

Postavení národních chemických společností v Evropě

Ve dnech 5.–6. října se sešli v Rimini zástupci 30 národních chemických společností sdružených ve Federaci evropských chemických společností (FECS). Hlavním bodem tohoto reprezentativního shromáždění byla diskuse o postavení národních chemických společností v legislativně a ekonomicky se sjednocující Evropě, o úloze učených společností ve vytváření standardů ve výuce a vědecké výchově v chemii a o etickém kodexu chemika.

Jaké je současné postavení FECS? Federace je organizačně volným seskupením 56 národních chemických a odborných společností téměř ze všech evropských zemí a Izraele s výjimkou Srbské chemické společnosti. Informace o Federaci jsou na webových stránkách Královské chemické společnosti (UK) <http://www.chemsoc.org/fecs>. O letošním setkání prezidentů evropských chemických společností a generálním shromáždění delegátů FECS se lze dočíst na adrese <http://www.chemsoc.org/networks/ENC/fecs/fecsrimini.htm>. Členské organizace neplatí zatím žádný příspěvek. Náklady na činnost FECS jsou hrazeny většinou ze zdrojů Královské chemické společnosti a Německé chemické společnosti. Komunikace mezi exekutivou FECS (7 členů) a jednotlivými národními společnostmi je často jednostranná bez zpětné reakce oslovených. Pravidelného generálního shromáždění delegátů, pořádaného jednou ročně, vždy v jiné evropské zemi se účastní mezi 25–30 delegáty. Slabou stránkou Federace, v dnes již informačně propojené Evropě, je absence efektivní výměny informací a kvalita komunikace. Rada členských společností FECS stále nemá své vlastní webové stránky a prostor jim nabízí na svých stránkách Královská chemická společnost. Není proto překvapující, že hlavním tématem setkání v Rimini byla diskuse o změnách v organizační struktuře, které by vedly ke zvýšení účinnosti aktivit FECS či její přeměně na jinou strukturu. Na shromáždění dominovaly dva názorové proudy. První reprezentoval příspěvek Gerharda Erker, prezidenta Německé chemické společnosti, ve kterém byl kladen důraz na uvědomění si evropské sounáležitosti členů národních chemických společností. Prvním krokem by mělo být vytvoření centrální báze dat, aby jednotlivci byli informováni přímo, bez informačních uzlů národních společností. Taková informační síť by racionalizovala práci Federace a vedla by k získávání informací bez jakéhokoliv zpoždění. Jako další zlepšení dosavadní struktury bylo navrženo organizování pan-evropských konferencí (nejméně čtyři národní společnosti), které by byly finančně podpořeny ze zdrojů Evropské unie a měly by dát především příležitost k větší účasti mladým chemikům a tím nepřímo přispívat ke zvýšení mobility odborníků v evropském prostoru. Dosavadní snahy Německé chemické společnosti na tomto poli jsou úspěšné a navazují na již pět let probíhající úsilí vytvořit pro jednotlivé chemické obory evropská informační média, schopná konkurence vědeckým časopisům vydávaným Americkou chemickou společností. ČSCH se na těch-

to aktivitách podílí. Zástupci členů FECS ze zemí mimo Evropskou unii své názory vyslovili prostřednictvím A. Kálmána, prezidenta Maďarské chemické společnosti. Současná struktura FECS, byť není zcela funkční, by měla zatím zůstat zachována. To, že dosud téměř všechny činnosti FECS jsou finančně kryty ze zdrojů dvou ekonomicky silných společností, není dobré. U členů malých národních chemických společností to vyvolává legitimní pocit méněcennosti. Tomu lze předejít zavedením členského poplatku, např. jeden euro za člena. Individuální členství je vhodné pro celoevropské odborné společnosti nikoliv však pro členy národních společností. Národní společnosti mají svůj význam nejen v organizování odborných aktivit svých členů, ale plní i důležité osvětové, výchovné a legislativní poslání, přispívají k vytváření dobrého pohledu na chemii ve své vlastní zemi. Tuto funkci mají i odborné časopisy vydávané jednotlivými společnostmi v národním jazyce a jsou prozatím nenahraditelné pro všeobecnou informovanost odborné veřejnosti v dané zemi.

Současný vývoj směřuje k všeobecné dostupnosti informací na internetových stránkách, komunikace mezi jednotlivci a organizací se stále více odehrává elektronickou formou. Podle mého názoru by si národní chemické společnosti měly stále ještě zachovat svou individuální tvář. Některé jejich funkce lze prozatím těžko nahradit společnou Evropskou chemickou společností. Je realitou, že v globální ekonomice a při existenci světové informační sítě, má konkurenční schopnost vůči severoamerickému a asijskému trhu pouze sjednocená Evropa. Národní chemické společnosti organizované ve funkční struktuře mohou plnit řadu konkrétních úkolů, které není možné organizačně a technicky zvládnout z jednoho centra. Otázka národní identity může jistě být předmětem mnoha dalších úvah. Česká společnost chemická patří mezi aktivní členy FECS. Její delegáti se podílejí na práci dalších evropských struktur jako například AllChem (<http://www.allchem.org>). Osobně to považují za dobrou cestu jak postupně směřovat k takové struktuře, která spojí evropské chemiky. Nyní několik slov ke končícímu kalendářnímu roku. Mezi cíle, které si ČSCH dala na začátku roku a byly naplněny, patří nesporně přijetí nových stanov České společnosti chemické a vstup ČSCH do struktury Českého svazu vědeckotechnických společností, rozšíření Asociace českých chemických společností o Národní komitét pro chemii, další rozšíření spektra publikační aktivity Chemických listů a udělení tří cen ČSCH (A. Badera, společnost MERCK a SHIMADZU). Za neúspěch považují odřeknuté konání 33. mezinárodní chemické olympiády v roce 2001 v České republice, byť se na této akci ČSCH přímo nepodílela.

Jsem přesvědčen, že naše Společnost v tomto roce opět pokročila směrem k moderní profesní organizaci chemiků, respektované jak v naší zemi, tak i v Evropě.

Vilím Šimánek

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ ALKALOIDŮ MORFINOVÉ ŘADY

JIŘÍ VOLKE a VĚRA VOLKEOVÁ

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo dne 2.IX.1999

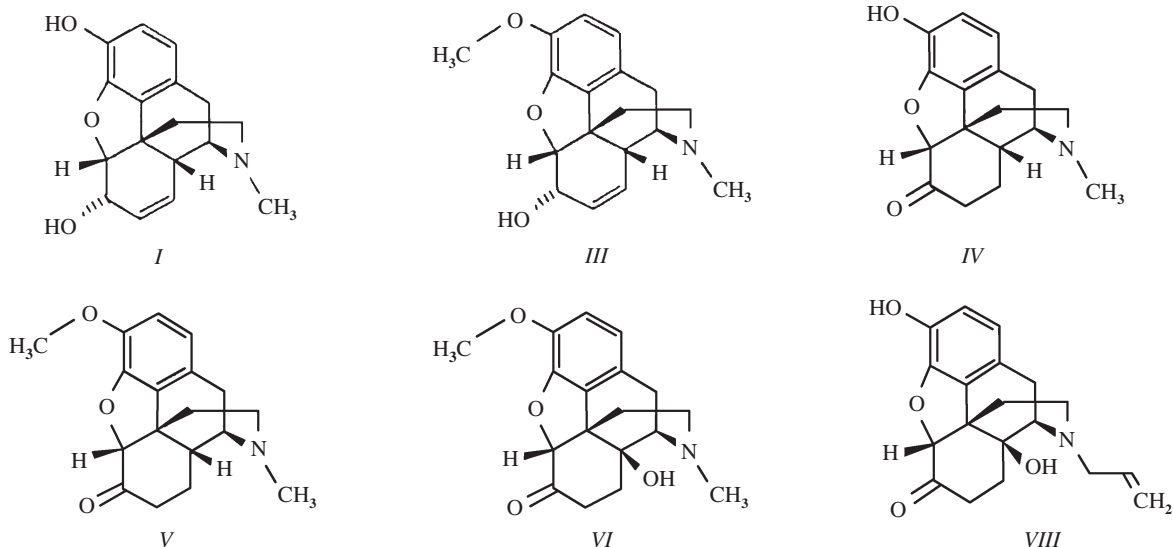
Klíčová slova: morfin, heroin, oxidační deriváty morfinu a kodeinu, apomorfín, elektroanalýza

Obsah

1. Úvod
2. Farmakologické vlastnosti
3. Polarografické a voltametrické chování morfinu a podobných látek
4. Nepřímá stanovení v morfinové řadě
5. Elektroredukovatelné deriváty morfinu a kodeinu
6. Elektrochemický výzkum apomorfínu
7. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích dochází i u nás ke zneužívání omamných drog, zvláště látek získávaných z opia a je nutno bojovat proti jejich ilegálnímu dovozu a pašování a především proti jejich zneužívání občany. Při řešení těchto úkolů se uplatňuje i elektrochemie, jak preparativní (při přípravě nových derivátů) tak i analytická (poznání jejich redoxních vlastností, adsorptivity a k jejich specifickému stanovení v různých prostředích).



2. Farmakologické vlastnosti

Nejvýznamnější mezi morfinovými alkaloidy jsou na jedné straně morfin (*I*), heroin (*II*) a kodein (*III*), u nichž je zachována původní struktura, na druhé straně oxidační produkty, jako je hydromorfon (*IV*), hydrokodon (*V*), oxykodon (*VI*), případně i meziprodukt takových reakcí, kodeinon (*VII*). Základní látka, morfin, se získává z opia, produktu mléčné šťávy nezralých makovic máku setého, tj. rostlin druhu *Papaver somniferum*.

Při častém dávkování morfinu v malých dávkách lze snadno udržovat analgetické účinky. Takové časté dávkování je ale na obtíž, nelze se mu však vyhnout podáváním velkých dávek v delších intervalech, které způsobí jednak přesahy do oblasti otravy, jednak však i časové úseky, kdy je koncentrace v plazmě tak nízká, že dojde ke ztrátě analgetického účinku. I když se potřebných hladin u morfinu dosáhne poměrně snadno perorálně i injekcemi, nelze tzv. enkefaliny vznikající v těle podávat perorálně, i kdyby byly vyizolovány. V tom se podstatně liší od látek, jako je i syntetický 1-methadon, který se používá jako substituční látka při léčení morfinových či heroinových závislostí. Tato situace svědčí tedy pro význam metod, jež umožňují stanovení opioidů, kupř. v plazmě, ale i ve výchozích lékových formách ve farmaceutickém průmyslu a v lékařské i laboratorní praxi.

3. Polarografické a voltametrické chování morfinu a podobných látek

Od počátků polarografie bylo zkoumáno dc-polarografické chování morfinových alkaloidů, zvláště morfinu (*I*) a kodeinu (*III*). Bylo zjištěno¹ a později potvrzeno v sérii Kirkpatrickových prací², že se tyto dvě sloučeniny neredukují

na rtuťové kapkové elektrodě a že redukční vlny, které tu byly pozorovány u negativnějších potenciálů a jejichž výška klesá s rostoucím pH ve formě disociační křivky, je nutno připsat katalytické redukci vodíkových iontů. Dusíkatá látka se adsorbuje na povrchu rtuťové kapky, kde vzniká addukt s protonem. Tento děj je následován vlastní elektrochemickou reakcí, v níž se redukuje proton na vodík a regeneruje se báze alkaloidu. Heterogenní průběh sice způsobuje značnou citlivost i při dc-polarografii ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ jako dolní mez detekce), avšak má za následek nespecifičnost a negativní vliv dalších surfaktantů, tj. téměř všech dalších organických látek.

Vzhledem k neredukovatelnosti většiny morfinových alkaloidů na různých typech elektrod byly zkoušeny různými skupinami anodické oxidace obou základních sloučenin. Slovenští chemici³ vypracovali pro morfin po extrakci z makovic metodu založenou na oxidaci na platinové elektrodě. Morfin dává dvouelektronovou anodickou vlnu jak na grafitové, tak i na platinové elektrodě. Limitní proud i hodnota oxidačního potenciálu ve voltametii jsou funkcí hodnoty pH základního roztoku. Nejlépe definované vlny vznikají na grafitové elektrodě při pH 11,5; při práci s platinovou elektrodou je výhodnější základní roztok 0,2 M-KOH. Vzhledem k poměrně vysokému teplotnímu koeficientu limitního proudu je zapotřebí udržovat konstantní teplotu roztoku. Lineární koncentrační oblast, v níž lze pracovat při analýze kupř. surového morfinu, morfinu v lékových formách, ale hlavně morfinu po jeho kyselém extrakci z makovic do ethanolu, je mezi 10^{-5} až $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Mechanismus oxidace byl sice navržen velmi podrobně, nebyl však preparativně potvrzen: má probíhat přes pseudomorfin a dochází při něm k otevření kyslíkového můstku. Podmínkou elektrochemické oxidovatelnosti má být přítomnost volné fenolické skupiny. V celé řadě látek byla oxidovatelnost zjištěna jen u morfinu a pseudomorfinu, o ostatních látkách se publikace nezmiňuje.

Soustavněji byly tyto alkaloidy prozkoumány při oxidaci na stacionárních i rotujících elektrodách z platiny a skelného uhlíku v pracích Bishopa a Husseina⁴. Podle nich se kodein ve velmi dobře definované anodické vlně oxiduje na platinové a zlaté rotující elektrodě za výměny 4 elektronů, jak prokázala i coulometrie. Půlvolný potenciál anodické vlny leží u 1,25 V pro platinu a je asi o 30 mV pozitivnější na zlaté elektrodě v základním roztoku 0,1 M-H₂SO₄. V roztocích o vyšším pH se, zvláště u zlaté elektrody, uplatňuje adsorpce, jež vede k deformaci vlny, případně k jejímu vymizení u pH větších než 3 na neaktivované zlaté elektrodě. Analyticky je možno využít tyto anodické děje ke specifickému stanovení v obvyklém rozsahu koncentrací s velice uspokojivou přesností. Dihydrokodein – látka, která je analgeticky asi pětikrát účinnější než kodein – se oxiduje při stejném potenciálu, ale se spotřebou 6 elektronů. Autoři navrhuji – bez izolace produktů – tento mechanismus: v první etapě se dvouelektronově oxiduje alkoholická skupina v poloze 6 na skupinu ketonickou. Za tímto dějem následuje buď oxidace v poloze 9,10 nebo 9,14, ale spíše odštěpení methanolu v methoxylové skupiny v poloze 3 za vzniku příslušného ketonu.

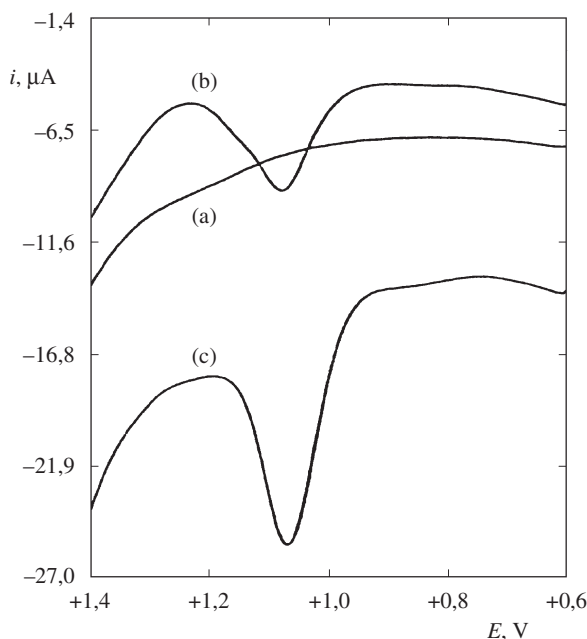
Na anodické oxidaci kodeinu je založeno stanovení⁵ jednak metodou průtokové injekční analýzy (FIA), jednak square-wave voltametrií. Původní měření na elektrodě ze skelného uhlíku byla zdokonalena zavedením chemicky modifikované elektrody ve složení nafion/RuO₂ s tzv. pyrochlorem. Tato

elektroda má značnou selektivitu a zajišťuje zvýšenou citlivost. Spojuje se v ní elektroanalytická aktivita RuO₂ elektrody při přenosu elektronu s prekoncentrační aktivitou nafionu. Square-wave voltamogramy byly registrovány v oblasti pozitivních potenciálů při frekvenci 15 Hz a amplitudě 50 mV. Základní elektrolyt byl ve většině pokusů 0,5 M-HClO₄. Zvýšení citlivosti oproti nemodifikované elektrodě je asi trojnásobné a oxidační potenciál se posune k negativnějším hodnotám. Lineární kalibrační křivka byla získána pro oblast $1 \cdot 10^{-8}$ až $32 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ s detekčním limitem kolem 10 nmol.l^{-1} . Při použití FIA s amperometrickou indikací (tenkovrstvý detektor ze skelného uhlíku) je kalibrační křivka lineární v oblasti $0,5$ až $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a detekční limit je 0,86 ng. Byl sledován vliv doby akumulace na chemicky modifikované elektrodě a pro koncentrace kolem $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ bylo zjištěno, že k nasycení povrchu dochází asi za 15 s. Při nižších koncentracích kodeinu je potřebný čas pochopitelně delší. Vzhledem k protonizované formě kodeinu v kyselém roztoku je vhodný akumulací potenciál spíše 0 V nebo nepatrně negativní. Práce bohužel nepřinesla žádné informace o oxidačním potenciálu a mechanismu oxidace, zvláště ve srovnání s analogickým morfinem. Stanovení kodeinu v lidské plazmě bylo provedeno ve vzorcích získaných od zdravých dobrovolníků a deproteinovaných pomocí 5 M-HClO₄. Kodein byl přidán k horní vrstvě po odstředění. Stanovení lze výhodněji provést voltametricky, kde se neprojevuje interference cizích oxidovatelných látek. Právě tak byly úspěšně analyzovány farmaceutické preparáty obsahující kodein (obr. 1–3).

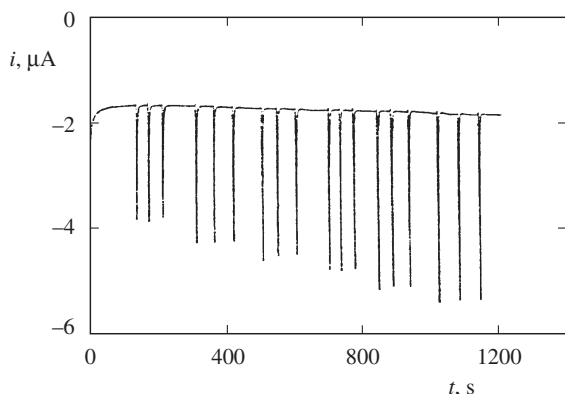
4. Nepřímá stanovení v morfinové řadě

Vzhledem k polarografické inaktivitě morfinu a příbuzných látek byly vypracovány nepřímé postupy stanovení, jež jsou vesměs založeny na reakci, již v roce 1945 zavedl Baggesgaard-Rasmussen⁶. Působením dusitanu sodného v silně kyselém prostředí HCl se látka v roztoku převede na elektroaktivní 2-nitromorfin, který se polarografuje po alkalizaci a dochází tu ke víceelektronové redukci v roztoku NaOH. Původně se předpokládalo, že vznikající produkt je příslušný 2-nitrosomorfin, bylo však prokázáno preparativně⁷, že předřazená chemická reakce vzhledem k přítomnosti fenolické skupiny v poloze 3 poskytuje 2-nitromorfin (VIII), který se rovněž redukuje čtyřelektronově. Se stejným zjištěním přišel autor tohoto článku, avšak s několikaměsíčním zpožděním. Metody není možno použít pro kodein. Nitrační postup byl modifikován pro stanovení nejnebezpečnější látky této řady, tj. heroinu (II). Tato látka^{9–12} se ve své původní, diacetylované formě v roztoku nenitruje. Podmínkou reaktivity je totiž přítomnost volné fenolické skupiny v poloze 3. Po hydrolyze v prostředí silné minerální kyseliny při mírně zvýšené teplotě se tato acetylová skupina kvantitativně odštěpí a pak lze přikročit k nitraci a stanovení heroinu v různých prostředích. Citlivost i přesnost stanovení odpovídá dc-polarografickým kritériím. Touto derivatizační metodou lze stanovit samotný morfin (před hydrolyzou) a morfin ve směsi s heroinem (po kyselém hydrolyze).

O další látce z této řady, N-allylnormorfinu, bylo zjištěno, že navzdory tvrzení některých autorů¹³ není kromě katalytických efektů elektroaktivní a je ho možno stanovit jen po svrchu uvedeném derivatizaci¹⁴ (obr. 4).



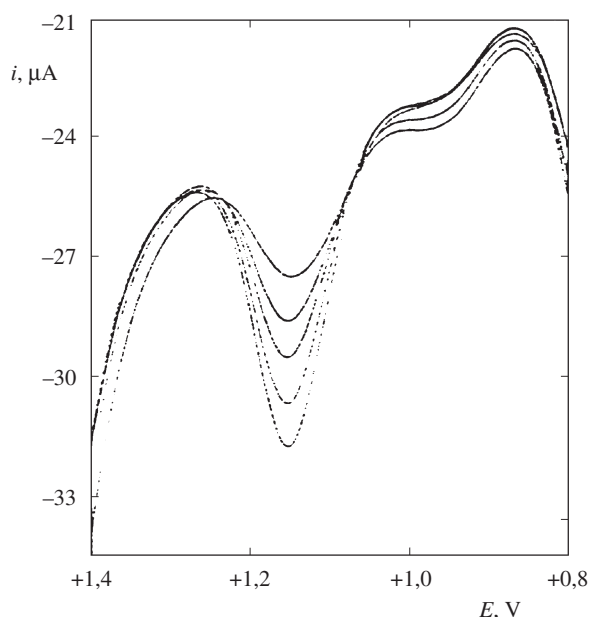
Obr. 1. Square-wave voltamogram 10^{-6} mol.l⁻¹ roztoku kodeinu v 0,05 M-HClO₄ na nemodifikované grafitové a na chemicky modifikované elektrodě; a prázdný základní roztok, b nemodifikovaná elektroda, c modifikovaná elektroda, (nafion/RuO₂pyrochlor na grafitovém povrchu). Amplituda 50 mV, frekvence 15 Hz, potenciálový krok 4 mV



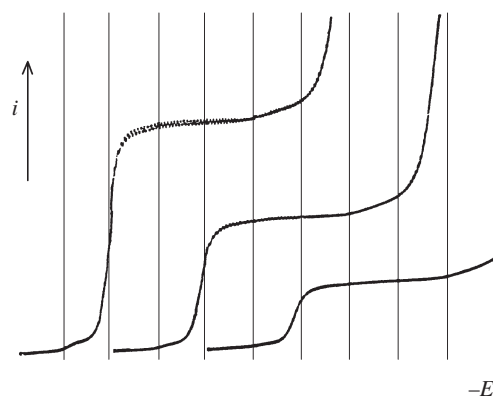
Obr. 3. Kalibrační závislost pro stanovení kodeinu pomocí FIA s amperometrickou indikací s tenkovrstvým GC detektorem ze skelného uhlíku; koncentrace od $5 \cdot 10^{-6}$ do $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ v intervalech po $5 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹

5. Elektroredukovatelné deriváty morfinu a kodeinu

Mezi většinou neredukovatelnými morfinovými a kodeinovými deriváty vytvářejí odlišnou významnou skupinu oxidační produkty morfinu a kodeinu, jako je hydromorfon (IV), hydrokodon (V) a oxykodon (VI). Polarografická aktivita těchto sloučenin je podmíněna přítomností karbonylové skupiny v poloze 6 v konjugaci s kyslíkovým můstkem (v dihydrofuranovém kruhu), případně v konjugaci s dvojnou vazbou u kodeinonu (VII). Redukovatelnost těchto látek přijetím 2



Obr. 2. Square-wave voltamogramy kodeinu v lidské plazmě při použití chemicky modifikované elektrody; koncentrace se zvyšuje v oblasti $1 \cdot 10^{-5}$ až $5 \cdot 10^{-5}$ M v intervalech po $1 \cdot 10^{-5}$ M

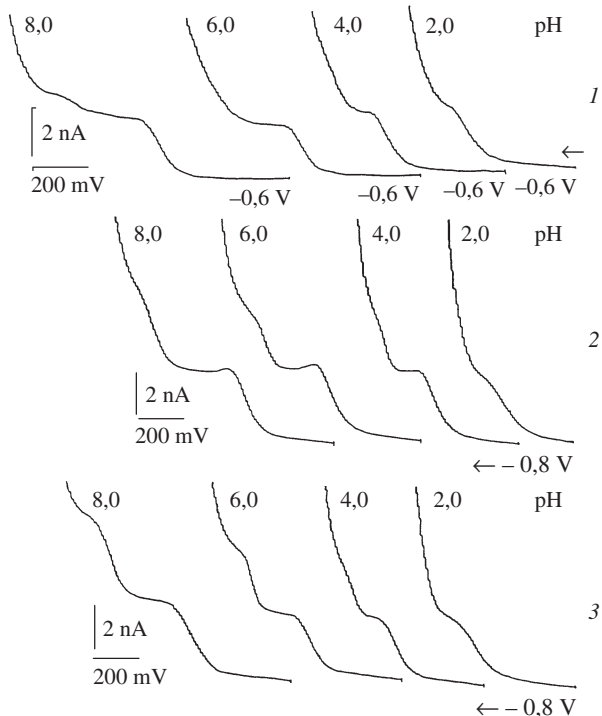


Obr. 4. dc-Polarogram 2-nitro-N-allyl-nor-morfinu; látka byla připravena nitrací dusitanem v kyselém prostředí z N-allyl-nor-morfinu, koncentrace odleva $4 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, $2 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, $1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹, od -0,4 V, redukční vlna u -0,77 V

elektronů v roztocích o pH 2 až 10, případně i alkaličtějších, a možnost výhodného dc- nebo dp-polarografického stanovení na základě dobře definovaných vln či píků je nesporně lákavá (obr. 5). Citlivost lze vylepšit i akumulací na visící rtuťové kapce. Jako prostředí vhodné k analýze se nejlépe osvědčily acetátové a fosfátové purfy o pH do 7, případně i roztoky alkalických hydroxidů. Tato fakta zjistily, nezávisle na sobě, s výjimkou naloxonu, dvě české pracovní skupiny¹⁵⁻¹⁷. Srovnáním polarografického chování těchto látek a jejich struktury se došlo k závěru, že redukce je spíše zasažen etherický můstek než karbonylová skupina v poloze 6.

Teprve v souvislosti se studiem elektrochemické redukovatelnosti^{18,19} naloxonu (VIII), antagonisty všech uvedených látek, který rovněž podléhá dvouelektronové redukci závislé na pH, se překročilo k definitivnímu vysvětlení mechanismu elektrochemické redukce oxidačních produktů morfinu.

Hydromorfon (*IV*), hydrokodon (*V*), oxykodon (*VI*) a naloxon (*VIII*) se redukuje (obr. 5) velice podobným způsobem a to ireverzibilně, jak plyne kupř. z logaritmické analýzy polarografických křivek. Směrnice závislosti $E_{1/2}$ na pH je u všech tří podrobněji zkoumaných látek kolem $-30 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$. Vybraná data jsou v tabulce I. Látky tohoto typu lze považovat za morfinové 6-oxoderiváty. Představu, že u nich dochází k redukci kyslíkového můstku, je nutno potvrdit elektroreparativními a chemickými pokusy. Jako první chemicky redukoval tento můstek Small¹⁸, když nechal reagovat β -isomorfin v ethanolickém prostředí s PtO_2 za vzniku příslušného tetra-



Obr. 5. dc-Polarogramy naloxonu (1), hydromorfonu (2) a hydrokodonu (3) při koncentraci $1.10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na pH Brittonova-Robinsonova pufru

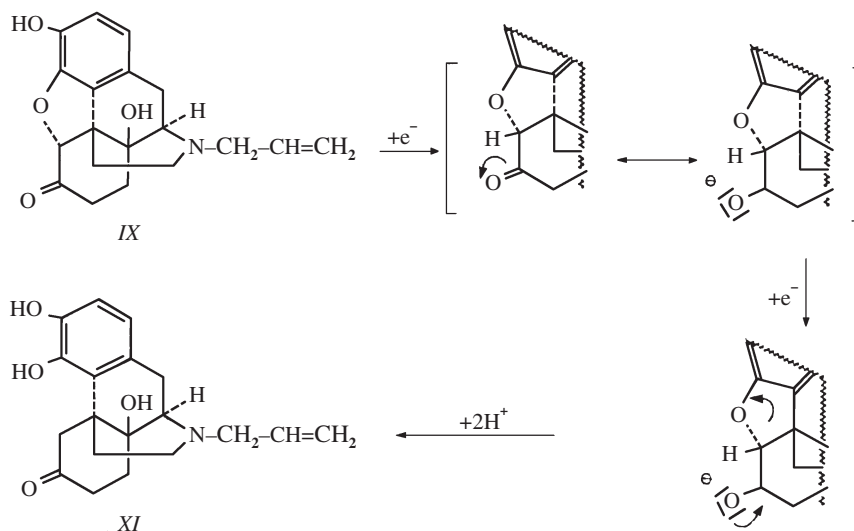


Schéma 1

hydropyrokatechinovém derivátu – tetrahydro- β -isomorfinu. Těž aktivovaným práškovým zinkem lze redukovat látky této řady na pyrokatechinové deriváty. Takto byl chemicky redukován i naloxon za vzniku příslušného derivátu pyrokatechinového typu, avšak jen s 55 % výtěžkem.

Konečným důkazem mechanismu se proto stala elektroreparativní redukce při konstantním potenciálu na míchané velkoplošné rtuťové elektrodě v tříelektrodovém zapojení. Potenciál redukce byl udržován na hodnotě těsně za půlvalnovým potenciálem nebo na potenciálu počátku limitního proudu polarografické vlny. Z 1 gramu bylo získáno 550 mg látky, jež byla u naloxonu identifikována jako 17-allyl-3,4,14-hydroxymorfinan-6-on (*XI*) o bodu tání $225\text{--}227^\circ\text{C}$. Elementární analýza odpovídá předpokládanému složení. Hmotnostní spektrometrie poskytla molekulární hmotnost 329,1. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ prokázalo přítomnost hydroxyly C-4 u 9,2 ppm, zatímco rezonanční signál hydroxyly C-3 byl u 8,02 ppm. Obě

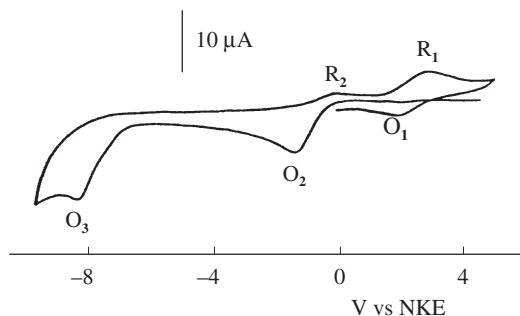
Tabulka I

Elektrochemická data pro hydromorfon, hydrokodon a naloxon

Sloučenina	pH	$E_{1/2}^a$	E_p^b
Hydromorfon (<i>IV</i>)	2,0	-1,05	-1,05
	4,0	-1,20	-1,21 (-1,37)
	6,0	-1,22	-1,25 (-1,47)
	8,0	-1,24	-1,25 (-1,58)
Hydrokodon (<i>V</i>)	2,0	-1,10	-1,10
	4,0	-1,17	-1,21 (-1,39)
	6,0	-1,19	-1,21 (-1,49)
	8,0	-1,19	-1,21 (-1,63)
Naloxon (<i>IX</i>)	2,0	-1,10	-1,12
	4,0	-1,15	-1,18 (-1,42)
	6,0	-1,16	-1,18
	8,0	-1,18	-1,20 (-1,56)

^a Půlvalnový potenciál při dc-polarografii, ^b potenciál píku při cyklické voltametii na grafitové elektrodě při rychlosti polarizace $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

fenolické skupiny lze deuterovat. Infračervené spektrum produktu nevykazuje charakteristický etherický můstek u 1220 až 1230 cm^{-1} . Signál skupiny 6-oxo je po rozštěpení můstku u kratší vlnové délky 1727 cm^{-1} . Vznikající produkt je na vzduchu velice nestálý a brzy dochází k jeho hnědočervenému zbarvení, které se neprojevuje pod dusíkem nebo argonem. Taková reakce potvrzuje pyrokatechinovou strukturu stejně jako zelené zbarvení komplexu s FeCl_3 v kyselině sírové. Produkt tvoří s kyselinou pikrovou v benzenu CT komplex, který po překrytí z methanolu taje při 190 až 192 $^\circ\text{C}$. Oxidativní rozklad v methanolu byl sledován spektrofotometricky při 456 nm. Má poločas 2,5 hod a rychlostní konstantu $k = 4,61 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Vznikající tmavočervený produkt je zřejmě polymerní a má *o*-chinoidní strukturu, jež se v infračerveném spektru projevuje rezonančními signály u 1625 cm^{-1} .



Obr. 6. Cyklický voltamogram apomorfinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) na grafitové pastové elektrodě v prostředí fosfátového pufru o pH 7,4 při rychlosti polarizace 3 V.min^{-1}

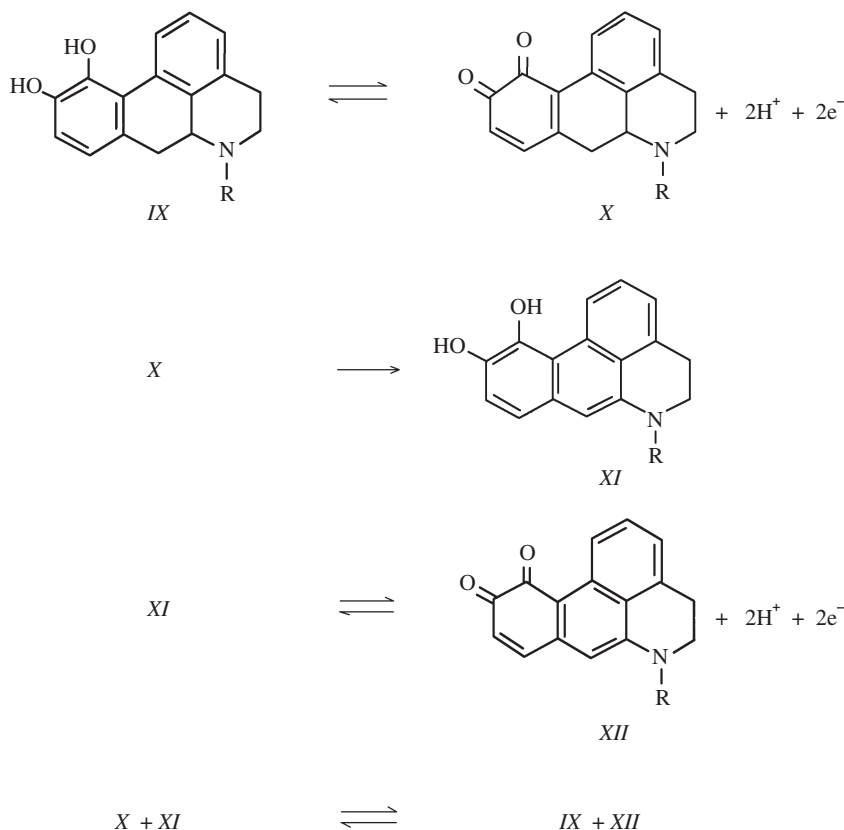


Schéma 2

6. Elektrochemický výzkum apomorfinu

Apomorphin (*IX*), který byl poprvé připraven asi před sto léty, je látka, která se liší od svrchu uvedených nejen svou strukturou, nýbrž i farmakologickými vlastnostmi – je to totiž silné emetikum, jež vyvolává zvracení. V současnosti vzbudil zájem o tuto látku^{20,21} výzkum dopaminu, jehož strukturu lze vysledovat i ve strukturálním vzorci apomorfinu. Studie byly prováděny souvislosti s léčením Parkinsonovy nemoci.

Elektrochemická měření, především cyklická voltametrie, byla prováděna hlavně na stacionární grafitové pastové elektrodě (nujol/grafit 30/70 w/w) (obr. 6). V nepřítomnosti silného nukleofilu je apomorphin ireverzibilně oxidován za výměny 2 elektronů a 2 protonů (schéma 2).

Podle svrchu uvedených reakcí pak dojde k vytvoření nového oxidačně redukčního systému. Ten se velice silně adsorbuje na pastové elektrodě a chová se jako elektrokatalyzátor při oxidacích, kupř. askorbové kyseliny. Odlišný mechanismus se uplatňuje v přítomnosti glutathionu jako silného nukleofilu. Adsorpce oxidované formy, tj. oxo-apomorfinu na pastové elektrodě umožňuje po prekoncentraci stanovit apomorphin po až třicetinásobném zvýšení citlivosti v oblasti koncentrací 10^{-6} až $10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$.

7. Závěr

Je zřejmé, že navzdory polarografické neredukovatelnosti morfinu a kodeinu poskytují polarografická a voltametrická měření dobré možnosti pro stanovení opiových alkaloidů a lá-

tek od nich odvozených nebo příbuzných v lékových formách nebo i v biologických matricích. Navíc se takto získají i cenné údaje o jejich redoxních vlastnostech. U látek jako je morfin a kodein, se nejlépe osvědčila anodická oxidace na pevných elektrodách. Nejvýznamnější je však velice příznivá polarografická redukovatelnost syntetických oxidačních produktů z této skupiny a jim příbuzného antagonisty naloxonu.

Polarografie i voltametrie mohou i s výhodou sloužit jako citlivé detekční metody po chromatografické separaci, ať už jde o HPLC nebo o tenkovrstvou chromatografii. Ve srovnání s příkladem stanovení u další často zneužívané drogy, kokainu²², soudíme, že nejvýhodnějším příspěvkem ke stanovení morfinu či dalších opioidů by byla konstrukce amperometrického imunosenzoru. Ten je u kokainu založen na chemicky aktivované afinitní membráně, umístěné na kyslíkové elektrodě a pracující s křenovou peroxidasou a s benzoyllegoninovou protilátkou. Antigenem je stanovovaný kokain. Změna amperometrického signálu je způsobena inhibicí enzymové aktivity vznikající asociací antigenu s imobilizovanou protilátkou. Popisované uspořádání je zvláště výhodné svou specificitou a možností opakovaných stanovení. O vzrůstajícím zájmu o metody elektrochemické stopové analýzy zneužitelných omamných jedů svědčí též nová práce²³, věnovaná stanovení kokainových mikročástic v pevné fázi (na textilu či lidské pokožce) pomocí anodické square-wave voltametrie na impregnované grafitové anodě.

LITERATURA

1. Pech J.: Collect. Czech Chem. Commun. 6, 190 (1934).
2. Kirkpatrick H. F. W.: Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20, 87 (1947).
3. Proksa B., Molnár L.: Anal. Chim. Acta 97, 149 (1984).
4. Bishop E., Hussein W.: Analyst 189, 143 (1984).
5. Jyh-Hyng Zen, Ming-Ren Cheng, Hsien-Hsun Chung, Ying Shih: Electroanalysis 10, 536 (1998).
6. Baggesgaard-Rasmussen H., Ilver K.: Dansk Tidsskrift Farmaci 19, 71 (1945).
7. Lund H.: Acta Chem. Scand 12, 1444 (1958).
8. Fořtová V.: *Kandidátská disertační práce*. Univerzita Karlova, Praha 1952.
9. Volke J., Fořtová V., ve sborníku: *Sjazd praktickej polarografie, Bratislava 1952*, str. 108.
10. Volke J.: Acta Chem. Acad. Sci. Hung 1956, 1.
11. Volke J., Volková V.: Cesk. Farm. 3, 289 (1954).
12. Volke J.: Talanta 12, 1081 (1965).
13. Seagers W. J., Neuss J. D., Mader J. W.: J. Am. Pharm. Assoc. 41, 640 (1952).
14. Volke J., Volková V.: Cesk. Farm 4, 20 (1955).
15. Šantavý F., Černoch M.: Chem. Listy 46, 81 (1952).
16. Šantavý F.: Pharmazie 11, 577 (1966).
17. Volke J., Volková V., v knize: *Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy* (Březina M., Zuman P., ed.), 2. vyd., str. 366. Academic Press, New York 1956.
18. Abu-Khurmah M., Oelschläger H., Volke J.: Pharmazie 53, 8 (1998).
19. Oelschläger H., Abu-Khurmah M.: Pharmazie 53, 164 (1998).
20. Cheng H. Y., Falat L., Li R.-L.: Anal. Chem. 54, 1384 (1982).
21. Cheng H. Y., Strobe E., Adams R. N.: Anal. Chem. 51, 2243 (1979).
22. Suleiman Ahmad, Xu Yuanhang: Electroanalysis 10, 240 (1998).
23. Komorovsky-Lovrič S., Galič I., Penovski R.: Electroanalysis 11, 120 (1999).

J. Volke and V. Volkeová (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Electrochemical Determination of Alkaloids of the Morphine Series**

The article deals with polarographic and voltammetric methods, both direct and indirect, in the study of morphine, codeine, heroin and their oxidation products, hydromorphone, hydrocodone, etc. Special attention is devoted to the morphine antagonist, naloxone, which is structurally related to morphine. Analytical use of electrochemical methods, their sensitivity and specificity as well as the reduction mechanism with regard to synthetic utilization are outlined. Electrochemical activity of apomorphine, another oxidation product of morphine, is discussed.

ANODICKÁ OXIDÁCIA HLINÍKA V KYSLÝCH ELEKTROLYTOCH

ŽANETA HOLICKÁ, MARTA CHOVANCOVÁ
a MATILDA ZEMANOVÁ

*Katedra anorganickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: chovan@chtf.stuba.sk*

Došlo dňa 17.1.2000

Kľúčové slová: anodická oxidácia hliníka, mechanizmus, kyslé elektrolyty

Obsah

1. Úvod
2. Mechanizmus anodickej oxidácie
3. Štruktúra anodickej oxidovej vrstvy
4. Modely rastu oxidovej vrstvy
5. Záver

1. Úvod

Hliník má niektoré vlastnosti, ktoré z neho robia prioritný konštrukčný materiál takmer vo všetkých oblastiach priemyslu. Popri priaznivých protikorózných vlastnostiach sú to: nízka hustota, dobrá tepelná a elektrická vodivosť, ľahká opracovateľnosť a prijateľná cena. Protikorózna odolnosť hliníka spočíva v tom, že pôsobením vzduchu sa pokrýva súvislou vrstvou oxidu hlinitého veľmi tenkej hrúbky, ktorá plní ochrannú funkciu. Povrchovými úpravami – chemickými alebo elektrochemickými – možno túto prirodzenú oxidovú vrstvu mnohonásobne zväčšiť.

Medzi významné metódy povrchovej úpravy hliníka patrí anodická oxidácia, ktorou sa vytvára na povrchu hliníka ochranný konverzný povlak, ktorý podstatne zlepšuje fyzikálne i chemické vlastnosti anodizovaného povrchu. Pri anodickej oxidácii sa využívajú rôzne elektrolyty, ktoré možno rozdeliť do troch základných skupín¹:

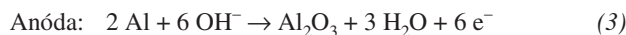
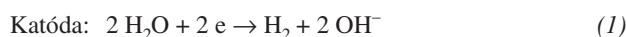
1. Elektrolyty, ktoré majú veľmi malú, resp. žiadnu schopnosť rozpúšťať oxidovú vrstvu. Povlaky z týchto elektrolytov sú tenké a bezpórovité, vytvárajú sa rýchle a ich hrúbka je priamo úmerná aplikovanému napätiu. Takto získané povlaky sa využívajú v elektrolytických kondenzátoroch a usmerňovačoch.
2. Elektrolyty, ktoré rozpúšťajú oxidy. Vytvorené množstvo oxidu je funkciou prúdu a času v súhlase s Faradayovými zákonmi, hoci konečná hrúbka oxidovej vrstvy je redukovaná rozpúšťacou reakciou elektrolytu, ktorá je výrazná v blízkosti vonkajšieho povrchu oxidovej vrstvy. Povlaky tohto typu sa využívajú na dekoratívny účel.
3. Elektrolyty, ktoré atakujú oxidovú vrstvu elektrochemickým leštením. Oxidy sa rozpúšťajú tak rýchlo, ako sa tvoria.

Výsledkom tohto procesu je, že na konci zostane len veľmi tenký oxidový film. Tento proces vedie k hladkým povrchom a získava sa lesklý vysoko reflektívny povrch.

V kyslých elektrolytoch vzniká procesom anodickej oxidácie oxidový film zložený zo stĺpcovitých oblastí hexagonálnych buniek obsahujúcich okrúhle póry². Ak sú tieto póry vyplnené kovmi alebo polovodičmi, môžu sa takéto vrstvy využiť v elektrických a elektrooptických zariadeniach. Na druhej strane, pórovitá štruktúra anodickej oxidovaného hliníka spôsobuje jeho vysokú absorpčnú schopnosť a tým i náchylnosť na koróziu v agresívnych prostrediach. Z tohto dôvodu sa anodická oxidácia hliníka utesňuje rôznymi metódami.

2. Mechanizmus anodickej oxidácie

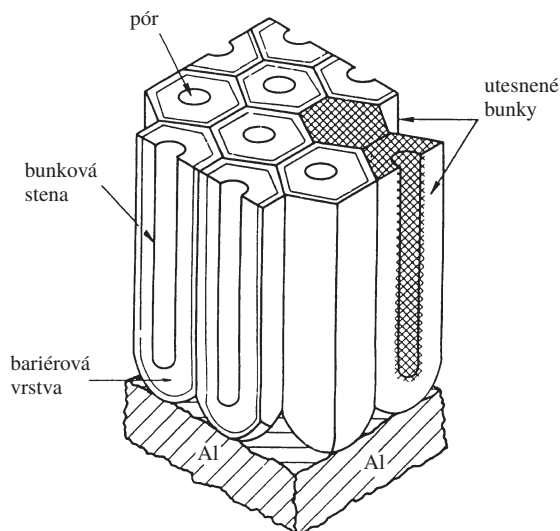
Prvá hypotéza o mechanizme formovania anodických oxidových vrstiev bola publikovaná v roku³ 1932. Do súčasných čias však nebola vypracovaná všeobecne platná teória. Jedna z teórií⁴ objasňuje vznik oxidovej vrstvy tak, že na katóde z nerozpustného kovu sa vylučuje vodík, zatiaľ čo na anóde vzrastá alkalita zvyšovaním koncentrácie hydroxidového aniónu:



Na začiatku deja sa vplyvom prechádzajúceho prúdu a kyseliny rozpustí určité množstvo hliníka, ale s pokračujúcou elektrolyzou hydroxidové ióny reagujú s hliníkovými kationmi, pričom sa vytvorí povlak nerozpustného hydroxidu hlinitého, ktorý má izolačné vlastnosti, čo spôsobuje vzrast elektrického odporu, čím nastáva ohrev vrstvy a jej následnou dehydratáciou vzniká vrstva Al_2O_3 .

Eloxovaný povlak nie je však iba vrstva samotného oxidu hlinitého, obsahuje tiež vodu, anióny elektrolytu, neoxidované čiastočky nečistôt a zliatinových prísad, ktoré môže obsahovať základný materiál.

