako „assistant professor“ na univerzitě v Aachen a Stefan Bräse jako výzkumník na univerzitě v Karlsruhe.

*Pavel Drašar*



Loupy André (ed.):

### Microwaves in Organic Synthesis

Vydal Wiley-VCH, Weinheim,  
2. kompletně přepracované a o 30 %  
rozšířené vydání, 2 díly, pevná vazba,  
1007 stran. Cena 299 eur  
ISBN-10: 3-527-31452-0

Přepracovaná příručka přináší zřejmě vše, co chemik potřebuje vědět o tomto dramaticky se rozvíjícím oboru, včetně novinek, jako je použití iontových kapalin, syntéza cukrů, multikomponentních reakcí, syntézy peptidů na pevné fázi až k, jak by dnes jinak, uhlíkatým nanotrubicím a fullerenům.

Kniha se dále podrobně zabývá tématy jako interakce materiálů s mikrovlnami a jejich dielektrické vlastnosti, vývoj a navrhování laboratorních mikrovlnných zařízení, použití tlakových nádob, netermální efekty mikrovln v organické syntéze, selektivita reakcí, katalýza s fázovým přenosem, reakce na nosičích, heterocyklická chemie, cykloadice, katalýza, chemie polymerů, reakce katalyzované přechodovými kovy, kombinatoriální syntéza, radiochemie, fotochemie a extrakce vonných olejů.

Autor, či spíše redaktor, André Loupy pracuje v Universitě Paris-Sud, Orsay, Francie a kromě této knihy se podílel na řadě úspěšných titulů.

Od prvního praktického zavedení kuchyňské mikrovlnné trouby na trh v roce 1955 zažila oblast praktického použití mikrovln k „vaření“ exponenciální rozvoj. V roce 1981 byla pak publikována první práce o použití mikrovln v organické chemii. Dnes najdeme v literatuře přes 2500 prací, které se touto tematikou zabývají. Je sympatické, že kniha je m.j. ovlivněna též mezinárodní spoluprací v rámci akce COST D32 *Chemistry in High Energy Environment*. I tím může být způsobeno příjemné zjištění, že mezi 51 autory podílejících se na knize, najdeme i odborníky z naší kotline, pp. Vladimíra Církvu, Milana Hájka a Petra Klána, ostatní autoři reprezentují pak „všechny kouty světa“.

Kniha je velmi přehledně uspořádána, opatřena kvalitními rejstříky, vypravena dobrým materiálem obrazovým, schémata a vzorce následují doporučení IUPAC, knize nelze zřejmě nic vytknout. Patří do knihovny každého zvědavého organického chemika, ale i potravináře, farmaceutického chemika či voňavkáře.

*Pavel Drašar*



# Invited Lecture Series

Topic: Biology Oriented Synthesis

## Biology Oriented Synthesis

In the lecture the trains of thought leading to the Biology Oriented Synthesis concept will be detailed, including the development of a Structural Clustering of Natural Products (SCONP) in a tree-like arrangement and its combined use with Protein Structure Similarity Clustering (PSSC) as hypothesis generators for the development of NP-derived and –inspired collections, the chemical feasibility of their synthesis on the solid phase and in solution and the investigation of these compound collections in selected biochemical and biological assays.

**Speaker: Professor Herbert Waldmann**

MPI of Molecular Physiology, Dortmund, Germany

ÚOCHB AV ČR, v. v. i.

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

Lecture Hall 10:00 am



# Invited Lecture Series

Topic: Organic Synthesis

## Advances in Transition Metal Lewis Acid – Mediated and Catalyzed Reactions

New powerful applications in asymmetric synthesis and catalysis have put half-sandwich complexes of the type  $MCpL_n$  and  $M(\text{arene})L_n$  into the limelight. Efficient synthetic access and new ligands are instrumental to further development and new applications. This lecture will focus on several aspects of the synthesis of electron-poor half sandwich complexes. The 16-electron half-sandwich complexes  $CpM(P^*P)]^+$  ( $M = Fe, Ru$ ) and  $[IndRu(P^*P)]^+$  where  $P^*P$  are electron poor bidentate fluoroaryl-phosphinite ligands are efficient catalysts for asymmetric [4+2] cycloaddition reactions between enals and dienes.

