

## Chemické inženýrství a Chemické listy

Zcela jistě není běžné začít úvodník Chemických listů připomenutím, co se vlastně pod názvem jedné z důležitých disciplín v chemických vědách skrývá. Nehodlám se rovněž pouštět do diskusí na téma, co všechno do chemického inženýrství patří a co nikoliv. Jsem nicméně udiven, že se ještě stále setkávám s názorem, že totiž chemické inženýrství je něco jako aplikovaná chemie, kde nejde o nic jednoduššího, než přenést co nejrychleji skvěle vymyšlený a ve zkumavce ověřený nápad klasického chemika do měřítka vhodného pro průmyslovou výrobu. Pravdou je, že obor chemické inženýrství, původně vzniklý v Anglii, se rozšířil v kontinentální Evropě v období obrovského rozvoje chemického průmyslu po druhé světové válce právě jako reflexe faktu, že úzké specializace technologa či organického chemika nebyly s to integrovat širokou škálu přírodovědných a inženýrských znalostí potřebných pro projektování složitých a velkokapacitních chemických procesů. Jako jedna z novějších inženýrských disciplín (ve srovnání např. s dlouholetou tradicí stavebního, strojního či elektrotechnického inženýrství) je chemické inženýrství vnímáno jako hybridní obor, využívající nejen chemii, fyziku a matematiku, ale v poslední době velmi intenzivně rovněž biologii. Zde je třeba zdůraznit, že chemické inženýrství nikdy nebylo a není pouhou kombinací nebo jednoduchou aplikací těchto oborů. Složitost jevů odehrávajících se v průmyslových aparátech vedla chemické inženýry k vývoji zcela nových koncepcí a metod vyžadujících nejen hluboké znalosti všech výše zmíněných disciplín, ale vedoucích k jejich významnému obohacení. Zmínil bych zde alespoň revoluční přístup z počáteční fáze vývoje oboru, konkrétně rozklad složitých průmyslových procesů na základní jednotkové operace (např. rektifikace, extrakce, absorpce apod.), jejichž univerzálnost umožňovala obecnější řešení praktických problémů, bez ohledu na typ procesu či druh produktů. Paradigma jednotkových operací, spolu s novějšími koncepcemi přenosových jevů a vícefázových toků za současné interakce chemicky reagujících složek, určilo ostatně základní směry výzkumu v chemickém inženýrství ve 20. století.

Nejsem rovněž povolán k tomu, abych kriticky hodnotil příspěvek českého (nebo československého) chemického inženýrství k rozvoji oboru. Ač mi pojem národní hrdosti není cizí, jsem vždy spíše podezřívavý při používání pojmu typu „česká škola v něčem“, kam se za „něco“ často dosazuje cokoli z vědy, techniky, kultury nebo sportu. Proto také občas používaný pojem „české školy v chemickém inženýrství“ беру s určitou rezervou. Na druhé straně musím říci, že řada chemicko-inženýrských aktivit v socialistickém Československu měla velmi dobrý mezinárodní ohlas a navzdory obtížné politické situaci se prosadila přinejmenším na evropské scéně. Je nesporným faktem, že československé chemické inženýrství hrálo vedoucí roli mezi zeměmi tehdejšího sovětského bloku. Této situaci významně napomáhaly mezinárodní kongresy chemického

a procesního inženýrství CHISA, které umožňovaly neocenitelné kontakty našich chemických inženýrů s kolegy ze západní Evropy i zámoří. Dnes již takřka pětadvacetiletá tradice kongresů (první mezinárodní kongres se konal v r. 1962 v Brně) je ojedinělým příkladem životaschopnosti akce, která začala na národní úrovni už v polovině padesátých let minulého století. Je s podivem, že v době, kdy většina významných vědeckých konferencí stále mění místo svého konání a snaží se tak uplatnit i „turistický“ aspekt, zájem o kongresy CHISA, pořádané již přes 30 let na stejném místě (v Praze), rozhodně neklesá. Kromě tradice, dobře strukturovaného programu a kvalitní organizace zde významnou roli bezesporu sehrává i pražský genius loci.

Hlavním organizátorem mezinárodních kongresů a národních konferencí CHISA (akronym vznikl z původního českého názvu chemické inženýrství, strojírenství a automatizace), jakož i dalších aktivit národní chemicko-inženýrské komunity, je Česká společnost chemického inženýrství (ČSCH), založená v roce 1956 jako Odborná skupina chemického inženýrství při České společnosti chemické. ČSCH sdružuje nejen odborníky s chemickým, ale i strojním, matematickým, případně dalším zaměřením, zabývající se používáním, řízením, projektováním, konstruováním, výrobou, výzkumem a vývojem procesů a aparátů chemické, potravinářské, biochemické a obecně procesní technologie. ČSCH je rovněž zakládajícím členem Asociace českých chemických společností a členem Evropské federace chemického inženýrství – více o ČSCH viz [www.cschi.cz](http://www.cschi.cz).

Chemicko-inženýrské aktivity na evropské úrovni koordinuje již zmíněná Evropská federace chemického inženýrství (EFCE). Tato instituce, založená v r. 1953, je v současné době tvořena 42 členskými společnostmi z 28 států a reprezentuje více než 100 000 chemických inženýrů z celé Evropy – viz [www.efce.info](http://www.efce.info). Těžiště práce federace je v oborových pracovních skupinách a mezioborových kécích, které sdružují takřka tisícovku odborníků z výzkumné i průmyslové sféry. ČSCH vstoupila do EFCE v r. 1966 jako první země z tehdejšího východního bloku a již tehdy se její členové podle možností účastnili činnosti v pracovních skupinách. Fakt, že jsem byl před nedávnem zvolen do čela EFCE jako vůbec první prezident ze zemí střední a východní Evropy, je především nesporným oceněním historické i současné role našeho chemického inženýrství a dlouholeté práce celé řady členů ČSCH.

V závěru bych se rád dotkl ještě jednoho chemicko-inženýrského problému, totiž absence oborových článků v Chemických listech. Opět se nebudu pokoušet o objektivní rozbor situace, ale pokusím se komentovat svůj osobní vztah k tomuto časopisu. Musím předeslat, že jsem velmi rád, že se daří zajistit pro něj trvale udržitelný rozvoj (cituji nedávný úvodník prof. B. Kratochvíla): jde o periodikum s uctyhodnou tradicí i živou současností a bylo by alarmující, kdyby bylo vážně ohroženo zánikem. Listuji

každým číslem, pravidelně čtu velmi zajímavé úvodníky a samozřejmě také Bulletin Asociace českých chemických společností. Sám nicméně vnímám Chemické listy především jako časopis chemický, byť znám některé kolegy kteří zde publikovali docela zajímavé články (především přehledové) s chemicko-inženýrskou problematikou. Na druhé straně jsem si při jejich čtení vždy kladl otázku, proč články nezkusili nejprve prosadit v nějakém skutečně mezinárodním časopise. To není nic proti Chemickým listům, ale česká chemicko-inženýrská komunita je příliš malá (např. ve srovnání s chemickou) na to, aby články měly nějaký širší dopad. Impaktní faktor Chemických listů zde nehraje takovou roli (hodnota IF pro kvalitní mezinárodní časopisy v mém oboru je zhruba čtyřnásobná), ale citovanost chemicko-inženýrských článků publikovaných v českém jazyce je zanedbatelná. Jakkoliv nejsem přítelem mechanické scientometrie, nemohu zcela ignorovat předepsanou

metodiku hodnocení kvality vědeckých institucí. Také proto jsem jako bývalý ředitel jednoho z ústavů AV ČR podporoval v první řadě publikace pracovníků ústavu v renomovaných mezinárodních časopisech. Chemické listy takovým časopisem jistě nejsou a asi nikdy nebudou – to však není pražádný důvod pro zpochybnění jejich existence. Mají široké čtenářské spektrum i mimo oblast výzkumu a vývoje, mají snahu etablovat se jako národní publikační fórum průmyslové chemie (snad to nalezne příslušnou odezvu), jejich ediční plán na r. 2006 reflektuje žádanou interdisciplinaritu a v neposlední řadě udržují kontinuitu českého jazyka v klasických chemických oborech. Pevně doufám, že se jim bude dařit i nadále, bez ohledu na množství publikovaných článků z oboru s názvem chemické inženýrství.

Jiří Drahoš  
předseda ČSCH

## ON-LINE PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

JANA HORÁKOVÁ, VÍTĚZSLAV MAIER  
a JURAJ ŠEVČÍK

*Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého  
Olomouc, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc  
jana.horakova@post.cz, maierv@email.cz,  
sevcik@prfnw.upol.cz*

Došlo 12.1.05, přepracováno 15.2.05, přijato 24.3.05.

---

**Klíčová slova:** kapilární elektroforéza, on-line prekoncentrace, zakoncentrování, sweeping, izotachoforéza

---

### Obsah

1. Úvod
2. On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů
  - 2.1. Zakoncentrování vzorku zesílením pole – (field amplified sample stacking – FASS)
  - 2.2. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu – (large volume sample stacking – LVSS)
3. Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek
  - 3.1. Nametení – (sweeping) ionizovatelných a hydrofóbních analytů
4. Přechodná izotachoforéza – (transient isotachopheresis – tITP)
5. Závěr

### 1. Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je účinná mikrokolonová separační technika s vysokou prostupností vzorku (tzv. high throughput separation technique), vhodná pro separaci velké řady analytů v různých matricích. Velkou nevýhodou kapilární elektroforézy je obvykle nízká koncentrační citlivost v porovnání s kapalinovou chromatografií jako nejčastěji používanou srovnatelnou technikou<sup>1</sup>. Důvodem nízké koncentrační citlivosti je dávkování velmi malých objemů vzorku (řádově jednotky až desítky nanolitů) a u spektrálních detektorů krátká absorpční dráha detekčního paprsku (shodná s vnitřním průměrem použité kapiláry).

V posledních letech se stále častěji objevuje snaha zvýšit citlivost stanovení prováděných technikou kapilární elektroforézy. Možností, jak zvýšit citlivost detekce v kapilární elektroforéze, je poměrně mnoho, přes obtížné konstrukční řešení detektorů a s tím související ekonomickou zátěž, až po elegantní techniky realizované prostřed-

nictvím změn elektrického a chemického pole přímo v kapiláře, které umožní zakoncentrovat složky analytu do velmi úzkých zón. Výsledkem je zvýšení koncentrace analytu v kapiláře před vlastní detekcí.

Trendem dnešní instrumentace je provést rychlou a jednoduchou analýzu s co nejmenším počtem úprav a operací se vzorkem. Sofistikované on-line prekoncentrační techniky tyto požadavky velmi dobře splňují. Díky znalostem dějů, které doprovázejí elektromigraci, je možno vyvíjet velmi účinné on-line prekoncentrace.

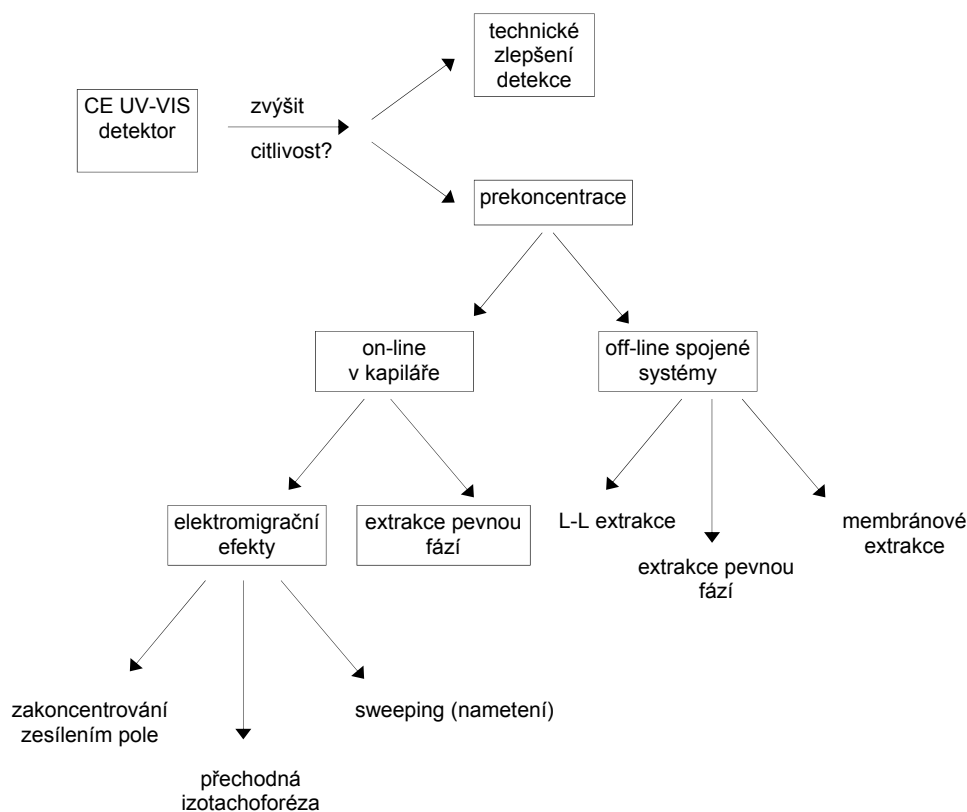
Alternativní možnosti k on-line prekoncentracím jsou úpravy konstrukce detektorů, využití jiných detekčních technik (laserem indukovaná fluorescence – LIF, hmotnostní spektrometrie – MS, elektrochemická detekce), derivatizace atp. Tyto možnosti jsou však technicky náročnější a ekonomicky méně výhodné než on-line prekoncentrace<sup>2</sup>.

On-line (on-capillary) prekoncentrace představují dostupnější možnost zvýšení citlivosti nežli použití jiného než UV-VIS detektoru nebo konstrukčně složitých modifikací detekční cely (případně detekčního okénka). Prekoncentrace analytů on-line v kapiláře během nadávkování a separace analytů je často označována jako zakoncentrování – stacking. Tento jev byl poprvé popsán Tisseliem v polyakrylamidové gelové elektroforéze<sup>3</sup>. Zakoncentrování – stacking může být uskutečněno jak při využití hydrodynamického, tak i elektrokinetického nástřiku.

Tento přehledný článek poukazuje na možnosti použití „on-capillary“ a „on-line“ technik k prekoncentracím celé řady analytů, které jsou pak separovány některou z technik kapilární elektroforézy (kapilární zónová elektroforéza – CZE, micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC). Zmíněné možnosti jsou přehledně vyobrazeny na obr. 1. (cit.<sup>1</sup>).

### 2. On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů

Kapilární elektroforéza je často používána pro separace analytů, které podléhají ionizačním rovnováhám (disociace, protonizace, asociace, komplexace). Rychlost migrace je pak ovlivnitelná změnou některých vlastností pracovního elektrolytu (pH, vodivost, teplota atp.). I malá změna těchto vlastností může vést ke generaci prekoncentračního mechanismu. Neexistuje ostrá hranice mezi jednotlivými prekoncentračními mechanismy, ale zjednodušeně lze říct, že pro on-line prekoncentraci ionizovatelných analytů lze využít následující principy: zakoncentrování vzorku zesílením pole – field amplified sample stacking (FASS), přechodná izotachoforéza – transient isotachopheresis (tITP), zakoncentrování pomocí organického rozpouštědla např. acetonitrilu – acetonitrilový stacking,



Obr. 1. Schéma prekoncentrací v kapilární elektroforéze

samozakoncentrování vzorku – sample self-stacking, přechodné pH rozhraní – dynamic pH junction, nametení – sweeping atd. Tyto principy umožní dávkování většího objemu vzorku do kapiláry (omezení představuje délka kapiláry) a následné zakoncentrování nadávkovaného analytu do velmi úzké zóny před vlastní separací. Přehledných článků zabývajících se problematikou on-line prekoncentrací ionizovatelných analytů je celá řada<sup>4-6</sup>.

### 2.1. Zakoncentrování vzorku zesílením pole (field amplified sample stacking)

Zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS) je jednou z velmi často používaných technik prekoncentrace, jejíž princip je znám již několik let. Podstata spočívá v interakci elektrického silového pole (vkládaného napětí mezi konce kapiláry) a pole koncentračního. Koncentrační pole je generováno díky různé vodivosti (koncentraci) pracovního elektrolytu a nadávkované zóny vzorku<sup>7-10</sup>.

Nejjednodušší možností jak zvýšit citlivost detekce je využít dnes již standardní postup rozpuštění vzorku pro analýzu v desetkrát zředěném pracovním elektrolytu nebo ve vodě. Při aplikaci stejnosměrného elektrického pole

dojde díky rozdílným vodivostem zón pracovního elektrolytu a zóny vzorku (zóna vzorku má nižší vodivost) k zakoncentrování dávkované zóny. V obou zónách je pak jiná hodnota intenzity elektrického pole (v zóně vzorku je vyšší). Důsledkem toho je rozdílná rychlost migrace analytů v obou zónách (analyty v zóně vzorku migrují rychleji). Na rozhraní obou zón tak dojde k zakoncentrování analytů vlivem zpomalení rychlosti migrace. Separace pak probíhá klasickým mechanismem kapilární zónové elektroforézy (CZE), ale s užší počáteční zónou vzorku.

FASS se samozřejmě dá uskutečnit i pomocí současné změny pH a vodivosti zón vzorku a pracovního elektrolytu. Pokud to povaha analytů umožňuje, lze vzorek okyselit nebo naopak zalkalizovat přidávkem kyseliny nebo hydroxidu. Dojde tak ke změně pH a k ovlivnění ionizační rovnováhy analytů. Na hodnotě pH je silně závislá efektivní mobilita analytů, což vede k vytvoření podmínek pro odlišnou rychlost migrace analytu v nadávkované zóně vzorku a v zóně pracovního elektrolytu. Tento způsob prekoncentrace je využíván pro analýzy celé řady analytů s rozdílným acidobazickým chováním.

Většina publikovaných prací o zakoncentrování ionizovatelných analytů uvádí dosažení deseti- až tisícnásobného zesílení signálu analytu, což umožnilo techni-

ce kapilární zónové elektroforézy proniknout i do oblasti separace a kvantifikace velmi nízkých koncentrací analytu ( $10^{-7}$ – $10^{-8}$  mol  $l^{-1}$ ) za použití běžného UV-VIS detektoru<sup>11–14</sup>.

Tento jednoduchý přístup umožňuje nadávkování pouze optimální nástřikové délky (tj. ne větší než 2 % délky kapiláry), protože v opačném případě dojde ke ztrátě separační účinnosti. V literatuře je tento nejjednodušší způsob označován jako přirozené zakoncentrování (normal stacking mode, NSM)<sup>15–17</sup>. Pokud je nadávkované množství vzorku větší než je optimální nástřiková délka v NSM, je nutné, aby matrice vzorku naopak migrovala ven z kapiláry nástřikovým koncem. Tento způsob je označován jako zakoncentrování vzorku z velkého objemu (large volume sample stacking, LVSS). „Pumpování“ matrice ven z kapiláry při dávkování může být zajištěno buď pomocí elektroosmotického toku nebo použitím externího tlaku. Směr toku matrice musí být opačný než migrace dávkovaných analytů a velikost obráceného toku musí být větší než je rychlost migrace dávkovaných analytů. Nevýhodou tohoto způsobu prekoncentrace je možnost fokusovat buď jenom kationty nebo jenom anionty během jedné analýzy. Prekoncentrační faktor se v tomto případě pohybuje většinou kolem stonásobku zesílení signálu analytu.

Mezi techniky, které využívají změny ve vodivostech zón dávkovaného vzorku patří i metody využívající techniky, kdy se vzorek rozpustí ve 30% (v/v) vodném roztoku acetonitrilu s přidávkou anorganické soli o vysoké koncentraci. Tento přístup se dá velmi dobře uplatnit při analýzách biologických vzorků, které už obsahují potřebnou koncentraci chloridu sodného<sup>18–22</sup>.

## 2.2. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu (Large volume sample stacking)

Zakoncentrování s přepínáním polarit y vychází z rozpuštění vzorku v základním elektrolytu nebo rozpouštědla tak, aby měl nízkou vodivost. Dávkování je hydrodynamické a mnohem delší než v případě NSM. Po nástřiku dlouhé zóny vzorku do kapiláry nastává fáze přepólování polarit y zdroje na opačnou polarit u, než jaká bude použita pro vlastní separaci. Tím dochází k migraci matrice ven z kapiláry a analyty se zakoncentrují ve formě úzké zóny na počátku kapiláry. To znamená, že polarit a pro odstranění matrice při zakoncentrování je volena podle znaménka náboje separovaných analytů. Do pracovního elektrolytu se přidává většinou aditivum, které obrací směr elektroosmotického toku (např. kationtový tenzid). V momentě, kdy hodnota protékajícího proudu vzroste na 90–99 % hodnoty běžné pro základní elektrolyt bez aditiva, je polarit a změněna tak, aby elektroosmotický tok protékal směrem k detektoru<sup>23</sup>.

I přesto, že některé komerční přístroje neumožňují měnit polarit u, je možné LVSS bez přepínání polarit y uskutečnit. Nicméně je tento přístup málo používaný pro nedostatečnou opakovatelnost a obtížné technické provedení.

Zakoncentrování (stacking) s využitím elektrokinetického dávkování poprvé popsali Chien a Burgi<sup>7</sup>. Teoretické základy jsou uvedeny v práci Chiena<sup>9</sup>. Vzorek je rovněž připraven tak, aby měl nízkou vodivost. Následně je proveden elektrokinetický nástřik, který zajišťuje selektivní dávkování buď jenom kationtů, nebo jenom aniontů. Pokud je elektroosmotický tok v opačném směru oproti migraci nástřikovaných iontů, je nutné, aby rychlost elektroosmotického toku byla menší než rychlost migrace dávkovaných analytů. Zakoncentrování (stacking) při elektrokinetickém dávkování poskytuje větší navýšení citlivosti detekce, než nabízí hydrodynamický nástřik. To je vysvětleno skutečností, že u hydrodynamického nástřiku je velikost nástřiku limitována délkou kapiláry. V případě elektrokinetického dávkování tomu tak není, protože analyty migrují do kapiláry nezávisle na délce kapiláry. V tomto případě lze dosáhnout prekoncentračního faktoru víc než tisíc, což jsou nejvyšší hodnoty dosažitelné při LVSS pomocí hydrodynamického nástřiku<sup>24</sup>.

Dalším přístupem pro tzv. on-capillary (přímo v kapiláře) prekoncentraci analytů v kapilární zónové elektroforéze je tzv. přechodné pH rozhraní (dynamic pH junction). Využívá se skutečnosti, že efektivní mobilita slabě kyselých a slabě bazických analytů je silně závislá na pH základního elektrolytu. V kapiláře je možné navolit takový elektrolytový systém, který je obdobou systémů používaných při izoelektrické fokusaci, kde se místo amfolytů využívá základních elektrolytů o rozdílných hodnotách pH. Nejjednodušší provedení této techniky je využití rozdílných hodnot pH mezi dávkovanou zónou vzorku a základním elektrolytem (např. pH vzorku je o 1,5 jednotky menší než je pH základního elektrolytu)<sup>25,26</sup>, přičemž lze využít buď pufrů o stejném složení (pufr pro rozpuštění vzorku a základní elektrolyt obsahuje stejné složky, ale má jiné pH), anebo lze využít dvou pufrů o rozdílném pH a rozdílném složení<sup>27–29</sup>.

## 3. Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek

Některé ionizovatelné analyty se ovšem obtížně separují klasickou kapilární zónovou elektroforézou. Proto výhodou může být využití přidavku micelotvorných látek do základního elektrolytu (micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC), které i v případě nabitých analytů může poskytnout zajímavé ovlivnění selektivity. Principy zakoncentrování (stackingu) v micelární elektrokinetické chromatografii nabitých analytů jsou velmi podobné principům uvedených v citacích<sup>30–35</sup>.

### 3.1. Nametení (sweeping) ionizovatelných a hydrofóbních analytů

Rozdílné druhy aditiv přidávané k základnímu elektrolytu ovlivňují selektivitu. Nametení<sup>36</sup> (sweeping) je nový fenomén, který zlepšuje citlivost, ale podstata techniky vychází z interakcí analytu a micel (rozdělovací rovno-

váhy) podobně, jako je tomu v micelární elektrokinetické chromatografii.

Při technice „sweepingu“ se používá přídavku micelotvorných látek do základního elektrolytu, který je umístěn v elektrolytové nádobce na dávkovací straně kapiláry. Samotná kapilára, druhá elektrolytová nádobka a ani vzorek neobsahují použité micelotvorné činidlo. Analyty mají silnou afinitu pro speciální typy aditiv, zahrnující iontové nebo neiontové micely, cyklodextriny apod.<sup>37–43</sup>

Využívá se interakcí mezi analytem (ion, neutrální molekula) a tzv. pseudostacionární fází (PS), kterou může být některé z uvedených aditiv. Pseudostacionární fáze proniká do široké zóny vzorku a na tomto rozhraní dochází k nakoncentrování (nametení) vzorku. Rozsah prekoncentrace je určován součtem všech interakcí mezi analytem a PS fází. Systém umožňuje efektivní odstranění maticových nečistot. Tato technika poskytuje nízký detekční limit ( $10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup>).

Jednoduchá nebo složitá aditiva mohou být použita pod podmínkou, že kinetika interakce je rychlejší než kinetika elektroforetické relaxace, a výsledkem je zakoncentrování v úzkém pásu. Všeobecně se používají aniontové tenzidy (dodecyl sulfát sodný, SDS) k zakoncentrování neutrálních nebo kationtových analytů, kde délka fokusační zóny závisí na velikosti retenčního faktoru. Nametení (sweeping) ve většině případů probíhá optimálně, když vodivost vzorku je podobná vodivosti základního elektrolytu, ačkoliv může být také použita vyšší vodivost vzorku za předpokladu, že je nalezena vhodná délka nástřiku vzorku. Pro separaci některých aniontových analytů se za alkalických podmínek ke zlepšení nametení (sweepingu) používají kationtové nebo neiontové tenzidy. Za přítomnosti kationtového tenzidu musí být k potlačení elektroosmotického toku kapilára pokrytá. Pouze nabitě analyty mohou být separovány pomocí neutrální PS fáze<sup>44</sup>. Nejčastěji se využívají nabitě molekuly PS fáze, ale i neiontová PS fáze může poskytovat potřebnou separaci nabitých molekul. Rozdíl je v tom, že nabitě analyty vstupují do micel neutrální PS fáze a dochází analogicky k prekoncentraci.

Pokud má vzorek stejnou vodivost jako základní elektrolyt, uskuteční se nametení (sweeping) za využití homogenního elektrického pole. Jinou možností je použití vysokých koncentrací solí ve vzorku a nametení (sweeping) se uskuteční s využitím tzv. redukováného elektrického pole v zóně vzorku.

Doposud byla publikována celá řada prací zabývajících se prekoncentrací různých analytů v rozmanitých maticích s využitím „sweepingu“ mechanismu<sup>40,41,45–49</sup>.

Je možné využívat i kombinace dvou prekoncentračních mechanismů. Typickým příkladem je využití dynamického rozdílu v hodnotách pH elektrolytů (dynamic pH junction – sweeping). Tato metoda je založena na využití „sweepingu“ podmínek (základní elektrolyt s PS fází, vzorek bez PS fáze) a podmínky přechodného pH rozhraní – dynamic pH junction (rozdílné pH vzorku a pufru)<sup>26,30,50–51</sup>.

#### 4. Přechodná izotachofórze (tITP)

Izotachofórze (ITP) je založena na použití diskontinuálního elektrolytového systému, kdy analyty migrují podle své mobility v úzkých zónách za sebou mezi vedoucím (leading, LE) a koncovým (terminating, TE) elektrolytem. Pro prekoncentraci s využitím ITP mechanismu lze vycházet z Kohlrauschovy regulační funkce<sup>52–62</sup>.

Vhodnou kombinací dvou nebo více rozdílných pracovních elektrolytů v jedné separační kapiláře lze docílit jevu, který je označován jako přechodná izotachofórze (tITP). Tento jev je možno využít k prekoncentraci celé řady analytů<sup>63</sup>.

Nejčastěji jsou při tITP-CE analýze používány dva různé přístupy<sup>54</sup>.

- Jestliže je základní elektrolyt zvolen tak, že ko-ion má vyšší efektivní mobilitu než analyty, ITP migrace je dosažena pomocí vhodného koncového elektrolytu (může být použit místo základního elektrolytu anebo ho lze dávkovat jako zónu) za zónou vzorku. Ko-ion v tomto případě přebírá úlohu vedoucího elektrolytu. Vzorek je nadávkován hydrodynamicky a po vložení elektrického pole dojde k vytvoření přechodného ITP stavu. Po zakoncentrování je koncový elektrolyt vyměněn za základní elektrolyt a nastává separace pomocí CZE.
- Jestliže základní elektrolyt obsahuje ko-ion s nižší efektivní mobilitou než analyt, musí samotný vzorek být obohacen o vedoucí ion (např. pro separaci kationtů je možno použít K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>) k dosažení tITP. Ko-ion se pak chová jako koncový ion. To může být výhodou pro biologické vzorky, které často přirozeně obsahují dostatečné množství iontů s vysokou mobilitou pro uskutečnění ITP prekoncentrace. Alternativou je přídavek takovýchto solí do samotného vzorku.

Je možno oba mechanismy kombinovat. Velmi často je vlastní mechanismus tITP kombinací uvedených případů, protože lze využít přístupu (a) pro vzorky obsahující soli vysoce mobilních iontů.

Přechodná izotachofórze je velmi často používána pro prekoncentraci ionizovatelných analytů. Ve spojení s kapilární elektroforézou představuje účinný prekoncentrační systém, který byl použit pro zvýšení citlivosti stanovení celé řady analytů<sup>63–70</sup>.

#### 5. Závěr

Tento článek podává přehled o nejčastěji používaných on-line prekoncentračních technikách v kapilární elektroforéze. Autoři jsou si vědomi, že nelze podat úplný a vyčerpávající přehled všech doposud publikovaných prací týkajících se prekoncentrací. Úspěšnost zvoleného prekoncentračního mechanismu je mimo jiné silně závislá i na povaze a chování samotných analytů, případně složitosti

matrice. Použití on-line prekoncentrace je nutno volit po pečlivém uvážení všech faktorů, které by mohly ovlivnit její úspěšnost. Trendem posledních let je aplikovat on-line prekoncentrace na reálné vzorky s relativně složitou maticí pomocí kombinace uvedených základních prekoncentračních technik.

*Autoři děkují záměru č. MSM 6198959216 a grantu FRVŠ G6 3044/2005 za finanční podporu.*

## LITERATURA

1. Simonet B. M., Rios A., Valcarcel M.: Trends Anal. Chem. 22, 10 (2003).
2. Li S. F. Y.: *Capillary electrophoresis – principles, practice and applications*. Elsevier, Amsterdam 1994.
3. Hjertén S., Jersted S., Tiselius A.: Anal. Biochem. 11, 219 (1965).
4. Quirino J. P., Terabe S.: J. Chromatogr., A 902, 119 (2000).
5. Chien R. L., Burgi D. S.: Anal. Chem. 64, 1046 (1992).
6. Shihabi Z. K.: J. Chromatogr., A 902, 107 (2000).
7. Chien R. L., Burgi D. S.: J. Chromatogr. 559, 141 (1991).
8. Chien R. L., Burgi D. S.: J. Chromatogr. 559, 153 (1991).
9. Burgi D. S., Chien R. L.: Anal. Chem. 63, 2866 (1991).
10. Chien R. L., Helmer J. C.: Anal. Chem. 63, 1354 (1991).
11. Galli V., Barbas C.: Anal. Chim. Acta 482, 37 (2003).
12. Lohg Y. H., Hernandez M., Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Borrull F., Calull M., Hoogmartens J.: J. Chromatogr., B 784, 255 (2003).
13. Wey B. A., Zhang C. X., Thormann W.: J. Chromatogr., A 853, 95 (1999).
14. Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T.: J. Chromatogr., A 1032, 193 (2004).
15. Quirino J. P., Terabe S.: J. Chromatogr., A 781, 119 (1997).
16. Burgi D. S., Chien R. L.: J. Microcol. Sep. 3, 199 (1991).
17. Chien R. L., Burgi D. S.: Anal. Chem. 71, 995 (1999).
18. Shihabi Z. K.: J. Cap. Electrophor. 2, 267 (1995).
19. Shihabi Z. K.: J. Chromatogr., A 744, 231 (1996).
20. Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K.: J. Chromatogr., A 781, 35 (1997).
21. Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K.: J. Chromatogr., A 781, 491 (1997).
22. Shihabi Z. K.: J. Chromatogr., A 817, 25 (1998).
23. Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J. L.: J. Chromatogr., A 757, 281 (1997).
24. Zhang C.-X., Thormann W.: Anal. Chem. 68, 2523 (1996).
25. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: Anal. Chem. 72, 1242 (2000).
26. Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsuboty K., Chen D. D. Y., Terabe S.: J. Chromatogr., A 1013, 65 (2003).
27. Britz-McKibbin P., Kranack A. R., Paprica A., Chen D. D. Y.: Analyst 123, 1461 (1998).
28. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: Anal. Chem. 72, 1729 (2000).
29. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: Chromatographia 57, 87 (2003).
30. Britz-McKibbin P., Terabe S.: J. Chromatogr., A 1000, 917 (2003).
31. Wienberg R., Sapp E., Moring S.: J. Chromatogr. 516, 271 (1990).
32. Szucz R., Vindevogel J., Sandra P., Verhegen L. C.: Chromatographia 36, 323 (1993).
33. Farran A., Ruiz S., Serra C., Aguilar M.: J. Chromatogr., A 737, 109 (1996).
34. Wu H., Guan F., Luo Y.: Sepu (Chinese J. Chromatogr.) 13, 390 (1995).
35. Zhang C.-X., Thormann W.: Anal. Chem. 70, 540 (1998).
36. Quirino J. P., Terabe S.: Science 282, 465 (1998).
37. Quirino J. P., Terabe S.: Anal. Chem. 71, 1638 (1999).
38. Palmer J., Munro N. J., Landers J. P.: Anal. Chem. 71, 1679 (1999).
39. Kim J. B., Quirino J. P., Otsuka K., Terabe S.: J. Chromatogr., A 916, 123 (2001).
40. Quirino J. P., Terabe S., Otsuka K., Vincent J. B., Vigh G.: J. Chromatogr., A 838, 3 (1999).
41. Monton M. R. N., Quirino J. P., Otsuka K., Terabe S.: J. Chromatogr., A 939, 99 (2001).
42. Munro N. J., Palmer J., Stalcup A. M., Landers J. P.: J. Chromatogr., B 731, 369 (1999).
43. Otsuka K., Matsumura M., Kim J. B., Terabe S.: J. Chromatogr., A 979, 425 (2002).
44. Quirino J. P., Kim J.-B., Terabe S.: J. Chromatogr., A 965, 357 (2002).
45. Fang C., Liu J.-T., Lin C.-H.: Talanta 58, 691 (2002).
46. Otsuka K., Matsumura M., Kim J.-B., Terabe S.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 1861 (2003).
47. Kim J.-B., Otsuka K., Terabe S.: J. Chromatogr., A 912, 343 (2001).
48. Lin C.-E., Liu Y.-C., Yang T.-Y., Wang T.-Z., Yang C.-C.: J. Chromatogr., A 916, 239 (2001).
49. Wu C.-H., Chen M.-C., Su A.-K., Shu P.-Y., Chou S.-H., Lin C.-H.: J. Chromatogr., B 785, 317 (2003).
50. Britz-McKibbin P., Otsuka K., Terabe S.: Anal. Chem. 74, 3736 (2002).
51. Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsubota K., Chen D. D. Y., Terabe S.: J. Chromatogr., A 1013, 65 (2003).
52. Stegehuis D. S., Irth H., Tjaden U. R., van der Greef J.: J. Chromatogr., A 538, 393 (1991).
53. Foret F., Szoko E., Karger B. L.: Electrophoresis 14, 417 (1993).
54. Foret F., Szoko E., Karger B. L.: J. Chromatogr., A 608, 3 (1992).
55. Stegehuis D. S., Tjaden U. R., van der Greef J.:

- J. Chromatogr., A 591, 341 (1992).
56. Hanna M., Simpson C., Perrett D.: J. Chromatogr., A 894, 117 (2000).
57. Everaerts F. M.: *Graduation Report*. University of Technology, Eindhoven 1964.
58. Everaerts F. M.: *Thesis*. University of Technology, Eindhoven 1968.
59. Martin A. J. P., Everaerts F. M.: Anal. Chim. Acta 38, 233 (1967).
60. Haglund H.: Sci. Tools 17, 2 (1970).
61. Simpson C. F., Whittaker M.: *Electrophoretic Techniques*. Academic Press, London 1983.
62. Everaerts F. M., Verheggen T. P. E. M., Mikkers F. E. P.: J. Chromatogr. 169, 21 (1979).
63. Bocek P., Deml M., Gebauer P., Dolnik V.: *Analytical Isotachopheresis*. VCH, Weinheim 1988.
64. Okamoto H., Okamoto Y., Hirokawa T., Timerbaev A. R.: Analyst 128, 1439 (2003).
65. Ito K., Ichihara T., Zhuo H. A., Kumamoto K., Timerbaev A. R., Hirokawa T.: Anal. Chim. Acta 497, 67 (2003).
66. Riaz A., Kim B., Chung D. S.: Electrophoresis 24, 2788 (2003).
67. Hirokawa T., Ichihara T., Ito K., Timerbaev A. R.: Electrophoresis 24, 2328 (2003).
68. Hirokawa T., Ichihara T., Timerbaev A. R.: J. Chromatogr., A 993, 205 (2003).
69. Auriola S., Thibault P., Sadovskaya I., Altman E.: Electrophoresis 19, 2665 (1998).
70. Church M. N., Spear J. D., Russo R. E., Klunder G. L., Grant P. M., Andresen B. D.: Anal. Chem. 70, 2475 (1998).

**J. Horáková, V. Maier, and J. Ševčík** (*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*):  
**On-line Preconcentration Techniques in Capillary Electrophoresis**

Preconcentration is a very important issue for achievement of low detection limits. Various on-line preconcentration modes, various electrolyte compositions, pH values and mechanisms responsible for the focusing effect are described in literature. The main modes of stacking, sweeping and transient isotachopheresis are discussed. Some of the described methods are combinations of major techniques of preconcentration and less known focusing techniques. References for optimization of focusing conditions and routine use of on-line preconcentration are given.



## SINGLETOVÝ KYSLÍK V PRAXI – SOUČASNOST A PERSPEKTIVA

KAMIL LANG<sup>a</sup>, JIŘÍ MOSINGER<sup>a,b</sup> a DANA M. WAGNEROVÁ<sup>a</sup><sup>a</sup> Ústav anorganické chemie, Akademie věd České republiky, 250 68 Řež, <sup>b</sup> Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
lang@iic.cas.cz

Došlo 28.1.05, přijato 27.6.05.

Klíčová slova: singletový kyslík, senzitivace, fotosenzitivace, fotodynamický efekt

## Obsah

1. Úvod
2. Praktické aplikace
  - 2.1. Organická syntéza
  - 2.2. Fotomedicína
  - 2.3. Dezinfekce
  - 2.4. Úprava a čištění vody
  - 2.5. Pesticidy
  - 2.6. Chemický kyslíko-jodový laser
3. Škodlivé účinky singletového kyslíku
4. Singletový kyslík v atmosféře a v životním prostředí
5. Výhledy

## 1. Úvod

Singletový kyslík  $^1\text{O}_2$ , energeticky bohatší a vysoce reaktivní forma molekulárního kyslíku, hraje významnou roli v mnoha chemických a biologicky relevantních procesech\*. Zvláštní význam pro vznik  $^1\text{O}_2$  mají fotosenzitivované reakce – světlem iniciované reakce sloučenin obsahujících chromofory, po jejichž excitaci se přenáší absorbovaná energie na kyslík za vzniku  $^1\text{O}_2$ . Senzitivátory jsou účinné již při velmi nízkých koncentracích, protože jedna molekula senzitivátoru může opakovaným přenosem energie produkovat mnoho molekul  $^1\text{O}_2$ . Rozvoj experimentálních technik v posledních letech přispěl k objasnění mechanismů jeho vzniku a reakcí a umožnil vzrůstající počet elegantních aplikací.