Od roku 1953 je známa teória Kellera, Huntera a Robinsona⁵. Podľa tejto teórie oxidová vrstva pozostáva z hexagonálnych prizmatických buniek vrstvy, ktorých stredom prechádzajú póry a tieto sú zakončené približne polguľovitým dnom na bariérovej vrstve (obr. 1). Exaktnější výklad teórie reakčného mechanizmu anodickej oxidácie hliníka je založený na predpoklade, že hliník je pokrytý vrstvou Al_2O_3 , ktorý vytvára veľké množstvo pórov. V procese anodickej oxidácie dochádza najprv k tvorbe bariérovej vrstvy. Následne na tejto vrstve rastie vrstva pórovitá. Procesy vo vnútri bariérovej vrstvy sú elektrochemickej povahy⁵⁻⁷, kým procesy vo vnútri pórovitej vrstvy sú chemickej a fyzikálnej povahy⁸⁻¹¹. Spätne rozpúšťanie vrstvy pri základni pórov je proces podporovaný elektrickým poľom, neide teda len o jednoduché chemické rozpúšťanie. Bariérovou vrstvou pretekajú tri zložky prúdu¹²: iónový prúd, ktorý spôsobuje rast pórovitej časti vrstvy, iónový prúd



Obr. 1. Štruktúra pórovitého anodického oxidu

sprevádzajúci spätné rozpúšťanie vrstvy a elektrónový prúd. Ďalšia teória¹³ vychádza z existencie plošnej nehomogenity bariérovej vrstvy. Táto vrstva sa skladá z oblastí, ktoré sa navzájom líšia svojou elektrickou vodivosťou. Nad oblasťami s malou elektrickou vodivosťou nemôže oxidovať vrstva po dosiahnutí určitej hrúbky ďalej narastať a začínajú sa vytvárať póry. Na povrchu hliníka dochádza vplyvom vloženého napätia k vzniku hliníkových kationtov a kyslíkových aniónov, ktoré putujú v tejto vrstve protismerné. Ich vzájomná reakcia prebieha v blízkosti dna pórov¹⁴.

Podľa novších teórií sa predpokladá, že kompaktná bariérová vrstva vzniká v závislosti od počtu aktívnych centier na povrchu kovu. Zo zárodok vyrastajú polguľovité mikrobunky, ktoré po určitom čase zaplňujú celý povrch kovu, čím vytvoria nepórovitú bariérovú vrstvu. Na defektných miestach sa v bariérovej vrstve tvoria póry. Póry rastú kolmo na povrch v rovnováhe s poľom, zosilneným rozpúšťaním oxidov na rozhraní kov-oxid. Anióny obsahujúce kyslík (O^{2-} , OH^-) migrujú z elektrolytu cez oxidovú vrstvu na dno pórov. Al^{3+} kationty putujú cez oxidovú vrstvu do roztoku na rozhranie oxid-elektrolyt (obr. 2). Na tomto rozhraní sa počas rastu pórovitého oxidu nevytvárajú oxidové bunky, ale všetky kationty dosahujúce toto rozhranie sú emitované do elektrolytu¹⁵.

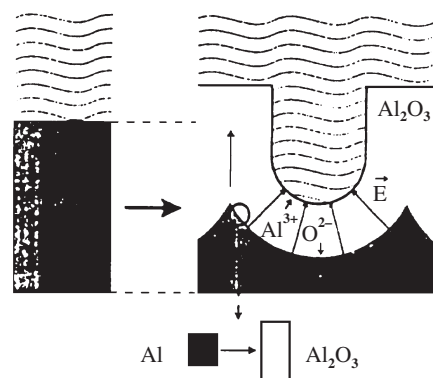
Mnohé súčasné práce zamerané na vysvetlenie mechanizmu anodického oxidácie vychádzajú z nasledujúcich faktov¹⁶:

1. Pre anodickú oxidáciu hliníka platí Faradayov zákon.
2. Poznatky získané pomocou elektrónovej mikroskopie poukazujú na existenciu tenkej kompaktnéj oxidovej vrstvy – bariérovej vrstvy medzi kovom a pórovitou oxidovou vrstvou.
3. Pórovitá oxidová vrstva rastie na dne pórov v procese formácie a transformácie bariérovej vrstvy.

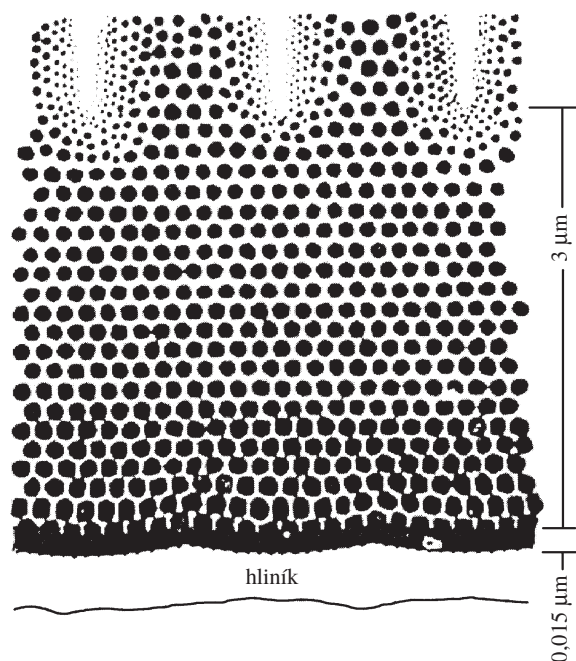
Na základe týchto faktov sa rast pórovitého oxidu vysvetľuje ako stacionárny proces v dvoch stupňoch:

- a) formácia nového oxidu na rozhraní kov – bariérová vrstva,
- b) transformácia kompaktného pórovitého oxidu na rozhraní bariérová vrstva – elektrolyt. Model vzniku anodického oxidu podľa Murphyho a Michelsona je na obr. 3 (cit.¹⁷).

Objasnenie premeny bariérovej vrstvy na pórovitú popisuje nasledujúci mechanizmus:¹⁸ Elektrické pole určuje z jednej

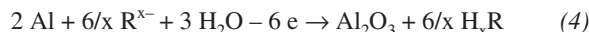


Obr. 2. Rast oxidu hlinitého počas anodického oxidácie hliníka



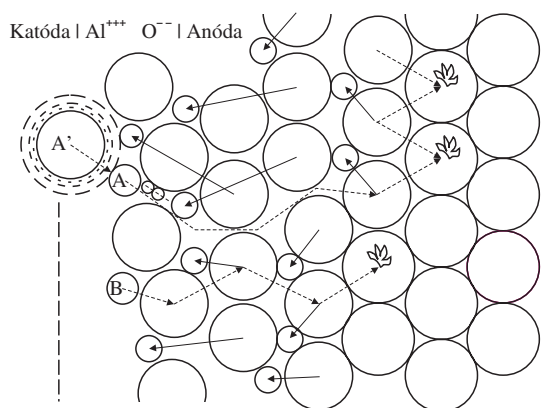
Obr. 3. Murphyho a Michelsonov model anodicky oxidovaného hliníka. Čierne oblasti predstavujú bezvodý oxid hlinitý, kým biele znázorňujú hydroxid a hydroxo-oxid hlinitý

strany pohyb hydroxylových iónov smerom ku kovu a z druhej strany sa proti nim pohybujú kationty smerom od bariérovej vrstvy. Hydroxylové ióny a voda na hranici medzi bariérovou a pórovitou vrstvou spôsobujú hydratáciu vonkajšej časti bariérovej vrstvy. Protipohyb kationtov však spôsobuje dehydratáciu v bariérovej vrstve. Dynamická rovnováha tohto systému závisí od teploty a koncentrácie elektrolytu, ktorému zodpovedá stanovený elektrický odpor bariérovej vrstvy. Zjednodušene možno proces formovania anodicky oxidovanej vrstvy vyjadriť schémou:



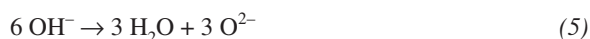
kde R^{x-} je príslušný anión.

Doposiaľ nie je objasnené, z ktorých radikálov alebo iónov pochádza kyslík, ktorý reaguje s hliníkom. Je možné, že reak-



Obr. 4. Diagram znázorňuje reakciu prebiehajúcu na rozhraní dielektrická vrstva–kov. Na rozhraní oxid–elektrolyt (katóda) sa oxidujú anióny O^{2-} na atóm O. Reakcia medzi kyslíkom a hliníkom prebieha na rozhraní oxid–kov (anóda) (cit.²⁹)

cie sa zúčastňujú OH^- ióny¹⁹, iní autori zasa predpokladajú, že ióny O^{2-} , ktoré vznikajú reakciou:



alebo ióny O^- vznikajúce nasledovne²⁰:



Ak sa berú do úvahy fyzikálne aspekty procesu formovania vrstvy, dá sa predpokladať, že proces spočíva v raste mriežky kyslíkových aniónov na vonkajšom povrchu vrstvy a v migrácii hliníkových kationov cez oxidovú vrstvu vakanciami kyslíkovej mriežky (obr. 4). Hlinité kationy sa uvoľňujú z mriežky pôsobením silného elektrického poľa²¹. Na základe tohto predpokladu možno proces formovania oxidovej vrstvy v elektrolytoch s rozpúšťacou schopnosťou v priebehu anodickej oxidácie rozdeliť do troch štádií:

1. migrácia Al^{3+} do oxidovej vrstvy,
2. difúzia Al^{3+} cez oxidovú vrstvu,
3. oxidačná reakcia – tvorba vrstvy Al_2O_3 .

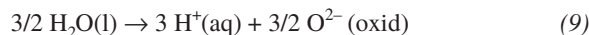
Mechанизmus formovania pórov je založený na teórii, podľa ktorej spätné rozpúšťanie vrstvy pri základni pórov je proces podporovaný elektrickým poľom²².

V experimente autorov Feiyue, Khanga, a Metzgera²³ sa na sledovanie rastu oxidovej vrstvy ako elektrolyt použila kyselina trihydrogénfosforečná. Na pozorovanie oxidového filmu sa použil riadkovací i rastrovací elektrónový mikroskop. Ukázalo sa, že póry vznikajú hneď na začiatku procesu a ich počiatočná hustota je vysoká. S rastúcim časom veľkosť pórov rastie, ale ich hustota klesá. Rast pórov môže byť spôsobený atakom vodíkových iónov na bariérovú vrstvu. Ak koncentrácia týchto iónov klesá, tento atak je pomalší až úplne prestane a vytvorí sa oxidový film typu bariérovej vrstvy. Bariérová vrstva sa nepretržite obnovuje na dne pórov a udržiava si malé, ale konštantnú hrúbku. Stena bunky pozostáva z amorfného Al_2O_3 , malého množstva aniónov použitého elektrolytu, malého množstva vody a nanokryštálov. Na základe tohto experimentu bol navrhnutý nasledujúci mechanizmus anodickej oxidácie:

- 1) Elektroštiepenie – vyrovnáva niektoré veľké povrchové nerovnosti, ale zároveň vytvára veľké množstvo malých pórov.
- 2) Na rozhraní kov–oxid dochádza k tvorbe kationov Al^{3+} a k ich migrácii do oxidovej vrstvy:



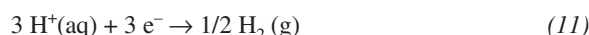
- 3) Na rozhraní oxid–elektrolyt dochádza k reakcii štiepenia vody:



- 4) Lokálne rozpúšťanie oxidu možno vyjadriť reakciou:



- 5) Vodíkové kationy putujú ku katóde, kde opúšťajú elektrolyt vo forme plynného H_2 :



3. Štruktúra anodickej oxidovej vrstvy

Anodicnou oxidáciou hliníka vzniká na jeho povrchu nepórovitý (bariérový) alebo pórovitý oxidový film⁸. Nepórovitý film sa získava z elektrolytov v ktorých je vznikajúci oxid hliníty málo rozpustný alebo vôbec nerozpustný (kyselina trihydrogénboritá, kyselina citrónová). Tento film má bunkovitú štruktúru a za vhodných podmienok (predĺžený čas anodickej oxidácie, vysoké teploty) sa veľmi pomaly mení na pórovitý typ filmu²⁴. Anodicnou oxidáciou v elektrolytoch, ktoré rozpúšťajú Al_2O_3 (kyselina sírová, kyselina trihydrogénfosforečná) získavame pórovitý oxidový film. Štruktúra týchto oxidov bola prvýkrát opísaná Kellerom⁵, ktorý ich charakterizoval ako uzavreté oblasti hexagonálnych buniek, ktoré majú centrálny pór približne cylindrického tvaru. Veľkosť buniek rastie so zvyšujúcim sa anodickým napätím, kým hustota oxidových buniek a hustota pórov s rastúcim napätím klesá²⁴. Rozmery pórov sú v prvom rade funkciou použitého elektrolytu. Pravidelnosť hexagonálnej bunkovej štruktúry závisí od typu elektrolytu a od podmienok anodickej oxidácie²⁴. Tvar pórov, ktorý sa pohybuje od pravidelného kruhu po cylindrický²⁵, závisí od metodiky a podmienok anodickej oxidácie. Štruktúra anodickej oxidovej vrstvy Al_2O_3 je znázornená na obr. 1.

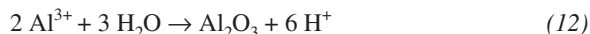
Táto vrstva pozostáva z bezpórovitej bariérovej vrstvy, ktorá sa ako tenká kompaktná oxidová vrstva nachádza medzi kovom a pórovitou oxidovou vrstvou. Bariérová vrstva je nekryštalická tuhá fáza, cez ktorú migrujú hliníkové a kyslíkové ióny. Predpokladá sa, že bariérová vrstva pozostáva z troch oblastí:

- vrchná oblasť (s afinitou k aniónom a nasýtená vodou),
- stredná oblasť (s afinitou k aniónom),
- spodná oblasť (bez afinity k aniónom a vode).

Ustálený rast hliníkového pórovitého oxidu je diskontinuálny proces, ktorého výsledkom je tvorba bariérovej vrstvy a môže byť popísaný tromi stupňami¹⁶:

1. transformácia existujúcej bariérovej vrstvy z compactnej na pórovitý oxid, ktorá môže byť dôsledkom elektrického rozpúšťania vrstvy,

2. anodická oxidácia hliníka,
3. formácia novej bariérovej vrstvy:



Hrúbka oxidovej vrstvy je priamo úmerná času anodickej oxidácie². Túto závislosť je teda možné napísať:

$$h = kt \quad (13)$$

kde h je hrúbka povlaku, t je čas anodickej oxidácie a k je konštanta rýchlosti rastu oxidovej vrstvy, ktorá závisí od podmienok anodickej oxidácie. Táto konštanta rastie s rastúcou prúdovou hustotou pri danej teplote v dôsledku väčšieho transportu iónov cez bariérovú vrstvu. S rastúcou prúdovou hustotou zároveň klesá pórovitosť, ktorá však rastie s teplotou. Hrúbka bariérovej vrstvy je v priamej úmery s veľkosťou oxidovej bunky². A pretože každá oxidová bunka má jeden pór, klesaním veľkosti bunky vzrastá pórovitosť.

Stacionárny proces formovania oxidového povlaku možno demonštrovať na základe závislostí, ktoré sa získali anodickou oxidáciou hliníka v galvanostatickom režime. Závislosť na obr. 5 možno rozdeliť do troch štádií²⁶.

Pre prvé štádium je charakteristický nárast anodického potenciálu. V tomto štádiu sa vytvárajú tak zárodoky oxidových buniek, ako aj plošná bariérová oxidová vrstva. Prvé bunky sa vytvárajú v miestach uzlov hraníc medzi kryštálmi povrchu hliníka. Ďalšie oxidové bunky sa vytvárajú i pozdĺž týchto hraníc. Vznik oxidových buniek na týchto miestach je spôsobený tým, že tieto oblasti majú vyšší chemický potenciál a vysokú koncentráciu kryštalografických defektov. V tejto perióde lineárneho rastu napätia sa rozmery buniek zväčšujú priamo úmerne s rastom napätia a ich množstvo tiež rastie.

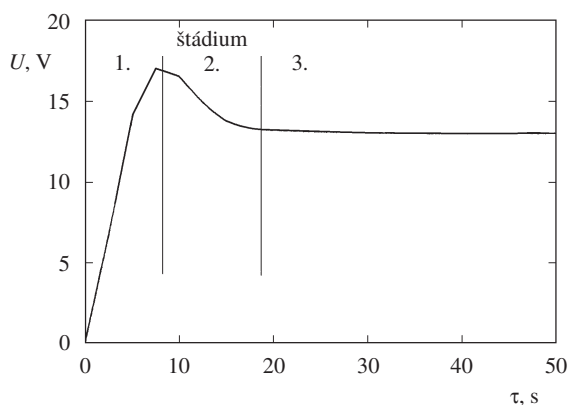
Na konci tohto štádia dochádza k zníženiu nárastu anodického potenciálu a k zmenšeniu množstva oxidových buniek. Zároveň však dochádza k rastu rozmerov buniek mechanizmom „konkurencie rastu“ (zväčšenie rozmerov oxidových buniek na úct iných, neperspektívnych). Súčasne však prebieha aj zahustenie rozloženia buniek oxidu a tým aj zmenšenie voľného priestranstva – nebunkových oblastí voľného priestranstva bariérovej oxidovej vrstvy. Tento fakt hovorí o tom, že rast oxidových buniek neprebíha len na úct menej perspektívnych buniek, no i cestou pripojenia nebunkových oblastí bariérového oxidu.

V druhom štádiu nedochádza k značnému poklesu anodického potenciálu. Oxidové bunky narastajú, no rýchlosť tohto procesu sa podstatne znižuje. Množstvo buniek klesá.

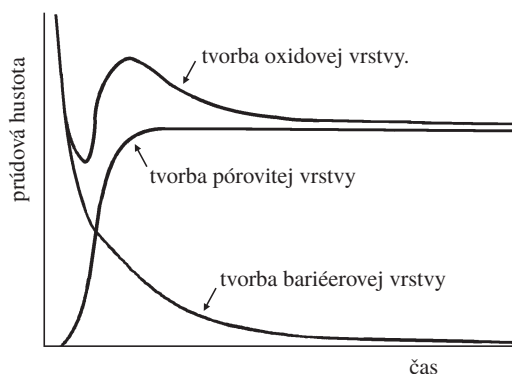
V treťom štádiu zostáva hodnota anodického potenciálu zachovaná. Vrstva anodicky oxidovaného hliníka sa zväčšuje po hrúbke a má bunkovo-pórovitú štruktúru. Na obrázku 6 je časový priebeh prúdovej hustoty pri konštantnom napätí. Počiatočný pokles prúdu a nasledovný rýchly rast a pomalší skok do konštantnej hodnoty je výsledkom dvoch procesov: exponenciálneho poklesu prúdu pri tvorbe bariérovej vrstvy a priebehu prúdu pri tvorbe pórov²⁹.

4. Modely rastu oxidovej vrstvy

V známych teoretických modeloch, ktoré opisujú rast oxidovej vrstvy na povrchu hliníka sa neberie do úvahy štruk-

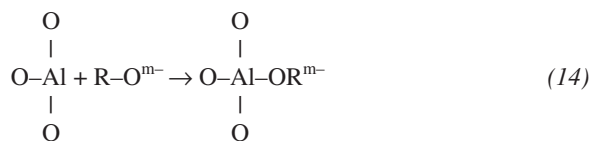


Obr. 5. Časový priebeh napätia počas anodickej oxidácie v kyseline sírovej pri prúdovej hustote $1,5 \text{ A}\cdot\text{dm}^{-2}$ a teplote 20°C



Obr. 6. Časová závislosť prúdovej hustoty počas anodickej oxidácie hliníka pri konštantnom napätí

túra vrstvy a neskúma sa vplyv zloženia elektrolytu na proces anodickej oxidácie. Preto sa pri modelovaní procesu rastu vrstvy skúmajú elektrochemické reakcie na hranici oxid-elektrolyt a predpokladá sa, že ako zdroj kyslíka môžu vystupovať i kyslík obsahujúce častice prítomné v elektrolyte²⁷. Na tomto základe sa zostrojil nasledujúci model rastu oxidovej vrstvy. Proces anodickej oxidácie začína koordináciou aniónu OH^- (resp. RO^{m-}) s atómom hliníka vo vrchnej vrstve oxidu:



Druhé štádium môže zahrňovať disociáciu väzieb $\text{R}-\text{O}$ a vytvorenie kváziiónov na povrchu povlaku. Tieto kváziióny sú obohatené kyslíkom. Ďalšie štádium je charakteristické rôznymi prenosmi náboja: migrácia kváziiónov k hranici kov-oxid, prenos elektrónov cez túto hranicu i migrácia iónov hliníka od povrchu kovu k hranici oxid-elektrolyt. Predpokladá sa, že na povrchu oxidu v procese rastu povlaku môžu vzniknúť polykryštalické, ale i amorfné oblasti. Pri popisovaní dielektrických vlastností kovu sa použil model Tomasa a Fermiho²⁷ a vyvodili sa nasledujúce závery.

1. V procese rastu oxidovej vrstvy, nezávisle od charakteristík donora kyslíka, ako prvá rastie na povrchu polykrystalická vrstva.

2. Po dosiahnutí kritickej hrúbky polykrystalickej vrstvy sa stáva viac pravdepodobným rast amorfnej vrstvy.

Dôležitú úlohu pri formovaní oxidovej vrstvy v reálnych procesoch oxidácie má chemické rozpúšťanie²⁸. Tento vplyv je oveľa väčší ako v prípade elektrochemického rozpúšťania na dne pórov. Hlavný dôvod je v tom, že dĺžka pórov je sto až tisíc-krát väčšia ako ich polomer. Reálne procesy anodickej oxidácie možno v závislosti od podmienok procesu rozdeliť na dve skupiny:

1. procesy, v ktorých sa póry nepretínajú,
2. procesy, v ktorých sa póry pretínajú natoľko, že sa vytvára stacionárna hrúbka pórovitej vrstvy.

Pri dôslednom hodnotení iba prípad 2. možno nazvať stacionárnym (elektrochemické parametre i morfológia anodického oxidu sa časom nemenia). Prvý prípad je iba kvázistacionárnym, pretože sa s časom nemení iba časť morfológických parametrov (geometrické rozmery bariérovej vrstvy, rozmer pórov na ich dne), ostatné parametre (hrúbka pórovitej vrstvy, rozmer pórov na vonkajšej strane pórovitej vrstvy) sa s časom menia. Stacionárne procesy majú teoretický význam, no kvázistacionárne sú dôležité pre praktické technológie.

Pri zaoberaní sa kvázistacionárnym procesom, boli vyslovené nasledujúce predpoklady:

1. Rýchlosť chemického rozpúšťania oxidu je stála v čase i po dĺžke pórov a je omnoho menšia ako rýchlosť nárastu hrúbky vrstvy.

2. Hrúbka pórovitej vrstvy je oveľa väčšia ako hrúbka bariérovej vrstvy.

3. Prúdová hustota je konštantná.

Výsledkom týchto predpokladov je vytvorenie modelu povlaku, ktorý pozostáva z kovu, kyslíka a z aniónov elektrolytu. Formáciu povlaku si potom možno predstaviť ako $MO_n(AO_m)_x$, kde x je časť aniónov elektrolytu pripadajúcich na atóm kovu. V prípade kyseliny sírovej je teda možné písať: $AlO_{3/2}(SO_3)_x$. Pri použití 15 % H_2SO_4 , vo forme aniónu SO_4^{2-} vstupuje do povlaku od 13,5±3 do 23±8 % atómov kyslíka. Ak vyberieme z týchto intervalov ich prieniky, získame 15,75±0,75 % atómov kyslíka. Zároveň sa zistilo, že na jeden atóm kyslíka pripadajú 4 % síry.

Platí teda:

$$x / (3/2 + 3x) = 0,04 \Rightarrow x = 0,068 \quad (15)$$

Takže v tomto prípade možno pre štruktúru anodického oxidu písať: $AlO_{3/2}(SO_3)_{0,068}$.

Pre anodickú oxidáciu hliníka je možné písať nasledujúcu elektrochemickú reakciu:



Na základe tejto reakcie možno s využitím Faradayových zákonov pre množstvo vzniknutého oxidu hlinitého písať²:

$$m_{ox} = \eta M_{ox} j t / (zF) \quad (17)$$

kde m_{ox} je celkové množstvo vytvoreného oxidu, M_{ox} je molekulová hmotnosť oxidu, A je úplná anodizovaná plocha, j je

prúdová hustota, t je čas anodickej oxidácie, z je počet elektrónov a F je Faradayova konštanta. η je prúdová účinnosť.

Množstvo pórovitého oxidu je potom:

$$m_p = m_{ox} - m_d \quad (18)$$

kde m_d je množstvo rozpusteného oxidu. Pre množstvo hliníka $(m_{Al})_\eta$ premeneného na oxid hlinitý s využitím Faradayových zákonov je možné písať:

$$(m_{Al})_\eta = 2 \eta M_{Al} A i t / (zF) \quad (19)$$

Pre množstvo pórovitého oxidu potom možno písať:

$$m_p = (m_{Al})_\eta + m_1 - m_2 \quad (20)$$

kde m_1 a m_2 je hmotnosť hliníkovej vzorky pred a po anodickej oxidácii.

5. Záver

V predloženom referáte sú zhrnuté doterajšie teoretické poznatky o mechanizme procesu anodickej oxidácie, štruktúre anodicky oxidovaného hliníka a modeloch rastu oxidovej vrstvy. Väčšina súčasných prác vysvetľuje mechanizmus anodickej oxidácie na základe poznatkov získaných pomocou elektrónovej mikroskopie, ktoré poukazujú na existenciu tenkej kompaktnéj bariérovej vrstvy medzi kovom a pórovitou oxidovou vrstvou. Rast pórovitého oxidu sa vysvetľuje ako stacionárny proces, ktorý prebieha v dvoch stupňoch. Prvým stupňom je formácia nového oxidu na rozhraní kov–bariérová vrstva a druhým stupňom je transformácia kompaktného pórovitého oxidu na rozhraní bariérová vrstva–elektrolyt. Stacionárny proces formovania oxidového povlaku je možné demonštrovať na základe závislostí, ktoré sa získali anodickou oxidáciou hliníka v galvanostatickom režime.

Pri modelovaní procesu rastu vrstvy sa skúmali elektrochemické reakcie na hranici oxid–elektrolyt, ale aj vplyv chemického rozpúšťania. Výsledkom týchto štúdií je vytvorenie takého modelu povlaku, ktorý pozostáva z kovu, kyslíka a z aniónov elektrolytu. Na základe tohto modelu možno vypočítať celkové množstvo vzniknutého oxidu a tiež množstvo pórovitého oxidu.

Napriek tomu, že anodická oxidácia hliníka má široké priemyselné uplatnenie, uvedený prehľadný referát svedčí o tom, že základný výskum v tejto oblasti je stále aktuálny.

Táto úloha sa riešila v rámci grantu č. 1/6251/99 Slovenskej agentúry VEGA.

LITERATÚRA

1. Surganov B. F., Mozalev A. M., Mozaleva I. I.: Zh. Prikl. Khim. 68, 1638 (1995).
2. Shawagfeh A. T., Baltés R. E.: J. Electrochem. Soc. 145, 2699 (1998).
3. Setoh S., Meyata A.: Sci. Pap. Inst. Phys. Chem. Res. Tokyo 17, 189 (1932).
4. Korecký J.: Povrchové zušlechťovanie kovů. Hokr, Praha 1947.

5. Keller F., Hunter M., Robinson D.: *J. Electrochem. Soc.* **100**, 411 (1953).
6. Young L.: *Anodic Oxide Films*. Academic Press, London 1961.
7. Patermarakis G., Moussoutzanis K.: *Electrochim. Acta* **40**, 699 (1995).
8. Patermarakis G., Leans P., Karavassilis Ch., Papayiannis G.: *Electrochim. Acta* **36**, 709 (1991).
9. Patermarakis G., Papandreadis N.: *Electrochim. Acta* **38**, 2351 (1993).
10. Patermarakis G., Tzouvelekis D.: *Electrochim. Acta* **39**, 2419 (1994).
11. Patermarakis G., Moussoutzanis K.: *J. Electrochem. Soc.* **142**, 737 (1995).
12. Kim K. I., Smith R. D., Devereux O. F.: *J. Electrochem. Soc.* **123**, 1789 (1976).
13. House D.: *Electroflat. Metal Finish.* **29**(10) 19, (11) 5 (1976).
14. Jakovleva N. M., Jakovlej A. N., Čupachina E. A.: *Zh. Prikl. Khim.* **67**, 1275 (1994).
15. Jessensky O., Müller F., Gösele U.: *Appl. Phys. Lett.* **72**, 1173 (1998).
16. Palibora E., Lupsan A., Pruneanu S., Savos M.: *Thin Solid Films* **256**, 101 (1994).
17. Murphy J. F., Michelson C. E.: *Aluminium Development Assoc. Conference on Anodizing, Nottingham 1961* (Preprint No. 6), Proceedings, str. 83.
18. Murphy G., Michelson G.: *Proceedings of Interference of Anodizing, Nottingham 1961*, str. 215.
19. Hoart T. P., Mott N. F.: *Phys. Chem. Solids* **9**, 97 (1959).
20. Krasil'sikov A. I.: *Zh. Fyz. Khim.* **31**, 2706 (1957).
21. Mott N. F.: *Trans. Faraday Soc.* **43**, 429 (1947).
22. Kim K. I., Smith R. D., Devereux O. F.: *J. Electrochem. Soc.* **123**, 1789 (1976).
23. Feiyue L., Khang L., Metzger R. M.: *Chem. Mater.* **10**, 2470 (1998).
24. Diggle J., Downie T., Goulding G.: *Chem. Rev.* **69**, 365 (1969).
25. Rai K. N., Ruckenstein E.: *J. Catal.* **40**, 117 (1975).
26. Surganov V. F., Goroch G. G.: *Zh. Prikl. Khim.* **66**, 680 (1993).
27. Izotov B. J., Maletin J. A., Koval I. V.: *Teor. Eksp. Khim.* **30**, 272 (1994).
28. Mizroev R. A., Cviridov A. A., Stepanova N. I., Styrov M. I.: *Zh. Prikl. Khim.* **68**, 241 (1995).
29. Wernick S., Pinner R., Sheasby P. G.: *The Surface Treatment and Finishing of Aluminum and its Alloys*, Finishing Publications, Teddington 1987.

Ž. Holická, M. Chovancová, and M. Zemanová (*Department of Inorganic Technology, Chemical Technological Faculty, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Anodic Oxidation of Aluminium in Acidic Electrolytes**

Hitherto theoretical findings on the mechanism of anodic oxidation, structure of anodically oxidized aluminium and models of the oxide layer growth are reviewed. In the modelling, the layer growth, electrochemical reactions at the oxide – electrolyte boundary and the effect of chemical dissolution were investigated. The result of the studies is the creation of a model coating, which consists of the metal, oxygen and electrolyte anions. On the basis of the model, the total amount of the oxide formed and also the amount of the porous oxide can be calculated. Though the anodic oxidation of aluminium is widely used in industry, basic research in the field is still timely.

STRUKTURA OROSOMUKOIDU – PŘÍKLAD STUDIA GLYKOPROTEINU FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝMI METODAMI

VÍTĚZ KALOUS

Malostranské nám. 10, 118 00 Praha 1
e-mail: notebookdoma@volny.cz

Došlo dne 17.XI.1999

Klíčová slova: orosomukoid, *alfa*-1 kyselý glykoprotein, glykoproteiny – struktura, glykany, oligosacharidy, struktura glykoproteinů – fyzikální metody

Obsah

1. Úvod
2. Obecná charakteristika orosomukoidu
3. NMR spektroskopie glykopeptidů a celé molekuly orosomukoidu
4. Hmotnostní spektroskopie moderními ionizačními metodami
5. Vibrační Ramanova optická aktivita
6. Spektroskopické metody (TPDS, CD)
7. Závěr

1. Úvod

Významnou skupinou krevních bílkovin jsou krevní glykoproteiny. Je jim proto věnována velká pozornost jak z hlediska chemického, tak fyzikálně-chemického¹⁻⁷. Před fyzikálně-chemickým studiem leží důležitý úkol, jakým je zkoumat nejen kvantitativní zastoupení jednotlivých glykoproteinů, ale i změny v jejich strukturách spojených s procesy probíhajícími v patologických stavech. Ke studiu těchto „patologických“ glykoproteinů byly v posledních letech použity často nákladné fyzikální metody, které se již osvědčily pro studium menších organických molekul. V tomto referátu bude hlavní pozornost věnována orosomukoidu (*alfa*-1 kyselému glykoproteinu), který vzhledem k vysokému obsahu cukerné složky a kyselému charakteru je zcela výjimečnou krevní bílkovinou. Úkolem referátu je upozornit biochemicky zaměřené čtenáře na možnosti fyzikálně-chemických metod při zkoumání struktury glykoproteinů a tak je připravit pro konzultace se specialisty v příslušných metodách.

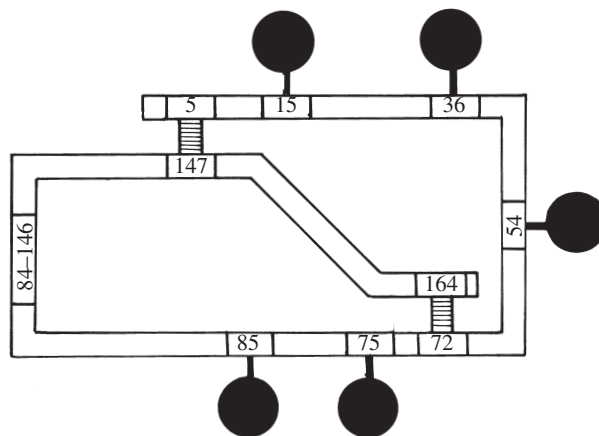
2. Obecná charakteristika orosomukoidu

Objev kyselého glykoproteinu v normálních i patologických sérech je úzce spjat s polarografickým studiem sulfosalicylových filtrátů krevních sér. Tyto filtráty byly použity při Brdičkově reakci⁸, při které se měří katalytické proudy bílkovin v amoniakálních puffech obsahujících ionty trojmocného kobaltu. Hlavní složka filtrátů^{9,10}, po vysrážení hlavních krev-

ních bílkovin kyselinou sulfosalicylovou nebo chloristou, se ukázala být bílkovinou o vysokém obsahu cukrů. Proto byla označena jako mukoprotein MP-1. Bílkovina, izolovaná klasickým vysolováním směsného séra síranem amonným Weimerem a spol.¹¹, byla pojmenována orosomukoid (ORS, ORM). Prakticky ve stejné době izoloval stejnou bílkovinu Schmid¹² a označil ji jako *alfa*-1 kyselý glykoprotein (AGP, AAG). Vzhledem k tomu, že v krevní plazmě představuje orosomukoid pouze přibližně jedno procento z přítomných bílkovin (u zdravých jedinců 50 až 150 mg/100 ml), bylo výhodnější provádět jeho izolaci u Cohnovy alkoholové frakce VI, kde tvoří hlavní bílkovinnou složku.

Vedle chemického srážecího postupu se k izolaci osvědčily chromatografické metody¹³⁻¹⁵ na modifikovaných celulosách. Vzhledem k požadavku studovat orosomukoid z individuálních normálních i patologických sér bylo třeba před vlastní chromatografií odstranit hlavní krevní bílkoviny. To se podařilo přidáním polyethylenglykolu a centrifugací sraženiny¹⁶. Izolace byla ukončena afinitní chromatografií¹⁷ na ConA Sepharose.

Izolovaný orosomukoid byl charakterizován chemickými a fyzikálně-chemickými metodami¹⁻⁷. Molekulová hmotnost se v závislosti na použité metodě pohybuje v rozmezí 41–43 kDa, izoelektrický bod *pI* 1,7–2,3 podle použitého pufru. Je tedy orosomukoid nejkyselějším proteinem krevního séra. Chemická analýza čistého orosomukoidu ukázala na přítomnost jednoho peptidového řetězce¹⁸ o délce 183 aminokyselin, přičemž na 21 místech je v různých variantách proteinu možnost výskytu dvou různých aminokyselin. Dvě disulfidové vazby¹⁹ jsou mezi cysteiny 5–147 a 72–164, hydrofobní oblasti pak mezi aminokyselinovými zbytky 1–15, 85–105 a 140–147, silně hydrofilní je naopak C-konec. V molekule je 8 fenylalaninů, 12 tyrosinů a 3 tryptofany. Ze sacharidů byly nalezeny



Obr. 1. Schematické znázornění struktury orosomukoidu. V jednoduchém peptidickém řetězci jsou šrafovanými sloupečky vyznačeny dva disulfidické můstky s číselným údajem místa v řetězci. Černá kolečka přísluší pěti oligosacharidovým jednotkám připojeným k asparaginům. Znázornění není v měřítku. Upraveno podle Schmidta et al.¹⁹

manosa, galaktosa, fukosa, *N*-acetylglukosamin a sialová kyselina¹⁹. Hmotnostní podíl cukerné části činí 41–45 %. Sacharidy jsou v molekule orosomukoidu přítomny ve formě pěti složitých oligosacharidů (glykanů)^{19–21} (obr. 1), které jsou na peptidický řetězec navázány přes amidový dusík asparaginu. U glykanů orosomukoidu byla nalezena řada glykoforem, které se liší ve stupni větvení, fukosylace a sialosylace. Orosomukoid se ukázal jako jeden z mála krevních glykoproteinů, které obsahují současně glykany^{22,23} di-, tri- a tetraantennního typu. Všem typům je společný pentasacharid, tvořený třemi manosami a dvěma *N*-acetylglukosaminy, z nichž jeden se účastní vazby na bílkovinnou část orosomukoidu. Protože glykany různého antennního typu jsou v molekule orosomukoidu zastoupeny v různém množství a také v peptidové části je mnoho zaměnitelných aminokyselin, je orosomukoid velmi heterogenní. Zvláštní kapitolou je heterogenita determinovaná genetikou²⁴.

V posledních letech se výzkum orosomukoidu ubíral v podstatě dvěma směry. Jeden byl zaměřen na studium struktury moderními fyzikálně-chemickými metodami, jako jsou metody nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS), Ramanova optická aktivita (ROA) a metody spektrofotometrické. Druhý biochemický směr, užívající chromatografických a elektroforetických metod, měl za úkol studium mikroheterogenity ze zaměřením na klinickou chemii.

3. NMR spektroskopie glykopeptidů a celé molekuly orosomukoidu

Rozvoj nukleární magnetické rezonance do oblasti vysokých frekvencí (360 MHz a vyšších) spolu s novými pulsními metodami^{25–27} umožnil rozšířit aplikace NMR na studium biomolekul jako jsou glykopeptidy a glykoproteiny krevní plazmy^{28,29}.

Pokud jde o studium orosomukoidu, bylo třeba nejprve rozštěpit jeho molekulu na několik glykopeptidů³⁰. Po odštěpení sialové kyseliny byl orosomukoid redukován, vzniklé SH skupiny karboxymethylovány a vzniklé fragmenty rozštěpeny proteasami a glykosidasami. Dělení glykopeptidů bylo provedeno kapalinovou chromatografií. Experimentální podmínky štěpení molekuly orosomukoidu byly voleny tak, aby glykopeptidy obsahovaly glykanové jednotky z pěti glykosylačních míst na molekule orosomukoidu. Tato místa byla označena^{18,20} římskými číslicemi I až V. Místo I odpovídá vazbě glykanu na zbytek asparaginu Asn 15, místo II Asn 38, místo III Asn 54, místo IV Asn 75 (obr. 1). Glykopeptidy z těchto míst obsahují

glykany složené z galaktosy, manosy, glukosaminu a fukosy. Podle molárního zastoupení uvedených monosacharidů, zjištěného klasickými analytickými metodami, byly glykopeptidy rozděleny do pěti tříd označených písmeny A, B, C, BF, CF. Zjištěné složení monosacharidů u glykopeptidů z jednotlivých glykosylačních míst ukázalo, že v místě I jsou glykopeptidy třídy A, B a BF, v místech II, III, IV a V jsou třídy B, C a CF.

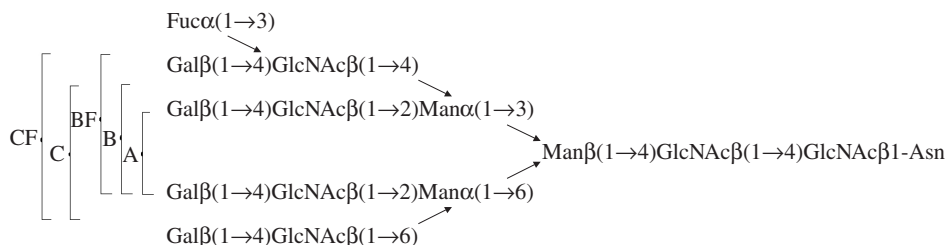
Pro určení lineární struktury glykanů v různých třídách glykopeptidů se osvědčila 360 MHz ¹H NMR s Fourierovou transformací³⁰. Pro interpretaci spekter registrovaných v těžké vodě bylo použito rezonancí H-1 a H-2 protonů manosových zbytků, H-5 a H-6 protonů fukosových zbytků a *N*-acetylových protonů. Citovaná práce uvádí přehledně v tabulkách u všech těchto tříd hodnoty chemických posunů uvedených protonů. Když bylo použito údajů o chemických posunech z předchozích prací s modelovými sloučeninami a glykoproteiny, bylo možno učinit závěr, že třída A má biantenní strukturu, třída B triantenní a třída C teraantenní strukturu (obr. 2). Strukturální vzorce oligosacharidů všech tříd jsou v práci Fourmeta et al.³⁰, kteří se věnovali glykosylačním místům II až V. Glykany v místě I studovali Schmid et al.³¹, kteří uveřejnili přehledné schéma primární struktury různých antennních glykanů (obr. 2).

Jiné NMR studie byly prováděny s celou molekulou orosomukoidu²⁸ spolu s jinými glykoproteiny akutní fáze, a to přímo v krevní plazmě. Ve spektru získaném metodou 500 MHz Hahn spin-echo ¹H NMR pozorovali Bell et al.²⁹ široké píky při 2,04 a 2,08 ppm, které přiřadili *N*-acetylům mobilních řetězců *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylneuraminové kyseliny (obr. 3). V práci jsou také pro ilustraci uvedena spektra lidské plazmy v oboru 1 až 3 ppm pro pět vzorků od čtyř pacientů a jednoho zdravého jedince. Píky ve spektru, označené římskými číslicemi I a II, se výrazně neliší, a tak až další pokusy rozhodnou o použitelnosti metody NMR pro studium orosomukoidu v celé nerozdělené krevní plazmě.

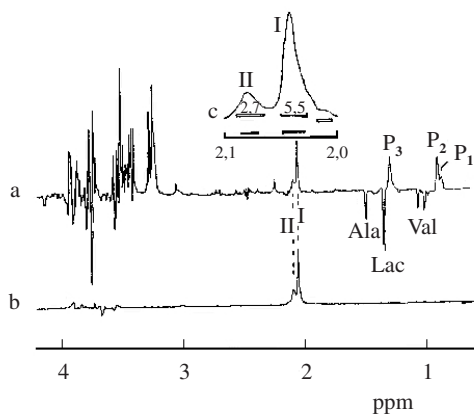
NMR spektra *alfa*-1 kyselého glykoproteinu najdeme také v práci Grootvelda et al.³², kteří srovnávali lidský a krysí orosomukoid za účelem použití krysy jako experimentálního zvířete. U krysího orosomukoidu tuto autoři našli navíc píky u 2,14 ppm, který přiřadili protonům skupiny *O*-acetyl-CH₃.

Další poznatky přinesla práce Nicholsona et al.³³, kteří pro studium lidské krevní plazmy použili 750 MHz ¹H a ¹H-¹³C NMR spektroskopie a několika dalších NMR metod. Pro *alfa*-1 kyselý glykoprotein je jako příklad v citované práci uvedeno 600 MHz ¹H-¹³C spektrum.

NMR se ukázala jako relativně rychlá metoda studia primární struktury glykopeptidů orosomukoidu. Aplikace studia mikroheterogenity glykopeptidů u individuálních sér v klinic-



Obr. 2. Primární struktura glycidových jednotek třídy A, B a BF na glykosylovaném místě lidského orosomukoidu. Tetraantennní struktury, vyskytující se na ostatních glykosylačních místech, jsou označeny C a CF. Písmeno F značí fukosu. Podle Schmidta et al.³¹

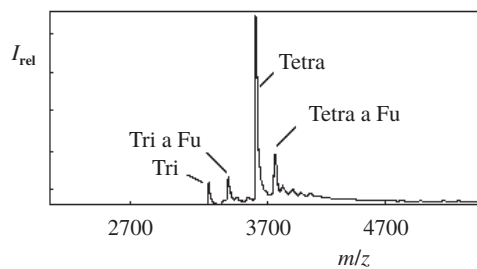


Obr. 3. 500 MHz spin echo ^1H NMR spektrum alifatické oblasti krevní plazmy s píky orosomukoidu (a), samotného orosomukoidu v D_2O (b). Na vložené části (c) jsou zvětšené píky I a II, které odpovídají *N*-acetylm *N*-acetylneuraminové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu. Podle Bella et al.²⁹

ké praxi bude však vyžadovat poměrně náročnou izolaci orosomukoidu, jeho chemickou úpravu a štěpení molekuly peptidasami a glykosidasami. Metody NMR s vysokým rozlišením umožňují přímo stanovit orosomukoid v individuální plazmě, neposkytují však doposud údaje o jeho mikroheterogenitě.

4. Hmotnostní spektrometrie moderními ionizačními metodami

Moderní metody hmotnostní spektrometrie^{28,34-37} (MS), založené na pulsním principu, dávají možnost citlivě a selektivně charakterizovat glykoproteiny z hlediska jak sacharidové tak peptidové části. Pro úspěšné splnění tohoto úkolu je nutno předem připravit glykopeptidy²⁰, např. tryptickým štěpením molekuly glykoproteinu, a ty po jejich rozdělení chromatografickými metodami dále rozštěpit glykosidasami. Pro studium peptidů a glykopeptidů byly použity moderní ionizační metody³⁶, mezi které patří především metoda MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), ESI (Electrospray Ionisation – ionizace elektrosprejem) a metoda FAB (Fast Atom Bombardment). Všechny tyto ionizační metody umožňují studovat velké netěkavé molekuly biopolymerů včetně glykoproteinů a polysacharidů o hmotnostech desítek i více kilodaltonů. Ionizace je při tom tak šetrná, že nedochází ke štěpení molekul, jak je tomu obvykle při ionizaci svazkem elektronů. Při metodě MALDI je glykopeptid nebo oligosacharid dispergován ve velkém nadbytku matrice, představované slabou aromatickou kyselinou (např. skořicovou) a jejími deriváty. Matrice se vzorkem je nanášena na kovovou destičku, která je ozařována laserem (např. pulsním dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm). Zářivá energie absorbovaná matricí je předána molekulám vzorku, které jsou tím převedeny do plynné fáze ve formě protonovaných molekul $(\text{M}+1)^+$. Tyto ionty jsou zavedeny (extrahovány) do analyzátoru hmotnostního spektrometru. Nejčastěji je jím spektrometr typu TOF-MS (Time-Of-Flight MS)³⁵. Ve výzkumu jsou metody jako je tandemová spektroskopie MS/MS, doplněná metodou CID (Collision-Induced-Dissociation).



Obr. 4. MALDI hmotnostní spektrum polysacharidových forem orosomukoidu. Tetra – tetraantenní forma, Tri – triantenní forma, Fu – formy obsahují navíc fukosu. I_{rel} relativní intenzita, m/z relativní molekulová hmotnost

Tabulka I

Zastoupení různých antenních glykoforem v místě substituce glykanů vázaných na molekulu orosomukoidu přes asparagin (Asn). Hodnoty v procentech byly převzaty z prací Sutona et al.³⁸ a Treuheita et al.¹⁷

Místo vazby	Antennost			Cit.
	bi-	tri-	tetra-	
Asn 16	12	87	1	38
	9	91	0	17
Asn 38	–	–	–	38
	61	25	14	17
Asn 54	9	40	51	38
	9	32	59	17
Asn 75	2	28	70	38
	0	21	79	17
Asn 85	–	–	–	38
	0	15	85	17
<i>Celkově</i>	<i>14</i>	<i>38</i>	<i>48</i>	<i>17</i>

Metodu MALDI použili při analýze pěti glykosylačních míst v molekule orosomukoidu Treuheit et al.¹⁷ Příklad MS spektra desialyzovaných forem je na obr. 4, na kterém jsou píky odpovídající pozitivním molekulovým iontům čtyř různých antenních glykoforem. Zastoupení těchto forem v různých glykosylačních místech je v tabulce I. Autoři¹⁷ dále zkoumali zastoupení jednotlivých antenních forem v různých glykosylačních místech I až V u tří orosomukoidových subfrakcí (variant). Tyto varianty získali dělením orosomukoidu lektinovou chromatografií na konkanavalinu A (Con A). Nejpevnější vazba s lektinem je u subfrakce R, středně pevná vazba u subfrakce WR a subfrakce U obsahuje variantu orosomukoidu, která se neváže s lektinem. Výsledky uvedené ve třech tabulkách citované práce¹⁷ platí pro komerční (tedy směsný) orosomukoid. Zajímavé by bylo toto dělení a následné MS studium u individuálních normálních a hlavně patologických sér, kde se dá očekávat různé zastoupení glykoforem.