**Speaker: Professor E. Peter Kündig**

Department of Organic Chemistry,  
University of Geneva, Switzerland

ÚOCHB AV ČR, v. v. i.

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

Lecture Hall 10:00 am

OBSAH		CONTENTS	
<b>ÚVODNÍK</b>	189	<b>EDITORIAL</b>	189
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC</b>	190	<b>Modern Stationary Phases for RP-HPLC</b>	190
D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská a M. Zvolánková		D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, and M. Zvolánková	
<b>Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou</b>	200	<b>Determination of Free Amino Acids in Biological Fluids Using Capillary Electrophoresis</b>	200
P. Tůma a E. Samcová		P. Tůma and E. Samcová	
<b>Moderní trendy syntézy nanoporézních materiálů</b>	208	<b>Recent Trends in the Synthesis of Nanoporous Materials</b>	208
A. Zukal		A. Zukal	
<b>CENA MERCK</b>		<b>MERCK PRIZE</b>	
<b>Analýza makerů pro charakterizaci destilátů</b>	217	<b>Analysis of Markers for Characterization of Distillates</b>	217
M. Korhoňová, R. Hejdová, P. Barták, P. Bednář a L. Čáp		M. Korhoňová, R. Hejdová, P. Barták, P. Bednář, and L. Čáp	
<b>Automatická spektrální dekonvolúcia na analýzu reziduí pesticídov metódou rýchlej GC-MS</b>	220	<b>Automated Mass Spectral Deconvolution for Pesticide Residues Analysis by Fast GC-MS</b>	220
M. Kirchner, S. Ondreková a E. Matisová		M. Kirchner, S. Ondreková, and E. Matisová	
<b>Využití elektrochemických technik pro analýzu biologických vzorků</b>	225	<b>Utilizing Electrochemical Techniques for Detection of Biological Samples</b>	225
O. Zítka, K. Stejskal, A. Kleckerová, V. Adam, M. Beklová, A. Horna, V. Šupálková, L. Havel a R. Kizek		O. Zítka, K. Stejskal, A. Kleckerová, V. Adam, M. Beklová, A. Horna, V. Šupálková, L. Havel, and R. Kizek	
<b>Validácia metódy stanovenia kadmia metódou ETA-AAS</b>	232	<b>Validation of ETA-AAS Method of Cadmium Determination</b>	232
S. Fándlyová, O. Hegedús a A. Hegedúsová		S. Fándlyová, O. Hegedús, and A. Hegedúsová	
<b>Analýza fosfolipidových biomarkerů plynovou chromatografií</b>	236	<b>Analysis of Phospholipids Biomarkers by Gas Chromatography</b>	236
S. Opluštil, D. Chrastina, M. Rulík, P. Barták, P. Bednář a L. Čáp		S. Opluštil, D. Chrastina, M. Rulík, P. Barták, P. Bednář, and L. Čáp	
<b>Využití iontových kapalin pro separaci látek v plynové chromatografii</b>	241	<b>Using Ionic Liquids for Separation in Gas Chromatography</b>	241
M. Zapadlo, E. Benická, J. Mydlová, K. Vítková a J. Krupčík		M. Zapadlo, E. Benická, J. Mydlová, K. Vítková, and J. Krupčík	
<b>Studium indukovaného cirkulárního dichroismu v komplexech porfyrinů a poly(L-glutamové kyseliny)</b>	246	<b>The Study of Induced Circular Dichroism in the Porphyrin-Poly(L-glutamic acid) Complexes</b>	246
O. Julínek a M. Urbanová		O. Julínek and M. Urbanová	
<b>UV spektrální a elektromigrační charakteristiky imidazolových ribosidů</b>	250	<b>Spectral and Electro-migration Characteristics of Imidazole Ribosides</b>	250
P. Vyskočilová, P. Horník, D. Friedecký a T. Adam		P. Vyskočilová, P. Horník, D. Friedecký, and T. Adam	
<b>RECENZE</b>	255	<b>BOOK REVIEWS</b>	255

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 101 (2007), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 131, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 117 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2007 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plné předplatné 2006 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2006 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 28.2.2007.**