Předchozí články<sup>1,2</sup> jsme věnovali základním principům fotosenzitivovaných reakcí produkujících  $^1\text{O}_2$ , vlastnostem  $^1\text{O}_2$  a metodám jeho detekce. Je třeba zdůraznit, že v reálných systémech senzitivátory vstupují do nekovalentních interakcí s okolními molekulami, např. biopolymery, a mohou vytvářet organizované molekulární útvary. Tyto interakce jednak ovlivňují fotofyzikální vlastnosti senzitivátorů, které se pak mohou chovat jinak než v jednoduchém roztoku, jednak určují místo vzniku  $^1\text{O}_2$ . Vzhledem k vysoké reaktivitě a rychlé deaktivaci  $^1\text{O}_2$  v kondenzované fázi je doba jeho života omezená a reakce mohou probíhat pouze v oblasti dané difuzním poloměrem (např. desítky nm v buňce). Lokalizace vzniku spolu s krátkou dobou života mají za následek specifické resp. selektivní působení singletového kyslíku. V tomto referátu chceme přiblížit čtenářům jak praktické využití singletového kyslíku, které již není pouhou teoretickou možností, tak i jeho nežádoucí účinky.

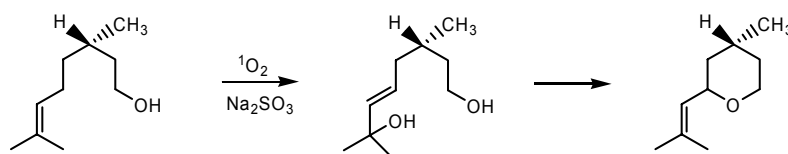
## 2. Praktické aplikace

## 2.1. Organická syntéza

Singletový kyslík je používán v organické syntéze jako silné a přitom selektivně působící oxidační činidlo. Základními reakcemi jsou adice na vazbu C=C a to en-reakce, 2+2 cykloadice, 4+2 cykloadice, a dále oxidace sulfidů<sup>3–5</sup>. Současný přístup je zaměřen na obecnější otázky jako je vliv substituentů na regio- a stereoselektivitu, detailní mechanismus reakcí a identifikace krátkožijících meziproductů<sup>6</sup>. Ze syntetického hlediska jsou en-reakce a 4+2 cykloadiční reakce nejvýznamnější a vedou ke vzniku allylových hydroperoxidů, endoperoxidů a meziproductů pro syntézu např. allylalkoholů, epoxyalkoholů, diolů a nasyčených polyolů. Typickým příkladem je fotooxygenace 4-methylpent-3-en-2-olu na  $\beta$ -hydroperoxyalkohol, který po konverzi poskytuje 1,2,4-trioxan vykazující antimalarickou aktivitu<sup>7</sup>. Průmyslově provozovaná fotooxidace (–)citronellolu senzitivovaná bengálskou červení poskytuje za redukčních podmínek odpovídající allylalkohol, následně po konverzi v kyselém prostředí cyklický terpenoid, který je významnou komponentou používanou při výrobě parfémů<sup>8</sup> (obr. 1).

Využití  $^1\text{O}_2$  vyžaduje vyřešení technického problému, kterým je dostatečně vydatný zdroj této částice generované většinou *in situ*. Každá z používaných metod má svá omezení. Fotosenzitivovaná generace  $^1\text{O}_2$  probíhá obvykle v kapalně fázi. Pokud je senzitivátor ukotven na tuhém

\* Není-li uvedeno jinak, je singletovým kyslíkem míněn nejnižší excitovaný stav kyslíku  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .



Obr. 1. Syntéza (–)-rose oxidu fotooxidací (–)-citronellolu

nosiči, lze jej snadno oddělit od produktů reakce a oxidovat i bez použití rozpouštědla<sup>7</sup>. Metody využívající k přípravě  $^1\text{O}_2$  disproporcionaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve vodném prostředí jsou omezeny nerozpustností hydrofobních organických substrátů a existencí nežádoucích vedlejších reakcí dalších reaktivních kyslíkových částic. Totéž platí i o použití rozkladu peroxokyselin, peroxomolybdenanu nebo peroxochromanu. Elegantní metodou je termické uvolňování  $^1\text{O}_2$  z peroxidu vápenatého  $\text{CaO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_2$ , který může být dispergován v organické fázi<sup>9</sup>. Příprava isotopově značeného  $^1\text{O}_2$  umožňuje sledování mechanismu kyslíkového přenosu. K těmto studiím lze použít naftalenendoperoxid, připravený fotosenzitizovanou reakcí v atmosféře  $^{18}\text{O}_2$  obohaceného na 99 % (cit.<sup>10</sup>).

## 2.2. Fotomedicína

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT)\*\* je neinvazivní metodou léčby nejrůznějších typů rakoviny kombinovaným užitím viditelného či blízkého infračerveného světla a senzitizeru<sup>11–14</sup>. Terapeutická strategie je následující: senzitizer je zaveden do krevního řečiště a postupně se akumuluje v neoplastických tkáních. Na retenci senzitizerů v tumorech se podílí vedle jejich zvýšené afinity k rychle rostoucím tkáním řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismu tumorů. Tumorová tkáň s akumulovaným senzitizerem je ozářena světlem s vlnovou délkou 600–900 nm (oblast tzv. terapeutického okna), které prochází tkání do větší hloubky a excituje senzitizer. Světelným zdrojem bývají lasery, ale používají se i jiné zdroje např. LED diody. V případě vnitřních nádorů je nutno vést světlo k tumorové tkáni optickými vlákny. Po ozáření přenáší excitovaný senzitizer absorbovanou energii na volně rozpuštěný kyslík v tkáních za vzniku  $^1\text{O}_2$ . Senzitizer se přenesením energie vrací do základního stavu a děj se může opakovat, pokud trvá světelná excitace a je přítomen kyslík. Díky krátké době života a tím malého difuzního poloměru singletového kyslíku ( $\leq 0,1 \mu\text{m}$ ) lze PDT považovat za selektivní metodu tumorové léčby, protože zasahuje pouze ozářenou oblast tumoru obsahující senzitizer. Oxidativní atak cytotoxického  $^1\text{O}_2$  vede k buněčnému poškození a následně k destrukci rakovinných buněk. Tato přímá buněčná destrukce je doprovázena poškozením tumorových cév, a tím je významně omezena výživa tumoru. Navíc může PDT aktivovat

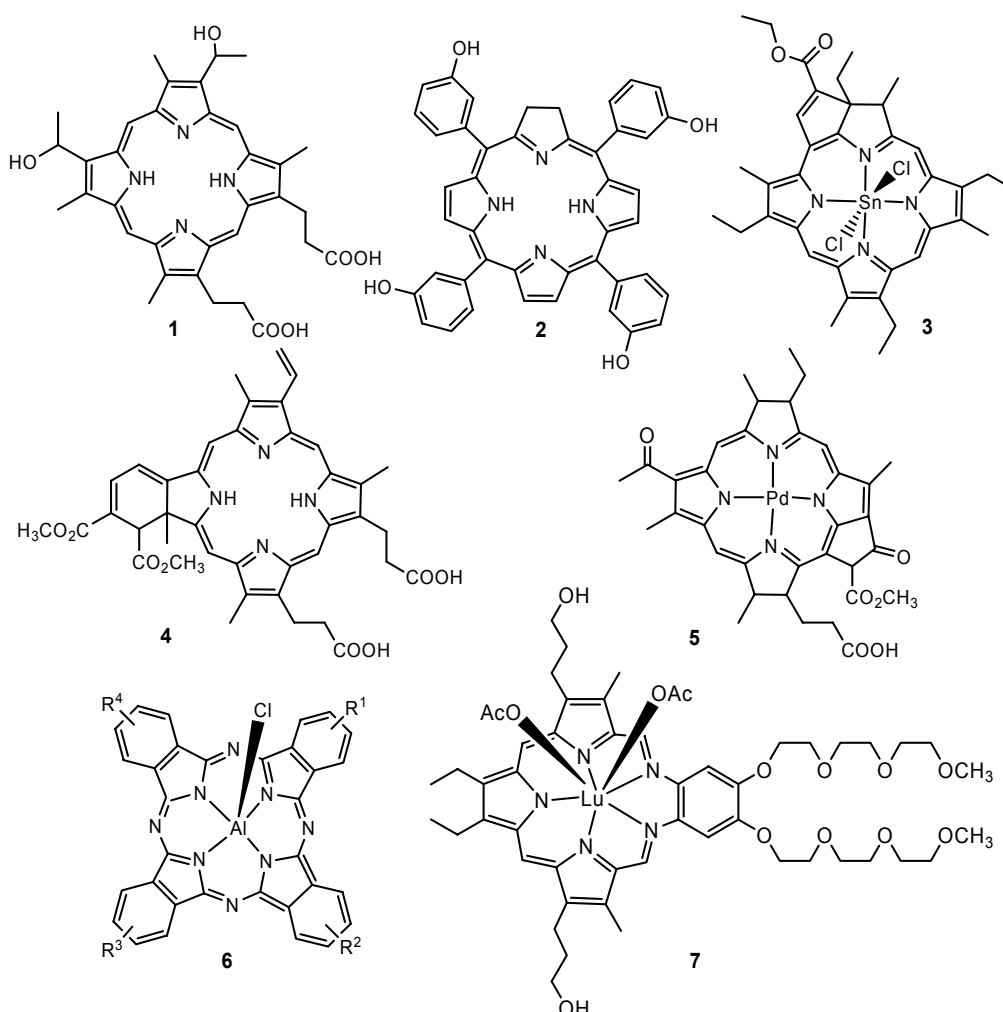
imunitní systém k ataku na tumorové tkáně<sup>15</sup>. Dokud se zdravá tkáň nezbaví senzitizeru, což může trvat několik dní, neměl by být pacient vystaven přímému dennímu světlu z důvodu možné fotosenzitizace kůže a jejího následného poškození.

Senzitizer vhodný pro aplikaci v PDT musí splňovat řadu kritérií<sup>11,12,14</sup>. Nejdůležitější jsou:

- vhodná absorpce senzitizeru. Výhodou je vyšší absorpce v oblasti vlnových délek „terapeutického okna“ a naopak nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm z důvodu možné fotosenzitizace kůže,
- dostatečně selektivní retence senzitizeru v neoplastických tkáních,
- nízká toxicita senzitizeru za nepřítomnosti záření označovaná jako „temná“ toxicita,
- photostabilita senzitizeru po dobu ozáření tkáně,
- fluorescence senzitizeru, která umožňuje sledování jeho distribuce fluorescenční endoskopií,
- dostatečně vysoký kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$ ,
- důležitou vlastností je rovněž polarita senzitizeru. Polární, hydrofilní senzitizery mohou být aplikovány intravenózně. Hydrofobní senzitizery vyžadují aplikaci na nosičích a vykazují většinou vyšší retenci v tumorových tkáních.

Prvním oficiálně schváleným senzitizerem pro PDT byl derivát hematoporfyrinu (HPD) s obchodním názvem Photofrin. Je to nejasně definovaná směs hematoporfyrinu **1**, (1-hydroxyethyl)vinyldeteroporfyrinu, protoporfyrinu a složité dimerní a oligomerní frakce. V posledních 20 letech byly vyvinuty senzitizery druhé generace, které jsou již dobře definovanými chemickými individui, vykazují vyšší retenci v tumorové tkáni a absorpci světla při delších vlnových délkách než HPD. Většinou jde o sloučeniny odvozené od porfyrinového makrocyklu: 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)chlorin (Foscan) **2**, Sn(IV)-etio-purpurin (Purlytin) **3**, derivát benzoporfyrinu (Visudyne) **4**, Pd(II)-bakteriofeoforbid (TOOKAD) **5**, disulfonovaný Al(III)-ftalocyanin **6**, Lu(III)-texafyrin (Lutrin, Antrin) **7**, nebo protoporfyrin IX, který vzniká jako endogenní senzitizer přímo v buňkách stimulovanou biosyntézou z jeho metabolického prekurzoru  $\delta$ -aminolevulové kyseliny (podrobněji v 2.3.) (obr. 2). Tyto sloučeniny byly již

\*\* Termín „fotodynamický“ označuje mechanismus spočívající v oxidativním působení  $^1\text{O}_2$  vznikajícího fotosenzitizovanou reakcí *in situ*.



Obr. 2. Senzitizátory používané ve fotodynamické terapii

schváleny pro léčebné účely nebo jsou v různém stupni klinických testů.

PDT se používá při léčbě kožních melanomů, rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, peritoneální dutiny, žaludku, střev, jater, močového měchýře, prostaty a děložního čípku. Fotodynamická metoda našla také využití při léčbě degenerativních změn na sítnici (Visudyne, Purlytin), nemoci koronárních cév, chronického zánětu dásní a mikrobiálních infekcí.

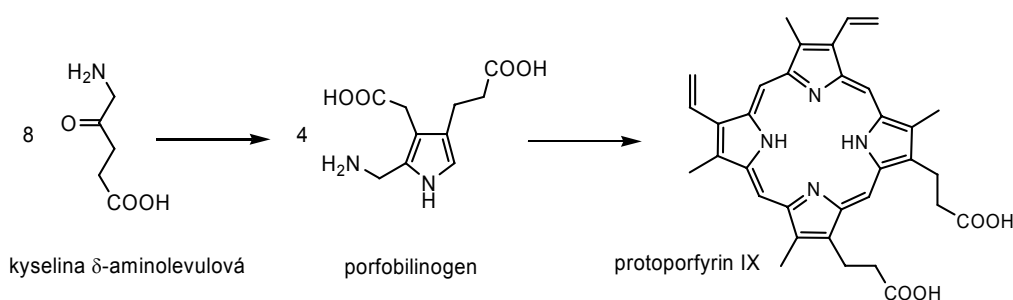
### 2.3. Dezinfekce

V souvislosti se stále častějším výskytem bakteriálních kmenů resistentních k antibiotikům nabývají na významu sloučeniny působící jiným mechanismem. Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (photodynamic

antimicrobial chemotherapy, PACT) je založena na stejném principu jako PDT (cit.<sup>16</sup>). Vlastnost senzitivátorů způsobující fotoinaktivaci *in vitro* i *in vivo* se souhrnně označuje jako fototoxicita nebo fotocytotoxicita. Empiricky je fototoxicita některých barviv vůči mikroorganismům známa již více než sto let. Jako první upozornil na tento jev Raab<sup>17</sup>, který pozoroval fototoxicitu akridinu, fenylakridinu a eosinu pro prvoky. Odtud pochází pojem „fotodynamický efekt“<sup>\*\*\*</sup>, který zavedl Tappeiner<sup>18</sup> v době, kdy podstata efektu a existence  $^1\text{O}_2$  nebyly známy.

Celkový fototoxický efekt je zpravidla způsoben  $^1\text{O}_2$ , ale mohou k němu přispívat superoxidový anion-radikál  $\text{O}_2^-$ , hydroxylové radikály  $\text{OH}^\bullet$ , případně další radikály senzitivátoru nebo jiných přítomných molekul. Zatímco při PDT se používají téměř výhradně porfyrinoidní senzitivátory

\*\*\* Název se vžil a začal se používat běžně i pro označení fotosenzitivovaných oxidací nízkomolekulárních látek *in vitro*.



Obr. 3. Biosyntéza endogenního senzitizeru protoporfyrinu IX

tory, pro fotodynamickou dezinfekci se používají i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová barviva a xanthenová barviva (bengálská červec). Fenothiazinová a akridinová barviva nabízejí výhodu dvojího účinku – jako konvenční dezinfekční činidla a jako fotodynamické senzitizery se širokým spektrem antibakteriální a antivirové aktivity<sup>19–21</sup>.

Výsledný antimikrobiální efekt závisí jak na povaze senzitizeru, tak na druhu mikroorganismu. Gram-negativní<sup>#</sup> bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) obvykle nepodléhají aniontovým a elektricky neutrálním senzitizerům, ale kladně nabitým senzitizerům mají výrazný inaktivační účinek. Gram-pozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*) se inaktivují účinkem aniontových, kationtových i elektricky neutrálních senzitizerů, ale zdá se, že kationtové senzitizery jsou obecně účinnější<sup>22,23</sup>. Účinnost senzitizeru je zřejmě závislá na povaze buněčné struktury, která určuje lokalizaci senzitizeru, a na jeho interakci s okolními biomolekulami<sup>16</sup>.

Elegantní fotodynamická metoda, používaná rovněž u PDT či pesticidů, spočívá ve vytváření endogenního senzitizeru přímo v buňce nebo organismu<sup>13</sup>. Metoda spočívá v podávání velkých dávek kyseliny  $\delta$ -amino-levulové (ALA, 5-amino-4-oxopentanová kyselina), která je prekurzorem biosyntézy životně důležitých porfyrinů (obr. 3). Vysoká koncentrace ALA vede k enormnímu zvýšení koncentrace protoporfyrinu IX, který je účinným senzitizerem produkujícím  $^1\text{O}_2$ . Metalace protoporfyrinu IX na nesenzitizující Fe(II)-protoporfyrin IX, katalyzovaná ferrocchelatasou, je za těchto podmínek příliš pomalá.

Perspektivní využití  $^1\text{O}_2$  se objevuje v oblasti dezinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze<sup>24</sup>. Při současné potřebě transfuzí a nebezpečí infekce musí dezinfekční proces splňovat náročné standardy. Především je třeba, aby byly cíleně zasaženy patogeny různé povahy – viry (HIV), bakterie, kvasinky, prvoci (*Plasmodium malariae*) a přitom nebyly ohroženy krevní komponenty jako např. červené krvinky. Fotodynamická metoda je založena na skutečnosti, že krevní plasma a červené krvinky neobsahují

nukleové kyseliny, kdežto bílé krvinky a infikující mikroorganismy nukleové kyseliny obsahují. Lze proto použít selektivně působící kationtové senzitizery s planární strukturou, které se interkalují do DNA mezi páry bází. Dalším požadavkem je, aby senzitizery absorbovaly záření v oblasti mimo absorpci hemových pigmentů, tedy vlnové délky větší než 600 nm. Tomu vyhovují modrá barviva jako jsou kationtové ftalocyaniny Zn nebo Si a fenothiazinová barviva<sup>24</sup>. Ze čtyř nukleobází singletový kyslík oxiduje hlavně guanin a způsobuje nevratné poškození DNA<sup>25</sup>, mimo to oxidativně degraduje buněčné membrány. Zatím je nejvíce používána methylenová modř, která má delší tradici různých lékařských aplikací. Nové senzitizery odvozené od fenothiazinového skeletu vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu, avšak dosud nebyly testovány *in vivo*<sup>20</sup>.

#### 2.4. Úprava a čištění vody

Úprava a čištění velkých objemů odpadních vod na úroveň pitné vody nebo alespoň na použití k zavlažování bez nebezpečí šíření infekcí, se stává aktuální potřebou pro řadu zemí. Použití  $^1\text{O}_2$  k tomuto účelu umožňuje odstranění mikrobiálního znečištění i oxidativní degradaci organických polutantů např. barviv nebo fenolických látek. Optimálního výsledku při inaktivaci Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií bylo dosaženo při použití kationtových porfyrinů nebo kationtových ftalocyaninů. Je zajímavé, že pořadí citlivosti jednotlivých mikroorganismů k fotodynamickému efektu je opačné než pořadí citlivosti k ionizujícímu záření. Příkladem může být *Deinococcus radiodurans*, který je, jak naznačuje název, mimořádně odolný vůči ionizujícímu záření, ale vysoce citlivý na fotodynamický proces<sup>23</sup>. K odstraňování koliformních bakterií z fekálních vod určených k recyklaci byla použita kombinace kationtového porfyrinu, bengálské červeni a methylenové modři<sup>26</sup>. Pro velké objemy čištěné vody jsou z důvodu snadnější regenerace výhodnější imobilizované senzitizery zakotvené na tuhém nosiči. K detoxifikaci (také od chemických pesticidů) a k dezinfekci vody byly použity

<sup>#</sup> Gramovo rozdělení bakterií je založeno na barvení bakterií krystalovou violetí. Gram-pozitivní bakterie se barví trvale, Gram-negativní se po čase odbarvují. Rozdíl je dán různým složením buněčné stěny.

porfyrinové senzitivizátory zakotvené na poly(methylmetakrylátu)<sup>27</sup>.

Úprava vody fotokatalytickým působením TiO<sub>2</sub> ve vodných suspenzích nebo v tuhé fázi nalézá v poslední době stále širší uplatnění, mj. také pro láčavou možnost využití slunečního záření<sup>28</sup>. Na konečném čistícím účinku se podílí vedle radikálů OH<sup>•</sup> zřejmě i <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, jehož vzniku při fotokatalýze TiO<sub>2</sub> byla zatím věnována jen okrajová pozornost. Nedávno byl vznik <sup>1</sup>O<sub>2</sub> doložen spektroskopicky<sup>29</sup>.

## 2.5. Pesticidy

Pesticidy je souhrnný název pro látky hubící rostliny a živočichy, škodlivě nebo zhoubně působící proti zájmům lidstva. Narozdíl od konvenčních chemických pesticidů, jejichž vedlejším účinkem je kontaminace půdy a povrchových vod, jsou fotodynamické pesticidy netoxické a nezatěžují životní prostředí, protože jsou účinné v mnohonásobně nižší koncentraci a vlivem slunečního záření se rozkládají většinou během několika hodin. Jako fotodynamické pesticidy se používají xanthenová barviva (floxin B, bengálská červeň, uranin), furokumariny (psoraleny) (obr. 4) a porfyriny, zejména endogenní, akumulované v tkáni v důsledku vysokých dávek ALA (obr. 3)<sup>30–32</sup>. Tyto pesticidy mohou zároveň působit jako detoxifikační činidla při odstraňování zamoření chemickými pesticidy. Za přírodní fotodynamické pesticidy lze označit některé sloučeniny izolované z vyšších rostlin (např. α-terthienyl, furokumarin, chinoidní sloučeniny) sloužící jako přirozená ochrana proti škůdcům, rostlinným patogenům a konkurujícím druhům rostlin – plevelům<sup>33</sup>.

Fotodynamické insekticidy byly intenzivně zkoumány během 90. let, zejména v souvislosti s hmyzem napadajícím citrusové a olivovníkové plantáže. Fotoinsekticidní aktivitu vykazují xanthenová, fenothiazinová, akridinová barviva, furokumariny, porfyriny a některé další látky. Dobré výsledky byly získány s halogenovaným xanthenovým barvivem floxin B, které bylo prvním polním fotoinsekticidem schváleným v USA. Narozdíl od většiny používaných senzitivizátorů je floxin B mírně toxický<sup>31</sup>.

Použití porfyrinů jako fotodynamických insekticidů je výhodné pro jejich příbuznost s biologicky aktivními látkami, pro kterou jsou dobře přijímány organismy, vysoké kvantové výtěžky <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a absorpci světla v širokém pásmu

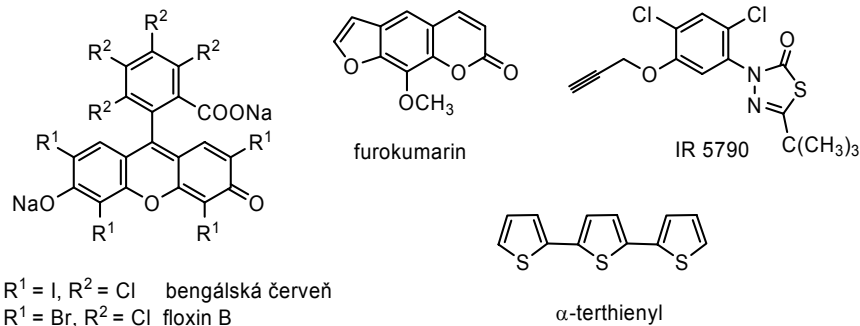
blízkého UV a Vis záření, tedy v pásmu slunečního záření. Mimo to jsou porfyriny účinné proti různým druhům hmyzu a larev, mohou se rozkládat účinkem světla a jsou cenově přístupné. Při aplikaci porfyrinů je možno postupovat dvojitým způsobem:

- vytvářením endogenních porfyrinů v organismu obohacením potravy ALA, jak bylo popsáno v 2.3.,
- přímým podáváním porfyrinu např. Zn(II)-5,10,15,20-tetrafenylporfyrinu, hematoporfyrinu IX v návnadě nebo postřikem. Optimální účinnost byla pozorována u amfifilních porfyrinů. Insekticidní mechanismus spočívá především v oxidačním napadání lipofilních buněčných membrán trávicího traktu. U kmenů hmyzu, jejichž populace byla opakovaně redukována fotodynamickým mechanismem, nebyla pozorována získaná fotorezistence<sup>30,34</sup>.

Endogenní fotodynamické herbicidy jsou porfyriny, které jsou metabolickými meziproducty biosyntézy chlorofylu, zejména Mg-protoporfyrin IX. Jejich akumulace v zelených rostlinách je výsledkem vysokých koncentrací ALA. Jde v zásadě o stejnou metodu využití endogenního senzitivizátoru jako u jiných pesticidů, s tím rozdílem, že konečným produktem není jen protoporfyrin IX, ale i další senzitivizující porfyrinové metabolity obsahující hořčík<sup>32</sup>. Singletový kyslík vznikající při ozáření rostliny slunečním světlem blokuje syntézu chlorofylu a destruuje membrány chloroplastů. Na listech se objevují odbarvené skvrny, u některých herbicidů již po 20 minutách po aplikaci. Dostupný je arylthiadiazolonový herbicid IR 5790 se širokým spektrem účinnosti proti plevelům, který také způsobuje akumulaci fotodynamického prekurzoru chlorofylu<sup>35</sup> (obr. 4).

## 2.6. Chemický kyslíko-jodový laser

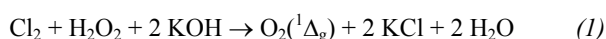
Kyslíko-jodový laser je chemickým laserem (chemical oxygen-iodine laser, COIL), který převádí energii chemické reakce na fotony. Je založen na elektronickém přechodu mezi prvním elektronovým a základním stavem atomárního jodu I(<sup>2</sup>P<sub>1/2</sub>) → I(<sup>2</sup>P<sub>3/2</sub>) a protože kontinuální laserová oscilace probíhá v blízké infračervené oblasti na vlnové délce 1,315 μm, je COIL chemickým laserem s nejkratší vlnovou délkou. Díky vhodné vlnové délce pro vláknovou optiku, dostupnosti základních chemi-



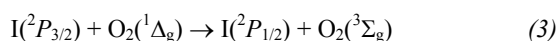
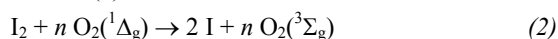
Obr. 4. Fotodynamické pesticidy

kálií a možnosti získat vysokoenergetické svazky byla vývoji technologie COIL věnována velká pozornost. První zařízení bylo uvedeno do provozu v roce 1977 a mělo výkon 4 mW (cit.<sup>36</sup>). Nejvyšší publikovaný výkon v současné době je přibližně 40 kW. Uvádí se, že COIL je vhodný pro průmyslové aplikace jako je vysokorychlostní řezání nebo vrtání. Hlavním směrem výzkumu v USA jsou obranné systémy určené pro ničení taktických balistických střel, kdy COIL o výkonu řádu MW má být umístěn na palubě monitorujícího letadla.

V klasickém uspořádání je čerpání laseru dosaženo přenosem energie mezi  $^1\text{O}_2$  a atomem jodu v základním stavu. Singletový kyslík vzniká reakcí plynného chloru a silně alkalického vodného roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Výtěžky  $^1\text{O}_2$  v reakci (1) vysoce převyšují prahovou hodnotu 15 % singletového kyslíku při 300 K nutných pro dosažení inverze populace na elektronovém přechodu atomu jodu. Po smíšení  $^1\text{O}_2$  s molekulárním jodem se menší část energie spotřebuje na disociaci  $\text{I}_2$  (2) a druhá větší část na excitaci I (3).



Reakce (2), která snižuje koncentraci  $^1\text{O}_2$ , může být eliminována disociací  $\text{I}_2$  mikrovlnným výbojem, výbojem v plynném alkyljodidu či chemickou reakcí (např. HI s Cl, cit.<sup>37</sup>). Protože použití nestabilních alkalických roztoků obsahujících  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve velkém měřítku přináší řadu komplikací, jsou také vyvíjeny generátory  $^1\text{O}_2$  na jiném principu jako jsou elektrický výboj v atmosféře  $\text{O}_2$ , excitace kapalného  $\text{O}_2$ , reakce  $\text{Na}_2\text{O}_2(\text{s})$  s  $\text{HCl}(\text{g})$ , nebo je  $\text{I}(^2P_{1/2})$  produkován reakcí atomárního jodu s NCl.

### 3. Škodlivé účinky singletového kyslíku

V předchozích kapitolách jsme uvedli různá využití  $^1\text{O}_2$  související s vysokým obsahem energie této částice. Reaktivita  $^1\text{O}_2$  však může působit nežádoucí efekty a znamenat i zdravotní riziko. Jde např. o degradaci proteinů, mutagenicitu a efekty stárnutí. Reakce biologicky relevantních molekul s  $^1\text{O}_2$  se vyznačují značným počtem meziproductů a konečných produktů a jejich mechanismus doposud není plně objasněn.

V biologických systémech vzniká  $^1\text{O}_2$  jako meziproduct některých enzymatických procesů, avšak daleko důležitějším zdrojem je jeho fotosenzitizovaná produkce. U proteinů je vznik  $^1\text{O}_2$  přímou excitací zanedbatelný z důvodu velmi nízkých kvantových výtěžků a nízké absorpce světla v oblasti vlnových délek nad 290 nm, které dopadají na zemský povrch. Nejvýznamnějším zdrojem  $^1\text{O}_2$ , jehož vlivu jsou proteiny vystaveny, je fotochemické působení jiných chromoforů. Jde hlavně o endogenní senzitivátory, často neznámé struktury, nebo léčiva. Oxidaci singletovým kyslíkem podléhají hlavně histidin, tyrosin, methionin, cystein a tryptofan<sup>38,39</sup>. Vznikající peroxidy

a peroxyradikály jsou nositeli dalšího oxidativního útoku, způsobujícího fragmentaci proteinu, síťování a agregaci. Tyto změny jsou ireverzibilní, negativně postihují funkce proteinů a zdá se, že nepřímě poškozují i DNA<sup>40</sup>.

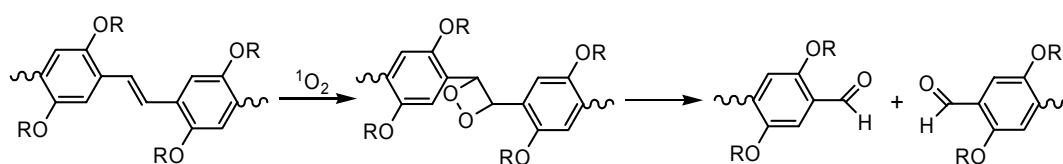
Energeticky nejbohatší komponentou slunečního záření dopadajícího na zemský povrch je záření označované jako UVB (280–320 nm), které může přímo excitovat jednotlivé báze v DNA, a tím iniciovat další reakce jako jsou tvorba dimerů a fotoadice. Senzitivovaná produkce singletového kyslíku probíhá s velmi nízkými kvantovými výtěžky (např. u adenosinu 0,03). Sluneční záření v oblasti UVA (320–400 nm) působí převážně nepřímě prostřednictvím fotosenzitizovaných reakcí, kdy zdrojem  $^1\text{O}_2$  mohou být také endogenní senzitivátory. Singletový kyslík může být produkován kationtovými senzitivátory, které se interkalují mezi páry bází nebo vážou do žlábků DNA. Nejvýznamnější je reakce singletového kyslíku s guaninem za vzniku řady produktů, dosud jen částečně identifikovaných<sup>25</sup>. Reakcí dochází ke vzniku jednoduchých zlomů a štěpení DNA<sup>41,42</sup>. Ostatní báze jsou k  $^1\text{O}_2$  odolnější.

Typickou reakcí  $^1\text{O}_2$  s lipidy je adice na dvojnou vazbu nenasycených mastných kyselin za vzniku řady peroxidových a radikálových produktů<sup>43</sup>. Sulfidy a obecně sloučeniny dvojnásobné síry ochotně reagují přímo s  $^1\text{O}_2$ . Primárním produktem reakce je nestabilní persulfoxid ( $\text{R}_2\text{S}^+\text{-OO}^-$ ), který má také významnou roli při oxidaci biopolymerů obsahujících methionin<sup>44</sup>. Pro svou reaktivitu byly sulfidy studovány hlavně jako ochranné antioxidanty v živých organismech<sup>45</sup>.

Uvádí se, že  $^1\text{O}_2$  spolupůsobí nebo je původcem některých chorob, jako např. porfyrie a očního šedého zákalu. Porfyrie označuje skupinu dědičných metabolických chorob, spočívajících v poruše biosyntézy krevního barviva, místo něhož vznikají fotosenzitivující porfyriny. U některých typů porfyrie se porfyriny ukládají v pokožce a vlivem slunečního záření produkují  $^1\text{O}_2$ , který způsobuje rozsáhlé poškození kůže<sup>46</sup>. Sedý zákal (katarakta) případně další poškození oka intenzivním světlem souvisí s přítomností endogenních senzitivátorů produkujících  $^1\text{O}_2$  a další reaktivní kyslíkové částice (např.  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ). Oko je chráněno složitým systémem účinných antioxidantů, ale s věkem a vlivem některých léčiv produkce antioxidantů klesá<sup>47</sup>.

Obranné látky, jimiž se organismus chrání proti vlivu  $^1\text{O}_2$ , jsou chemické zhášeče, které přímo reagují s  $^1\text{O}_2$ , nebo látky reagující s peroxidy a peroxidovými radikály, které jsou produkty primárních reakcí – oxidací mastných kyselin, peptidů a proteinů. K první skupině patří karotenoidy ( $\beta$ -karoten, lykopen), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), kyselina močová, ergothionein a melatonin<sup>45,46,48</sup>. Antioxidanty druhé skupiny reagující s peroxysloučeninami jsou nízkomolekulární thioly<sup>49</sup>, glutathion, kyselina askorbová a některé karotenoidy<sup>4</sup>. Enzymatické antioxidanty katalasa, superoxidodismutasa a křenová peroxidasa jsou u peroxidových meziproductů neúčinné<sup>50</sup>.

Odbarvování barviv vlivem slunečního záření tj. vlivem záření o vlnových délkách  $\lambda > 290$  nm probíhá reduktivními nebo oxidativními mechanismy. Mechanismus



Obr. 5. Mechanismus degradace fenylvinylenového oligomeru singletovým kyslíkem (2+2 cykloadice)

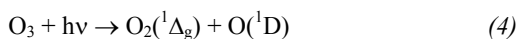
odbarvování záleží především na typu a fotochemických vlastnostech barviva, na materiálu nosiče (vlákna, filmu, folie), přístupu kyslíku a přítomnosti zhášečů excitovaných stavů. Singletový kyslík hraje dominantní roli při odbarvování trifenylmethanových barviv a sulfonovaných ftalocyaninů zinku. Odbarvování zabraňují některé nikelnaté komplexy reagující přímo s  $^1\text{O}_2$  nebo lapáče peroxyradikálů, které jsou meziproducty oxidace barviva nebo materiálu nosiče<sup>51,52</sup>. Žloutnutí celulosy způsobuje příměs ligninu, který působí jako senzitivátor produkující  $^1\text{O}_2$  (cit.<sup>53</sup>). Fotoiniciované žloutnutí vlny je způsobeno oxidativní degradací keratinu, zejména tryptofanových skupin vlivem  $^1\text{O}_2$  a reaktivních kyslíkových částic<sup>54</sup>.

Polymery degradují vlivem singletového kyslíku, pokud obsahují fotosenzitivující barviva nebo je některá z komponent polymeru fotosenzitivujícím chromoforem. Nebarvené plasty skládající se z alifatických řetězců (PET, PVC) centra pro vznik  $^1\text{O}_2$  neobsahují. Nejpodrobněji byl vliv  $^1\text{O}_2$  studován u fenylvinylenových polymerů a oligomerů, které mají elektroluminiscenční vlastnosti a používají se jako materiály pro LED diody. Fotosenzitivující fenylenové skupiny jsou zdrojem singletového kyslíku, který způsobuje oxidativní degradaci materiálu a je rozhodujícím faktorem pro životnost diod (obr. 5). Degradaci je možno potlačit zavedením vhodných substituentů, např. CN, nebo omezením kontaminace materiálu kyslíkem během výroby<sup>55–57</sup>.

#### 4. Singletový kyslík v atmosféře a v životním prostředí

Hlavním zdrojem  $^1\text{O}_2$  v atmosféře je fotolýza ozonu UV zářením probíhající hlavně ve vysokých vrstvách atmosféry. Z hlediska vlivu na životní prostředí může mít význam výskyt singletového kyslíku i v nižších a zejména přízemních vrstvách atmosféry.

Fotolýza ozonu na  $^1\text{O}_2$  je spinově dovolenou reakcí



Kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$  se pro vlnové délky menší než 305 nm blíží jedné, pro záření s delší vlnovou délkou výtěžky rychle klesají a nad 355 nm jsou téměř zanedbatelné<sup>58,59</sup>. Vzhledem k tomu, že na zemský povrch dopadá záření s vlnovými délkami většími než asi 290 nm, je zřejmé, že fotolýza může probíhat v celé atmosféře. Dalším produktem fotolýzy je vysoce reaktivní atomární kyslík v excitovaném singletovém stavu, který s atmosférickou

vodou reaguje na radikál  $\text{OH}^\cdot$ . Singletový kyslík může vznikat v atmosféře rovněž fotosenzitivovanou reakcí. Možným senzitivátorem je  $\text{NO}_2$  (excitace při  $\lambda \sim 398 \text{ nm}$ ), který generuje oba excitované stavy kyslíku, tj.  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  a  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ .

Městský vzduch a smog obsahují  $^1\text{O}_2$ , jehož množství kolísá během dne v závislosti na intenzitě slunečního záření a na míře znečištění. Během slunečního dne byla naměřena koncentrace  $^1\text{O}_2$  až 22 ppb ( $\sim 5 \times 10^{11}$  molekul  $\text{cm}^{-3}$ ). Singletový kyslík iniciuje chemické reakce převážně ve styku s kapalnou fází – v kapkách vody, mračích a mlhách. Reaguje s nenasycenými organickými sloučeninami na peroxyacyl radikály, které jednak oxidují  $\text{NO}$  na  $\text{NO}_2$ , jednak dále reagují s  $\text{NO}_2$  na dráždivý peroxyacyl-nitrát  $\text{RC(O)-O-O-NO}_2$ . „Přízemní“  $^1\text{O}_2$  vznikající ve znečištěné atmosféře je faktorem ohrožujícím životní prostředí a může hrát roli v patologii člověka, zvířat i rostlin.

Singletový kyslík je jednou z reaktivních kyslíkových částic, vznikajících v povrchových vodách působením slunečního záření reakcemi senzitivovanými různými organickými chromofory, zejména huminovými látkami. Na vzniku reaktivních kyslíkových částic závisí abiotický samočisticí proces včetně fotooxidativní degradace antropogenních látek. Jelikož však doba života  $^1\text{O}_2$  ve vodě je v řádu mikrosekund a jeho maximální koncentrace se pohybuje od  $1 \cdot 10^{-12}$  do  $1 \cdot 10^{-15}$  M, zdá se, že příspěvek singletového kyslíku není podstatný<sup>60,61</sup>.

#### 5. Výhledy

V předchozích odstavcích jsme ukázali možnosti využití singletového kyslíku stejně jako jeho potenciální škodlivé účinky. V budoucnu se dá očekávat metodický pokrok a další rozšíření v následujících oblastech. Jde hlavně o léčbu rakoviny a dalších nemocí jako makulární degenerace sítnice a ateroskleróza, a léčbu lokalizovaných infekcí. Vývoj metody PDT nemusí být výrazně závislý na syntéze nových senzitivátorů s odpovídajícími vlastnostmi. Rozhodujícím krokem je spíše zdoluhavé testování jejich účinnosti v biologickém materiálu *in vivo*. Dalším přínosem může být pokrok v molekulárním rozpoznávání a na základě toho cílená volba nosiče senzitivátoru např. typu monoklonálních protilátek. Nové možnosti přináší dvoufotonová fotosenzitivovaná produkce singletového kyslíku. K excitaci vhodných senzitivátorů je možno použít fotony s menší energií než při jednofotonové excitaci, tj. blízké infračervené záření, které v tkáni proniká do větší hloubky<sup>62,63</sup>.

Emisní mikroskopie singletového kyslíku je založena na měření jeho luminiscence poté, co byl vzorek excitován laserem<sup>64</sup>. Vyvinené metody využívající jednofotonové i nelineární dvoufotonové excitace umožňují zobrazovat mikroskopické heterogenity a fázové domény v polymerních materiálech; v biologických systémech lze rozlišit jednotlivé buňky. Rozlišení je dáno skutečností, že singletový kyslík je lokalizován v místě jeho vzniku. Tato metoda umožní nový pohled na řadu procesů, které závisí na kyslíku jako např. fotoinicovaná smrt buněk.