Distribucí glykanových forem u směsného orosomukoidu se zabývali také Sutton et al.³⁸ Tito autoři metodou MALDI monitorovali sekvenování oligosacharidů po digesti glykopeptidů exoglykosidasami. Podle autorů jde o rychlou a citlivou metodu, vyžadující 200 pmol jednotlivých glykopeptidů. Výsledky jsou uvedeny společně s hodnotami z práce Treuhei-

ta et al.¹⁷ v tabulce I. Relativně malé rozdíly v zastoupení jednotlivých forem v různých glykosylačních místech se dají vysvětlit podobným, i když ne totožným způsobem přípravy štěpů orosomukoidu, a hlavně velkou mikroheterogenitou tohoto glykoproteinu, která se promítá do komerčního preparátu.

Podobně jako z lidského krevního séra byl z hovězího séra izolován orosomukoid, označovaný v literatuře jako hovězí α_1 -kyselý glykoprotein³⁹. Pro detekci glycidové složky ve fragmentech glykoproteinu po jeho enzymovém štěpení bylo použito ionizace elektrosprejem (ESI). Eluát vytékající z chromatografického sloupce tenkou kovovou kapilárou byl účinnkem silného elektrického pole přeměněn v jemnou mlhu mnohonásobně nabitých částic. Po odpaření rozpouštědla byly ionty zavedeny do prvního MS analyzátoru, který rozdělil proud iontů na mateřské ionty. Tyto ionty pokračovaly ve své dráze a vstoupily do komůrky s kolizním plynem (argonem). Zde došlo k jejich disociaci na dceřiné ionty (metoda CID). V literatuře je celý uvedený postup označován jako LC/ES-CID/MS/MS. Metoda umožňuje selektivní detekci glykopeptidů vedle peptidů. U glykopeptidů je totiž přítomen ion m/z 204 (*N*-acetylhexosaminový oxoniový ion) a ion m/z 366 (Hex-HexNac⁺). Jako možnou praktickou aplikaci navrhuje autoři studium glykoproteinů u některých onemocnění skotu.

V poslední době se Stubbsovi a spol.⁴⁰ podařilo přechistit tetraantenní oligosacharidy, připravené z lidského asialyzovalného orosomukoidu. Metodou MALDI a protonovou NMR s velkým rozlišením byla určena polyaktosaminová extenze tetraantenního glykanu. Autorům se osvědčila tyrosinamidová derivatizace, která umožnila sestavit oligosacharidovou knihovnu.

Dobré služby prokázala metoda LC/ES při hledání „sialyl Lewis(x) antigenu“, jehož umístění se předpokládá na některém z pěti *N*-glykosylačních míst molekuly orosomukoidu. Při těchto pokusech⁴¹ byl v řady glykopeptidů sledován oxoniový ion o m/z 803. Analýza ukázala, že antigen je přítomen ve všech místech obsahujících *N*-glykopeptidy.

Protože je stále živá problematika vazby léků na orosomukoid, byly modifikovány histidiny a tyrosiny diethylpyrokarbonátem⁴¹. Metody (HPLC-ESI/MS) a MALDI ukázaly na rozdílnost v reaktivitě histidinu 97 a histidinu 100. Byly také modifikovány lysiny v závislosti na pH. Podle autorů může být výsledek využito pro navržení experimentů pro posouzení vazby některých léčiv na uvedené aminokyseliny.

Hmotnostní spektrometrie se ukázala jako velmi dobrá a relativně rychlá metoda pro určování struktury oligosacharidové části glykoproteinů, přičemž množství látky potřebné ke studiu je přítom velice malé.

5. Vibrační Ramanova optická aktivita

Při Ramanově spektroskopii dochází při excitaci molekul laserovým zářením ke vzniku rozptýleného záření o vlnových délkách kratších i delších než je intenzivní záření excitační. Rozdíly mezi vlnocet excitačního záření a jednotlivých vlnocetů záření rozptýleného (tzv. Ramanův posun) odpovídají přechodům ve vibračně-rotálních stavech molekuly. Tento klasický Ramanův jev byl doplněn metodou vibrační Ramanovy optické aktivity (VROA), označované také jako Ramanova optická aktivita^{55,56} (ROA). Při technice ROA se měří malé rozdíly v Ramanově rozptylu pravé a levé složky kruhové

polarizovaného excitačního laserového záření. Je tedy ROA blízká technice vibračního cirkulárního dichroismu (VCD).

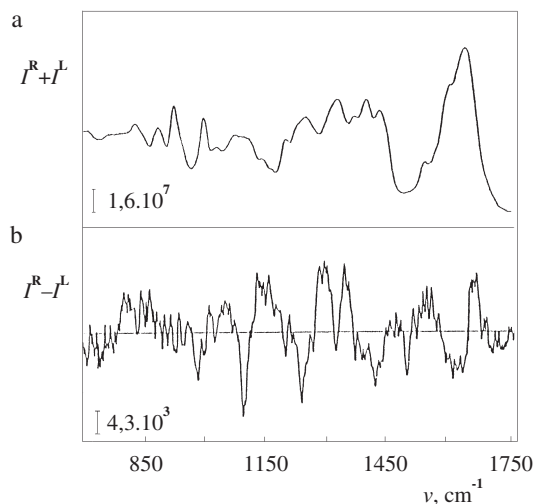
ROA spektra poskytují informaci o roztokové struktuře biopolymerů⁵⁷, včetně glykoproteinů⁵⁸. Zkoumání terciární struktury a dynamiky proteinů je možné u nativních i rozvinutých molekul. U glykoproteinů, jako je např. orosomukoid, se dají získat informace jak o peptidové tak cukerné části molekuly. Mimoto je možno ze spekter vyčíst vzájemné ovlivňování obou složek a posoudit stabilitu molekuly. Se spektrem orosomukoidu se můžeme setkat v práci Barrona et al.⁵⁷, kteří použili metodu s uspořádáním zpětného rozptylu (Backscattered Raman). Ostrost některých ROA maxim (ROA pásů) ukazuje na nezvyklou rigiditu tohoto glykoproteinu (obr. 5). Z širokého pozitivního maxima při 1060 cm^{-1} a velmi ostrého pozitivního maxima při 1308 cm^{-1} se dá soudit na vysoký obsah struktury typu *beta* skládaného listu a nízký obsah *alfa* šroubovice. Rozvoj metody ROA po instrumentální i teoretické stránce vytváří perspektivu získání dalších údajů o terciární struktuře biopolymerů ve vodných roztocích.

Další možností využití Ramanova jevu ke zkoumání orosomukoidu je metoda SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). Touto metodou studují zbytky kyseliny sialové v molekule orosomukoidu až do koncentrace $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a to jak v molekulách izolovaných z normálních sér tak z ascitické kapaliny pacientů trpících zhoubnými nádory⁵⁹.

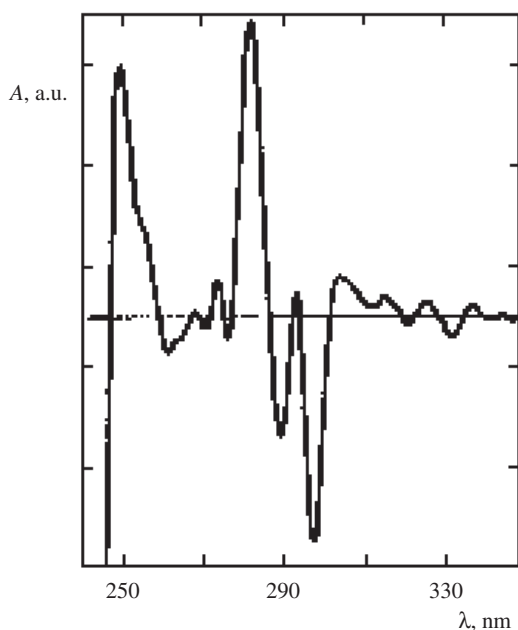
6. Metody spektroskopické (TPDS, CD)

Spektrofotometrie bílkovin v ultrafialové oblasti je založena na poznatku, že aromatické aminokyseliny (tyrosin, tryptofan, fenylalanin) absorbují ultrafialové záření v oblasti 240 až 300 nm. Tato skutečnost byla uplatněna při určení absorpčního koeficientu^{1,3} orosomukoidu $E_{280}^{1\%}$ (1 %) = 8,9 a molární absorptivity $\epsilon_{278} = 3,57 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

Větší informace o aromatických aminokyselinách poskytl metoda TPDS (Temperature Perturbation Difference Spectrophotometry) a derivační spektroskopie. Při této metodě se



Obr. 5. „Backscattered“ Ramanovo spektrum (a), RAO spektrum (b) orosomukoidu v acetátovém pufru. I^R a I^L – intenzita pravé a levotočivé složky záření, ν – vlnocet v cm^{-1} . Podle Barrona et al.⁴⁵



Obr. 6. Čtvrtá derivace absorpčního spektra orosomukoidu ve vodě při pH 10. Podle Karpenka et al.⁵³ Absorbance *A* byla z uvedené práce převzata v jednotkách a.u. (arbitrary units), korektnější je užit rozměr (nm⁻⁴)

měří rozdíl absorbance mezi dvěma kyvetami, naplněnými roztoky o stejné koncentraci. Při měření je jedna kyveta udržována na konstantní teplotě, zatímco teplota v druhé kyvetě je postupně zvyšována. Po každém zvýšení teploty je zaznamenáno absorpční spektrum.

Metodou TPDS bylo zjištěno⁴⁸, že molekula orosomukoidu obsahuje čtyři pro rozpouštědlo přístupné (volné) tyrosyly zatímco zbývajících osm tyrosylů je maskováno v hydrofobním jádru molekuly. Počet exponovaných tryptofylových zbytků byl nalezen blízký jedničce (z celkového počtu tří tryptofylů). Expozici tyrosylů orosomukoidu se dále zabývali Janáčková a Karpenko⁴⁹ při studiu termální stability této bílkoviny. Tito autoři zjistili spektrofotometrickou titrací tři druhy tyrosylů⁵⁰, jejichž počet ($n_1 = 3$, $n_2 = 7$, $n_3 = 2$) je v soulase s hodnotami v jejich předchozí práci⁵¹.

Současná technika dovoluje získat derivační spektra⁵² numerickou derivací. Největšího uplatnění našla především derivační spektra čtvrtého řádu. Touto technikou byly u orosomukoidu v oblasti 245 až 300 nm pozorovány dva výrazně kladné a dva záporné píky⁵³ (obr. 6). Pro posouzení uložení zbytků aromatických aminokyselin v molekule orosomukoidu má především význam pozitivní pik při 250 nm, příslušející zbytkům fenylalaninu. Interpretace derivačního spektra ukázala, že 1 až 2 zbytky fenylalaninů z celkového počtu 12 jsou exponovány vodou jako rozpouštědlem.

Orosomukoid byl také zkoumán metodou cirkulárního dichroismu (CD) a optické rotační disperze (ORD), které dávají obraz sekundární struktury. Ve starší práci našli Yamagami a Schmid⁵⁴ 8 % *alfa*-helixu, 60 % *beta* struktury a 10 % *beta* ohybu II. typu. V dalších pracích za zlepšených experimentálních a interpretačních podmínek byl upřesněn obsah *alfa*-helixu na hodnotu kolem 20 %. K této hodnotě se přiblížili

Aubert a Loucheux-Lefebvre⁵⁵, kteří měřením i predikcí udávají shodně 21 % *alfa*-helixu. Stejná hodnota se dá odečíst také z obrázku v práci⁵⁶, pojednávající o vlivu methanolu na strukturu orosomukoidu. CD spektrum ORS ve fosfátovém pufru s charakteristickým intenzivním negativním píkem je v práci Kodíčka et al.⁵⁷

Další metodou bylo měření fluorescence a zvláště pak časově rozlišené fluorescence. U orosomukoidu metoda pikosekundové fluorescence umožnila odhadnout přístupnost tryptofylových zbytků⁵⁸ a to v soulase s výsledky získanými TPDS.

Vzhledem k relativní jednoduchosti spektroskopických metod a jejich dalšímu rozvoji se dá v blízké budoucnosti počítat s praktickými aplikacemi v biochemii a lékařství.

7. Závěr

Fyzikálně-chemické metody rozšířily a zpřesnily poznatky o struktuře orosomukoidu. Na základě rezonance vodíků na cukerných zbytcích byly moderními NMR metodami určeny typy anténních struktur jednotlivých oligosacharidů. Méně úspěšná byla NMR při studiu orosomukoidu v krevní plazmě, kde je možno stanovit jeho koncentraci avšak bez určení jeho mikroheterogenity. Metody hmotnostní spektrometrie, užívající ionizačních metod jako je MALDI a ESI, umožnily po enzymové a chemické úpravě studovat jak cukernou, tak peptidickou část molekuly orosomukoidu. Dokonalá technika hmotnostní spektrometrie dovolila pracovat s pikogramovým množstvím vzorků. Rozlišení jednotlivých oligomerů, potřebné pro posouzení vztahu mezi strukturou orosomukoidu a klinickým stavem pacienta, vyžaduje prozatím poměrně náročnou enzymovou a chemickou modifikaci, následovanou chromatografickým dělením. Z dalších metod je pro studium terciární struktury perspektivní metoda ROA a ORD. Spektroskopické metody umožnily citlivě posuzovat postavení aromatických aminokyselin v molekule orosomukoidu. Tato skupina metod, vzhledem ke své relativní aparaturní jednoduchosti, se jeví jako perspektivní pro bližší poznání peptidické části molekuly orosomukoidu, např. z hlediska jeho hydrofobních interakcí.

LITERATURA

- Schultze H. E., Heremans J. F.: *Molecular Biology of Human Plasma Proteins*. Elsevier, Amsterdam 1966.
- Jeanloz R. W., v knize: *Glycoproteins* (Gottschalk A., ed.), 2. vyd., kap. 6. Elsevier, Amsterdam 1972.
- Lehman J.: *Carbohydrates Structure and Biology*. G. Thieme, Stuttgart 1998.
- Musil J.: *Glykoproteiny*. Avicenum, Praha 1978.
- Schwick H. G., Haupt H.: *The Plasma Proteins IV*, 167 (1984).
- Schmid K., v knize: *Alpha₁-acid glycoprotein Genetics, Biochemistry, Physiological Functions, and Pharmacology* (Baumann P., Eap C. B., Muller W. E., Tillemant J. P., ed.), str. 7. Alan R. Liss, New York 1989.
- Schultz D. R., Arnold P. I.: *Semin. Arthrit. Rheumat.* 20, 129 (1990).
- Brdička R., Březina M., Kalous V.: *Talanta* 12, 1149 (1965).

9. Mehl J., Golden F., Winzler R. J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72, 110 (1949).
10. Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 19, 1039 (1954).
11. Weimer H. F., Mehl J. W., Winzler R. J.: J. Biol. Chem. 185, 561 (1950).
12. Schmid K.: J. Am. Chem. Soc. 75, 60 (1953).
13. Bezkorovainy A., Winzler R. J.: Biochim. Biophys. Acta 49, 559 (1961).
14. Kalous V., Poncová M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 30, 737 (1965).
15. Karpenko V., Pavlíček Z., Kalous V.: Biochim. Biophys. Acta 154, 245 (1968).
16. Smith K. D., Elliott M. A., Elliott H. G., McLaughlin C. M., Wightman P., Wood G. C.: J. Chromatogr., B 661, 7 (1994).
17. Treuheit M. J., Costello C. E., Halsall H. B.: Biochem. J. 283, 105 (1992).
18. Smid K., Kaufman H., Satoko I., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S.: Biochemistry 12, 2711 (1973).
19. Schmid K., Burgi W., Collins J. H., Nanno S.: Biochemistry 13, 2694 (1974).
20. Schmid K., Nimberg R. B., Yamaguchi H., Binette J. P.: Biochim. Biophys. Acta 492, 291 (1977).
21. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata J.: J. Biol. Chem. 256, 8476 (1981).
22. De Graaf T. W., Van Ommen E. C. R., Van der Stelt M. E., Kerstens P. J. S. M., Boerbooms A. M. T., Van Dijk W.: J. Rheumatol. 21, 2209 (1994).
23. Van Dijk W., Havenaar E. C., Brinkman-Van der Linden E. C. M.: Glycoconjugate J. 12, 227 (1995).
24. Yuasa I., Suenaga K., Umetsu K.: Hum. Genet. 77, 255 (1987).
25. Günter H.: *NMR Spectroscopy*, 2. vyd. Wiley, Chichester 1995.
26. Sanders K. M., Hunter B. K.: *Modern NMR Spectroscopy*, 2. vyd. Oxford Univ. Press, Oxford 1993.
27. Šraml J.: *Dvourozměrná NMR*. Academia, Praha 1978.
28. Van Halbeek H., v knize: *Guide to Techniques in Glycobiology* (Lennarz W. J., Hart G. W., ed.), sv. 230. Academic Press, San Diego 1996.
29. Bell J. D., Brown J. K., Nicholson J. K., Sadler P. J.: FEBS Lett. 215, 311 (1987).
30. Fournet B., Montreuil J., Stecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Binette J. P., Schmid K.: Biochemistry 17, 5206 (1978).
31. Schmid K., Binette J. P., Dorland L., Vliegenthart J. F. G., Fournet B., Montreuil J.: Biochim. Biophys. Acta 581, 356 (1979).
32. Grootveld M., Claxson A. W. D., Chander Ch. L., Haycock P., Blake D. R., Hawkes G. E.: FEBS Lett. 322, 266 (1993).
33. Nicholson J. K., Foxall P. J. D., Spraud M., Farrant R. D., Lindon J. C.: Anal. Chem. 67, 793 (1995).
34. Townsend R. R., v knize: *Biological Mass Spectrometry* (McCloskey J. A., ed.). Elsevier, Amsterdam 1990.
35. Kalous V.: *Základy fyzikálně chemických metod*. SNTL, Praha 1986.
36. Zdráhal Z., Plocek J., Konečný P., Chmelík J.: Chem. Listy 91, 811 (1997).
37. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Ryska M.: Chem. Listy 91, 2 (1997).
38. Sutton Ch. W., O'Neil J. A., Cottrel J. S.: Anal. Biochem. 218, 34 (1994).
39. Hunter A. P., Games D. E.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 42 (1995).
40. Stubbs H. J., Shia M. A., Rice K. G.: Anal. Biochem. 247, 357 (1997).
41. Dage J. L., Ackermann B. L., Halsall H. B.: Glycobiology 8, 755 (1998).
42. Dage J. L., Sun H., Halsall H. B.: Anal. Biochem. 257, 176 (1998).
43. Barron L. D.: Adv. Spectrosc. 21, 235 (1993).
44. Hug W.: Chimia 48, 386 (1994).
45. Barron L. D., Ford S. J., Bell A. F., Wilson G., Hecht L., Cooper A.: Faraday Discuss. Chem. Soc. 99, 217 (1994).
46. Bell A. F., Ford S. J., Hecht L., Wilson G., Barron L. D.: Int. J. Biol. Macromol. 16, 277 (1994).
47. Sokolov K. V., Byramova N. E., Mochalova L. V., Tuzikov A. B., Shivan S. D., Bovin N. V., Nabiev I. R.: Appl. Spectrosc. 47, 535 (1993).
48. Kálal P., Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 49, 165 (1984).
49. Karpenko V., Horálková J., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 59, 2190 (1994).
50. Karpenko V., Horálková J., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1533 (1997).
51. Svobodová X., Karpenko V., Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 42, 1742 (1977).
52. Anzenbacher P., Hudeček J.: Chem. Listy 75, 180 (1981).
53. Karpenko V., Šinkorová L., Janáčková L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 2701 (1993).
54. Yamagami K., Schmid K.: J. Biol. Chem. 242, 4176 (1967).
55. Aubert J.-P., Loucheux-Lefebvre M. H.: Arch. Biochem. Biophys. 175, 400 (1976).
56. Karpenko V., Šinkorová L., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 57, 641 (1992).
57. Kodíček M., Infazón A., Karpenko V.: Biochim. Biophys. Acta 1246, 10 (1995).
58. Hof M., Vajda S., Fidler V., Karpenko V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 61, 808 (1996).

V. Kalous (Malostranské nám. 10, Prague): Structure of Orosomuroid – An Example of the Study of a Glycoprotein Investigated by Physicochemical Methods

Up-to-date information acquired by physicochemical methods (NMR, MS, ROA, TPDS) about structure of orosomuroid (α -1 acid glycoprotein) helps biochemists to deal with problems in which glycoproteins are involved.

KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA SACHARIDŮ

JITKA ŽÍDKOVÁ a JOSEF CHMELÍK

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno, jittak@iach.cz, chmelik@iach.cz

Došlo dne 18.XI.1999

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, sacharidy

Obsah

1. Úvod
2. Elektrolyty pro kapilární elektroforézu sacharidů
 - 2.1. Elektroforéza v silně alkalickém elektrolytu
 - 2.2. Komplexy sacharidů s ionty
 - 2.2.1. Komplexy sacharidů s boráty
 - 2.2.2. Komplexy sacharidů s kovy
3. Kapilární kolona
4. Detekce sacharidů
 - 4.1. Detekce nederivatizovaných sacharidů
 - 4.1.1. Přímá detekce sacharidů v UV oblasti
 - 4.1.2. Nepřímá detekce
 - 4.1.3. Elektrochemická detekce
 - 4.2. Dynamicky značené sacharidy
5. Derivatizace sacharidů
 - 5.1. Reduktivní aminace
 - 5.2. Bazicky katalyzovaná kondenzace redukujícího sacharidu s PMP nebo PMPMP
 - 5.3. Derivatizace sacharidů s karboxylovou skupinou
6. Využití kapilární elektroforézy sacharidů v praxi
 - 6.1. Stanovení monosacharidů a disacharidů
 - 6.2. Stanovení oligosacharidů a polysacharidů
7. Příklady využití sacharidů jako aditiv v kapilární elektroforéze
8. Závěr

1. Úvod

Sacharidy tvoří většinu organických materiálů na Zemi. Hrají roli ve všech formách života, jako zásoba a zdroj energie a metabolické meziprodukty. Tvoří základy struktury buněčných stěn rostlin, hub a bakterií. Poslední studia ukazují, že hrají také důležitou roli v procesech buněčného rozpoznávání. Ovlivňují konformace, metabolismus i biologickou aktivitu molekul glykoproteinů a glykolipidů. Z těchto důvodů vzrůstá zájem o analýzy sacharidů, a to jak o relativně jednoduchá stanovení jednotlivých monosacharidů, tak o rozlišení mikroheterogenit oligosacharidů. Ty mohou například ovlivnit bezpečnost a účinnost terapeutických glykoproteinů jako je erytropoietin nebo tkáňový typ plazminogenního aktivátoru, nebo léků založených na sacharidické složce jako tetrasacharid sialyl Lewis^x. Ten zprostředkovává vazbu bílých krvinek

na specifické receptory v cévách a jejich následný pohyb z krevního řečiště ke tkáním, stejně jako beta-fectin, který je rozeznáván neutrofily a spouští imunitní odezvu proti nemocím působeným viry nebo kvasinkami¹.

Stanovení sacharidů je komplikováno jejich izomerií. Jen monosacharidů existuje více než 100, mohou zaujímat různé konformace a mohou být vázány třemi až čtyřmi různými způsoby k monosacharidům jiným. Navíc typ glykosidické vazby může být buď v α nebo β konfiguraci. Tři různé monosacharidy mohou tedy tvořit více než 1000 trisacharidů. Struktury oligo- a polysacharidů mohou být buď lineární, cyklické nebo větvené. Dále sacharidy obsahují substituenty jako pyruvátové, acetátové, fosfátové a sulfátové estery, methylethery, aminoskupiny a další.

Existence velkého množství různých typů sacharidů, které se od sebe často jen velmi málo liší, znesnadňuje identifikaci jednotlivých sacharidů ve směsích. Navíc jsou velmi polární a netěkavé, postrádají snadno ionizovatelné skupiny a většina z nich neabsorbuje v analyticky využitelné oblasti světelného spektra ani nefluoreskuje, což brání citlivé detekci¹.

Metod pro stanovení sacharidů bylo vyvinuto několik. Patří mezi ně NMR spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, různé chromatografické a elektroforetické techniky. Jako vhodná separační technika může být použita kapalinová chromatografie a elektroforéza (kapilární, nebo v polyakrylamidovém gelu). Nejvhodnější z kapalinových chromatografií se jeví vysoce účinná ionexová chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí (HPIC PAD). Pomocí této techniky jsou detegovány redukující i neredukující sacharidy bez chemické derivatizace a citlivost je nižší než 50 nM, navíc se sacharidy neinteraguje většina anorganických iontů a karboxylových kyselin². Pomocí této metody mohou být separovány látky lišící se jednou z vazeb³, jako maltosa, isomaltosa a cellobiosa, nebo maltooligosacharidy až do stupně polymerace 30.

Stejně tak kapilární elektroforéza je vhodná alternativa pro stanovení mono a oligosacharidů i fragmentů glykoproteinů. Díky její velké účinnosti můžeme v krátkém separačním čase dosáhnout vysokého rozlišení a reprodukovatelné mikrokvantifikace. Výhodná je nepatrná spotřeba vzorku – detekční limity se pohybují ve speciálních případech v oblasti piko až attomolů. Proti kapalinové chromatografii je výhodná také nižší cena zařízení. Kapilární elektroforéza má ale také nevýhody: nízkou kapacitu při preparacích, nebezpečí ucpání kapiláry, nízkou reprodukovatelnost analýzy při různých koncentracích solí ve vzorcích¹. Přehledné práce na toto téma napsali El Rassi a Mechref⁴, El Rassi⁵ a Oefner a Scherz¹.

Pro stanovení sacharidů pomocí kapilární elektroforézy je nutné zajistit, aby sacharidy byly nabitě a detegovatelné. Některé sacharidy náboj mají, jsou to: aldonové kyseliny, uronové kyseliny, sialové kyseliny, aminosacharidy a sacharidy složené ze sulfatovaných sacharidů, jako chondroitin, dermatan, keratan a heparin⁵. Neutrálním sacharidům je možné náboj udělit zvýšením pH do silně alkalické oblasti, kde dochází k jejich disociaci, vytvořením komplexů sacharidů s ionty, nebo derivatizací⁵.

Sacharidy je možné detegovat elektrochemicky pomocí

oxidace na povrchu kovových elektrod. U detekce v optické oblasti máme několik možností. Některé sacharidy absorbují v UV oblasti, pro neabsorbující použijeme nepřímou detekci (do roztoku přidáme látku, která absorbuje při určité vlnové délce, v zóně analytu je tato látka vytěsněna a na záznamu nalezneme negativní pík), nebo derivatizací připravíme deriváty sacharidů absorbující v ultrafialové/viditelné oblasti, nebo fluoreskující⁴.

2. Elektrolyty pro kapilární elektroforézu sacharidů

2.1. Elektroforéza v silně alkalickém elektrolytu (v přítomnosti elektroosmotického toku)

Pořadí migrace sacharidů je závislé na stupni ionizace. Sacharidy, které disociují nejméně, dosáhnou detektoru jako první, protože mají menší schopnost migrovat proti elektroosmotickému toku v nepokryté křemenné kapiláře. Rychlost elektroosmotického toku je o řád vyšší, než rychlost elektromigrace. Disociační konstanty sacharidů jsou v rozmezí 10^{-12} – 10^{-14} (viz tabulka I) (cit.⁵). Jako elektrolyty se používají roztoky hydroxidů⁶ sodných, draselných a lithných o pH vyšším než 12.

Redukující sacharidy jsou ionizovány lépe, což je způsobeno kyselým charakterem poloacetalové skupiny⁷. Z tabulky I můžeme odvodit, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin roste acidita sacharidů. Přítomnost intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami a aniontem kyslíku může vést ke změnám kyselosti, vodíkové můstky například stabilizují vazbou vznikající iontový náboj. To vysvětluje nižší kyselost a vyšší mobilitu deoxy-D-ribosy v porovnání s D-ribosou, protože aniontový kyslík na C1 je schopný vazby s přilehlou hydroxylovou skupinou na C2 u D-ribosy, taková vazba nemůže existovat u deoxy-sloučenin⁵.

2.2. Komplexy sacharidů s ionty

Sacharidy tvoří komplexy s anionty i kationty. Z aniontů se nejčastěji používá komplexace boráty, možné je vytvořit i komplexy sacharidů s germananem⁹, cínčitánem¹⁰, arsenitanem¹¹, molybdenanem¹², wolframanem¹⁰ nebo vanadičnanem¹³. Z kationtů jsou nejčastěji používány vápenaté¹⁴, lanthanité¹⁵ a měďnaté¹⁶ kationty.

2.2.1. Komplexy sacharidů s boráty

Ve vodném prostředí se kyselina boritá chová jako Lewisova kyselina:



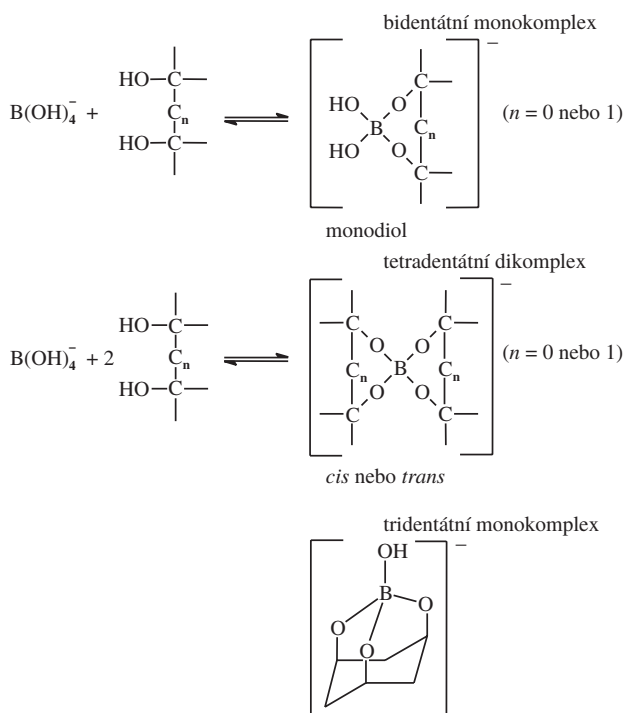
V alkalické oblasti je rovnováha této reakce silně posunuta doprava. Z tohoto důvodu reagují sacharidy s tetrahydroborátovým aniontem a tvoří následující komplexy¹⁷ (obr. 1).

Struktura sacharidů poskytuje možnost tvorby různých forem, jak je zřejmé ze schématu 1 na příkladu glukosy. Ve vodném roztoku se vyskytují jak lineární forma glukosy, tak cyklické formy s pětičlenným i šestičlenným cyklem⁵.

Tabulka I
Ionizační konstanty (hydroxylových skupin) sacharidů ve vodě⁸ při 25 °C

Sloučenina	pK _a	Sloučenina	pK _a
2-Deoxyglukosa	12,52	glycerol	14,40
2-Doxyribosa	12,67	laktosa	11,98
D-Arabinosa	12,43	maltosa	11,94
D-Fruktosa	12,03	D-glukosa	12,35
D-Galaktosa	12,35	D-lyxosa	12,11
D-Glucitol	13,57 ^a	D-manitol	13,50 ^a
D-Manosa	12,08	rafinosa	12,74 ^a
D-Ribosa	12,21	sacharosa	12,51
D-Xylosa	12,29		

^a Měřeno při 18 °C



Obr. 1. Tvorba borátových komplexů se sacharidy

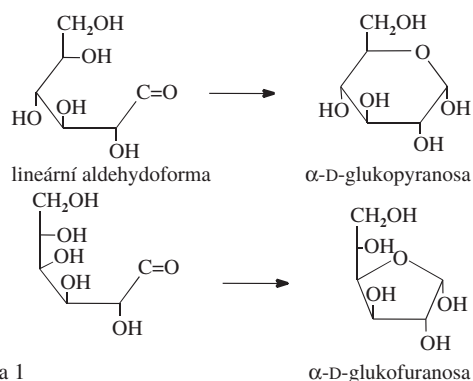


Schéma 1

Jednotlivé formy se liší svými vlastnostmi a to hlavně schopností komplexace. Je známo, že furanosové a lineární formy tvoří silnější borátové komplexy¹⁸. Ke tvorbě komplexů dochází, pokud hydroxylové skupiny sacharidů jsou vhodně situované, tj. pokud je vzdálenost kyslíků v molekule sacharidu stejná jako je vzdálenost kyslíků v molekule borátu. Proto jsou *threo*-1,2-dioly stabilnější než *erythro*-1,2-dioly, *syn*-1,3-dioly než *anti*-1,3-dioly, 1,2-dioly jsou stabilnější než 1,3-dioly¹⁷. Stabilita komplexů je zvyšována počtem hydroxylových skupin.

Komplexace je ovlivněna substituenty sacharidů, závisí na náboji a lokalizaci substituentů. V případě záporně nabitých substituentů poklesne komplexace z důvodu coulombické repulze¹⁹. Ve vodných roztocích vedle sebe koexistují mono a dikomplexy²⁰. Poměr jejich koncentrací je závislý na koncentraci borátů a polyolů, pozici hydroxylových skupin v polyolech a na přítomnosti substituentů. Za běžných podmínek, při kterých se elektroforéza provádí, převládají monokomplexy. Na elektroferogramu tvoří směs mono a dikomplexů jeden pík, protože tvorba dikomplexů z monokomplexů je dynamická⁵.

Tvorba borátových komplexů se sacharidy závisí na pH, a to pro různé sacharidy různě. Optimální pH je v oblasti 10–11 (cit.²¹). Pomocí tvorby komplexů můžeme separovat různé mono a disacharidy, ale také homologní oligoglukany, které se navzájem liší pouze typem interglykosidické vazby jako α -(1-3) vázané laminariny, α -(1-6)isomaltosa a β -(1-4)celooligosacharidy²². Komplexace boráty umožňuje také separace závislé na velikosti založené na rozdílech v poměru náboj/hmotnost. Náboj je stejný pro všechny oligoglukany, nezávislý na velikosti z důvodu ionizace jedné ze tří hydroxylových skupin borátu ($pK_a = 9,14$), elektroforetická mobilita klesá s rostoucí molekulovou velikostí²³.

Dále bylo zjištěno, že zvýšení teploty analýzy zlepší účinnost rozlišení a zkrátí dobu analýzy²⁴. Zvlášť výrazně je tento jev znát na separaci glukosy a xylosy v borátovém elektrolytu. Při teplotě 20 °C trvá analýza více než 40 minut a glukosa a xylosa koeluuji v jednom širokém píku, při teplotě 60 °C trvá analýza 20 minut a glukosa a xylosa jsou rozlišeny na základní linii. Hlavní důvod tohoto jevu je, že se zvýšenou teplotou se sacharidy vyskytují více v otevřených formách a ty se účastní komplexace lépe než formy cyklické²¹. (Při 60 °C je v roztoku 4× více cyklických forem než při 20 °C.)

K detekci se využívá skutečnosti, že borátové komplexy mají vyšší absorpční koeficient při 195 nm než samotné sacharidy²⁴.

2.2.2. Komplexy sacharidů s kovy

Nejstabilnější komplexy tvoří trojmocné kationty, komplexy s dvojmocnými kationty jsou slabší a nejméně silné komplexy vznikají s jednomocnými kationty⁷. Pro stabilitu komplexu je důležitý iontový poloměr kationtu. Nejlépe komplexují kationty s iontovým poloměrem 100–110 pm, například Ca^{2+} nebo La^{3+} .

Silná tvorba komplexů je u sacharidů s uspořádáním hydroxylových skupin axiální–ekvatoriální–axiální²⁵ a 1,3,5-triaxiální u šestičetných kruhů. U pětičetných kruhů je to *cis,cis*-1,2,3-triolové seskupení v konformaci *twist*¹⁵.

Některé sloučeniny nemají a–e–a sekvenci ve stabilnější konformaci, ale mohou ji mít v konformaci méně stabilní (viz

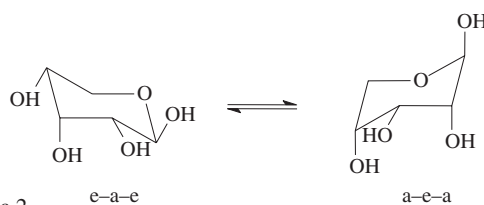


Schéma 2

schéma 2). Takové sacharidy s kovy tvoří také komplexy, které jsou však slabší¹⁵.

Tvorby komplexu se nejčastěji účastní 3 hydroxylové skupiny, komplexy vznikají i se čtyřmi nebo dvěma hydroxylovými skupinami¹⁵. Systémy s kationty jako komplexačními činidly poskytují jinou selektivitu, než elektrolyty borátové. Rozlišení je ale ve většině případů horší než v případě borátů⁵.

3. Kapilární kolona

Pro kapilární elektroforézu sacharidů se používá zpravidla nepokrytá křemenná kapilára. Vnitřní průměr kapiláry se pohybuje od 10 do 75 μ m, celková délka kapiláry bývá 25 až 80 cm, efektivní délka (délka po detekční okénko) 20 až 50 cm. Nejčastěji jsou používány kapiláry vyráběné firmou Polymicro Technology, Phoenix, USA, nebo Chromatographie Service, Langerwehe, SRN.

Elektroforéza sacharidů ve vodných roztocích (borátových nebo roztocích NaOH) se provádí v nepokryté kapiláře, protože většina povrchů podléhá hydrolytické degradaci při $pH > 8,5$. Sacharidy tvoří v alkalickém pH nebo s boráty anionty, které jsou odpuzovány od záporně nabitého povrchu kapiláry, takže nedochází k jejich adsorpci na kapilární stěnu. Pokud však provádíme stanovení v reálných vzorcích, dochází k adsorpci kationtových kontaminantů na povrch kapiláry, to může vést k nereprodukovatelnosti stanovení. Při stanovení glykokonjugátů jako glykoproteinů a glykopeptidů je povrch kapiláry nutné, tyto látky jsou totiž mnohonásobně nabitě a při vysokém poměru povrch/objem u kapiláry mají glykokonjugáty silnou schopnost navázat se na stěnu. Také při stanovení derivátů sacharidů jsou používány pokryté kapiláry. Lze s nimi dosáhnout větší účinnosti separací⁵.

První metoda pro pokrývání kapilár byla popsána Hjer-ténem²⁶, který modifikoval skleněné nebo křemenné trubičky nezesíťovaným polyakrylamidem. To vede k tvorbě monomolekulární vrstvy kovalentně připojené ke kapiláře siloxanovou vazbou. Toto pokrytí má slabou hydrolytickou stabilitu při vysokém pH.

Nebo byl polyakrylamidový povlak připojen ke stěně kapiláry Si–C vazbou²⁷. Takový povlak vykazuje větší stabilitu a reprodukovatelnost v rozsahu pH 2 až 10,5. Huang a spol.²⁸ imobilizovali polyakrylamid přes 7-oct-1-enyl-trimetoxy-silan místo používaného 3-methylakryloxypropyltrialkoxysilanu. Tato vrstva ze zesíťovaného siloxanu je více stabilní. Nashbeh a El Rasi²⁹ pokryli kapiláry polyetherovým povlakem, ty vykazují vysokou separační účinnost pro různé biopolymery. Smith a El Rasi připravili povlak, který mění elektroosmotický tok z anodického na katodický v závislosti na pH použitého pufru³⁰. Povrch kapilár se skládá z nezreagovaných siloxanových skupin, vrstvy pozitivně nabitých kvartérních amonio-

vých funkcí a vrchní hydrofilní vrstvy polyetherového řetězce. Z důvodu přítomnosti pozitivně i negativně nabitých skupin (kvartérních amoniových a nezreagovaných silanolových skupin) se náboj povlaku může měnit z kladného na záporný se změnou pH.

V jiných laboratořích byly připraveny další povlaky: polyvinylpyrolidinový³¹, polyethylenglykolový³², maltosový³³, arylpentafluorový³⁴, polyethyleniminový³⁵, hydrofobně navázaná C18 s adsorbovaným neiontovým tenzidem³⁶, poly(methylglutamátový)³⁷, z polymerního epoxidu³⁸, s navázaným α -laktalbuminem (amfoterní protein)³⁹, polyvinylalkoholový⁴⁰ a celulosový⁴¹.

4. Detekce sacharidů

4.1. Detekce nederivatizovaných sacharidů

4.1.1. Přímá detekce sacharidů v UV oblasti

Jednoduché sacharidy jako je glukosa, fruktosa a sacharosa je možné detegovat přímo při 195 nm. Extinkční koeficient se zvýší, provedeme-li elektroforézu v borátovém pufru²⁴. Sacharidy obsahující *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylglukosamin a zbytky kyseliny sialové je možno detegovat při 200 nm (cit.⁴²) nebo 185 nm (cit.⁴³). Detekce při této vlnové délce není příliš selektivní, protože všechny látky obsahující aminoskupinu vykazují silnou absorpci ve vzdálené ultrafialové oblasti. Kyselé di- a oligosacharidy vzniklé z glykosaminoglykanů je možno detegovat⁴⁴ při 232 nm. Problémem je, že elektrolyt nemůže obsahovat aditiva absorbující v této oblasti spektra. Taková je ovšem většina běžných aditiv.

4.1.2. Nepřímá detekce

Nepřímá detekce je používána u látek postrádajících důležité fyzikální vlastnosti pro přímou detekci. Do elektrolytu přidáme aditivum, které udržuje konstantní signál pozadí v detektoru. Když dosáhne detektoru nedetegovatelný ion, dojde k poklesu koncentrace iontu detegovatelného v zóně analytu, dojde k poklesu signálu pozadí a vznikne negativní pík. Nepřímá detekce může být prováděna ve stejném zařízení jako detekce přímá. Výhodou nepřímé detekce je, že je univerzální a dá se aplikovat na různé typy sloučenin bez potřeby pre- nebo post-kolonové derivatizace a že její citlivost je značná. Sacharidy mohou být detegovány v pikomolových množstvích. Detekční limit pro glukosu⁴⁵ může být i 2 pmoly. Tato metoda je vhodná především pro neredukující sacharidy, které nemohou být derivatizovány⁴⁵.

Jako aditivum jsou vybírány jednou nabitě chromoforní (nebo fluoroforní) ionty s vysokou molární absorptivitou (nebo kvantovou účinností), které neinteragují se stěnou kapiláry ani s analyty a mají efektivní elektroforetickou mobilitu blízko analytům. Díky tomu, že aditiva nesou jeden náboj, mají dobré číslo přeměny (počet molekul chromoforu nahrazených jednou molekulou analytu). Díky přibližně stejné efektivní mobilitě aditiva a analytu nedochází k chvostování migrujícího solutu v zónách. Pro nepřímou detekci sacharidů byla použita tato aditiva: kyselina sorbová⁴⁶ (254 nm), kyselina 5-sulfosalicylová⁴⁴ (214 nm), kyselina 1,2,4-trikarboxy-

benzoová⁴⁴ (214 nm), *p*-nitrofenol⁴⁷ (400 nm) nebo fluorescenční aditiva: kumarin 343 (cit.⁴⁸) a fluorescein⁴⁹.

Důležitou podmínkou úspěšné analýzy je najít vhodnou koncentraci aditiva. Při vyšších koncentracích se snižuje odezva, protože na detekční fotodiodu dopadne méně světla. Při nižších koncentracích citlivost klesá z důvodu relativně vysoké koncentrace hydroxidových iontů, které nahrazují nabitě molekuly analytu v zónách. Citlivost detekce neutrálních sacharidů je limitována, protože při pH přibližně 12 není koncentrace hydroxidových iontů zanedbatelná vůči koncentraci detegovatelného iontu⁴⁵.

4.1.3. Elektrochemická detekce

Tato detekce je založena na elektrochemických změnách na povrchu elektrody. Výhodou metody je, že může být prováděna i ve velmi úzkých kapilárách, protože citlivost není závislá na šířce kapiláry⁴. Citlivost je vysoká, mez detekce je 50 femtomolů pro redukující i neredukující sacharidy⁵⁰. Rozlišujeme amperometrickou detekci při konstantním potenciálu⁵¹ a pulsní amperometrickou detekci⁵².

Nevýhodami je, že detekci je možné provádět pouze při pH vyšším než 12. Dále detekce vykazuje odezvu i pro látky jiné než sacharidy – pro aminokyseliny, peptidy, organické kyseliny, jednoduché alkoholy, nebo alifatické aminy⁵³.

4.2. Dynamicky značené sacharidy

Detekce cyklodextrinů se provádí jako detekce jejich inkluzních komplexů s 2-aminonaftalen-6-sulfonovou kyselinou pomocí laserem indukované fluorescence⁵⁴ (LIF). Když prochází detekčním okénkem komplexy, sledujeme zvýšenou fluorescenci. Detekce cyklodextrinů může být také prováděna pomocí tvorby komplexů s kyselinou benzoovou. Při vzniku komplexů dochází k posunu absorpce v ultrafialové oblasti a komplexy mohou být detegovány jako pokles absorbance v zónách komplexů⁵⁵. Podobným způsobem je využívána tvorba komplexů amylosy a amylopektinu s jodem. Modré komplexy jodu s amylosou nebo amylopektinem jsou detegovány při 560 nm (cit.⁵⁶).

5. Derivatizace sacharidů

Derivatizace se provádí pomocí vazby derivatizačního činidla na redukující skupiny sacharidů. Derivatizační činidlo má zaručit sacharidům citlivou detekci a zároveň náboj v širokém rozsahu pH, nebo hydrofobní charakter, využitelný v micelární elektrokinetické chromatografii. Další kriteria pro úspěšnou derivatizaci jsou: *i*) vysoký výtěžek, *ii*) tvorba jednoduchých produktů, *iii*) nedetegovatelné vedlejší produkty, *iv*) minimální spotřeba vzorku při derivatizaci a čištění, *v*) mírné podmínky, které nevedou ke štěpení sacharidických podjednotek během derivatizace⁴. Pro derivatizaci redukujících sacharidů jsou používány dva rozdílné způsoby, poskytující detekční limity v rozsahu femto a attomolů¹.

5.1. Reduktivní aminace

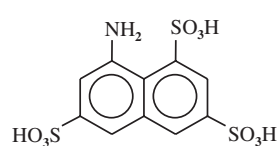
Tento způsob derivatizace je používán nejčastěji. Může být prováděn dvěma způsoby⁵⁷.

a) Derivatizace redukujících sacharidů činidlem s následnou reduktivní aminací.

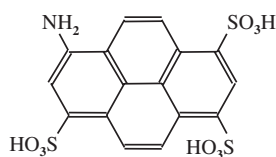
Nejprve reaguje redukující konec sacharidu s primární aminoskupinou sloučeniny chromoforu (fluoroforu) za vzniku

Schiffovy báze, která je následně redukována kyanoborhydridem sodným viz⁵⁸ schéma 3.

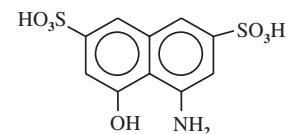
Vzniklé deriváty jsou stabilní v alkalickém i kyselém prostředí. Reakce je téměř kvantitativní a pro monosacharidy



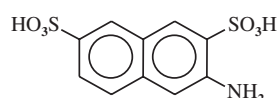
8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS)⁵⁹
 $\lambda_{em} = 520$ nm
He-Cd laser 235 nm



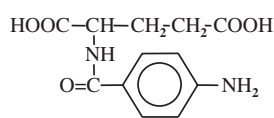
9-aminopyren-1,4,6-trisulfonová kyselina (APTS)⁶⁰
 $\lambda_{exc} = 455$ nm, $\lambda_{em} = 521$ nm
argonový iontový laser 488 nm



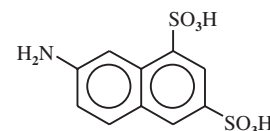
4-amino-5-hydroxynaftalen-2,7-disulfonová kyselina (AHNS)⁶¹
 $\lambda_{em} = 475$ nm
He-Cd laser 235 nm



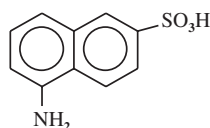
3-aminonaftalen-2,7-disulfonová kyselina (3-ANDA)⁶²
 $\lambda = 235$ nm



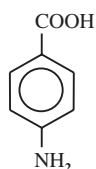
N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamová kyselina (ABG)⁶³
 $\lambda_{max} = 291$ nm



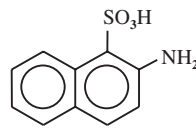
7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (ANDSA)⁶⁴
 $\lambda_{max} = 274$ nm, $\lambda_{exc} = 315$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm
xenon-rtuťová lampa



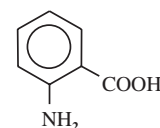
5-aminonaftalen-2-sulfonová kyselina (5-ANSA)⁶²
 $\lambda = 235$ nm, $\lambda_{em} = 475$ nm
He-Cd laser 235 nm



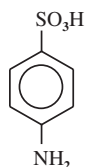
p-aminobenzoová kyselina⁶⁵
 $\lambda_{max} = 285$ nm



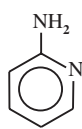
2-aminonaftalen-1-sulfonová kyselina (2-ANSA)⁶²
 $\lambda = 235$ nm



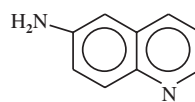
o-aminobenzoová kyselina⁶⁶
 $\lambda_{max} = 285$ nm,
 $\lambda_{exc} = 230$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm



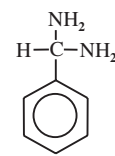
sulfanilová kyselina (SA)⁶⁴
 $\lambda_{max} = 247$ nm



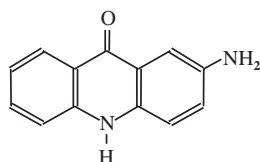
2-aminopiridinn (2-AP)⁶⁷
 $\lambda_{max} = 240$ nm, $\lambda_{em} = 375$ nm
He-Cd laser 325 nm



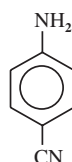
6-aminochinolin (6-AQ)⁶⁸
 $\lambda_{max} = 270$ nm, $\lambda_{max} > 495$ nm
He-Cd laser 325 nm



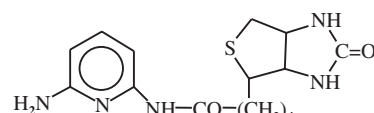
S-(−)-1-phenethylamin⁶⁹
 $\lambda = 200$ nm



2-aminoakridon (2-AA)⁷⁰
 $\lambda_{exc} = 425$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm
argonový iontový laser 320 nm



p-aminobenzonitril⁷¹
 $\lambda_{max} = 285$ nm



2-amino-(amidobiotinyl)pyridin (BAP)⁷²
 $\lambda_{exc} = 345$ nm, $\lambda_{em} = 400$ nm
argonový iontový laser 320 nm

Obr. 2. Činidla používaná pro derivatizaci reduktivní aminací

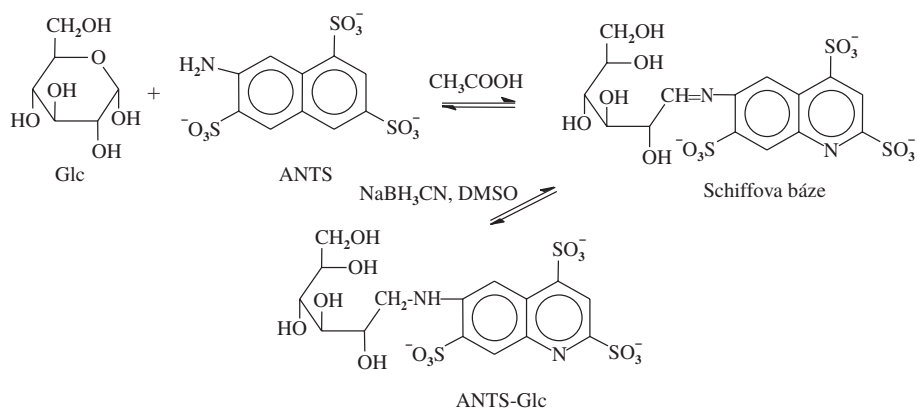


Schéma 3

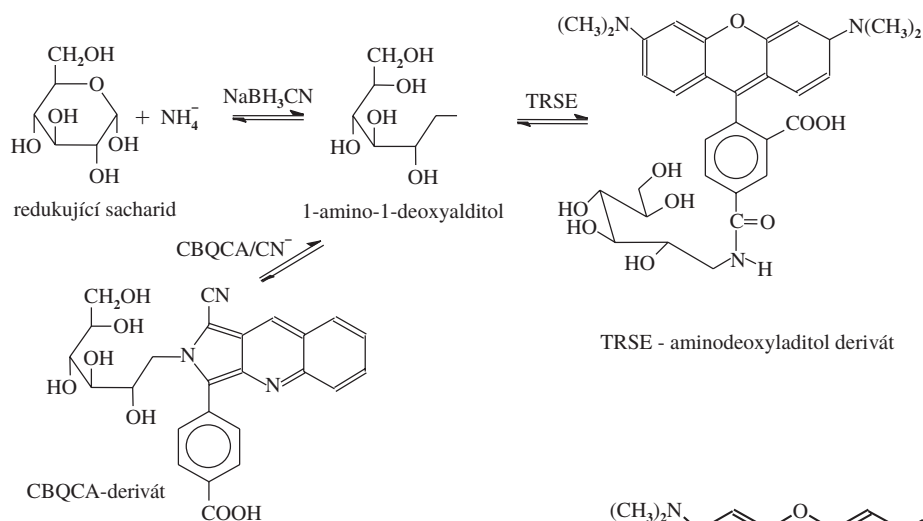


Schéma 4

probíhá bez nežádoucích bočních reakcí jako je β -eliminace, epimerace nebo desialyzace. Činidla používaná pro tento způsob reduktivní aminace jsou uvedena na (obr. 2).

b) Derivatizace redukcujících sacharidů po reduktivní aminaci

Redukující sacharid je při této derivatizaci převeden pomocí amoniaku na 1-amino-1-deoxyderivát. Ten může reagovat se sukcinimidovým esterem 5-karboxy-tetramethylrhodaminu (TRSE) nebo s 3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolinkarboxyaldehydem (CBQCA viz⁵⁸ schéma 4).

Detekční limit CBQCA-derivátu se uvádí řádově femto až attomoly⁷³. Činidlo CBQCA bylo původně vyvinuto pro citlivou detekci aminokyselin a peptidů. Nevýhoda tohoto činidla je přesně definovaný molární poměr sacharidu a činidla, při kterém je možné získat maximální výtěžek. Například molární výtěžek derivatizace galaktosaminu byl vyšší při molárním nadbytku CBQCA 1 až 2, při poměru 0,2 a 5 klesl výtěžek na 1/10. Další nevýhodou je derivatizace aminů přítomných ve vzorcích, které interferují v analýzách a desialyzace při podmínkách nutných pro reduktivní aminaci. Ale na rozdíl od předchozího způsobu derivatizace není nutné odstraňovat nadbytek činidla, protože nezreagované činidlo nefluoreskuje⁷³.

Podobně je tomu v případě TRSE. Činidlo také reaguje s nesacharidickými materiály. Detekční limit sacharidů je 60 molekul⁷⁴. Použitá činidla jsou na schématu 5.

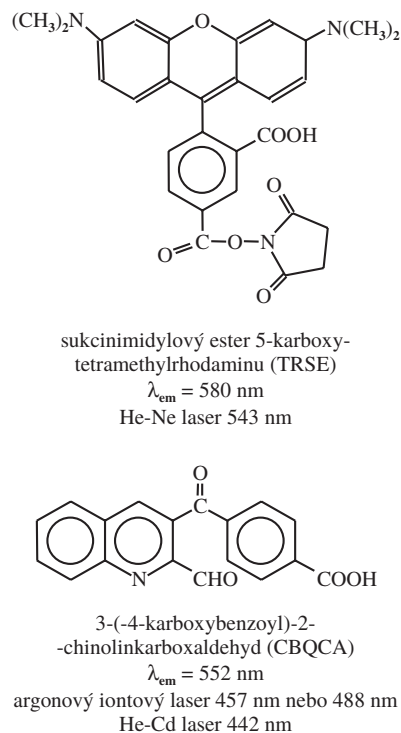


Schéma 5

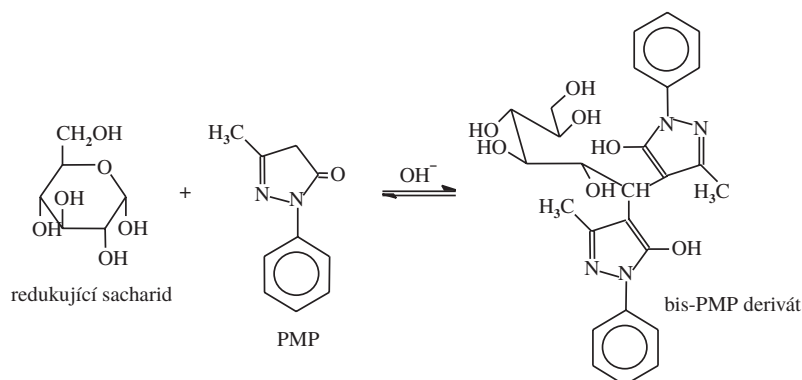


Schéma 6

5.2. Bazicky katalyzovaná kondenzace mezi karbonylovou skupinou redukujiícího sacharidu a 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem (PMP) nebo 1-(*p*-methoxy)fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem (PMPMP)

Průběh reakce je znázorněn⁵⁷ ve schématu 6.

Při reakci vznikají bis-PMP nebo bis-PMPMP deriváty. Činidlo PMPMP je více reaktivní a má o 50 % vyšší citlivost při UV detekci. Díky přítomnosti ketoskupin v pyrazolonovém kruhu je možné využít také elektrochemické detekce, ta dává lineární odezvu v rozsahu 0,5–200 pmolů. Kondenzace je prováděna při alkalických podmínkách pH ~8,3. To znamená, že nedochází k desialyzaci. Nevýhodou je, že pro derivatizaci je třeba velký nadbytek činidla, který může interferovat při analýze. Dále je zde problém při skladování bis-PMP a bis-PMPMP derivátů, které jsou v alkalickém prostředí labilní a mohou tvořit mono-PMP nebo mono-PMPMP deriváty⁷⁵. Činidla PMP a PMPMP jsou znázorněna ve schématu 7.

5.3. Derivatizace sacharidů s karboxylovou skupinou

Pro karboxylované sacharidy se používá derivatizace aminy v přítomnosti karbodiimidu⁷⁶. Reakce je znázorněna ve schématu 8.

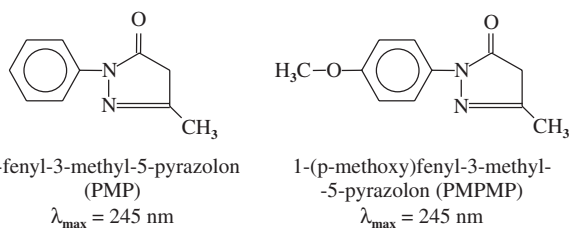


Schéma 7

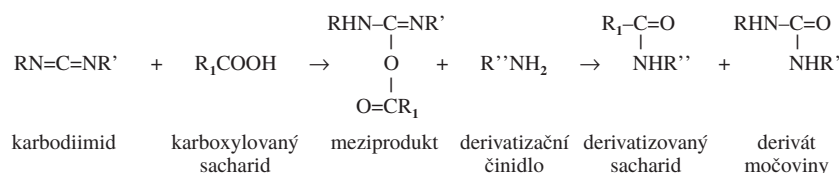


Schéma 8

6. Využití kapilární elektroforézy sacharidů v praxi

Jak bylo popsáno v úvodu, má kapilární elektroforéza sacharidů široké uplatnění v různých oborech: lékařství, farmácii, zemědělství, potravinářství atd. Naše laboratoř se specializuje zejména na stanovení sacharidů v potravinách, proto bude následující kapitola zaměřena na tuto problematiku.

6.1. Stanovení mono-, di- a trisacharidů

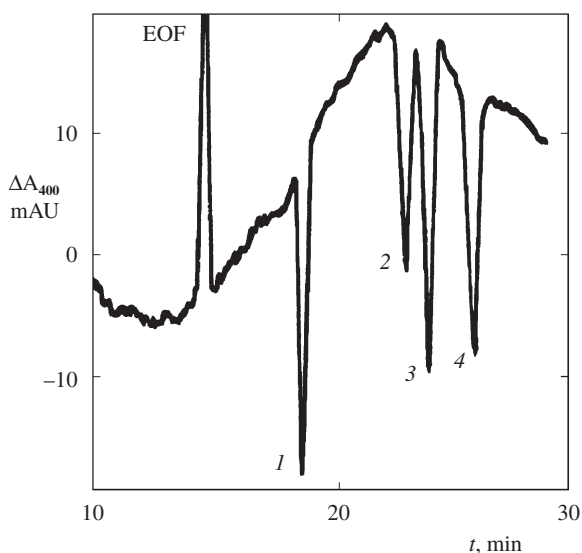
a) Nederivatizované mono-, di- a trisacharidy

Aby bylo sacharidům umožněno migrovat v elektrickém poli je třeba použít speciální elektrolyty. Detekce je prováděna elektrochemicky. Tento způsob byl úspěšně použit na stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v běžných nápojích⁵⁰. Do elektrolytu byly přidány borátové ionty, které zlepšily díky tvorbě komplexů separace sacharidů s blízkými hodnotami pK_a . Tímto způsobem byly stanoveny sacharidy v jablečných šťávách, nebo monitorována aktivita enzymu glukosaoxidasa⁷⁷. Vedle toho byla použita k detekci sacharidů nepřímá detekce. Vzhledem k tomu, že je tato metoda detekce méně citlivá, je možné ji použít pouze pro analýzy koncentrovaných sacharidických roztoků. Například pro stanovení cukerného složení ovocných šťáv⁷⁸. Pro stanovení monosacharidů v ovocných šťávách je možné použít nepřímou detekci pomocí *p*-nitrofenolu jako aditiva⁷⁹ (obr. 3).

Nederivatizované di- a trisacharidy byly analyzovány v elektrolytech s vysokým pH^{50,80} (například trehalosa, sacharosa, laktulosa, celobiosa, rafinosa a stachyosa) za elektrochemické detekce⁵⁰, nebo byla při vysokém pH analyzována sacharosa a maltosa a detegována nepřímou detekcí⁸⁰. Pomocí borátové komplexace lze navzájem oddělit i nepatrné rozdíly v typu vazby mezi stejnými molekulami sacharidů, například glukosové dimery: maltosu, isomaltosu a celobiosu. Separace disacharidů provedli Plocek a Chmelík⁴⁷ (obr. 4).

b) Derivatizované mono-, di- a trisacharidy

Předkolonová derivatizace monosacharidů se provádí, po-



Obr. 3. Stanovení monosacharidů vyskytujících se v ovocných šťávách; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 40 mol.l^{-1} Na_2HPO_4 , pH 12,75, napětí 4 kV, vzorek: 2 mmol.l^{-1} (1) sacharosa, (2) maltosa, (3) glukosa, (4) fruktosa detekce byla prováděna při 400 nm

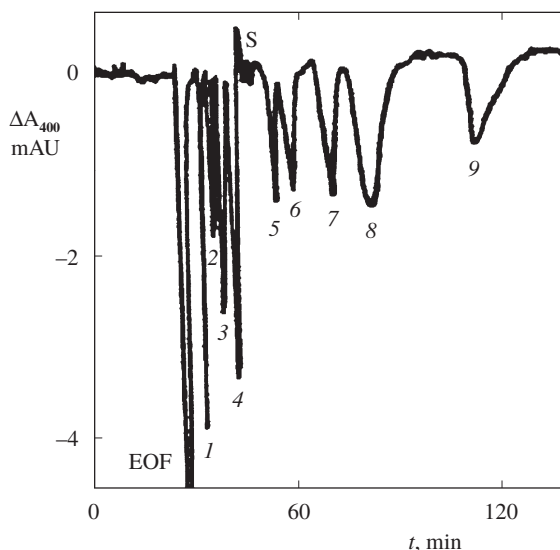
kud je třeba dosáhnout vyšší citlivost detekce analytů, udělit sacharidům náboj, nebo zlepšit slučitelnost sacharidů s určitým elektrolytovým systémem. Sacharidy jsou příliš hydrofilní, aby se mohly rozpustit v micelárních systémech, proto jsou označeny hydrofobními značkami a analyzovány micelární elektrokinetickou chromatografií, jako derivatizační činidlo se používá například 2-aminoakridon⁸¹. Tato sloučenina může být také použita pro enantiomerní separace, když jsou do elektrolytu přidány β -cyklodextriny⁸¹. Pro separace pomocí micelární elektrokinetické chromatografie byla dále použita tato činidla: 4-aminobenzonitril⁷¹, nebo 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon⁸². Fluorescenčně byly monosacharidy značeny pomocí 9-aminopyren-1,4,6-trisulfonové kyseliny^{60,83}. Enantiomerní separace D- a L-monosacharidů jsou prováděny po jejich derivatizaci 2-aminopiridinem, 5-aminonaftalen-2-sulfonovou kyselinou, nebo 4-amino-5-hydroxynaftalen-2,7-disulfonová kyselina v přítomnosti lineárních a cyklických dextrinů⁶¹, nebo S(-)-1-fenylethylaminu⁶⁹. Hydrolyzáty xylanů a hemi-celulos jsou analyzovány pomocí derivatizace *p*-aminobenzoovou kyselinou a rozděleny na základě rozdílné komplexace boráty⁶⁵.

Některé disacharidy včetně gentiobiosy, maltosy, laktosy, celobiosy a melibiosy byly značeny 9-aminopyren-1,4,6-trisulfonovou kyselinou⁸³ a separovány pomocí kapilární elektroforézy.

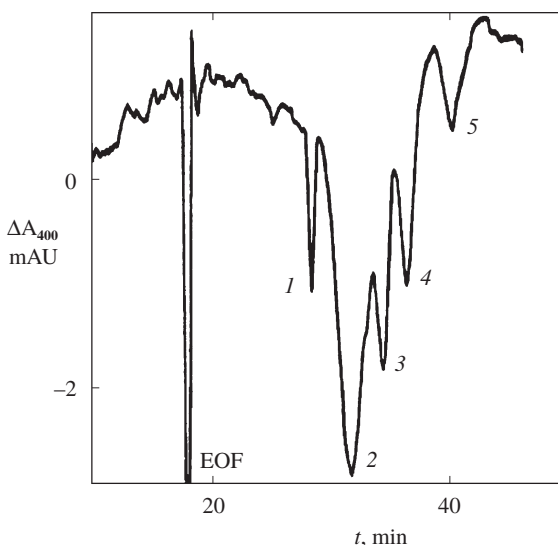
6.2. Stanovení oligosacharidů a polysacharidů

a) Nederivatizované oligosacharidy a polysacharidy

Separace vyšších oligosacharidů je možné provádět pomocí borátové komplexace maximálně do čtyř glukosových jednotek (obr. 5). Vyšší nederivatizované oligosacharidy nelze od sebe pomocí kapilární elektroforézy separovat.



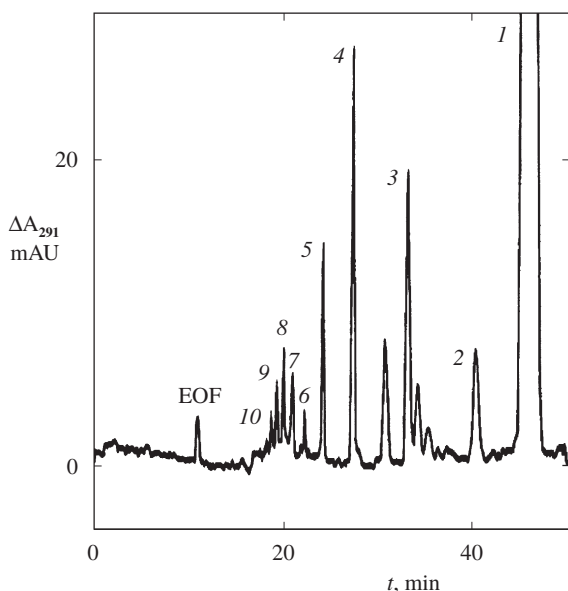
Obr. 4. Separace disacharidů jako komplexů s boráty (cit.⁴⁷); kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 75 μm vnitřní průměr, délka 70 cm, efektivní délka 50 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 175 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 6 kV, vzorek: (1) sacharosa (15 mmol.l^{-1}), (2) celobiosa (10 mmol.l^{-1}), (3) maltosa (15 mmol.l^{-1}), (4) laktosa (15 mmol.l^{-1}), (5) 4-*O*-galaktosyl-man-nopyranosid (5 mmol.l^{-1}), (6) isomaltosa (10 mmol.l^{-1}), (7) fruktosa (10 mmol.l^{-1}), (8) melibiosa (25 mmol.l^{-1}), (3) glukosa (15 mmol.l^{-1}), (S) systémový pik, detekce byla prováděna při 400 nm



Obr. 5. Kapilární elektroforéza maltooligosacharidů jako komplexů s boráty; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 400 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 4 kV, vzorek: (1) sacharosa 10 mmol.l^{-1} , (2) směs maltooligosacharidů o 5–9 jednotkách 20 mmol.l^{-1} , (3) maltotetraosa 10 mmol.l^{-1} , (4) maltotriosa 10 mmol.l^{-1} , (5) maltosa 10 mmol.l^{-1} , detekce byla prováděna při 400 nm

b) Derivatizované oligosacharidy a polysacharidy

Pomocí derivatizace a detekce v UV oblasti lze separovat oligosacharidy až do velikosti 30 homologních zbytků⁶³. Směs



Obr. 6. Separace maltooligosacharidů od 2 do 10 glukosových jednotek jako derivátů ABG; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 200 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 4 kV; vzorek: ABG deriváty maltooligosacharidů s 2–9 jednotkami. (1) derivatizační činidlo, (2)–(9) deriváty maltooligosacharidů (čísla odpovídají počtu glukosových jednotek) (EOF) elektroosmóza. Detekce byla prováděna při 291 nm

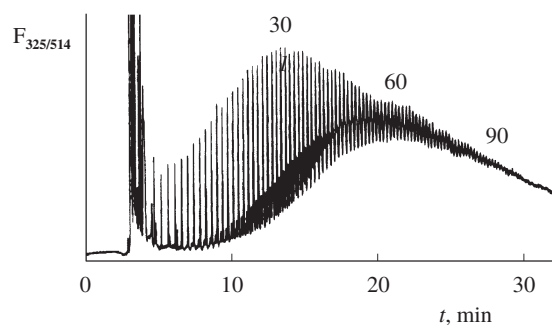
podobná jako na obr. 5 byla úspěšně separována po derivatizaci kyselinou *N*-(4-aminobenzoyl)-L-glutamovou (obr. 6).

Pro velice citlivá stanovení homologních oligosacharidů, například maltooligosacharidů je používána derivatizace fluoreskujícími činidly, nejčastěji 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonovou kyselinou^{59,84}. Za pomoci této derivatizace je možné separovat více než 90 oligomerů za méně než 30 minut⁸⁵. Deriváty činidla 3-aminonaftalen-2,7-disulfonové kyseliny mají stejné rozlišení, ale separovat lze maximálně 30 oligomerů. U derivátů maltooligosacharidů s 2-aminonaftalen-1-sulfonovou kyselinou a 5-aminonaftalen-2-sulfonovou kyselinou bylo rozlišeno pouze 20 oligomerů a byla zde menší účinnost. Doba migrace derivátů 2-aminonaftalen-1-sulfonové kyseliny je 4 krát nižší než derivátů 5-aminonaftalen-2-sulfonové kyseliny⁶².

Pořadí derivatizovaných oligosacharidů na obrázku 6 je opačné než na obrázku 7. V nepokryté kapiláře (obr. 6) je uplatněna elektroosmóza, která funguje jako pumpa a nese záporně nabitě deriváty ke katodě – nejprve deriváty s nejnižší elektroforetickou mobilitou. V pokryté kapiláře (obr. 7) je elektroosmóza eliminovaná a deriváty putují k anodě – nejprve deriváty s nejvyšší elektroforetickou mobilitou.

7. Příklady využití sacharidů jako aditiv v kapilární elektroforeze

Kromě stanovení různých sacharidů pomocí kapilární elektroforezy, lze sacharidy využít v této technice jako aditiv při stanovení jiných látek.



Obr. 7. Elektroforetická separace oligomerů dextransu derivatizovaných ANTS (cit.⁸⁵); kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 50 cm, efektivní délka 35 cm, modifikovaná na vnitřním povrchu lineárním polyakrylamidem²⁴, elektrolyt: 0,1 mol.l^{-1} Tris-borát, pH 8,5, napětí 20 kV, fluorimetrická detekce: $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$

Polysacharidy byly použity jako separační média, ve kterých se látky dělí na základě rozdílů velikostí. První práce na toto téma provedl Ogston a spol.⁸⁶ – použil roztoky kyseliny hyaluronové pro elektroforezu polystyrenových částic. Separace DNA byly také prováděny v roztocích hydroxypropylmethylcelulosy⁸⁷. Kapalné agarosové roztoky udržované při jejich želatinizující teplotě byly poprvé použity Bočkem a Chrambachem na separaci sulfatovaných polystyrenových standardů (do průměru částic 2 μm) a na cirkulární⁸⁸ a lineární DNA (cit.⁸⁹).

Sacharidy byly přidávány jako aditivum pro separace na základě velikostí. Elektroforetická migrace uniformě nabitých polysacharidů může být ovlivněna přidávkem opačně nabitěho moderátoru. Stefansson a spol.⁹⁰ použili aminodextran pro zlepšení separace hyaluronanů na základě jejich velikosti v gelové kapilární elektroforeze. Aminodextran interaguje s negativně nabitými hyaluronany iontově výměnným mechanismem. Síla interakcí mezi aminodextranem a hyaluronanem závisí na délce řetězce hyaluronové kyseliny.

Sacharidy byly aplikovány jako chirální selektory, například cyklodextriny pro jejich schopnost rozlišit enantiomery mechanismem inkusních komplexů^{91,92}. Dále byl použit heparin^{93,94} nebo chondroitin sulfát A, B a C^{95,96} jako chirální selektor pro enantiomerní rozdělení různých farmaceutických sloučenin.

Sacharidy byly použity jako povlaky kapilár pro kapilární elektroforezu. Metodu pro přípravu stabilních celulosových povlaků popsal Huang a spol.⁹⁷ Celulosové deriváty (například hydroxypropylcelulosa) jsou imobilizovány na povrch kapiláry. Takový povlak je hydrolyticky stabilní, vykazuje reprodukovatelnou separaci derivátů oligosacharidů a glykoforem proteinů v pufrch o vysokém pH.

Deriváty sacharidů se používají i na dynamické pokrytí kapilár. Hydroxypropylmethylcelulosa přidaná do katolytu, kterým je kapilára naplněna dříve než je nastříknut vzorek a spuštěn elektrický proud, tvoří dynamické pokrytí stěn kapiláry a snižuje interakce mezi proteiny a stěnou. Malá množství hydroxypropylmethylcelulosy přidaná do pufru umožní provádět dynamickou izoelektrickou fokusaci proteinů s vysokým rozlišením v nepokryté kapiláře za přítomnosti elektroosmotického toku⁹⁸.

8. Závěr

Kapilární elektroforézu lze použít pro stanovení různých sacharidů ve vzorcích farmaceutických, medicínských, potravinářských a dalších. Výhodou je především její jednoduchost a účinnost. Pomocí kapilární elektroforézy je možné separovat jinak těžko rozlišitelné izomery sacharidů, které se liší například jen v jedné vazbě.

Tato práce vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum EP 9410/99.

LITERATURA

- Oefner P., Scherz H.: *Adv. Electrophor.* 7, 155 (1994).
- Dionex LPN 032861, *Ion Chromatography Cookbook*, str. II-34. Dionex, Sunnyvale 1987.
- Barsuhn K., Kotarski S. F.: *J. Chromatogr.* 546, 273 (1991).
- El Rassi Z., Mechref Y.: *Electrophoresis* 17, 275 (1996).
- El Rassi Z.: *Adv. Chromatogr.* 34, 177 (1994).
- Garner T. W., Yeung E. S.: *J. Chromatogr.* 515, 639 (1990).
- Frahn J. L., Mills J. A.: *Aust. J. Chem.* 12, 65 (1959).
- Redelman J. A. Jr.: *Adv. Chem. Ser.* 117, 51 (1971).
- Antikainen P. J.: *Acta Chem. Scand.* 13, 312 (1959).
- Weigel H.: *Adv. Carbohydr. Chem.* 18, 61 (1963).
- Roy G. L., Laferrriere A. L., Edwards J. O.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 4, 106 (1957).
- Borune E. J., Hutson D. H., Weigel H.: *J. Chem. Soc.* 1960, 4252.
- Searle F., Weigel H.: *Carbohydr. Res.* 85, 515 (1980).
- Honda S., Yamamoto K., Suzuki S., Ueda M., Kakehi K.: *J. Chromatogr.*, A 558, 327 (1991).
- Angyal S. J.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 47, 1 (1989).
- Bazzanella A., Bachmann K.: *J. Chromatogr.*, A 799, 238 (1998).
- Van Duin V., Peters J. A., Kieboom A. P. G., Van Bekkum H.: *Tetrahedron* 41, 3411 (1985).
- Davis H. B., Mott C. J. B.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 76, 1991 (1980).
- Foster A. B.: *Chem. Ind.* 1952, 828.
- Makkee M., Kieboom A. P. G., Van Bekkum H.: *Tetrahedron* 41, 3411 (1985).
- Honda S., Iwase S., Makino A., Fujiwara S.: *Anal. Biochem.* 176, 72 (1989).
- Honda S., Suyuki S., Nose A., Yamamoto K., Kakehi K.: *Carbohydr. Res.* 215, 193 (1991).
- Landers J. P., Oda P. R., Schuchard M. D.: *Anal. Chem.* 64, 2846 (1992).
- Hofster-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H. M.: *Anal. Chem.* 63, 1541 (1991).
- Angyal S. J., Davies K. P.: *Chem. Commun.* 1971, 500.
- Hjertén S.: *J. Chromatogr.* 347, 191 (1985).
- Cobb K. A., Dolník V., Novotný M.: *Anal. Chem.* 62, 2478 (1990).
- Huang M., Workink W. P., Lee M. L.: *J. Microbiol. Sep.* 4, 233 (1992).
- Nashabeh W., El Rassi Z.: *J. Chromatogr.* 632, 157 (1993).
- Smith J. T., El Rassi Z.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 573 (1992).
- Mc Cormick R. M.: *Anal. Chem.* 60, 2322 (1988).
- Wang T., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr.* 594, 325 (1992).
- Bruin G. J. M., Huisden R., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 480, 339 (1989).
- Swedberg S. A.: *Anal. Biochem.* 185, 51 (1990).
- Towns J. K., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 516, 69 (1990).
- Towns J. K., Regnier F. E.: *Anal. Chem.* 63, 1126 (1991).
- Bentrop D., Kohr J., Eugelhardt H.: *Chromatographia* 32, 171 (1991).
- Towns J. K., Bao J., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 599, 227 (1992).
- Maa F. Y., Hyver K. J., Swedberg S. A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 65 (1991).
- Gilges M., Husmann H., Kleemis M. H., Motsch S. R., Schomburg G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 452 (1992).
- Smith J. T., El Rassi Z.: *Electrophoresis* 14, 396 (1993).
- Hughes D. E.: *J. Chromatogr.*, B 657, 315 (1994).
- Kakehi K., Susami A., Taga A., Suzuki S., Honda S. J.: *J. Chromatogr.*, A 608, 209 (1994).
- Damm J. B. L., Overklift G. T.: *J. Chromatogr.*, A 678, 151 (1994).
- Ginsburg V., Robbins P.: *Biology of the Carbohydrates*. Wiley, New York 1981.
- Vorndran A. C., Oefner P. J., Scherz H., Bonn G. K.: *Chromatographia* 33, 163 (1992).
- Plocek J., Chmelík J.: *Electrophoresis* 18, 1148 (1997).
- Garne T. W., Yeung E. S.: *J. Chromatogr.* 515, 639 (1990).
- Richmond M. D., Yeung E. S.: *Anal. Biochem.* 210, 245 (1993).
- Colon L. A., Dadoo R., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 65, 476 (1993).
- Ye J., Baldwin R. P.: *J. Chromatogr.*, A 687, 141 (1994).
- Lu W., Cassidy R. M.: *Anal. Chem.* 65, 2878 (1993).
- Weber P., Kornfelt T., Klausen N. K., Lunte S. M.: *Anal. Biochem.* 225, 135 (1995).
- Penn S. G., Chiu R. W., Monnig C. A.: *J. Chromatogr.*, A 680, 233 (1994).
- Nardi A., Fanali S., Foret F.: *Electrophoresis* 11, 774 (1990).
- Brewster J. D., Fishman M. L.: *J. Chromatogr.*, A 693, 382 (1995).
- Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruyter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr.*, A 807, 3 (1998).
- Hase S.: *J. Chromatogr.*, A 720, 173 (1996).
- Chiesa C., Horváth C.: *J. Chromatogr.* 645, 337 (1993).
- Evangelista R. A., Liu M., Chen F.: *Anal. Chem.* 67, 2239 (1995).
- Stefansson M., Novotny M. V.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11573 (1993).
- Chiesa C., O'Neill R. A.: *Electrophoresis* 15, 1132 (1994).
- Plocek J., Novotny M. V.: *J. Chromatogr.*, A 757, 215 (1997).
- Mechref Y., El Rassi Z.: *Electrophoresis* 15, 627 (1994).
- Huber C., Grill E., Oefner P., Bobleter O.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 825 (1994).

66. Anumula K. R.: *Anal. Biochem.* 220, 275 (1994).
67. Honda S., Akao E., Suzuki S., Okuda M., Kakehi K., Nakamura J.: *Anal. Biochem.* 180, 351 (1989).
68. Nashabeh W., El Rassi Z.: *J. Chromatogr.* 600, 279 (1992).
69. Noe C. R., Freissmuth J.: *J. Chromatogr., A* 704, 503 (1995).
70. Jackson P.: *Anal. Biochem.* 216, 243 (1994).
71. Schwaigen H., Oefner P., Huber C., Grill E., Bonn G. K.: *Electrophoresis* 15, 941 (1994).
72. Rothenberg B. E., Hayers B. K., Toomre D., Manzi A. E., Varki A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11939 (1993).
73. Liu J., Shiota O., Wiesler D., Novotny M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2302 (1991).
74. Zaho J. Y., Diedrich P., Zhang Y., Hindsgaul O., Dovicki N. J.: *J. Chromatogr., B* 657, 307 (1994).
75. Honda S., Ueno T., Kakehi K.: *J. Chromatogr.* 608, 289 (1992).
76. Mechref Y., El Rassi Z.: *Anal. Chem.* 68, 1771 (1996).
77. Ye J., Baldwin R. P., *J. Chromatogr., A* 687, 141 (1994).
78. Klockow A., Paulus A., Figueiredo V., Amadò R., Widmer H. M., *J. Chromatogr., A* 680, 187 (1994).
79. Žídková J., Chmelík J.: *Nepublikované výsledky.*
80. Xu X., Kok W. T., Poppe H.: *J. Chromatogr., A* 716, 231 (1995).
81. Greenaway M., Okafo G. N., Camilleri P., Dhanak D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 14, 1691 (1994).
82. Chiesa C., Oefner P. J., Zieske L. R., O'Neill R. A.: *J. Cap. Electrophor.* 2, 175 (1995).
83. Chen F., Evangelista R. A., *Anal. Biochem.*: 230, 273 (1995).
84. Klockow A., Widmer H. M., Amadò R., Paulus A.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 350, 415 (1994).
85. Chmelík J., Chmelíková J., Novotný M. V.: *J. Chromatogr., A* 790, 96 (1997).
86. Ogston A. G., Preston B. N., Wells J. D.: *Proc. R. Soc. (London)*, A 333, 297 (1973).
87. Schwartz H. E., Ulfelder K., Sunzeri F. J., Bush M. P., Brownlee R. G.: *J. Chromatogr.* 559, 267 (1991).
88. Boček P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 13, 31 (1992).
89. Boček P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 12, 1059 (1992).
90. Stefansson M., Sudor J., Hong M., Chmelíková J., Chmelík J., Novotný M. V.: *Anal. Chem.* 69, 3846 (1997).
91. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* 635, 113 (1993).
92. Amini A., Sorman U. P., Lindgren B. H., Westerlund D.: *Electrophoresis* 19, 731 (1998).
93. Stalcup A. M., Agyei N. M.: *Anal. Chem.* 66, 3054 (1994).
94. Agyei N. M., Gahm K. H., Stalcup A. M.: *Anal. Chim. Acta* 307, 185 (1995).
95. Nishi H.: *J. Chromatogr., A* 735, 345 (1996).
96. Gotti R., Cavrini V., Andrisano V., Mascellani G.: *J. Chromatogr., A* 814, 205 (1998).
97. Huang M., Plocek J., Novotny M. V.: *Electrophoresis* 16, 396 (1995).
98. Thormann W., Caslavská J., Molteni S., Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 589, 321 (1992).

J. Žídková and J. Chmelík (*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*):
Electrophoresis of Carbohydrates

Capillary electrophoresis (CE) is well suitable for determination of saccharides in a variety of pharmaceutical, biomedical and food samples. It is able to distinguish subtle differences between carbohydrate molecules which are difficult to detect and/or resolve. Other advantages of CE are its simplicity and effectivity. The review deals with the principles and practical applications of determination of mono-, oligo- and polysaccharides.

Česká společnost chemická přijme

novou výkonnou redaktorku Chemických listů

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

CONCEPTS OF COMBINATORIAL CHEMISTRY AND COMBINATORIAL TECHNOLOGIES

STANISLAV MIERTUS^a, GIORGIO FASSINA^b,
and P. F. SENEČI^c

^aInternational Centre for Science and High Technology of the United Nations Industrial Development Organization, ICS-UNIDO, Area Science Park, Building L2, Padriciano 99, 34012, Trieste, ^bBiopharmaceuticals, TECNOGEN S.C.p.A, Parco Scientifico, 81015 Piana di Monte Verona (CE), ^cLead Discovery Department, GlaxoWellcome Medicines Research Centre, Via Fleming 4, 37100 Verona, Italy

Received January 21, 2000

Key words: combinatorial chemistry, combinatorial technologies

Introduction

Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technology (CC/CT) are a new interdisciplinary field joining computer-assisted combinatorial chemistry with automated parallel synthesis of chemical "libraries" followed by automated screening.

The main purpose of computer assisted combinatorial chemistry is to generate thousands structurally diverse compounds as libraries, maximising their diversity, which are then considered in an experimental parallel automated synthesis and screening on the basis of their properties. The key issue is to integrate all important steps of CC/CT in a single, multidisciplinary approach.

This nascent technology already produced more new compounds in just a few years than the pharmaceutical industry did in its entire history.

Combinatorial chemistry has turned traditional chemistry upside down. It required chemists not to think in terms of synthesizing single, well-characterized compounds but in terms of simultaneously synthesizing large populations of compounds. It also required that those people involved with information management and computational chemistry systems address these same issues as the chemists.

While CC/CT had the greatest impact on the drug industry, combinatorial methods need not be restricted to pharmaceutical applications. Whenever high numbers of compounds have to be prepared for testing, this technique can be used. For example, agricultural research, new materials and new catalysts research and development stand to gain from this technology. However, for the time being, main emphasis is still on pharmaceutical research. Most major pharmaceutical companies are active in the field. It is generally accepted that the method has a great potential for finding leads in the drug discovery process where the technology is expected to contribute to the reduction in time and cost.

Many countries have emphasized the urgent need to get

acquainted with Combinatorial Technologies in order to enable local enterprises to remain competitive and economically viable in the coming decades and gain expertise on application practices of combinatorial technology. In view of global competition, CC/CT together with molecular modeling may be considered as powerful tools for the implementation and/or the increase of a country's capabilities in drug design, agrochemistry, new materials and new catalysts. The above considerations become even more significant if it is taken into account that many countries have abundant natural resources which are presently well below their proper exploitation. Combinatorial chemistry can enhance the potential of these resources.

Combinatorial Technologies

Combinatorial approaches were originally based on the premise that the probability of finding a molecule in a random screening process is proportional to the number of molecules subjected to the screening process. In its earliest expression, the primary objective of combinatorial chemistry focused on the simultaneous generation of large numbers of molecules and on the simultaneous screening of their activity. Following this approach, the success rate to identify new leads is greatly enhanced, while the time required is considerably reduced.

The development of new processes for the generation of collection of structurally related compounds (libraries) with the introduction of combinatorial approaches has revitalized random screening as a paradigm for drug discovery and has raised enormous excitement about the possibility of finding new and valuable drugs in short times and at reasonable costs (Figure 1).

However the advent of this new field in drug discovery did not obscure the importance of "classical" medicinal chemistry approaches, such as computer-aided rational drug design and QSAR for example, but catalyzed instead their evolution to complement and to be integrated with combinatorial technologies.

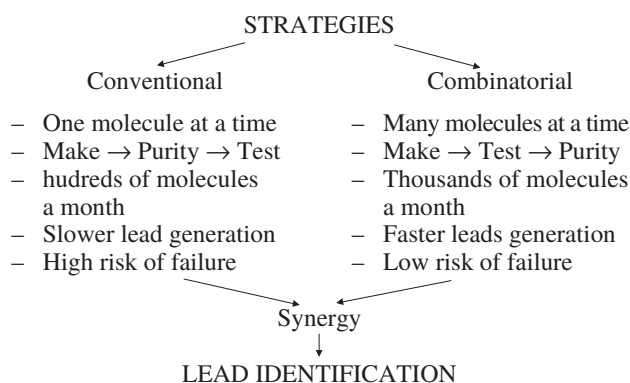
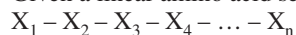


Fig. 1. Principal characteristics of conventional vs. combinatorial strategy of drug discovery

PEPTIDES CHEMICAL DIVERSITY

Given a linear amino acid sequence of n residues



the total number of different peptides obtainable equals to:

$$y^n$$

n = peptide length

y = number of different amino acids used in the synthesis (usually 18)

$n = 3$ 5.832 peptides

$n = 5$ 1.889.568 peptides

$n = 4$ 104.976 peptides

$n = 6$ 34.012.224 peptides

Fig. 2. Number of compounds (peptides) generated by combinatorial approach

The word “combinatorial” appeared in the scientific literature at the beginning of the '90, but the generation of the first combinatorial libraries can be dated back to the beginning of the '80. The first reports dealt with the simultaneous production of collection of chemically synthesized peptides, produced by solid phase methods on solid supports^{2,6}. Peptides were particularly suited for combinatorial synthesis given the well established synthetic protocols available, the great number of different molecules attainable, and the potential to generate leads of biological and pharmaceutical value (Figure 2).

The use of peptide libraries was greatly accelerated by the introduction of biological methods for library preparation, such as the phage display technology, which provided interesting advantages over the synthetic counterpart^{7,8}. At the same time, the first papers on the generation of oligonucleotide libraries appeared in the literature^{9,10}, suggesting thus the possibility to extend the applicability of combinatorial approaches even to other classes of synthetic or natural oligomeric compounds, such as carbohydrates. There are many important biologically active glyco-conjugate drugs whose carbohydrate constituents are associated with the molecular

mechanism by which these drugs exhibit their effect. Because of this, the exploration of carbohydrate molecular diversity has the potential for identifying novel agents with enhanced potency (Figure 3).

The Need for Combinatorial Technologies

Drug discovery in the past has been based traditionally about the random screening of collections of chemically synthesized compounds or extracts derived from natural sources, such as microorganisms, bacteria, fungi, plants, of terrestrial or marine origin or by modifications of chemicals with known physiological activities (Figure 4).

SOURCES OF MOLECULAR DIVERSITY

- Plant extracts
- Microbial extracts
- Collection of chemical compounds (synthetic)
- Oligonucleotide libraries (biological or synthetic)
- Oligosaccharide libraries
- Chemical compounds libraries (synthetic)
- Peptide libraries (biological or synthetic)

LIBRARIES

Collection of structurally related compounds (peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, organic molecules) obtainable by chemical or biological means simultaneously as a mixture and screened for activity as a mixture of compounds, without any isolation protocol step. Identification of active compounds derives from the synthesis/production protocol used to generate the library. Great acceleration of leads identification since millions of different compounds can be screened simultaneously.

Fig. 4. The basic sources of molecular diversity and definition of libraries

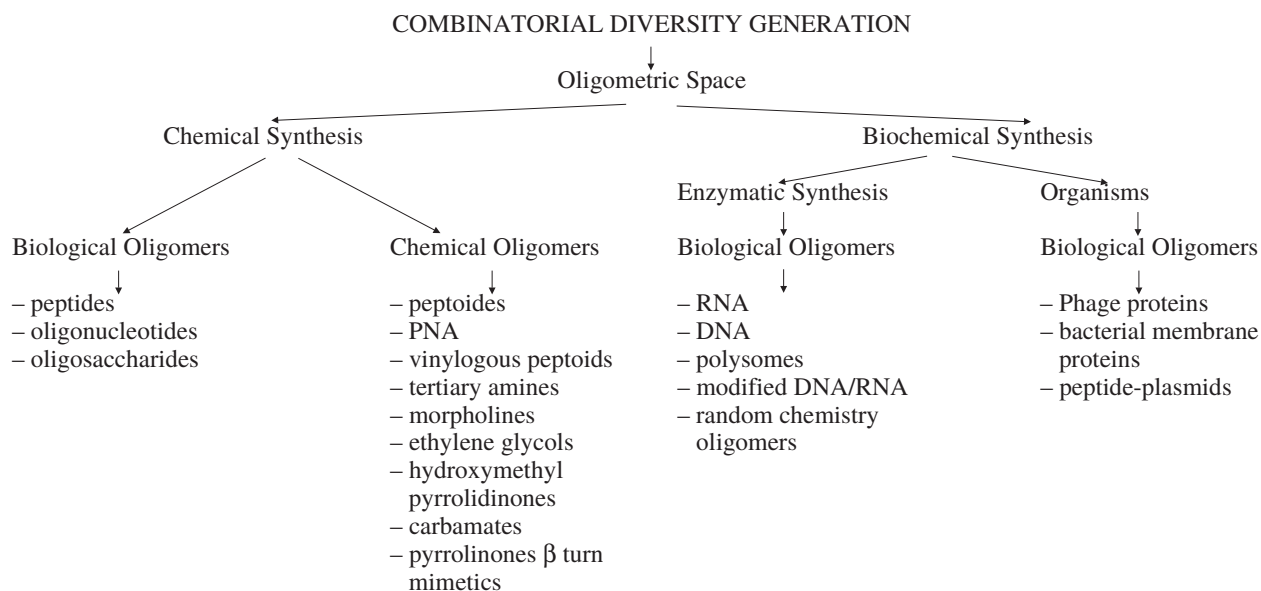


Fig. 3. Diversity of compounds generated by combinatorial approach

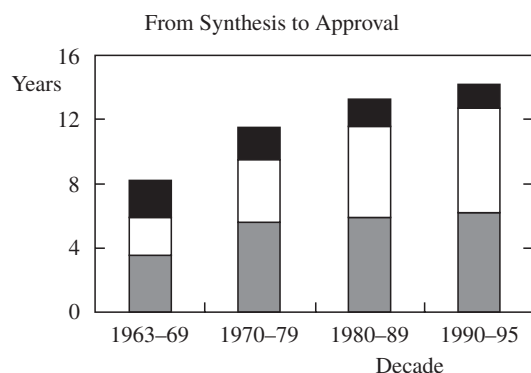


Fig. 5. Time needed for new drugs development in the last decades; ■ FDA, □ clinical, ■ preclinical

FACTORS AFFECTING STRATEGY CHANGES IN DRUG DISCOVERY

1. Biotechnology (genomics): provides molecular targets of therapeutic relevance (receptors, hormones, proteins).
2. Combinatorial Technology: provide the possibility of generating huge collections of molecules which are simultaneously produced with a built-in decoding capability.
3. High Throughput Screening (HTS): provides the possibility of handling many assays at the same time.