Lákavou perspektivou je technologické zvládnutí vazby senzitivátorů na vhodné minerální, polymerní nebo textilní nosiče, které by umožnilo výrobu materiálů se zabudovanou automatickou dezinfekcí iniciovanou světlem. Materiály mající fotodezinfekční vlastnosti mohou být přímo součástí folií či nátěrůvých hmot.

*Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za finanční podporu (granty GA ČR č. 203/02/1483 a 203/04/0426).*

#### LITERATURA

- Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Coord. Chem. Rev.* 248, 321 (2004).
- Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 99, 211 (2005).
- Frimer A. A. (ed.): *Singlet O<sub>2</sub>*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton 1985.
- Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 101. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Foot C. S., Clennan E. L., v knize: *Active Oxygen in Chemistry*, SEARCH Series, Vol. 2, (Foot C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 105. Blackie Academic & Professional, London 1995.
- Clennan E. L.: *Tetrahedron* 56, 9151 (2000).
- Griesbeck A. G., El-Idreesy T. T., Fiege M., Brun R.: *Org. Lett.* 4, 4193 (2002).
- Braun A. M., Maurette M. T., Oliveros E.: *Photochemical Technology*. Wiley, Chichester 1991.
- Pierlot C., Nardello V., Schrive J., Mabilille C., Barbillat J., Sombret B., Aubry J.-M.: *J. Org. Chem.* 67, 2418 (2002).
- Martinez G. R., Ravanat J.-L., Medeiros M. H. G., Cadet J., Di Mascio P.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10212 (2000).
- Boyle R. W., Dolphin D.: *Photochem. Photobiol.* 64, 469 (1996).
- Ochsner M.: *J. Photochem. Photobiol.*, B 39, 1 (1997).
- MacDonald I. J., Dougherty T. J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* 5, 105 (2001).
- Nyman E. S., Hynninen P. H.: *J. Photochem. Photobiol.*, B 73, 1 (2004).
- Wilson B. C.: *Can. J. Gastroenterol.* 16, 393 (2002).
- Hamblin M. R., Hasan T.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 436 (2004).
- Raab O.: *Z. Biol.* 39, 524 (1900).
- Tappeiner H.: *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 86, 479 (1906).
- Wainwright M., Crossley K. B.: *J. Chemother.* 14, 431 (2002).
- Phoenix D. A., Harris F.: *Trends Mol. Med.* 9, 283 (2003).
- Jori G., Brown S. B.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 403 (2004).
- Minnock A., Vernon D. I., Schofield J., Griffiths J., Parish J. H., Brown S. B.: *J. Photochem. Photobiol.*, B 32, 159 (1996).
- Schäfer M., Schmitz C., Facius R., Horneck G., Milow B., Funken K.-H., Ortner J.: *Photochem. Photobiol.* 71, 514 (2000).
- Wainwright M.: *Chem. Soc. Rev.* 31, 128 (2002).
- Armitage B.: *Chem. Rev.* 98, 1171 (1998).
- Jemli M., Alouini Z., Sabbahi S., Gueddari M.: *J. Environ. Monitor.* 4, 511 (2002).
- Faust D., Funken K. H., Horneck G., Milow B., Ortner J., Sattlegger M., Schäfer M., Schmitz C.: *Sol. Energy* 65, 71 (1999).
- Legrini O., Oliveros E., Braun A. M.: *Chem. Rev.* 93, 671 (1993).
- Nosaka Y., Daimon T., Nosaka A. Y., Murakami Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 2917 (2004).
- Ben Amor T., Jori G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 915 (2000).
- Heitz J. R.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 1 (1995).
- Amindari S., Splittstoesser W. E., Rebeiz C. A.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 217 (1995).
- Downum K. R., Wen J.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 135 (1995).
- Ben Amor T., Bortolotto L., Jori G.: *Photochem. Photobiol.* 71, 124 (2000).
- Dayan F. E., Meazza G., Bettarini F., Signorini E., Piccardi P., Romagni J. G., Duke S. O.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2302 (2001).
- McDermott W. E., Pchelkin N. R., Benard D. J., Bousek R. R.: *Appl. Phys. Lett.* 32, 469 (1978).
- Špalek O., Čenský M., Jirásek V., Kodymová J., Jakubec I., Hager G. D.: *IEEE J. Quantum Electron.* 40, 564 (2004).
- Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 173. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Lang K., Wagnerová D. M., Engst P., Kubát P.: *Z. Phys. Chem.* 187, 213 (1994).
- Davies M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761 (2003).
- Kochevar I. E., Dunn D. A., v knize: *Bioorganic Photochemistry; Photochemistry and the Nucleic Acids*, Vol. 1 (Morrison H., ed.), str. 273. J. Wiley & Sons, New York 1990.



42. Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J.: *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 88 (2001).
43. Nelson M. J., Seitz S. P., v knize: *Active Oxygen in Biochemistry*, SEARCH Series, Vol. 3, (Valentine J. S., Foote C. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 276. Blackie Academic & Professional, London 1995.
44. Clennan E. L.: *Acc. Chem. Res.* 34, 875 (2001).
45. Rougee M., Bensasson R. V., Land E. J., Pariente R.: *Photochem. Photobiol.* 47, 485 (1988).
46. Bohm F., Edge R., Foley S., Lange L., Truscott T. G.: *J. Photochem. Photobiol., B* 65, 177 (2001).
47. Roberts J. E.: *Int. J. Toxicol.* 21, 491 (2002).
48. Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 201. Oxford University Press, Oxford 1993.
49. Davies M. J.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 17 (2004).
50. Morgan P. E., Dean R. T., Davies M. J.: *Free Radical Biol. Med.* 36, 484 (2004).
51. Oda H.: *Dyes Pigments* 48, 233 (2001).
52. Thomas J. L., Allen N. S.: *Dyes Pigments* 53, 195 (2002).
53. Barclay L. R. C., Basque M. C., Vinqvist M. R.: *Can. J. Chem.* 81, 457 (2003).
54. Davidson R. S.: *J. Photochem. Photobiol., B* 33, 3 (1996).
55. Scurlock R. D., Wang B., Ogilby P. R., Sheats J. R., Clough R. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10194 (1995).
56. Dam N., Scurlock R. D., Wang B., Ma L., Sundahl M., Ogilby P. R.: *Chem. Mater.* 11, 1302 (1999).
57. Cumpston B. H., Parker I. D., Jensen K. F.: *J. Appl. Phys.* 81, 3716 (1997).
58. Armerding W., Comes F. J., Schülke B.: *J. Phys. Chem.* 99, 3137 (1995).
59. Wayne R. P.: *Res. Chem. Intermed.* 20, 395 (1994).
60. Blough N. V., Zepp R. G.: *Active Oxygen in Chemistry*, SEARCH Series, Vol. 2, (Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 280. Blackie Academic & Professional, London 1995.
61. Klementová Š., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 84, 1134 (1990).
62. Paul A., Molich A., Oeckers S., Seifert M., Roder B.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* 6, 340 (2002).
63. Fournier M., Pépin C., Houde D., Ouellet R., van Lier J. E.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 120 (2004).
64. Snyder J. W., Zebger I., Gao Z., Poulsen L., Frederiksen P. K., Skovsen E., McIlroy S. P., Klinger M., Andersen L. K., Ogilby P. R.: *Acc. Chem. Res.* 37, 894 (2004).

**K. Lang<sup>a</sup>, J. Mosinger<sup>a,b</sup>, and D. M. Wagnerová<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>*Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež;* <sup>b</sup>*Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Praha):*  
**Singlet Oxygen in Practice – Present State and Prospects**

The chemistry of singlet oxygen has been rapidly developing ever since its discovery in the sixties. Nevertheless, the progress in utilization of singlet oxygen is relatively recent. In organic synthesis, singlet oxygen has been used in preparation of novel compounds. Photodynamic therapy of cancer and of some other diseases advanced due to novel specifically acting porphyrinoid sensitizers approved for clinical use. The sensitizers producing singlet oxygen are a promising alternative to inactivation of microorganisms resistant to antibiotics and can also be employed in blood disinfection or water treatment. Photodynamic pesticides are environment-friendly due to the absence of side effects. The use of the chemical oxygen-iodine laser based on singlet oxygen is envisaged in defence systems against ballistic missiles. The harmful effects of singlet oxygen on biological materials, polymers, dyes and textile fibres are briefly discussed.

## VYBRANÉ METODY MODIFIKACE POVRCHŮ BIOSENZORŮ PRO IMOBILIZACI PROTEINŮ

ROMAN KOTLÍN a JAN E. DYR

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1,  
128 20 Praha 2  
kotlinr@centrum.cz

Došlo 21.2.05, přepracováno 29.8.05, přijato 15.9.05.

Klíčová slova: biosenzor, imobilizace proteinů, adsorpce

### Obsah

1. Úvod
2. Biosenzory
3. Adsorpce proteinů na povrch senzoru
4. Metody modifikace povrchů senzorů
  - 4.1. Hydrofobizace povrchu senzoru, modifikace povrchu nanášením organického polymeru
  - 4.2. Imobilizace proteinů ve fosfatidylcholinovém filmu
  - 4.3. Imobilizace proteinů s použitím systému (strept)avidin – biotin
  - 4.4. Imobilizace založená na samoskladných mono-  
vrstvách
  - 4.5. Fotochemická imobilizace proteinů
  - 4.6. Imobilizace proteinů přes hexahistidinovou  
nástavbu
5. Závěr

### 1. Úvod

Biosenzory se od 60. let minulého století staly běžnou součástí laboratorní praxe mnoha oborů lidské činnosti. K jejich každodennímu použití však vedla trnitá cesta. Mnoho praktických problémů muselo být vyřešeno dříve, než se začaly vyrábět první komerční přístroje. Jedním z těchto problémů byla a stále ještě je imobilizace detekčního systému na povrch senzoru. Jelikož tímto detekčním systémem jsou biologicky aktivní látky (enzymy, protilátky, receptory atp.), je nezbytné zachovat jejich biologickou aktivitu i po imobilizaci. Přímou imobilizací takové molekuly na povrch se s největší pravděpodobností změní její konformace, což může vést ke snížení nebo změně biologické aktivity. Abychom tomuto jevu zabránili, lze na povrch senzoru nejprve navázat jiné sloučeniny (malé organické molekuly, proteiny aj.), které vytvoří na povrchu senzoru film, na nějž se následně imobilizují vlastní

biologicky aktivní molekuly. Metod, jak imobilizovat enzymy, protilátky a jiné biologicky významné sloučeniny na povrch senzoru, je v současné době mnoho a zde se budeme zabývat některými z metod modifikací povrchů senzorů pro nekovalentní vazbu proteinů.

### 2. Biosenzory

Biosenzor může být definován jako kompaktní analytický nástroj spojující biologicky aktivní detekční prvek (buď přímo integrovaný nebo blízce přidružený) s fyzikálně-chemickým snímačem<sup>1</sup>. Z této definice vyplývají dvě základní součásti biosenzoru: *i*) biologicky aktivní látka, která interaguje s analytem a *ii*) snímač, jenž reaguje na změnu vyvolanou interakcí analytu s detekční molekulou.

Detekční molekulou může být ionofor, enzym, protilátka, receptor, část molekuly enzymu s aktivním místem, buněčná organela, buňka, tkáň aj. Výběr biologicky aktivní látky závisí jak na stanovovaném analytu, tak na konstrukci senzoru jako takového.

Otcem biosenzorů je Leland C. Clark Jr., který v roce 1956 publikoval práci o kyslíkovém článku<sup>2</sup>. Na tuto práci navázal a v roce 1962 představil na symposiu Newyorské akademie věd, jak propojit elektrochemické senzory s detekčním snímačem. Tento koncept ilustroval pomocí glukosaoxidasy, enzymu katalyzujícího oxidaci  $\beta$ -D-glukosy kyslíkem a kyslíkového článku. Ve stejném roce společně s L. Lyonsem vydal článek, v němž se poprvé objevil termín enzymová elektroda<sup>3</sup> (správně enzymový článek). Roku 1969 Guilbault a Montalvo sestrojili a publikovali první potenciometrický biosenzor<sup>4</sup>.

První komerční biosenzor, a to na principu kyslíkového článku s glukosaoxidasou, byl vyroben v roce 1972 a znovu v roce 1975 americkou firmou Yellow Springs Instrument Company. V roce 1975 vznikl také první biosenzor s mikroorganismem jako detekčním prvkem<sup>5</sup> a první imunosenzor<sup>6</sup>.

V současné době vyrábí biosenzory nespočet firem po celém světě. Uplatnění nalézají v biomedicině, v klinické diagnóze, ve veterinární analýze, při analýze potravin, při kontrole polutantů životního prostředí, v mikrobiologii, v potravinářském průmyslu, v zemědělství, v chemickém průmyslu, ve výzkumu, ve vojenství, atd.

A jaké jsou výhody biosenzorů? Při správné konstrukci senzoru a při použití vhodného detekčního systému je to jejich specifita. Většina biologických dvojic, jako enzym – substrát nebo antigen – protilátka, spolu interagují velmi specificky (např. pro ureasu je jediným substrátem močovina), což dovoluje, aby byl měřený analyt stanoven i ve složitých maticích. Z dalších výhod lze jmenovat rychlost stanovení, nízké detekční limity, opakovatelnost,

reprodukovatelnost či široké použití biosenzorů.

Biosenzory mají však i své nevýhody. Poměrně vysoká cena těchto zařízení je často překážkou pro jejich širší využití. Při konstrukci biosenzorů bývá také velkým problémem imobilizace biomolekul tak, aby nezpůsobila konformační změny, které by mohly vyvolat ztrátu jejich biologické aktivity a schopnosti specifické interakce se stanovovaným analytem. Další nevýhodou jsou možné nespecifické vazby látek z maticí na povrch senzoru. V neposlední řadě je to také desorpce detekčních molekul z povrchu senzoru.

### 3. Adsorpce proteinů na povrch senzoru

Adsorpce proteinu na tuhý povrch senzoru je komplexní jev, k jehož popisu je nutné uvažovat mnoho faktorů. Proteiny ve fyziologickém prostředí zaujímají nativní konformaci, která se liší od konformace, kterou protein zaujme po adsorpci na povrch.

Vzájemné reakce proteinů s povrchem mohou zprostředkovat všechny druhy interakcí. Na hydrofobních površích budou převládat hydrofobní interakce, které povedou k rozbalení proteinu a interakcím s hydrofobními postranními řetězci aminokyselinových zbytků. Na površích hydrofilních to budou především polární a iontové síly, které zprostředkují interakci. Na všech površích se však mohou do určité míry uplatnit všechny druhy interakcí.

Hnací síla adsorpce může mít buď entalpickou povahu (např. protein a povrch mají opačný náboj) nebo povahu entropickou (rozbalení proteinu)<sup>7</sup>. Obecně lze říci, že adsorpce bude probíhat pouze za předpokladu, že Gibbsova energie celého systému bude klesat.

Adsorpce proteinů na povrch je složitý proces, který se skládá z několika stupňů. Adsorpce proteinu začíná přiblížením se k rozhraní vodné a tuhé fáze, dále vzniká dočasná vazba na rozhraní a mění se konformace proteinu. Současně probíhá desorpce proteinu, jež zahrnuje uvolnění proteinu z rozhraní a transport proteinu od rozhraní<sup>8</sup>. Konformační změna proteinu obvykle začíná redistribucí nabitých skupin, jejímž výsledkem jsou chemické a chemické efekty, následovaná změnou stavu hydratace molekul proteinu<sup>9</sup>. Průběh konformační změny je nejméně známý aspekt procesu adsorpce proteinu<sup>7</sup>. Je však velice důležitý, neboť má za následek další efekty, především pak ztrátu biologické aktivity.

Významným faktorem ovlivňujícím adsorpci proteinů je tzv. Vromanův efekt. Poprvé jej pozoroval Vroman při studiu adsorpce fibrinogenu a dalších proteinů z plasmy na tuhý povrch<sup>10</sup>. Brash a ten Hove<sup>11</sup> ukázali, že při delší době adsorpce jsou dříve navázané molekuly fibrinogenu na povrchu nahrazovány jinými proteiny z plasmy, které mají vyšší afinitu k povrchu, zatímco v krátkém čase po zahájení adsorpce (do 5 minut) je převládající adsorbovanou molekulou právě fibrinogen. Vromanův efekt je způsoben reverzibilitou vazby proteinu na povrch a rozdílnou rychlostí adsorpce různých proteinů na povrch. Tento jev byl studován i s různými definovanými roztoky proteinů

o různých výchozích koncentracích a na různých površích<sup>10–15</sup>. Slack a Horbett<sup>15</sup> navrhli dokonce i matematický model popisující Vromanův efekt. Tento efekt se uplatňuje i při adsorpci jiných proteinů<sup>16</sup>.

Při studiu adsorpce proteinů je důležité sledovat nejen termodynamiku, ale také kinetiku adsorpce. Při termodynamických studiích lze vycházet z Langmuirovy adsorpční isotermy ( $I$ ), kde množství adsorbovaného proteinu  $\Gamma$  závisí na koncentraci proteinu v roztoku  $c$  a na teplotě  $T$ .

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} c}{1 + \beta c} \quad (1)$$

$$\beta = e^{\frac{\Delta G_{\text{ads}}^{\circ}}{RT}} \quad (2)$$

Naměřené koncentrace proteinů však musí být rovnovážné. To může být experimentálně dosti složité a nepřesné, a proto je lépe sledovat kinetiku adsorpce. Při studiu kinetiky je potřeba uvažovat jednotlivé stupně, které jsme si vyjmenovali výše, neboť každý může proces adsorpce ukončit<sup>8</sup>. Při studiu kinetiky adsorpce bílkoviny na povrch je nutné si zvolit vhodný model, který se porovná s naměřenými daty<sup>17–23</sup>. Je potřeba provést mnoho zjednodušení a některé vlivy úplně zanedbat.

Jako příklad je možné uvést model používaný van Tesselem a spol.<sup>23</sup>. Jde o model, ve kterém je protein uvažován jako disk o průměru  $\sigma_{\alpha}$ , který se adsorbuje na rovný povrch nahodile, po částech a bez překrývání. Části mohou nabývat pouze dvou konformačních stavů –  $\alpha$ , kdy se části adsorbují reverzibilně beze změny průměru, a  $\beta$ , kdy se adsorbují ireverzibilně a průměr se zvětší na  $\sigma_{\beta}$ . Vztahy (3) a (4) jsou kinetickými rovnicemi pro časový vývoj  $\alpha$  a  $\beta$ , kde  $t$  je čas,  $\rho$  je hustota  $\alpha$  a  $\beta$  na povrchu,  $k_{\alpha c}$ ,  $k_d$  a  $k_s$  představují rychlost adsorpce, desorpce a rozprostření,  $c$  je koncentrace  $\alpha$  a  $\beta$  v roztoku,  $\Phi_{\alpha}$  je pravděpodobnost, že přicházející  $\alpha$  dopadne na povrch bez překryvu a  $\Psi_{\alpha\beta}$  je pravděpodobnost, že  $\alpha$  je na povrchu a má dostatečný prostor pro rozšíření.

$$\frac{\partial \rho_{\alpha}}{\partial t} = k_{\alpha c} \Phi_{\alpha}(t) - k_d \rho_{\alpha}(t) - k_s \rho_{\alpha}(t) \Psi_{\alpha\beta}(t) \quad (3)$$

$$\frac{\partial \rho_{\beta}}{\partial t} = k_s \rho_{\alpha}(t) \Psi_{\alpha\beta}(t) \quad (4)$$

Pokud bychom chtěli mít přesnější model a výsledky, bylo by potřeba uvažovat faktory jako je heterogenita povrchu, kooperativní efekt, různé možné konformace proteinu, drsnost povrchu, překryv molekul, skutečný tvar molekul, odpor prostředí aj.

Prostá adsorpce biomolekul na tuhý povrch tedy přináší mnohá úskalí, která je možno eliminovat modifikací povrchů pro adsorpci biomolekul.

#### 4. Metody modifikace povrchů

Jednotlivých metod, jak modifikovat povrch senzorů pro imobilizaci proteinů, je nespočet. V tomto článku se budeme zabývat pouze některými metodami pro nekovalentní imobilizaci polypeptidů.

##### 4.1. Hydrofobizace povrchu senzoru, modifikace povrchu nanášením organického polymeru

Jedním z nejjednodušších způsobů, jak upravit povrch pro imobilizaci proteinů, je hydrofobizace. Nejčastěji se využívá u skleněných povrchů, nebo před nanášením organického polymeru na povrch senzoru.

Hydrofobizaci skleněného povrchu lze provádět po důkladném omytí např. roztokem dichlordimethylsilanu v toluenu<sup>24,25</sup>.

Na takto upravený hydrofobní povrch lze nanést tenkou vrstvu organického polymeru. Nanesená vrstva polymeru je vysoce hladká<sup>24</sup> a hydrofobní. To je výhodné pro zarovnání nerovností, jež se mohou na povrchu vyskytovat. Nanášeným polymerem často bývá polystyren, poly(tetrafluorethylen), polyethylen a další.

##### 4.2. Imobilizace proteinů ve fosfatidylcholinovém filmu

Fosfatidylcholin jsou přirozené součásti biologických membrán. Jejich molekuly obsahují polární a nepolární části. Nepolární část tvoří mastné kyseliny, polární část tvoří terciární amin. Spontánně mohou tvořit ve vodném prostředí dvojvrstvé váčky<sup>26</sup>, v nichž jsou molekuly

fosfatidylcholinů orientovány svou polární částí ven a nepolární částí dovnitř dvojvrstvy.

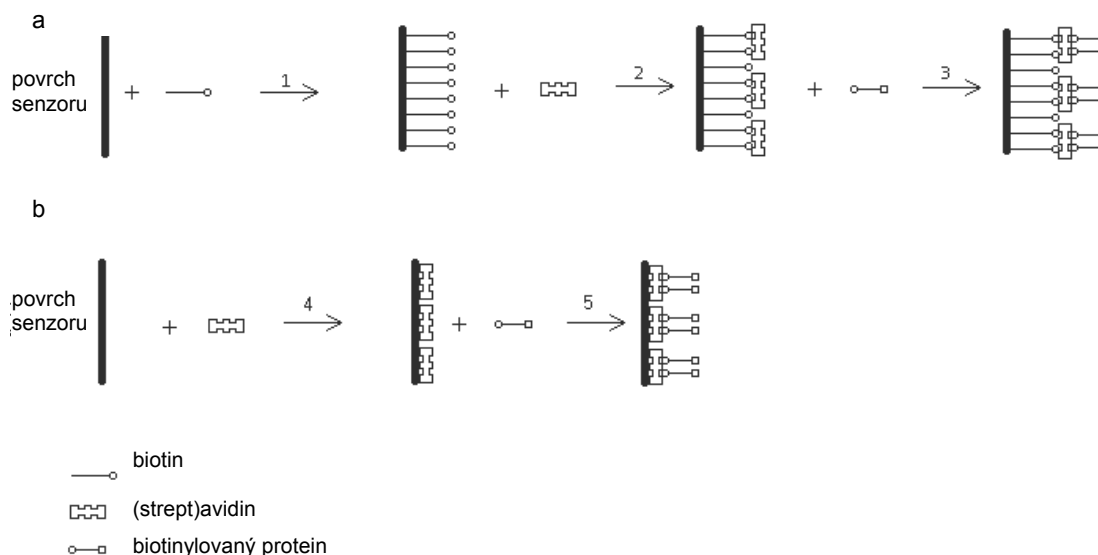
Principem imobilizace je příprava emulze fosfatidylcholinu, k níž se přidá protein. Po vytvoření dvojvrstvy a vstupu proteinu do ní se dvojvrstva přenesla na povrch senzoru.

Tato imobilizační technika je s dobrými výsledky používána pro myoglobin<sup>27</sup> nebo hemoglobin<sup>26,28</sup>.

##### 4.3. Imobilizace proteinů s použitím systému (strept)avidin – biotin

Avidin je glykoprotein vaječného bílku o molekulové hmotnosti 66 kDa (cit.<sup>29,30</sup>). Podíl sacharidové složky je 10%. Avidin je tvořen čtyřmi identickými řetězci (128 aminokyselinových zbytků) a každá podjednotka má vazebné místo s vysokou afinitou pro biotin<sup>31</sup>, může tedy vázat čtyři molekuly biotinu. Obsahuje velké množství kladných nábojů a má vysokou hodnotu izoelektrického bodu (pH 10,5)<sup>29,30</sup>. Hodnota disociační konstanty komplexu avidin – biotin<sup>32</sup> je  $K_d = 10^{-15} \text{ mol dm}^{-3}$  a patří mezi nejsilnější nekovalentní biochemické vazby. Protože jde o glykoprotein s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselinových zbytků, dochází často k nespecifickým interakcím s povrchem<sup>33</sup>.

Případným nespecifickým interakcím sacharidové části molekuly lze zabránit nahrazením avidinu streptavidinem. Streptavidin je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*, má molekulovou hmotnost 60 kDa, izoelektrický bod v rozmezí pH 5 a 6 a je tvořen čtyřmi identickými řetězci (159 aminokyselinových zbytků)<sup>34,35</sup>. Má nižší afinitu k biotinu ( $K_d = 10^{-13} \text{ mol dm}^{-3}$ )<sup>32</sup> a méně nespecificky interaguje s povrchem. Streptavidin i avidin



Obr. 1. Postup imobilizace proteinu při použití systému (strept)avidin – biotin: možné jsou dva postupy. V prvním (1a) se nejprve vytvoří na povrchu senzoru biotinová vrstva (reakce 1), na kterou se následně imobilizuje (strept)avidin (reakce 2). Na takto upravený povrch se imobilizuje biotinylovaný protein (reakce 3). Při druhé metodě (1b) se nejprve imobilizuje na povrch senzoru (strept)avidin (reakce 4), na nějž se imobilizuje biotinylovaný protein (reakce 5)

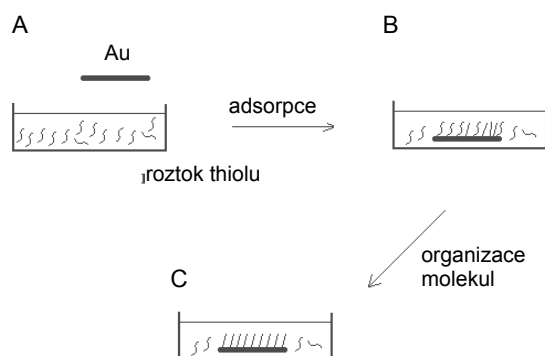
jsou stabilní vůči tepelné denaturaci<sup>36</sup> a jejich vazba k biotinu je prakticky ireverzibilní, což způsobuje problémy s obnovováním povrchu biosenzoru.

Použitím různých derivátů avidinu lze snížit nespecifické interakce a převést ireverzibilní vazbu k biotinu na reverzibilní. NeutrAvidin je deglykosylovaný derivát avidinu, který má podobné vlastnosti ve vazbě k biotinu jako avidin. Poskytuje méně nespecifických interakcí s povrchem. Izoelektrický bod je snížen na pH 6,3 a molekulová hmotnost je 60 kDa (cit.<sup>37,38</sup>). Dalšími deriváty, které se v současné době začínají hojně využívat, jsou nitroavidin (CaptAvidin) resp. nitrostreptavidin, u nichž jsou selektivně nitrované tyrosinové zbytky v místě vazby k biotinu. To má za následek redukci afinity k biotinylovaným molekulám nad pH 9. Vazba na tyto deriváty je reverzibilní a imobilizovaný nitro(strept)avidin se dá opakovaně použít<sup>39</sup>.

Při imobilizaci jsou dva možné přístupy. První, kdy se nejprve imobilizuje biotin, na nějž se následně váže (strept)avidin a posléze biotinylovaný protein (obr. 1a). Nebo druhý, kdy se nejprve imobilizuje (strept)avidin a na něj se váže biotinylovaný protein (obr. 1b). Vazbu obou látek k povrchu je možné uskutečnit buď přímo, nebo lépe kovalentně pomocí samoskladných monovrstev (viz dále).

#### 4.4. Imobilizace založená na samoskladných monovrstvách

Samoskladná monovrstva (SAM z anglického self-assembled monolayer) je vrstva vytvořená na tuhém povrchu spontánní organizací molekul<sup>40</sup>. Je několik typů takovýchto monovrstev, nejpoužívanější jsou aminoalkanthioly, hydroxyalkanthioly, ferrocenylalkanthioly, dialkylsulfidy, diethylsulfidy a sukcinimidylalkylsulfidy nebo jejich směsi na vzácných kovech (nejčastěji na zlatě nebo



Obr. 2. Příprava samoskladné vrstvy na povrchu zlata; zlato se ponoří do roztoku thiolu, který se adsorbuje na povrch (B). Přitom se molekuly samovolně organizují orientované v jednom směru na povrchu zlata a vytvoří monovrstvy (C)

platině) nebo karboxylové kyseliny na oxidu hlinitém. Použitím alkylových řetězců delších než deset uhlíkových atomů je možné obdržet velmi uspořádané vrstvy, které mají málo defektů. Defekty bývají způsobeny především nepravidelností povrchu kovů<sup>41</sup>.

Tvorba samoskladných vrstev je v podstatě organizace molekul na rozhraní tuhé a kapalné fáze navozená silnou chemisorpcí mezi povrchem a organickou molekulou<sup>42</sup>. Jejich hlavní výhodou je jednoduchost jejich přípravy. Lze ji provádět přímo v laboratoři za použití dostupných chemikálií. Z dalších výhod lze uvést stabilitu vrstvy, malou spotřebu proteinů, stabilitu v čase, možnost regenerace vrstvy a další. Z nevýhod lze uvést toxicitu některých chemikálií a v některých případech i dlouhou dobu potřebnou na imobilizaci (nezřídka bývá kolem 24 h).

Postup imobilizace je poměrně jednoduchý. Povrch se nejprve řádně omyje a poté se adsorbuje dostatečně dlouhou dobu monovrstva organické látky (obr. 2). Na ni se buď imobilizuje biomolekula, nebo se k ní připojuje další sloučenina, jež zprostředkovává vazbu k proteinu. Vazba monovrstvy k povrchu je kovalentní; vzniká nejčastěji reakcí atomů síry monovrstvy s kovem.

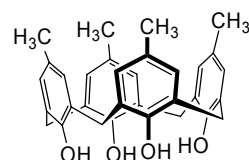
Z nejběžněji používaných látek pro přípravu monovrstev lze uvést cysteamin s glutaraldehydem; thiooktovou kyselinu; 4-aminobenzen-1-thiol, protein A; dithiobis(sukcinimidylpropionát), 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin, 3,3'-dithiodipropanovou kyselinu a mnoho dalších. Byly popsány i metody, kdy samoskladná monovrstva byla tvořena kofaktory NAD<sup>+</sup> (cit.<sup>43</sup>) nebo FAD (cit.<sup>44</sup>).

Zajímavým případem samoskladných vrstev je využití kalix[*n*]arenů. Kalix[*n*]areny jsou cyklické oligomery vznikající kondenzací para-substituovaných fenolů s formaldehydem v alkalickém prostředí<sup>45</sup>. Kalix[*n*]areny byly již dříve použity při syntéze umělých receptorů pro kationty, anionty a neutrální organické molekuly<sup>46</sup>. Struktura typického zástupce této skupiny látek, *p*-methylkalix[4]arenu, je patrná na obr. 3.

Lee a spol.<sup>47</sup> využili modifikované kalix[4]areny k imobilizaci hovězího sérového albuminu (BSA). Použili kalix[4]arenkarboxylovou kyselinu a její ester a sledovali množství imobilizovaného BSA.

Vývoj imobilizačních technik s využitím kalix[*n*]arenů a jejich derivátů je velmi dobrá cesta, jak adsorbovat biomolekuly na povrchy senzorů.

Podrobnější informace o samoskladných monovrstvách a jejich využití naleznete v přehledných článkách<sup>42,48–50</sup>.



Obr. 3. Struktura *p*-methylkalix[4]arenu

#### 4.5. Fotochemická imobilizace proteinů

Jedna z novějších metod, jak rychle imobilizovat proteiny, je fotochemická imobilizace. Imobilizace je způsobena UV světlem. Tato technika je šetrná k biomolekulám a nezávisí na pH a teplotě<sup>51</sup>.

Fotoimobilizační technika může být řízena vystavením vzorku UV světlu nebo laserovému paprsku<sup>52</sup>.

K imobilizaci je potřeba fotoreaktivní povrch, jímž může být aminopolystyren, alkylaminosilikagel atp. Fotoaktivní polymer se připraví reakcí s 4-azido-1-fluor-2-nitrobenzenem za působení mikrovlnného záření, kdy vznikají fotolabilní skupiny<sup>51</sup>. Přídavkem proteinu a ozářením UV světlem vznikne kovalentní vazba polymeru s proteinem.

Naqvi a spol.<sup>51</sup> tuto metodu úspěšně použili pro imobilizaci křenové peroxidasy a glukosaoxidasy.

#### 4.6. Imobilizace proteinů přes hexahistidinovou nástavbu

Tato metoda je založena na afinitní chromatografii s imobilizovaným kovem<sup>53</sup>. Ionty kovů (niklu, zinku, mědi) tvoří komplex s chelatačním činidlem, které obsazuje tři až čtyři koordinační vazby kovového iontu (z šesti možných) a zbylé mohou být obsazeny donory elektronů jako jsou např. histidinové skupiny<sup>54</sup>. Histidinové kotvy jsou vnášeny do proteinu pomocí genového inženýrství. Inzert oligonukleotidového linkeru kódujícího histidinovou kotvu je vnesen do genu kódujícího protein (který již bývá umístěn na plasmidu) a protein je sekretován vhodným mikroorganismem<sup>55</sup>.

Kröger a spol. využili tento systém k imobilizaci antilysozym F<sub>ab</sub> fragmentu D1.3 (histidinový hexamer byl připojen k C-konci těžkého řetězce) a ke sledování jeho interakce s lysozymem z vaječného bílku<sup>56</sup>. Ověřili, že sekundární struktura fragmentu se po imobilizaci nezměnila a fragment si zachoval vysokou aktivitu ve vazbě s lysozymem.

### 5. Závěr

Metodami imobilizace proteinů na povrchy senzorů a sledováním kinetiky a termodynamiky adsorpce se zabývá mnoho výzkumných týmů po celém světě. Cílem je vyvinout metody, které by byly levné, rychlé a které by neovlivňovaly adsorbovaný protein. Některými metodami již bylo dosaženo značného pokroku, např. při použití systému (strept)avidin-biotin.

V současnosti je k dispozici široká paleta metod, která se dá uplatnit u různých molekul bílkovinné povahy rozdílně. Některé metody jsou vhodnější pro enzymy, jiné pro protilátky a jiné použijeme pro imobilizaci strukturálních proteinů. Tato práce nepřinesla úplný výčet metod používaných při modifikaci povrchů senzorů pro imobilizaci biomolekul, ale pouze některé metody modifikace

povrchů senzorů pro nekovalentní imobilizaci proteinů.

*Tato práce vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ ČR číslo NA/7616-3.*

#### LITERATURA

1. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
2. Clark L. C. Jr.: *Trans. Am. Soc. Artif. Internal Organs* 2, 41 (1956).
3. Clark L. C. Jr., Lyons C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
4. Guilbault G. G., Montalvo J.: *J. Am. Chem. Soc.* 91, 2164 (1969).
5. Divis C.: *Annal. Microbiol.*, A 126, 175 (1975).
6. <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/chinap.htm>, staženo 18.8.2004.
7. <http://www.ipfdd.de/research/res16/a12/a12.html#Isothermal>, staženo 18.8.2004.
8. <http://afm1.pharm.utah.edu/PISMCourse/Kinetics/Kinetics2.html>, staženo 18.8.2004.
9. Norde W., Lyklema J.: *J. Colloid Interface Sci.* 71, 350 (1979).
10. Vroman L., Adams A. L.: *J. Biomed. Mater. Res.* 3, 43 (1969).
11. Brash J. L., ten Hove P.: *Thromb. Haemostasis* 51, 326 (1984).
12. Vroman L., Adams A. L.: *J. Colloid Interface Sci.* 111, 391 (1986).
13. Hobert T. A.: *Thromb. Haemostasis* 51, 174 (1984).
14. Wojciechowski P., ten Hove P., Brash J. L.: *J. Colloid Interface Sci.* 111, 455 (1986).
15. Slack S. M., Hobert T. A.: *J. Colloid Interface Sci.* 133, 148 (1989).
16. Freitas Jr. R. A.: *Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility*. Landes Bioscience, Georgetown 2003.
17. Zhdanov V. P., Kasemo B.: *J. Chem. Phys.* 109, 6497 (1998).
18. Lee N. K., Vilgis T. A.: *Phys. Rev. E* 67, 050901-1 (2003).
19. Brusatori M. A., Van Tassel P. R.: *J. Colloid Interface Sci.* 219, 333 (1999).
20. Fragneto G., Su T. J., Thomas R. K., Rennie A. R.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 5214 (2000).
21. Ball V., Huetz P., Elaissari A., Cazenave J. P., Voegel J. C., Schaaf P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7330 (1994).
22. Burns Jr. R. A., El-Sayed M. Y., Roberts M. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4902 (1982).
23. Van Tassel P. R., Viot P., Tarjus G.: *J. Chem. Phys.* 106, 761 (1997).
24. Kotlín R.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2004.
25. Zíka R.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2003.
26. Yang J., Hu N.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48, 117 (1999).

27. Hamachi I., Nakamura K., Fujita A., Kunitake T.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4966 (1993).
28. Fan C., Pang J., Shen P., Li G., Zhu D.: *Anal. Sci.* **18**, 129 (2002).
29. Green N.: *Biochem. J.* **89**, 609 (1963).
30. Green N.: *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 244 (1962).
31. Anzai J., Hoshi T., Osa T.: *Trends. Anal. Chem.* **13**, 205 (1994).
32. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M.: *Methods Enzymol.* **184**, 80 (1990).
33. Steiger B., Padeste C., Grubelnik A., Tiefenauer L.: *Electrochim. Acta* **48**, 761 (2003).
34. Chaiet L., Wolf F.: *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 1 (1964).
35. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M.: *Methods Enzymol.* **184**, 80 (1990).
36. Bayer E. A., Ehrlich – Rogozinski S., Wilchek M.: *Electrophoresis* **17**, 1319 (1996).
37. Hiller Y., Geushani J. M., Bayer E. A., Wilchek M.: *Biochem. J.* **248**, 167 (1987).
38. Vermette P., Gengenbach T., Divisekera U., Kambouris P. A., Griesser H. J., Meagher L.: *J. Colloid Interface Sci.* **259**, 13 (2003).
39. Morgan E., Bayer E. A., Wilchek M.: *Anal. Biochem.* **243**, 257 (1996).
40. <http://www.dojindo.com/sam/SAM.html>, staženo 12.2.2005.
41. Storri S., Santoni M., Minunni M., Mascini M.: *Biosens. Bioelectron.* **13**, 347 (1998).
42. Chaki N. K., Vijayamohan K.: *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1 (2002).
43. Yang H., Yang Y., Liu Z., Zhang Z., Shen G., Yu R.: *Surf. Sci.* **551**, 1 (2004).
44. Vidal J.-C., Espuelas J., Castillo J.-R.: *Anal. Biochem.* **333**, 88 (2004).
45. Vincens J., Böhmer V. (ed.): *Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1991.
46. Ji H. F., Brown G. M., Dabestani R.: *Chem. Commun.* **7**, 609 (1999).
47. Lee M., An W. G., Kim J.-H., Choi H.-J., Kim S.-H., Han M.-H., Koh K.: *Mater. Sci. Eng., C* **24**, 123 (2004).
48. Göpel W., Heiduschka P.: *Biosens. Bioelectron.* **10**, 853 (1995).
49. Ferretti S., Paynter S., Russell D. A., Sapsford K. E.: *Trends Anal. Chem.* **19**, 530 (2000).
50. Tombelli S., Mascini M.: *Anal. Lett.* **33**, 2129 (2000).
51. Naqvi A., Nahar P.: *Anal. Biochem.* **327**, 68 (2004).
52. Kalachikov S. M., Adarichev B. A., Dymshits G. M.: *Bioorg. Khim.* **18**, 52 (1992).
53. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* **258**, 598 (1975).
54. Zachariou M., Hearn M. T.: *Biochemistry* **35**, 202 (1996).
55. Sugiura M., Inoue Y., Minagawa J.: *FEBS Lett.* **426**, 140 (1998).
56. Kröger D., Liley M., Schiweck W., Skerra A., Vogel H.: *Biosens. Bioelectron.* **14**, 155 (1999).