Fig. 6. Key factors affecting drug discovery

This approach has resulted in many important drugs, however the ratio of novel to previously discovered compounds has diminished with time. In addition, this process is very time consuming and expensive. A limiting factor is the restricted number of molecules available or extract samples to be screened, since the success rate in obtaining useful lead candidates depends directly upon the number of samples tested. Chemical synthesis of new chemical entities often is a very laborious task, and additional time is required for purification and chemical characterization. The average cost of creating a new molecular entity in a pharmaceutical company is around 7500 USD/compound¹. Generation of natural extracts, while very often providing interesting new molecular structures endowed with biological properties leads to mixtures of different compounds at different concentrations, making thus activity comparisons very difficult. In addition, once activity is found in a specific assay, the extract needs to be fractionated in order to identify the active component. Quite often, the chemical synthesis of natural compounds is extremely difficult, making thus the lead development to in a new drug a very complex task. The time and cost needed for the development of new drugs have been increasing steadily during the past three decades (Figure 5).

Estimated costs for introducing a new drug in the market now reach around 300–400 millions USD, and this process takes around 12–14 years after their original discovery. This increase in time and cost is due mainly to the extensive clinical studies of new chemical entities required by competent regu-

latory agencies, such as the Food and Drug Administration, and to a lesser extent to the increased costs associated to research. The time and cost required for clinical and preclinical evaluation of new drugs is not likely to decrease in the near future, and as a consequence, a key issue for pharmaceutical companies to stay in the market has been to increase the number of new drugs in their development pipeline. While the pharmaceutical industry was demanding more rapid and cost effective approaches to lead discovery, the advent of new methodologies in molecular biology, biochemistry, and genetics, led to the identification and production of an ever increasing number enzymes, proteins, receptors, involved in biological processes of pharmacological relevance, but also to good candidates for the development of screening assay, complicated even more this scenario. The introduction of combinatorial technologies provided an unlimited source of new compounds, capable to satisfy all these needs (Figure 6).

Applicability of Combinatorial Technologies

Up to now many active compounds have been selected to date following combinatorial methodologies, and a considerable number of those have progressed to in clinical trials. However, combinatorial chemistry and related technologies for producing and screening large number of molecules find useful applications also in other industrial sectors not necessarily related to pharmaceutical industry. Emerging fields of application of combinatorial technologies are the diagnostic, the down-stream processing, the catalysis, and the new material sectors. In the first case, CC can be successfully applied to the identification of previously unknown epitopes recognized by antibodies in biological fluids associated to pathological conditions.

Combinatorial Technologies have been applied also to the identification of new macromolecules endowed with catalytic activity for reactions where natural enzymes are inactive. This application even if still at the early stage, is calling considerable attention from the industrial sector, since the availability of new enzymes may reduce the production costs of many chemicals.

Combinatorial Tools

A broad variety of new synthesis and screening methods are currently grouped under the term combinatorial. These methods include parallel chemical synthesis and testing of multiple individual compounds or compounds mixtures in solution, synthesis, and testing of compounds on solid supports, and biochemical or organism-based synthesis of biological oligomers coupled to selection and amplification strategies. Fully automated instruments for the synthesis and for the screening of libraries of compounds are integrated tools in combinatorial technologies, as well as computer assisted approaches for library design. A very important class of molecular libraries is represented by peptide libraries. Peptides are particularly suitable for the construction of libraries since a high degree of structural diversification can be easily achieved simply by varying the peptide sequence length or by the introduction of different amino acids other than those naturally

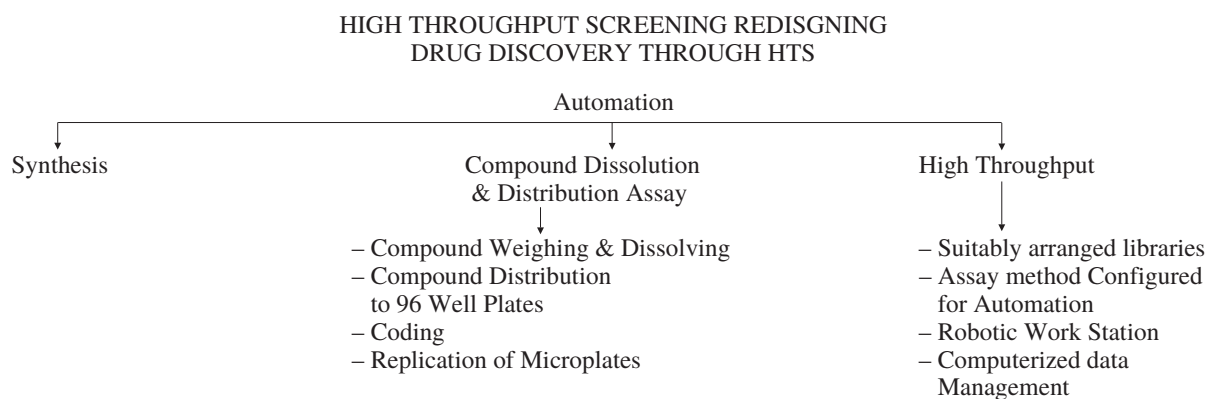


Fig. 7. Role of automation in CC/CT

occurring. The number of different peptides obtainable by a combinatorial approach is governed by the simple formula:

$$N = b^x$$

where N is the total number of molecules obtainable, b is the number of residues used in the construction of the library and x is the sequence length. Generation of synthetic peptide libraries generally follow the divide:couple:recombine process^{2,5} (DCR), where different aliquots of resin for solid phase synthesis are treated separately with solutions containing different activated amino acids, which are after coupling, recombined, mixed, and then divided again in different aliquots. The process is then repeated several times until the desired length of the library is accomplished.

Peptide libraries could be synthesized even manually in the laboratories where Combinatorial chemistry should be applied without investments.

Another important aspect of combinatorial chemistry is the analytical characterization of molecular libraries. Since a considerable number of different molecules are tested separately or in combination, analytical data should indicate that all the expected components are occurring with a comparable degree of purity. Amino acid analysis by TOF-MALDI mass spectrometry for peptide libraries quality control is often used. The amino acid analysis is useful mainly for the characterization of amino acid-based libraries (peptides, benzodiazepines, hydantoins).

Different techniques such as Electrospray (ES), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), Fast Atom Bombardment (FAB) and tandem mass spectrometry have been successfully used to evaluate the composition and purity of synthetic peptide mixtures, but there are no limitations for their use with purely organic libraries. When interfaced to HPLC or capillary electrophoresis the ES becomes the most powerful method for the characterization of even very complex mixtures, since the combination of the two techniques allows the identification of compounds having chemical properties very similar. MALDI is a very sensitive method and can be used when very small amounts of sample are available.

In combinatorial chemistry, due to the high number of chemical manipulations required to synthesize libraries of compounds and to the high number of screening steps, automation is unavoidable (Figure 7). Many research groups, both in academia and industrial settings are developing automated instru-

COMBINATORIAL CHEMISTRY

ON SOLID PHASE

- large excess of reagents allowed
- multistep synthesis allowed
- easy workup-isolation
- mix and split possible

IN SOLUTION

- all organic reactions can be used
- no chemistry assessment
- no linker/cleavage chemistry
- unlimited product quantities

Fig. 8. Characteristics of solid phase and solution phase combinatorial chemistry

ments specifically tailored to these needs, and this technology field is acquiring an extremely important role for the development of combinatorial technologies for the next millennium. However, semi-automated instruments requiring little investment may be constructed in research lab with a low budget.

The screening steps required to decipher the active sequence from a molecular library are strictly related to the type of library used, to the synthesis or preparation cycles needed, and to the kind of activity wanted. Molecular libraries can be prepared following chemical or biological approaches. For the first case, libraries can be prepared free in solution or anchored to solid supports, and for these two different situations different screening procedures are required. Resin-released libraries can be conveniently used for the search of molecules able to interfere in solution with a specific biochemical recognition event, such as in the case of hormone-receptor, antigen-antibody, or inhibitor-enzyme interactions. Screening can be conveniently performed evaluating the inhibitory activity of sub-libraries, where the nature of at least one functional group of the library is known in a predetermined position, on the assay under consideration. In combinatorial chemistry many different types of libraries can be produced, by using solid phase or solution phase methods (Figure 8).

Computer-Assisted Combinatorial Chemistry and Molecular Design

The different technologies and strategies used in the production of combinatorial libraries are now so well developed

that it is easy to plan synthetic schemes for the generation of a huge number of compounds. Since the rate at which compounds can be screened does constitute a limitation to the use of combinatorial technologies, it is important to be selective about the compounds which are synthesized (Figure 9).

Computational methods are very valuable from this point of view to assist in the design of combinatorial libraries. The main requirement for lead generation is often to maximize the range of structural types within the library with the expectation that a broad range of activities will result. As a consequence, diversity analysis is an important aspect of library design. The diversity of libraries may be measured by the use of similarity or dissimilarity indexes which make intermolecular comparisons possible. Measures of chemical similarity have been developed for similarity searching in chemical databases. The calculation of the similarity between two molecules involves the characterization of the molecules by using chemical/struc-

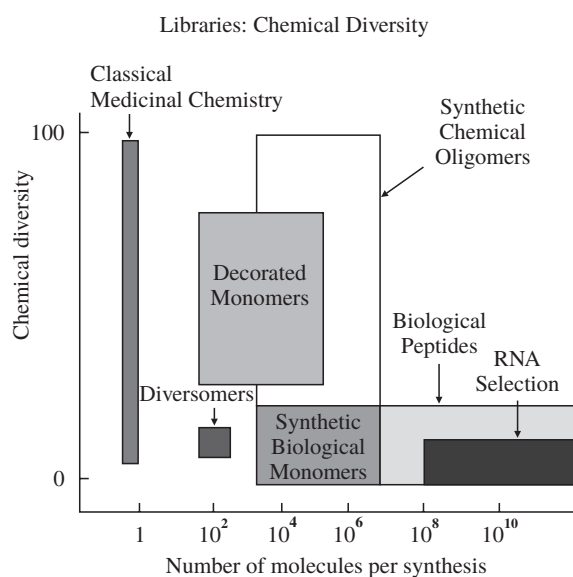


Fig. 9. Chemical diversity and number of molecules produced by various concepts of synthesis

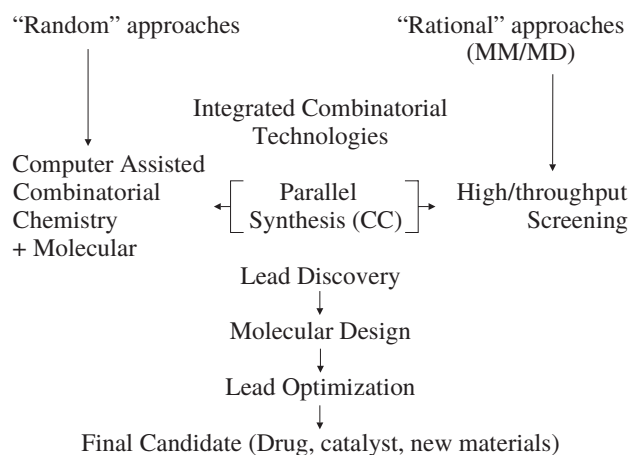


Fig. 10. Integration of combinatorial technology and molecular design

tural descriptors, and then the application of similarity coefficients to quantify the similarity.

Moreover, Molecular Design uses various sophisticated techniques of computer chemistry/molecular mechanics and dynamics (QSAR, neural networking, etc.) for rational search of candidate structures with desired properties and activity with applications in pharmaceutical and chemical companies, and its high tech. and reasonable cost requirements render it suitable for use in SMEs in developing and in transition countries. A clear tendency is observed in industrial companies developing new compounds (drugs, agrochemicals, catalysts, new specialty chemicals, new polymer materials and other) to develop both the strategies (i.e. combinatorial technology and molecular design) in synergy (Figure 10).

Biological Methods

Biological methods for library preparation are mainly limited to peptide or oligonucleotide libraries. For peptide libraries, methods are based on the construction of a pool of clones each one expressing a different peptide on its surface (Figure 11).

The peptides are fused to proteins normally expressed on the surface of the microorganism used. Phage display libraries are the most commonly used. Screening is accomplished by incubation of the target molecule, adsorbed to a solid support, with the phage population. Active phages will bind the target even after extensive washing steps. Target-bound phages are isolated and propagated by infection of *E. coli* and subjected to an additional round of adsorption to the immobilized target. This procedure increases both the number of active phages and the stringency of selection, since harsher condition may be employed in the washing steps to reduce the number of non-specifically bound phages. As for the case of synthetic libraries, iterative cycles of adsorption, washing, elution and propagation in *E. coli* are performed to enrich the phage population in the active or in few active sequences. Active phages may then be subjected to DNA sequencing in order to decode the active peptide sequence.

The use of biological display libraries for the isolation of peptide ligands is an interesting alternative to chemical libraries. Since 1985 (Ref.¹⁸), when this technique was first published, many fields of research have benefited from its use.

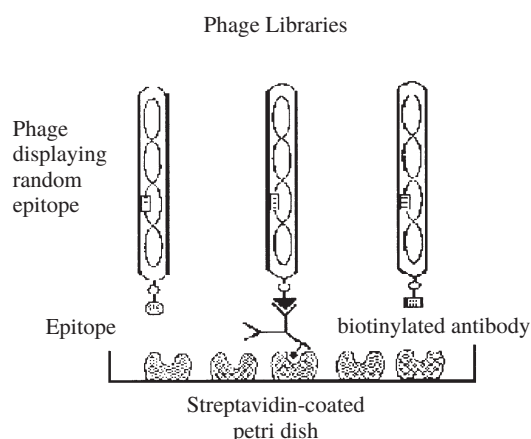


Fig. 11. Principle of phage libraries preparation

Web resources relevant to Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies

There is a sort of information explosion accompanying the development of Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies and an almost exponential growth of publications and patents in the field. At the same time, several web sites have been established providing updated information. The most important are the following:
<http://www.5z.com/divinfo/spos.html>

This site is probably the best collection of papers/patents/presentations/abstracts regarding combinatorial technologies in all its aspects and applications.

Theoretically this link may bring the experienced scientist almost everywhere in the field of Combinatorial Technologies, but we will highlight some other relevant web addresses:
<http://www.combinatorial.com/>

This site is based on a well known book titled "The Combinatorial Index", written by B. Bunin and published by Academic Press. The TOC is electronically available and the new articles appearing are grouped consequently as for their area. The site is devoted to synthetic organic libraries.
<http://www.netsci.org/Resources/CCYP/top.html>

This is the site of Network Sciences, which hosts an electronic publication related to Combinatorial Technologies and High Throughput Screening among other topics.
<http://www.stemcorp.com/organic.htm>

Website of STEM corporation, providing many links such as: Discussion group for Organic Synthesis, Discussion group for Drug Discovery and Synthesis, a Lab-Robotics Interest Group and others.

<http://www.dl.ac.uk/CDS/sps.html>

Database of Solid Phase Synthesis from Synopsis.

<http://pubs.acs.org/journals/jcchff/index.html>

<http://www2.interscience.wiley.com/issn/0006-3592/>

<http://www.bscipubl.demon.co.uk/cchts/>

<http://www.wkap.nl/journalhome.html/1381-1991>

Websites of the major scientific magazines in Combinatorial Technologies: respectively Journal of Combinatorial Chemistry (to start in Jan 1999, ACS), Biotechnology and Bioengineering (special issues on Combinatorial Technologies, John Wiley and Sons), Combinatorial Chemistry (Bentham Science Publishers) and High Throughput Synthesis and Molecular Diversity (Kluwer).

Information on the ICS-UNIDO programme on Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies, together with a database on CC/CT can be found on
<http://www.ics.trieste.it>

Last but not least, several books and review papers dealing with the topics of CC/CT were recently published²⁰⁻²⁵.

Conclusions

Combinatorial approaches have been introduced from the beginning in the drug discovery field, given their tremendous impact of the identification of new leads. Many active compounds have been selected to-date, following combinatorial methodologies, and a considerable number of those have progressed into clinical trials. However, combinatorial chemistry and related technologies for producing and screening large numbers of molecules also find useful applications in other

industrial sectors not necessarily related to the pharmaceutical industry. Emerging fields of application of combinatorial technologies are diagnostics, the down-stream processing, catalysis and the new material sectors.

Many biotechnology/combinatorial-technology companies have been founded in the last few years, with the primary goal to design and produce highly diversified molecular libraries to be screened on selected targets, and the vast majority have definitely caught the attention of pharmaceutical companies.

At the same time, rapidly growing sectors of catalyst design and new material design are going to influence chemical industries as well.

BIBLIOGRAPHY

- Chabala J. C.: *Drug Discovery Management Subsection, September 19–21, 1993*. Pharmaceutical Manufacturers Association, Philadelphia 1993.
- Furka A., Sebestyén F., Asgedom M., Dibo G.: *14th Int. Congr. Biochem., Prague, Czechoslovakia*, Abstr. 5, 47 (1988).
- Houghten R. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5131 (1985).
- Fassina G., Lebl M., Chaiken I. M.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 53, 2627 (1988).
- Furka A., Sebestyén F., Asgedom M., Dibo G.: *Int. J. Pept. Protein. Res.* 37, 487 (1991).
- Houghten R. A., Pinilla C., Blondelle S. E., Appel J. R., Dooley C. T., Cuervo J. H.: *Nature* 354, 84 (1991).
- Cwirla S., Peters E. A., Barret R. W., Dower W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6378 (1990).
- Scott J. K., Smith G. P.: *Science* 249, 386 (1990).
- Tuerk C., Gold L.: *Science* 249, 505 (1990).
- Ellington A. D., Szostak J. W.: *Nature* 346, 818 (1990).
- Fassina G., Verdoliva A., Odierna M. R., Ruvo M., Cassani G.: *J. Mol. Recogn.* 9, 564 (1996).
- Lam K. S., Salmon S. E., Hersh E. M., Hruby V. J., Kazmierski W. M., Knapp R. J.: *Nature* 354, 82 (1991).
- Lam K. S., Hruby V. J., Lebl M., Knapp R. J., Kazmierski W. M., Hersh E. M., Salmon S. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 419 (1993).
- Holm A., Meldal M.: *Peptides 1988*, p. 208. ESCOM, Leiden 1988.
- Gausepohl H., Kraft M., Boulin C., Frank R. W.: *Peptides 1990*, p. 206. ESCOM, Leiden 1991.
- Knapp D. R., Oatis J. E., Papac D. I.: *Int. J. Pept. Protein. Res.* 42, 259 (1993).
- Ruvo M., Scardino P., Cassani G., Fassina G.: *Prot. Pept. Lett.* 1, 187 (1994).
- Smith G. P.: *Science* 228, 1315 (1985).
- Smith G. P., Scott J. K.: *Methods Enzymol.* 217, 228 (1993).
- Miertus S., Fassina G.: *Combinatorial Chemistry and Technology*. M. Dekker, New York 1999.
- Seneci P.: *Chim. Ind.* 80, 1183 (1998).
- Fassina G., Miertus S.: *Introduction to Combinatorial Chemistry and Technologies*. Special Series on Emerging Technologies. UNIDO, Trieste 1999.
- Gennari F., Seneci P., Miertus S.: *Catal. Rev. – Sci. Eng.*, in press.
- Seneci P.: *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*. Wiley, New York 2000, in press.

25. Miertus S., Fassina G.: *Protocols of Combinatorial Chemistry and Technology*. UNIDO-ICS publication, in press.

S. Miertus^a, G. Fassina^b, and P. F. Seneci^c (^a*International Centre for Science and High Technology of the U.N. Industrial Development Organization*, ^b*Biopharmaceuticals, Tecnogen S.C.p.A, Piana di Monte Verna*, ^c*Lead Discovery Department, GlaxoWellcome Medicines Research Centre, Verona, Italy*): **Concepts of Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies**

A survey of basic concepts of combinatorial chemistry and combinatorial technologies and a great impact of this new

approach on the traditional chemistry is presented. The main fields of application of CC/CT are reviewed and the reasons why CC/CT is so strongly needed and demanded are given. Besides obvious utilization of CC/CT in drug discovery, agrochemical research and research and development of new materials and catalysts also gain from this approach. The paper describes the origins and development of the technique, formed on the basis of probabilistic justifications. The applicability of combinatorial technologies and main combinatorial tools are described together with computer-assisted combinatorial chemistry, molecular design and biological methods of CC/CT. A list of important Web resources relevant to the topic is also presented.

Rektor Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vyhláší přijímací řízení pro školní rok 2001–2002 do následujících oborů doktorských studijních programů ve smyslu §49 odst. 5 a §98 odst. 1c) Zákona 111/1998 Sb. uskutečňovaných na fakultách VŠCHT Praha:

Fakulta chemické technologie

Studijní program: Chemie

Studijní obory: Anorganická chemie
Organická chemie
Makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie a chemická technologie

Studijní obory: Anorganická technologie
Organická technologie

Studijní program: Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek
Fyzikální metalurgie a mezní stavy materiálů
Chemická metalurgie
Chemie a technologie anorganických materiálů
Materiálové inženýrství

Fakulta technologie ochrany prostředí

Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie

Studijní program: Chemie a technologie paliv a prostředí

Studijní obor: Energetika v chemicko-technologických procesech
Chemické a energetické zpracování paliv

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Organická chemie
Biochemie

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie

Studijní program: Biochemie a biotechnologie

Studijní obor: Biotechnologie

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a analýza potravin
Technologie potravin

Fakulta chemicko-inženýrská

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie
Fyzikální chemie

Studijní program: Chemické a procesní inženýrství

Studijní obor: Chemické inženýrství
Měřicí technika
Technická kybernetika
Řízení a ekonomika podniku

Studijní program: Aplikovaná matematika

Studijní obor: Aplikovaná matematika

Všechny doktorské studijní programy jsou uskutečňovány formou presenční, distanční nebo kombinací presenční a distanční formy.

Standardní doba studia u všech doktorských studijních programů je tři roky.

Žádosti doložené životopisem, doklady o dosaženém vzdělání a dosavadní praxi, soupisem publikovaných prací a ostatních výsledků odborné činnosti, podávejte nejpozději do 30.3.2001 na děkanáty příslušných fakult, Technická 5, 166 28 Praha 6.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POSTUP MINERALIZACE HOŘČÍKEM PRO STANOVENÍ DELORU 103 ČI DALŠÍCH CHLORDERIVÁTŮ V OLEJI ČI V ROZTOCÍCH

JOSEF JENÍK^a, KAREL BOJDA^a,
JANETTE KACÍROVÁ^a a LADISLAV NOVOTNÝ^b

^aÚstav ochrany životního prostředí, Doubravice 41, 533 53 Pardubice 19, ^bUNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo dne 18.X.1999

Klíčová slova: polychlorované bifenylly, organické chlorderiváty, mineralizace, analýza

Úvod

Spolehlivá a relativně levná analýza PCB a dalších chlorderivátů v olejích i v roztocích je dosud nedostatečně vyřešeným problémem. Vedle zavedených nákladnějších chromatografických technik¹ se prosazují i nadějně dostupnější metody voltametrické². Využívají zejména poznatků o elektrokapilární aktivitě uvedených látek, její souvislosti s adsorptivní voltametrií³, speciálních kapilár, elektrod a elektrodoových systémů a počítačem řízených měřících polarografických či voltametrických analyzátorů⁴.

Potenciálně mohou být tyto i jiné techniky využity i pro nepřímé stanovení na základě analýzy chloridů vzniklých degradací PCB a chlorderivátů a jejich následného stanovení pomocí katodické stripping voltametrie⁵, VIS-spektrofotometrie⁶, či jinak. Důležitým krokem je však v takovém případě účinný postup mineralizace kontaminovaného oleje.

Cílem tohoto sdělení byl popis účinného způsobu mineralizace vzorku oleje obsahujícího PCB či další chlorderiváty pomocí hořčíku, navazující na dřívější zkušenosti⁷ s obdobným využitím tohoto kovu. Vznik odpovídajícího množství chloridů byl dokumentován s využitím VIS-spektrofotometrie.

Experimentální podmínky

Spektrofotometrická měření byla prováděna pomocí zařízení Specord UV-VIS Carl Zeiss Jena, s křemennými květami 50 mm. Základní referenční vzorky oleje (analyzované pomocí GC-MS) obsahovaly buď 1,76 mg nebo 1,47 mg Deloru 103 v 1 kg transformátorového oleje. Redestilovaná voda pro přípravu vodných roztoků byla připravována s využitím zařízení Milli Q⁺ (fy Millipore, USA); použité chemikálie Lachema Brno byly čistoty p.a. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě 293,15±0,3 K.

Výsledky a diskuse

Postup mineralizace oleje

Do skleněné mikrozkušavky z těžko tavitelného skla o délce 10 cm byla nasypána směs práškového a zrněného hořčíku (1:1) do výšky max. 1 cm, pak byl přidán přesně zvážený čistý nebo kontaminovaný olej, v množstvích 0,15 až 0,2 g a převrstven dalším sloupcem směsi hořčíku do celkové výšky cca 5–6 cm. Zkušavka byla zahřívána po dobu 2 minut v propan-butanovém plameni směrem od horního okraje ke dnu zkušavky až do celkového rozžhavení jejího obsahu. Důležité bylo zahřívání mikrozkušavku od horního okraje směrem dolů, aby se ve vzniklém prstenci taveniny počaly mineralizovat postupně vznikající páry oleje. Rozžhavaná zkušavka byla po mineralizaci ochlazena tenkým proudem tekoucí vody tak, aby sklo stěn popraskalo, načež byla celá i s taveninou vhozena do připravené kádinky s roztokem obsahujícím 5 ml redestilované vody a 1 ml konc. kyseliny dusičné; po rozpadu byla vzniklá směs tyčinkou rozmělněna a po rozpuštění taveniny byla drť skla se zbytky taveniny odfiltrována a propláchnuta 5 ml vody. Roztok vykazoval alkalickou reakci; proto bylo k filtrátu přidáno „činidlo“ tvořené 0,5 ml nasyceného Hg(SCN)₂ v CH₃OH, 0,5 ml 1 mol.l⁻¹ Fe(NO₃)₃ v konc. HNO₃, 1 ml konc. HNO₃ a 8 ml redestilované vody; objem vzniklého roztoku činil tedy 10 ml. Získal oranžovo-hnědé zabarvení, které ve viditelné oblasti vykazovalo maximum absorpce při 458 nm. Fotometrická měření byla vyhodnocována po odečtení výsledků, odpovídajících „čistému oleji“ (tj. stejným způsobem zmineralizovaného oleje neobsahujícího chlor ani PCB). Pro kontrolu byly vůči redestilované vodě (bez mineralizace) proměřeny též absorpce samotného „činidla“, poskytujícího již zmíněnou barevnou reakci⁸. Podobně byly rovněž pro informaci určeny hodnoty absorpance slepého pokusu označeného „Mg + činidlo“, kdy byl proveden celý popsaný proces včetně spálení hořčíku, avšak bez přidávky oleje. Výsledky měření absorpance A (tabulka I) dokumentovaly určitý obsah chloridů již v použitém hořčíku. Ještě nižší pozadí chloridů vykázal postup, při kterém byl výše zmíněný roztok Fe(NO₃)₃ v HNO₃ nahrazen Fe₂(SO₄)₃ v H₂SO₄ (suprapur, obsah Cl⁻ max. 0,5 ppm).

Stručný souhrn výsledků

Tabulka I shrnuje naměřené a průměrné hodnoty absorpance A při 458 nm proti redestilované vodě pro „čistý olej“, „činidlo“ a „Mg + činidlo“. Dokumentuje přítomnost pozadí chloridů nebo chlorderivátů v jednotlivých maticích.

Příklad vyhodnocení obsahu sledovaných organických chlorderivátů v oleji je zřejmý z tabulky II a z následného postupu: Do zkušavky č. 1 bylo naváženo 0,056 g standardu o koncentraci 1,76 mg Deloru 103 v 1 kg oleje, bez aditiv na bázi chlóru. Do zkušavky č. 2 bylo odváženo 0,0773 g neznámého vzorku kontaminovaného oleje. Popsaná mineralizace a spektrofotometrická měření poskytla po odečtení průměrného pozadí $\bar{A} = 0,149$ „čistého oleje“ (viz tab. I) jednot-

Tabulka I

Naměřené hodnoty absorpance A při 458 nm proti redestilované vodě ve skleněných kyvetách o délce 1 cm

Parametr	Čistý olej	Činidlo	Mg + činidlo
A	0,150	0,063	0,124
	0,149	0,063	0,124
	0,148	0,062	0,125
	0,148	0,062	0,125
	0,149	0,064	0,125
\bar{A}	0,149	0,063	0,125

Tabulka II

Naměřené hodnoty absorpance olejů s dominantním obsahem PCB, měřeno proti čistému oleji po mineralizaci Mg

Parametr	Standard	Kontaminovaný olej
A	0,115	0,118
	0,115	0,117
	0,115	0,117
	0,115	0,115
	0,114	0,115
\bar{A}	0,115	0,116

livé hodnoty A , tvořící první sloupec v tab. II. U každého vzorku byl přítom celý postup včetně mineralizace opakovaně pětkrát. Obsah Deloru m v kontaminovaném oleji byl pak vyčíslen po přepočtu průměrné absorpance na jednotkovou navážku (v gramech) $\bar{A}_1 = 0,115/0,056 = 2,056$ a $\bar{A}_2 = 0,116/0,0773 = 1,5006$ $m = 1,76$. Vypočtená hodnota m činila tedy $(\bar{A}_1 / \bar{A}_2) \cong 1,3$ mg Deloru 103 na 1 kg kontaminovaného oleje. Tato hodnota byla cca o 12 % nižší než výsledek 1,45 mg.kg⁻¹ kontrolní analýzy téhož oleje metodou GC/MS. Nalezený rozdíl cca 12 % (potvrzený opakovaním analýzy vzorků) je z hlediska praktického využití popsaného postupu zanedbatelným.

Závěr

Popsaný postup mineralizace PCB či jiných chlorderivátů v olejích se ukázal velmi účinný. Umožňuje sledovat PCB

v olejích na koncentrační úrovni mg.l⁻¹ (tj. ppm). Zjišťování obsahu chlorderivátů ve vodných roztocích vyžaduje, aby popsané mineralizaci předcházela např. extrakce do rodného oleje, resp. vhodné uhlovodíkové frakce. V principu lze pro vyhodnocení obsahu chlorderivátů využít jak metody standardního přidavku, tak metody kalibrační křivky.

Autoři děkují za finanční podporu této publikace z grantu FVRS F4-0333 a grantu IGA MZ 4238-3/09.

LITERATURA

1. Ericson M. D.: *Analytical Chemistry of PCBs*. Butterworth, London 1986.
2. Lam K., Kopanica M.: *Anal. Chim. Acta* 161, 315 (1984).
3. Novotný L., v knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Štulík K., Kalvoda R., ed.), str. 49. UNESCO ROSTE, Benátky 1996.
4. Novotný L.: *Habilitační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1996.
5. Kalvoda R.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 349, 565 (1994).
6. Rodabaugh R. D., Upperman G. T.: *Anal. Chim. Acta* 60, 434 (1972).
7. Jureček M., Jeník J.: *Chem. Listy* 48, 1771 (1954).

J. Jeník^a, K. Bojda^a, J. Kacířová^a, and L. Novotný^b
 (^a*Department of Environment Protection, University of Pardubice, Pardubice*, ^b*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):
Magnesium Mineralization Procedure for Determination of Delor 103 or Other Chloro Derivatives in Oil or Solutions

The present paper describes an effective and facile way of mineralization of analyzed samples containing polychlorinated biphenyls (PCB) or other organic chloro derivatives using magnesium. It enables to determine PCB at concentration levels of mg.l⁻¹ (ppm). The visible spectroscopy or voltammetry could successfully be applied as final analytical techniques.

VYUŽITÍ DIFERENČNÍCH MĚŘENÍ POVRCHOVÝCH TLAKŮ PRO POROVNÁNÍ ADSORPTIVNÍHO CHOVÁNÍ HYDROCHINONU A *p*-BENZOCINONU

EVA JÍROVCOVÁ^a a TOMÁŠ SÁKRA^b

^aKatedra chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, e-mail: skritek@zf.jcu.cz, ^bÚstav ochrany životního prostředí, Doubravice 41, 533 53 Pardubice 19

Došlo dne 18.X.1999

Klíčová slova: hydrochinon, *p*-benzochinon, povrchové tlaky, adsorptivita, diferenční měření

Úvod

Hydrochinon (HCH) a *p*-benzochinon (CH) patří spolu s dalšími deriváty chinonů do skupiny škodlivých látek nacházejících se v průmyslových odpadních vodách. Jejich odstranění je proto předmětem vývoje příslušných separačních metod¹⁻⁴. Mezi úspěšně se rozvíjející techniky patří v tomto směru využívání adsorpčních vlastností uvedených látek. Jedná se přitom o využití adsorpce HCH, CH a příp. dalších chinonů na chemicky inertních maticích, např. na aktivním uhlí⁵⁻⁷. O účinnosti separace chinonu z vodných roztoků rozhoduje především jejich adsorptivita. Lze ji zjišťovat např. z měření úbytku sledovaných látek při adsorpci na přidávaném aktivním uhlí, popř. z časových změn koncentrací těchto látek^{3,4}. Tyto metody jsou však poměrně zdlouhavé, a proto jsou hledány postupy poskytující výsledky rychleji a efektivněji. Ukázalo se^{4,9}, že sledování adsorptivity uvedených látek na uhlíkových materiálech koreluje s jejich adsorptivitou na rtuťové elektrodě. V principu bylo možno tyto závěry potvrdit pomocí tenzametrických měření s využitím střídavého proudu nebo impedančních měření vedoucích k určování diferenciálních kapacit elektrody⁹. Uvedené techniky jsou však pro praxi rovněž příliš speciální, náročné a obtížně využitelné. Nedávno byla popsána mezifázová elektrokapilární měření, jejichž citlivost je o 2 až 3 řády vyšší než tomu bylo u klasických metod obdobného typu¹⁰⁻²¹. Popsány byly rovněž příslušné nové typy elektrodových systémů^{10,22-30}, postupy a způsoby vyhodnocování^{10,31,32}, které by se mohly pro daný účel jevit jako nadějně. Cílem tohoto sdělení bylo vyzkoušet uvedené metody pro rozlišení adsorptivity hydrochinonu a chinonu ve vodných roztocích a popsat praktický postup jejich aplikace pro daný účel.

Experimentální část

Pro elektrokapilární mezifázová měření sloužila aparatura popsaná v cit.^{10,13}; pracovní elektrodou byla rtuťová kapková elektroda v podobě skleněné vřetenovité kapiláry (o průměrech 45/135), referentní elektrodou byla velkoplošná nasycená kalomelová elektroda (průměr 12 mm) a pomocnou platínová elektroda. K tomu byl použit solný můstek obsahující 0,5 mol.l⁻¹ Na₂SO₄. Při měření byla kombinována aparatura sestávající z počítačového Eko-Tribo Polarografu PC-ETP firmy Polaro-Sensors, Praha a z polarografického analyzátoru

PA-3 firmy Laboratorní přístroje, Praha. Vodné roztoky byly připravovány z redestilované vody a obsahovaly 0,5 mol.l⁻¹ KNO₃ čistoty p.a. Rovněž hydrochinon a *p*-benzochinon byly čistoty p.a. od firmy Fluka Chemie AG. Měření probíhala při laboratorní teplotě 298,15±0,5 K. pH roztoku bylo kontrolováno pomocí pH-metru A1 firmy Altec. Před měřením byl sledovaný roztok vybublán argonem.

Výsledky a diskuse

Pracovní postup

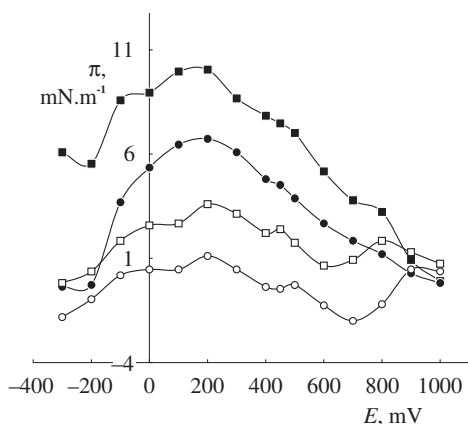
Do měrné nádoby bylo přidáno 10 ml vodného roztoku 0,5 mol.l⁻¹ KNO₃, do kterého byly zasunuty pracovní rtuťová kapková elektroda RKE, referentní kalomelová elektroda SKE a pomocná platínová elektroda. Po vybublání roztoku argonem po dobu 7 minut byla RKE postupně polarizována v potenciálovém rozsahu +300 až -800 mV vs. SKE, přičemž byly zaznamenávány doby kapky *t* (pomocí digitálních stopek firmy CASIO s přesností ±0,03 s) v závislosti na polarizačním potenciálu *E*. Poté byl do roztoku postupně přidáván hydrochinon v rozsahu koncentrací 0,002 až 0,02 mol.l⁻¹ a při každé koncentraci byla měření *t*-*E* křivky třikrát opakována. Do grafu byly pak vyneseny rozdílové křivky pro jednotlivé koncentrace HCH vůči křivce základního elektrolytu. Tyto změny dob kapky Δt byly pak přepočteny podle vztahu^{10,11,13,15} $\pi = (425,6/40,5) \cdot \Delta t$, kde *t* = 40,5 při *E* = -450 mV vs. SKE, na hodnoty povrchových tlaků π a vyneseny do grafů π vs. *E*. Poté byl roztok HCH zaměněn za roztok čistého základního elektrolytu a měření byla opakována za přidavku CH, rovněž v koncentračním rozmezí 0,002 až 0,02 mol.l⁻¹. Adsorptivita obou látek byla poté porovnána na základě získaných sérií π -*E* křivek.

Změřené výsledky

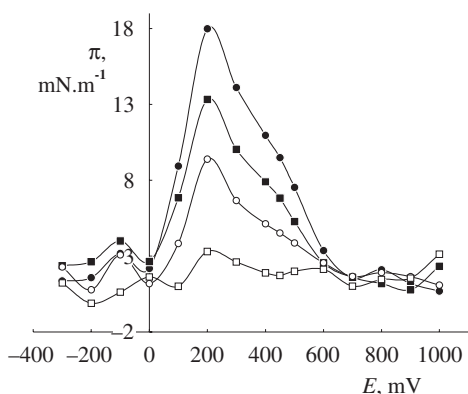
Změřené π -*E* křivky jsou znázorněny na obr. 1. Ukázalo se, že HCH vykazoval výraznou mezifázovou aktivitu v poměrně široké potenciálové oblasti +200 mV až -800 mV vs. SKE, s maximem v oblasti okolo -200 mV. Při pozitivnějších potenciálech než +300 mV se začínalo při citlivých měřeních projevovat anodické rozpouštění rtuťové elektrody. Při negativnějších hodnotách potenciálů, menších než -900 mV, docházelo naopak k výraznému omezení adsorpce HCH vlivem nárůstu povrchové koncentrace kationtů základního elektrolytu. Podobný tvar π -*E* závislosti byl získán též v případě chinonu. Poloha maxima odpovídala rovněž cca -200 mV vs. SKE, průběh křivek byl však strmější a obor potenciálů mezifázové aktivity užší, mezi 0 mV a -600 mV. Mimo tuto potenciálovou oblast sehrál zřejmě výraznou roli opět nárůst koncentrace iontů základního elektrolytu v mezifázi. Vzájemné porovnání hodnot maxim křivek na obr. 1 a 2 ukázalo, že adsorptivita CH je v průměru cca 1,7-krát vyšší než adsorptivita HCH určená za stejných podmínek. Tento výsledek souhlasí s obdobným zjištěním, ke kterému bylo možno dospět pomocí měření úbytků HCH a CH v 0,5 mol.l⁻¹ KNO₃ v důsledku jejich adsorpce na aktivním uhlí^{4,3}.

Závěr

Popsaný postup potvrdil možnost využití diferenčních měření povrchových tlaků pro poměrně rychlé a dostupné prov-



Obr. 1. Závislost změn povrchového tlaku π na E na rtuťové elektrodě v $0,5 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KNO}_3$, obsahujícím hydrochinon o koncentraci $c \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$: ● 0,002; ■ 0,005; ○ 0,01; □ 0,02



Obr. 2. Závislost π na E na rtuťové elektrodě v $0,5 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KNO}_3$, obsahujícím *p*-benzochinon o koncentraci $c \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$: ● 0,002; ■ 0,005; ○ 0,01; □ 0,02

nání či rozlišení mezifázové aktivity sledovaných chinonů. Získané poznatky odpovídaly dříve provedeným separačním měřením na aktivním uhlí.

Autoři děkují za finanční podporu této práce grantu FRVŠ č. F 4 – 0333.

LITERATURA

- Gruško J. M.: *Škodlivé látky v průmyslových odpadních vodách*, str. 49 a 100. SNTL Praha 1983.
- Jeník J.: *Chem. Prum.* 35/60, 154 (1985).
- Sákra T., Kacetl L.: *Procesy a aparáty tvorby a ochrany prostředí*, str. 141. VŠCHT Pardubice 1984.
- Divišová-Jírovcová E.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1994.
- Mostafa M. R., Samra S. E.: *Indian J. Chem., Sect. A* 28, 946 (1989).
- Vidic, Suidan, Sorial: *Water Environ. Res.* 65, 156 (1993).
- Skripnik Z. D., Strazhesko D. N.: *Adsorbtsiya Adsorbenty* 5, 14 (1977).
- Skřítková-Jírovcová E., Novotný L., Sákra T.: *Proceedings Int. Sci. Conference of PhD Students, Miskolc, August 1997*, str. 63.

- Koryta J., Dvořák J.: *Principles of Electrochemistry*, str. 447. Wiley, New York 1987.
- Novotný L., v knize: *Review on Electrochemistry for Environmental Protection* (Kalvoda R., Štulík K., ed.), str. 49. UNESCO-ROSTE, Benátky 1996.
- Novotný L., v knize: *Nové směry v analytické chemii* (Zýka J., ed.), sv. V, str. 56. SNTL, Praha 1989.
- Novotný L., Smoler I.: *J. Electroanal. Chem.* 146, 183 (1983).
- Novotný L., Smoler I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 50, 2525 (1985); 48, 964 (1983).
- Novotný L., Rudlovský J.: *Vodní hospodářství*, B 4, 97 (1984).
- Novotný L., Kůta J., Smoler I.: *J. Electroanal. Chem.* 88, 161 (1978).
- Novotný L.: *Vodní hospodářství a ochrana ovzduší* 9, 16 (1994).
- Krummbein A., Novotný L., Retter U.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 1745 (1994).
- Kalvoda R., Novotný L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 51, 1587 (1986); 51, 1595 (1986).
- Heyrovský M., Novotný L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 54 (1987); 52, 1097 (1987).
- Novotný L., Heyrovský M.: *Trends Anal. Chem.* 6, 176 (1987).
- Krista J., Kopanica M., Novotný L.: *Anal. Chim. Acta* 386, 221 (1999).
- Novotný L.: *J. Heyrovský Mem. Congress, Prague 1980. Sborník II*, str. 129 B; str. 130.
- Heyrovský M., Novotný L., Smoler I.: *J. Heyrovský Mem. Congress, Prague 1980. Sborník I*, str. 34 a *Sborník II*, str. 126, 127.
- Novotný L., Hönig J., Herout M.: *soukromé sdělení*.
- Novotný L.: *Electroanalysis* 2, 287 (1990); 8, 135 (1996).
- Novotný L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1703 (1996); *Chem. Listy* 89, 320 (1995).
- Trojánek A., Novotný L.: *Chem. Listy* 75, 1091 (1981).
- Novotný L.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 362, 184 (1998).
- Novotný L., Heyrovský M.: *Croatica Chim. Acta* 70, 151 (1997).
- Heyrovský M., Novotný L., Smoler I., ve sborníku: *Electrochemistry, Past and Present* (Stok J. T., Orna M. O., ed.); ACS Symposium Series 390, str. 370. ACS, Washington D.C. 1989.
- Novotný L., ve sborníku: *Review on Electrochemistry for Environmental Protection* (Kalvoda R., Štulík K., ed.), str. 41. Charles Univ. and the Acad. Sci. of the Czech Rep., Prague 1995.
- Novotný L.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A3*, 235, (1997).

E. Jírovcová^a and T. Sákra^b (^aDepartment of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, ^bInstitute of Environment Protection, University of Pardubice): Utilization of Difference Measurements of Surface Pressures for Comparison of Adsorption Behaviour of Hydroquinone and 1,4-Benzoquinone

Utilization of differential measurement of surface pressures for a comparison of adsorption behaviour of hydroquinone and 1,4-benzoquinone is described. The described procedure confirms the utilization potential of the method for a rapid and accessible comparison or distinguishing of interphase activity of the investigated quinones. The findings obtained correspond to the separation measurements on active carbon performed earlier.

STANOVENÍ SILYBINU V KREVŇÍ PLAZMĚ VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ S EXTRAKCÍ NA PEVNÉ FÁZI

PAVEL KOSINA^a a JOSEF BARTEK^b

^aCentrum analytické chemie molekulárních struktur, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, e-mail: kosina@tunw.upol.cz, ^bÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

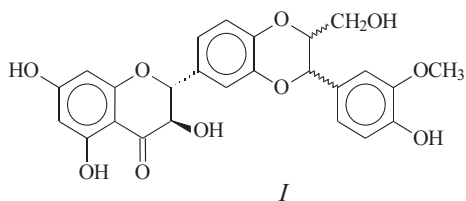
Došlo dne 18.X.1999

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, konjugovaný a celkový silybin, plazma

Úvod

Silymarin, přečištěný extrakt ze semen ostropestřce mariánského – *Silybum marianum* (L.) Gaertn., patří v druhé polovině dvacátého století k intenzivně sledovaným látkám z hlediska farmakologického účinku¹. Je možno nalézt několik set odborných článků, zabývajících se studiem silymarinu nebo jeho jednotlivých komponent¹⁻⁴.

Silymarin a jeho hlavní obsahový flavonolignan silybin (*I*) vykazuje širokou paletu ochranných účinků proti poškození organismu toxiny¹. Chrání proti celé řadě jaterních jedů, např. tetrachlormethanu, D-galaktosaminu, thaliu, acetaminofenu¹. V organismu působí flavonolignany ze silymarinu jako antioxidanty, vychytávají volné radikály, stabilizují buněčné membrány, ovlivňují hladiny sérových lipidů, mají antiproliferativní účinky na celou řadu nádorů^{5,6}. Významným účinkem silymarinu je jeho schopnost přispívat k regeneraci jaterní tkáně. Při akutních otravách toxiny muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) se používá silybin ve formě bishemisukcinátu jako účinné antidotum¹.



V současné době se přípravky na bázi silymarinu používají nejen jako léčiva, ale stále více také jako potravinové doplňky zdravé výživy, hlavně v západní Evropě a USA⁴, jejich obliba stále stoupá v souladu se snahou o zdravý životní styl. Zatímco léky jsou pod přísnou kontrolou z hlediska jejich schvalování, distribuce i monitorování v organismu, pro potravinové doplňky není k dispozici dostatek vhodných metod ke sledování těchto látek v biologických materiálech. Vzhledem k interindividuálním rozdílům v citlivosti populace k medikamentům obecně je řešení tohoto problému velmi důležité.

První metody stanovení silybinu (SB) v krevním séru a moči

využívaly tenkovrstevné chromatografie s fluorimetrickou detekcí po extrakci do etheru⁷. Největšího uplatnění našly metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie⁸⁻¹¹. Všechny použité metody stanovují pouze SB, ani jedna nesleduje přímo jeho metabolity, konjugáty s kyselinou glukuronovou a sírovou. Ty jsou před chromatografickou analýzou enzymově štěpeny β -glukuronidasou a sulfatasou, stanoven je celkový obsah, zahrnující nekonjugovaný i původně konjugovaný SB.

Silybin existuje ve formě dvou diastereomerů, ale pouze některé postupy umožňují jejich stanovení vedle sebe^{8,9}. Všechny popisované postupy využívají více či méně složité přečištění před vlastní HPLC analýzou. Martinelli et al.¹⁰ stanovoval SB v lidské plazmě a moči po extrakci *tert*-butylmethyletherem během desetiminutové analýzy, ale bez rozdělení diastereomerů. K rozdělení diastereomerů nedochází ani v případě studie Morazzoniho et al.¹¹, srovnávající farmakokineticky silipid (1:1 komplex fosfatidylcholinu se SB) a silymarin za použití sorbentu Extrelut 3. Diethylether použili k extrakci Rickling et al.⁸ i Mascher et al.⁹ Ten zvolil k přečištění vzorku postup, zahrnující po extrakci diethyletherem vymražení vodné fáze suchým ledem s acetonem, smíchání organické fáze s roztokem Na₂CO₃, okyselení vodné fáze a nástřik na HPLC kolonu. Cílem naší práce bylo modifikovat již dříve publikované metody tak, aby bylo možno co možná nejjednodušší preseparací získat analyt vhodný pro HPLC stanovení ze vzorků krevní plazmy za zachování separace diastereomerů. Prezentovaná metoda je modifikací metod, použitých při studiu flavonolignanů v rostlinném materiálu^{12,13} a metody využití ke stanovení glykosidů SB v biologických materiálech¹⁴. Metoda byla aplikována na vzorky plazmy dvou zdravých dobrovolníků.

Experimentální podmínky

Chemikálie: Silymarin (Favea, Česká republika) – 200 mg silymarinu v jedné tabletě, Legalon[®] 70 (Madaus AG, Německo) – 70 mg silymarinu v jedné tabletě, silybin (Galena Opava, Česká republika), kyselina octová p.a., methanol p.a. (MeOH), redestilovaná voda, octan sodný p.a., aceton p.a., směs β -glukuronidasa/arylsulfatasa (40/20 U.ml⁻¹) z *Helix pomatia* (Merck, Německo).

Biologický materiál: Plazma byla získána od dvou dobrovolníků A a B, kteří měsíc před experimentem užívali třikrát denně 1 tabletu Silymarinu (Favea) – dobrovolník A nebo 1 tabletu Legalon[®]70 (Madaus AG) – dobrovolník B. Dvacet čtyři hodin před odběrem oba dobrovolníci neměli nadměrnou fyzickou zátěž, nekouřili, vyvarovali se nápojů a potravin, obsahujících xanthin, jako je káva, čaj a čokoláda. Hladověli od večera před experimentem a během experimentu. Krev byla odebírána do zkumavek s EDTA v časových intervalech 0,5, 1, a 2 hodiny od podání tablety příslušných preparátů. Ihned po odběru byla centrifugací získána plazma, která byla před dalším použitím zamrazena při –20 °C. Plazma pro zjištění návratnosti SB z biologického materiálu byla získána od dobrovolníků, kteří neužívali žádné léky ani potravinové doplňky, obsahující silymarin.

Kapalinová chromatografie: Kapalinový chromatograf Shimadzu Class - LC 10 (Shimadzu, Japonsko) byl v uspořádání odplynovací jednotka GT-104, pumpa LC 10AT, termostat CTO-10AC, DAD detektor SPD-M10AVP, centrální

ní jednotka CBM-10A, autoinjektor SIL-10ADvp s dávkovací smyčkou 500 μl . Separace byla prováděna na koloně 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈ AB, předkolona 11/4 stejný sorbent (Macherey Nagel, SRN). Stanovení bylo provedeno v gradientu mobilní fáze (složka A: MeOH-H₂O-CH₃COOH 37:63:0,5; složka B: MeOH, program gradientu je uveden v tabulce I). HPLC analýzy byly prováděny při teplotě kolony 30 °C, průtoku 0,9 ml.min⁻¹ a detekci při 290 nm, nastříkované množství bylo 50 μl .

Tabulka I
Program gradientu mobilní fáze

Čas, min	0	3,75	11,25	15	20	20,1	27
% B	0	10	35	100	100	0	STOP

Příprava analytického vzorku

1. Extrakce nekonjugovaného silybinu na pevné fázi

K 1 ml krevní plazmy bylo přidáno 2 ml acetátového pufru – AC (0,1 mol.l⁻¹, pH 4). Směs byla nanášena na prekondicionovaný sorbent (Spe-ed Octadecyl C18/18 %, 200 mg/3 ml (Applied Separations, USA), kondicionován MeOH (2×2 ml), H₂O (2 ml) a AC (1 ml)). Kolonka byla promyta AC (1 ml). Analyt byl desorbován MeOH (2×2 ml) a acetonem (1 ml) do zkumavky, následovala centrifugace při 2 000 g/12 °C/1 min. Po centrifugaci byl supernatant přefiltrován přes filtr 0,45 μm (Sartorius, Německo) a odpařen na vakuové rotační odparce při 45 °C do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 100 μl mobilní fáze A a aplikován na HPLC kolonu.

2. Stanovení celkového silybinu

K 1 ml krevní plazmy bylo přidáno 1,5 ml AC a 60 μl roztoku směsi β -glukuronidasa/arylsulfatasa, o aktivitě 0,56/0,28 U.ml⁻¹ (cit.¹⁵). Zkumavky byly uzavřeny gumovou zátkou, inkubovány 4 hod při 37 °C ve vibrační vodní lázni, poté doplněny 0,5 ml AC a zpracovány stejným extrakčním postupem jako v bodu 1.

Příprava standardních roztoků

Byl připraven zásobní roztok SB o koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v MeOH. Protože v této práci použitý SB je směs dvou diastereomerů v poměru 1:1, koncentrace každého diastereomeru v zásobním roztoku byla 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Ze zásobního roztoku byly naředěním v plazmě připraveny kalibrační roztoky, obsahující 0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 2,5 a 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka II
Návratnost silybinu z lidské plazmy při extrakci na sorbent C₁₈

Koncentrace silybinu ^a , $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,005	0,025	0,05	0,25	2,5	25
Návratnost, %	92,4±7,2	91,7±5,8	89,4±6,7	85,1±6,3	82,8±8,4	80,5±7,6

^a Průměr ± směrodatná odchylka, $n = 3$; návratnost obou diastereomerů byla stejná, proto je v tabulce uváděn pouze jeden údaj

jednotlivých diastereomerů. Pro stanovení návratnosti SB z biologického materiálu byly připraveny standardní roztoky v mobilní fázi A ve stejných koncentracích.

Výsledky a diskuse

Použitou metodou je možno separovat diastereomery SB, retenční časy jsou 17,7 a 18,1 min, rozlišení píků $R_{ij} = 1,22$. Rovnice kalibračních přímků pro každý diastereomer (I a II), sestrojené v koncentračním rozsahu 0,005 až 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ každého diastereomeru mají tvar:

$$c_{\text{I}} = 1,781 \cdot 10^{-5} \quad P - 0,018 \cdot r^2 = 0,99999$$

$$c_{\text{II}} = 1,554 \cdot 10^{-5} \quad P - 0,017 \cdot r^2 = 0,99998$$

c – koncentrace diastereomeru [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]

P – plocha píku [$\mu\text{V.s}$]

Mez detekce pro každý diastereomer je 2 nmol.l⁻¹, mez stanovitelnosti 5 nmol.l⁻¹ nekonjugovaného i celkového SB. Program

Tabulka III

Koncentrace silybinu [nmol.l^{-1}] ve vzorcích plazmy dobrovolníka A po podání jedné tablety Silymarin (Favea)

Čas odběru ^a , hod	Silybin			
	nekonjugovaný		celkový	
	D I ^b	D II ^b	D I ^b	D II ^b
0,5	49,2±2,9	21,6±2,7	46,5±3,1	40,2±4,4
1	86,5±1,5	31,7±2,3	88,0±10,2	48,5±4,1
2	133,0±9,5	35,1±4,4	176,1±7,7	200,6±8,1

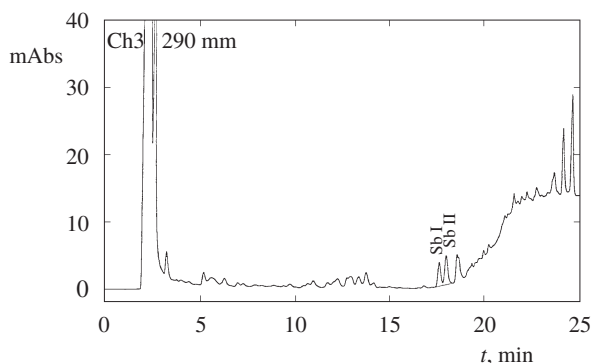
^a Čas odběru krve po podání preparátu, ^b průměr ± směrodatná odchylka, $n = 2$; D = diastereomer

Tabulka IV

Koncentrace silybinu [nmol.l^{-1}] ve vzorcích plazmy dobrovolníka B po podání jedné tablety Legalon[®]70

Čas odběru ^a , hod	Silybin			
	nekonjugovaný		celkový	
	D I ^b	D II ^b	D I ^b	D II ^b
0,5	25,5±3,5	n.d. ^c	30,9±6,6	6,8±1,0
1	25,5±4,8	8,9±2,5	52,9±4,4	82,2±8,7
2	139,0±15,6	7,5±3,7	127,0±14,7	67,6±12,0

^a Čas odběru krve po podání preparátu, ^b průměr ± směrodatná odchylka, $n = 2$, ^c nedetekováno; D = diastereomer



Obr. 1. Stanovení celkového silybinu (jednotlivých diastereomerů) ve vzorku plazmy dobrovolníka A po 2 hod od podání jedné tablety Silymarinu (Favea) po enzymatickém štěpení konjugovaného silybinu

gradientu (tab. I) zajišťuje na konci analýzy vymytí balastních látek, hydrofobnějších než silybin, z kolony a zároveň návrat do původního stavu. Návratnost SB je uvedena v tabulce II. Byly sledovány změny koncentrací diastereomerů SB v čase v plazmě dvou dobrovolníků po podání jedné tablety preparátů Silymarin a Legalon[®]70 (tab. III a IV). Chromatogram stanovení celkového silybinu (jednotlivých diastereomerů) ve vzorku plazmy dobrovolníka A po 2 hod od podání jedné tablety Silymarinu (Favea) po enzymatickém štěpení konjugovaného silybinu a extrakci na pevné fázi zachycuje obr. 1.

V porovnání s metodou Maschera et al.⁹ je prezentovaná metoda stejně citlivá pro stanovení nekonjugovaného SB a citlivější o polovinu při stanovení celkového SB (metoda Maschera et al. dovoluje stanovit koncentraci 10 nmol.l⁻¹ každého diastereomeru celkového SB), metoda Ricklinga et al.⁸ dovoluje stanovit každý diastereomer v koncentraci 0,5 nmol.l⁻¹ pro nekonjugovaný SB ovšem při použití přepínání kolon a elektrochemického detektoru. Pro celkový SB má prezentovaná metoda stejnou citlivost jako metoda Ricklinga et al.⁸

Výhodou použití C₁₈ sorbentu při extrakci na pevnou fázi je možnost zachytit i hydrofilnější deriváty silybinu, např. β-D-glykosidy SB¹⁴, které extrakcí do diethyletheru stanovit nelze. V současné době probíhají experimenty s využitím prezentované metody pro stanovení přirozených metabolitů SB v krevní plazmě.

Návratnost SB z krevní plazmy při použití extrakce na pevnou fázi se pohybovala okolo 85 % za dostatečného přečištění vzorků.

Ve vzorcích plazmy po aplikaci obou přípravků byly nalezeny v časové závislosti vzrůstající koncentrace jak nekonjugovaného, tak i celkového SB u diastereomeru I, u dobrovolníka A se stejný trend uplatňoval i u diastereomeru II. U dobrovolníka B byl rozdíl v koncentraci diastereomeru II po jedné a dvou hodinách od aplikace preparátu nevýznamný. Pozorovaný rozdíl v koncentraci diastereomerů I a II v krevní plazmě je v souladu s literárními údaji¹⁵. Není známo, zda se jedná o rozdílnou resorpci diastereomerů z gastrointestinálního traktu, různou rychlost biotransformace a vylučování nebo kombinaci všech těchto vlivů.

Preparát Silymarin (Favea) obsahoval trojnásobné množství silymarinu než Legalon[®]70, rozdíl v plazmatické koncentraci

traci (hlavně u diastereomeru I) neodpovídá aplikovanému množství a svědčí pro rozdílnou biodostupnost preparátů odlišných výrobců, což bylo pozorováno také v práci Schulze et al.¹⁶ Významnou roli v odlišné biodostupnosti mohou hrát také interindividuální rozdíly, které mohou posuzování biodostupnosti různých preparátů výrazně ovlivňovat¹⁵.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT ČR VS 96021 a MSM 151100003, MPO PP-ZI/13/99.

LITERATURA

1. Morazzoni P., Bombardelli E.: *Fitoterapia* 66, 3 (1995).
2. Jegorov A.: *Chem. Listy* 90, 859 (1996).
3. Leng-Peschlow E., Strenge-Hesse A.: *Z. Phytother.* 12, 162 (1991).
4. Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).
5. Katiyar S. K., Korman N. J., Mukhar H., Agarwal R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 556 (1997).
6. Zi X., Grasso A. W., Kung H. J., Agarwal R.: *Cancer Res.* 58, 1920 (1998).
7. Lorenz D., Lückner P. W., Mennicke W. H., Wetzelsberger N.: *Meth. Find. Clin. Pharmacol.* 6, 655 (1984).
8. Rickling B., Hans B., Kramarczyk R., Krumbiegel G., Weyhenmeyer R.: *J. Chromatogr.* B 670, 267 (1995).
9. Mascher H., Kikuta Ch. Weyhenmeyer R.: *J. Liquid Chromatogr.* 16, 2777 (1993).
10. Martinelli E. M., Morazzoni P., Livio S., Uberti S.: *J. Liquid Chromatogr.* 14, 1285 (1991).
11. Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G.: *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin.* 18, 289 (1993).
12. Tittel G., Wagner H.: *J. Chromatogr.* 135, 499 (1977).
13. Tittel G., Wagner H.: *J. Chromatogr.* 153, 227 (1978).
14. Kosina P., Kubisch J., Walterová D.: *Chem. Listy* 91, 704 (1997).
15. Weyhenmeyer R., Mascher H., Birkmayer J.: *Int. J. Clin. Pharm. Ther. Tox.* 30, 134 (1992).
16. Schulz H. U., Schurer M., Krumbiegel G., Wachter W., Weyhenmeyer R., Seidel G.: *Arzneim.-Forsch* 45, 61 (1995).

P. Kosina^a and J. Bartek^b (^aCentre for Bioanalytical Research, Palacký University, ^bInstitute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc): **Determination of Silybin in Blood Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction**

HPLC method with SPE preseparation step for determination of silybin, the main constituent of silymarin, in blood plasma was optimized. A C18 sorbent for preseparation from acidified samples was used. Diastereomers of silybin in unconjugated form or total silybin are resolved by the method, the detection limit being 2 nmol.l⁻¹ and the limit of quantification 5 nmol.l⁻¹ per diastereomer. The method is suitable for silybin monitoring in human plasma after administration of drugs or food additives based on silymarin.

PEVNÉ STŘÍBRNÉ AMALGAMOVÉ ELEKTRODY

LADISLAV NOVOTNÝ a BOGDAN YOSYPCHUK

UNESCO Laboratoř pro elektrochemii životního prostředí, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail:ladislav.novotny@jh-inst.cas.cz

Došlo dne 30.8.2000

Klíčová slova: pevná amalgama, voltametrie

Úvod

Nedílnou součástí výzkumu a vývoje elektrochemické instrumentace je řešení nových typů elektrod, jejich výzkum a využití. V polarografii, voltametii a příbuzných oborech zaujala mimořádné postavení rtuťová kapková elektroda RKE¹⁻⁴, zejména díky kvalitě povrchu a jeho obnovovatelnosti. Hledání elektrod, které by se vlastnostem RKE přiblížily, je tudíž důležitou součástí zmíněného výzkumu zejména v souvislosti s aplikacemi vyžadujícími práci bez rtuti, využití netoxických elektrodových materiálů, jednoduchou obsluhu, robustnost, miniaturizaci systému, jeho snadnou přenosnost apod., při dostatečné citlivosti, selektivitě a dalších analytických parametrech.

V rámci zmíněného výzkumu jsme proto asi před pěti lety⁵⁻⁷ zaměřili pozornost též na amalgamové stříbrné elektrody, v návaznosti na dříve publikované poznatky o těchto elektrodách^{8,9}. Hlavním motivem byla původně^{5-7,10-12} snaha zavést elektrody typu netoxických zubních amalgam, které by za vhodných experimentálních podmínek a uspořádání splňovaly výše zmíněné parametry. Díky příznivým výsledkům byly již první typy těchto stříbrných amalgamových Hg/Ag elektrod zavedeny do výroby^{6,7}. Nasycená tuhá amalgama může být vytvářena i na stříbrné plošce (diskové Ag-elektrode), nebo ještě lépe amalgamací příslušného prášku (eventuelně pudru, pilin). Elektroda může mít přitom např. formu disku či menisku, apod. Podle potřeby může být vyleštěna nebo naopak modifikována, např. rtuťovým filmem, přirozeně s tím, že její vlastnosti pak závisejí na jejím konkrétním uspořádání.

O značném zájmu o tuto problematiku svědčí i práce¹¹⁻¹⁶.

Experimentální část

Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna s využitím počítačového Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors spol. s r.o., Praha), ve dvou nebo tříelektrodovém uspořádání, v přítomnosti vzdušného kyslíku nebo po vyublení roztoku dusíkem. Jako referentní sloužila nasycená kalomelová elektroda SKE. Pomocnou elektrodu tvořil Pt drátek o průměru 1,0 mm. a délky 7 mm. Byly použity metody DC voltametrie (DCV), cyklická voltametrie (CV) a diferenční pulsní voltametrie

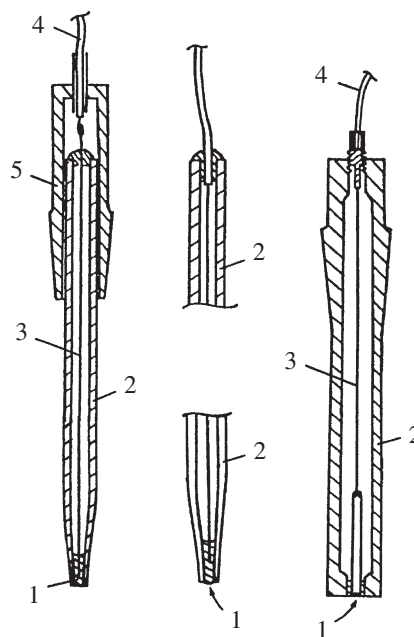
(DPV) v režimu „square-wave“, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 100 ms. Podle potřeby byly tyto metody kombinovány s anodickým, katodickým nebo adsorptivním nahromaděním. Roztoky byly připravovány z redestilované vody; všechny chemikálie byly čistoty p.a. (Lachema Brno). Analýzy byly prováděny při teplotě 293,2±0,5 K.

Příprava amalgamové elektrody

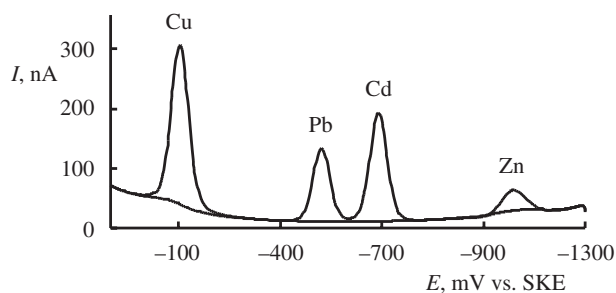
Skleněná trubička (SIMAX) vnějšího průměru 5 mm a vnitřního průměru 1–2 mm byla v určeném úseku délky asi 1 cm zahřata a vytažením zúžena na vnitřní průměr cca 0,4 až 0,5 mm. Po přeříznutí trubičky v zúženém místě a zaleštění čela zúžené části na jemném smirkovém papíře byl do zužujícího se vnitřního prostoru vpraven stříbrný prášek velikosti částic 5–10 μm, po té byl do průběžného otvoru trubičky a do vrstvičky prášku Ag zaveden platinový drátek o průměru 0,1 mm a vrstvička Ag prášku byla upěchována. Ústí bylo pak zasunuto do lahvičky s asi 0,5 ml Hg a za postupující amalgamace ponecháno 2 hodiny. K hornímu konci Pt drátku byl pak připevněn přívod elektrického kontaktu a horní část elektrody byla opatřena krytkou. Konstrukce vzniklé amalgamové Hg/Ag-elektrody je znázorněna na obr. 1. Hg/Ag-elektroda s rozhraním ve formě ztuhlé stříbrné amalgamy (připomínající zubní mikroplombičku) podoby menisku nebo hemisféry byla tak připravena k měření. K případnému vyleštění Hg/Ag-elektrody byl použit ultrajemný smirkový papír.

Obdobným postupem byly připraveny též amalgamy jiných kovů, např. zlatá, indiová, měděná.

Komerční pevné amalgamové stříbrné Hg/Ag elektrody (Polaro-Sensors spol. s r.o., Praha) se chovaly stejně jako analogické elektrody připravené laboratorně.



Obr. 1. Schémata elektrod na bázi pevné kovové amalgamy, např. stříbrné Hg/Ag: 1 – pevná popř. modifikovaná amalgama; 2 – tělo elektrody; 3 – Pt-kontakt; 4 – přívod elektrického kontaktu; 5 – krytka s osazením elektrody



Obr. 2. DP voltamogramy 0,2 M acetátového pufru pH 4,8 (1) obsahujícího 0,06 ppm Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} a Zn^{2+} (2); doba akumulace $t_{ac} = 90$ s při $E_{ac} = -1,3$ V; doba vybublání roztoku dusíkem $t_b = 300$ s; rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; šířka pulsu 100 ms

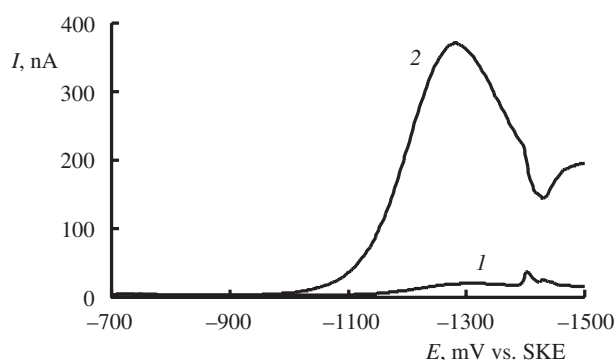
Výsledky a diskuse

Před každým měřením byla elektroda vždy ve stanoveném režimu polarizována, např. vložení vhodného negativního potenciálu, nebo ještě lépe cyklováním kupř. 200 cyklů mezi $-0,05$ V a $-1,2$ V. Optimalizace podmínek stanovení dané látky zahrnovala tedy nejdříve nalezení vhodného režimu elektrochemického obnovení povrchu Hg/Ag-elektrody a poté režimu vlastní analýzy. Výsledky se staly součástí konkrétních metodik, v praxi využitelných např. ve formě příslušných aplikačních listů.

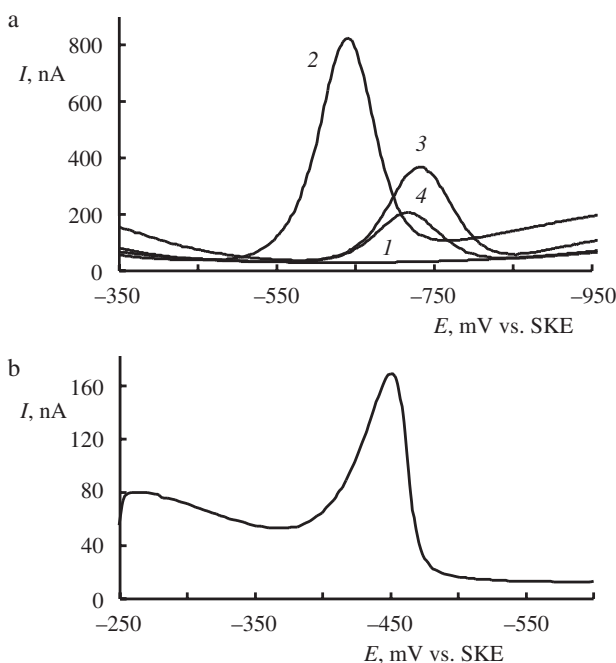
V případě kovových iontů jako jsou Cd^{2+} či Pb^{2+} bylo zjištěno, že k elektrochemické úpravě měrného rozhraní stačilo např. uvedené cyklování před každým měřením při dané koncentraci depolarizátoru; po ní pak následoval určený sled kroků měření, podle potřeby zahrnující nebo nezahrnující akumulaci stanovovaných složek.

Obr. 2 dokumentuje využitelnost popsaných Hg/Ag elektrod pro stanovení Cu, Pb, Cd, Zn. Reprodukovatelnost stanovení se pohybovala kolem $\pm 2\%$. Potenciály píků odpovídaly hodnotám na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Při dodržení popsaného postupu bylo možno s Hg/Ag elektrodou pracovat bez jejího mechanického obnovení či doteku s kapalnou rtuťí po dobu jednoho týdne. Analogicky bylo možno analyzovat roztoky obsahující Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Tl^+ , Cr^{3+} , In^{3+} , I^- , IO_3^- aj. Za optimálních podmínek analýzy bylo možno dosáhnout mez stanovitelnosti kovů na úrovni 1 ppb. Zvlášť významnou roli hrála elektrochemická předúprava povrchu elektrody při stanoveních, kdy se výrazně uplatňovaly mezifázové či povrchové děje. Příkladem toho byla voltametrie NO_3^- za podmínek jejich katalyzované redukce¹⁶ – viz obr. 3.

Všeobecně lze říci, že Hg/Ag elektroda vykazuje široký rozsah polarizačních potenciálů a vysoké přepětí vodíku. Při vymezení katodické i anodické větve voltametrických záznamů úrovní $5 \mu\text{A}$ činil např. rozsah odpovídajících pracovních potenciálů v 0,1 M- HClO_4 $-1,23$ V až $+0,47$ V, v 0,1 M- NaClO_4 $-1,99$ V až $+0,45$ V, v 0,1 M- KCl $-1,99$ V až $+0,095$ V a v 0,1 M- NaOH $-1,99$ V až $-0,1$ V, vše proti SKE. Uvedené rozsahy byly v porovnání s HMDE za daných experimentálních podmínek v průměru pouze o 200–300 mV užší v oblasti pozitivních i negativních potenciálů. Příklady využití Hg/Ag elektrody pro stanovení organických látek a adsorpční rozpouštěcí voltametrii ilustruje obr. 4, znázorňující voltamogramy nitrobenzenu a kyseliny thiodiglykolové. Podobně bylo možno registrovat i voltamogramy SH-látek a dalších povrchově



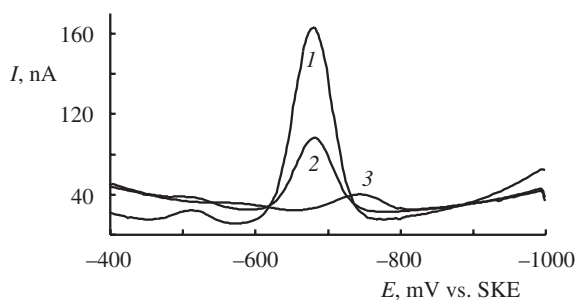
Obr. 3. DP voltamogramy 30 ppm NO_3^- (2) v 0,04 M- CeCl_3 a 0,1 M- KCl (1); $E_{ac} = -1,7$ V; $t_{ac} = 45$ s



Obr. 4. a) DP voltamogramy 0,1 M amoniakálního pufru pH 9,8 (1) obsahujícího 10 ppm nitrobenzenu na HMDE (2) na Hg/Ag (3) a na obdobné Hg/Au (4) elektrodě; rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; b) DP voltamogramy $4 \cdot 10^{-5}$ M kyseliny thiodiglykolové v 0,1 M chloracetátovém pufru pH 2,5 metodou katodické adsorpční rozpouštěcí voltametrie; $t_{ac} = 30$ s; rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

aktivních látek. Obr. 4a současně dokumentuje možnost přípravy a využití popsaného typu amalgamové elektrody na bázi jiného kovu než stříbra, v daném případě zlata. Z obrázku je též zřejmý posuv píku nitrobenzenu na Hg/Ag a Hg/Au v porovnání s HMDE.

Popsané amalgamové elektrody mají širokou využitelnost, zejména v závislosti na složení amalgamované kovové či směsné matrice, na povrchové modifikaci či úpravě vzniklé amalgamy, na režimu její polarizace, apod. Jejich matrice může být přitom shodná nebo se blížit složení dentálních amalgam¹⁷ (obsahujících ve výchozí surovině pro přípravu amalgamy např. v případě „Safarganu special“, Safina Praha, Ag, Sn a Cu v poměru 7:2,5:0,6) nebo může být zvoleno jiné složení – např. na bázi často žádaných čistých amalgam (Ag,



Obr. 5. DP voltamogramy 0,4 ppm Cd^{2+} v 0,2 M acetátovém pufru pH 4,8 na HMDE (1), Hg/Ag elektrodě bez mechanické úpravy jejího povrchu (2) a na téže, avšak vyleštěné diskové Hg/Ag elektrodě (3)

Au, atd.), směsných či kompozitních amalgam, atd. Dotek s kapalnou rtuťí vede k tvorbě hemisfér, menisků či filmů. Vhodně zvolené amalgamy poskytují často lépe definované podmínky, vyšší citlivost, lepší reprodukovatelnost i další analytické parametry. Rovněž povrch uvedených elektrod může být upravován broušením, leštěním, chemickými postupy, apod., nebo může být ponechán bez mechanických úprav, např. v podobě vytvořeného menisku či filmu. Na obr. 5 jsou pro porovnání uvedeny voltamogramy Cd^{2+} na HMDE, meniskové Hg/Ag elektrodě připravené popsaným postupem bez mechanické úpravy povrchu a na vyleštěné (diskové) Hg/Ag-elektrodě (typu vyleštěné zubní amalgamy). Z obrázku je zřejmé, že citlivost stanovení Cd klesá v řadě HMDE – menisková Hg/Ag – vyleštěná Hg/Ag. U poslední zmíněné elektrody došlo současně k posunu píku Cd k negativnějším potenciálům a k výraznému zhoršení reprodukovatelnosti.

Ačkoliv popsané Hg/Ag a další amalgamové elektrody nedosahují užitečných vlastností obnovovaných rtuťových elektrod, mají díky rozsahu jejich funkčních a užitečných parametrů, relativní jednoduchosti, robustnosti a nejedovatosti šanci významně se uplatnit v praxi. V současné době pokračuje výzkum vlastností a chování zmíněných amalgamových elektrod a obdobných elektrod obsahujících jiné kovy, jejich další vývoj, rozšiřování využitelných metodik a tvorba aplikačních listů, s eventuálním využitím přístrojů pro automatickou výrobu dentálních směsí požadovaného složení (např. přístroj fy Degusa). Získané výsledky budou předmětem dalších sdělení.

Autoři děkují GAČR za finanční podporu této publikace v rámci grantu č. 204/97/K084.

LITERATURA

- Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*. NČSAV, Praha 1962.

- Kalvoda R.: *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. SNTL, Praha 1985.
- Novotný L., v knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Štulík K., Kalvoda R., ed.), str. 49. UNESCO ROSTE, Venice 1996.
- Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. VCH Publishers, New York 1994.
- Novotný L.: *Int. Conf. Inorg. Environ. Analysis and Quality Assurance; Spectroscopic Soc. J. M. Marci, Sept. 2–5, Pardubice 1997*, Book of Abstracts; CS (užit. vzor) č. 7103-97/6815, PV 2762-97, Praha 1997.
- Novotný L., Yosypchuk B., ve sborníku: *Moderní elektroanalytické metody*. SES Logic s.r.o. Ústí n/L., Jetřichovice 1998, 1999, 2000.
- POLARO-SENSORS, spol. s r.o., Nabídkové materiály. Praha 1997.
- Micka K.: *Chem. Zvesti* 16, 242 (1962).
- Skobec E. M., Berenbljum L. C., Atamanenko N. N.: *Zavod. Lab.* 14, 131 (1948).
- Novotný L.: *Proc. Int. Conf. Modern Electroanal. Methods*, Sept. 19–23, Seč 1999.
- Novotný L., Yosypchuk B., Dřevínek M.: *Chem. Listy* 94, Supplement S4.01 (2000).
- Novotný L., Havran L., Yosypchuk B., Fojta M.: *Electroanalysis* 12, 960 (2000).
- Novotný L., Yosypchuk B.: *Proc. J. Heyrovský Mem. Symp.*, str. 52. Praha 2000.
- Mikkelsen ö., Schröder: *Proc. J. Heyrovský Mem. Symp.*, str. 22. Praha 2000.
- Novotný L., Fojta M., Heyrovský M., Paleček E., Yosypchuk B., Dřevínek M.: *Proc. J. Heyrovský Mem. Symp.*, str. 54. Praha 2000.
- Krista J., Kapanica M., Novotný L.: *Electroanalysis* 12, 199 (2000).
- Brázda O., Čechová L., Kvapilová J., Novák L., Zahálková E.: *Základy záchovné stomatologie*. Avicenum, Praha 1981.

L. Novotný and B. Yosypchuk (UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Solid Silver Amalgam Electrodes**

Construction and properties of commercially available non-toxic silver-mercury amalgam electrodes are described. These electrodes can be further electrochemically or mechanically modified and used for the determination of both inorganic and organic substances at ppb levels with reproducibility better than 2 %.

RECENZE

M. Kodíček a V. Karpenko:

Biofyzikální chemie

Academia, Praha 2000. Stran 337.

Biofyzikální chemie je významný interdisciplinární obor zabývající se aplikací fyzikální chemie na biologické problémy. Současný prudký rozvoj biochemie a biologických věd akcentuje význam této disciplíny pro další rozvoj zkoumání a pochopení nejrůznějších biologických jevů, ale zároveň naznačuje, že náplň tohoto oboru není zdaleka uzavřena, ale naopak se neustále rozšiřuje. Autoři publikace jsou si tohoto problému vědomi, a proto se snaží diskusí vymezit současnou náplň oboru. Při výuce oboru a tedy i zpracování učebnice je základním předpokladem úspěchu připravenost posluchačů (adeptů) tj. úroveň jejich předchozí přípravy, zejména ve fyzikální chemii, biochemii a matematice. Především oblast výpočtů, která je nedílnou součástí výuky biofyzikální chemie, bývá zdrojem problémů u nedostatečně připravených posluchačů. V tomto případě je na učitelovi, aby citlivě dokázal takové problémy překonat.

Recenzovaná publikace je rozdělena do 10 kapitol. Po úvodním slově je logicky druhá kapitola věnována bioenergetice – fascinujícímu systému zajišťujícímu životní funkce. Třetí kapitola popisuje nekovalentní interakce zodpovědné za rozpoznávací systém, interakce biologicky aktivních látek, jakož i mechanismus biokatalýzy a dalších významných dějů v biologických systémech. Čtvrtá kapitola poučí čtenáře o kinetice biologických procesů, které jsou však více méně omezeny na enzymovou kinetiku. Pátá a šestá kapitola by měly být vyměněny, ale tato záměna nic neubírá na jejich obsahu. Problematika membrán (kap. 6) by dle mého názoru měla následovat za kinetikou a pak by následoval ucelený blok technik aplikovaných v biofyzikálním výzkumu (metody elektrochemické, spektrofotometrické, radiometrické a další techniky studia prostorového uspořádání biomakromolekul).

Závěrem mohu konstatovat, že se jedná o knihu zdařilou, která bude jistě bohatě využívána jako učebnice pro vysokoškolské studenty různého chemického a biologického zaměření, včetně medicíny, i jako pomůcka a zdroj informací pro všechny, kteří školu již před léty opustili.

Jan Káš

M. Ferenčík, B. Škárka, M. Novák

a L. Turecký:

Biochémiá

Slovak Academic Press, Bratislava 2000. Stran 952, doporučená cena 950,- Sk.

Známí slovenští biochemici připravili rozsáhlou monografii o 32 kapitolách, která svým rozsahem, odborným zaměřením i stupněm inovace podstatně překonává dřívější dílo dvou ze současné čtveřice autorů.

Biochemie jako široký interdisciplinární obor má mnoho tváří a zasahuje do různých oborů (medicíny, potravinářství,

zemědělství, životního prostředí, atd.), a proto je jako jeden z klíčových předmětů vyučována na mnoha školách s různým zaměřením. Z tohoto důvodu autoři upravili obsah publikace tak, aby mohla sloužit jako vysokoškolská učebnice biochemie posluchačům medicíny, chemie, veterinárního lékařství, přírodních věd, farmacie, potravinářství, zemědělství a ekologie. Vzhledem k svému rozsahu poskytne informace i pracovníkům z průmyslové praxe a výzkumu i vládních organizací, kteří se ve své práci zabírají biochemickou problematikou.

V recenzovaném díle nalezneme jednak vše základní co obecné biochemie obvykle obsahují a navíc některé specializované kapitoly, které v běžných biochemických monografiích nebyvají zařazeny. Značná pozornost je věnována organizaci a chemickému složení organismů, typům molekul vyskytujících se v organismech a základním reakcím intermediačního metabolismu. Důstojné místo zaujímají enzymy jako biokatalyzátory základních životních pochodů, je však i naznačeno jejich použití v běžné praxi. Následují podrobné popisy základních složek živé hmoty (sacharidy, lipidy a proteiny s pochopitelným rozšířením o detailní popis aminokyseliny a peptidů, nukleotidy a nukleové kyseliny). Další kapitoly jsou věnovány molekulární genetice, která je integrální součástí biochemie. Nejsou opomenuty funkce membrán a informační a regulační mechanismy.

Z těch kapitol, které podstatně rozšiřují obvyklý tematický rozsah biochemických monografií, uvádím např. rozsáhlé kapitoly o hormonech, biochemii nervového systému, biochemii imunitního systému, látky se zvláštními funkcemi, metabolismus mikroorganismů, rostlinných pletiv a živočišných tkání a především základy patobiochemie a klinické biochemie a transformace xenobiotik a léčiv. Tematický rozsah monografie je opravdu úctyhodný, ale na druhé straně mě trochu překvapuje, že autoři nezařadili alespoň stručnou kapitolu o laboratorních technikách biochemie, třeba s odkazem na jejich, jiné již publikované, dílo.

Závěrem mohu konstatovat, že recenzovaná monografie přináší rozsáhlý soubor poznatků z moderní biochemie a bude cenným zdrojem informací pro studenty nejrůznějších zaměření a pracovníky oborů, kde biochemie a biotechnologie hraje významnou úlohu. Vzhledem k blízkosti našich jazyků nalezneme jistě mnoho čtenářů i v České republice.

Jan Káš

H. Scott Fogler:

Elements of Chemical Reaction Engineering

Prentice Hall PTR, 1999, 3. vydání. Stran 967, 1 CD.

Kniha o základech chemického reaktorového inženýrství patří v současnosti mezi nejpobulárnější učebnice daného oboru. Pochází od renomovaného autora, který dlouho působí na University of Michigan v Ann Arboru. Vlastní text je rozvržen do 14 kapitol, pokrývající celou širokou oblast chemických reaktorů. V úvodních kapitolách se autor věnuje bilancování vsádkových a průtočných reaktorů, které je dopl-

něno fotografiemi průmyslových aparátů. Výklad pokračuje pasážemi o návrhu izotermního reaktoru, dále se pojednává o měření a analýze kinetických dat. V další části textu jsou probírány složité reakční soustavy a případy, kdy kinetika reakce není jednoduchá. Zde jsou diskutovány především reaktory pro polymerace a bioprosedy. Učebnice dále obsahuje kapitoly o návrhu neizotermních reaktorů pracujících jak v ustáleném, tak neustáleném stavu, jsou samozřejmě probírány také katalytické reaktory a vliv difuze vně a uvnitř katalyzátoru na chování reaktoru. V posledních kapitolách je čtenář obeznámen s popisem distribuce doby zdržení reakční směsi v reaktoru a jsou uváděny příslušné modely pro popis neideálních reaktorů. Každá kapitola je zakončena vybranými odkazy na původní časopisecké práce, ve kterých případný zájemce získá podrobnější informace.

Učebnice je určena jak studentům základního kurzu chemického reaktorového inženýrství, tak poskytuje značný prostor také studentům postgraduálního studia. Text je doplněn četnými příklady s diferencovanou obtížností pro různé stupně výuky. Většina úloh vyžaduje při řešení numerické výpočty, na mnoha místech je ukázáno, jak lze k jejich řešení vhodně využít programové produkty MATLAB nebo POLYMATH. Proto je také kniha doplněna mnoha užitečnými přílohami.

Na monografii je zvláště sympatické to, že je vybavena kompaktním diskem, který usnadňuje studium textu, jsou zde hlavně shrnuty podstatné pasáže probírané látky a také otázky k jednotlivým kapitolám a řešené příklady. Čtenář na příslušném místě textu knihy najde odkaz na CD.

Závěrem lze konstatovat, že recenzovaná učebnice je moderní a pěkně vypravená. Lze ji proto doporučit k pozornosti každému zájemci o problematiku chemických reaktorů. Zvláště studenti, kteří rádi ke studiu využívají počítače, jistě ocení přiložený kompaktní disk.

Jiří Hanika

W. A. Herrmann (Ed.):

Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry, Vol. 9; Transition Metals, Part 3

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2000. Stran 221; cena 198,- DEM.

Recenzovaný svazek je poslední částí přehledu syntéz sloučenin přechodných kovů vybraných editorem na základě jejich širšího aplikačního významu (části 1 a 2 jsou publikovány jako Vol. 7 a 8 série Synthetic Methods rozvržené do 10 svazků). Ačkoliv není obvyklé v recenzích uvádět podrobněji obsah díla, v tomto případě, vzhledem k různosti strukturálních typů ve svazku uvedených látek, lze snad tento přístup omluvit.

Úvodní kapitola je věnována syntéze alkenyl, allyl, dienyl a polyenyl sloučenin přechodných kovů a doplněna o popis přípravy sloučenin prvků hlavní skupiny použitých k zavedení uvedených nenasycených skupin na atom přechodného kovu (např. vinylithia, tetrallylstananu, cyklopentadienidu draselného apod.). Kapitola 2 se zabývá komplexy přechodných kovů s 5-člennými heterocyklickými ligandy s h^5 -koordinací (pyrrolyl, azacyklopentadienyl, fosfolyl, bifosfolyl, azaborolyl). Příprava těchto, ve srovnání s karbocyklickými analogy, málo stálých komplexů vyžaduje specifická, v kapitole uvedená experimentální řešení. Další skupinu představují komplexy přechodných kovů s *N*-heterocyklickými karbeny od-

vozenými od imidazolu, pyrazolu, triazolu a thiazolu (kap. 3). Tyto ligandy stabilizují jak elektronově bohaté přechodné kovy, tak i elektronově chudé kationty kovů hlavních skupin. Vzhledem k jejich možnému využití ke stabilizaci katalyzátorů redox procesů je výběr příprav komplexů uvedených v této kapitole podřízen tomuto záměru. Vysoká účinnost CH_3ReO_3 jako katalyzátoru epoxidace a metatéze alkenů byla podnětem k uvedení příprav oxo- a alkoxy komplexů rhenia, technecia, molybdenu a wolframu (kap. 4). Další kapitola je věnována syntéze pentakarbonyltantalátů (kyano, hydrido, *tert*-butylisonitrilo a ammino) jako příkladu vysoce redukovaných karbonyl komplexů tantalu. Z hlediska homogenní katalýzy je přínosem (kap. 6) přehled syntéz vodorozpuštěných komplexů přechodných kovů se sulfonovanými fosfany. Z nich průmyslového nasazení se již dočkaly např. komplexy rhodia (hydroformylace alkenů). Kapitola 7 shrnuje přípravy některých dalších komplexů kovů s potenciálním významem pro organickou katalýzu, jako pentamethylcyklopentadienylových komplexů ruthenia, allyl-, aryl- a fosfanrhodných komplexů, alkyldenových komplexů ruthenia a wolframu (metatéze, cyklopropanace) či bisiminokomplexy železa, niklu a palladia (polymerace).

Svazek je opatřen seznamem v něm zmíněných komplexů (s grafickým odlišením stránek s podrobným popisem přípravy) a dále kumulativním indexem komplexů přechodných kovů uvedených v předchozích dílech série.

Recenzovaný díl je pečlivě graficky proveden, a až na kap. 4, 5 a 7 i shodně redakčně upraven: v úvodu kapitol jsou shrnuty obecné metody syntézy daného typu komplexů, případně jejich strukturální charakterizace; podrobný popis přípravy jednotlivých komplexů případně organokovových činidel použitých při jejich přípravě je rozšířen o popis vlastností a doplněn příslušnými odkazy. Patříčná pozornost je věnována zdravím škodlivým účinkům daných sloučenin i případným rizikům při manipulaci s nimi.

Recenzovaný díl tak beze zbytku splňuje záměr autorů série Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry systematicky shrnout ověřené receptury syntéz vybraných komplexů přechodných kovů obecnějšího významu. Je nutné ocenit, že se neomezuje jen na tyto komplexy, ale uvádějí i novější typy, jejichž význam není dosud dostatečně rozpoznán či doceněn. V tomto směru tak autoři nabízí vedle laboratorních praktik i inspiraci.

Posuzovaný svazek je součástí díla, které by jako celek nemělo chybět v knihovnách pracovišť zabývajících se syntézou organokovových sloučenin či laboratořích studujících strukturu a vlastnosti těchto látek případně jejich využití v organické syntéze.

Jiří Hetflejš

P. Schuster, W. Mikenda (Eds.):

Hydrogen Bond Research

(Zvláštní vydání Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, Vol. 130, No. 8, 1999)

Springer-Verlag, Wien 1999. Stran 115, obrázků 44; cena 135,- USD.

Studium vodíkových vazeb začalo ve dvacátých letech dvacátého století a od té doby neustává. Rozvoj experimentál-

ních technik (např. rezonanční spektroskopie a laserové infračervené spektroskopie) a teoretických metod (hlavně *ab initio* metod se zahrnutím podstatné části korelační energie) dovoluje studovat vodíkové vazby v mezimolekulových komplexech do značných detailů. Chemické a biologické důsledky tvorby vodíkových vazeb jsou tak rozmanité a významné, že nás základní výzkum v oblasti vodíkových vazeb bude provázet ještě po dlouhou dobu.