**R. Kotlín and J. E. Dyr** (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague*): **Selected Methods of Modification of Biosensor Surfaces for Protein Immobilization**

Protein immobilization plays a crucial role in biosensor construction. Conformational changes take place during protein adsorption onto a solid surface. The conformational changes may cause a loss of biological activity and may lead to impairment of the sensor. This is why different immobilization techniques have been designed; some of them are commercially utilized. This article is an overview of methods of surface modification for noncovalent protein immobilization.

## PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V PIVOVARSTVÍ

MARCEL KARABÍN, PAVEL DOSTÁLEK  
a PAVEL HOFTA

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,  
Technická 5, 166 28 Praha 6  
karabinm@vscht.cz

Došlo 30.4.04, přepracováno 13.7.05, přijato 21.7.05.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, radikály, antioxidanty, chmel, pivo, mladina, sladina

### Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení metod
  - 2.1. Chemické metody
    - 2.1.1. Metoda podle Kanedy
    - 2.1.2. Metoda 2,6-dichlorfenolindofenolová – metoda MEBAK 7.15.1
    - 2.1.3. Stanovení redukční síly (2,2'-bipyridyl)
    - 2.1.4. Stanovení čísla kyseliny thiobarbiturové
    - 2.1.5. Stanovení celkového antioxidačního stavu
    - 2.1.6. Metoda systému ABTS-TROLOX
    - 2.1.7. Metoda spoluoxidace  $\beta$ -karotenu v modelovém systému
    - 2.1.8. Inhibice lipoxygenasové aktivity
  - 2.2. Fyzikální metody
    - 2.2.1. Elektronová spinová rezonance (ESR)
    - 2.2.2. Stanovení redox potenciálu
    - 2.2.3. Chemiluminiscence
    - 2.2.4. Stanovení oxidačních změn pomocí  $^{18}\text{O}$
3. Závěr

### 1. Úvod

Během posledních deseti let se látky s antioxidačními účinky dostaly do popředí zájmu odborníků v řadě oborů potravinářství, zejména v souvislosti s jejich potvrzenými antikancerogenními účinky. V České republice, kde za minulý rok byla spotřeba piva 161 l na osobu<sup>1</sup> (nejvíce na světě), představuje pivo jeden z nejvýznamnějších zdrojů přírodních antioxidantů v potravě. Polyfenolové látky, jako nejširší skupina antioxidantů v pivovarství<sup>2</sup>, hrají navíc významnou úlohu i v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování. Tento oxidační proces může vyústit v tvorbu celé řady senzoričky negativních látek. Za všechny jmenujme alespoň (*E*)-non-2-enal,

který je díky svému nízkému prahu vnímání ( $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) látkou s velice negativními účinky na výsledný senzoričkový profil produktu<sup>3</sup>. Na druhou stranu polyfenoly přítomné v pivu reagují s bílkovinami za vzniku nežádoucích komplexů, čímž snižují koloidní stabilitu piva. V důsledku těchto pozitivních i negativních vlivů na kvalitu je nyní aktuálním problémem pivovarského průmyslu nalezení cest ke stanovení antioxidačních vlastností a optimalizace obsahu těchto látek. V tomto článku si autoři kladou za cíl shrnout metody známé i z jiných oborů<sup>4</sup>, které jsou použitelné i pro pivovarskou praxi a podělit se o své zkušenosti s aplikacemi některých z nich v prostředí pivovarské analytiky.

### 2. Rozdělení metod

Metody stanovení antioxidačních účinků v pivovarských materiálech je možno rozdělit do dvou základních skupin: *i*) na metody chemické a *ii*) fyzikální<sup>5</sup>.

Chemické metody spočívají nejčastěji v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku naopak brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky. Je nutno podotknout, že srovnání hodnot poskytovaných jednotlivými metodami je velmi nesnadné, neboť jak antioxidantů, tak reaktivních látek způsobujících oxidační změny je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé jeho šíři.

Fyzikální metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Namísto toho sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy provázejí.

V dalším textu jsou metody řazeny podle jejich aplikační frekvence v pivovarství.

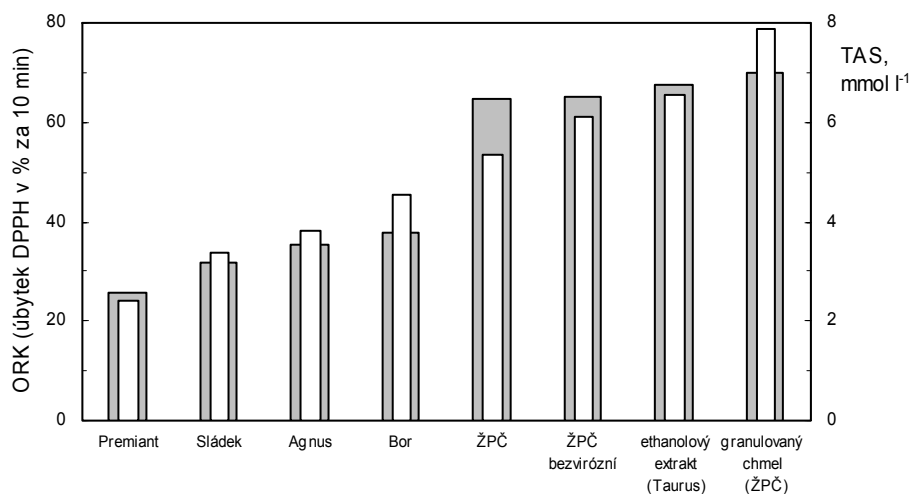
#### 2.1. Chemické metody

##### 2.1.1. Metoda podle Kanedy<sup>6</sup>

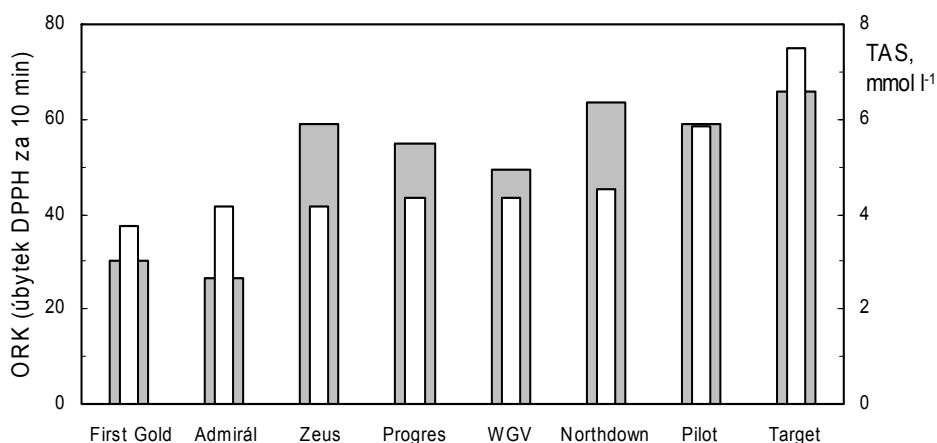
DPPH, 1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl, je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku a přejít do formy stabilní diamagnetické molekuly. Intenzivní fialové zabarvení měřitelné při 520 nm je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Působením antioxidantů se intenzita jeho zabarvení snižuje a měří se v minutových intervalech po dobu 10 minut. Vzhledem k tomu, že je sledován úbytek látky, je možno použít i detekci HPLC, kdy je sledovanou veličinou plocha pásu odpovídající DPPH.

Použitelnost této metody v pivovarství byla autory úspěšně odzkoušena a bylo provedeno srovnání s metodou





Obr. 1. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity dle Kanedy (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) u českých hlávkových chmelů a chmelových výrobků; ŽPČ – Žatecký poloraný červeňák; ■ ORK, □ TAS



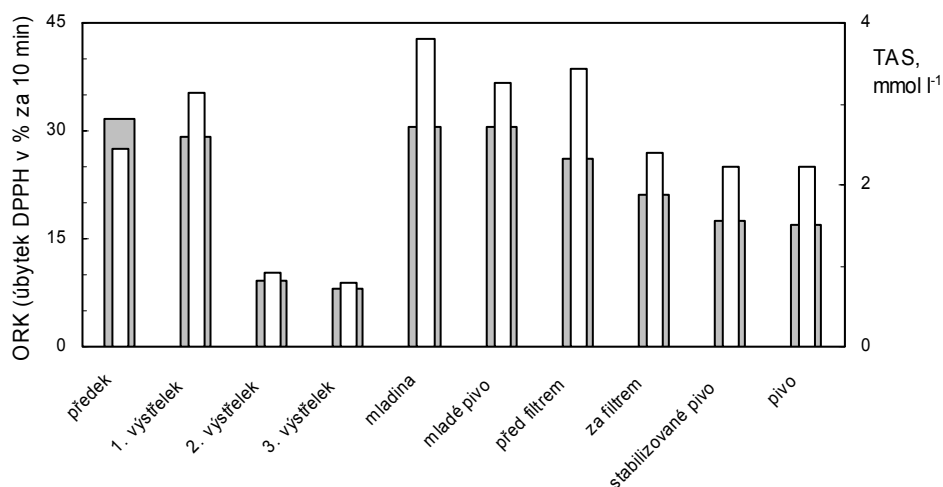
Obr. 2. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity dle Kanedy (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) v zahraničních hlávkových chmelech; ■ ORK, □ TAS

stanovení celkového antioxidačního stavu (TAS – Total Antioxidation Status), uvedenou v kapitole 2.1.5.

Roztok DPPH ( $1,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v ethanolu byl smíchán s acetátovým tlumivým roztokem (pH 4,3) v poměru 2:1. K 2,8 ml pracovního roztoku DPPH bylo přidáno 0,2 ml vzorku a ihned byla proměřena absorbance při 525 nm. Odbarvování indikátoru pak bylo měřeno v 1 cm skleněné kyvetě v minutových intervalech po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Výsledky se vyjadřují jako úbytek DPPH po 10 min v procentech.

Výsledky srovnání s metodou stanovení TAS pro různé materiály jsou uvedeny na obrázcích 1 až 3. Byly

stanoveny antioxidační vlastnosti výluhů 6 českých a 8 zahraničních chmelů a 2 druhů chmelových výrobků uvedenými metodami. Tyto výluhy byly připraveny prostým povařením 10 g vzorku v 400 ml vody pod zpětným chladičem na vodní lázni, následným doplněním na objem 500 ml a filtrací přes papírový a membránový filtr. Dále byly stanoveny i antioxidační vlastnosti jednotlivých mezi-produktů výroby piva. Je zřejmé, že obě metody poskytují srovnatelné výsledky. Uvedené hodnoty jsou průměrem z 5 stanovení, přičemž odchylka jednotlivých stanovení se u všech uváděných výsledků pohybovala v rozmezí 0,1 až 0,2  $\text{mmol l}^{-1}$  u metody TAS, resp. 5–8 % u metody dle



Obr. 3. Srovnání výsledků metod zjišťování oxido-redukční kapacity (ORK) a celkové antioxidační kapacity (TAS) v meziproductech výroby 12 % světlého piva; ■ ORK, □ TAS

Kanedy. Mezi českými odrůdami žatecký poloraný červenák dosahuje výrazně nejvyšších hodnot. Některé odrůdy zahraničních chmelů sice mohou v tomto směru žateckému chmelu konkurovat, zde je však nutno podotknout, že tyto chmely mají často výrazně vyšší obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin, při výrobě se jich proto dávkuje méně a v pivo se proto rozdíl v dosažených hodnotách antioxidačních aktivit vlivem dávkování dále zvyšují. Chmelové výrobky vykazují v podstatě stejné hodnoty antioxidačních vlastností jako hlávkový chmel. Mírné zvýšení lze vysvětlit zkoncentrováním aktivních látek v procesech výroby granulátu respektive ethanoloového extraktu, který je sice koncentrátem, ovšem připravuje se obvykle z odrůd s nižším obsahem polyfenolických látek a tudíž rozdíl v hodnotách neodpovídá míře zkoncentrování.

Na obr. 3 je možno sledovat změny antioxidačních vlastností v průběhu procesu výroby piva. Ve sladince jsou hodnoty vysoké, v důsledku přestupu sladových polyfenolů a reduktonů do sladiny. Oxidačními reakcemi v průběhu chmelovaru se antioxidační aktivita snižuje, ovšem přidávek dalších polyfenolických látek z chmele ji udržuje na hladině srovnatelné se sladinou. Tak je tomu i v procesu hlavního kvašení, kdy jsou do systému dodávány další látky s antioxidačními účinky spolu s kvasinkami. Filtrací je část látek sorbovaných na povrch kvasničné buňky odstraněna, nicméně i po poměrně prudkém poklesu antioxidační aktivity se tyto hodnoty drží na velmi vysoké úrovni.

#### 2.1.2. Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) – metoda MEBAK 7.15.1

Tato metoda<sup>7</sup> je standardní metodou podporovanou MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission). Principem je reakce 2,6-dichlorfenol-

indofenolu s endiolovou skupinou polyfenolů za vzniku bezbarvých dioxosloučenin. Tato změna zbarvení je stanovitelná spektrofotometricky; v případech, kdy není možno optických metod použít (tmavá piva, kvasnicová piva), se používá kombinace s voltametrickou detekcí<sup>8</sup>. Výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalenty množství kyseliny L-askorbové, která slouží jako standard.

#### 2.1.3. Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem

Tato metoda, rozpracovaná Chaponem<sup>9</sup>, je založena na reakci železitých iontů s 2,2'-bipyridylem. Vzniklý komplex je silným oxidačním činidlem a reakcí se širokou skupinou redukujících látek se mění z bezbarvé oxidované formy na červenou, redukovanou. Tuto změnu lze měřit spektrofotometricky při 510 nm po třiminutové prodlevě.

#### 2.1.4. Stanovení čísla kyseliny thiobarbiturové (TBA)

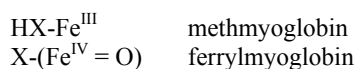
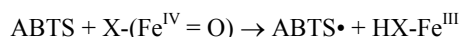
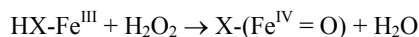
Kyselina thiobarbiturová poskytuje reakci s karbonylovými sloučeninami řady barevných produktů<sup>10</sup>. Reakcí s pivem vzniká převážně žluté zbarvení absorbující při 455 nm a červené absorbující při 530 nm. Zvýšením kyselosti, teploty a doby reakce se tvorba obou barevných produktů významně zvyšuje. Reakce se provádí smícháním roztoku TBA ve směsi isopropylalkoholu a vody s odplyněným pivem, následuje inkubace při 60 °C po dobu 30 min a následně se změří absorbance při 455 a 530 nm proti slepému pokusu. Výsledkem jsou dvě hodnoty absorbance, označované jako číslo kyseliny thiobarbiturové.

#### 2.1.5. Stanovení celkového antioxidačního stavu

Tato metoda<sup>11</sup> byla doposud hojně využívána v medicínské praxi, zejména při stanovování antioxidačních vlastností v krvi a séru. Nejčastěji je používána ko-

měření souprava fy RANDOX, ovšem v poslední době byly vyvinuty nové postupy za použití automatických spektrofotometrů, poskytující srovnatelné výsledky spolu s řadou výhod<sup>12</sup>.

Metoda za použití komerční soupravy spočívá v reakci methmyoglobinu s peroxidem vodíku za tvorby radikálu ferrylyoglobinu. Uvedený radikál reaguje s 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátem) (ABTS) v substrátu a vytváří radikál-kation ABTS<sup>+</sup> modrozelené barvy. Antioxidanty v systému zabraňují tvorbě ABTS<sup>•</sup> v míře odpovídající jejich koncentraci. Reakce probíhá při 37 °C, měří se při vlnové délce 600 nm.



V 1 cm kyvetách byly přesně 1 min po smíchání a promíchání měřeny absorbance  $A_1$  kontrolního vzorku (20  $\mu\text{l}$  redukující vody a 1 ml chromogenu), standardu (20  $\mu\text{l}$  6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny a 1 ml chromogenu). Poté bylo do všech kyvet přidáno 200  $\mu\text{l}$  (250  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) peroxidu vodíku. Po promíchání je za 3 minuty opět měřena absorbance  $A_2$ . Celková antioxidační kapacita TAS v  $\text{mmol l}^{-1}$  se vypočte ze vztahu:

$$\text{TAS} = \left[ \frac{\text{koncentrace standardu}(\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} - \Delta A_{\text{standard}})}{(\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} - \Delta A_{\text{vzorek}})} \right] \times (\text{mmol l}^{-1} \text{ vzorku})$$

kde  $\Delta A_{\text{kontrolní vzorek}} = \Delta A_{1 \text{ kontrolní vzorek}} - \Delta A_{2 \text{ kontrolní vzorek}}$   
 $\Delta A_{\text{standarda}} = \Delta A_{1 \text{ standard}} - \Delta A_{2 \text{ standard}}$   
 $\Delta A_{\text{vzorek}} = \Delta A_{1 \text{ vzorek}} - \Delta A_{2 \text{ vzorek}}$

### 2.1.6. Metoda ABTS-TROLOX

Základem metody<sup>13</sup> je stejně jako u metody TAS generování radikálového kationu ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)). Zde je však měřena relativní zhasací schopnost antioxidantů ve srovnání s 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou kyselinou (TROLOX). Relativní antioxidační aktivita je definována jako koncentrace TROLOXu se stejnou antioxidační aktivitou, jako má 1 mM koncentrace stanovovaného vzorku. V praxi se jako zdroj peroxidového radikálu používá 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH), jehož směs s ABTS se inkubuje v acetátovém pufru o pH 4,3 při 45 °C po dobu 60 min. Po ochlazení a přidání vzorku, resp. pufru v případě slepého vzorku, se po 25 min měří absorbance při 734 nm. Tato tzv. hodnota TRAP (total reactive antioxidant potential) je v pivovarství považována za odpovídající indikátor antioxidačních účinků výhradně polyfenolických látek.

$$\text{TRAP (mM)} = \frac{(A_{\text{vzorku}} - A_{\text{slep}})}{(A_{\text{standard}} - A_{\text{slep}})} \times C_{\text{standard}}$$

### 2.1.7. Metoda spoluoxidace $\beta$ -karotenu v linoleátovém modelovém systému

Tato metoda byla adaptována pro potřeby pivovarství Goupym<sup>14</sup>.  $\beta$ -Karoten je díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci výborným pohlcovačem radikálů. Je přidáván do vzorku a spolu s ním podroben oxidaci. Měřenou veličinou je pokles absorbance  $\beta$ -karotenu při 470 nm za a bez přítomnosti antioxidantů ze vzorku. Antioxidační vlastnosti jsou vyjádřeny jako procenta inhibice oxidace  $\beta$ -karotenu.

### 2.1.8. Inhibice lipoxygenasové aktivity

Metoda inhibice lipoxygenasové aktivity<sup>15</sup> se používá pro určení antioxidačních schopností zejména v ječmenných a sladových extraktech. Lipoxygenasová aktivita se běžně vyjadřuje v nanomolech spotřebovaného kyslíku za sekundu (nkat). Antioxidační kapacita bývá pak stejně jako v předchozím případě vyjadřována v procentech inhibice v porovnání se srovnávacím vzorkem. Další metody (stanovení hydroxylového a superoxidového radikálu<sup>16</sup>, autooxidace methylinoleátu<sup>17</sup>, metoda redukce jodu<sup>16</sup>) jsou používány spíše okrajově.

## 2.2. Fyzikální metody

### 2.2.1. Elektronová spinová rezonance (ESR)

Tato v poslední době velmi oblíbená metoda je schopna určit přítomnost iontů, které obsahují nepárové elektrony, a je proto vhodná pro stanovení volných kyslíkových radikálů, případně jejich komplexů s některými kovovými ionty. Uchida a Ono<sup>18</sup> vyvinuli metodu pro stanovení endogenní antioxidační aktivity piva. Tato technika umožnila i predikci chuťové stability piva. Volné radikály byly detegovány během uměle navozeného oxidačního testu při 60 °C s 9,5 ml vzduchu v prostoru hrdla láhve. Použita byla metoda spinové pasti spolu s ESR. Jako spinová činidla byl použit *N-terc-butyl- $\alpha$ -fenylnitron* a 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-1-oxid (DMPO). Byl prokázán fakt, že k tvorbě hydroxylového radikálu nedochází ihned po započítí testu, ale až po určitém časovém posunu. Tento čas pak může být využit jako indikátor endogenní antioxidační aktivity vzorku piva. Další sledovanou veličinou je  $t_{150}$ , což je odezva po 150 min, která je přímo úměrná koncentraci hydroxylových radikálů ve vzorku.

Pozdější práce<sup>19</sup> se věnovaly využití metody pro stanovení antioxidačních vlastností jednotlivých skupin látek obsažených v pivu. Nepotvrdily však výrazné antioxidační vlastnosti látek ze skupiny polyfenolů, větší význam přikládají látkám na bázi síry.

Možnému využití kombinace ESR a některých chemických metod pro předpověď chuťové stability piv se věnoval Franz<sup>20</sup>, který zjistil zajímavé korelace mezi senzorickým stárnutím a technologickými podmínkami při výrobě mladiny.

### 2.2.2. Stanovení redox potenciálu

Poprvé bylo stanovení redox potenciálu<sup>21</sup> v pivovarském průmyslu použito již ve třicátých letech minulého století. Postupem času byla opuštěna cesta kolorimetrické detekce a výzkum se soustředil výhradně na elektrochemické stanovení rH (redox potenciálu vztaženému ke standardní vodíkové elektrodě). Postupem času byly určeny tři skupiny látek, které rozhodující měrou ovlivňují hodnotu redox potenciálu v pivovarském procesu.

- rozpuštěný kyslík (hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci),
- těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď),
- látky povahy reduktonů.

Bylo rovněž prokázáno, že měření potenciálu vyjadřují pouze okamžitý oxidačně-redukční vliv zmiňovaných látek ve vzorku, a že tedy tyto hodnoty nemohou být použity pro kvantifikaci obecných antioxidačních vlastností vzorku, neboť na něm se podílejí i další, elektrochemicky neaktivní látky. Další výzkum se proto omezil na optimalizaci používaných systémů s tím, že sledování redox potenciálů bude mít pouze informativní charakter a bude používáno jako způsob sledování obsahu rozpuštěného kyslíku.

### 2.2.3. Chemiluminiscence

Japonští autoři Kaneda<sup>22</sup> a Kobayashi<sup>23</sup> zkoumali rovněž použití chemiluminiscence jako metody pro stanovení intenzity oxidace lipidů. Bylo vyzkoušeno více luminiscenčních činidel, z nichž se nejvíce osvědčil 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion (isoluminol) a 6-fenyl-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a] pyrazin-3-on, což je analog luciferinu. Bylo zjištěno, že rozhodující vliv na intenzitu oxidace lipidů má jednak teplota, kdy bylo dosaženo největší intenzity luminiscence při teplotách okolo 65 °C, jednak intenzita míchání. To odpovídá podmínkám, které jsou běžné při rmutování, které bylo již dříve považováno za kritický krok z hlediska oxidace lipidových složek při přípravě mladiny.

Jejich práce rozvinul Walters<sup>15</sup>, jehož postup je založen na reakci luminolu s peroxidem vodíku za přítomnosti zesilovače (1,1,4,7,7-diethylentriaminpentaoctová kyselina), která produkuje záblesk světla, stálý po dobu 30 s. Přítomnost antioxidantu pak způsobuje zhasnutí luminiscence a pokles intenzity signálu.

Srovnání antioxidačních vlastností metodou chemiluminiscence v pivo a víně se věnovali italští autoři<sup>24</sup>, kteří zároveň ověřili pro tyto nápoje vztahy mezi antioxidačními vlastnostmi zjištěnými touto metodou a obsahem polyfenolických složek.

### 2.2.4. Stanovení oxidačních změn pomocí <sup>18</sup>O

Řada autorů, jmenovitě Collin<sup>25</sup>, Noel<sup>26</sup> a Lermusieau<sup>27</sup> se v posledních letech zabývalo možnostmi použití isotopu kyslíku <sup>18</sup>O pro určení oxidačních změn probíhajících během skladování piva. Do prostoru hrdla lahve je vstříknuto určité množství isotopu, pivo v lahvi je podrobeno stárnutí po dobu několika měsíců při pokojové teplotě a potom je pivo analyzováno metodou GC-MS. Přítomností nebylo prokázáno zvýšené množství isotopu v molekulách

(E)-non-2-enalu, což indikuje, že většina karbonylových sloučenin nevzniká oxidačními změnami lipidových složek během skladování piva.

## 3. Závěr

Velký zájem, který se v posledních letech soustřeďuje na otázku antioxidačních vlastností různých látek jak v řadách laické veřejnosti, tak i potravinářských odborníků, má za následek nutnost vytvoření spolehlivých metod pro stanovení jak obsahu těchto látek, tak i účinků, které jejich přítomnost v potravinách navozuje. V pivovarské technologii je k těmto aspektům nutno přidat i fakt, že oxidační reakce v celém procesu výroby piva mají za následek zásadní ovlivnění organoleptických vlastností produktu. Proto patří pivovarští analytici k neaktivnějším co do snahy optimalizovat dostupné metody pro jejich potřeby tak, aby byla získána metoda co nejdříve použitelná, rychlá a zároveň přesná. Uvedený přehled metod je výběrem těch, které již byly v pivovarství odzkoušeny a jsou ve větší či menší míře používány. Také jsou srovnávány hodnoty získané za použití dvou z těchto metod a spolu s tím jsou ověřovány i specifické vlastnosti chmele odrůdy žatecký poloraný červeňák. Pozornost byla také věnována změnám profilu antioxidační aktivity v průběhu procesu výroby piva s ohledem na kritické body, ve kterých dochází k největšímu oxidačnímu zatížení produktu.

*Tato práce je součástí řešení výzkumného centra IM6215648902.*

## LITERATURA

1. Statistické přehledy 2003, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský Praha, 2004.
2. Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
3. Walters M. T., Heasman A. P., Hughes P. T.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55, 83 (1997).
4. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 (2004).
5. Moll M: Monatsschr. Brauwiss. 54, 64 (2001).
6. Kaneda H., Kobayashi N., Takashio I., Tamaki I., Shinotsuka K.: Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am. 36, 41 (1999).
7. MEBAK vol. II, method 7.15.1, 307 (1979).
8. Ralph M. S., Neumann R., Wabner D.: Electroanalysis 14, 969 (1999).
9. Chapon L., Louis C., Chapon S.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 13, 307 (1971).
10. Grisby J. H., Palamand S. R.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 34, 49 (1976).
11. Trefil L., Racek J., Holeček V.: Randox – Seminář, Plzeň, Sborník přednášek 24 (2000).
12. Erel O.: Clin. Biochem. 37, 277 (2004).
13. Araki S., Kimura T., Shimizu C., Furusho S., Takashio M., Shinotsuka H.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 57, 34 (1999).

14. Goupy P., Hughes M., Boivin P., Amiot M. J.: *J. Sci. Food Agric.* 79, 1625 (1999).
15. Walters M. T., Hughes P. S., Bamforth C. W.: *Proc. Congr. – Inst. Brew. (Asia Pac. Sect.)* 24, 103 (1996).
16. Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M. N., Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 24 397 (1993).
17. Ohtsu K., Hashimoto N., Inoue T., Miyki S.: *Brew. Digest* 6, 18 (1986).
18. Uchida M., Ono M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 198 (1996).
19. Andersen L., Outtrup H., Skibsted H.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3106 (2000).
20. Franz O., Back W.: *Tech. Q. MBAA Commun.* 40, 20 (2003).
21. Buckee G. K., Mom M., Nye J. W. S., Hammond, R. V.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 26, 607 (1997).
22. Kaneda H., Kano Y., Kamimura M.: *J. Inst. Brew.* 97, 105 (1991).
23. Kobayashi N., Kaneda H., Kano Y., Koshino S.: *J. Inst. Brew.* 99, 143 (1993).
24. Girotti S., Bolelli L., Fini F., Budini R., Arfelli G.: *Ital. J. Food Sci.* 14, 113 (2002).
25. Collin S., Noel S., Bonte S., Metais N., Bodart E., Peladan F., Dupire S.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 26, 535 (1997).
26. Noel S., Liegeois C., Lermusieau G., Collin S.: *J. Inst. Brew.* 105, 269 (1999).
27. Lermusieau G., Noel S., Liégeois C., Collin S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 29 (1999).

**M. Karabín, P. Dostálek, and P. Hofta** (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Application of Methods for Estimation of Antioxidant Activity in Brewing**

In recent years many methods for determination of antioxidant activity in malting and brewing have been described. Brewing raw materials such as barley, malt, hop and hop products, and wort are complex in their composition, and in type and amount of antioxidants. This paper describes chemical and physical methods of analysis of antioxidants and determination of their activity in hop and in brewing.

## CENA MERCK

### Soutěž o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck“ 2006

Ve dnech 30. až 31. ledna 2006 se uskutečnil již 9. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos organizovala Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za podpory firem Merck, s.r.o., Praha, BorsodChem MCHZ, s.r.o., Ostrava, Linde Technoplyn a.s., Praha a Hanácká kyselka, s.r.o., Horní Moštěnice. Rekordní počet 22 účastníků, včetně tří zástupců ze Slovenska, si kromě odborného programu vychutnal exkurzi na olomouckou radnici, zahrál bowling, zjistil, čím se zabývají pracovníci Katedry analytické chemie PŘF UP či zatancoval a zazpíval na přátelském posezení s rautem v Menze UP v Nefedíně.

Druhý den pak měla porota nelehký úkol vybrat práce nejlepší z dvaadvaceti velice kvalitních a vyrovnaných prací. První místo získal Pavel Řezanka z Ústavu analytické chemie Fakulty chemického inženýrství Vysoké školy chemicko-technologické v Praze s prací „Interakce modifikovaných zlatých nanočástic s nukleotidy“. Druhé místo obsadil Vojtěch Adam z Katedry analytické chemie Příro-



Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck“ 2006; zleva: Vojtěch Adam, Pavel Řezanka, manažerka prodeje firmy Merck Ing. Lenka Ungrmanová, Renáta Myjavcová, Magdalena Megová



Hromadná fotografie účastníků, porotců a organizátorů soutěže „O cenu firmy Merck“ 2006

dovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně s prací „Elektrochemické techniky v nádorové diagnostice“ a třetí místo shodně získaly studentky Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci Magdalena Megová s prací „Příprava a studium liposomů a jejich využití jako modelů biomembrán“ a Renáta Myjavcová s prací „Analýza chinolinů v cigaretovém kouři“. Zvláštní cenu Univerzity Palackého, kterou osobně předával děkan Přírodovědecké fakulty prof. Ševčík, pak získala Antónia Gyöngyová ze Slovenské Technické Univerzity v Bratislavě za práci „Identifikácia prchavých látok vo vzorkách slovenských brandy“. Pavel Řezanka a Magdalena Megová si ještě odnesli i ocenění za nejlepší práci hodnocenou přímo soutěžícími.

Fotografie z celého průběhu soutěže, výsledky a další informace je možné najít na internetových stránkách <http://ach.upol.cz/soutez>. Organizátoři věří, že se alespoň částečně podařilo naplnit myšlenku, že již samotná účast v této soutěži je výhrou, a že si všichni účastníci odnesli spoustu zajímavých nápadů, ideí a možností spolupráce, protože dnešní vědecká práce není věcí jednotlivců, ale kooperujících týmů. Na závěr nezbývá než podotknout, že jubilejní 10. ročník této soutěže se uskuteční za rok na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a popřát našim mladým vědcům hodně úspěchu v další práci.

Jan Petr, Václav Ranc a Vítězslav Maier

## DERIVATIZACE AMINOKYSELIN, PEPTIDŮ A PROTEINŮ PRO LASEREM INDUKOVANOU FLUORESCENČNÍ DETEKCI V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

MARKÉTA RYVOLOVÁ\*, PETR TÁBORSKÝ, PATRIK VRÁBEL, JOSEF HAVEL a JAN PREISLER

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
preisler@chemi.muni.cz*

Došlo 27.5.05, přepracováno 13.12.05, přijato 27.12.05.

Klíčová slova: fluorescenční detekce, rhodamin B isothiokyanát, derivatizace, kapilární elektroforéza, laser

### Úvod

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda využitelná pro široké spektrum analytů – od jednoduchých anorganických iontů<sup>1</sup> až po složité biomolekuly<sup>2,3</sup>. Mezi největší výhody této metody patří především její vysoká účinnost, nízká spotřeba chemikálií, dávkovaných vzorků a krátké časy analýz. Lze ji navíc spojit s mnoha druhy detektorů; mezi běžně používané patří např. UV/VIS absorpční detektor<sup>4,5</sup>, elektrochemický<sup>6,7</sup>, vodivostní<sup>8</sup> a MS detektor<sup>9,10</sup>. K nejcitlivějším způsobům detekce vůbec náleží laserem indukovaná fluorescenční (LIF) detekce<sup>11,12</sup>.

LIF detekce v kombinaci s kapilární zónovou elektroforézou (CZE) umožňuje dosažení extrémně nízkých detekčních limitů, pohybujících se až na úrovni jednotlivých molekul<sup>13–16</sup>. Možnost využití této metody je ale výrazně omezena fluorescenčními vlastnostmi jednotlivých analytů v kombinaci s použitým zdrojem buďícího záření. U biologicky aktivních látek, jako jsou např. aminokyseliny, peptidy nebo proteiny, které vykazují přirozenou fluorescenci pouze v UV oblasti spektra, lze pro buzení jejich nativní fluorescence využít např. Ar<sup>+</sup> laser s přechodem při 275,4 nm (cit.<sup>11</sup>), neodymem dopovaný granátový (Nd:YAG) laser s vlnovou délkou 266 nm (cit.<sup>17</sup>) a další.

Pokud analyt nemá vhodné spektrální vlastnosti, aby bylo možné sledovat jeho přirozenou fluorescenci nebo vyžaduje použití nákladného UV laseru, lze jej modifikovat a začlenit do jeho struktury fluorofor, jehož fluorescen-

ce se deteguje. Časté je použití derivatizačních barviv vykazujících fluorescenci ve viditelné oblasti spektra, kde existuje široká škála laserů využitelných jako zdroje excitačního záření. Pro LIF se kromě různých přechodů Ar<sup>+</sup> laseru s nejpoužívanějším přechodem 488 nm (cit.<sup>18</sup>), vhodným pro excitaci fluoresceinu, a He-Ne laseru, využívá také celá řada pevnolátkových, resp. diodových laserů, které se díky nízké ceně a snadné dostupnosti dočkaly velkého rozšíření. Příkladem relativně dostupného pevnolátkového laseru je diodově pumpovaný Nd:YAG laser s násobenou frekvencí emitující záření o vlnové délce 532 nm (cit.<sup>19</sup>).

Pro derivatizaci aminokupin peptidů (resp. proteinů) jsou nejvhodnější dvě skupiny derivatizačních činidel; isothiokyanáty a sukcinimidylestery. Jejich reakcí s aminokupinou analytu vzniká z isothiokyanátu derivát thioamočoviny nebo ze sukcinimidylesteru peptidová vazba. Reakce je velmi závislá na pH, protože aminokupina analytu musí být deprotonovaná, což při derivatizaci *N*-koncových aminokupin vyžaduje pH alespoň 7,5 a při derivatizaci  $\epsilon$ -aminokupiny lysinu pH 8–10 (cit.<sup>20</sup>).

Jak již bylo řečeno, je možno kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí dosáhnout velmi nízkých mezí detekce, ale ve většině případů jsou tyto hodnoty zjištěny analýzou derivátu, který byl připraven v daleko vyšší koncentraci (řádově  $\mu$ M) a následně zředěn<sup>13,21</sup>. Takto získané meze detekce mají význam v mnoha metodách odvozených od luminiscenční spektroskopie (fluorescenční imunoanalýza, fluorescenční rezonanční energetický přenos, průtoková cytometrie, atd.), ale pokud jde o přímou derivatizaci vzorků o nízkých koncentracích, jsou dosažené meze detekce výrazně horší, protože reakce zdaleka neprobíhá kvantitativně<sup>22</sup>.

Cílem této práce bylo najít vhodný postup derivatizace aminokupin biomolekul a jejich následné detekce metodou LIF, ověřit jej a zjistit reálné meze detekce pro případné využití v praxi.

### Experimentální část

#### Chemikálie a činidla

Rhodamin B, rhodamin B-isothiokyanát (RBITC), isoleucin, glutamová kyselina, lidský angiotensin I a bradykinin (vše Sigma Aldrich, Německo); hovězí insulin (USB, USA); citronová kyselina a hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, Česká republika); aceton a methanol (Scharlau, Německo). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Voda byla redestilována v křemenné aparatuře firmy Heraeus (Německo).

\* Markéta Ryvolová získala 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie

## Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

Experimenty byly provedeny na přístroji pro kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescenční detekcí sestaveném na Katedře analytické chemie PřF MU Brno<sup>19</sup>. Zdrojem excitačního záření byl Nd:YAG laser s násobenou frekvencí (532 nm) a výkonem 5 mW; model DPGL-3005F vyrobený firmou Casix (Čína). Laserový paprsek byl skleněnou čočkou dodanou firmou Edmund Scientific (USA) s ohniskovou vzdáleností 10 mm zaostřen do středu křemenné kapiláry vyrobené firmou Polymicro Technologies (USA). Vnitřní průměr kapiláry byl 50  $\mu\text{m}$ , vnější průměr byl 375  $\mu\text{m}$ , efektivní délka 30 cm a celková délka 37 cm. Fluorescence analytu byla objektivem mikroskopu s šedesátinásobným zvětšením, rovněž od společnosti Edmund Scientific (USA), směřována na fotonásobič model R6356 od firmy Hamamatsu Photonics (Japonsko). Rozptýlené laserové záření bylo eliminováno použitím stínítek a optických filtrů s transmitancí v oblasti 560–660 nm dodaných společností Edmund Scientific Optics (USA). Signál z fotonásobiče byl 16 bitovým A/D převodníkem digitalizován a vyhodnocen počítačem. Frekvence ukládání dat byla 4 Hz. Systém byl ovládán programem vytvořeným v prostředí LabVIEW v. 6.0 dodaným firmou National Instruments (USA), data byla zpracována v programu MS Excel 2000 společnosti Microsoft (USA)<sup>19</sup>.

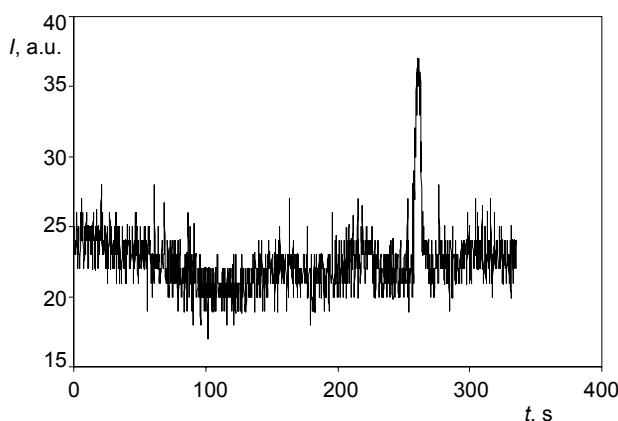
## Výsledky a diskuse

### Meze detekce

Proměřením excitačních a emisních spekter několika rhodaminových barviv (rhodamin B, rhodamin 6G, rhodamin 123 a rhodamin B-isothiokyanát) bylo zjištěno, že při použití optických filtrů, popsanych v instrumentální části, má v kyselém prostředí (0,02 mol l<sup>-1</sup> citronová kyselina v 10% MeOH, pH 2,1) nejvhodnější spektrální vlastnosti rhodamin 6G a v alkalickém prostředí (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10) rhodamin B (cit.<sup>23</sup>). Vzhledem k předpokládaným reakčním a separačním podmínkám byl pro měření meze detekce zvolen rhodamin B. Roztok barviva o koncentraci 1.10<sup>-12</sup> mol l<sup>-1</sup> v separačním elektrolytu (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10) byl analyzován kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE LIF). Dávkování vzorku proběhlo buď hydrodynamicky po dobu  $t = 30$  s při rozdílu výšky hladin elektrolytu ve vialkách na koncích kapiláry  $\Delta h = 2$  cm nebo elektromigračně při napětí  $U = 5$  kV ( $t = 10$  s). Separační napětí bylo 10 kV.

Z elektroferogramu rhodaminu B dávkovaného hydrodynamicky byla z trojnásobku směrodatné odchylky stanovena mez detekce 2.10<sup>-13</sup> mol l<sup>-1</sup>.