Toto speciální vydání *Chemical Monthly* přináší soubor sedmi přehledných článků a původních prací věnovaných vodíkovým vazbám. Toto číslo si neklade za cíl podat reprezentativní pohled na oblast vodíkových vazeb (a ani při poněkud skromném rozsahu nemůže), spíše podává svědectví o výzkumu, který se provádí v této oblasti na rakouských univerzitách.

Celé číslo je uvedené přehledným článkem P. Schustera a P. Wolschanna, „Vodíková vazba: od malých klastrů k biopolymerům“. Tento rozsahem nevelký článek je užitečným přehledem a úvodem k dalším studiím. Shrnuje základní poznatky o vodíkových vazbách v malých binárních komplexech (s detaily získaných experimentálních a teoretických výsledků v dimeru vody), v klastrech se sítí vodíkových vazeb (se zvláštním zřetelem na jejich aditivitu), věnuje se roli vodíkových vazeb na strukturu nukleových kyselin a proteinů. Tento referát je dobrým zdrojem citací na základní práce o vodíkových vazbách.

Následující přehledný článek R. Konrata, M. Tollingera, G. Kotaxise a B. Kräutlera je věnován NMR technikám při studiu vodíkových vazeb v kapalném prostředí. Rozebírá experimentální aspekty využití interakčních konstant, izotopových frakčních faktorů a mezimolekulových výměnných procesů při různém pH.

Původní práce A. Kolla a P. Wolschanna je věnována intramolekulovým vodíkovým vazbám v Mannichových bázích. Autoři studují strukturu a vlastnosti 75 různých bází v roztocích převážně pomocí IČ spektroskopie. Pomocí několika experimentálních technik studovali dynamiku a termodynamické vlastnosti intramolekulového přenosu protonu mezi donorem a akceptorem vodíkové vazby s typickým energetickým profilem se dvěma minimy, a to v závislosti na pH, solventu a teplotě.

A. Simperler a W. Mikenda zde publikují teoretickou práci o kompetici konformací a vodíkových vazeb v 2,6-disubstituovaných fenolech se substituenty COOH, COOCH₃, CHO, COCH₃ a CONH₂. Výpočty metodou funkcionálu hustoty (DFT, Density Functional Theory), B3LYP/6-31G(d,p), jsou doplněny o výpočty solvatačních efektů využitím jednoduchého modelu (reaction field model) s proměnnou dielektrickou konstantou (až do hodnoty $\epsilon = 37,5$, odpovídající vodě). Předpověděné výsledky posloupnosti stabilit a konformačních rovnováh porovnané s experimentálními IČ spektroskopickými

daty jsou ve výborné shodě. Na základě analýzy teoretických výpočtů dospěli k závěru, že stabilita izomerů je dána nevažebnými O...R-C interakcemi a nikoliv vodíkovými vazbami typu O-H...O=C.

Teoretická práce o dimeru kyanodiacetyleny od A. Karphena studuje možnost tvorby vodíkové vazby a patrového dimeru uvedené sloučeniny. Autor použil MP2 metody se středně velkými a velkými bázemi. Platnost teoretického postupu ověřil srovnáním strukturních a spektroskopických dat pro monomer a monomery podobných látek a srovnáním s výpočty na vyšší úrovni (CCSD(T)). Autor došel k závěru, že antiparalelní patrová struktura je stabilnější, než lineární s tvorbou vodíkové vazby o nejméně 8 kJ.mol⁻¹.

K. Wolf, A. Simperler a W. Mikenda studovali molekulovou dynamiku přenosu protonu v dimeru kyseliny mravenčí a v 5,8-dihydroxy-1,4-naftochinonu. Ke studiu použili Blöchlovu metodu PAW (Projector Augmented Wave), založenou na molekulově dynamickém postupu Cara a Parrinelliho, která kombinuje klasickou dynamiku s kvantově mechanickými silami a poskytuje úplný molekulově dynamický popis v konečných teplotách a pikosekundovém časovém měřítku. Výpočty trajektorií byly provedeny v časech do 20 ps v rozsahu teplot od 500 do 700 K. Během dynamiky rozlišili období života s dvěma klasickými vodíkovými vazbami, období aktivace, v kterém je proton na poloviční cestě od donoru k akceptoru a velice krátké období, ve kterém proton přejde na stranu akceptoru a téměř ihned se vrací zpět. Zatímco v dimeru kyseliny dochází k přenosu obou protonů současně, u chinonu jde o dva následné přenosy. Důvod spatřují v existenci metastabilního tautomeru s přeneseným jedním protonem u chinonu, který u dimeru kyseliny mravenčí neexistuje.

Poněkud odlišný charakter má práce E. Libowitzkého, která pojednává o korelaci O-H vibračních frekvencí a délek vodíkových vazeb O-H...O v minerálech. Korelace mezi vibrační frekvencí a délkou, vycházející ze 125 párů dat 65 minerálů, má exponenciální tvar s relativně značným rozptylem okolo ideální křivky. Tento rozptyl je připisován existenci ohnutých a rozštěpených geometrií vodíkové vazby, existenci dynamických vlastností protonu a iontovým efektům.

Tento svazek *Chemical Monthly*, věnovaný vodíkovým vazbám, pokrývá jen některé aspekty rozsáhlé problematiky vodíkových vazeb. Je věnován převážně klasickým vodíkovým vazbám u malých organických molekul (s výjimkou posledního příspěvku). Zcela je opomenuta oblast biologických aplikací, a to přesto, že v úvodním slově Schustera a Wolschanna je jim věnována značná pozornost a na rakouských univerzitách tato tematika nechybí. Nicméně uvedené články stojí za přečtení, jsou dobře napsané a citují literaturu až do doby uveřejnění.

Zdeněk Havlas

OPRAVA

V článku V. Janda a M. Švecová: **Vedlejší produkty dezinfekce pitné vody** – Chem. Listy 94, 905 (2000) – byly nesprávně vysázeny jednotky v tabulce I: Limitní koncentrace [mg.l⁻¹] má být [μg.l⁻¹]. Autorům se velmi omlouváme.

Redakce

ODBORNÁ SETKÁNÍ

EUROANALYSIS XI

Tato celoevropská konference organizovaná Divizí analytické chemie Federace evropských chemických společností úspěšně demonstrovala rostoucí roli analytické chemie v moderní společnosti. Téměř 500 účastníků prakticky ze všech evropských i řady zámořských zemí zasedalo ve 12 sekcích věnovaných elektroanalytické chemii, senzorům, vývoji nových analytických metod, strategii vzorkování, průtokové analýze, environmentální analytické chemii, chemické metrologii, teoretickým přístupům k analytické chemii, speciaci stopových kovů, legálním aspektům analytické chemie, výuce a historii analytické chemie. 30 pozvaných přednášek, 91 přednášek v sekcích a 425 posterů dokumentovalo pokroky prakticky ve všech oblastech analytické chemie.

Z hlediska českého účastníka bylo potěšitelné mimořádně vysoké zastoupení moderních elektrochemických metod, jejichž počátky lze bezesporu spatřovat v průkopnických pracích profesora J. Heyrovského. Veškeré konferenční materiály jsou k dispozici u autora tohoto článku, jehož účast na konferenci byla umožněna laskavou podporou Českého literárního fondu.

*Jiří Zima
tajemník odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické
Katedra analytické chemie PŘF UK
Albertov 2030, 128 43 Praha 2
tel: 2195 2295, fax: 2491 3538
e-mail: Zima@natur.cuni.cz*

CETA-VÚOS – TESTOVÁNÍ CHEMIKÁLIÍ

Centrum ekologie, toxikologie a analytiky VÚOS, a.s. je v současnosti jediným pracovištěm v České republice, které disponuje kompletní základnou pro zkoušení chemikálií tak, jak je vyžaduje nová legislativa, která vznikla implementací zásad Evropské unie pro tuto oblast. Ta vyžaduje zjištění řady údajů o fyzikálních a chemických vlastnostech výrobku, zjištění možnosti poškození zdraví, životního prostředí a dalších. Doložení těchto vlastností je nezbytnou podmínkou pro uvedení nového výrobku chemického charakteru na trh. Celý proces je mimořádně složitý a nákladný a je naprosto nezbytné, aby proběhl podle zcela přesných a jasně daných postupů a za dokonalé kontroly jejich průběhu a hodnocení. K tomu slouží systém Správné laboratorní praxe, definovaný OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) který lze do určité míry přirovnat ke známým systémům ISO nebo akreditace. Hlavní rozdíl je ve výrazně přísnějších požadavcích na pracoviště, jeho technické i personální vybavení, dokumentaci a především dodržování zpracovaných pracovních postupů.

Centrum ekologie, toxikologie a analytiky VÚOS, a.s. prošlo v minulých dnech náročnou prověrkou Národním inspekčním orgánem SLP, který je zřízen Ministerstvem životního prostředí a stalo se tak prvním pracovištěm v ČR, které splňuje požadavky zmíněných zákonů. Výsledky pracoviště jsou bez problémů uznávány v celém světě, protože pracoviště již několik let disponuje rovněž certifikátem SLP (GLP – Good Laboratory Practice) vydaným zahraničním inspekčním orgánem (německý BgVV).

VÝUKA CHEMIE

VÝVOJ CHEMICKÉHO VZDĚLÁVÁNÍ V SOUVISLOSTI S ROZVOJEM CHEMIE JAKO VĚDY

JINDŘICH HELLBERG a MARTIN BÍLEK

Katedra chemie, Pedagogická fakulta, Univerzita Hradec
Králové, V. Nejedlého 573, 500 03 Hradec Králové, e-mail:
martin.bilek@uhk.cz

Došlo dne 3.III.2000

Obsah

1. Úvod
2. Počátky chemie a formování jejího významu v procesu vzdělávání
3. Počátky výuky chemie a první učebnice chemie
4. Úloha experimentální metody při formování didaktiky chemie v Německu
5. Vznik didaktiky chemie jako vědního oboru
6. Vývoj chemického vzdělávání ve Francii
7. Vývoj chemického vzdělávání v Anglii
8. Vývoj chemického vzdělávání v USA
9. Vývoj chemického vzdělávání v Rusku
10. Závěr

1. Úvod

Rozhodující roli při formování didaktiky chemie jako vědní disciplíny sehrál stejně jako v chemii Baconův systém metod vědeckého poznávání a zvláště jeho základní komponenty – experimentální metoda a tzv. vědecká indukce. Zakladatelé didaktiky chemie (popř. metodiky chemie nebo pedagogiky chemie), za které lze považovat R. Arendta, F. Wilbranda a E. Armstronga, tento metodologický přístup využili jako teoretické východisko při koncipování nového oboru. V historickém vývoji pak docházelo a dochází k tvorbě didaktických soustav na jedné straně preferujících vědeckou dedukci, analogicky k axiomaticky pojatým didaktickým soustavám matematiky a na druhé straně didaktických soustav založených na základních metodologických nástrojích chemického poznávání, tj. na prostém a řízeném pozorování a na reálném experimentu. Mezi oběma krajnostmi vznikají rozpory, které přetrvávají ve světovém měřítku až do dnešní doby.

Vývoj chemie jako vědy dal vznik didaktice chemie a ovlivňuje ji stejně tak jako rozvoj pedagogické teorie a praxe. Analýza historických souvislostí přispívá k objasnění vzájemných vztahů, specifikaci terminologie a orientaci vědecko-výzkumné činnosti v rámci didaktiky chemie, jako samostatného interdisciplinárního vědního oboru.

2. Počátky chemie a formování jejího významu v procesu vzdělávání

Počátky chemie je nutno hledat ve staré Číně, v Indii, v Egyptě a v Řecku. Od samého začátku se chemie vyvíjela jako praktická lidská činnost, spojená zejména s rozvojem metalurgie, barvířství, výroby keramiky, lékařství atp. a s pokusem o vysvětlení příslušných jevů. Chemie jako věda vznikala z alchymie až na přelomu XVI. a XVII. století. Společným rysem chemie a alchymie je pozorování přírodních jevů, které se však liší v podmínkách, za nichž je pozorování realizováno. Alchymici pozorují vliv přírodních proměnných parametrů působících na přírodní jevy, např. vliv slunečních penetrací. Chemik si naopak vytváří podmínky a zkoumá jejich vliv na přírodní jevy a přitom mnohonásobně, je-li to nutné, opakuje příslušné experimenty. Zásadní rozdíl v pojmání skutečnosti vyplývá ze záměny scholastické logiky novějšími filozofickými názory, jejichž tvůrci byli především Giordano Bruno a Francis Bacon. Podle F. Bacona je cílem vědy poznání zákonů přírody a jejich použití pro dobro člověka. K uskutečnění tohoto požadavku vytvořil novou metodologii, jejíž principy lze vyjádřit takto:

- 1) zkušenost je zdrojem a kritériem poznání,
- 2) zkušenost musí vyplývat z logické analýzy přírodního jevu,
- 3) k analýze experimentálních výsledků je nutno využívat metody indukce.

Bacon vyložil uvedené metodologické názory v díle *Novum Organum* v roce 1610 a nesporně tak ovlivnil i proces utváření chemie jako vědy. Za prvního skutečného chemika je možno pokládat Roberta Boyla. Je tvůrcem korpuskulární teorie stavby látek, čímž dochází k určité renezanci starořeckého demokritovského atomismu. Současníkem F. Bacona i R. Boyla je český filozof a pedagog J. A. Komenský, mající ucelený názor na význam přírodních věd v procesu vzdělávání mladého pokolení. J. A. Komenský byl v určitém slova smyslu žákem F. Bacona, jako velkého propagátora vědecké indukce, která sehrála významnou roli ve formování chemické vědecké soustavy a později poznamenala i proces utváření chemických didaktických soustav. J. A. Komenského lze pokládat i za tvůrce metodik výuky přírodovědným předmětům. Tvrdí, že je nezbytné vytvořit u mladého člověka schopnost chápání jevů a jejich podstaty za současného rozvíjení jeho paměti a dovednosti používat jak rozum, tak i ruce. Roli učitele spatřuje především ve schopnosti objevovat v žácích jejich předpoklady pro příslušné činnosti. Proti tehdy panujícímu dogmatickému učení předkládá učení na základě důkazu s využitím všech smyslů a s požadavkem na uplatnění snahy pochopit podstatu věci. Z nalezené korespondence vyplývá, že J. A. Komenský udržoval styky s R. Boylem. R. Boyle vysoce cenil J. A. Komenského jako jedinečného vykladače Campanely a jako toho, jenž ho podnítl k pochybnostem o správnosti aristotelovských názorů na pojetí hmoty.

3. Počátky výuky chemie a první učebnice chemie

Za skutečnou první učebnici chemie lze pokládat Demerihovo *Kurz chemie* z roku 1697. Tato učebnice se dočkala třinácti vydání, poslední z r. 1756. Kniha byla přeložena do řady jazyků, a byla využívána i v českých zemích. M. Demeri chápe chemii jako demonstrační vědu a za základ všech úvah pokládá chemický experiment. V popisu struktury látek se opírá o názory R. Boyla.

V r. 1732 zpracoval rozsáhlou učebnici chemie H. Boerhaave, nazvanou *Elementa Chemiae*. Toto dílo sloužilo po dlouhou dobu jako model tvorby učebnic chemie v celé tehdejší Evropě. V r. 1739 vzniklo v Čechách tzv. *Dispensarium Medico-Pharmaceuticum Pragense*, jako základní příručka lékařů a lékárníků.

Charakteristickým rysem učebnic chemie vydaných od druhé poloviny XVII. století, jako např. Magnerova *Elementa Chemiae*, Baumeho *Chimie experimentalle et raisonnée* z r. 1673, Wenzlova *Lehre der Verwandtschaft der Körper* z r. 1677, podobně jako Raffova *Naturgeschichte für Kinder* z r. 1781, byla aplikace flogistonové hypotézy na výklad chemických dějů. Poznamenejme, že nešlo o učebnice v pravém smyslu, ale spíše to byly knihy popisující tehdejší stav poznání v oblasti chemie a jako takové byly používány ve výuce chemie v nově utvořených Grammar Schools v Anglii a Collège ve Francii. Rozsah zprostředkovaných vědomostí v těchto školách byl malý, protože žáci byli především vzděláváni jako příští úředníci pro tehdy, zejména v Anglii, se rozvíjející průmysl. Podobně tomu bylo v Belgii, v Holandsku a ve Francii. Chemie jako předmět výuky našel své místo až na školách vysokých. Již koncem XVIII. stol. je vyučováno chemii na univerzitě v Oxfordu, kde vznikly první vědecké laboratoře, které byly záhy využívány i pro pedagogický proces. V Moskvě zakládá M. V. Lomonosov na univerzitě první fyzikálně-chemickou laboratoř. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze přijímá v r. 1746 rozhodnutí o zavedení fyziky a chemie do učebních plánů pro studenty medicíny. V téže době se přednáší chemie v německém Halle. Ve Francii byla poprvé zavedena výuka chemie v Jardin du Roi. A to již delší dobu existovaly instituce, v nichž se pěstovala chemická věda, od r. 1657 např. Academia del Climenti ve Florencii, Královská Akademie věd v Londýně od r. 1662, Académie des sciences v Paříži od r. 1666. Od r. 1770 funguje v Berlíně Akademie der Wissenschaften a v Peterburgu Rossijskaja Akademie Nauk. Poznamenejme však, že všechny uvedené instituce měly charakter malých společností. V r. 1792 se ujímá pedagogické činnosti v tzv. Magisterské akademii v anglickém Manchesteru J. Dalton, pro chemii jedna z nejvýraznějších osobností.

Konec XVIII. a začátek XIX. století znamená pro chemii novou vývojovou etapu. Dochází k popisování a systematizování vědeckých pozorování a to nejenom statických procesů, ale zejména jejich dynamiky, vývoje a pohybu. Statická přírodověda je nahrazována postupně přírodní vědou dynamickou. V této etapě vývoje chemie lze zaznamenat celou řadu nových objevů:

1. Upevnění pojmu chemický prvek, a to v souvislosti s objevem celé řady prvků.
2. Rozpracování atomové a molekulové teorie.
3. Kvantifikace vztahů v základních chemických jevech.

4. Pokus o aplikaci atomové a molekulové teorie k objasnění kvalitativních vlastností látek.
5. První pokusy klasifikovat anorganické látky.
6. Pokus o systematizaci organických sloučenin.

Pro toto vývojové období je rovněž charakteristický růst chemického průmyslu: jde o výrobu barviv, farmaceutických preparátů a prvních látek pro využití v zemědělství. K rozvoji chemického průmyslu dochází především v Německu a teprve později v ostatních částech světa. Potřeba rozvoje chemického průmyslu stimulovala vývoj chemických výzkumů a pro tuto oblast se zvýšila i potřeba chemického vzdělávání. Zatímco k rozvoji chemického průmyslu docházelo zejména v Německu, teoretická chemie se začala záhy rozvíjet i díky slovanickým vědcům, především D. I. Mendělejeva. Výsledkem těchto vědeckých snah je systematizace popisného materiálu a rozvoj schopností formulovat vědecké hypotézy, což ve svých důsledcích vede k prohloubení teoretických základů chemie. Vznikají nové učebnice chemie, založené na:

- 1) empirickém učení o prvcích,
- 2) atomové teorii,
- 3) principu dualismu,
- 4) unitární teorii,
- 5) atomové a molekulové teorii.

Příkladem učebnice, založené na prvním principu může být *Traité élémentaire de chimie*, jejíž autorem je Antoine-Laurent Lavoisier. Učebnice vyšla poprvé v r. 1789. Vysvětluje nesprávnost flogistonové teorie, a co je pro nás zejména důležité, obsahuje i některé názory chemicko-didaktické. Autor uvádí, že chemie je složena z faktů, které tvoří samu náplň chemie, z pojmů, které jsou jejich odrazem, a ze slov, která je vyjadřují. Proto A. L. Lavoisier zdůrazňuje význam odborné nomenklatury, která by se měla stát součástí didaktické soustavy. Jeho didaktické názory lze shrnout následovně:

- 1) nikdy nepostupovat jinak než od známého k neznámému,
- 2) nikdy nevytvářet závěry jinak, než na základě pozorování nebo experimentování,
- 3) fakty a zákony uspořádat tak, že se začne od nejjednodušších.

Zajímavá je jistě i struktura učebnice: teplo, skupenské stavy, molekulová teorie, atmosféra, kyslík – air vital, síra, fosfor, uhlík, termochemické výpočty, látky organické. A. L. Lavoisier zavádí pojem oxidace a kyselost, a formuluje zákon zachování hmotnosti. Většina učebnic chemie celého XIX. století a dokonce začátku XX. století kopíruje strukturu vypracovanou Lavoisierem.

V r. 1809 zpracoval J. Dalton učebnici nazvanou *A New System of Chemical Philosophy*. V této knize se Daltonovi podařilo spojit pojem atomu s kvantitativními vztahy v chemických reakcích. Zavádí se pojem atomová hmotnost. Struktura jeho učebnice je následující: nauka o teple, skupenské stavy a chemická syntéza.

Za zmínku stojí i Berzeliova učebnice z r. 1823, založená na třetím principu. Jde o rozsáhlé pětisvazkové kompendium nazvané *Lehrbuch der Chemie*, v němž autor uvedl hodnoty některých jím stanovených atomových hmotností prvků. Autor se rovněž věnuje problematice afinity mezi prvky s ohledem na jejich chemické chování. Dualistickou teorii využívá k dělení látek na važitelné a nevažitelné, jako je např. světlo, elektřina, magnetismus apod.

Na unitární teorii je založena učebnice K. F. Gerhardta *Traité de chimie*. Pochází z r. 1848.

Na atomově-molekulové teorii je založena učebnice italského chemika S. Cannizzara *Koncept kurzu teoretické chemie*, uvedený na tzv. Faradayovských přednáškách v Janově a v Londýně. S. Cannizzaro klade důraz na rozvoj intelektuálních dovedností studenta v průběhu jeho studia. Zdůrazňuje chápání teorií a hypotéz, které je nutno vysvětlovat pomocí atomové teorie, a ne za použití indukce.

4. Úloha experimentální metody při formování didaktiky chemie v Německu

Ve druhé polovině XIX. století sehrál důležitou roli jak pro chemii jako vědu, tak pro její didaktiku Justus Liebig. Poprvé zavedl tzv. experimentální metodu jako didaktickou, a tím převedl těžiště výuky z přednášek do laboratorních cvičení. Této problematice věnoval řadu svých prací¹⁻⁵. Jako první v historii vyučování chemii zavedl pojem cíle. Pochopil význam chemie pro všeobecné vzdělání. Podle něho chemie pomáhá rozvíjet intelektuální a manuální schopnosti, a to pomocí řízeného procesu pozorování a experimentování. Experimentální metoda je jím pojímána tak, že s její pomocí je možné seznámit studenty se základními chemickými zákony, s vlastnostmi látek a jejich praktickým použitím. Podle J. Liebiga připomíná výuka chemie studium cizího jazyka. Je třeba znát slova, jejich zapisování, gramatická pravidla a určitý algoritmus jejich praktického používání. Slova, jako např. chlor nebo rtuť, je vždy nutno spojovat s jejich podstatnou vlastností. Zdroj poznávání vlastností látek je chemický experiment. Je však nutno mít na paměti, že nejde jenom o poznávání vnější stránky věci, ale i o poznávání její podstaty. Tomu slouží teoretické vědomosti. Lze tedy říci, že podle J. Liebiga se v přednáškách má student naučit abecedě vědy a má být uveden do laboratorní činnosti. Jedině v laboratoři se však naučí číst „knihu přírody“.

Chemie jako vyučovací předmět všeobecně vzdělávací školy jen velmi pomalu hledala a získávala své místo v učebních plánech škol tehdejší Evropy. Podle Britské královské komise se v letech 1864–1868 chemii vyučovalo jen ve 128 školách. Komise doporučila zavedení chemie jako všeobecně vzdělávacího předmětu do všech škol, a to s jednou týdenní vyučovací hodinou. Současně doporučila experimentální metodu jako jedinou vhodnou pro výuku chemie.

Sedmdesátá léta XIX. století jsou velmi významná pro rozvoj, zejména teoretické chemie. Tento vývoj je spjat se jmény dvou významných chemiků, a to D. I. Mendělejeva a W. Ostwalda.

D. I. Mendělejev je objevitelem periodického zákona a periodické soustavy prvků⁷. Z čistě didaktických hledisek je periodický systém prvků i významnou heuristickou pomůckou, která sehrála důležitou roli ve vývoji didaktiky chemie. Z analýzy základního Mendělejevova díla vyplývá, že podobnou strukturu jako *Osnovy chemii*⁷, mají i jiné učebnice chemie, a to zejména německých a polských autorů. Rovněž české učebnice byly výrazně poznamenány Mendělejevovým vlivem. Jako příklad uveďme učebnice Šafaříkovy a Votočkovy⁸⁻⁹.

V rozpracování koncepce vysokoškolské výuky fyzikální chemie sehrál nezastupitelnou roli velký německý chemik Wilhelm Ostwald, který zastával názor, že chemie se nutně musí opírat o výsledky reálného experimentu. V tomto ohledu

se jeho názory shodují s Liebigovými. Ve své knize¹⁰ W. Ostwald praví: *Věda se musí opírat toliko o reálná fakta, přičemž reálná je toliko naše vlastní zkušenost.*

Pro potřeby elementárního chemického vzdělávání napsal W. Ostwald příručku¹¹, vydanou poprvé v r. 1910. Kniha byla přeložena do mnoha jazyků, též do češtiny a sehrála významnou úlohu v rozšíření chemických vědomostí v širokých lidových vrstvách. Zajímavá je její forma. Je napsána jako scénář s otázkami, které klade žák a na které mu odpovídá učitel.

W. Ostwald byl přesvědčen, že je možno vybudovat racionální strukturu obsahu vyučování chemii. Doporučuje zavést jen omezený, poměrně malý počet sloučenin a pomocí nich ukázat význam obecných chemických zákonů a pravidel. V učebnici uplatnil princip jednoty všeobecně teoretického a faktografického učebního materiálu. Jeho pedagogická koncepce vychází z následujících předpokladů:

- teoretická zobecnění je nutno dělat na vhodných místech didaktické struktury,
- obecné pojmy je nutno používat v dalších kapitolách výuky chemie tak, aby se upevňovaly,
- pojmy je třeba koncipovat tak, aby se postupně rozvíjely s rozšiřováním učební látky.

Uveďme, že Ostwaldovy didaktické názory nesporně ovlivnily didaktické myšlení ve všech vyvinutých zemích tehdejšího světa. Z filozofického hlediska je W. Ostwald představitelem neopozitivistické školy, tzv. empiriokriticizmu. U nás byl nejvýznamnějším chemikem tohoto zaměření první profesor teoretické chemie na ČVUT v Praze František Wald. Pokusil se o vytvoření originální soustavy základů chemie.

V následujícím období vznikají v Evropě dvě odlišné koncepce výuky chemie. První do značné míry koresponduje s chemickým vědeckým systémem. Představuje v jistém slova smyslu jeho miniaturizaci. Zdůrazňuje význam dedukce v poznávacím procesu a v mnohém vychází z Mendělejevových didaktických představ. Druhá koncepce více odpovídá názorům Ostwaldovým a nezáříká se vědecké indukce. V dalším vývojovém období lze zaznamenat vzájemně se ovlivňování, popř. pronikání obou těchto koncepcí. To vedlo ke vzniku různých obměn chemických didaktických systémů. Metodické názory se často rodily spolu s novými chemickými objevy, což mělo za následek, že velcí chemici se často zajímali o problémy výuky chemie. Didaktiku chemie však ještě nebylo možno pokládat za i jen relativně samostatnou vědní disciplínu.

5. Vznik didaktiky chemie jako vědního oboru

Prvním vědcem, který vypracoval základy didaktiky chemie byl profesor polytechniky a gymnázia v Lipsku Rudolf Arendt. Ač byl především chemikem, měl značné vědomosti z pedagogiky a psychologie. Z pozice uvědomělého „herbartovce“ uznával výchovnou funkci výuky chemie. Jako první přímo vyhledával v chemickém obsahu výchovné elementy. Své pedagogické názory publikoval v r. 1894 v Lipsku¹². Pro výuku chemie zdůrazňuje význam induktivní logiky. Byl přesvědčen o tom, že všechny chemické zákony jsou v podstatě dílem induktivního myšlení. Pro výuku chemie uznává následující formy práce jako optimální:

- hromadění faktů a abstraktních pojmů,

- b) uvědomělé hledání příčin studovaných jevů,
c) vyvozování zákonů cestou indukce.

R. Arendt je prvním chemikem, který hovoří o zásadním rozdílu mezi vědeckým a didaktickým systémem chemie. Výuka chemie má, podle něho, začínat blízkými fakty a pojmy a ne obecnými teoriemi. Je vyznavačem podobných principů jako před ním J. A. Komenský. Samostatná, experimentální cvičení jsou integrální součástí výuky chemie. To vyjádřil názorně ve své knize *Technik der Experimentalchemie*¹³. Nedoporučuje zavádět v úvodním elementárním kurzu chemickou symboliku a názvosloví. Chemické zákony je nutno vyvozovat pomocí indukce, tj. analýzy a komparace faktů z pozorování. Faktografický materiál by měl být uspořádán tak, aby bylo možno na jeho základě postupně zavádět nové pojmy a chemické zákony. Na uvedených zásadách R. Arendt vypracoval svoji učebnici chemie¹⁴, v které však chybí skutečná chemická systematika.

Jiným významným německým chemikem byl F. Wilbrand. Také on se zabýval didaktikou chemie. Domníval se, že vyučování chemie by mělo do značné míry imitovat vědecká bádání. Nejdůležitější funkcí výuky chemie je podle něho příprava žáka na samostatnou intelektuální práci. Není proto významné uvádět příliš rozsáhlý soubor faktů, ale východiskem má být vhodný soubor problémových, zejména experimentálních úloh, umožňujících provádět hlubokou analýzu chemických jevů, která přivádí poznávající subjekt k formulování nejpravděpodobnějšího průběhu chemické reakce. Tento předpoklad vyžaduje ověření, a to induktivní cestou bádání. Ve svém díle¹⁵ se o tom vyjadřuje následovně: *Mým cílem je naučit induktivně myslet, hledat a zdůvodňovat příčinné vztahy, jakož i seznámit žáky s experimentálními metodami a konečně naučit je opatrnosti ve vztahu k vyslovování závěrů*. Protože uspořádání učební látky je u F. Wilbranda podřízeno badatelské metodě, tvrdí, že není nutno vycházet od prvků ke sloučeninám, ale přímo naopak. Žák by měl napřed studovat vlastnosti sloučeniny, např. chloridu sodného a teprve pak vlastnosti prvků chloru a sodíku.

Některé názory R. Arendta a F. Wilbranda nalezly ohlas nejen v Německu, ale např. i v Anglii a do značné míry i ve Spojených státech. Následovníky R. Arendta a F. Wilbranda byli H. Löwenhardt¹⁶, K. Winderlich¹⁷ a zejména pak K. Scheid¹⁸, kteří působili v období po první světové válce. Typickým představitelem tohoto období je v německé didaktice chemie K. Scheid¹⁸. Podle jeho názorů by se výuka chemie měla dít v následujících etapách:

- pro žáky 10–13leté společná výuka integrované přírodovědy, jejíž součástí je i chemie; hlavním cílem je naučit žáky pozorovat přírodní jevy,
- pak následuje první, tzv. propedeutický stupeň výuky chemie; tento stupeň lze též označit jako metodický,
- systematický cyklus výuky chemie.

I když jsou jednotlivé etapy chemického vzdělávání v Scheidově pojetí poznamenány nadměrou faktografií, je jejich základem nácvik přesného pozorování, experimentování a uvažování.

J. Liebig, W. Ostwald, R. Arendt, F. Wilbrand a K. Scheid vytvořili základy teorie a praxe vyučování chemii. Současné německé didaktické soustavy chemie představují pokračování domácí tradice z let 1875–1925. Existuje zde celá řada souborů učebnic pro oba stupně sekundární školy. U nás je nejznámější a do češtiny přeložený soubor¹⁹ *Elemente I a Elemente II*.

6. Vývoj chemického vzdělávání ve Francii

Zajímavé je sledovat vývoj didaktických idejí ve Francii. Tato země ovlivnila vývoj školství v celé řadě zemí. Výuka chemie je ve Francii těsně vázána na výuku fyziky. Chemie jako věda i její výuka je pokládána za integrální součást tzv. fyzikálních věd a jejich výuky. Lze zaznamenat určitý vliv německé metodické školy, jak je to patrné např. z úvodních slov učebních osnov chemie²⁰: *Cílem fyziky a chemie je uvedení žáka do experimentální metody, aniž by byl přetěžován nadměrným množstvím faktografické učební látky*. Je zdůrazňován význam myšlenkových cvičení, rozvoj pozorovacích dovedností, formulování závěrů a jejich verifikování pomocí experimentu. Velká pozornost je věnována dovednostem učitele demonstrovat reálné experimenty a podávat jejich výklad. Poměrně málo místa je věnováno teoretickému učivu. Tak např. periodický zákon je jen součástí tzv. četby, tedy jako nepovinné učivo.

Pro francouzskou školu je typický princip koncentristu. Na úrovni prvního cyklu je výuka chemie spojená s fyzikou. Toto pojetí se podobá německému wilbrandovskému a má tedy propedeutický charakter. K tradičním učebnicím patřily příručky Faucherovy²¹. V šedesátých letech se objevila řada nových učebnic chemie. Jde např. o sérii učebnic chemie J. Cessaca a M. Treherna²²⁻²³, H. Joyala²⁴, K. Dreyfusa a C. Donadiniho²⁵ a jiné. V osmdesátých a devadesátých letech byly vydány nové učebnice. Např. v r. 1989 byly u Nathana vydány učebnice I. E. De Colognyho a kol.²⁶ a v r. 1993 A. Tomasina a C. Lorrina²⁷, v nichž je proti klasickému pojetí zdůrazněna motivace, např. v 2. ročníku lycea praktickými pracemi z agrochemie.

Z hlediska výuky chemie je ve Francii na základní škole typickou formou práce samostatná činnost žáků, spojená s řešením jednoduchých, často experimentálních, úloh na měření, např. objemů kapalin a plynů. Naopak na lyceálním stupni jde zejména o přednášky s demonstračními pokusy. Malá pozornost je věnována systematickému prověřování žákovských vědomostí. I když francouzský racionalismus a tradicionalismus a priori odmítá cizí vlivy, v posledních desetiletích nelze vyloučit výrazné vlivy zejména amerických didaktických systémů.

7. Vývoj chemického vzdělávání v Anglii

Velmi zajímavý je vývoj chemie jako vědy a předmětu výuky v Anglii. Anglie značnou měrou přispěla k rozvoji chemické vědy. Vždyť J. Dalton, M. Faraday, H. Moseley, T. Huxley, G. Stokes byli Britové. Když v letech 1900–1904 probíhá první školní reforma, působí v Královské edukační komisi v oddělení přírodních věd řada významných anglických chemiků. Jde o zavedení chemie jako předmětu do všeobecně vzdělávacích škol. Chemie se stává ve všeobecně vzdělávací škole výběrovým, tj. fakultativním předmětem, laboratorní práce nejsou přitom povinné. Někteří členové komise, např. W. Thomson a W. Ramsey jsou toho názoru, že by se chemii mělo vyučovat již od prvního ročníku střední školy, tj. děti ve věku 11–12 let, a to proto, že „chemie, resp. přírodověda není obtížnější než aritmetika“. Chemie byla v Anglii prvním přírodovědným předmětem, který byl zaveden v rámci všeobecného vzdělávání a komise doporučovala zavedení

i aplikovaných přírodovědných disciplín, jako je agrochemie, aplikovaná mechanika apod.

Do konce XIX. století představovala výuka chemie na anglických středních školách v podstatě zredukovaný vysok školský kurz. První pokus o vytvoření na vědecké soustavě ne zcela závislé výuky chemie na střední škole pochází od E. Armstronga. E. Armstrong byl profesorem chemie různých vysokých škol v Anglii a nadšencem výuky přírodním vědám v podmínkách všeobecně vzdělávacích britských škol. Na základě poměrně komplikovaných didaktických výzkumů sestavil učební osnovy, které pak po dlouhá léta ověřoval a postupně zdokonaloval. O této své činnosti napsal zajímavé dílo *The Teaching of Scientific Method*, které vydal²⁸ v r. 1898. Uvádí, že význam přírodních věd a jejich vyučování spočívá především v jejich praktické hodnotě. Přírodovědné vyučování umožňuje, podle autora, specificky orientovaný rozvoj intelektu, čehož nelze dosáhnout ani literárním, ani čistě matematickým vzděláváním. Jde mu zejména o rozvoj schopností pozorovat, experimentovat a uvažovat. E. Armstrong využívá tzv. heuristickou metodu, tj. takový způsob výuky, při němž se žáci mohou relativně samostatně zmocňovat nových poznatků. Podle Armstronga věda vyžaduje absolutní svobodu myšlení, svobodu ducha zbavenou všech dogmat. Svoji metodu charakterizuje jako „obyčejný způsob vědeckého bádání“, realizovaný v podmínkách střední školy. Zdůrazňuje, že žák musí samostatně dospívat k objevování faktů. Heuristickou metodu obecně zformuloval již v r. 1897 H. Spencer²⁹. E. Armstrong ji zaktualizoval a aplikoval na výuku přírodním vědám, zejména chemii. Vyznačtelem heuristické metody se stal i jiný anglický didaktik chemie J. Smittels, který ve svém článku³⁰, zdůraznil význam dvou jejích charakteristik:

- 1) samostatné provádění experimentů žáky,
- 2) experiment je prostředkem objevování čehosi dosud neznámého.

Heuristickou metodu ve výuce chemii dále rozpracovali G. Fowles³¹ a D. Newbury³². Byla však předmětem kritiky předsedy Britské asociace přírodovědců B. Gregoryho^{33,34}.

V r. 1962 vznikl ve Velké Británii nově koncipovaný kurz výuky chemie, a to v tzv. Nuffieldově fondu³⁵. Tato soustava vychází z domácích armstrongovských tradic s nesporným vlivem didaktiky americké a německé. Je zde, pro anglosaské didaktické soustavy tak charakteristická, menší systematická, a to na úkor větší samostatnosti získávání poznatků samotnými poznávajícími subjekty, zvláště jedná-li se o experimentální činnosti. Později, zejména v sedmdesátých a osmdesátých letech prodělala didaktická soustava chemie vzniklá v Nuffieldově fondu značné proměny. Bylo odstoupeno od jednostranného aplikování heuristické metody a volnosti skladby jednotlivých tematických okruhů. Lze dokonce říci, že došlo k určitému obratu ve prospěch klasického pojetí. Jako reakce na to vznikl pracovní tým univerzity v Yorku, který pokračuje v rozvíjení britské didaktické soustavy chemie v armstrongovském duchu.

8. Vývoj chemického vzdělávání v USA

Nelze opomenout ani vývoj didaktických systémů chemie ve Spojených státech. Od poloviny XIX. století je zde typickou školou tzv. High School. Dodnes je univerzální všeobecně vzdělávací, byť značně diferencovanou střední školou. Má dva

stupně: nižší čtyřletou Junior High School a vyšší, tří nebo čtyřletou Senior High School.

Pojetí americké školy vychází zpočátku z filozofie pragmatismu a Thorndikovy teorie³⁶. Významnou osobností pragmatické pedagogiky je J. Dewey, který výrazně ovlivnil i utváření koncepce vyučování chemii v americké škole. J. Dewey pokládá pojmy a teorie za instrumenty, které pomáhají praktické činnosti a myšlení v procesu permanentní adaptace. Ve vyučování jde o povzbuzování zájmu o věc a o realizaci praktických žákovských činností. Tyto ideje jsou typické i pro navazující systémy, viz např. známé Taylorovo dílo³⁷, v němž autor nespátňuje jako hlavní úkol ovládnutí daného souboru konkrétních vědomostí, ale rozvoj člověka jako jedince. Kromě těchto idejí se v USA prosazoval i tzv. tradicionalismus, který požadoval neustálé zvyšování teoretické úrovně všech základních vyučovacích předmětů.

V USA existovaly následující typy koncepcí, jímž odpovídají i příslušné učebnice chemie:

1. Analogické s anglickými, včetně elementárního předmětu General Science.
2. Systematická koncepce, analogická s většinou koncepcí evropských.
3. Praktická, o níž G. I. Richardson³⁸ tvrdí, že je „vykradeným kurzem college“.

Američané s oblibou hodnotí vlastní historický vývoj školství a to z různých hledisek. Tak např. již v r. 1902 analyzuje A. Smith³⁹ v USA existující učebnice chemie a dělí je na:

- 1) heuristické, se značným důrazem na experiment, zejména na laboratorní žákovskou činnost; tyto učebnice, podle autora, odpovídají anglickým a byly zpracovány na základě armstrongovských východisek,
- 2) teoretické, které zdůrazňují význam zákonů, principů a chemické teorie,
- 3) historicko-systematické, zdůrazňující význam popisného materiálu.

Zajímavý je popis „americké cesty vyučovacích kurzů pro všechny“⁴⁰. Tato stať obsahuje kritiku stávajících učebnic a pojetí, jako pro žáky nezajímavých, obtížných, obsahujících nadměrnost faktografie, pojmů a teorií. V posledních 40–50 letech vzniklo v USA mnoho různých kurzů chemie, ale jenom některé z nich se dočkaly relativně delšího života. Podle reprezentanta učitelů chemie v UNESCO z konce 60. let F. Mayburyho byly v té době v 50–60 % amerických středních škol používány učebnice M. Bradburyho *Chemistry and You* z r. 1957, dále B. Yaffeho *New World of Chemistry* z r. 1955 a E. C. Weavera a L. C. Fosterova *Chemistry for Our Times*, též z r. 1955. Tyto učebnice se svojí strukturou příliš nelišily od většiny učebnic evropských.

Prudký rozvoj chemické vědy a techniky, zejména v posledních desetiletích, způsobil potřebu revize dosavadního způsobu výuky chemie. Jde zejména o taková témata jako základy termodynamiky, chemické kinetiky a z ní vyplývající teorie reakčních mechanismů. Právě tyto skutečnosti vedly k pokusům o vytvoření adekvátnějších didaktických systémů chemie, a to i pro všeobecně vzdělávací americkou střední školu. A tak v roce 1963 vznikají hned dvě konkurenční didaktické soustavy, a to CBA⁴¹ a Chem Study⁴² (CBA – Chemical Bond Approach Project, Chem Study neboli CHEMS – Chemistry and Experimental Science). Oba tyto systémy představují novou vývojovou etapu chemických didaktických soustav USA. Jde o systémy a k nim adekvátní učebnice určené

pro Senior High School. Jejich společným charakteristickým rysem je:

- 1) vysoká teoretická úroveň,
- 2) příkládání značného významu učivu o stavbě látek, struktuře a energetických změnách, jde tu o určitou reminiscenci názorů Ostwaldových,
- 3) zavedení elementů kvantové teorie, a to poprvé na úrovni střední všeobecně vzdělávací školy, jakož i o určité soustavy základních pojmů termodynamických, např. entropie (v systému CBA).

Přítom je dost značná pozornost věnována školnímu, zejména žákovskému experimentu s určitými aspekty metodologickými, např. uvedení metody „black box“ apod. Vývoj koncepcí chemického vzdělávání ovlivnil didaktiku chemie v celé řadě zemí, včetně tehdejšího Československa, kde v r. 1964 vzniká v rámci Chemické společnosti její sekce výuky chemie.

Poznamenejme, že nové americké didaktické systémy nebyly všemi, především učiteli, ale i některými didaktiky a chemiky, např. R. J. Gillespiem, přijaty jednoznačně pozitivně. Později vznikly nové, lze říci, že hybridní kurzy chemie a k nim příslušné učebnice, např. R. C. Smoota⁴³. Učebnice byla vydána u Merrill Publishing v Ohiu, první vydání v r. 1987. Tato učebnice je v běžném používání pro Senior High School doposud. Svoji koncepcí představuje hybrid klasické koncepce s některými „osvědčenými“ prvky uvedených experimentálně náročných didaktických systémů.

9. Vývoj chemického vzdělávání v Rusku

Významné je sledovat i vývoj výuky chemie v Rusku, neboť tato země spolu s Německem, Velkou Británií, Francií a USA nejvíce přispěla k rozvoji didaktiky chemie.

Věnovali jsme se již výraznému představiteli ruské chemie D. I. Mendělejevovi, a to zejména pro jeho nesporně originální přístup ke koncipování didaktické soustavy chemie, která získala v našich podmínkách díky velkému českému chemikovi B. Braunerovi záhy značný ohlas.

Velmi významnou osobností v oblasti organické chemie byl A. Butlerov, který je oprávněně pokládán, spolu s F. A. Kekulém, za tvůrce novodobé teorie stavby organických sloučenin. Tato teorie se stala východí při tvorbě učebnic organické chemie. Svědectví o tom podal v úvodu své učebnice organické chemie významný český chemik E. Votoček⁴⁴.

Na základě originálních idejí vznikla již v předrevolučním období řada zajímavých učebnic chemie. Prvním didaktikem chemie byl v Rusku Š. I. Sozonov. Jeho názory byly ovlivněny zahraničními didaktiky chemie, zejména R. Arendtem, F. Wilbrandem a E. Armstrongem, i když se snažil o originální, vlastní teoretický model výuky chemie, především na předrevoluční střední všeobecně vzdělávací škole. V r. 1923 byla v tehdejší sovětské škole zavedena tzv. komplexní metoda výuky. Byl zrušen systematický výklad základů jednotlivých přírodních věd a nahrazen „logikou obklopujícího nás světa“. Základním objektem studia se stala práce lidí, výroba a společnost. A protože nelze některá odvětví lidské činnosti vysvětlit bez znalostí základů chemie, byla jako předmět zařazena již do páté třídy všeobecně vzdělávací školy. Osnovy byly rozděleny do několika částí. V první části byl obsažen obecný název tématu a názvy jeho chemických částí. Druhou část

tvořilo chemicko-technologické učivo a v třetí části byl soupis příslušných laboratorních činností. Poslední čtvrtá část obsahovala teoretické informace, s nimiž je nezbytné seznámit žáky. Tak byly zpracovány osnovy pro všechny postupné ročníky. V r. 1927 byly tyto osnovy podrobeny kritice, poněvadž prý postrádaly hlavní polytechnickou linii. K splnění uvedené funkce byli žáci přinuceni vykonávat příslušné manuální činnosti. Uvedme jako příklady tematiku 5. ročníku – Ekonomická pětiletka našeho závodu a 6. ročníku – Rekonstrukce národního hospodářství v rámci pětiletého plánu. Škola se měla stát centrem organizujícím společenskou činnost dětí. Místo předmětů nastoupily brigády, buňky apod. Chemii se vyučovalo pomocí speciálních pracovních sešitů, klasické učebnice neexistovaly. Tato situace trvala až do r. 1932. Z rozhodnutí nejvyšších orgánů byly od r. 1933 stanoveny tzv. stacionární učebnice. Hlavním autorem učebnic se stal předrevoluční chemik a původně asistent Mendělejevův V. N. Věrchovskij, který společně s I. S. Goľdfarbem a L. N. Smorgovským napsali poměrně dobré a obsáhlé učebnice chemie pro tzv. sovětskou desetiletku^{45,46}. Ty byly používány až do padesátých let. Vedoucí teorií byl periodický zákon Mendělejevův a jeho systém prvků jako základní heuristická pomůcka. Následovala elementární systematická organická chemie, vycházející z Butlerovovy teorie stavby organických sloučenin. Šlo o návrat k tradiční ruské škole, s pokusy o aplikaci socialistické teorie výchovy. Připomeňme, že šlo o dobré učebnice, které byly přeloženy do celé řady jazyků. V dalším vývojovém období šedesátých a sedmdesátých let probíhá rovněž v tehdejší sovětské škole tzv. modernizační proces, týkající se jak obsahu, tak i metod a postupů výuky. Z tohoto období jsou známy učebnice Levčenkovy⁴⁷, Chodakovovy⁴⁸ a Cvětkovovy⁴⁹, které v různých modifikacích a zjednodušeníh přečkaly až do revolučních přeměn konce osmdesátých let. Devadesátá léta, poznamenaná snahou po demokratizaci ruské společnosti, neminula ani oblast školství. Byla obnovena gymnázia a lycea. Vedle státních škol se objevily školy soukromé a církevní a byly vydány nové řady učebnic⁵⁰⁻⁵², které navazují na ruské tradice a zároveň akceptují současné způsoby výuky chemie ve světě.