Za stejných podmínek proběhlo i určení meze detekce



Obr. 1. Elektroferogram rhodamin B-isothiokyanátu (1.10<sup>-11</sup> mol l<sup>-1</sup>), hydrodynamické dávkování ( $\Delta h = 2$  cm,  $t = 30$  s), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt: 0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

isothiokyanátu rhodaminu B. Koncentrace dávkovaného roztoku byla 1.10<sup>-11</sup> mol l<sup>-1</sup>. Výpočtem byla stanovena mez detekce tohoto barviva na 4.10<sup>-12</sup> mol l<sup>-1</sup> (obr. 1). Podobné výsledky byly získány i pro elektromigrační dávkování.

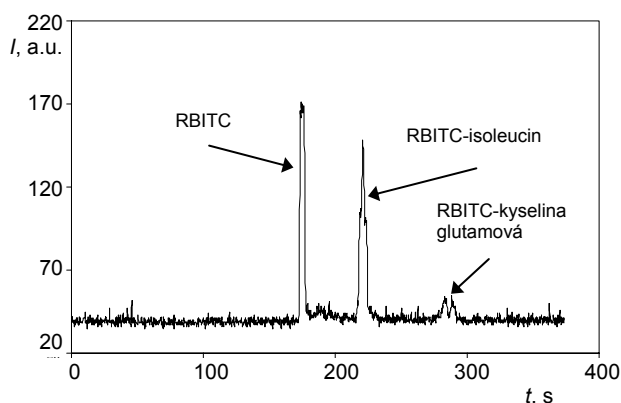
### Derivatizace aminokyselin

V literatuře bylo publikováno několik derivatizačních postupů<sup>20,24–27</sup>, na základě kterých byl navržen a optimalizován postup poskytující nejvyšší výtěžek reakce a také nejvyšší signál analyzovaných derivátů. Jako výchozí látky pro derivatizaci byly pro svou strukturní jednoduchost vybrány aminokyseliny. Protože je pro průběh reakce nutné, aby aminoskupina byla deprotonovaná, probíhala modifikace v alkalickém prostředí. Byla připravena směs aminokyselin (isoleucinu a glutamové kyseliny) ve fosforečnanu (0,02 mol l<sup>-1</sup>; pH 10); koncentrace každé z aminokyselin ve směsi byla 1.10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>. 50  $\mu\text{l}$  této směsi bylo derivatizováno 50  $\mu\text{l}$  roztoku činidla RBITC o koncentraci 2.10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> v acetonu. Směs byla inkubována při 50 °C po dobu 5 h (cit.<sup>24</sup>). Před analýzou byla směs ředěna separačním elektrolytem (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan s 10% MeOH; pH 10) 1:1000. Dávkováno bylo elektromigračně ( $t = 10$  s,  $U = 5$  kV) a separační napětí bylo 10 kV.

Na obr. 2 jsou vidět jak píky modifikovaných aminokyselin, tak i výrazný pík nezreagovaného barviva. Důvodem vzniku více produktů, jak je patrné zejména u derivátu glutamové kyseliny, je použité činidlo, které je směsí dvou isomerů (5- a 6- RBITC). Z isoleucinu vznikají pravděpodobně také dva deriváty, které však od sebe nejsou odděleny. Při derivatizaci malých aminosloučenin se tedy může negativně projevit nízká kvalita činidla; dle našich zkušeností se lze s nečistotami v činidle nebo s jeho výskytem setkat i u tzv. chromatograficky čistých činidel.

Pokud vyjdeme ze zjednodušujícího předpokladu, že



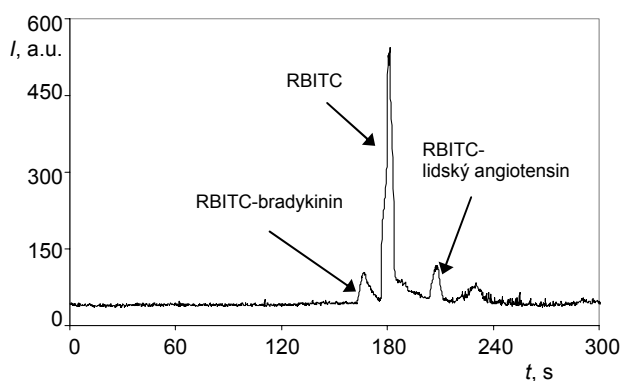


Obr. 2. Separace aminokyselin derivatizovaných rhodamin B-isothiokyanátem ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

intenzita fluorescence RBITC se po navázání na aminokyselinu výrazně nezmění, lze z poměrů ploch jednotlivých píků usoudit, že asi 60 % činidla zůstalo nezreagováno a přibližně 40 % je ve směsi přítomno ve formě derivátu. Rozdílnou velikost plochy píků derivátů isoleucinu a glutamové kyseliny lze vysvětlit různou reaktivitou aminokyselin s RBITC; derivatizace isoleucinu tedy probíhá snáze.

#### Derivatizace peptidů

Dalším krokem byla derivatizace a separace peptidů, která probíhala podle stejného postupu a ve stejném separačním pufru jako modifikace aminokyselin. Jako modelové vzorky byly vybrány lidský angiotensin I a bradykinin. Bylo derivatizováno 50  $\mu\text{l}$  směsi peptidů ve fosforečnanu (koncentrace jednotlivých peptidů byly  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ )



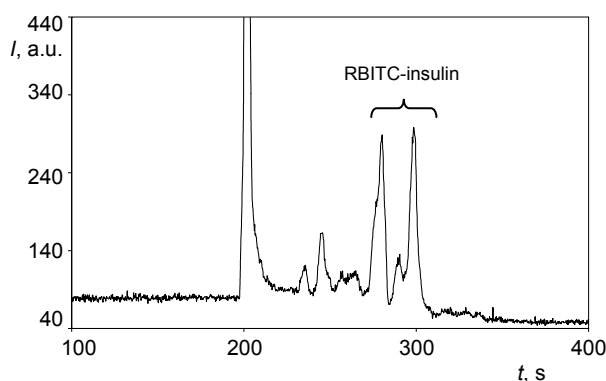
Obr. 3. Separace peptidů derivatizovaných rhodamin B-isothiokyanátem ( $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

roztokem 50  $\mu\text{l}$  barviva o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonu. Směs byla před separací ředěna v poměru 1:1000.

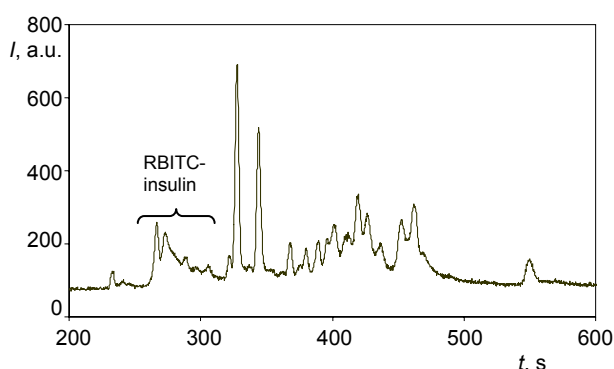
Z obr. 3 je patrné, že CZE LIF lze využít k rychlému a citlivému stanovení těchto peptidů díky jejich rozdílným migračním časům. Rozdíl v migraci způsobuje asparagová kyselina, přítomná ve struktuře angiotensinu, jejíž boční řetězec s disociovanou karboxylovou skupinou vnáší do molekuly RBITC-angiotensinu navíc jeden záporný náboj. V porovnání s aminokyselinami není pozorováno žádné štěpení píků derivátů, což lze vysvětlit tím, že v tomto případě je pro rychlost migrace určující spíše velikost molekuly peptidu a nikoli molekuly činidla, jak tomu bylo u aminokyselin.

#### Derivatizace insulínu

Pro derivatizaci proteinů byl jako jeden z menších a jednodušších vybrán hovězí insulin. Pro modifikaci byl použit stejný postup jako v předchozích případech. 50  $\mu\text{l}$  insulínu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  bylo modifikováno 50  $\mu\text{l}$  RBITC o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Směs byla ředěna 1000 $\times$ . Separací účinnost CZE proteinů snižuje především jejich sorpce na stěnu kapiláry. Tento jev je omezen např. při extrémních hodnotách pH (cit.<sup>28,29</sup>). Proto byly v této práci testovány možnosti separace jak v alkalickém, tak v kyselém separačním elektrolytu. V alkalické oblasti byl použit opět fosforečnanový pufr ( $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  v 10% MeOH) o pH 10 a v kyselém oblasti byl testován citrátový pufr ( $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  v 10% MeOH) o pH 2,6. Separací napětí bylo pro fosforečnan 10 a pro citrát 15 kV. Elektroferogramy obou separací ukazují obr. 4 a 5. Je patrné, že vzniká více produktů, což je pravděpodobně způsobeno především přítomností více vazebných míst v molekule insulínu. Ten se skládá ze 2 řetězců spojených disulfidovými můstky a navíc obsahuje lysin, takže má teoreticky tři možná vazebná místa. Současně se může



Obr. 4. Separace insulínu derivatizovaného rhodamin B-isothiokyanátem v alkalickém prostředí ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10



Obr. 5. Separace insulinu derivatizovaného rhodamin B-isothiokyanátem v kyselém prostředí ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektro-migrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí:  $15 \text{ kV}$ , separační elektrolyt:  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  citrónová kyselina v 10% MeOH; pH 2,6

insulin rozpadat, případně agregovat, což je jedním z důvodů snížení citlivosti analýzy. Z obr. 5 je také vidět, že v kyselém prostředí se činidlo rozpadá daleko více, v důsledku čehož je elektroferogram mnohem komplikovanější.

#### Srovnání mezi detekce

Jak již bylo řečeno, lze mez detekce derivatizační reakce určit dvěma způsoby. Jedním z nich je derivatizace koncentrovaného roztoku vzorku a jeho následné ředění. Druhým způsobem je přímá derivatizace vzorků o nízkých koncentracích. Tento způsob je z analytického hlediska významnější především pro analýzu reálných vzorků, ale takto zjištěné meze detekce jsou o několik řádů vyšší<sup>22</sup>. Je to pravděpodobně způsobeno zejména rychlostí derivatizační reakce, která je ve vyšších koncentracích daleko vyšší a poskytuje tedy mnohem vyšší výtěžek. V tabulce I je uvedeno srovnání těchto dvou přístupů. Hodnoty označené jako  $\text{LOD}_1$  jsou meze detekce, vypočtené z trojnásobku směrodatné odchylky šumu v okolí píku (25 s), pro roztoky derivatizované při vysokých koncentracích ( $\sim 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a následně ředěné na koncentraci vhodnou pro analýzu ( $\sim 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ). Jako  $\text{LOD}_2$  jsou označeny nejnižší výchozí koncentrace vzorků, které se podařilo derivatizovat. Je vidět, že se tyto hodnoty

#### Tabulka I

Srovnání mezi detekce dosažených ředěním koncentrovaného derivátu ( $\text{LOD}_1$ ) a dosažených přímou derivatizací ( $\text{LOD}_2$ )

Látka	$\text{LOD}_1 [\text{mol l}^{-1}]$	$\text{LOD}_2 [\text{mol l}^{-1}]$
RBITC	$4 \cdot 10^{-12}$	–
Aminokyseliny	$4 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-8}$
Peptidy	$1 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-7}$
Insulin	$1 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-7}$

liši o 2 až 3 řády. Také je patrné, že čím jednodušší je molekula derivatizovaného analytu, tím nižší meze detekce je možné dosáhnout.

#### Závěr

V této práci byla charakterizována citlivost sestavy CE LIF s Nd:YAG laserem ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ), jejíž mez detekce pro rhodamin B-isothiokyanát byla stanovena na  $4 \cdot 10^{-12} \text{ mol l}^{-1}$ . Současně byl vybrán a ověřen postup pro derivatizaci aminokyselin, peptidů a insulinu. Separace biomolekul byla provedena v alkalickém prostředí a pro insulin také v prostředí kyselém. Bylo potvrzeno, že vzorky o vyšších koncentracích lze derivatizovat s vyšším výtěžkem, který se pohybuje kolem 50 %. Mez detekce získaná ředěním koncentrovaného vzorku je o 2–3 řády nižší než mez detekce dosažená přímou derivatizací vzorků o nízké koncentraci. Výtěžek takovéto reakce je několikanásobně nižší než v předešlém případě. Ve srovnání s mezi detekce přístroje, stanoveným rhodaminem B, zvyšuje derivatizační reakce stanovenou mez detekce o několik řádů. Toto snížení citlivosti je způsobeno především nízkým výtěžkem reakce. Dalším faktorem je vznik několika produktů reakce. U aminokyselin je vznik několika derivátů způsoben zejména přítomností dvou isomerů činidla (5-, 6- RBITC). U peptidů a proteinů hraje největší roli přítomnost více vazebných míst v molekule analytu a případně agregace nebo rozpad samotného vzorku, což způsobuje vznik většího počtu derivátů. Výsledky potvrzují, že čím jednodušší je struktura analytu, tím nižší meze detekce je možné dosáhnout.

*Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, výzkumný záměr č. MSM0021622415 a Grantové agentuře, projekt č. 203/03/0515.*

#### Seznam zkratk

a.u.	auxiliary unit – pomocná jednotka pro vyjádření intenzity fluorescence
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit of detection – mez detekce
Nd:YAG	neodymem dopovaný granátový laser
RBITC	rhodamin B-isothiokyanát
5-RBITC	rhodamin B-isothiokyanát s isothioskupinou vázanou v poloze 5
6-RBITC	rhodamin B-isothiokyanát s isothioskupinou vázanou v poloze 6

#### LITERATURA

- Kaniánský D., Masár M., Marák J., Bodor R.: J. Chromatogr., A 834, 133 (1999).
- Kašicka V., Prusík Z.: Am. Lab. 26, 22-Oct (1994).

3. Foret F., Thompson T. J., Vouros P., Karger B. L., Gebauer P., Boček P.: *Anal. Chem.* **66**, 4450 (1994).
4. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* **56**, 111 (1984).
5. Walbroehl Y., Jorgenson J. W.: *J. Chromatogr., A* **315**, 135 (1984).
6. Wallingford R. A., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **60**, 1972 (1988).
7. Huang X., Luckey J. A., Gordon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **61**, 766 (1989).
8. Zemann J. A.: *Trends Anal. Chem.* **20**, 346 (2001).
9. Udseth H. R., Loo J. A., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **61**, 228 (1989).
10. Caprioli R., Moore W., Martin M., DaGue B., Wilson K., Moring S.: *J. Chromatogr., A* **480**, 247 (1989).
11. Gassmann E., Kuo J. E., Zare R. N.: *Science* **230**, 813 (1985).
12. Lee T. T., Yeung E. S.: *J. Chromatogr., A* **595**, 319 (1992).
13. Ummadi M., Weimer B.C., *J. Chromatogr., A* **964**, 243 (2002).
14. Chen D. Y., Dovichi N.J.: *J. Chromatogr., B* **657**, 265 (1994).
15. Zhao J. Y., Chen D. Y., Dovichi N. J.: *J. Chromatogr., A* **608**, 117 (1992).
16. Wu S., Dovichi N. J.: *Talanta* **39**, 173 (1992).
17. Chan K. C., Muschik G. M., Issaq H. J.: *Electrophoresis* **21**, 2062 (2000).
18. Mattusch J., Dittrich K.: *J. Chromatogr., A* **680**, 279 (1994).
19. Vrábel P.: *Diplomová práce*. Masarykova univerzita, Brno 2003.
20. www.molecularprobes.com, staženo 15. listopadu 2004.
21. Banks P. R.: *Trends Anal. Chem.* **17**, 612 (1998).
22. Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruiter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr., A* **807**, 3 (1998).
23. Peš O.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita, Brno 2004.
24. Takizawa K., Nakamura H.: *Anal. Sci.* **14**, 925 (1998).
25. Šlais K., Horká M., Nováčková J., Friedl Z.: *Electrophoresis* **23**, 1692 (2002).
26. Gök E., Olgaz S.: *J. Fluorescence* **14**, 203 (2004).
27. Román D. A., Carretero A. S., Blanco C. C., Gutiérrez A. F.: *Biomed. Chromatogr.* **18**, 422 (2004).
28. Zhu M., Rodriguez R., Hansen D., Wehr T.: *J. Chromatogr., A* **513**, 123 (1990).
29. McCormick R.M., *Anal. Chem.* **60**, 2322 (1988).

**M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, J. Havel, and J. Preisler** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Derivatization of Amino Acids, Peptides and Proteins for Laser-Induced Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis**

This work is focused on application of laser-induced fluorescence detection for analysis of amino acids, peptides and proteins. The measurements were performed on a home-built instrument with a frequency-doubled Nd:YAG laser (532 nm) as excitation source. Rhodamine B isothiocyanate was used for derivatization of model samples. Major differences between the detection limits of analytes derivatized at high and low concentrations were presented. Difficulties associated with derivatization of complex samples and their negative influence on the limits of detection were also demonstrated.

## ROZLIŠENÍ IZOMERŮ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S VYUŽITÍM KINETICKÉ METODY

VÁCLAV RANC\*, PETR FRYČÁK, LUKÁŠ MÜLLER, PETR BEDNÁŘ a KAREL LEMR

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc  
lemr@prfnw.upol.cz

Došlo 29.8.05, přijato 14.12.05.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, kinetická metoda, rozlišení izomerů

### Obsah

1. Úvod
2. Princip kinetické metody
3. Kinetická metoda v analýze izomerů
4. Realizace kinetické metody v průtočných systémech
5. Závěr

### 1. Úvod

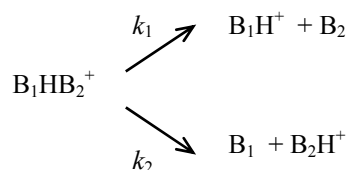
Odlišné vlastnosti izomerů včetně možné rozdílné interakce s biologickými systémy vyžadují syntetické metody vedoucí cíleně k požadovanému izomeru i selektivní analytické metody. Selektivní z hlediska jejich schopnosti „rozpoznat“ jednotlivé izomery. V řadě případů je to úkol relativně snadný. Lze využít rozdílů v rozpustnosti, teplotě tání aj. Jindy je to však úkol značně náročný. Např. optické izomery je nutné vystavit působení chirálního prostředí. Právě odlišná interakce enantiomerů s lidským organismem, který je rovněž chirální (L-aminokyseliny, D-cukry), se projevila smutnými důsledky v aféře thalidomidu, u něhož *S*-enantiomer vykazuje teratogenní účinky. Užívání preparátu (racemátu) proti nevolnosti těhotnými ženami způsobovalo poškození plodu. Vzhledem k rychlé interkonverzi enantiomerů thalidomidu *in vivo* nelze teratogenní efekt eliminovat ani podáváním čistého *R*-enantiomeru. Další výzkum však také prokázal protizánětlivé a imuno-modulační účinky *S*-enantiomeru, což vedlo k jeho uvede-

ní na trh a distribuci ovšem za přísně kontrolovaných podmínek<sup>1,2</sup>. Uvedený příklad ukazuje na nezbytnost studovat vlastnosti a tedy i analyzovat jednotlivé enantiomery ve stadiu vývoje i výroby účinných preparátů, ať již pro humánní či veterinární lékařství, ale i např. při vývoji pesticidů.

K analýze izomerů lze využít celou řadu analytických metod. K velmi účinným přístupům patří aplikace metod separačních, např. plynové nebo kapalinové chromatografie či kapilární elektroforézy. Své uplatnění nachází i hmotnostní spektrometrie. Izomery mají sice stejnou molekulovou hmotnost, ale mohou se lišit svojí fragmentací. Tento rozdíl se však neobjeví u enantiomerů, které, jak již bylo zmíněno, musí být vystaveny působení chirálního prostředí. I zde je však analytický problém řešitelný hmotnostní spektrometrií. Podobně jako u separace enantiomerů jsou postupy hmotnostní spektrometrie založeny na tvorbě diastereoizomerů, např. diastereoizomerních klastrů tak, jak bude popsáno v části věnované aplikaci kinetické metody v analýze izomerů.

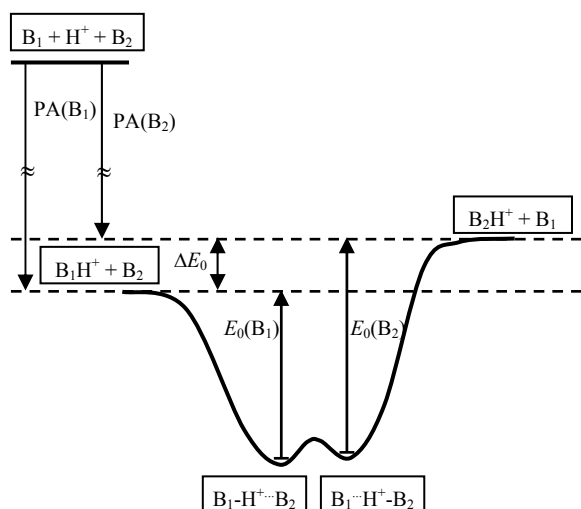
### 2. Princip kinetické metody

Kinetická metoda, která dnes slouží k měření termochemických veličin (např. protonové afinity), ale z níž vychází i postupy rozlišení a kvantifikace izomerů včetně izomerů optických, byla popsána R. G. Cooksem a T. L. Krugerem v roce 1977 (cit.<sup>3</sup>). Ve své práci popsali novou metodu určení protonové afinity založenou na fragmentaci metastabilních iontů. Obecně fragmentovaný ion nemusí být metastabilní, štěpení iontů lze docílit např. kolizí indukovanou disociací. Kinetická metoda vychází z izolace vhodného iontového klastru, který následně podléhá dvěma konkurenčním fragmentačním procesům (obr. 1). Při určování protonové afinity je zmíněným klastrem protonovaný adukt dvou bazí ( $[B_1HB_2]^+$ ), podobně u afinity ke kovovým iontům adukt studovaných látek ( $M_1$  a  $M_2$ ) s kationtem kovu  $C^+$  ( $[M_1CM_2]^+$ ), při určování elektronové afinity se sleduje záporně nabitý molekulární klaster ( $M_1^{\cdots}e^{\cdots}M_2$ ), pro měření ionizační



Obr. 1. Konkurenční fragmentace protonovaného dimeru bazí  $B_1$  a  $B_2$ ,  $k_1$  a  $k_2$  – rychlostní konstanty

\* Václav Ranc získal 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 2. Schématické znázornění změny energie při konkurenční fragmentaci protonovaného dimeru

energie klastr – kation radikál  $M_1M_2^{++}$  atd.<sup>4</sup>

Princip kinetické metody<sup>3–7</sup> bude objasněn na příkladu určení protonové afinity ( $PA$ ), přičemž  $PA = -\Delta H$ , kde  $\Delta H$  je enthalpie reakce látky s protonem ( $B + H^+ \rightarrow BH^+$ ) v plynné fázi. Určování jiných veličin je analogické. Při experimentu je sledována fragmentace protonovaného aduktu ( $[B_1HB_2]^+$ ). Intenzita vznikajících iontů závisí na rychlostních konstantách ( $k_1$  a  $k_2$ ) konkurenčních procesů (obr. 1). Průběh dějů je schématicky znázorněn pomocí energetických změn na obr. 2.

Poměr rychlostních konstant  $k_1$  a  $k_2$  konkurenčních monomolekulárních reakcí lze vyjádřit vztahem (1):

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \ln\left(\frac{Q_1^* Q_2}{Q_2^* Q_1}\right) + \frac{\Delta E_0}{RT} \quad (1)$$

kde  $Q$  je partiční funkce fragmentovaného iontu,  $Q^*$  je partiční funkce aktivovaného komplexu,  $\Delta E_0$  je rozdíl aktivačních energií (obr. 2),  $R$  univerzální plynová konstanta a  $T$  je absolutní teplota. Protože obě konkurenční reakce vycházejí z téhož výchozího iontu (protonovaného dimeru), je  $Q_1 = Q_2$ . Při fragmentaci iontů po jejich izolaci v hmotnostním spektrometru nelze předpokládat, že soubor iontů je v tepelné rovnováze, nelze předpokládat Maxwell-Boltzmannovu distribuci jejich energie charakterizovanou absolutní teplotou, a proto absolutní teplota ve vztahu (1) je nahrazena veličinou  $T_{\text{eff}}$  tzv. efektivní teplotou (vztah 2).

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \ln\left(\frac{Q_1^*}{Q_2^*}\right) + \frac{\Delta E_0}{RT_{\text{eff}}} \quad (2)$$

Kinetická metoda je přibližná metoda určování termochemických veličin. Pro její uplatnění musí být splněny

následující základní předpoklady<sup>3–7</sup>:

- I. Poměr naměřených intenzit iontů fragmentů musí být roven poměru koncentrací produktů (např. nesmí docházet k diskriminaci iontů při jejich detekci v hmotnostním spektrometru, popř. tato diskriminace musí být kompenzována).
- II. Rozdíl enthalpie a entropie přechodných stavů. Jinými slovy aktivační bariéra zpětných reakcí (tvorba dimeru) musí být nulová (zanedbatelná) nebo stejná pro obě reakce. Pro tzv. volné přechodné stavy (struktura přechodného stavu se blíží struktuře produktu) je tento požadavek většinou dobře splněn. Pokud by výchozí ionty byly v tepelné rovnováze, poměr koncentrací (intenzit) produktů (odpovídající poměru rychlostních konstant) by byl při splnění uvedeného požadavku v přímém vztahu k termochemickým vlastnostem. Kinetická metoda vychází z předpokladu, že uvedený vztah je přibližně splněn i v případech, kdy systém není v tepelné rovnováze.
- III. Teplotní závislost enthalpie a entropie je zanedbatelná popř. stejná pro obě reakční cesty.
- IV. U aktivovaného iontu (protonovaný dimer apod.) nesmí docházet k izomerii. Představa o jeho struktuře by měla být jasná (např. musí být zřejmé, pro které místo v molekule je měřena protonová afinita).
- V. Jednoduchá původní verze kinetické metody vychází také z předpokladu, že mezi oběma reakčními cestami není rozdíl v entropiích nebo je zanedbatelný. Pak platí  $Q_1^* \approx Q_2^*$ . Později byly vypracovány varianty, které se s problémem rozdílných entropií do jisté míry vyrovnávají.

Při splnění uvedených pěti podmínek lze využít vztah (3):

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \ln\left(\frac{I(B_1H^+)}{I(B_2H^+)}\right) \approx \frac{\Delta PA}{RT_{\text{eff}}} \quad (3)$$

kde  $I$  je intenzita odpovídajícího iontu ( $B_1H^+$  resp.  $B_2H^+$ ),  $\Delta PA$  je rozdíl protonových afinit ( $\Delta PA = \Delta E_0$ , viz. obr. 2).

Postup určení protonové afinity ( $PA$ ) pomocí nejjednodušší verze kinetické metody (stejná změna entropie pro obě konkurenční reakce)<sup>3,5</sup> je založen na proměření závislosti (4) odvozené ze vztahu (3) pro sadu standardů  $B_i$  se známou protonovou afinitou a studovanou sloučeninu  $B$ , jejíž protonová afinita je zjišťována:

$$\ln\left(\frac{I(BH^+)}{I(B_iH^+)}\right) = \frac{PA(B)}{RT_{\text{eff}}} - \frac{PA(B_i)}{RT_{\text{eff}}} \quad (4)$$

Výsledkem měření, jsou-li splněny uvedené předpoklady I. – V., je přímková závislost se směrnici  $1/(RT_{\text{eff}})$  a úsekem na ose  $PA(B)/(RT_{\text{eff}})$ , z níž se určí hodnota měřené protonové afinity. Podmínka V. (shoda partičních funkcí přechodných stavů,  $Q_1^* \approx Q_2^*$ ) může být splněna, jsou-li standardy a studovaná sloučenina strukturně podobné.

V řadě případů však splněna není. Člen  $\ln(Q_1^*/Q_2^*)$  ve vztahu (2) je nahrazován rozdílem entropií konkurenčních reakčních cest  $\Delta(\Delta S)$ , což je oprávněné za předpokladu zanedbatelné nebo stejné aktivační bariéry zpětných reakcí (předpoklad II.). Vztah pro kinetické měření získává tvar:

$$\ln\left(\frac{I(\text{BH}^+)}{I(\text{B}_1\text{H}^+)}\right) = \frac{PA(\text{B})}{RT_{\text{eff}}} - \frac{PA(\text{B}_1)}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (5)$$

Práce s uvedeným vztahem se liší v různých verzích kinetické metody. Další informace k nim lze najít v citované literatuře<sup>3,5,8–13</sup>. Statistický postup zpracování dat při užití kinetické metody byl publikován Armentroustem<sup>14</sup>.

V literatuře<sup>8,15,16</sup> stále diskutovanou veličinou je  $T_{\text{eff}}$ . Při modelování fragmentace protonovaného dimeru byla zjištěna dobrá korelace mezi efektivní teplotou a střední hodnotou vnitřní energie iontů poskytujících detegované fragmenty. Bylo ukázáno, že hodnota  $T_{\text{eff}}$  závisí na energii dodávané iontu při jeho aktivaci kolizemi, na vazebné energii klastru, na časovém průběhu experimentu (např. doba od aktivace iontů po detekci jejich fragmentů vymezuje z celého souboru aktivovaných iontů pouze ty, u kterých dochází k fragmentaci právě v tomto časovém okně) aj.

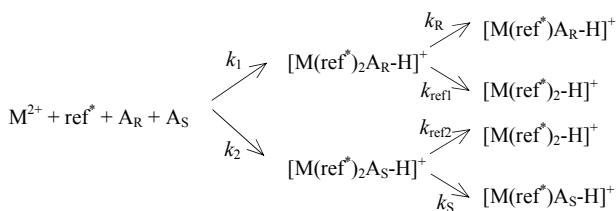
Kinetická metoda vyžaduje měření na tandemových hmotnostních spektrometrech, které jsou však v dnešní době dostupné v řadě laboratoří. Její aplikace je poměrně jednoduchá, je rychlá a je použitelná k měření termochemických vlastností a studiu řady systémů (viz. např. cit.<sup>4</sup>). Kromě hodnot termochemických veličin totiž dovoluje v určitých případech získat např. představu o struktuře iontů a sterických efektech. Metoda nevyžaduje čistý vzorek (studované ionty jsou izolovány hmotnostním analyzátozem), měření relativního poměru intenzit iontů vede do jisté míry ke kompenzaci chyb měření. K výhodám kinetické metody patří dále její citlivost k malým rozdílům hodnot termochemických veličin a aplikovatelnost i na látky netěkavé. Je to však metoda relativní a správnost výsledku závisí na správnosti referenčních hodnot. Výsledky měření lze kontrolovat např. měřením při různých kolizních energiích, určováním hodnot  $T_{\text{eff}}$  a jejich porovnáním s jinými systémy, určováním rozdílů entropií dvou konkurenčních reakcí ( $\Delta(\Delta S)$ ). Výsledky je vhodné také srovnávat s daty získanými jinými experimentálními metodami, případně výpočtem. Na závěr je nutné znovu připomenout, že kinetická metoda je metoda přibližná a relativní a že je založena na určitých předpokladech (I. – V., viz. výše), které nejsou vždy dostatečně naplněny. Její užitečnost je zřejmá a byla mnohokrát prokázána, ale její využití vyžaduje opatrnost.

### 3. Rozlišení izomerů kinetickou metodou

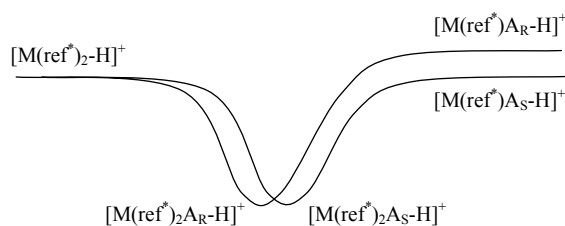
Kinetická metoda umožňuje postihnout velmi malé energetické rozdíly projevující se v rozdílných rychlost-

ních konstantách konkurenčních reakcí. Lze očekávat, že je možné registrovat i rozdíly mezi izomery. Tuto schopnost kinetické metody demonstroval T. K. Majumdar se spoluautory při rozlišení *cis*- a *trans*-2-methylcyklohexanolu a *cis*- a *trans*-4-methylcyklohexanolu<sup>17</sup>. Zjistil rozdíl mezi aciditou v plynné fázi pro *cis* a *trans* izomer, přičemž *cis* izomer v obou případech vykazoval vyšší aciditu. Rozlišení stereoizomerů demonstrovali další autoři na analýze 2,3-butandiolu<sup>18</sup>. Zjistili rozdílnou bazicitu v plynné fázi pro (2*R*,3*R*)- a *meso*-2,3-butandiol (diastereoizomery) – 191,5 a 191,2 kcal mol<sup>-1</sup>. I když hodnoty jsou velmi málo rozdílné, přesnost měření je dostatečná, aby mohl být tento rozdíl postihnout. Optické izomery (2*R*,3*R*)- a (2*S*,3*S*)-butandiol rozlišili na základě tvorby dimeru vždy jednoho optického izomeru s enantiomerem referenční sloučeniny. Vznikají dva diastereoizomery, které při fragmentaci dávají různý poměr iontů produktů. Rozlišení optických izomerů bylo uskutečněno s dimery nabitými kladně (protonovanými) i záporně (deprotonovanými). K. Vékey a G. Czira<sup>19</sup> k odlišení enantiomerů aminokyselin využili formování kladně nabitých trimerů obecného složení A<sub>2</sub>BH<sup>+</sup>, přičemž A i B byly vždy čisté optické izomery některé ze studovaných aminokyselin. Fragmentace těchto trimerů vede k dvojici dimerů A<sub>2</sub>H<sup>+</sup> resp. ABH<sup>+</sup>. První z nich je vždy homochirální (obsahuje enantiomery se stejnou konfigurací), druhý byl homo- nebo heterochirální (obsahuje enantiomery s různou konfigurací) v závislosti na použitých enantiomerech aminokyselin A a B. Měření kinetickou metodou ukázala rozdíly v bazicitě v plynné fázi mezi homo- a heterochirálními dimery, což dovoluje rozhodnout, jakými enantiomery je dimer ABH<sup>+</sup> tvořen. Větší rozdíly mezi enantiomery aminokyseliny byly pozorovány při využití kladně nabitých klastrů, ve kterých jsou aminokyseliny vázány jako ligandy na kation Cu<sup>2+</sup> (cit.<sup>20</sup>). Komplex [Cu(ref<sup>\*</sup>)<sub>2</sub>A-H]<sup>+</sup> poskytuje fragmenty [Cu(ref<sup>\*</sup>)A-H]<sup>+</sup> resp. [Cu(ref<sup>\*</sup>)<sub>2</sub>-H]<sup>+</sup>. Ref<sup>\*</sup> značí referenční enantiomer (L-prolin v citované práci), A analyzovanou aminokyselinu. Autoři předpokládají, že v tříligandovém komplexu je jedna z aminokyselin vázána na centrální ion dvěma vazbami, druhá dvě jsou vázány každá jednou vazbou a mohou být snáze odštěpeny. Fragmentace ale již poskytuje komplexy, ve kterých jsou obě aminokyseliny koordinovány dvěma vazbami. Jejich dalšímu štěpení dominuje ztráta CO<sub>2</sub>, ztráta některého z ligandů pozorována nebyla. Použití měďnatého kationtu dovoluje odlišit homo- a heterochirální komplexy na základě různé afinity k tomuto kationtu. Na rozdíl od předchozích dvou citovaných prací autoři naznačují i možnost kvantifikace enantiomerů ve směsi. Jako referenční sloučeninu použili nejen čisté enantiomery, ale i jejich směs. Míra chirální diskriminace analyzovaných aminokyselin se měnila se zastoupením enantiomerů referenční látky. Maximální diskriminace bylo dosaženo pro čisté enantiomery referenční látky, žádné pak při použití racemátu.

Stejný systém (tvorba měďnatých komplexů) byl později studován s cílem dosáhnout chirálního rozlišení a kvantifikace enantiomerů aminokyselin<sup>21</sup>. V práci je demonstrována závislost poměru intenzit iontů se dvěma



Obr. 3. Schématické znázornění tvorby komplexů s třemi ligandy a jejich fragmentace



Obr. 4. Schématické znázornění energetických změn při analýze směsi enantiomerů

ligandy na zastoupení enantiomerů v analyzovaném vzorku. Princip stanovení poměru izomerů ve vzorku s využitím kinetické metody bude ukázán na příkladu stanovení poměru enantiomerů<sup>6,21–24</sup>, ale analogicky je použitelný pro analýzu i jiných izomerních směsí.

Při ionizaci roztoku obsahujícího jednotlivé složky (dvojmocný kation –  $M^{2+}$ , referenční enantiomer –  $ref^*$ , enantiomery analyzované látky –  $A_R$ ,  $A_S$ ) dochází k tvorbě dvou diastereoizomerů. Tyto ionty jsou izolovány v prvním stupni hmotnostně spektrální analýzy a následně podrobeny fragmentaci (kolizi indukované disociaci) za vzniku komplexů s dvěma ligandy, viz. obr. 3. Energetické změny spojené s uvedenými procesy jsou naznačeny na obr. 4.

Je-li systém vhodný k rozlišení enantiomerů, projeví se jejich různý obsah v roztoku v odlišné hodnotě poměru intenzit:

$$R = \frac{[M(ref^*)A - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (6)$$

kde A představuje oba enantiomery analyzované látky. Obsahuje-li roztok pouze jeden enantiomer, lze vztah (6) psát pro jednotlivé enantiomery:

$$R_R = \frac{[M(ref^*)A_R - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (7)$$

$$R_S = \frac{[M(ref^*)A_S - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (8)$$

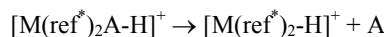
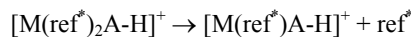
Mírou chirální selektivity je hodnota  $R_{chiral}$ :

$$R_{chiral} = R_R / R_S = \frac{[M(ref^*)A_R - H]^+ / [M(ref^*)_2 - H]^+}{[M(ref^*)A_S - H]^+ / [M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (9)$$

Je zřejmé, že čím více se  $R_{chiral}$  liší od jedné, tím většího chirálního rozlišení je dosaženo. K určení chirální selektivity se proměřují dva roztoky obsahující vždy jeden z optických izomerů analyzované látky. Vzhledem k tomu, že se jedná o dvě měření, nelze hodnoty  $[M(ref^*)_2 - H]^+$  ve vztahu (9) vykrátit, obecně jsou různé. Podle kinetické metody (při splnění odpovídajících předpokladů zmíněných výše) lze dospět ke vztahu:

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{eff}} \quad (10)$$

kde  $\Delta(\Delta G)$  je rozdíl Gibbsových energií mezi následujícími dvěma reakcemi.



Je-li analytem čistý enantiomer R resp. S, označuje se rozdíl Gibbsových energií jako  $\Delta(\Delta G)_R$  resp.  $\Delta(\Delta G)_S$ . Mezi uvedenými veličinami platí vztah:

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G) &= \Delta(\Delta G)_R \alpha + \Delta(\Delta G)_S (1 - \alpha) = \\ &= \Delta(\Delta G)_S + (\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S) \alpha \end{aligned} \quad (11)$$

a tedy

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)_S}{RT_{eff}} + \frac{[\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S]}{RT_{eff}} \alpha \quad (12)$$

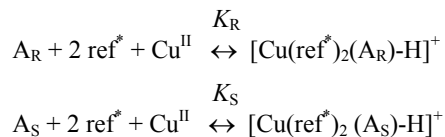
Poslední rovnice ukazuje lineární vztah mezi přirozeným logaritmem poměru intenzit a molárním zlomkem izomeru R ve směsi s izomerem S ( $\alpha$ ) (např. cit.<sup>21</sup>). Vyplyvá z ní, že by mělo být možné provést kvantifikaci na základě kalibrační závislosti určené ze dvou bodů (dvě různé hodnoty  $\alpha$ ); např. proměřením dvou roztoků obsahujících vždy jeden enantiomer analytu. Obvyklým postupem je použití kalibrační závislosti získané z většího počtu proměřených bodů. Pro kalibraci je v tomto případě nutné mít dva různé standardy analytu o známém obsahu enantiomerů (nemusí to nutně být dvě čisté optické formy). Po naměření kalibrační závislosti je proměřen vzorek a ze získané hodnoty  $R$  je z kalibrační závislosti určen obsah optických izomerů. Chirální analýza je možná i v případě, že dva standardy analyzované látky nejsou k dispozici. Podstata tohoto postupu spočívá v proměření neznámého vzorku postupně s oběma optickými izomery referenční látky<sup>23</sup>. Získáme dva poměry intenzit iontů, jejichž podíl je roven veličině  $RR$ .

$$RR = \frac{[M(ref_R^*)A - H]^+ / [MA_2 - H]^+}{[M(ref_S^*)A - H]^+ / [MA_2 - H]^+} \quad (13)$$

Podobně jako pro poměr intenzit  $R$  lze ukázat, že přirozený logaritmus  $RR$  je přímo úměrný molárnímu zlomku  $\alpha$ . Navíc pro racemát analyzované látky je  $RR$  rovno jedné ( $\ln RR = 0$ ). U tohoto postupu by mohlo stačit proměřit jeden bod kalibrační závislosti (je potřeba jeden standard analytu o známém zastoupení enantiomerů). Druhým bodem je hodnota  $\ln RR = 0$  pro racemickou směs.

Zajímavou alternativou popisované metody je zavedení tzv. fixního ligandu<sup>25</sup>. Podstatou této varianty je tvorba komplexu se třemi ligandy (tedy opět tvorba trimeru –  $[\text{ML}_{\text{fix}}(\text{ref}^*)\text{A-H}]^+$ ). Jeden z ligandů  $L_{\text{fix}}$  je však výrazně pevněji vázán na centrální kation než další dva ligandy. Důsledkem je, že nedochází k jeho odštěpování a tento fixní ligand zůstává součástí obou iontů vznikajících fragmentací ( $[\text{ML}_{\text{fix}}(\text{ref}^*)\text{-H}]^+$  a  $[\text{ML}_{\text{fix}}\text{A-H}]^+$ ). Ty se liší tím, zda obsahují enantiomer referenční látky nebo analyt. Použití fixního ligandu vede ke zjednodušení dějů, na kterých je diskutovaná metoda založena. Fixní ligand je k centrálnímu kationtu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) vázán dvěma vazbami, zatímco referenční látka a analyt pouze vazbou jednou, proto jsou snadněji odštěpovány. Při použití  $[\text{M}(\text{ref}^*)_2\text{A-H}]^+$  může být jednou vazbou vázán ligand  $\text{ref}^*$  a A, druhý ligand  $\text{ref}^*$  je pak vázán dvěma vazbami, ale může nastat situace, kdy jednou vazbou jsou vázány oba ligandy  $\text{ref}^*$  a ligand A je vázán dvěma vazbami. V populaci iontů se mohou objevit i obě varianty navázání ligandů současně. Uvedená skutečnost může komplikovat stanovení (např. zhoršovat jeho selektivitu), a proto se použití fixního ligandu jeví jako zajímavá alternativa. V citované práci<sup>25</sup> byly jako fixní ligandy testovány dipeptidy až pentapeptidy. Nejlepších výsledků pro studovaný systém bylo dosaženo s tetrapeptidem.

Při proměřování kalibrační závislosti pro účely kvantifikace izomerů kinetickou metodou lze někdy pozorovat její odchylky od lineárního průběhu, což může naznačovat diskriminaci jednoho z enantiomerů (izomerů) při tvorbě trimerních iontů v plynné fázi, případně v dalších krocích hmotnostně spektrometrického měření. Popíše-li se proces vzniku trimerních iontů zjednodušeně následujícími rovnicemi, dochází k diskriminaci v případě, že  $K_R \neq K_S$  (formální rovnovážné konstanty) a poměr sledovaných izomerů v kapalně fázi se liší od pozorovaného poměru v plynné fázi.



V této souvislosti navrhl M. Y. Zhang se spolupracovníky<sup>26</sup> zavést korekci, která by kompenzovala možnou diskriminaci při tvorbě trimerních iontů. Svůj postup autoři demonstrovali na analýze enantiomerů aminokyselin. Korekční faktor zjišťovali z hodnot  $\ln R$  změřených pro roztok obsahující čistý L-, čistý D-izomer a pro roztok racemické směsi. Z hodnot pro čisté enantiomery určili rovnici kalibrační přímky, z níž vypočetli pro hodnotu naměřenou pro racemickou směs poměr enantiomerů v plynné

fázi. Tuto hodnotu použili ke korekci při kvantifikaci enantiomerů v analyzovaných vzorcích. Postup sice vedl ke zlepšení korelačního koeficientu, ale použití pouze tří bodů (dvou pro určení kalibrační přímky a následně třetího pro určení korekčního faktoru) může omezovat správnost korigovaných výsledků. Na představě odlišného pozorovaného zastoupení enantiomerů (izomerů) v kapalně a plynné fázi jsme založili i náš přístup ke zpracování dat ovlivněných touto skutečností, ale využito je všech naměřených bodů kalibrační závislosti. Lze odvodit, že mezi molárním zlomkem enantiomerů (obecně izomerů) v kapalně a plynné fázi existuje vztah (14):

$$\alpha_{R,g} = \frac{\frac{K_R}{K_S} \alpha_{R,l}}{1 - \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right) \alpha_{R,l}} \quad (14)$$

kde  $\alpha_{R,g}$  je molární zlomek R-enantiomeru v plynné fázi,  $\alpha_{R,l}$  v kapalně fázi. Po dosazení do lineární závislosti  $\ln R$  na molárním zlomku R-enantiomeru v plynné fázi (15) dostaneme vztah použitelný pro kalibraci (16):

$$\ln R = A \alpha_{R,g} + B \quad (15)$$

$$\ln R = A \frac{\frac{K_R}{K_S} \alpha_{R,l}}{1 - \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right) \alpha_{R,l}} + B \quad (16)$$

Hodnoty konstant A a B i poměr  $K_R/K_S$  je nutné určit z bodů kalibrační závislosti. K výpočtu molárního zlomku R-enantiomeru v kapalně fázi lze využít vztahu (17).

$$\alpha_{R,l} = \frac{\ln R - B}{\frac{K_R}{K_S} A + (\ln R - B) \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right)} = \frac{1}{1 + \frac{K_R}{K_S} \left(\frac{A}{\ln R - B} - 1\right)} \quad (17)$$

Nastane-li rovnost  $K_R=K_S$ , je poměr konstant roven jedné a vztah (16) přechází na rovnici přímky. Aplikaci navržené korekce lze dosáhnout zlepšení správnosti stanovení. Možnosti využití vztahu (16) pro hodnocení diskriminace jednoho z enantiomerů jsou v současnosti na našem pracovišti studovány.

Kinetická metoda našla uplatnění při analýze izomerů různých typů látek. Značná pozornost byla věnována chirální analýze aminokyselin. Kromě již zmíněného systému využívajícího kationtu měďnatého<sup>21</sup> bylo využito kationtu nikelnatého<sup>27</sup>. K dalším aplikacím diskutované metody v oblasti chirálních látek patří analýza optických izomerů peptidů<sup>22</sup>, chirálních farmaceutických substancí<sup>28,29</sup>, látek s antivirálním účinkem<sup>30</sup>, antibiotik<sup>25</sup>,  $\alpha$ -hydroxykyselin<sup>31</sup>



a cukrů<sup>32</sup>. Kromě enantiomerů byla metoda použita ke kvantifikaci peptidů lišících se pořadím aminokyselin (dipeptidů<sup>33,34</sup> a tripeptidů<sup>35</sup>) i odlišení peptidů obsahujících  $\alpha$ - resp.  $\beta$ -aminokyselinu<sup>36</sup>.

#### 4. Realizace kinetické metody v průtočných systémech

Doposud byla kinetická metoda prováděna v tzv. statickém systému. Byl připraven roztok všech složek (analytu i chirálního selektoru), který byl kontinuálně zaváděn do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Takovému uspořádání umožňuje sbírat a průměrovat větší počet skenů, ale jeho nevýhodou je menší prostupnost vzorků. Z tohoto důvodu byla v naší laboratoři pozornost zaměřena na dynamické systémy, kdy je vzorek nastříkovan do proudu kapaliny, ke kterému je následně přimícháván roztok chirálního selektoru. Takováto modifikace umožňuje provádět průtokovou injekční analýzu i využití kinetické metody jako chirální detekce po předchozí achirální separaci analytů<sup>37,38</sup>.

Při přechodu od statického k dynamickému systému bylo nutné zhodnotit vliv experimentálních parametrů (obsah jednotlivých složek v roztoku chirálního selektoru, průtok roztoku chirálního selektoru, průtok nosné kapaliny resp. mobilní fáze v případě použití HPLC) na výsledek analýzy. Ukázalo se, že jejich volba může ovlivnit  $R_{\text{chiral}}$  a že je vhodné tento vliv prověřit před použitím konkrétního systému pro zamýšlenou analýzu. Možnosti dynamických systémů byly testovány na analýze enantiomerů aminokyselin. Obr. 5 ukazuje sekvenci pěti nástřiků a odpovídající hmotnostní spektrum demonstrující přítomnost sledovaných fragmentů. Analyzovanou aminokyselinou byl

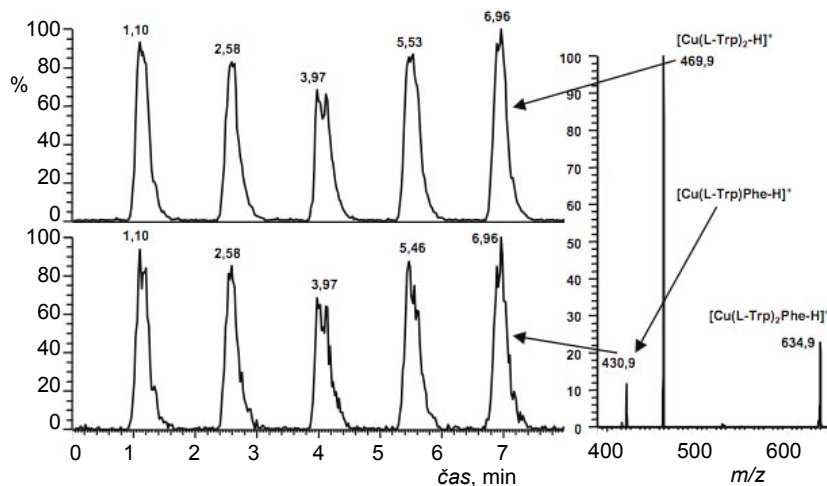
fenylalanin. Použitý systém poskytoval hodnotu  $R_{\text{chiral}} = 6,7$ . Pro kalibrační závislost bez korekce diskriminace bylo dosaženo hodnoty koeficientu determinace  $R^2 = 0,8805$ , s korekcí diskriminace dle Zhanga a spol.<sup>26</sup>  $R^2 = 0,9853$  a s korekcí diskriminace založené na vztahu (17)  $R^2 = 0,9926$ . Výsledky měření modelových vzorků jsou shrnuty v tabulce I. Koeficienty determinace i výsledky měření ukazují, že u studovaného systému je korekce nezbytná. Neprovedení korekce vede k významným chybám. Ovšem i korekce podle Zhanga a spol. může výrazně zkreslit výsledky. Zatímco u prezentovaného stanovení došlo ke zlepšení jeho správnosti pro nižší obsahy D-fenylalaninu, pro vyšší obsahy je odchylka od daných hodnot dokonce větší než v případě, kdy se korekce neprováděla. Lepších výsledků bylo dosaženo aplikací vztahu (17). Je patrné, že došlo, oproti nekorigovaným hodnotám, ke zlepšení pro nižší i vyšší obsahy D-fenylalaninu (tab. I).

Dosažovaná správnost měření je horší než u statických systémů, ale pro rychlé rozhodnutí, zda je ve vzorku obsažen jeden či druhý enantiomer resp. racemát, je zcela postačující, přičemž rychlost analýzy je větší (pět nástřiků bylo realizováno v čase kratším než 8 min, obr. 5).

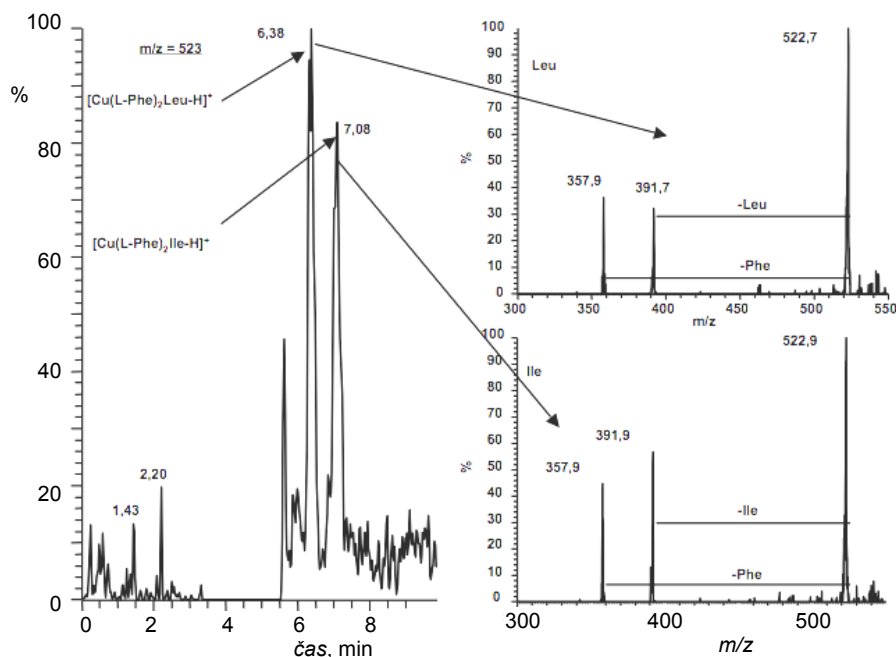
Tabulka I

Analýza směsi enantiomerů fenylalaninu

dáno	Podíl D-fenylalaninu ve směsi enantiomerů [%]		
	nalezeno		
	bez korekce	korekce dle cit. <sup>26</sup>	korekce dle (17)
1,0	-24,6	-1,0	-2,0
10,0	-0,4	4,9	5,6
90,0	83,8	99,4	88,8
99,0	87,9	116,5	99,4



Obr. 5. Průtoková analýza poměru enantiomerů fenylalaninu; směs voda : methanol (1 : 1) byla použita jako rozpouštědlo vzorku (fenylalanin,  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ , nástřik 10  $\mu\text{l}$ ), chirálního selektoru ( $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ L-tryptofan}$ , průtok 5  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) i jako nosná kapalina (průtok 50  $\mu\text{l min}^{-1}$ ). Přístroj: hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a elektrosprejem LCQ (Thermo Finnigan, USA)



Obr. 6. Achirální separace leucinu a isoleucinu s chirální detekcí enantiomerů pomocí kinetické metody; kolona: 150 mm x 4mm, Gemini C18 110A, 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA); mobilní fáze: 5 mmol  $\text{l}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (ve vodě upraveno  $\text{CH}_3\text{COOH}$  na  $\text{pH}=3$ ) ve směsi s acetonitrilem = 95 : 5 (v/v), 0,2 ml  $\text{min}^{-1}$ ; chirální selektor (přimícháván za kolonou):  $4,16 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$  L-fenylalanin, voda : methanol = 1 : 1 (v/v), 30  $\mu\text{l min}^{-1}$ ; nástřik: 10  $\mu\text{l}$  roztoku leucinu ( $5,0 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ) a isoleucinu ( $5,0 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ), voda : methanol = 1 : 1 (v/v); přístroj: vysokotlaké čerpadlo Rheos 2000 (Flux Instruments, Švýcarsko), automatický dávkovač HTS PAL (CTC Analytics, Švýcarsko), hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a elektrosprejem LCQ (Thermo Finnigan, USA)

Dynamický systém byl rovněž úspěšně aplikován při průtokové analýze enantiomerů ve směsi aminokyselin i jako nástroj chirální detekce po předchozí achirální separaci analytů kapalinovou chromatografií. I v těchto případech je metoda zcela vyhovující pro rychlý screening<sup>38</sup>. Chromatografický záznam achirální separace směsi leucinu a isoleucinu včetně odpovídajících fragmentačních spekter ukazuje obr. 6. Izomerní aminokyseliny tvoří trimerní komplexy se stejnou hodnotou  $m/z$ , které nelze vzájemně izolovat hmotnostním spektrometrem před kolizí indukovanou disociací. Nezbytné je oddělení těchto aminokyselin vhodnou separační technikou. Po korekci diskriminace pomocí vztahu (17) byla pro vzorky obsahující 10 % D-izomeru nalezena průměrná hodnota 12,9 % pro D-leucin a 11,2 % pro D-isoleucin, pro vyšší obsah D-izomeru (90 %) bylo stanoveno 70,5 % D-leucinu a 85,8 % D-isoleucinu (průměry byly určovány ze tří měření). Důvodem horších výsledků v případě leucinu může být menší chirální selektivita použitého systému pro tuto aminokyselinu ( $R_{\text{chiral}}(\text{leucin}) = 1,9$ ;  $R_{\text{chiral}}(\text{isoleucin}) = 3,4$ ).

Použití dynamických systémů otvírá nové možnosti aplikace kinetické metody. Ve srovnání se statickými systémy jsou chyby určení poměru enantiomerů zatím větší, ale je dosahováno významného urychlení analýzy. Zajímavá je také možnost aplikace studované metody jako „chirálního detektoru“ v HPLC popř. v CE.

## 5. Závěr

Řada příkladů dokazuje aplikovatelnost kinetické metody při rozlišení izomerů včetně izomerů optických. Prezentovaná modifikace založená na dynamických systémech se ukázala jako vhodná pro rychlé analýzy, kdy je např. nutné rozhodnout, který enantiomer je přítomen či zda se jedná o racemát. Statická i dynamická varianta měření vyžaduje zlepšení přesnosti a správnosti. Doposud v těchto parametrech kinetická metoda nemůže konkurovat separačním metodám. Jednou z možností, jak zlepšit parametry měření, je zmíněné využití fixního ligandu, ale je nutné hledat i další alternativy. Nabízí se několik cest. Je možné testovat jiné chirální systémy. Doposud převažoval systém založený na tvorbě trimerních komplexů, ale vhodným by mohl být obecně i jiný systém, který bude poskytovat dvě fragmentační cesty, jejichž uplatnění během kolizí indukované disociace bude podmíněno poměrným zastoupením analyzovaných izomerů ve vzorku. Další možností je zvýšit intenzitu prekurzorového iontu (v popsaných systémech trimerního komplexu). Předběžné experimenty provedené v naší laboratoři naznačují, že jednou z cest je využití nanoelektrospreje. Ukázalo se, že pro zvolený systém lze dosáhnout pomocí nanoelektrospreje o jeden až dva řády vyšší intenzity prekurzorového iontu

oproti elektrospreji, což ve svém důsledku vede i k vyššímu signálu fragmentů, jejichž intenzita se měří.

Další výzkum ukáže, zda hmotnostně spektrometrická analýza izomerů založená na kinetické metodě bude moci konkurovat separačním metodám nejen rychlostí analýzy, kterou nabízí již dnes, ale i přesností a správností stanovení poměru izomerů.

*Výzkum byl podpořen Fondem rozvoje vysokých škol (G6 75/2003) a MŠMT ČR (MSM6198959216).*

#### LITERATURA

- Eriksson T., Björkman S., Höglund P.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 365 (2001).
- Rouhi M.: *Chem. Eng. News* **83**, 122 (2005).
- Cooks R. G., Kruger T. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 1279 (1977).
- Cooks R. G., Wong P. S.: *Acc. Chem. Res.* **31**, 379 (1998).
- McLuckey S. A., Cameron D., Cooks R. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1313 (1981).
- Zheng X., Cooks R. G., Augusti R., Tao W. A., v knize: *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Theory and Ion Chemistry* (Gross M. L., Caprioli R., Armentrout P. B., ed.), sv. I, kap. The kinetic method: thermochemical determinations and chiral analysis. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Drahos L., Vékey K.: *J. Mass Spectrom.* **38**, 1025 (2003).
- Cooks R. G., Koskinen J. T., Thomas P. D.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 85 (1999).
- McLuckey S. A., Cooks R. G., Fulford J. E.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **52**, 165 (1983).
- Wu Z. C., Fenselau C.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 863 (1992).
- Cheng X. H., Wu Z. C., Fenselau C.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4844 (1993).
- Wenthold P. G., Squires R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11890 (1994).
- Zheng X., Cooks R. G.: *J. Phys. Chem., A* **106**, 9939 (2002).
- Armentrout P. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 371 (2000).
- Drahos L., Vékey K.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 79 (1999).
- Armentrout P. B.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 74 (1999).
- Majumdar T. K., Clairet F., Tabet J. C., Cooks R. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2897 (1992).
- Shen W., Wong P. S. H., Cooks R. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 71 (1997).
- Vékey K., Czira G.: *Anal. Chem.* **69**, 1700 (1997).
- Tao W. A., Zhang D., Wang F., Thomas P. D., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **71**, 4427 (1999).
- Tao W. A., Zhang D., Nikolaev E. N., Cooks R. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 10598 (2000).
- Tao W. A., Cooks R. G.: *Chem. Int. Ed.* **40**, 757 (2001).
- Tao W. A., Clark R. L., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **74**, 3783 (2002).
- Tao W. A., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **75**, 25A (2003).
- Wu L., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **75**, 678 (2003).
- Zhang M. Y., Kerns E., McConnell O.: *51<sup>st</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, 8–12 June 2003*, Proceedings (Sjöberg J., Lilly C., Thomas T., Cole R. B., ed.), Poster No. A031172. ASMS, Montreal 2003.
- Zhang D., Tao W. A., Cooks R. G.: *Int. J. Mass Spectrom.* **204**, 159 (2001).
- Tao W. A., Gozzo F. C., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **73**, 1692 (2001).
- Vasconcellos A. D., Rodinei A.: *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 1881 (2005).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G., Wang F., Begley J. A., Lampert B.: *J. Med. Chem.* **44**, 3541 (2001).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G.: *Chem. Commun.* **2000**, 2023.
- Augusti D. V., Carazza F., Augusti R., Tao W. A., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **74**, 3458 (2002).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 490 (2001).
- Schug A. K., Lindner W., Lemr K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 840 (2004).
- Wu L., Lemr K., Aggerholm T., Cooks R. G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 152 (2003).
- Wu L., Meurer C. E., Young B., Yang P., Eberlin M., Cooks R. G.: *Int. J. Mass Spectrom.* **231**, 103 (2004).
- Lemr K., Ranc V., Fryčák P.: *56. sjezd chemických společností, Ostrava, 6. – 9. září 2004*, Sborník – Chem. Listy **98**, 605 (2004), str. 605, přednáška 15L-11. ČSCH, Praha 2004.
- Lemr K., Ranc V., Fryčák P., Bednář P.: *53<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, 5–9 June 2005*, Proceedings (Sjöberg J., Lilly C., Watson B., Thomas T., Murray K. K., ed.), Poster No. A051045. ASMS, San Antonio 2005.

**V. Ranc, P. Fryčák, L. Müller, P. Bednář, and K. Lemr** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Recognition of Isomers by Mass Spectrometry Using the Kinetic Method**

The principle of the Cooks' kinetic method and its application to analysis of isomeric mixtures are described. The kinetic method based on mass spectrometric measurements is applied to discrimination of isomers of various types of compounds (amino acids, peptides, sugars, pharmaceuticals, etc.). So far this method has been used in static systems (with constant analyte concentrations in the course of analytical run). A modification for dynamic systems (flow injection analysis, HPLC) is presented. The accuracy of determination in both static and dynamic systems can worsen due to different ratios of the isomers in liquid and gas phases. A procedure for correction of this phenomenon is also demonstrated.

# STUDIUM PROCESŮ INTERAKCE LASEROVÉHO ZÁŘENÍ SE VZORKY SKEL A ZEMĚDĚLSKÝCH PŮD POMOČÍ SPEKTROSKOPIE LASEREM INDUKOVANÉHO MIKROPLAZMATU A OPTICKÉ EMISNÍ SPEKTROSKOPIE V INDUKČNĚ VÁZANÉM PLAZMATU

MICHAELA GALIOVÁ\*, VERONIKA MOŽNÁ\*, ALICE STAŇKOVÁ\*, KAREL NOVOTNÝ a VIKTOR KANICKÝ

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
viktork@chemi.muni.cz*

Došlo 22.6.05, přijato 14.11.05.

**Klíčová slova:** laserová ablace, spektrometrie indukčně vázaného plazmatu, spektrometrie laserem indukovaného mikroplazmatu

## Úvod

Laserová ablace ve spojení s optickou emisní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (LA-ICP-OES) je kombinovaná technika prvkové spektrální analýzy, která spojuje laserovou ablaci jako nástroj generování aerosolu z pevných vzorků s optickou emisní spektrometrií ICP pro generování analytického signálu a jeho detekci. Výhoda přímého zavádění pevných vzorků do ICP výboje laserovou ablací spočívá v eliminaci často časově náročných chemických rozkladů vzorků a v minimalizaci ztrát analytů a kontaminace spojené s rozpouštěním. Laserová ablace představuje prakticky nedestruktivní vzorkovací techniku a nízké meze detekce ve spojení s ICP-MS, ICP-OES a LIBS umožňují stanovení prvků při ablaci plošky vzorku o průměru několika mikrometrů, často jediným pulsem<sup>1</sup>. Na měření optické emise z laserového mikroplazmatu generovaného na povrchu vzorku je založena spektroskopie laserem indukovaného mikroplazmatu (LIBS – laser induced breakdown spectrometry). Ablace je termín, kterým se označuje souhrn procesů probíhající při interakci laserového paprsku se vzorkem. Charakter tohoto procesu závisí na okolní atmosféře, vlastnostech laserového paprsku a vlastnostech samotného vzorku. Používají se zpravidla pevnolátkové nebo plynové lasery. Vzorkování laserovým paprskem je umožněno díky tomu, že koherentní záření lze zaostřit na plochu o průměru jednotek až stovek

μm a v režimu nanosekundových pulsů je dosaženo hustot zářivého výkonu až  $10^9 \text{ W cm}^{-2}$ .

Při interakci laserového paprsku se vzorkem dochází k destrukci materiálu a vzniku mikroplazmatu. Destrukce materiálu zahrnuje erozi, explozi, vymrštování částic, sublimaci, tvorbu aerosolu a další procesy. Vzniklý aerosol může být transportován do dalšího excitačního a ionizačního prostředí, jakým je indukčně vázané plazma (LA-ICP-OES)<sup>2</sup> zatímco emisi mikroplazmatu využívá metoda LIBS.

K analýze pevných materiálů se v současné době používá nejčastěji roztoková analýza po rozkladu vzorku, vyloužení půdních vzorků, nebo využití spektroskopických technik jako je AAS (atomová absorpční spektroskopie), ICP-OES/MS (technika optické emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem/hmotnostní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu)<sup>3–6</sup>. K analýze pevných a práškových vzorků se využívá rentgenová fluorescenční spektroskopie (XRF) nebo techniky LA-ICP-OES nebo laserové ablace spojené s hmotnostní spektrometrií v indukčně vázaném plazmatu (LA-ICP-MS)<sup>7–9</sup>. Spektrometrie laserem indukovaného mikroplazmatu byla použita například pro charakterizaci prvkového složení povrchu a vnitřní struktury daugerreotypů z 19. století<sup>10</sup>. Metodou LIBS a UV a IR spektrometrií byly popsány a identifikovány pigmenty, mající podobné zbarvení, ale odlišnou chemickou strukturu, v iluminovaném rukopisu pocházejícím z 12. a 13. století<sup>11</sup>. Podobná analýza byla provedena u keramických materiálů, šperků a kovových artefaktů. U těchto vzorků byla provedena kvalitativní a semikvantitativní analýza prvkového složení<sup>12</sup>. Technika LIBS byla využita i při studiu vzorků kalcifikovaných tkání a při analýze ocelí<sup>2,13</sup>. Také byly popsány principy metody pro povrchovou analýzu a hloubkové profilování<sup>14</sup>. S využitím femtosekundových laserů byly získány hloubkové profily vzorků Cu-Ag a TiN-TiAlN na křemíku a železe<sup>15</sup>. Využití metody bylo zkoumáno i v oblasti identifikace bakteriálních kmenů<sup>16</sup>.

Cílem této práce je porovnání signálů LA-ICP-OES a LIBS vybraných prvků při ablaci různých materiálů pro případné využití pro přímou spektrální analýzu těchto typů vzorků. Pro tyto experimenty byly v prvním přiblížení vybrány různé typy standardů skel a půdní tablety jako příklad. Byly sledovány korelace signálů jednotlivých prvků v závislosti na obsahu ve vzorcích. V případě skel je demonstrován výrazný matrix efekt vedoucí v extrémních případech až k obrácení směrnice kalibračních křivek, zatímco u půdních tablet lze vysledovat rozumné korelace využitelné k případnému stanovení obsahu prvku. V případě metody LA-ICP-OES lze použitím porovnávacího prvku značně eliminovat nepříznivé matrix efekty, což naznačuje, že stechiometrie prvků v aerosolu transportovaného do ICP plazmatu zůstává zachována a že je i zachována široká lineární odezva ICP-OES jako detektoru abla-

\* Michaela Galiová, Veronika Možná a Alice Staňková získaly zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

tovaného materiálu. V případě signálu LIBS jsou děje vedoucí k maticovým efektům složitější a nelze je jednoduchým způsobem s použitím porovnávacího prvku odstranit.

## Experimentální část

### Laser a ablační systém

Pro měření byl použit pulzní Nd:YAG laser (Quantel, Brilliant, Francie) emitující laserové záření o základní vlnové délce 1064 nm s frekvencí pulsů 10 Hz. Jde o pevnolátkový laser využívající modulace kvality optického rezonátoru (Q-modulace, Q-switch) pomocí Kerrova článku, s výstupními pulzy trvajících asi 5 ns. S využitím krystalů pro násobení frekvence bylo možné pracovat při vlnových délkách 532 nm (druhá harmonická frekvence) a 266 nm (čtvrtá harmonická frekvence). V této práci byla použita základní vlnová délka 1064 nm pro půdní tablety a 266 nm pro skla. Měření se prováděla v IČ oblasti s energií pulsů 120 mJ a v UV oblasti s energií pulsů 10 mJ. K zaostření IČ laserového záření byla použita skleněná čočka s ohniskovou vzdáleností 170 mm, k zaostření UV laserového záření křemenná čočka s ohniskovou vzdáleností 125 mm. Energie pulsů laseru byla měřena pomocí monitoru energie/výkonu laseru Nova (Ophir Optronics, Izrael).

Vzorky byly upevněny v držáku, který byl připevněn k XY translátoru s programovatelným pohybem. K pohybu sloužil translátor OWIS (Německo) řízený softwarem Galil (USA). Laserová ablace byla prováděna buď do bodu anebo vzorek vykonával pohyb po kruhové dráze s poloměrem 2 mm.

Pro analýzu byla použita ablační komora o objemu 16 cm<sup>3</sup>, která byla umístěna tak, že laserový paprsek dopa-

dal na povrch vzorku pod úhlem 72°. Ablaci komorou proudil nosný plyn, který odnášel ablatovaný materiál do ICP spektrometru Jobin-Yvon 170 Ultrace (Jobin-Yvon, Francie). Současně bylo snímáno a detegováno záření emitované laserem indukovaným plazmatem. Experimentální uspořádání je na obr. 1.

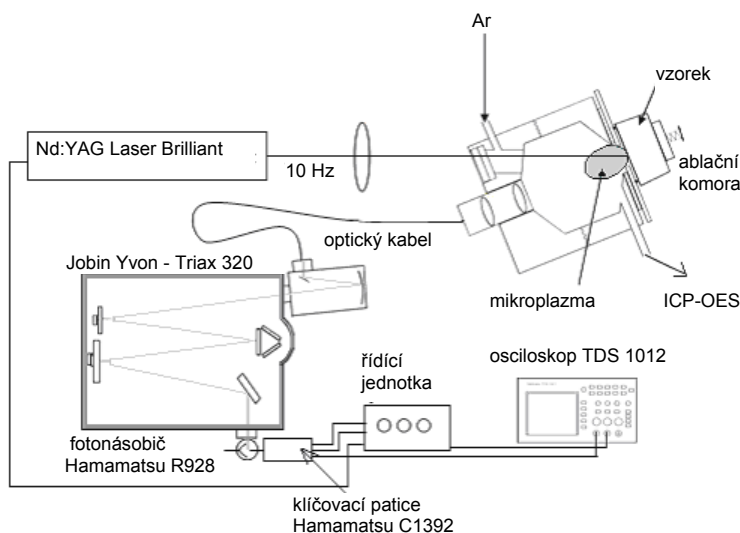
### ICP

Aerosol vzorku byl z ablační komory transportován nosným plynem (argon) do plazmové hlavice ICP spektrometru JY 170 Ultrace (Jobin-Yvon, Francie) s laterálním pozorováním plazmatu. Průtok vnějšího plazmového plynu byl 12 l min<sup>-1</sup>, průtok nosného plynu byl 0,6 l min<sup>-1</sup>. Disperzní systém ICP spektrometru je vybaven monochromátorem typu Czerny-Turner s ohniskovou vzdáleností 1 m, jenž umožňuje sekvenční měření a polychromátorem konstrukce Paschen-Runge umožňující simultánní měření. Na monochromátoru byly měřeny spektrální čáry K a Na. K měření čar Mg, Si, V a Cu byl použit polychromátor (viz tabulka I).

Tabulka I

Vlnové délky analytických čar prvků stanovovaných ve vzorcích skel a půd metodou LIBS a ICP-OES

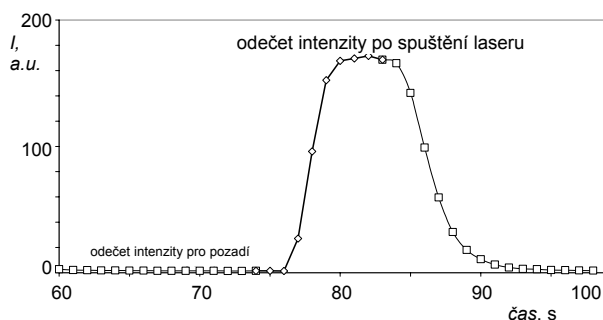
Prvek	LIBS [nm]	ICP-OES [nm]
Si	251,61	251,61
Na	589,00	589,00
K	766,49	766,49
V	617,04	292,41
Cu	521,82	324,76



Obr.1. Experimentální uspořádání laserové ablace s optickou emisní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu spojené se spektrometrií laserem indukovaného mikroplazmatu

### Vyhodnocení signálu ICP-OES

Ablace probíhala tak, že laser byl puštěn po dobu 13 s (kvůli záznamu LIBS signálu), poté byl vypnut na 40 s a pak znovu zapnut na 13 s. Tento postup se opakoval ještě dvakrát. Výsledkem byl záznam 3 „píků“, které byly vyhodnoceny tak, že od intenzity v maximu „píku“ byla odečtena hodnota pozadí získaná měřením ICP-OES signálu při vypnutém laseru (obr. 2).



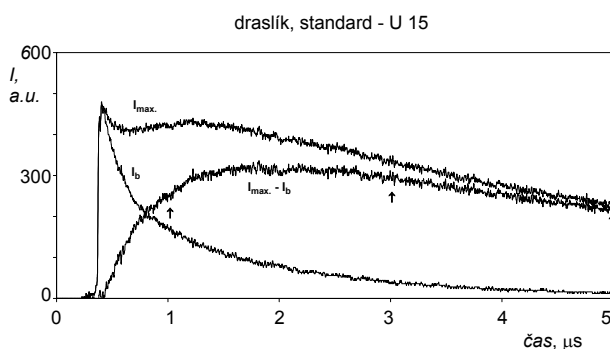
Obr. 2. Způsob odečtu signálu ICP-OES; měřeno pro křemík (251,61 nm) ve vzorku U 15 (24,6 % Si). Odečteno pozadí před spuštěním laseru a intenzita signálu po spuštění laseru. Energie pulsu laseru 10 mJ, rychlost průtoku argonu 0,6 l min<sup>-1</sup>, zaostření paprsku na povrch vzorku; □ laser vypnutý, ◇ laser zapnutý

### LIBS

Emitované záření laserem indukovaného plazmatu bylo snímáno z ablační komory objektivem a vedeno optickým kabelem na vstupní štěrbinu monochromátoru TRIAX 320 v uspořádání Czerny-Turner s ohniskovou vzdáleností 320 mm. Ten byl osazen třemi mřížkami (68 × 68 mm) s 1200, 2400 a 3600 vrypů / mm, motorizovanou vstupní a výstupní štěrbinou (s nastavitelnou šířkou v rozsahu 0–2 mm s krokem 12,5 μm), fotonásobičem Hamamatsu R928 a klíčovací patičí Hamamatsu C1392. Ke spuštění měření bylo využito impulsu řídicího modulační (Q-switch) laseru. K registraci signálu prvků Si, Na, Mg, V a Cu (tabulka I) byl použit digitální osciloskop Tektronix TDS 1012, který byl připojen přes sériovou datovou sběrnici RS-232C k počítači. K transportu dat do počítače a k nastavení osciloskopu byl použit program pro počítačovou podporu osciloskopů Scope 6.1 (Tektronix).

### Vyhodnocení signálu

Každý signál byl získán průměrováním 128 laserových pulsů, přičemž každý puls laseru představoval jeden emisní signál. Toto průměrování bylo prováděno digitálním osciloskopem. Měření signálu na analytické čáře a na pozadí byla prováděna postupně a výsledný signál byl získán odečtením signálu pozadí od signálu na analytické čáře (obr. 3). Měření signálu v maximu analytické čáry i pozadí bylo provedeno třikrát, pokaždé v různých místech vzorku.



Obr. 3. Časový průběh signálu LIBS atomové čáry K – 766,49 nm ( $I_{\max}$ ), pozadí při 765,49 nm ( $I_b$ ) a rozdíl signálů v maximu a na pozadí ( $I_{\max} - I_b$ ). Měření vzorku U 15 (7,5 % K), průměrný signál zaznamenávaný po dobu 5 ms, průměrováno 128 pulsů laseru, energie pulsu laseru 10 mJ, rychlost průtoku argonu 0,6 l min<sup>-1</sup>, zaostření paprsku na povrch vzorku

### Vzorky

Možnost použití LA pro ICP-OES a LIBS byla testována na standardních vzorcích skel a půd. V případě skleněných vzorků bylo pracováno se standardy skel 2-THETA (tabulka II), v případě půdních vzorků bylo pracováno se vzorky z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, Brno (tabulka III).

Lisované tablety byly připraveny po mletí a homogenizaci vzorku v kulovém mlýnku Pulverisette 7 (Fritsch, Německo). Po smíchání půdy s pojivovým materiálem (Ag prášek) v poměru 2:1 a přidání porovnávacího prvku (prášek GeO<sub>2</sub>, v konečném obsahu 0,2 g Ge na 10 g směsi) byla provedena homogenizace po dobu 60 min. Homogenizovaný materiál byl následně lisován manuálním hydraulickým lisem Mobiko SP 2 do tablet s použitím ocelové formy vlastní konstrukce. Výsledné tablety o průměru 12 mm a tloušťce 1 mm obsahovaly asi 2 g materiálu. Polyuretanové tablety byly připraveny z nízkoviskózní

Tabulka II

Seznam použitých standardů skel firmy 2-THETA a jejich složení

Sklo	Barva	% Si	% Na	% K
U 8	bezbarvé, průhledné	28,5	5,9	6,1
U 12	bílé, neprůhledné	32,7	10,0	2,1
U 13	hnědé, průhledné	33,4	10,0	2,0
U 15	hnědé, průhledné	24,6	4,5	7,1
U 34	světle zelené, průhledné	32,6	6,9	4,5
U 35	červené, průhledné	28,3	10,0	4,4
U 37	tmavě modré, průhledné	34,0	9,0	2,1
U 39	bezbarvé, průhledné	33,9	11,4	0,5
U 42	bezbarvé, průhledné	31,7	7,0	3,0

## Tabulka III

Seznam použitých vzorků půd (vzorky z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, Brno)

Číslo vz.	Popis vzorku	V [mg kg <sup>-1</sup> ]	Cu [mg kg <sup>-1</sup> ]
5213	glejová půda, kat. úz. Lomnice, okr. Jindřichův Hradec	16,90	7,60
5303	kambizem, kat.úz. Krásné Údolí, okr. Karlovy Vary	89,00	30,60
5692	černozem, Chrlice, okr. Brno město	41,62	76,70
5491	nivní půda, Dobroměřice, okr. Louny	67,30	62,90
5393	ilimerizovaná půda, Sytno, okr. Tachov	54,30	23,00
5617	černozem, Pasohlávky, okr. Břeclav	16,99	14,31
5492	fluvizem, Lišany u Žatce, okr. Louny	80,18	204,00
5492	fluvizem	79,20	203,00
5701	černozem, Věrovany, okr. Olomouc	39,11	19,79
5002	kambizem – červená, Malá Černoc, okr. Louny	46,77	47,52
5312	regozem, Bohy, okr. Plzeň	26,50	12,19
5616	černozem, kat. úz. Moravský Žižkev, okr. Břeclav	32,71	15,98

dvousložkové pryskyřice PX 521HT (Axson). Vzorky půd byly po smíchání se složkou A (isokyanát) zhomogenizovány a byla k nim přidána složka B (polyol). Složka A byla se složkou B smíchána v poměru 2:1. Následně byly vzorky vakuovány a vzniklá hmota byla nalita do lukoprenové (silikonový kaučuk) formy, která byla předežhřata na 70 °C a v níž byla hmota vložena do sušárny na 1 h. Pak byla tableta ponechána ve formě než vychladla a následně byla vyloupena.