10. Závěr

V článku je podán přehled vývoje chemického vzdělávání v souvislosti s rozvojem chemické vědy ve významných zemích Evropy a v USA.

Vývoji chemie jako vědy a předmětu vyučování, včetně formování didaktiky chemie jako vědního oboru v českých zemích, by měla být věnována zvláštní samostatná pozornost. Proto na závěr uvedme jen to, že se v našich podmínkách prolínaly všechny proudy, o nichž jsme se zmiňovali v předchozích úvahách.

Inspirací pro vznik této studie byly také další práce ruského didaktika chemie L. N. Smorgonského. Za poskytnutí těchto materiálů patří dík členu-korespondentu APN L. N. Cvětkovovi.

LITERATURA

1. Liebig J.: *Chemische Briefe*. Leipzig u. Heidelberg 1878.
2. Liebig J.: *Reden und Abhandlungen*. Leipzig 1874.

3. Liebig J.: *Die Entwicklung der Ideen in der Naturwissenschaft*. München 1866.
4. Liebig J., Berzelius, J.: *Briefe 1831–1845*. München 1866.
5. Liebig J.: *Über das Studium der Naturwissenschaft*. München 1852.
6. Faraday M.: *The Chemical History of Candle*. London 1894.
7. Mendelejev D. I.: *Osnovy chimii*. Petersburg 1869–1871.
8. Šafařík P.: *Počátkové chemie*. Praha 1884.
9. Votoček E.: *Anorganická chemie*. Praha 1902.
10. Ostwald W.: *Grundzüge der anorganischen Chemie*. Leipzig 1900.
11. Ostwald W.: *Schule der Chemie*. Leipzig 1910.
12. Arendt R.: *Bildungselemente und erzieherischer Wert des Unterrichts an niederen und höheren Lehranstalten*. Verlag von L. Voss, Hamburg u. Leipzig 1894.
13. Arendt R.: *Technik der Experimentalchemie*. Verlag von L. Voss, Hamburg u. Leipzig 1910.
14. Arendt R.: *Anorganische Chemie in Grundzügen*. Verlag von L. Voss, Hamburg u. Leipzig 1894.
15. Wilbrand F.: *Leitfaden für methodischen Unterricht in der Chemie*. Leipzig 1870.
16. Lowenhardt H.: *Didaktik und Methodik des Chemieunterrichts*. Berlin 1920.
17. Winderlich K.: *Handbuch des Chemieunterrichts an höheren Schulen*. Breslau 1920.
18. Scheid K.: *Methodik des Chemieunterrichts*. Leipzig 1927.
19. Annam W. u. Koll.: *Elemente I, II*. Klett Verlag, Stuttgart 1990–1994.
20. *Guide des études, enseignement supérieur*. Paris 1934.
21. Faucher R.: *Chimie – Classes de seconde de mathématique et sciences expérimentales*. Librairie Hatier, Paris 1958.
22. Cessac J.: *Chimie classes secondes*. Librairie Hatier, Paris 1961.
23. Treherne M.: *Chimie de premier*. Librairie Hatier, Paris 1963.
24. Joyal H.: *Chimie, Classes Terminales*. C. D. T. Librairie Hatier, Paris 1967.
25. Dreyfus K., Donadini C.: *Chimie, cl. 2-me*. Librairie Hatier, Paris 1968.
26. De Cologny I. E.: *Chimie*. Nathan, Paris 1989.
27. Tomasino A., Lorrin C.: *Chimie*. Nathan, Paris 1993.
28. Armstrong E.: *The Teaching of Scientific Methods and Other Papers on Education*. London 1898.
29. Spencer L.: *Aids and Practice of Teaching Physical Science*. London 1912.
30. Smittels B.: *Nature* 69, 219 (1913).
31. Fowles J.: *Lecture Experiments in Chemistry*. London 1937.
32. Newbury M.: *The Teaching of Chemistry*. London 1934.
33. Gregory B.: *British Association Rapport*, str. 394. London 1919.
34. Gregory B.: *British Association, Rapport*, str. 267. London 1922.
35. Nyholm R. S., et al.: *Nuffield Science Teaching Projects*. Newgate Press Ltd., London 1967.
36. Kandel I. L.: *Philosophical Theories of American Education*, str. 25. New York 1958.
37. Taylor L. O.: *The American Secondary School*. New York 1960.
38. Richardson G. I.: *Science Teaching in Secondary School*, str. 10. New York 1957.
39. Brandwein W., Blackwood, P. E.: *A Book of the Methods. Teaching of High School Science*, str. 319. New York 1958.
40. Sidney R.: *J. Chem. Ed.* 33, 787 (1956).
41. Pimental G. C.: *CBA – Chemical Bond Approach Project*. Webster Division McGraw-Hill Book Co., New York 1963.
42. Seaborg G. T.: *CHEMSTUDY. Teachers Guide*. W. H. Freeman and Co., Cooperating Publishers, San Francisco 1963.
43. Smoot R. C.: *Chemistry – a Modern Course*. Merrill Publishing, Ohio 1987.
44. Votoček E.: *Organická chemie*. Čs. společnost chemická, Praha 1935.
45. Věrchofskij N. V.: *Nieorganická chemija dlja 7.–9. kl. SŠ. UČPEDGIZ, Moskva* 1937, 1946, 1947.
46. Věrchofskij N. V., Goldfarb, I. S., Smorgovskij, L. N.: *Učebnik organickéj chemii dlja 10. kl. SŠ. UČPEDGIZ, Moskva* 1947.
47. Levčenko V. V.: *Chimija, učebnik dlja SŠ. Pedagogika, Moskva* 1952.
48. Chodakov J. V., Epštejn, D., A.: *Nieorganická chemija, učebnik dlja 8. i 9. kl. SŠ. Pedagogika, Moskva* 1967.
49. Cvětšov L. A.: *Organická chemija dlja 10. kl. SŠ. Pedagogika, Moskva* 1970.
50. Feldman F. G., Rudzitis, G. E.: *Chimija dlja 8.–11. kl. SŠ. Prosvěšćenie, Moskva* 1998.
51. Gabrieljan O. C.: *Chimija. BlikPljus-Sirin, Moskva* 1997.
52. Drofa M.: *Bolšoj spravočnik školnika 5.–11. kl. SŠ. Chimija, str. 855. Drofa, Moskva* 1998.

J. Hellberg and M. Bilek (*Department of Chemistry, Pedagogical Faculty, University of Hradec Králové*): **The Development of Chemical Education in Connection with the Development of Chemistry as a Science**

Historical relations of the development of chemistry as a science and a teaching subject on one hand and the formation of didactics of chemistry as an interdisciplinary science branch on the other are dealt with in the paper. The consequences are described of the formation of first chemistry textbooks and efforts at introducing chemistry as a general education subject at different levels of education systems. The analysis of chemical teaching in Germany, England, France, U.S.A. and Russia confirms the *raison d'être* of an independently developed science branch – didactics of chemistry.

OBSAH

ÚVODNÍK	1074
REFERÁTY	
Elektrochemické stanovení alkaloidů morfinové řady J. Volke a V. Volkeová	1075
Anodická oxidácia hliníka v kyslých elektrolytoch Ž. Holická, M. Chovancová a M. Zemanová	1081
Struktura orosomukoidu – příklad studia glykoproteinu fyzikálně-chemickými metodami V. Kalous	1087
Kapilární elektroforéza sacharidů J. Žídková a J. Chmelík	1093
Concepts of Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies S. Miertus, G. Fassina, and P. F. Seneci	1104
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Postup mineralizace hořčíkem pro stanovení Deloru 103 či dalších chlorderivátů v oleji či v roztocích J. Jeník, K. Bojda, J. Kacířová a L. Novotný	1111
Využití diferenčních měření povrchových tlaků pro porovnání adsorpčního chování hydrochinonu a p-benzochinonu E. Jírovcová a T. Sákra	1113
Stanovení silybinu v krevní plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s extrakcí na pevné fázi P. Kosina a J. Bartek	1115
Pevné stříbrné amalgamové elektrody L. Novotný a B. Yosypchuk	1118
RECENZE	1121
ODBORNÁ SETKÁNÍ	1124
VÝUKA CHEMIE	1125

CONTENTS

EDITORIAL	1074
REVIEW ARTICLES	
Electrochemical Determination of Alkaloids of the Morphine Series J. Volke and V. Volkeová	1075
Anodic Oxidation of Aluminium in Acidic Electrolytes Ž. Holická, M. Chovancová, and M. Zemanová	1081
Structure of Orosomucoid – An Example of the Study of a Glycoprotein Investigated by Physicochemical Methods V. Kalous	1087
Electrophoresis of Carbohydrates J. Žídková and J. Chmelík	1093
Concepts of Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies S. Miertus, G. Fassina, and P. F. Seneci	1104
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Magnesium Mineralization Procedure for Determination of Delor 103 or Other Chloro Derivatives in Oil or Solutions J. Jeník, K. Bojda, J. Kacířová, and L. Novotný	1111
Utilization of Difference Measurements of Surface Pressures for Comparison of Adsorption Behaviour of Hydroquinone and 1,4-Benzoquinone E. Jírovcová and T. Sákra	1113
Determination of Silybin in Blood Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction P. Kosina and J. Bartek	1115
Solid Silver Amalgam Electrodes L. Novotný and B. Yosypchuk	1118
BOOK REVIEWS	1121
MEETINGS	1124
EDUCATION IN CHEMISTRY	1125

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 94 (2000), čís./no. 12 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 124, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 110 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 31 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Heflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámotný (webové stránky) • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. Jiráťová, I. Valterová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, J. Káš, J. Košťál, J. Koubek, L. Lapčík, J. Lederer, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, P. Pavlas, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNÝ NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jionická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2000 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2000 (12 čísel) 940 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2200 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2000 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/1 5333/95 • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use. • Pokyny pro autory najdete v čísle 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu. V rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností. SAZBA BULLETINU: B. Valter.

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ
CZECH CHEMICAL SOCIETY

vydává ve spolupráci
s Vysokou školou chemicko-technologickou, Praha,
s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem
organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční
podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
ČR

published in cooperation
with Institute of Chemical Technology, Prague,
Czech Society of Industrial Chemistry, Institute of
Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of
Science of the Czech Republic, and with financial
assistance of Ministry of Education, Youth and Sports
of the Czech Republic

CHEMICKÉ LISTY

CHILSAC 94, 1 – 408 (2000)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redaktoři

Editors

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. GUT, J. HETFLEJŠ, P. CHUCHVALEC, J. PODEŠVA, P. RAUCH,
J. VOLKE

Bulletin

Bulletin

M. BLÁHOVÁ, M. FERLES, B. VALTER, I. VALTEROVÁ

Zahraniční a oblastní redaktoři

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), L. OPLETAL (Hradec Králové), J. SOUŠEK (Olomouc), J. ŠIBOR (Brno)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUZSOVÁ, J. HANIKA, J. CHURÁČEK, Č. JECH, J. KAŠ,
J. KOŠTÍŘ †, J. KOUBEK, L. LAPČÍK, J. LEDERER, T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA,
P. PAVLAS, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

C. JIRÁTOVÁ

Ročník 94 (2000)
Volume 94 (2000)

Listy chemické, ročník 124 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 110

Str. 1 – 408

ISSN 0009-2770

Úvodníky

Editorials

Úvodní slovo předsedy České společnosti chemické (V. Šimánek)	1
Chemické listy v roce 2000 (B. Kratochvíl)	89
Jak to vše začalo, vzpomínka na první mezinárodní chemickou olympiádu v Praze (J. Macháčková)	149
Metamorfózy v chemii (P. Chuchvalec)	209
Chemie a Nová maturita (B. Kratochvíl)	277
Chemici a biotechnologie (J. Káš)	337
Úvodní slovo (J. Michal)	409
Praktické využití pokroků v chemii přírodních chmelových látek (J. Čepička)	409
Geneticky modifikované organismy a potraviny (K. Demnerová)	489
Chemie a životní prostředí (J. Barek)	889
Jak dál v chemii (M. Holík)	977
Chemická legislativa České republiky v mezinárodních souvislostech (K. Bláha)	890
Hodnocení nebezpečnosti chemických látek v rámci Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) (J. Hasa)	892
Ověřování dodržování zásad správné laboratorní praxe a výhledy do budoucnosti (P. Finger, I. Koruna a K. Bláha)	895
Postavení národních chemických společností v Evropě (V. Šimánek)	1074

Referáty

Review Articles

R. Kalvoda: Netradiční použití polarografie/voltametrie	2
I. Špánik a J. Krupčík: Využití cyklodextrínů jako stacionárních fází na separaci enantiomérů kapilární plynovou chromatografií	10
J. Dostál a J. Slavík: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech	15
K. Lešová a M. Šturdíková: Antifungální metabolity produkované mikromycetami	21
P. Janderka: Molekulové modelování a teoretická chemie na PC	28
J. Horký a B. Boček: Většina medailí tentokrát pro Chemical Abstracts (porovnání vybranýchází dat na příkladu rešerše o farmaceutickém přípravku epibatidin)	39
J. Czernek a V. Sklenář: <i>Ab initio</i> výpočty chemických posunů v biomolekulách	90
V. Pacáková, K. Štulík, S. Hubená a M. Tichá: Afinity kapilární elektroforéza	97
M. Šturdíková, D. Slugeň, K. Lešová a M. Rosenberg: Mikrobiální produkcia farebných azofilónových metabolitů	105
J. Slanina: Biologická a farmakologická aktivita lignanů	111
L. Lapčík, V. Cetkovský, B. Lapčíková a S. Vašut: Materiály pro snižování hluku a vibrací	117
M. Kohlíčková, V. Jedináková-Křížová a F. Melichar: Komplexní sloučeniny rhenia v nukleární medicíně	151
L. Jurica a E. Beinrohr: Stanovenie stopových koncentrací arzenu elektrochemickou rozpúšťacou analýzou	159
J. Balej: Složení a termodynamické vlastnosti vyšších oxohydroxo sloučenin niklu	168
J. Mindl: Struktura a reaktivita karbamátů	175
P. Uchytíl: Použití anorganických a polymerních membrán pro pervaporaci	181
M. Stiborová, E. Frei a H. H. Schmeiser: Aristolochové kyseliny a ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“	186
J. Shorter: The Prehistory of the Hammett Equation	210
R. Kalvoda: Elektronický nos a jazyk	215
P. Kotianová a E. Matisová: Mikroextrakcia kvapalina–kvapalina a jej využitie pri stopovej analýze organických látok vo vodnej matrici	220
L. Bořek-Dohalská a M. Stiborová: Protinádorová léčiva s unikátním mechanismem účinnu	226
J. Patočka, M. C. Ardila a M. V. Vázquez: Jedy žab <i>Dendrobatidae</i> – inspirace pro bioorganickou chemii	230

<i>J. Čejka a N. Žilková</i> : Syntéza a struktura zeolitů	278
<i>J. Gasparič</i> : Hexanitrokobaltitan sodný, Na ₃ (Co(NO ₂) ₆), jako činidlo v organické analýze	288
<i>R. Halko a M. Hutta</i> : Špeciácia a stanovenie ortuti metódami vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie	292
<i>P. Straka</i> : Chemická struktura černých uhlí	299
<i>D. Gašparovičová a M. Králik</i> : Katalytická redukcia dusičnanov v pitnej vode na Pd-Cu katalyzátoroch	308
<i>Z. Glatz</i> : Kovalentní chromatografie	314
<i>P. Hrnčířová a F. Opekar</i> : Senzory s tuhými polymery pro měření vlhkosti plynů	338
<i>P. Mikuš a D. Kaniansky</i> : Derivatizačné reakcie v kapilárnej elektroforéze aminokyselín	347
<i>Z. Janeba</i> : Purinové 8- <i>O</i> - a 8- <i>S</i> -cyklonukleosidy – syntéza a vlastnosti	355
<i>P. Peterková a L. Lapčík, Jr.</i> : Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace	371
<i>M. Navrátil a E. Šturdík</i> : Chemické aspekty imobilizovaných systémů v biotechnologiách	380
<i>Z. Glatz</i> : Afinitní precipitace bílkovin	389
<i>J. Tobičik a L. Červený</i> : Hydrogenace alkylsubstituovaných fenolů	411
<i>B. Bernauer, I. Janouškovcová, M. Mareček a Z. Sobalík</i> : Přímá katalytická přeměna methanu na vyšší uhlovodíky	417
<i>J. Martinec a J. Hanika</i> : Vliv tvaru částice katalyzátoru na její účinnost při uplatnění vlivu transportních jevů	425
<i>P. Klusoň a P. Kačer</i> : Řízení struktury oxidu titaničitého metodou sol-gel pomocí inverzních micel	432
<i>V. Hlubuček, B. Kuklík a O. Zdebski</i> : Rafinace C4 lineárních alfa-olefinů	437
<i>Z. Glatz</i> : Afinitní ultrafiltrace bílkovin	490
<i>M. Švec a J. Vondrášek</i> : Sbalování proteinů: stav problematiky na konci století	494
<i>J. Tomášková</i> : Membránové glykoproteiny trombocytov	501
<i>M. Hoskovec</i> : Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika	897
<i>V. Janda a M. Švecová</i> : Vedlejší produkty dezinfekce pitné vody	905
<i>Z. Kafka a J. Punčochářová</i> : Bioindikátory v monitoringu životního prostředí	909
<i>Z. Knejzlík, J. Káš a T. Ruml</i> : Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace	913
<i>I. Zíka</i> : Responsible Care – odpovědné podnikání v chemii	919
<i>M. Hocek</i> : Syntéza a biologická aktivita 2- a 6- <i>C</i> -substituovaných purinových bází, nukleosidů a acyklických analogů nukleotidů	978
<i>Č. Jech</i> : Příprava a stabilita supertěžkých prvků	983
<i>R. Halko a M. Hutta</i> : Přehľad využitia neiónových tenzidov při úprave vzoriek pre environmentálnu analýzu organických polutantov	990
<i>M. Doležalová a M. Tkaczyková</i> : Kontrola enantiomerní čistoty léčiv	994
<i>J. Volke a V. Volkeová</i> : Elektrochemické stanovení alkaloidů morfinové řady	1075
<i>Ž. Holická, M. Chovancová a M. Zemanová</i> : Anodická oxidácia hliníka v kyslých elektrolytoch	1081
<i>V. Kalous</i> : Struktura orosomukoidu – příklad studia glykoproteinu fyzikálně-chemickými metodami	1087
<i>J. Žídková a J. Chmelík</i> : Kapilární elektroforéza sacharidů	1093
<i>S. Miertus, G. Fassina, and P. F. Seneci</i> : Concepts of Combinatorial Chemistry and Combinatorial Technologies	1104
XVII. biochemický sjezd – plenární přednášky, ústní a plakátová sdělení	511
52. sjezd chemických společností – sborník	761
Liblice 2000 – plenární přednášky, krátké přednášky a posterly	1029

Nomenklatura a terminologie Nomenclature and Terminology

Doporučení IUPAC. Nomenclature of Structural and Compositional Characteristics of Ordered Microporous and Mesoporous Materials with Inorganic Hosts (<i>J. Kahovec</i>)	234
Metrologická terminologie v chemii (<i>Terminologická komise</i>)	439
Doporučení IUPAC. Names for Muonium Atoms and Ions (<i>J. Kahovec</i>)	507
Doporučení IUPAC. The Hold-up Volume Concept in Column Chromatography. Retention Parameters in Gas Chromatography. Generic Source-Based Nomenclature for Polymers (<i>J. Kahovec</i>).	1003

Laboratorní přístroje a postupy Laboratory Equipment and Methods

<i>J. Nývlt</i> : Viskozita suspenzí	45
<i>S. Vaňková, I. Řezníčková a J. Hoffmann</i> : Respirometrické sledování inhibičních vlivů xenobiotik na aerobní respiraci mikroorganismů aktivovaného kalu	48
<i>P. Brož, E. Drbálková, P. Janderka, P. Sitko a J. Vřešťál</i> : Spojení membránového vstupu s hmotnostním spektrometrem (MIMS)	123
<i>J. Gronos a M. Mačor</i> : Schopnost bakterií viazat a premieňat selen na biologicky využitelnou formu	129
<i>G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková a M. Beránek</i> : Stanovení dextromethorphanu a jeho metabolitů v moči metodou HPLC	132
<i>O. Mestek, V. Hrubý a M. Suchánek</i> : Příprava a ověření standardních roztoků niklu, selenu, thalia a zinku	136
<i>U. Kucharska and J. Leszczynska</i> : The Use of ELISA Method for the Determination of Chloramfenicol in Food Products of Animal Origin	190
<i>I. Němcová, K. Nesměrák a V. Tománková</i> : Určení hodnoty kritické micelární koncentrace marlophenu NP-10 metodou cyklické voltametrie	195
<i>M. Pouzar, T. Černohorský, R. Bulánek a A. Krejčová</i> : Stanovení mědi v zeolitech metodou vlnové disperzní rentgenfluorescenční spektrometrie (WD XRF)	197
<i>A. Eisner, K. Kurečková a K. Ventura</i> : Využití zrychlené extrakce rozpouštědlem pro izolaci aditiv z jednosložkových bezdýmých prachů	235
<i>J. Kizlink</i> : Úprava bodotávku Koflerova bloku pomocí digitálního teploměru	240
<i>A. Kurková, P. Praus a Z. Klika</i> : Použití kapilární izotachografie pro studium interkalace kvartérních solí do montmorillonitu	241
<i>J. Chýlková, J. Polák a R. Mészáros</i> : Stanovení arsenu diferenčně pulsní katodickou stripping voltametrií na stacionární rtuťové kapce	321
<i>M. Douša</i> : Stanovení dimetridazolu ve finálních krmivech a premixech doplňkových látek metodou HPLC s UV detekcí. Mezilaboratorní porovnávací zkouška metody	326
<i>J. Prousek a J. Dömötöröová</i> : Využití systémů NaOCl/Fe^{2+} , HOCl/Fe^{2+} a $\text{H}_2\text{O/HOCl/Fe}^{2+}$ na oxidační degradaci vodných roztoků barviv	331
<i>T. Bartovský a L. Bartovská</i> : Přístroj pro kontinuální měření roztažnosti polymerních fólií	397
<i>T. Navrátil, Z. Dlasková, D. Pelclová a L. Novotný</i> : Použití voltametrických metod ke sledování obsahu olova v organismu při různých způsobech intoxikace	401
<i>J. Podešva</i> : Azeotropický nástavec pro esterifikace v rozpouštědlech lehčích než voda, modifikovaný pro použití molekulového síta	404
<i>M. Navrátilová a K. Sporka</i> : Modifikované zeolitické katalyzátory pro syntézu adamantanu	445
<i>V. Tukač, J. Vokál a J. Hanika</i> : Vliv přenosu kyslíku a hydrodynamiky na oxidaci fenolu ve zkrápěném reaktoru	449
<i>J. Polák</i> : Stanovení obsahu sirovodíku a thiolů v plynných uhlovodících	453
<i>J. Volf, K. Matějovič a M. Petrisko</i> : Reduktivní methylace benzylaminu formaldehydem na katalyzátorech Raney-Ni a Pd/C	456
<i>M. Sekyra, J. Leníček, K. Bednářková a I. Beneš</i> : GC-MS stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků v ovzduší	924
<i>F. Skácel, V. Tekáč a T. Bičák</i> : Posouzení správnosti údajů kontinuálního měření emisí	931
<i>Z. Borovec</i> : Modelování redistribuce toxických prvků v říčních sedimentech	939
<i>R. Hušková, D. Pěchová, M. Kotouček, K. Lemr a K. Doležal</i> : Voltametrické chování a stanovení některých cytokininů na rtuťové elektrodě	1004
<i>A. Gavenda, J. Ševčík a J. Psotová</i> : Stanovení nanomolárních koncentrací anthracyklinových antibiotik kapilární elektroforézou s UV detekcí	1010
<i>V. Quaiserová, J. Zima a J. Berek</i> : HPLC separace genotoxických derivátů naftalenu	1014
<i>M. Semerád, M. Štěpán, V. Otruba a V. Kanický</i> : Plazmová tryska pro emisní spektrální analýzu	1018
<i>J. Jeník, K. Bojda, J. Kacířová a L. Novotný</i> : Postup mineralizace hořčíkem pro stanovení Deloru 103 či dalších chlorderivátů v oleji či roztocích	1111

<i>E. Jírovcová a T. Sákra</i> : Využití diferenčních měření povrchových tlaků pro porovnání adsorptivního chování hydrochinonu a <i>p</i> -benzochinonu	1113
<i>P. Kosina a J. Bartek</i> : Stanovení silybinu v krevní plazmě vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s extrakcí na pevné fázi	1115
<i>L. Novotný a B. Yosypchuk</i> : Pevné stříbrné amalgamové elektrody	1118

Recenze

Book Reviews

A. Kleemann, J. Engel: Pharmaceutical Substances – Syntheses, Patents, Applications (<i>J. Volke</i>)	55
C. H. Hamann, W. Vielstich: Elektrochemie (<i>J. Jindra</i>)	55
J. Vohlídal, A. Julák, K. Štulík: Chemické a analytické tabulky (<i>P. Drašar</i>)	72
U. Schubert (Ed.): Silicon Chemistry (<i>J. Hetflejš</i>)	202
J. Škeřík: Technický receptář (<i>J. Sejbal</i>)	202
L. D. Lawsoa, R. Bauer (Eds.): Phytomedicine of Europe. Chemistry and Biological Activity (<i>J. Soušek</i>)	245
P. Křivka, J. Růžička: Odborný slovník anglicko-český a česko-anglický – Ekologie a ochrana životního prostředí (<i>J. Barek</i>)	245
D. S. Ginley, D. H. Doughty, B. Scrosati, T. Takamura, Z. Zhang (Eds.): Materials for Electrochemical Energy Storage and Conversion II – Batteries, Capacitors, and Fuel Cells (<i>J. Jindra</i>)	246
N. M. Rodriguez, S. L. Soled, J. Hrbek (Eds.): Recent Advances in Catalytic Materials (<i>J. Jindra</i>)	246
O. Auciello, R. Ramesh, E. N. Kaufmann, J. A. Giordmaine, A. G. Evans (Eds.): Annual Review of Materials Science (<i>J. Jindra</i>)	246
N. Sato: Electrochemistry at Metal and Semiconductor Electrodes (<i>L. Pospíšil</i>)	334
A. F. Roberts, M. Wink (Eds.): Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications (<i>J. Soušek</i>)	334
A. Lane (Ed.): Gas and Particle Phase Measurements of Atmospheric Organic Compounds Advances in Environmental, Industrial and Process Control Technologies, Vol. 2 (<i>J. Horák</i>)	335
B. Zilynská, P. Svobodný (Eds.): Věda v Československu v letech 1945–1953 (<i>J. Jindra</i>)	335
M. Raab: Materiály a člověk (Netradiční úvod do současné materiálové vědy) (<i>J. Hlaváč</i>)	406
H. Lüllmann, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger: Color Atlas of Pharmacology (<i>J. Volke</i>)	489
Z. Šesták: Jak psát a přednášet o vědě (<i>P. Chuchvalec</i>)	508
W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore, Ch. Tamm (Eds.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 77 (<i>J. Harmatha</i>)	508
W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore, Ch. Tamm (Eds.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 78 (<i>P. Drašar</i>)	509
Kolektiv autorů: Vývoj chemického průmyslu v Československu 1918–1990, historické studie (<i>P. Zachař</i>)	967
M. Kodíček, V. Karpenko: Biofyzikální chemie (<i>J. Káš</i>)	1121
M. Ferenčík, B. Škárka, M. Novák, L. Turecký: Biochémiá (<i>J. Káš</i>)	1121
H. Scott Fogler: Elements of Chemicals Reaction Engineering (<i>J. Hanika</i>)	1121
W. A. Herrmann (Ed.): Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry, Vol. 9; Transition Metals, Part 3 (<i>J. Hetflejš</i>)	1122
H. Schuster, W. Mikenda (Eds.): Hydrogen Bond Research (<i>Z. Havlas</i>)	1123

Diskuse

Discussion

Jak dál v chemickém průmyslu (<i>V. Duřová</i>)	142
Úvahy skoro o všem (Ovšem jen v oblasti badatelského výzkumu) (<i>Z. Knor</i>)	203
Jednotka látkového množství stále kouzla nezbavená (<i>P. Pitter</i>)	460
Minerální hnojiva v České republice – současný stav a perspektiva (<i>P. Hegner</i>)	946
Ke státním maturitám (<i>M. Melichar</i>)	1025
Hnědé uhlí a jeho perspektiva (<i>V. Duřová</i>)	1026
Je účelné zabývat se v ČR chemickým využitím uhlí? (<i>J. Pašek</i>)	1026

Odborná setkání**Meetings**

18. konference o isoprenoidech (<i>L. Kohout, A. Kasal a B. Koutek</i>)	76
28. konference „Syntéza a analýza léčiv“ (<i>L. Opletal</i>)	77
Farmaceutická chemie (<i>A. Popkov</i>)	78
Chemometrics V – Brno 29.8–2.9.1999 (<i>J. Šibor</i>)	78
Mezinárodní konference o inteligentním zpracování materiálů (<i>J. Šesták</i>)	78
53. zjazd chemických společností (<i>Nullius in verba</i>) (<i>V. Havlíček</i>)	969
Desáté jubilejní sympozium Silichem (<i>A. G. Pokorný</i>)	969
Euroanalysis XI (<i>J. Zima</i>)	1124

Osobní zprávy**Personal News**

Významné životní jubileum (<i>A. G. Pokorný</i>)	82
K sedmdesátinám doc. RNDr. Bohuslava Štraucha, CSc. (<i>Z. Mička</i>)	82
K osmdesátinám Ing. Dr. Josefa Jizby, CSc. (<i>M. Ferles</i>)	83
Prof. RNDr. Josef Laub, CSc., sedmdesátníkem (<i>B. Kratochvíl</i>)	83
Prof. RNDr. Antonín Vlček, DrSc. † 10. října 1999 (<i>R. Kalvoda</i>)	84
Zemřel Dr. Imre Mezö (<i>M. Havránek</i>)	84
Symposion – o tom, že „Chemie je jen jedna“ konaný u příležitosti 75. narozenin prof. Ing. Milana Kratochvíla, CSc. (<i>M. Potáček a J. Šibor</i>)	144
Prof. Pavlu Kratochvílovi k sedmdesátinám (<i>M. Bohdanecký</i>)	144
Kumulativní kulatiny (Přemysl Beran, Jiří Ševčík, Irena Němcová, V. Pacáková) (<i>K. Štulík</i>)	206
Pětasedmdesátiny významného chemika (<i>A. G. Pokorný</i>)	259
Otakar Červinka jubuluje (<i>V. Šimánek</i>)	259
Životní výročí prof. RNDr. Jaroslava Vulterina, DrSc. (<i>P. Beneš</i>)	259
K sedmdesátinám prof. Ing. Jaroslava Churáčka, DrSc. (<i>K. Vytřas a K. Ventura</i>)	260
Profesorka Anna Sopková (1927–1999) (<i>M. Reháková a J. Bubanec</i>)	261
Odešel Ing. Blahoslav Sedláček, DrSc. (<i>K. Dušek</i>)	262
Ing. Jaroslava Turková, DrSc. – in memoriam (<i>O. Mikeš</i>)	262
Vzpomínka na Františka Šantavého (<i>W. Wiegrebe</i>)	263
K šedesátinám RNDr. Václava Macháčka, DrSc. (<i>J. Prugar</i>)	407
Prof. Pašek a Moravské chemické závody Ostrava (<i>P. Pavlas a K. Bancíř</i>)	473
K sedmdesátinám prof. Ing. Josefa Paška, DrSc. (<i>L. Červený</i>)	476
Sedmdesátiny prof. Ing. Pavla Pittera, DrSc. (<i>V. Janda</i>)	477
Vzpomínka na dr. Miloslava Vondráčka (<i>M. Heřmanský</i>)	510
Zemřel prof. RNDr. Josef V. Košťtř (<i>G. Entlicher</i>)	959
Profesor Košťtř a Chemické listy (<i>J. Gut</i>)	960
Za profesorem Mlezivou (<i>J. Šňupárek</i>)	960
Třičtvrtě století (<i>A. G. Pokorný</i>)	961
Za doc. Ing. Jiřím Michálkem, CSc. (<i>B. Bernauer a J. Poživil</i>)	961
Prof. Ing. Michal Ilavský, DrSc., má šedesátiny (<i>M. Raab</i>)	1028

Výuka chemie**Education in Chemistry**

Školní pokusy k tématu spontánní endotermické reakce (<i>J. Číperka, Z. Mička, M. Bílek, J. Banýr a L. Svoboda</i>)	146
Odborná skupina pro výuku chemie České společnosti chemické (<i>H. Čtrnáctová</i>)	247
Vyhovuje současné pojetí výuky anorganické chemie na všeobecné vzdělávací škole? (<i>J. Banýr a H. Čtrnáctová</i>)	248
Použití výpočetních programů při výuce (<i>pad</i>)	959
Experimenty k demonstraci výroby papíru ve výuce chemie (<i>M. Kraitr, J. Štrofová a V. Richtř</i>)	1022
Vývoj chemického vzdělávání v souvislosti s rozvojem chemie jako vědy (<i>J. Hellberg a M. Bílek</i>)	1124

Zprávy**News**

Československo-americký vědeckotechnický program (<i>S. Lauerová</i>)	56
Výukový model a program akreditace monitoringu znečištění ovzduší v zemích Evropské unie a dalších evropských zemích (<i>F. Skácel</i>)	254

Dopisy**Letters**

Vážená redakce (<i>F. Švec</i>)	252
---	-----

Bulletin Českých chemických společností Bulletin of the Czech Chemical Societies

Možnosti financování středně velikých inovací v chemickém průmyslu (<i>M. Fusek</i>)	58
Jak studenti hodnotili učitele na VŠCHT (<i>J. Havrda</i>)	462
Porovnání názvoslovných programů (<i>pad</i>)	463
Web of Science v České republice (<i>I. Kadlecová</i>)	951
Esej na okraj dne (<i>P. Drašar</i>)	952
Současný stav a problémy českého chemického názvosloví (<i>J. Kahovec</i>)	953
Ze života chemických společností	59, 256, 468, 955
Členská oznámení a služby	63, 257, 956
Chemik na studiích, cestách	
31. mezinárodní chemická olympiáda, Bangkok 1999 (slohové cvičení – úvaha)	64
Pittcon 2000 (<i>pad</i>)	471
Baderova stipendia v oboru chemie	957
Z vědeckých, odborných a zahraničních společností	66, 258, 472, 957
Bulletin představuje	67, 973
Zákony, které ovlivní život chemiků	72, 269, 480, 966
Poezie	73, 269, 481, 967
Zajímavosti ze světa vědy a techniky	74, 269, 482, 968
Aprílový klub	75, 269, 483, 968
Střípky a klípky o světových chemících	67, 264, 478, 962
Technické zajímavosti a služby	70, 264, 478, 964
Akce v ČR a v zahraničí	79, 270, 484, 970
Výročí a jubilea	273, 486, 974
Noví členové ČSCH	85

(úv) úvodník, (ref) přehledný referát, (nt) nomenklatura a terminologie, (l) laboratorní přístroje a postupy, (v.ch.) výuka chemie, (rec) recenze, (d) diskuse, (os.zp.) osobní zprávy, (z) zprávy, (s) odborná setkání, (b) bulletin

- Ardila M. C.: (ref) 230
 Balej J.: (ref) 168
 Bancíř K.: (os.zp.) 473
 Banýr J.: (v.ch.) 146, 248
 Barek J.: (rec) 245, (úv) 889, (l) 1014
 Bartek J.: (l) 1115
 Bartovská L.: (l) 397
 Bartovský T.: (l) 397
 Bednářková K.: (l) 924
 Beinrohr E.: (ref) 159
 Beneš I.: (l) 924
 Beneš P.: (os.zp.) 259
 Beránek M.: (l) 132
 Bernauer B.: (ref) 417, (os.zp.) 961
 Bičák T.: (l) 931
 Bílek M.: (v.ch.) 146, 1125
 Bláha K.: 890, 895
 Boček B.: (ref) 39
 Bohdanecký M.: (os.zp.) 144
 Bojda K.: (l) 1111
 Borovec Z.: (l) 939
 Bořek-Dohalská L.: (ref) 226
 Brož P.: (l) 123
 Bubanec J.: (os.zp.) 261
 Bulánek R.: (l) 197
 Cetkovský V.: (ref) 117
 Czernek J.: (ref) 90
 Čejka J.: (ref) 278
 Čepička J.: (úv) 409
 Černožský T.: (l) 197
 Červený L.: (ref) 411, (os.zp.) 476
 Čípera J.: (v.ch.) 146
 Čtrnáctová H.: (v.ch.) 247, 248
 Demnerová K.: (úv) 489
 Dlasková Z.: (l) 401
 Doležal K.: (l) 1004
 Doležalová M.: (ref) 994
 Dömötöröová J.: (l) 331
 Dostál J.: (ref) 15
 Douša M.: (l) 326
 Drašar L.: (b) 79, 270, 484, 970
 Drašar P.: (b) 463, 952, (rec) 72, 509
 Drbálková E.: (l) 123
 Duřová V.: (d) 142, 1026
 Dušek K.: (os.zp.) 262
 Eisner A.: (l) 235
 Entlicher G.: (os.zp.) 959
 Fassina G.: (ref) 1104
 Ferles M.: (os.zp.) 83, (b) 67, 264, 478, 962
 Finger P.: 895
 Frei E.: (ref) 186
 Fusek M.: (rec) 481, (b) 58
 Gasparič J.: (ref) 288
 Gašparičová D.: (ref) 308
 Gavenda A.: (l) 1010
 Glatz Z.: (ref) 314, 389, 490
 Grones J.: (l) 129
 Gut J.: (os.zp.) 960
 Halko R.: (ref) 292, 990
 Hanika J.: (ref) 425, (l) 449, (rec) 1121
 Harmatha J.: (rec) 508
 Hasa J.: 892
 Havlas Z.: (rec) 1123
 Havlíček V.: (s) 969
 Havránek M.: (os.zp.) 84
 Havrda J.: (b) 462
 Hegner P.: (d) 946
 Hellberg J.: (v.ch.) 1125
 Heřmanský M.: (os.zp.) 510
 Hetflejš J.: (rec) 202, 1122
 Hlaváč J.: (rec) 406
 Hlubuček V.: (ref) 437
 Hocek M.: (ref) 978
 Hoffmann J.: (l) 48
 Holická Ž.: (ref) 1081
 Holík M.: (úv) 977
 Horák J.: (rec) 335
 Horký J.: (ref) 39
 Hoskovec M.: (ref) 897
 Hrnčířová P.: (ref) 338
 Hrubý V.: (l) 136
 Hubená S.: (ref) 97
 Hušková R.: (l) 1004
 Hutta M.: (ref) 292, 990
 Chládek J.: (l) 132
 Chmelík J.: (ref) 1093
 Chovancová M.: (ref) 1081
 Chuchvalec P.: (úv) 209, (rec) 508
 Chýlková J.: (l) 321
 Janda V.: (ref) 905, oprava 1123, (os.zp.) 477
 Janderka P.: (ref) 28, (l) 123
 Janeba Z.: (ref) 355
 Janoušková I.: (ref) 417
 Jedináková-Křížová V.: (ref) 151
 Jech Č.: (ref) 983
 Jeník J.: (l) 1111
 Jindra J.: (rec) 55, 246, 335
 Jírovcová E.: (l) 1113
 Jurica L.: (ref) 159
 Kacířová J.: (l) 1111
 Kačer P.: (ref) 432
 Kadlecová I.: (b) 951
 Kafka Z.: (ref) 909
 Kahovec J.: (nt) 234, 507, 1003, (b) 953
 Kalous V.: (ref) 1087
 Kalvoda R.: (ref) 2, 213, (os.zp.) 84
 Kaniánský D.: (ref) 347
 Kanický V.: (l) 1018
 Kasal A.: (s) 76
 Káš J.: (úv) 337, (ref) 913, (rec) 1121
 Kizlink J.: (l) 240
 Klika Z.: (l) 241
 Klusoň P.: (ref) 432
 Knejzlík Z.: (ref) 913
 Knor Z.: (d) 203
 Kohlíčková M.: (ref) 151
 Kohout L.: (s) 76
 Kosina P.: (l) 1115
 Koruna I.: 895
 Kotianová P.: (ref) 220
 Kotouček M.: (l) 1004
 Koutek B.: (s) 76
 Kraitr M.: (v.ch.) 1022
 Králik M.: (ref) 308
 Kratochvíl B.: (úv) 89, 277, (os.zp.) 83

- Krejčová A.: (l) 197
 Krupčík J.: (ref) 10
 Kucharska U.: (l) 190
 Kuklík B.: (ref) 437
 Kurečková K.: (l) 235
 Kurková M.: (l) 241
- Lapčík L., Jr.: (ref) 117, 371
 Lapčíková B.: (ref) 117
 Lauerová S.: (z) 56
 Lemr K.: (l) 1004
 Leníček J.: (l) 924
 Leszczynska J.: (l) 190
 Lešová K.: (ref) 21, 105
- Mačor M.: (l) 129
 Macháčková J.: (úv) 149
 Mareček M.: (ref) 417
 Martinec J.: (ref) 425
 Martínková J.: (l) 132
 Matějovič K.: (l) 456
 Matisová E.: (ref) 220
 Matouš J.: (b) 955
 Melichar F.: (ref) 151
 Melichar M.: (d) 1025
 Mestek O.: (l) 136
 Mészáros R.: (l) 321
 Mička Z.: (os.zp.) 82, (v.ch.) 146
 Miertus S.: (ref) 1104
 Michal J.: (úv) 409
 Mikeš O.: (os.zp.) 262
 Mikuš P.: (ref) 347
 Mindl J.: (ref) 175
- Navrátil M.: (ref) 380
 Navrátil T.: (l) 401
 Navrátilová M.: (l) 445
 Němcová I.: (l) 195
 Nesměrák K.: (l) 195
 Novotný L.: (l) 401, 1111, 1118
 Nývlt J.: (l) 45
- Opekar F.: (ref) 338
 Opletal L.: (s) 77
 Otruba V.: (l) 1018
- Pacáková V.: (ref) 97
 Palágyi Š.: (b) 68
 Pašek J.: (d) 1026
 Patočka J.: (ref) 230
 Pavlas P.: (os.zp.) 473
 Pěchová D.: (l) 1004
- Pelclová D.: (l) 401
 Peterková P.: (ref) 371
 Petrisko M.: (l) 456
 Pitter P.: (d) 460
 Podešva J.: (l) 404
 Pokorný A. G.: (os.zp.) 82, 259, 961,
 (s) 969, (b) 69
 Polák J.: (l) 321, 453
 Popkov A.: (s) 78
 Pospíšil L.: (rec) 334
 Potáček M.: (os.zp.) 144
 Pouzar M.: (l) 197
 Poživil J.: (os.zp.) 961
 Praus P.: (l) 241
 Prousek J.: (l) 331
 Prugar J.: (os.zp.) 407
 Psotová J.: (l) 1010
 Punčochářová J.: (ref) 909
- Quaiserová V.: (l) 1014
- Raab M.: (os.zp.) 1028
 Reháková M.: (os.zp.) 261
 Richt V.: (v.ch.) 1022
 Rosenberg M.: (ref) 105
 Ruml T.: (ref) 913
 Růžička J.: (b) 967
- Řezníčková I.: (l)48
- Sákra T.: (l) 1113
 Sejbal J.: (rec) 202
 Sekyra M.: (l) 924
 Semerád M.: (l) 1018
 Seneci P. F.: (ref) 1104
 Shorter J.: (ref) 210
 Schmeiser H.H.: (ref) 186
 Sitko P.: (l) 123
 Skácel F.: (l) 931, (z) 254
 Sklenář V.: (ref) 90
 Slanina J.: (ref) 111
 Slavík J.: (ref) 15
 Slugeň D.: (ref) 105
 Sobalík Z.: (ref) 417
 Soušek J.: (rec) 245, 334
 Sporka K.: (l) 445
 Stiborová M.: (ref) 186, 226
 Straka P.: (ref) 299
 Suchánek M.: (l) 136
 Svoboda L.: (v.ch.) 146
- Šesták J.: (s) 78
- Ševčík J.: (l) 1010
 Šibor J.: (os.zp.) 144, (s) 78
 Šimánek V.: (úv) 1, 1074, (os.zp.) 259
 Šňupárek J.: (os.zp.) 960
 Špánek I.: (ref) 10
 Štěpán M.: (l) 1018
 Štrofová J.: (v.ch.) 1022
 Štulík K.: (ref) 97, (os.zp.) 206
 Šturdík E.: (ref) 380
 Šturdíková M.: (ref) 21, 105
 Švec F.: (d) 252
 Švec M.: (ref) 494
 Švecová M.: (ref) 905, oprava 1123
- Taraba B.: (b) 955
 Tekáč V.: (l) 931
 Tichá M.: (ref) 97
 Tkaczyková M.: (ref) 994
 Tobičík J.: (ref) 411
 Tománková V.: (l) 195
 Tomášková J.: (ref) 501
 Tukač V.: (l) 449
- Uchytíl P.: (ref) 181
- Vaňková S.: (l) 48
 Vašut S.: (ref) 117
 Vázquez M. V.: (ref) 230
 Ventura K.: (l) 235, (os. zp.) 260,
 (b) 64, 472
 Vokál J.: (l) 449
 Volf J.: (l) 456
 Volke J.: (ref) 1075, (rec) 55, 459
 Volkeová V.: (ref) 1075
 Vondrášek J.: (ref) 494
 Vřešťál J.: (l) 123
 Vytřas K.: (os.zp.) 260
- Wiegrebe W.: (os.zp.) 263
- Yosypchuk B.: (l) 1118
- Zachař P.: (rec) 967
 Zdebski O.: (ref) 437
 Zemánek F.: (b) 957
 Zemanová M.: (ref) 1081
 Zíka I.: (ref) 919
 Zima J.: (l) 1014, (s) 1124
 Zimová G.: (l) 132
- Žídková J.: (ref) 1093
 Žilková N.: (ref) 278

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ
CZECH CHEMICAL SOCIETY

vydává ve spolupráci
s Vysokou školou chemicko-technologickou, Praha,
s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem
organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční
podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
ČR

published in cooperation
with Institute of Chemical Technology, Prague,
Czech Society of Industrial Chemistry, Institute of
Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of
Science of the Czech Republic, and with financial
assistance of Ministry of Education, Youth and Sports
of the Czech Republic

CHEMICKÉ LISTY

CHILSAC 94, 409 – 1132 (2000)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redaktoři

Editors

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. GUT, J. HETFLEJŠ, P. CHUCHVALEC, J. PODEŠVA, P. RAUCH,
J. VOLKE

Bulletin

Bulletin

M. BLÁHOVÁ, M. FERLES, B. VALTER, I. VALTEROVÁ

Zahraniční a oblastní redaktoři

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), L. OPLETAL (Hradec Králové), J. SOUŠEK (Olomouc), J. ŠIBOR (Brno)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUZSOVÁ, J. HANIKA, J. CHURÁČEK, Č. JECH, J. KAŠ,
J. KOŠTÍŘ †, J. KOUBEK, L. LAPČÍK, J. LEDERER, T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA,
P. PAVLAS, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

C. JIRÁTOVÁ

Ročník 94 (2000)

Volume 94 (2000)

Listy chemické, ročník 124 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 110

Str. 409 – 1132

ISSN 0009-2770