## Rastrovací elektronový mikroskop

Pro měření kráterů vzniklých po pulsech laseru byl použit rastrovací elektronový mikroskop TESLA BS 340 (Tesla Brno, Česká republika) s rozlišovací schopností 7 nm a 10–200 000 násobným zvětšením. Jako osvětlovací systém sloužila žhavená W-katoda. Urychlovací napětí bylo 20 kV. Sekundární elektrony byly detegovány scintilačním detektorem. Měření bylo provedeno při tlaku  $5 \cdot 10^{-4}$  Pa po třiminutovém pokovení zlatem iontovým naprašováním při proudu 30 mA.

## Výsledky a diskuse

## Vliv zaostření

Významným parametrem ovlivňujícím podmínky ablace je zaostření laserového paprsku, které bylo optimalizováno pro získání maximální intenzity signálu.

## Laserové záření 266 nm

Optimalizační měření bylo provedeno na standardu U 39 (Na 11,4 %) při vlnové délce 589,00 nm odpovídající atomové čáře Na. Vliv zaostření laserového paprsku na intenzitu signálu byl zkoumán v rozmezí 10 mm nad povrchem vzorku až 5 mm pod povrchem vzorku. Mezi jednotlivými měřeními byl vzorek posouván pomocí x,y-translátoru. Signál byl zaznamenáván po dobu 10 μs po pulsu laseru. Maximálního signálu bylo dosaženo při zaostření laserového paprsku na povrch vzorku. V ohniskové vzdálenosti čočky byla tedy provedena všechna měření vzorků skel metodami LIBS i LA-ICP-OES.

## Laserové záření 1064 nm

Měření bylo provedeno na vzorku půdy č. 5492 (204 Cu mg kg<sup>-1</sup>) při vlnové délce 521,82 nm odpovídající atomové čáře Cu. Vliv zaostření laserového paprsku na intenzitu signálu byl zkoumán v rozmezí 35 mm nad povrchem vzorku po 10 mm pod povrchem vzorku. Signál byl zaznamenáván po dobu 10 μs po pulsu laseru. Maximální intenzity signálu bylo dosaženo při zaostření laserového paprsku 20 mm nad povrchem vzorku. V této vzdálenosti čočky od povrchu laseru byla provedena všechna měření půdních tablet metodami LIBS i LA-ICP-OES.

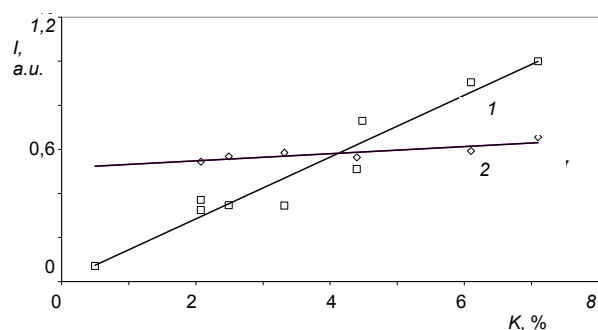
## Kalibrační závislosti

## Vzorky skel

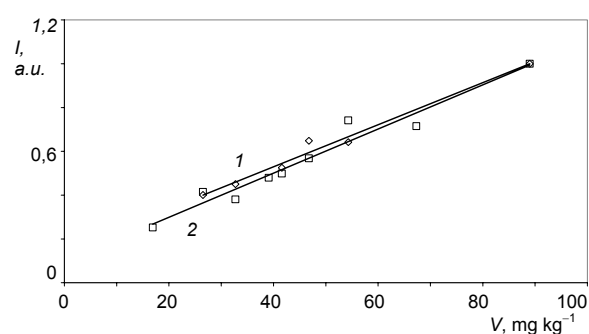
Měření sady standardů skel bylo provedeno metodami LIBS a LA-ICP-OES po výběru analytických čar, jejichž vlnové délky jsou uvedeny v tabulce I. U každé emisní čáry měřené metodou LIBS byl proměřen profil této čáry.

Bylo zjištěno, že samotný signál křemíku není použitelný pro případné určení obsahu křemíku v případě obou metod, u metody LIBS byl dokonce pozorován pokles intenzity s rostoucím obsahem křemíku.

Kalibrační závislost signálu draslíku získaná oběma metodami byla také shledána nepoužitelnou pro analytické účely. Proto byl použit signál křemíku jako signál porovnávacího prvku. Z přepočtených kalibračních závislostí pro draslík (obr. 4) je patrné, že výsledky získané metodou LIBS není ani takto možné použít, neboť se uplatňuje takový vliv matrice, který přepočtem na porovnávací prvek nelze odstranit. U metody LA-ICP-OES přepočtení na porovnávací prvek křemík způsobilo eliminaci vlivu matrice (tabulka IV) a kalibrační závislost je tak po přepočtu na křemík pro vyhodnocení obsahů draslíku ve vzorcích skel využitelná.



Obr. 4. Kalibrační závislost draslíku ve vzorcích skel metodami LIBS a LA-ICP-OES po přepočtu na porovnávací prvek (Si); □ ICP-OES, ◇ LIBS, 1)  $y = 0,1404x + 0,0036$ ,  $R^2 = 0,9386$ , 2)  $y = 0,0163x + 0,5157$ ,  $R^2 = 0,7252$



Obr. 5. Kalibrační závislost pro vanad ve vzorcích půdních tablet lisovaných s Ag metodami LIBS a LA-ICP-OES bez přepočtu na porovnávací prvek; □ ICP-OES, ◇ LIBS, 1)  $y = 0,0096x + 0,1454$ ,  $R^2 = 0,9827$ , 2)  $y = 0,0101x + 0,0974$ ,  $R^2 = 0,955$

#### Tabulka IV

Hodnoty koeficientů determinace  $R^2$  kalibračních závislostí po přepočtu a s přepočtem na porovnávací prvek (Si ve vzorcích skel a Ge vzorcích půd)

Skla	$R^2$		$R^2$	
	bez přepočtu na porovnávací prvek (PP)		s přepočtem na porovnávací prvek (PP)	
	LIBS	ICP-OES	LIBS	ICP-OES
Si	0,6114	0,3756	~	~
Na	0,0091	0,1672	0,3362	0,8387
K	0,9701	0,1105	0,7252	0,9386
<i>Půdy</i>	$R^2$		$R^2$	
<i>LIBS</i>	tablety lisované s Ag		polyuretanové tablety	
V	0,9910	0,9910	0,7178	0,7178
Cu	0,9162	0,9162	0,6950	0,6950
<i>Půdy</i>	$R^2$		$R^2$	
<i>ICP-OES</i>	tablety lisované s Ag		polyuretanové tablety	
	bez přepočtu	s přepočtem	bez přepočtu	s přepočtem
V	0,9550	0,9368	0,9492	0,7526
Cu	0,9721	0,9603	0,9994	0,9720

Podobně při sledování signálu sodíku ve vzorcích skel nebyla pozorována žádná korelace s jeho obsahem a jako u draslíku došlo při přepočtu na porovnávací prvek křemík k výraznému zlepšení linearit a tak částečnému odstranění vlivu matrice pouze u metody LA-ICP-OES (tabulka IV).

#### Vzorky půd

Vzorky půd získané z kruhových testů byly stanoveny metodami LIBS a LA-ICP-OES na vlnových délkách uvedených v tabulce I. Metodou LA-ICP-OES byly kalibrační závislosti vyhodnoceny s přepočtem i bez přepočtu na

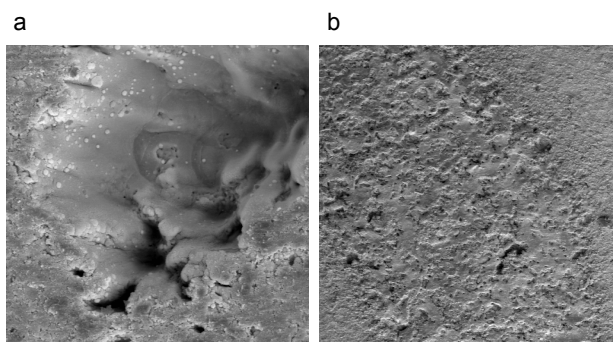
porovnávací prvek, kterým bylo Ge. Z kalibračních závislostí pro vanad v půdních tabletách lisovaných s Ag (obr. 5) je patrné praktické využití jak u metody LIBS, tak i LA-ICP-OES. U metody LIBS bylo dosaženo lepšího korelačního koeficientu. U tablet polyuretanových je citlivost stanovení vanadu oběma metodami nižší (tabulka IV). Přepočet na porovnávací prvek Ge u LA-ICP-OES nezpůsobil pozitivní změnu na rozdíl od tablet lisovaných s Ag.

V případě stanovení Cu byla pozorována lepší citlivost u metody LA-ICP-OES jak u tablet lisovaných tak i polyuretanových. Přepočet na porovnávací prvek u této metody nepřinesl zlepšení (tabulka IV).

Analýza lisovaných tablet s Ag oběma metodami poskytuje lepší výsledky než u tablet polyuretanových. Větší odchylky u polyuretanových tablet mohou být způsobeny vlivem matrice.

#### Krátery

Interakcí laserového paprsku se vzorkem vznikají na



Obr. 6. Fotografie kráteru na povrchu vzorku skla a půdní tablety; a) výřez kráteru na povrchu vzorku U 34 zvětšený 960krát, energie laseru 10 mJ, rychlost průtoku argonu 0,6 l min<sup>-1</sup>, zaostření paprsku (266 nm) na povrch vzorku, b) výřez na povrchu vzorku lisované půdní tablety 5701 po ablací do kružnice zvětšený 160krát, energie laseru 120 mJ, rychlost průtoku argonu 0,6 l min<sup>-1</sup>, zaostření paprsku (1064 nm) 20 mm nad povrch vzorku



povrchu vzorku ablační krátery, jejichž snímky byly získány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu.

V případě standardů skel není kráter symetrický, lze tedy usuzovat, že docházelo k nerovnoměrné ablaci, patrně vlivem nepravidelnosti laserového paprsku v UV oblasti (obr. 6a).

Naopak je tomu u ablačních kráterů tablet půd (obr. 6b). U polyuretanových půdních tablet vznikly krátery s větší hloubkou než u lisovaných, což dokazuje snadnější ablaci materiálu.

## Závěr

Cílem práce bylo ověřit možnost použití metod spektroskopie laserem indukovaného mikroplazmatu a optické emisní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu s laserovou ablací pro stanovení vybraných prvků ve vzorcích skel a půd.

Nejdříve byl sledován vliv zaostření laserového paprsku na velikost měřeného signálu. Při sledování signálu prvků ve vzorcích skel byl laserový paprsek (266 nm) zaostřen na povrch vzorku a u půdních tablet (1064 nm) 20 mm nad povrch vzorku.

Pro jednotlivé prvky byly sestrojeny kalibrační závislosti. Při analýze skel byly tyto závislosti přepočteny na porovnávací prvek Si u obou metod LIBS a LA-ICP-OES. V případě analýzy půdních tablet byl tento přepočet proveden na Ge pouze u LA-ICP-OES. Půdní tablety byly analyzovány buď lisované s vnitřním standardem Ag a nebo polyuretanové.

Závěrem se dá říct, že při stanovení prvků ve standardech skel metodou LIBS se uplatňuje velký vliv matrice, který nelze odstranit ani při použití Si jako porovnávacího prvku. Vzhledem k různým vlastnostem vzorků skel je mechanismus ablace natolik odlišný, že naměřené signály neodráží obsah prvků ve vzorcích. Důvodem může být nejen velký vliv matrice rozdílných vzorků skel použitých v této práci, ale i barevnost těchto vzorků, která může způsobit odlišnou míru absorpce laserového záření. Tmavší vzorky mohou absorbovat větší část záření.

U LA-ICP-OES se uplatňuje také velký vliv matrice, který lze naopak v tomto případě odstranit použitím Si jako porovnávacího prvku. Z tohoto hlediska je tato metoda pro stanovení vybraných prvků ve vzorcích skel vhodná.

U půdních vzorků bylo zjištěno, že není nutné ani u metody LIBS ani LA-ICP-OES používat přepočet na porovnávací prvek (Ge). Pro stanovení vybraných prvků v půdních vzorcích je výhodnější použití lisovaných tablet s Ag.

*Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za podporu projektu „Studium a aplikace plazmochemických reakcí v neizotermickém nízkoteplotním plazmatu a jeho interakci s povrchem pevných látek“ MSM0021622411.*

## LITERATURA

- Jeong S. H., Borisov O. V., Yoo J. H., Mao X. L., Russo R. E.: *Anal. Chem.* 71, 5123 (1999).
- Novotný K., Vaculovič T., Kanický V., Otruba V.: *Hutnická analytika*, str. 54. 2 Theta, Český Těšín 2003.
- Dočekalová H.: *Chem. Papers* 57, 161 (2003).
- Zbiral J.: *Jednotné pracovní postupy, Analýza půd*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 1996.
- Holzbecher Z., Churáček J.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha 1987.
- Murray R. W., Miller D. J., Kryc K. A.: *Analysis of Major and Trace Elements in Rocks, Sediments, and Interstitial Waters by Inductively Coupled Plasma-atomic Emission Spectrometry (ICP-AES)*. Ocean Drilling program, Texas A and M University 2000.
- www.amtek.com/xrf.html , staženo 10. června 2005.
- www.fz-juelich.de/zch , staženo 10. června 2005.
- Otaka M., Iwasaki Y., Futura N., Brenner I. B.: *Spectrochim. Acta B* 57, 1713 (2002).
- Anglos D., Melesanaki K., Zafiropulos V., Gresalfi M. J., Miller J. C.: *Appl. Spectrosc.* 56, 423 (2002).
- Melesanaki K., Papadakis V., Balas C., Anglos D.: *Spectrochim. Acta, B* 56, 2337 (2001).
- Melesanaki K., Mateo M., Ferrence S. C., Betancourt P. P., Anglos D.: *Appl. Surf. Sc.* 197, 156 (2002).
- Samek O., Beddows D. C. S., Telle H. H., Kaiser J., Liska M., Caceres J. O., Urena A.G.: *Spectrochim. Acta, B* 56, 865 (2001).
- Vadillo J. M., Laserna J. J.: *Spectrochim. Acta, B* 59, 147 (2004).
- Winefordner J. D., Correll T., Gigg E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1061 (2004).
- Kim T., Specht Z. G., Vary P. S., Lin C. T.: *J. Phys. Chem., B* 108, 5477 (2004).

**M. Galiová, V. Možná, A. Staňková, K. Novotný and V. Kanický** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Study of Laser - Sample Interactions of Glasses and Soils Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Optical Emission Spectroscopy with Inductively Coupled Plasma**

The potentials of laser ablation used as an analytical tool for glasses and soils were studied by optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma and laser-induced breakdown spectroscopy. Glass samples were ablated by laser radiation at 266 nm. For ablation of soils, the 1064 nm laser radiation was used. Calibration curves were constructed for Si, Na, Mg and K in glass materials and for V and Cu in soils.

## NMR STUDIE INTERAKCE DERIVÁTŮ DISTAMYCINU S DNA

JARMILA FOLTÝNOVÁ\*, MARCELA  
TKADLECOVÁ, MARTIN VALÍK, LUKÁŠ  
PALIVEC a VLADIMÍR KRÁL

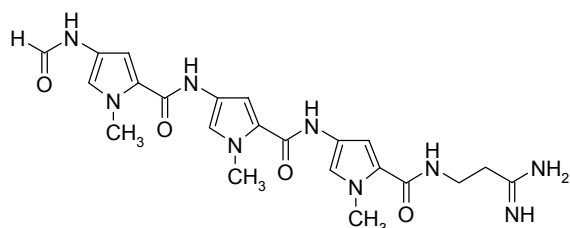
Ústav analytické chemie, VŠCHT, Technická 3, 166 28  
Praha 6  
Jarmila.Foltynova@vscht.cz

Došlo 7.4.05, přijato 18.11.05.

Klíčová slova: Trögerova báze, distamycin, DNA, NMR

### Úvod

Nukleové kyseliny reverzibilně interagují s rozsáhlou skupinou malých organických molekul, což hraje důležitou roli při výzkumu nových léčiv vyvíjených pro léčbu rakovinných a virových onemocnění. Mezi tyto látky patří i přírodní oligopeptid distamycin A (obr. 1). Ten se neko-



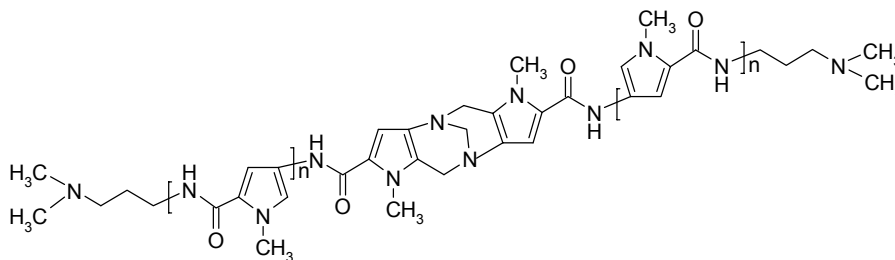
Obr. 1. Strukturální vzorec distamycinu A

valentně váže na DNA do malého žlábků, preferenčně v oblastech sekvenci bází adeninu a thyminu<sup>1</sup>. Cílem řady výzkumných projektů je syntetizovat dimerní deriváty této přírodní formy a sledovat jejich interakci s DNA, případně docílit lepších vazebných schopností mimo sekvence adenin-thymin<sup>2–4</sup>.

V předkládané práci je tato interakce sledována spektroskopii NMR u řady derivátů distamycinu, které byly již dříve syntetizovány na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha<sup>5</sup>. Jednotlivé deriváty se od sebe liší počtem *N*-methylpyrolových jednotek a oproti přírodní formě obsahují navíc v centru molekuly Trögerovu bázi (obr. 2).

Ve spektroskopii NMR jsou intra- či intermolekulární dynamické procesy označovány pojmem chemická výměna. Její vliv na vzhled spektra souvisí s rychlostí výměny a s rozdílem rezonančních frekvencí signálů sledovaného jádra v jednotlivých stavech, mezi nimiž výměna probíhá. Pokud je tato výměna pomalá, obsahuje spektrum dva signály, odpovídající jednotlivým stavům. Je-li výměna rychlá, dojde ve spektru ke splnutí signálů a pozorujeme pouze jeden pík, ovšem na jiném místě, než byly původní – u výměny mezi dvěma stejně populovanými signály uprostřed. Proto jsou ve spektru při studiu interakcí sledovány dva základní parametry: rozšiřování píků a chemický posun signálů. To odpovídá chemické výměně mezi volnou formou pozorované látky a formou vázanou na jinou molekulu.

Dalším parametrem pro studium interakce je změna relaxace, tzn. návratu systému po vybuzení radiofrekvenčním pulsem zpět do rovnovážného stavu. Rozlišujeme dva různé relaxační procesy: spin-mřížkovou relaxaci (podélná) a spin-spinovou relaxaci (příčná). V práci jsme se zaměřili na sledování změny spin-mřížkové relaxace, při níž relaxující jádro předá energii translačním a rotačním pohybům jader a elektronů, které tvoří tzv. mřížku, čímž je označováno okolí daného jádra. Rychlost relaxace je dána rychlostní konstantou  $1/T_1$ , kde  $T_1$  je spin-mřížkový relaxační čas. Obecně platí pravidlo, že čím rychleji se molekula pohybuje, tím větší je hodnota  $T_1$ , tj. navázáním malé molekuly na větší by se hodnota  $T_1$  měla zmenšovat.



Obr. 2. Dimerní deriváty distamycinu; a)  $n=0$  (derivát 0); b)  $n=1$  (derivát 1); c)  $n=2$  (derivát 2); d)  $n=3$  (derivát 3)

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

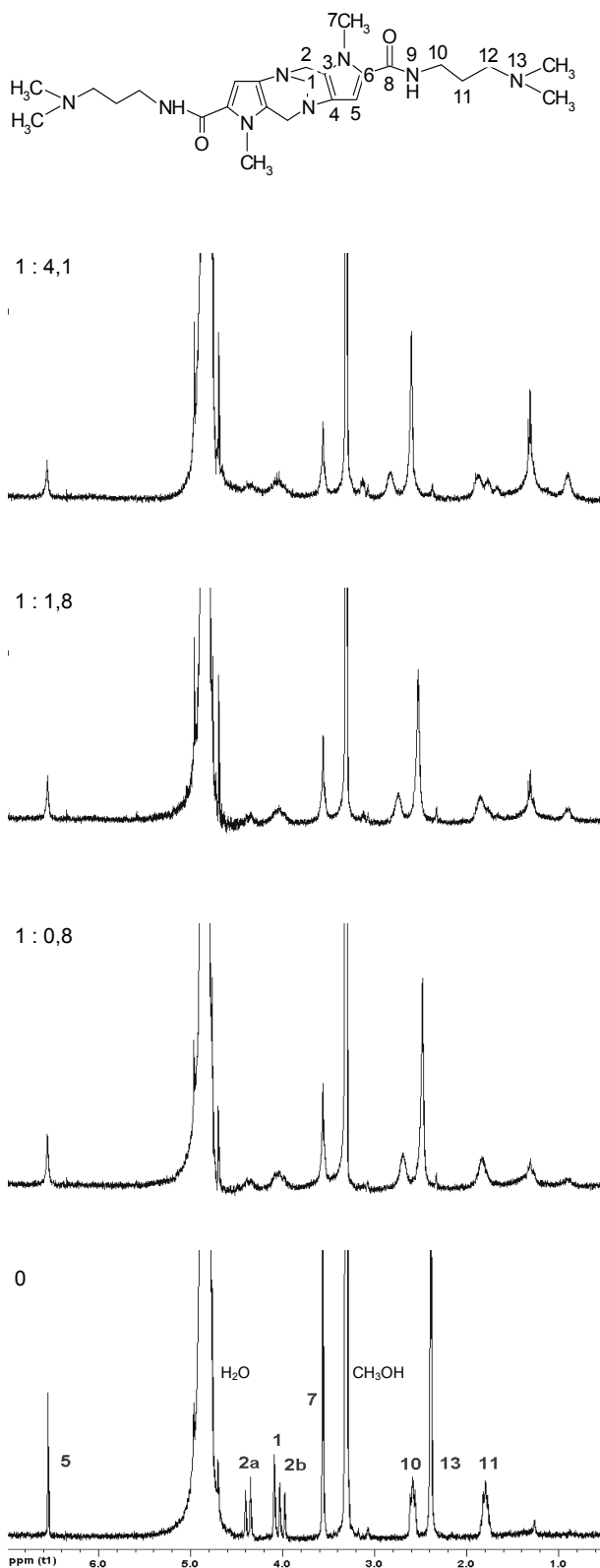
## Experimentální část

Všechna spektra byla měřena na spektrometru firmy Varian, model Mercury Plus (300 MHz). Při přípravě roztoků DNA byla použita míchačka VSM-3 (Shelton Scientific) a ultrazvuková lázeň (Merck). Pro přiřazení signálů distamycinových derivátů v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrech byly použity roztoky v dimethylsulfoxidu –  $d_6$  (99,9 %-D, Aldrich), kde jsou všechny deriváty dobře rozpustné. Byla měřena spektra  $^1\text{H}$  NMR (též s potlačením signálu rozpouštědla), dále  $^{13}\text{C}$  NMR, apt a dvoudimenzionální spektra gCOSY, gHSQC a gHMBC. Relaxační časy  $T_1$  byly měřeny metodou inverze populací. Pro měření vodíkových spekter bylo používáno 64 skenů a snímáno 36 000 bodů. Měření byla prováděna za konstantní teploty 298 K. Studované distamycinové deriváty byly syntetizované na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha<sup>5</sup>, relativní molekulové hmotnosti (potvrzené hmotnostní spektrometrií; čísla derivátů odpovídají počtu *N*-methylpyrolových jednotek v molekule, viz obr. 2): derivát 0 – 484, derivát 1 – 787, derivát 2 – 972, derivát 3 – 1216. Použitá DNA byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich, sonifikována v ultrazvukové lázni, lyofilizována dvakrát v  $\text{D}_2\text{O}$  k dosažení výměny deuterium-vodík. Interakci s DNA bylo nutno sledovat ve vodných roztocích. Pro zlepšení rozpustnosti vyšších distamycinových derivátů bylo použito směsné rozpouštědlo voda (99,9 %-D, Aldrich) – methanol (99,8 %-D, Aldrich) v objemovém poměru 2:1. Výpočet přidaného množství DNA vycházel z látkových množství jednotlivých derivátů a průměrné relativní molekulové hmotnosti pro jeden pár bází DNA, která činí 666.

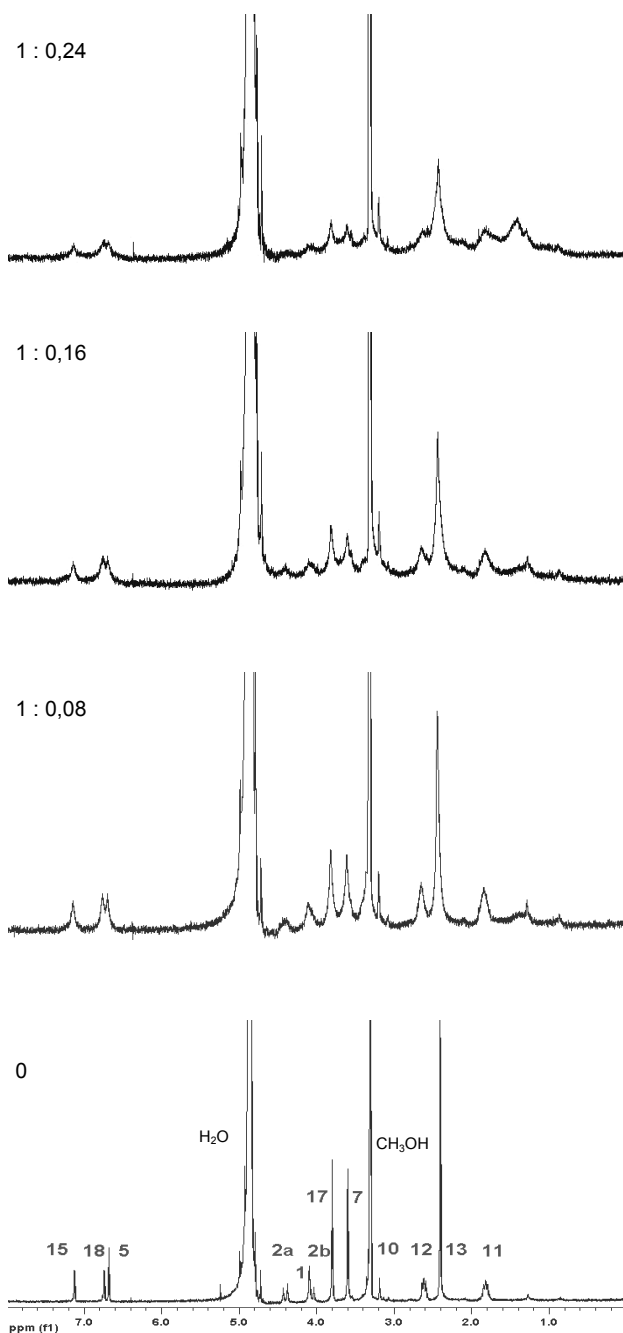
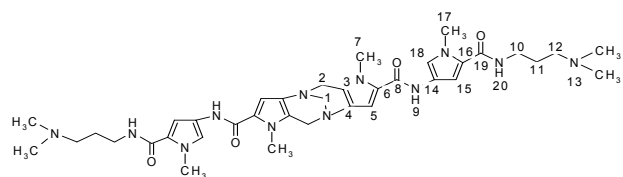
## Výsledky a diskuse

Ve vodíkových spektrech derivátu 0 během přidavku DNA (obr. 3) je patrné, že dochází k rozšiřování signálů, což odpovídá chemické výměně mezi různými formami, v tomto případě formou volnou a formou či formami vázanými na DNA – z toho lze usuzovat na vzájemnou interakci. Nejvíce jsou ovlivněny signál 2 odpovídající skupině  $\text{CH}_2$  Trögerovy báze, a dále pak signál 5, patřící skupině  $\text{CH}$  v pyrolovém kruhu. Titrace byla provedena též v deuterované vodě, přičemž výsledky byly srovnatelné jako při použití směsného rozpouštědla voda-methanol. Při přidávání DNA k derivátu 1 (obr. 4) docházelo k velmi podobným změnám jako u menšího derivátu, ovšem spektra se výrazně změnila již při nepatrném přidavku. Z toho plyne, že interakce je ovlivněna počtem *N*-methylpyrolových jednotek a že vazba na DNA probíhá podobným způsobem jako u derivátu 0. Rozšiřování signálů u obou předchozích derivátů hned po přidavku malého množství DNA má za následek zhoršené měření relaxačních časů  $T_1$ . Přesto jsme zjistili, že dochází k jejich snižování.

Změny ve vodíkových spektrech derivátu 2 při přidávání DNA nebyly tak patrné jako pro předchozí dva



Obr. 3. Přidávky DNA k derivátu 0 (vlevo uveden poměr  $n(\text{derivátu}) : n(\text{DNA})$ )



Obr. 4. Přidavky DNA k derivátu 1; (vlevo uveden poměr  $n(\text{derivátu}) : n(\text{DNA})$ )

deriváty. Pouze v oblasti skupin CH začleněných do pyrrolových kruhů je zřetelný posun jednoho ze signálů. Dá se tedy předpokládat interakce s DNA i pro tento derivát.

Interakce derivátu 3, který vykazuje velmi špatnou rozpustnost i ve směsném rozpouštědle voda-methanol, byla prozatím zkoumána pouze pomocí cirkulárního dichroismu. Ukázalo se, že se derivát 3 specificky váže na DNA. Pro deriváty 0 a 1 spektra cirkulárního dichroismu nevykazují žádné pozorovatelné změny signálů, což naznačuje, že probíhající vazebná interakce je nespecifická.

*Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT č. 6046137307.*

#### LITERATURA

1. Geierstanger B. H., Dwyer T. J., Bathini Y., Lown J. W., Wemmer D. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4474 (1993).
2. Weihong D., Baohua W.; Zhifen L., Junhua X., Gu Y., Weiqiang H.: *Thermochim. Acta* 395, 257 (2003).
3. Conte M. R., Fattorusso E., Palorna L. G., Mayol L.: *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2, 1299 (1992).
4. Dwyer T. J., Geierstanger B. H., Bathini Y., Lown J. W., Wemmer D. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5911 (1992).
5. Valík M., Dolenský B., Petříčková H., Vašek P., Král V.: *J. Tetrahedron Lett.* 16, 2083 (2003).
6. Friebolin H.: *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Wiley, Weinheim 1998.
7. Buděšínský M., Pelnař J.: *Organická chemie*, sv. 25. ÚOCHB ČSAV, Praha 2000.

**J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Valík, L. Palivec, and V. Král** (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Interaction of Novel Dimeric Distamycin Derivatives with DNA: NMR Study**

A series of novel dimeric distamycin derivatives with increasing number of 1-methylpyrrole units, was synthesized. In comparison with natural distamycin, the dimeric derivatives contain a Tröger base as a bridging unit in the centres of their molecules. The main goal of this work was to study the influence of interaction with calf thymus DNA on the distamycin derivative molecule by  $^1\text{H}$  NMR spectrometry and to determine the binding site. It was observed that addition of DNA caused broadening of hydrogen signals and also changes in corresponding relaxation times. Both facts are in accordance with the assumed interaction. The results are discussed for different derivatives in dependence on the possible binding site and compared with those from circular dichroism.

## VÝUKA CHEMIE

### VIZUÁLNA GRAMOTNOSŤ A RIEŠENIE UČEBNÝCH ÚLOH Z CHÉMIE

ZUZANA HALÁKOVÁ a MIROSLAV PROKŠA

*Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie  
a pedagogiky, Univerzita Komenského v Bratislave Príro-  
dovedecká fakulta, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava,  
Slovenská republika  
halakova@fns.uniba.sk, proksa@fns.uniba.sk*

Došlo 20.7.04, prijaté 7.2.05.

Kľúčové slová: učebné úlohy z chémie, vizuálna gramotnosť, vizualizačné prvky

#### Obsah

1. Úvod
2. Vizuálna gramotnosť
3. Chemické učebné úlohy s vizualizačnými prvkami
4. Metodika a výsledky výskumu
5. Záver

#### 1. Úvod

V súčasnosti je aktuálnou a v mnohých médiách rozoberanou témou problematika gramotnosti. Nestretávame sa s ňou len v tradičnom ponímaní ako s bližšie nešpecifikovanou schopnosťou čítať a písať<sup>1</sup>, ale čoraz častejšie sa hovorí aj o cudzojazyčnej, počítačovej a informačnej, matematickej, prírodovednej, hudobnej, výtvarnej, občianskej, mediálnej, právnej, ekonomickej, sociálnej, či dokonca organizačnej, alebo kartografickej gramotnosti. Pojem funkčná gramotnosť označuje súhrne gramotnosť tradičnú, cudzojazyčnú, počítačovú a informačnú<sup>2,3</sup>. Človek 21. storočia by mal disponovať každou jej zložkou, aby sa jeho život a práca stali plnohodnotnými.

Výskum PISA (Program medzinárodného hodnotenia študentov) sa zameriava na tri oblasti gramotnosti: čitateľskú, matematickú a prírodovednú<sup>2,3</sup>. Definuje ich postupne ako spôsobilosť porozumieť písanému textu, používať písaný text, premýšľať o ňom; matematickú gramotnosť ako spôsobilosť rozpoznať možnosť využitia poznatkov z matematiky pri riešení úloh, zaoberať sa nimi a aplikovať ich. Uplatňovanie prírodovedných vedomostí, kladenie

otázok a vyvodzovanie záverov, ktoré vedú k porozumeniu a uľahčujú rozhodovanie týkajúce sa sveta prírody a jeho zmien sú prejavom prírodovednej gramotnosti.

#### 2. Vizuálna gramotnosť

V zahraničných zdrojoch sa v posledných rokoch stretávame s výrazom vizuálna gramotnosť. Tento pojem, pochádzajúci z psychológie, vyjadruje schopnosť rozoznať, pochopiť a vedieť interpretovať vizuálne vyjadrenú skutočnosť. Podľa Herkmana<sup>4</sup> k fyziologickým a psychologickým aspektom vizuálnej percepcie patrí napr. pochopenie tvarov, foriem, vzorov, farieb, dimenzií. Vizuálna gramotnosť zahŕňa také oblasti ako výraz tváre, reč tela, kreslenie, maľovanie, sochárstvo, znakovú reč, medzinárodne používané symboly, plány, nákrasy obrázkov a slová v učebniciach. Vyjadruje schopnosť rozumieť informáciám podávaným vizuálnym spôsobom a schopnosť tvoriť tieto informácie, t.j. obrázky, grafy, schémy, symboly a pod.<sup>5</sup>

Od začiatku ľudskej kultúry je vizuálne povedomie, používanie obrázkov, znakov a symbolov kľúčovým prvkom komunikácie. Postupom času sa tieto symboly a významy zmenili na abecedu, súbor znakov dnešného sveta, ktorá je základom tzv. verbálnej gramotnosti. Disponovať touto schopnosťou znamená dokázať manipulovať so základnými zložkami písanej podoby jazyka: písanie listov, manipulácia so slovami, ovládanie gramatiky, syntaxe<sup>6</sup>.

Používanie ikon a obrázkov však ani v dnešnej dobe nestratilo na význame. Skôr naopak. Dobrým argumentom pre podporu tohto tvrdenia je všeobecne používaný operačný systém WINDOWS, ale aj množstvo ikonických informácií, s ktorými sa v bežnom živote stretávame na každom kroku.

#### 3. Chemické učebné úlohy s vizualizačnými prvkami

Vzhľadom na tieto poznatky sme v poslednom čase zamerali svoju pozornosť na učebné úlohy, ktoré pracovne označujeme ako úlohy s vizualizačnými prvkami. Bez nároku na precíznu definíciu ich vymedzujeme ako úlohy, v ktorých sa využívajú grafické prvky - obrázky, grafy, tabuľky, schémy, symboly, ikony, schematické znázornenia a ktoré u žiakov predpokladajú využívanie aspoň minimálnej úrovne vizuálnej gramotnosti. Inak povedané, vyžadujú od nich riešenie nastoleného problému, v ktorom dominujú obrázky, schémy, nákrasy, grafy. Nie sú u nás fenoménom novým, ale predstavujú známu, hoci ešte nie celkom etablovanú oblasť chemických učebných úloh<sup>7,8</sup>.

Z potreby a nutnosti odlišovať tento typ úloh od tých, ktoré sú formulované tradične, vyplynula aj snaha o systematické roztriedenie jednotlivých typov. Z pohľadu prítomnosti alebo absencie vizualizačných prvkov v učebných úlohách z chémie môžeme vymedziť tri kategórie:

### 3.1. Slovné zadávané úlohy

Na tento typ úloh sú naši žiaci zvyknutí. Ich charakteristickou črtou je, že neobsahujú žiadne znázornenie, zobrazenie, či zvýraznenie niektorej časti. V zadaní sa používa len slovná formulácia problému, bez grafického zásahu do štruktúry textu.

*Poznámka:* Správna alternatíva odpovede je vo všetkých príkladoch zvýraznená.

#### Príklad

Do jednej banky nalejeme roztok síranu sodného a umiestnime v nej malú skúmavku s roztokom dusičnanu bárnateho. Do druhej banky dáme kúsok zinku a malú skúmavku s roztokom kyseliny sírovej. Obidve banky zazátujeme gumenými zátkami. Hmotnosť obidvoch baniek na váhach je rovnaká a sú dostatočne veľké na to, aby nedošlo k ich prípadnému odzátkovaniu. Naklonením baniek sa obsah malých skúmaviek vyleje a v obidvoch prípadoch sa reaktanty zmiešajú. Predpokladáme, že sme použili dve rovnaké banky a aj dve rovnaké malé skúmavky.

Čo budete pozorovať?

- banka, v ktorej boli dusičnan bárnatý so síranom sodným je ťažšia,
- banka, v ktorej boli zinok s kyselinou sírovou je ťažšia,
- obidve banky majú rovnakú hmotnosť.**

### 3.2. Úlohy s dominanciou vizualizačných prvkov (ÚDVP)

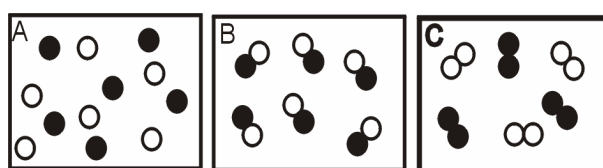
Úlohy, zadávané takmer výlučne grafickými prostriedkami - využitím náčrtov, obrázkov, schém, ilustrácií, označujeme ako úlohy s dominanciou vizualizačných prvkov. Neuvádza sa v nich takmer žiadny slovný komentár, neobsahujú doplňujúce informácie v textovej podobe. Predpokladom žiakovho úspechu pri riešení danej otázky je pochopenie grafického znázornenia zadaného problému. V tejto kategórii učebných úloh môžeme rozlíšiť niekoľko typov podľa toho, čo je v nich konkrétne znázornené:

#### 3.2.1. Reprézentácia mikrosvetu

Vizualizujeme objekty, ktoré nie sú voľným okom pozorovateľné (časticové zloženie hmoty, znázornenie atómov, molekúl, iónov).

#### Príklad

Vo forme akých častíc sa nachádzajú vo vzduchu jeho hlavné súčasti dusík a kyslík?



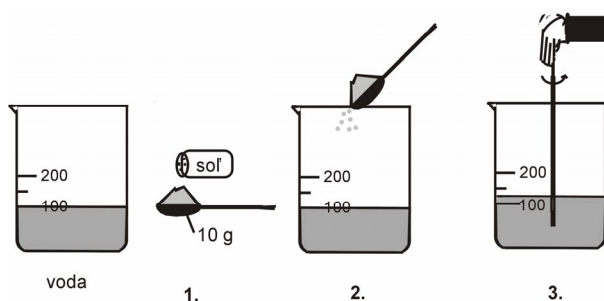
- atóm kyslíka  
● atóm dusíka

Obr. 1. Grafické znázornenie hlavných zložiek vzduchu

#### 3.2.2. Znázornenie pracovného postupu

Prostredníctvom obrázkov, schém, náčrtov zachytíme pracovný postup chemického experimentu, úkonu, chemickej operácie.

#### Príklad



Obr. 2. Znázornenie prípravy roztoku daného zloženia

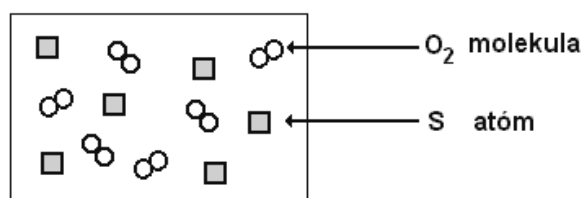
hmotnostný zlomok  $w(\text{NaCl}) = ?$

- 10,5%
- 10,0%
- 9,1%**
- 8,3%

#### 3.2.3. Zobrazenie priebehu chemickej reakcie

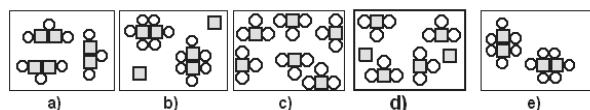
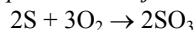
#### Príklad

Diagram reprezentuje zmes atómov síry a molekúl kyslíka v uzavretej nádobe<sup>10</sup>.



Obr. 3. Reprézentácia zmesi atómov síry a molekúl kyslíka v uzavretej nádobe

Ktorý z diagramov ukazuje výsledok po zmiešaní reaktantov úplne tak, ako je to len možné podľa rovnice:

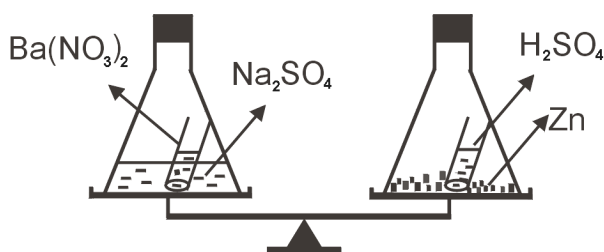


Obr. 4. Znázornenie produktu chemickej reakcie

### 3.2.4. Demonštrácia zákonitostí

Znázorníme podstatu zákonov, princípov a pravidiel (napr. zákonu zachovania hmotnosti, princípu pohyblivej rovnováhy, pravidiel pre obsadzovanie orbitalov elektrónmi,...).

Príklad<sup>11</sup>

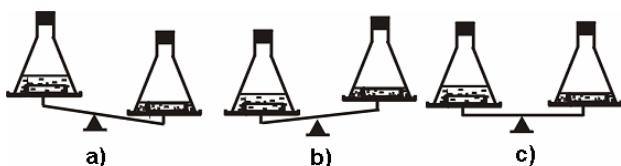


Obr. 5. Zadanie úlohy použitím vizualizačných prvkov



Obr. 6. Znázornenie sústavy počas priebehu chemickej reakcie

Problémová otázka: Čo budete pozorovať?



Obr. 7. Výber správnej odpovede z viacerých možností

### 3.2.5. Grafické, tabuľkové a diagramové úlohy

Úlohy zadané grafom, tabuľkou, v ktorých základom je pochopenie grafického vyjadrenia závislosti premennej od stanovených a menených podmienok; porozumenie informáciám, ktoré sú sprostredkované a zaznamenané v tabuľke.

Príklad

Ktorým postupom by sme efektívne oddelili glukózu ( $C_6H_{12}O_6$ ) zo zmesi pozostávajúcej z týchto tuhých látok: kamenec (dodekahydrát síranu draselnohlinitého  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ), cukor a piesok, ak ich rozpustnosť v troch rozpúšťadlách uvádza nasledujúca tabuľka I:

Tabuľka I

Rozpustnosť vybraných látok v rôznych rozpúšťadlách

Látky	Rozpúšťadlá		
	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>
kamenec $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	rozpustný	nerozpustný	nerozpustný
glukóza ( $C_6H_{12}O_6$ )	rozpustný	rozpustný	nerozpustný
piesok (SiO <sub>2</sub> )	nerozpustný	nerozpustný	nerozpustný

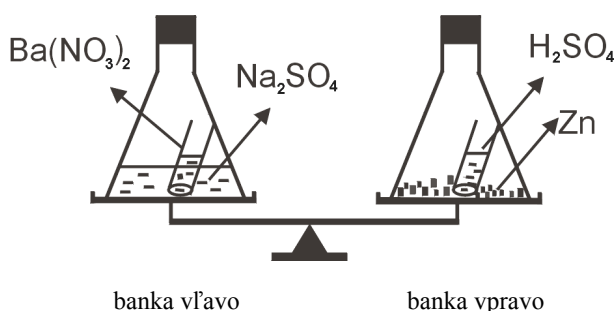
- Ku zmesi tuhých látok pridáme H<sub>2</sub>O, premiešame a prefiltrujeme. Potom vysušime tuhú látku, ktorá zostala na filtračnom papieri.
- Ku zmesi tuhých látok pridáme CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, premiešame a prefiltrujeme. Potom vysušime tuhú látku, ktorá zostala na filtračnom papieri.
- Ku zmesi tuhých látok pridáme CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, premiešame a prefiltrujeme. Potom vysušime tuhú látku, ktorá zostala na filtračnom papieri.
- Ku zmesi pridáme H<sub>2</sub>O, premiešame a prefiltrujeme. Potom necháme odpariť filtrát (prefiltrovanú kvapalinu).
- Ku zmesi pridáme CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, premiešame a prefiltrujeme. Potom necháme odpariť filtrát (prefiltrovanú kvapalinu).

### 3.3. Kombinácia uvedených dvoch typov učebných úloh

Úlohy, v ktorých dominujú vizualizačné prvky, no na jednoznačnejšie pochopenie situácie je potrebný aj slovný komentár (sprievodný popis situácie).

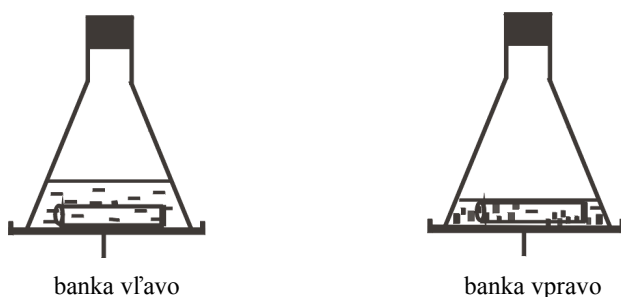
Príklad

Dve dostatočne veľké Erlenmayerove banky obsahujú reaktanty uvedené na obrázku. Banky sme umiestnili na váhy a pozorovali sme, že majú rovnakú hmotnosť.



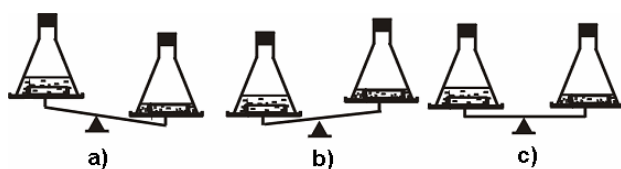
Obr. 8. Zadanie úlohy s použitím kombinácie vizualizačných a verbálnych prvkov

Bankami sme potriasli a nechali sme zreagovať reaktanty.



Obr. 9. Znázornenie sústavy počas priebehu chemickej reakcie

Banky sme znovu umiestnili na váhy.  
Problémová otázka: Čo budete pozorovať?



Obr. 10. Výber správnej odpovede z viacerých možností

#### 4. Metodika a výsledky výskumu

Charakterizovať vlastnosti, potenciálne použitie, užitočnosť daného typu chemických učebných úloh vo vyučovaní procese sme sa rozhodli aj na základe empirického šetrenia.

Cieľom nášho výskumu bolo urobiť prvotnú sondáž do študentovho spôsobu pochopenia úloh s vizualizačnými

prvkami, porovnať úspešnosť ich riešenia vzhľadom na tradičné slovné zadané úlohy, odhadnúť možnosti ich použitia v učebnom procese.

Vytvorený didaktický test pozostával zo 14 úloh obsahovo zameraných na všeobecnú chémiu. Niektoré pochádzali od autorov Nurrenbernej a Robinsona<sup>9</sup>, ktorí sa venujú tvorbe učebných úloh predpokladajúcich pochopenie pojmov a vzťahov medzi nimi. Časť položiek sme modifikovali, zostávajúce sme skonštruovali sami. Všetky si vyžadovali voľbu jednej správnej odpovede z niekoľkých možností. Vypracovali sme dva varianty testu tak, že každý respondent riešil 7 graficky zadaných úloh a 7 iných, slovné formulovaných úloh. Položky, ktoré boli v jednej skupine slovné, v druhej skupine mali grafickú podobu a naopak. Zachovali sme ich obsahovú rovnocennosť.

Výskumu sa zúčastnilo 122 študentov prvého ročníka Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave v októbri 2003. Respondentmi boli nádejní budúci učitelia prírodovedných predmetov: chémie, biológie, geografie, matematiky, environmentalistiky. Všetci sa podrobili testovaniu v tom istom čase a na riešenie mali k dispozícii maximálne 30 minút.

Vzhľadom na náročnosť nášho zadania na priestor neuvádzame didaktický test v plnom znení. Pre vytvorenie adekvátnejšej predstavy čitateľa a pre jeho hlbšie nahliadnutie do danej problematiky si však dovoľujeme upozorniť, že z uvádzaných typov úloh (2.1-2.5) boli v teste použité príklady na typ 2.1, 2.3, 2.4 ako testové položky č.6, č.11 a č.5 (v oboch variantoch testu, len s rozdielnou formou zadania).

Tabuľka II

Úspešnosť študentov pri riešení jednotlivých položiek v percentách a zaradenie ÚDVP podľa typu

Úloha č.	Úspešnosť študentov pri riešení jednotlivých položiek [%]		Typ úlohy s dominanciou vizualizačných prvkov
	grafické	slovné	
1.	26,23	8,20	2.3
2.	49,18	57,38	2.2
3.	22,95	24,59	2.4
4.	49,18	40,98	2.3
5.	39,34	49,18	2.4
6.	62,30	77,05	2.1
7.	11,48	19,67	2.1
8.	62,30	29,51	2.1
9.	42,62	36,07	2.1
10.	21,31	36,07	2.2
11.	11,48	16,39	2.3
12.	32,79	57,38	2.4
13.	26,23	22,95	2.1
14.	36,07	44,26	2.4

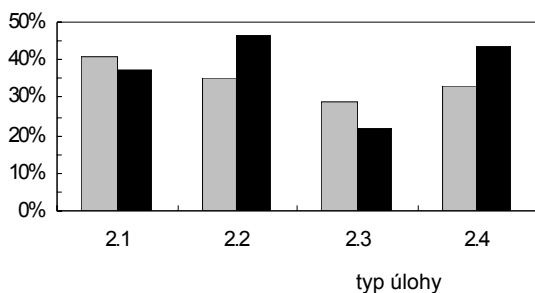


Kým úspešnosť v riešení vizuálnych položiek dosiahla 35,25%, tie isté verbálne položky úspešne vyriešilo 37,12% študentov. Rozdiel sa však neprejavil ako štatisticky významný. To by mohlo indikovať a potvrdzovať ekvivalenciu slovného a grafického zadania z pohľadu obsahu a množstva informácií, ktoré študentom poskytla verbálna a vizuálna formulácia problému. V tabuľke II uvádzame úspešnosť študentov pri riešení jednotlivých položiek testu v rôznej forme zadania a zaradenie úloh podľa príslušnosti k danému typu.

Z pohľadu vyššie uvedeného členenia učebných úloh podľa jednotlivých typov sa v našom mernom prostredí vyskytli štyri druhy úloh s dominanciou vizualizačných prvkov. S požiadavkou pochopiť graficky vyjadrenú závislosť dvoch veličín a s interpretáciou údajov uvádzaných v tabuľkách sa študenti stretávajú najčastejšie, a nielen na hodinách chémie. Z toho dôvodu sme sa rozhodli tento typ do nášho didaktického testu nezaraďovať a sústredili sme sa na skúmanie zvládnutia zostávajúcich štyroch druhov. Tieto prípady boli zastúpené nerovnomerne (dvoma, tromi, štyrmi a piatimi položkami). V nasledujúcom grafe (obr. 11) sme preto zaznamenali priemernú úspešnosť respondentov pri riešení konkrétneho typu úloh z daného počtu položiek.

Pri pohľade na graf možno skonštatovať, že ani v jednom z uvedených typov úloh v grafickom prevedení sa nepodarilo presiahnuť hranicu úspešnosti 45 %, kým v slovnej forme bola prekročená len pri druhom type položiek (2.2). Ten sa týkal znázornenia pracovného postupu.

Najlepšie vyriešeným typom úloh spomedzi grafických bol prípad 2.1 (vizualizácia „mikrosveta“), ku ktorému prislúchalo najviac úloh testu (5). Do tejto kategórie boli zaradené najúspešnejšie zvládnuté položky č. 6 a č. 8 (obe 62,3 %), no aj najhoršie zvládnutá úloha č. 7 (11,48 %), ktorá vyžadovala hlbšie pochopenie podstaty a aplikáciu daného poznatku v novej súvislosti. Zdá sa, že znázornenie časticového zloženia hmoty, t.j. reprezentácia mikroskopického pohľadu na svet, hovorí v prospech grafického zadania, hoci rozdiel v porovnaní s tradičnou - slovnou formou nie je markantný. Za pozornosť však stojí porovnanie typov 2.2 a 2.4 (znázornenie pracovného postupu a zákonitostí, princípov, pravidiel). Študenti si lepšie počínali v slovne koncipovaných úlohách a rozdiely sa



Obr. 11. Úspešnosť študentov pri riešení jednotlivých typov ÚDVP (v percentách); ■ grafické, ■ slovné

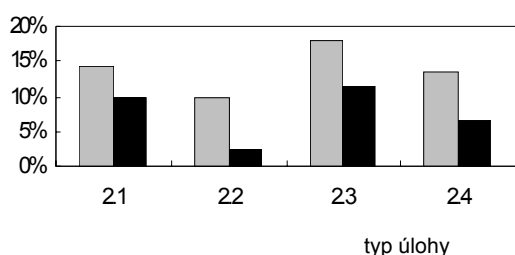
javia pomerne výrazné (11,47 % a 11,6 % respondentov). Zdá sa, že majú väčšie problémy pochopiť postupnosť obrázkov, sled krokov, prípadne nadväznosť znázornených činností. Lepšie zvládnu slovný popis postupu. Je možné, že pod tento trend sa podpisuje aj súčasná koncepcia učebníc, z ktorých sa študenti učia a v ktorých je kladený dôraz na slovnú formuláciu, hoci praktický život sa ubera práve opačným smerom. Trendom sa stáva rýchle, takmer okamžité pochopenie predkladaných informácií a nie opisné a „čas hltajúce“ vyjadrovanie.

Relatívne najhoršie dopadol typ úloh 2.3, do ktorého sme zahrnuli položky týkajúce sa znázornenia chemických reakcií. V grafickej podobe boli riešené s väčším úspechom, čo si vysvetľujeme aj tým, že študenti sú zvyknutí na symbolický zápis chemickej reakcie chemickou rovnicou, obsahujúcou rôzne vizualizačné komponenty ako značky chemických prvkov a zlúčenín, znamienka, či iné znaky. Slovné vyjadrenie sa preto pri snahe o rovnocennosť zadania mohlo zdať respondentom zdĺhavé a nevenovali mu dostatočnú pozornosť, čo sa odrazilo aj na výsledku.

Niektoré porovnania naznačujú, že forma zadania chemickej učebnej úlohy by mohla zohrávať dôležitú rolu pri jej riešení. V prípade grafických úloh sa nie vždy študentom podarí preniknúť do podstaty predkladaného problému, v čom sa však môže odrážať najmä obsahová náročnosť učiva všeobecnej chémie.

Pri podrobnejšom skúmaní nesprávnych odpovedí v jednotlivých typoch učebných úloh, sme zistili, že najviac respondentov nesprávne riešilo grafické úlohy typu 2.2 a 2.4, najmenej nesprávnych odpovedí pripadalo na typ 2.1. Pri riešení úloh týkajúcich sa chemických reakcií (č.1, č.4, č.11- typ úlohy 2.3) študenti častokrát nemajú predstavu o množstve a zložení vznikajúceho produktu. Hoci boli oboznámení so základmi zrážkovej teórie molekúl a chemickej kinetiky, prevažná väčšina z nich je schopná pripustiť napr. existenciu molekuly tvorenej z dvoch atómov síry a štyroch atómov kyslíka. Pri tomto type úloh respondenti volili tie isté nesprávne odpovede bez ohľadu na formu zadania úlohy. V slovnej formulácii týchto úloh sa ich však vyskytlo viac. Pri riešení úloh kategórie 2.2. a 2.4 z nesprávnych odpovedí dominujú tie, v ktorých prevláda tipovanie a nevedenie si platnosti určitých zákonov, postupov. Zjavne ich prijali na hodinách chémie ako nemiace sa fakty. Snáď by ich, v lepšom prípade, dokázali za pomoci učiteľa sformulovať, no ich aplikácia na konkrétnu situáciu je už nad ich sily. Študenti si ešte celkom neosvojili symboliku, zavádzanú na lepšie pochopenie mikroskopickej podstaty chemických látok. Pri riešení tohto typu je hlavným predpokladom úspechu porozumenie znázorneniu (typ 2.1). Grafické zobrazenie môže reprezentovať atómy, molekuly, ióny. Študent sa musí zamyslieť nad tým, či je potrebné všimnúť si ich počet, poradie, veľkosť, atď.

Graficky sme znázornili (obr. 12), koľko študentov neriešilo jednotlivé typy úloh. Najviac respondentov sa vyhlo riešeniu úloh týkajúcich sa znázornenia chemických reakcií v oboch formách zadania. V prípade grafickej



Obr. 12. Prehľad o počte respondentov, ktorí nezodpovedali jednotlivé typy ÚDVP (v percentách); □ grafické, ■ slovné

interpretácie sa s týmto prístupom stotožnilo 18,03 % z nich. Vo všeobecnosti prevažuje názor, že ak študenti majú možnosť vybrať si odpoveď, oveľa častejšie volia odpovede aj za cenu nesprávneho tipu, ako by sa rozhodli na otázku neodpovedať. Častejšie ignorujú graficky prezentovanú úlohu ako slovné zadanú. Nevyskytla sa taká položka testu, ktorú by vyriešili všetci, či už správne alebo nesprávne. Najviac študentov nezodpovedalo otázku č. 4, ktorá sa týkala určenia štruktúry produktu chemickej reakcie. Zjavne im spôsobuje problémy pochopenie symbolického znázornenia, ale aj slovného opisu reagujúcich látok a následne jednoznačný výber produktu.

## 5. Záver

Ukazuje sa, že vizuálna gramotnosť našich študentov nie je rozvinutá na dostatočnej úrovni. Malý rozdiel vyplývajúci z porovnania ich celkovej úspešnosti v dvoch druhoch zadania učebných úloh naznačuje, že určujúcim faktorom sa nestáva jeho forma, ale pochopenie obsahu učiva. Jeho zvládnutie je základným predpokladom pre ďalšiu aplikáciu získaných poznatkov. Majúc na zreteli aj čiastkové výsledky výskumu, za úvahu by stálo, zamyslieť sa nad tým, ktoré učebné úlohy je vhodné žiakom sprostredkovať v grafickej forme a ktoré bude lepšie predložiť im v tradičnej slovnéj podobe. Ideálne by bolo, keby mal učiteľ možnosť výberu.

Použitie grafických prvkov sprevádzaných slovným popisom danej situácie v učebných úlohách nachádzame pomerne často. Zvykli sme si vnímať ich predovšetkým ako doplnenie informácií uvedených v texte. Z tohto dôvodu im častokrát nevenujeme primeranú pozornosť. Ak sú však vizualizačné prvky nositeľom podstatnej informácie (faktu, skutočnosti) a žiadny slovný komentár nás nenavádza na to, čo je potrebné a nevyhnutné si na obrázku všimnúť, v tom prípade nám i našim žiakom môže takéto prezentovanie informácie spôsobovať problémy. Zavádzanie učebných úloh z chémie s dominanciou vizualizačných prvkov do učebníc, zbierok úloh, ich zaradovanie na hodiny chémie by mohlo predstavovať východisko z tejto situácie.

Spomínaný typ učebných úloh ponúka možnosť zlep-

šiť vizuálnu gramotnosť našich študentov. Mohli by prispieť k hlbšiemu porozumeniu danej skutočnosti, k rozvoju názornosti, k pochopeniu javov v širších súvislostiach. Umožňujú prístup k danej situácii z iného uhla pohľadu. Mohlo by sa zdať, že znázornením sa daná situácia príliš skonkretizuje a nadobudne presne vymedzenú podobu. Nie je to celkom pravda, hoci musíme súhlasiť, že do istej miery disponuje obmedzujúcimi črtami. Takmer každý grafický komponent však v sebe nepochybne nesie aj určitý podiel možností ďalšieho prepracovania a rozvíja predstavivosť riešiteľa. V našich úlohách by sme skôr chceli vyzdvihnúť jeho usmerňujúcu funkciu a nie prílišnú konkretizáciu.

V každom prípade bude potrebné zamyslieť sa nad tým, ako naučiť našich žiakov „vidieť“ nielen v bežnej chápanom a prijímanom význame, ale aj v zmysle vnímať, pochopiť, porozumieť a skutočne VIDIEŤ do veci, javu, vlastnosti daného predmetu. Je to dôležitá práve v období, keď prijímame oveľa väčšie množstvo informácií v grafickej, ikonickej podobe v porovnaní s minulosťou.

*Príspevok vznikol v súvislosti s riešením projektov VEGA 1/0030/03 „Spätná väzba ako prostriedok vyučovania prírodovedných predmetov“ a Grantu UK č. 245/2004 „Mikrovyučovanie a jeho podpora technickými prostriedkami v príprave budúcich učiteľov chémie“.*

## LITERATÚRA

1. FILIT – otvorená filozofická encyklopédia. <http://dent.ii.fmph.uniba.sk/~filit/fvg/gramotnost.html>, stiahnuté 24. mája 2004.
2. Malíková M., Kormošová M., Ďuračková, B.: *Plurilingvizmus – súčasť funkčnej gramotnosti pre 21. storočie*. <http://www.institut.ukf.sk/PLURILINGVIZMUS%20-%20M.%20Ma1%EDkov%E1.doc>, stiahnuté 24. mája 2004.
3. Štátny pedagogický ústav: *4 domény skúšky PISA*. <http://www.statpedu.sk/Projekty/PISA/ulohy.htm>, stiahnuté 24. mája 2004.
4. Klínek P.: *Podpora gramotnosti: výzva pre knižnice*. <http://www.sakba.sk/bulletin/2003/bull4/cl12.html>, stiahnuté 24. mája 2004.
5. Gavora P., Mareš J.: *Anglicko - slovenský pedagogický slovník (English-Slovak educational dictionary)*. IRIS, Bratislava 1996.
6. Pintel S.: *The On-Line Visual Literacy Project* <http://www.pomona.edu/Academics/courserelated/classprojects/Visual-lit/intro/intro.html>, stiahnuté 24. mája 2004.
7. Čtrnáctová H.: *Pedagogika* 42, 138 (1997).
8. Čtrnáctová H.: *Biológia, ekológia, chémia* 2, 4 (1997).
9. Nurrenbern S., Robinson W. R.: *Conceptual Questions and challenge Problems*, <http://jchemed.chem.wisc.edu/JCEWWW/Features/CQandChP/index.html>, stiahnuté 10. júla 2003.
10. Mulford D. R., Robinson W. R.: *J. Chem. Educ.* 6, 79 (2002).
11. Lin Huann-shyang.: *J. Chem. Educ.* 10, 75 (1998).

**Z. Haláková and M. Prokša** (*Department of Didactics, Natural Sciences, Psychology and Pedagogy, Faculty of Science, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Visual Literacy and Solving Conceptual Questions in Chemistry**

Visual literacy includes picture reading and understanding graphical elements. To enhance visual literacy of students we aimed at conceiving chemical problems with visualization elements and graphical assignment. The preparedness of students for solving such types of problems is discussed.

## CHEMICKÝ PRŮMYSL

### ČESKÁ TECHNOLOGICKÁ PLATFORMA PRO UDRŽITELNOU CHEMIÍ

IRENA VODIČKOVÁ a MARTIN ŠILHAN

Svaz chemického průmyslu ČR, Dělnická 12, 170 04 Praha 7  
mail@schp.cz

V prosinci 2005 byla ustavena Česká národní technologická platforma pro udržitelnou chemii (SusChem ČR). Úkolem SusChem ČR je podpora aktivit a iniciativ organizací působících ve prospěch rozvoje chemie a chemického průmyslu v České republice a s tím spojených vědeckých, výzkumných, technologických a inovačních aktivit.

Základními cíli SusChem ČR jsou:

1. Zvyšování konkurenceschopnosti českého chemického průmyslu v České republice.
2. Na základě iniciování a provádění vědecko-technických výzkumů a komerčního využití vědeckých řešení vytváření mostu mezi vědou, výzkumem a průmyslem v oblasti chemie.
3. Propagace inovačních aktivit a vědecko-technického rozvoje v chemickém průmyslu.
4. Zapojení České republiky do realizace hlavních činností Evropské technologické platformy pro udržitelnou chemii následujícími způsoby:
  - zpracování vize rozvoje sektoru,
  - vypracování programu strategického výzkumu,
  - iniciování a provádění vědecko-technických výzkumů,
  - tvorba strategie pro rozvoj moderních chemických technologií,
  - spolupráce při vytváření politiky a právních předpisů sloužících k povzbuzení inovačních aktivit.

Přehled aktivit spojených s oblastmi výzkumu je ob-

sahem dokumentů zpracovaných Evropskou technologickou platformou pro udržitelnou chemii (European Technology Platform for Sustainable Chemistry) „The vision for 2025 and beyond“ a „Strategic Research Agenda“. Dotýkají se oblastí průmyslové biotechnologie, technologie materiálů, nových typů reakcí a procesů a dále horizontálních záležitostí jako jsou společenské otázky v oblastech podpory veřejného dialogu o technologiích pro udržitelnou chemii, strategie vyhodnocení rizik a jejich řízení, spolupráce s ostatními technologickými platformami na společných problémech, podpory inovací, motivace a vzdělávání mladých nadaných osob, rozvoje dovedností potřebných pro chemický průmysl nebo změny „image“ chemického průmyslu.

SusChem ČR byla založena 12 subjekty: společnost AGROFERT Holding, a.s., BorsodChem MCHZ, s.r.o., České technologické centrum pro anorganické pigmenty, a.s., Hexion Specialty Chemicals, a.s., Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Svaz chemického průmyslu České republiky, Technologické centrum Akademie věd České republiky, Ústav chemických procesů AV ČR a.s., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Výzkumný ústav anorganické chemie, a.s., Výzkumný ústav organických syntéz, a.s. a Zentiva, a.s. V další fázi se k iniciativě SusChem ČR připojily společnosti Ekora, s.r.o., Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice a Linde Technoplyn, a.s.

Prvním z úkolů zúčastněných je vytvoření Stanov SusChem ČR a zvolení jeho orgánů. Předpokládá se, že SusChem ČR bude organizačně napojen na sekretariát Svazu chemického průmyslu České republiky. Dalším úkolem bude pro SusChem ČR příprava na využití prostředků 6. a 7. rámcového programu EU pro český chemický výzkum a podporu propojení s evropskými subjekty.

Česká technologická platforma pro udržitelnou chemii má otevřený charakter. Do platformy mohou vstoupit noví členové tím, že podepíší Deklaraci o ustavení platformy a současného projevení souhlasu stávajících členů Deklarace.

---

## NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

---

### DOPORUČENÍ IUPAC

#### Explanatory Dictionary of Key Terms in Toxicology

The objective of the Explanatory Dictionary of Concepts in Toxicology is to give full explanations of the meaning of toxicological terms chosen for their importance and complexity from the point of merging chemistry and toxicology. This requires a full description of the underlying concepts, going beyond a normal dictionary definition. Often linguistic barriers lead to problems in obtaining a common understanding of terminology at international level and between disciplines. The explanatory definitions should help to break down such barriers. The dictionary consists of about 68 terms chosen from the IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicokinetics (*Pure Appl. Chem.* 76(5), 1033–1082, 2004) organized under 22 main headings. The authors hope that among the groups which will find this explanatory dictionary helpful are chemists, pharmacologists, toxicologists, risk assessors, regulators, medical practitioners, regulatory authorities, and everyone with an interest in the relationship of chemistry to toxicology. It should also facilitate the use of chemistry in relation to risk assessment. Thus, it is expected that there will be a wide audience for this document.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu z oboru toxikologie, který byl připraven divizí IUPAC pro chemii a lidské zdraví. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR  
Heyrovského nám. 2  
162 06 Praha 6  
tel. 296 809 322, fax 296 809 410  
e-mail kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese <http://www.iupac.org/reports/provisional/index.html>  
Připomínky k návrhu je třeba zaslat do 31. května 2006 na adresu:

Prof. M. Nordberg  
Institute of Environmental Medicine  
Karolinska Institutet  
SE-171 77 Stockholm  
Švédsko  
E-mail: monica.nordberg@imm.ki.se

#### Glossary of Terms Relating to Pesticides

The glossary contains definitions of more than 500 terms frequently used in relation to the chemistry, mode of action, regulation and use of pesticides. A wide range of disciplines are involved in this field and the glossary was developed as a step in facilitating communication between researchers, government regulatory authorities and chemists in associated professional areas. The range of terms relates to pesticide residue analysis, sampling for analysis, good laboratory practice, metabolism, environmental fate, effects on ecosystems, computer simulation models, toxicology and risk assessment. The number of important, 'pesticide related' terms has more than doubled since 1996, when the first IUPAC glossary of this type was developed (*Pure Appl. Chem.* 68(5), 1167–1193, 1996), an indication of how this field has become so integrated with many other scientific and regulatory disciplines.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu z oboru pesticidů, který byl připraven divizí IUPAC pro chemii a životní prostředí. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR  
Heyrovského nám. 2  
162 06 Praha 6  
tel. 296 809 322, fax 296 809 410  
e-mail kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese <http://www.iupac.org/reports/provisional/index.html>  
Připomínky k návrhu je třeba zaslat do 31. května 2006 na adresu:

Prof. Gerald R. Stephenson  
University of Guelph  
Department of Environmental Biology  
Guelph, ON N1G 2W1  
Kanada  
E-mail: gerry.stephenson@rogers.com

# Analytica 2006



## **Bilance Analytica 2006: Místo srazu pro evropskou analytiku, biotechnologie a laboratoř**

Analytica 2006 potvrzuje svým dvacátým jubileem přesvědčivým způsobem svoji pozici evropského vůdčího veletrhu pro řešení kolem laboratoří v průmyslu a výzkumu: S množstvím mezinárodních vystavovatelů a prezencí globálních lídrů trhu představuje největší celosvětově největší informační platformu svého oboru. Analytica 2006 ukazuje aktuální trendy a produkty pro analytiku, kontrolu jakosti a laboratorní techniku, jakož i biotechnologie a Life Sciences v celé tematické šířce a hloubce. Mezinárodní význam veletrhu bude posílen také pořádáním Analytica Conference, již se letos poprvé účastní Evropská asociace chemických a molekulárních věd.

Analytica je v roce 2006 opět místem srazu mezinárodních laboratorních oborů. Vedle již tradičních společných stánků z USA a Velké Británie budou letos poprvé na veletrhu také společné účasti z Ruska a Austrálie. Se svými zařízeními a systémy pro laboratoř z hlediska obchodu i vědy přicházejí vystavovatelé do Mnichova ze zámoří, jako např. z Kanady, z Izraele, Indie, Japonska, Korey, Singapuru, Tchaj-wanu, Číny a Nového Zélandu aj. Ale i evropský průmysl analytiky, laboratorní techniky a biotechnologií je na veletrhu silně zastoupen - prezentují se společnosti z Belgie, Dánska, Francie, Velké Británie, Irsku, Itálie, Lichtenštejnska, Lucemburska, Nizozemí, Rakouska, Švédska, Švýcarska a Španělska. Vedle společné expozice České republiky se na veletrhu Analytica můžete setkat z vystavovateli z Polska a Turecka. Samozřejmě že obor na veletrhu zastupují také četné německé podniky. Analytica je tímto celosvětově největší veletržní platformou pro toto segment trhu se spádovým okruhem návštěvníků pro celou Evropu.

Analytica 2006 přesvědčí ovšem nejen internacionalitou vystavovatelů, ale i prezencí lídrů trhu. V oboru laboratorní techniky informují o svých nejnovějších produktech a inovacích pro efektivnější a ekonomičtější provoz laboratoří mezi jinými hráči jako EMCLAB, Eppendorf, Miele & Cie., Millipore, Peter Huber chladič zařízení, Retsch, Sarstedt, Tecan, VWR International a Zinsser Analytic. V segmentech analytiky a kontroly jakosti zvou odborné publikum k návštěvě např. Bruins Instruments, Carl Zeiss Jena, Dionex, Deutsche Metrohm, Leica Microsysteme, Mettler-Toledo, Nikon, Olympus, Schleicher & Schuell, Shimadzu, Thermo Electron, Waters a Varian, aby se osobně informovali o nejnovějším dění v odvětvích instrumentální analytiky, spektroskopie, chromatografie a mikroskopie.

Celá jedna hala pro biotechnologie a Life Sciences

Biotechnologie a Life Sciences jsou vedle laboratorní techniky a analytiky třetím tematickým těžištěm veletrhu, který již několik rok vykazuje rostoucí tendenci.

Na 20. ročníku veletrhu Analytica je oběma těmto oborům budoucnosti vyhrazena celá jedna výstavní hala.

Podrobné informace, zlevněné předprodejní vstupenky, ubytování, zájezd na veletrh: Oficiální zastoupení pořadatele pro ČR a SR, Expo-Consult+Service spol s r.o., Příkop 4, 604 45 Brno, tel. 545 176 158, fax 545 176 159, [info@expocs.cz](mailto:info@expocs.cz), [www.expocs.cz](http://www.expocs.cz)

Asociace českých chemických společností  
a Asociácia slovenských chemických  
a farmaceutických spoločností  
*ve spolupráci se spoločnosť*

Spolek pro chemickou a hutní výrobu a.s.

a

Univerzitou J. E. Purkyně v Ústí nad Labem  
*pořádají*

## 58. Sjezd chemických společností

4.–8. září 2006, Ústí nad Labem



### Odborný program proběhne v následujících sekcích:

1. Analytická a fyzikální chemie
2. Anorganická a materiálová chemie
3. Organická a farmaceutická chemie
4. Petrochemie a polymery
5. Výuka, informatika a historie chemie
6. Chemie životního prostředí
7. Chemie potravin a biotechnologie
8. Průmyslová chemie – CHEMPROGRESS

Plenární příspěvky dosud potvrdili následující přednášející:  
C. Näther (Heyrovského-Ilkovičova-Nernstova přednáška)  
J. Moravcová (Šantavého přednáška)

Přednášky k 80. narozeninám doc. K. Bláhy:  
J. Vičar, P. Maloň, M. Flegel

VIP přednášky:

P. Zuman, F. Tureček, V. Větvička, V. Křen, V. M. Král,  
J. B. Šmidrkal

Hlavní přednášky v příslušných sekcích:

M. Navrátil, D. Berek, S. Schmidt, P. Kutschy, P. Szolcsányi,  
K. Jesenak, K. Florián, P. Silny, M. Remko.

### Temíny:

Přihlášení příspěvků (vč. krátkého abstraktu)	28.2.2006
Oznámení o přijetí	13.3.2006
Druhý oběžník na webu	18.3.2006
Registrace za standardní poplatek	30.4.2006
Zaslání abstraktu pro sborník	15.5.2006

Sjezd se koná v Ústí nad Labem, významném středisku českého chemického průmyslu v roce, kdy Spolek pro chemickou a hutní výrobu, a.s., oslaví 150. výročí svého založení. Koná se také v roce, kdy časopis České společnosti chemické, „Chemické listy“, vydají svůj řádný stý ročník. A v neposlední řadě je konání sjezdu v Ústí n. L. i reflexí toho, že na Univerzitě Jana Evangelisty Purkyně byla nově zřízena Přírodovědecká fakulta, teprve druhá v Čechách, a byla tak posílena i pozice chemických oborů v regionu.

**Kontakt pro zaregistrované účastníky:** [info@orgit.cz](mailto:info@orgit.cz)

**Adresa pro písemný styk:** Česká společnost chemická,  
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1

**Další informace na adrese:** <http://www.sci.ujep.cz/sjezd>

Účastnický poplatek bude nabídnut jako kompletní balíček pokrývající následující výdaje:

- organizační náklady
- veškerou stravu a občerstvení během sjezdu
- ubytování

Vstup na všechny společenské akce bude pro účastníky a doprovázející osoby volný.

Předběžně byl účastnický poplatek stanoven na 5000 CZK. Pro účastníky bez nároku na ubytování bude balíček v ceně cca 3500 CZK.

## OBSAH

ÚVODNÍK	161
<b>REFERÁTY</b>	
<b>On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze</b>	163
J. Horáková, V. Maier a J. Ševčík	
<b>Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva</b>	169
K. Lang, J. Mosinger a D. M. Wagnerová	
<b>Vybrané metody modifikace povrchů biosenzorů pro imobilizaci proteinů</b>	178
R. Kotlín a J. E. Dyr	
<b>Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství</b>	184
M. Karabín, P. Dostálek a P. Hofta	
<b>CENA MERCK</b>	190
<b>Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze</b>	191
M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, J. Havel a J. Preisler	
<b>Rozlišení izomerů hmotnostní spektrometrií s využitím kinetické metody</b>	196
V. Ranc, P. Fryčák, L. Müller, P. Bednář a K. Lemr	
<b>Studium procesů interakce laserového záření se vzorky skel a zemědělských půd pomocí spektroskopie laserem indukovaného mikroplazmatu a optické emisní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu</b>	204
M. Galiová, V. Možná, A. Staňková, K. Novotný a V. Kanický	
<b>NMR studie interakce derivátů distamycinu s DNA</b>	210
J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Valík, L. Palivec a V. Král	
<b>VÝUKA CHEMIE</b>	
<b>Vizuální gramotnost' a řešení učebních úloh z chemie</b>	213
Z. Haláková a M. Prokša	
<b>CHEMICKÝ PRŮMYSL</b>	220
<b>NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE</b>	221

## CONTENTS

<b>EDITORIAL</b>	161
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>On-line Preconcentration Techniques in Capillary Electrophoresis</b>	163
J. Horáková, V. Maier, and J. Ševčík	
<b>Singlet Oxygen in Practice – Present State and Prospects</b>	169
K. Lang, J. Mosinger, and D. M. Wagnerová	
<b>Selected Methods of Modification of Biosensor Surfaces for Protein Immobilization</b>	178
R. Kotlín and J. E. Dyr	
<b>Application of Methods for Estimation of Antioxidant Activity in Brewing</b>	184
M. Karabín, P. Dostálek, and P. Hofta	
<b>MERCK PRIZE</b>	190
<b>Derivatization of Amino Acids, Peptides and Proteins for Laser-Induced Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis</b>	191
M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, J. Havel, and J. Preisler	
<b>Recognition of Isomers by Mass Spectrometry Using the Kinetic Method</b>	196
V. Ranc, P. Fryčák, L. Müller, P. Bednář, and K. Lemr	
<b>Study of Laser - Sample Interactions of Glasses and Soils Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Optical Emission Spectroscopy with Inductively Coupled Plasma</b>	204
M. Galiová, V. Možná, A. Staňková, K. Novotný, and V. Kanický	
<b>Interaction of Novel Dimeric Distamycin Derivatives with DNA: NMR Study</b>	210
J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Valík, L. Palivec, and V. Král	
<b>EDUCATION IN CHEMISTRY</b>	
<b>Visual Literacy and Solving Conceptual Questions in Chemistry</b>	213
Z. Haláková and M. Prokša	
<b>CHEMICAL INDUSTRY</b>	220
<b>NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY</b>	221

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 100 (2006), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 130, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 116 • 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. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvicka (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • 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. Mišek, 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, simanek@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 © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně 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 21.2.2006.